

**Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese der  
Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub>**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

**Manuel Wolpert**

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2007

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

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

## Publikationen und Tagungsbeiträge aus der vorliegenden Arbeit

### Publikationen:

**Wolpert, M., Gust, B., Kammerer, B. and Heide, L. (2007).**

Effects of deletions of *mbtH*-like genes on clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **153**, 1413-1423

**Wolpert, M., Kammerer, B., Heide, L. and Gust, B.**

Assembly and heterologous expression of the coumermycin A<sub>1</sub> gene cluster and production of new derivatives by genetic engineering. Akzeptiert *ChemBioChem*.

### Patentanmeldung:

Neue Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate sowie Verfahren zu ihrer gentechnischen Herstellung. Anmelder: Universität Tübingen; Erfinder: **Wolpert, M. und Heide, L. (2007)**; Deutsches Patentamt, Aktenzeichen 10 2007 052 119.99 (vom 31.10.2007).

### Tagungsbeiträge:

#### *Vorträge:*

**Heterologous expression of the gene clusters of the aminocoumarin antibiotics: Clorobiocin, Novobiocin and Coumermycin A<sub>1</sub>**

ActinoGEN-Meeting, Paris, Januar 04-06, 2006

#### *Posterpräsentation:*

**Assembly and heterologous expression of the coumermycin A<sub>1</sub> gene cluster and production of new derivatives by genetic engineering**

Manuel Wolpert, Lutz Heide, Bernd Kammerer and Bertolt Gust

14<sup>th</sup> International Symposium on the Biology of *Actinomycetes*, Newcastle, August 26-30, 2007

und

VAAM-Tagung, "Biology of Bacteria Producing Natural Products", Saarbrücken, Oktober 02-06, 2007



# I. INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Streptomyceten und ihre Sekundärstoffe .....	1
1.2	Aminocoumarine.....	2
1.3	Wirkung und Wirkspektrum der Aminocoumarine .....	3
1.4	Organisation der Aminocoumarin-Gencluster .....	5
1.4.1	Resistenzgene .....	7
1.4.2	Regulatorgene.....	7
1.4.3	Gene der Aminocoumarinringbiosynthese.....	8
1.4.4	Gene der Desoxyzuckerbiosynthese.....	9
1.4.5	Gene für die Biosynthese der Acylkomponenten.....	9
1.4.6	Gene für die Verknüpfung der einzelnen Strukturelemente.....	10
1.4.7	Gene für die Substitution des Desoxyzuckers.....	11
1.4.8	Gene ohne eindeutige Funktionszuordnung .....	12
1.5	Klonierung der Aminocoumarin-Gencluster und heterologe Expression .....	12
1.6	<i>mbtH</i> und <i>mbtH</i> -ähnliche Gene.....	14
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	16
1.7.1	<i>mbtH</i> -Projekt .....	16
1.7.2	Coumermycin-Projekt .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1	Chemikalien .....	18
2.2	Enzyme und Kits .....	19
2.3	Nährmedien, Puffer und Lösungen .....	20
2.3.1	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	20
2.3.2	Medien zur Kultivierung von Streptomyceten .....	20
2.3.3	Clorobiocin-Produktionsmedium .....	22
2.3.4	Coumermycin A <sub>1</sub> -Produktionsmedium .....	23
2.3.5	Medien zur Protoplastentransformation von Streptomyceten.....	23
2.4	Anzucht und Kultivierung von Bakterien .....	24
2.4.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> -Kulturen .....	24
2.4.2	Anzucht und standardisierte Kultivierung von Streptomyceten .....	24
2.4.3	Kultivierung von Streptomyceten zur Produktion von Clorobiocin und Novclobiocin 102 .....	25
2.4.4	Kultivierung von Streptomyceten zur Produktion von Coumermycin A <sub>1</sub> und Coumermycin A <sub>1</sub> -Derivaten.....	25
2.5	Extraktion von Streptomyceten-Kulturen .....	25
2.5.1	Clorobiocin-Extraktion.....	25
2.5.2	Extraktion von Coumermycin A <sub>1</sub> und Coumermycin A <sub>1</sub> -Derivaten.....	26
2.6	Analytik.....	26
2.6.1	HPLC-Analytik von Clorobiocin und Novclobiocin 102 .....	26
2.6.2	HPLC-Analytik von Coumermycin A <sub>1</sub> und Coumermycin A <sub>1</sub> -Derivaten.....	27
2.6.3	Massenspektroskopie zur Strukturaufklärung neuer Coumermycin A <sub>1</sub> -Derivate 28	
2.7	Methoden der Molekularbiologie.....	28
2.7.1	DNA-Isolation aus <i>E. coli</i> .....	28
2.7.2	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	29
2.7.3	Alkoholische DNA-Präzipitation .....	29
2.7.4	Phenol-Chloroform Extraktion.....	29
2.7.5	Isolierung genomischer DNA aus Streptomyceten .....	29
2.7.6	Nachweis von Plasmiden aus Streptomyceten .....	30
2.7.7	DNA-Restriktion .....	30

# I. INHALTSVERZEICHNIS

2.7.8	Auffüllreaktion von DNA mit Hilfe von T4-DNA-Polymerase .....	30
2.7.9	Dephosphorylierung von DNA .....	31
2.7.10	DNA-Ligation .....	31
2.7.11	DNA-Gelelektrophorese.....	31
2.7.12	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	32
2.7.13	CaCl <sub>2</sub> -Transformation .....	32
2.7.14	Herstellung elektroporationskompetenter Zellen.....	32
2.7.15	Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	33
2.7.16	Protoplastierung von Streptomycceten .....	33
2.7.17	PEG-vermittelte Protoplastentransformation .....	34
2.7.18	Konjugation in Streptomycceten.....	34
2.7.19	Herstellung von doppel cross-over Mutanten .....	35
2.7.20	DNA-Sequenzierung .....	36
2.7.21	PCR-Bedingungen.....	36
2.7.22	Bestimmung der antibakteriellen Aktivität .....	37
2.8	Puffer und Lösungen der molekularen Zellbiologie .....	37
2.8.1	Antibiotikalösungen .....	37
2.8.2	Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden und Cosmiden aus <i>E. coli</i> 38	
2.8.3	Puffer zur DNA-Gelelektrophorese .....	38
2.8.4	Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomycceten .....	39
2.8.5	Puffer und Lösungen zur Isolation von genomischer DNA aus Streptomycceten 39	
2.8.6	Lösungen zur Blau-Weiß-Selektion in <i>E. coli</i> .....	39
2.9	Plasmide, Cosmide und Bakterienstämme .....	40
2.10	Herstellung verwendeter Bakterienmutanten und DNA-Konstrukte .....	44
2.10.1	Herstellung der $\Delta mbtH$ Cosmide cloMW15 und cloMW16 .....	44
2.10.2	Deletion der <i>mbtH</i> -homologen Gene in <i>S. coelicolor</i> M512 .....	44
2.10.3	Herstellung der Komplementationskonstrukte für <i>S. coelicolor</i> MW03.....	45
2.11	Herstellung der Plasmide pMWcloF, pAE_ha7 und pVD1 .....	46
2.11.1	Herstellung von pMWcloF .....	46
2.11.2	Plasmide pAE_ha7 und pVD1 .....	46
2.12	Konstruktion der <i>S. rishiriensis</i> -Cosmidbank .....	46
2.13	PCR-screening der Cosmidbank .....	47
2.14	Identifizierung der Cosmide 49F3 und 51D9.....	47
2.15	Klonierung des gesamten Coumermycin A <sub>1</sub> -Genclusters über $\lambda$ RED-vermittelte Rekombination .....	48
2.15.1	Herstellung von Cosmid couMW12.....	48
2.15.2	Herstellung von Cosmid couMW13.....	48
2.15.3	Herstellung von Cosmid couMW14.....	49
2.15.4	Herstellung von Cosmid couMW15 und couMW16.....	49
2.15.5	Herstellung der $\Delta couO$ Cosmide couMW17 und couMW18.....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1	Untersuchungen zur Funktion des <i>mbtH</i> -ähnlichen Gens <i>cloY</i> aus dem Clorobiocingencluster .....	52
3.1.1	<i>mbtH</i> -ähnliche Gene und mögliche Funktionszuordnungen.....	52
3.1.2	Inaktivierung von <i>cloY</i> im Clorobiocinbiosynthesegencluster und heterologe Expression des $\Delta cloY$ Genclusters .....	53
3.1.3	Inaktivierung der <i>mbtH</i> -Homologen im Genom von <i>S. coelicolor</i> M512 und Herstellung der $\Delta mbtH$ Doppelmutante <i>S. coelicolor</i> MW03.....	57

## I. INHALTSVERZEICHNIS

3.1.4	Heterologe Expression des $\Delta cloY$ Genclusters cloMW16 in der <i>S. coelicolor mbtH</i> Doppelmutante <i>S. coelicolor</i> MW03 und Analyse der Clorobiocinproduktion.....	58
3.1.5	Komplementierung der <i>mbtH</i> Dreifachmutante <i>S. coelicolor</i> MW03(cloMW16) mit <i>cloY</i> , <i>CDA-ORFX</i> und <i>cchK</i> .....	60
3.1.6	Komplementierung der <i>mbtH</i> Dreifachmutante <i>S. coelicolor</i> MW03(cloMW16) mit <i>couY</i> aus dem Coumermycin A <sub>1</sub> -Gencluster .....	62
3.1.7	Nachweis des Einflusses von <i>cloY</i> auf die Bildung der 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarineinheit .....	62
3.1.8	Heterologe Expression des Novobiocingenclusters in der <i>mbtH</i> Doppelmutante <i>S. coelicolor</i> MW03 .....	64
3.2	Untersuchungen zur heterologen Expression des Coumermycin A <sub>1</sub> -Genclusters und zur Herstellung neuer Coumermycin A <sub>1</sub> -Derivate .....	65
3.2.1	Herstellung einer <i>S. rishiriensis</i> Cosmidbank und Konstruktion des Cosmids couMW16 mit dem vollständigen Coumermycin A <sub>1</sub> -Gencluster .....	65
3.2.2	Sequenzierung von Cosmid couMW16.....	70
3.2.3	Heterologe Expression von Cosmid couMW16 und Coumermycin A <sub>1</sub> -Produktion in <i>S. coelicolor</i> M512 .....	72
3.2.4	Inaktivierung des C-Methyltransferasgens <i>couO</i> und Expression des resultierenden Cosmids couMW18 in <i>S. coelicolor</i> M512 .....	73
3.2.5	Identifizierung von Coumermycin LW1 aus <i>S. coelicolor</i> (couMW18).....	75
3.2.6	Heterologe Expression des Halogenasgens <i>clo-hal</i> in <i>S. coelicolor</i> (couMW18).....	76
3.2.7	Antibakterielle Aktivität der neuen Coumermycin A <sub>1</sub> -Derivate.....	78
3.2.8	Expression der putativen Prephenat-Dehydrogenase <i>cloF</i> im heterologen Coumermycin A <sub>1</sub> -Produzenten .....	79
3.2.9	Expression des Regulatorgens <i>novG</i> im heterologen Coumermycin A <sub>1</sub> -Produzenten.....	81
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
4.1	<i>mbtH</i> -Projekt .....	82
4.2	Coumermycin-Projekt .....	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>102</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>106</b>
	<b>Akademische Lehrer .....</b>	<b>107</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>108</b>



## II. ABKÜRZUNGEN

### Abkürzungen

°C	Grad Celcius
μ	mikro
<i>aac(3)/IV</i>	Apramycin-Resistenzgen
ACP	Acylcarrierprotein
Amp	Ampicillin
Apra	Apramycin
Arg	Arginin
As	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>cchK</i>	<i>S. coelicolor</i> Gen SCO0489: <i>cchK</i> aus dem Coelichelin (cch)-Gencluster
<i>CDA-ORFX</i>	<i>S. coelicolor</i> Gen SCO3218; <i>ORFX</i> aus dem calcium dependent antibiotic (CDA)-Gencluster
CoA	Coenzym A
d	Durchmesser
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNDP	Desoxyribonukleosiddiphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAB	Fast atom bombardment
FRT	FLP recognition target
g	Gramm
GC-Gehalt	Guanosin- und Cytosin-Gehalt
GyrB	Gyrase B-Untereinheit
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
k	Kilo
Kan	Kanamycin

## II. ABKÜRZUNGEN

kb	Kilobasen
l	Liter
<i>lacZ<math>\alpha</math></i>	$\beta$ -Galaktosidase-Gen
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung
m	milli
M	molar
Mb	Megabasenpaare
<i>mbtH</i>	Mycobactincluster Gen H; <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ,
min	Minute(n)
MS	Massenspektroskopie, Massenspektrum
MW	Molekulargewicht
n	Nano
<i>neo</i>	Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen
NRPS	Nichtribosomale Peptidsyntase
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	pico
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
ppm	Parts per million
<sup>R</sup>	Resistent
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<sup>s</sup>	Sensitiv(ität)
s	Sekunde
s.	siehe
S.	<i>Streptomyces</i>
Ser	Serin
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Streptomyceten und ihre Sekundärstoffe

Streptomyceten sind ubiquitär vorkommende Gram-positive Bakterien und bilden mit den Aktinomyceten zwei artenreiche Gattungen innerhalb der Klasse der *Aktinobacteria*. Die meisten Formen leben obligat aerob und stellen einen wichtigen Teil der Bodenmikroflora dar. Der charakteristische, hyphen-ähnliche Wuchs führt bei optimalem Nährstoffangebot zur Bildung von filamentösem, den Pilzen ähnlichem, Substratmycel. Verschlechtert sich das Nährstoffangebot der natürlichen Umgebung kommt es zur Bildung von Luftmycel, von dem Sporen als Dauerformen abgegliedert werden können.

Neben dem hohen GC-Gehalt und der ungewöhnlichen Genomgröße von 8-10 Mb (Bentley *et al.*, 2002; Bibb *et al.*, 1984; Ikeda *et al.*, 2003) ist das große Spektrum der von Streptomyceten produzierten Sekundärmetabolite ein weiteres charakteristisches Merkmal. Die Gene, die für die Synthese bestimmter Sekundärstoffwechselprodukte verantwortlich sind, liegen hierbei in Genclustern vor, d.h. auf zusammenhängenden Abschnitten des Genoms. Diese Cluster können alle Biosynthesegene, Regulatorgene sowie Resistenzgene z.B. für die Bildung eines Antibiotikums enthalten. Das zahlreiche Auftreten solcher Biosynthesegencluster innerhalb der Streptomyceten und die damit einhergehende Produktion unterschiedlichster Sekundärstoffwechselprodukte macht diese Gattung unter pharmazeutischen Gesichtspunkten höchst interessant. So sind bis heute mehr als 3000 biologisch aktive Substanzen aus Streptomyceten isoliert worden, darunter wichtige Antibiotika wie die Tetracycline, Vancomycin und Erythromycin (Watve *et al.*, 2001). Die Gruppe der von Streptomyceten gebildeten Substanzen umfasst weiterhin Zytostatika, Antimykotika, Virustatika und Herbizide (von Döhren & Gräfe, 1997). Die ständige Entwicklung neuer molekularer Techniken zur genetischen Manipulation, wie auch das stetig steigende Wissen über Sequenzinformationen, haben zu einem detaillierten Verständnis der genetischen und biochemischen Grundlagen der Sekundärmetabolitbiosynthese geführt. Fundierte Kenntnisse liegen insbesondere für Vertreter der Makrolid-Antibiotika, Peptid-Antibiotika, Tetracycline, Anthracycline, Aminoglycoside und Aminocoumarine vor (von Döhren & Gräfe, 1997).

## 1.2 Aminocoumarine

Die Gruppe der Aminocoumarin-Antibiotika schließt die strukturell eng verwandten Substanzen Novobiocin, Clorobiocin, Coumermycin A<sub>1</sub>, sowie die strukturell diversen Aminocoumarine Simocyclinon D8 und Rubradirin ein (Abbildung 1). Natürliche Produzenten von Coumermycin A<sub>1</sub> sind die Stämme *Streptomyces rishiriensis*, *S. hazeliensis* var. *hazeliensis*, *S. spinichromogenes* und *S. spinicoumarensis* (Berger & Batcho, 1978; Kawaguchi *et al.*, 1965). Clorobiocinproduzenten sind *S. albocinerescens*, *S. hygrosopicus* und *S. roseochromogenes* var. *oscitans* (Mancy *et al.*, 1974; Ninet *et al.*, 1972). Novobiocin wird von *S. caeruleus* produziert. Dieses Synonym wird für die Stämme *S. spheroides* und *S. niveus* (Berger & Batcho, 1978; Smith *et al.*, 1956) verwendet, da die Vermutung vorliegt, dass es sich um unabhängige Isolate des gleichen Stamms handelt (Lanoot *et al.*, 2002).

Allen Substanzen ist der namensgebende Aminocoumarinring gemeinsam. In Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> (Abbildung 1) ist die 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarineinheit an Position 7 O-glykosidisch mit einem Desoxyzucker verbunden. Die Position 3 des Aminocoumarinrings ist über eine Amidbindung mit einer Acylkomponente verknüpft. Bei Simocyclinon D8 und Rubradirin fehlt die Glykosylierung der 7-OH-Gruppe, und ihre Acylkomponenten sind von größerer und komplizierterer Struktur (Abbildung 1). Clorobiocin und Novobiocin sind durch einen terminalen 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäurerest gekennzeichnet, wohingegen im Coumermycin A<sub>1</sub>-Molekül zwei substituierte Aminocoumarineinheiten über eine Amidbindung mit einer 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure verbunden sind. Im Novobiocin-Molekül ist der Desoxyzucker an Position 3 mit einer Carbamoylgruppe verknüpft, während in Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> diese Position mit einer 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure verestert ist. Die unterschiedliche Substitution der Position 8 des 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarinrings mit einem Chloratom im Clorobiocin- und Simocyclinon D8-Molekül, oder einer Methylgruppe bei Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub>, charakterisiert die Substanzen weiterhin.

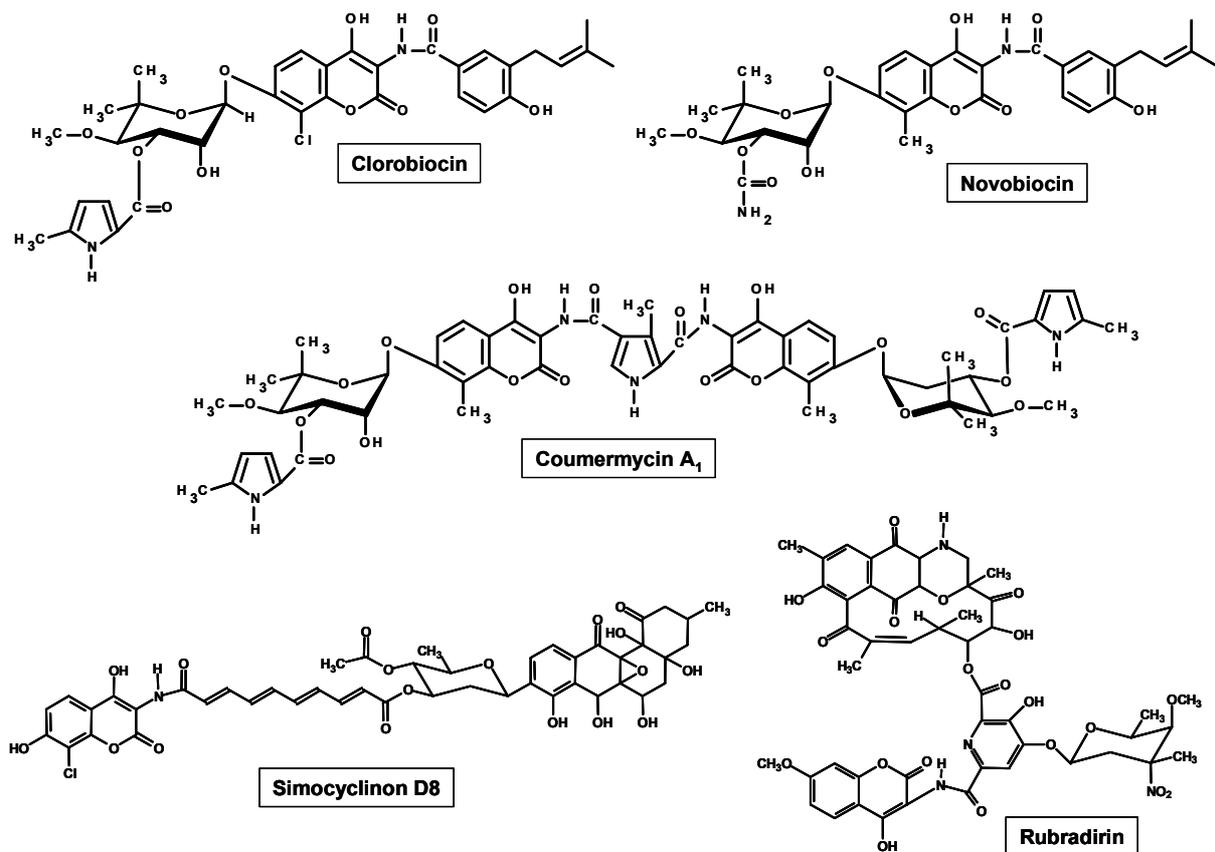


Abbildung 1: Strukturen der Aminocoumarin-Antibiotika

### 1.3 Wirkung und Wirkspektrum der Aminocoumarine

Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> sind potente Inhibitoren der bakteriellen DNA-Gyrase. Diese gehört zur Klasse der Typ II Topoisomerasen und katalysiert die ATP-abhängige Einführung negativer Supercoils in doppelsträngige DNA. Sie ist damit essentiell an wichtigen bakteriellen DNA-Prozessen wie Transkription, Rekombination und Replikation beteiligt. Ihr ausschließliches Auftreten in Prokaryoten macht sie außerdem zu einem geeigneten Angriffspunkt für Substanzen mit antibiotischer Wirkung (Maxwell, 1997). Die *E. coli* DNA-Gyrase setzt sich aus den zwei Proteinen GyrA und GyrB zusammen, die einen aktiven Enzymkomplex durch ein A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-Heterodimer bilden. Strukturaufklärungen zeigten, dass die GyrA-Untereinheit von einem 97 kDa Protein gebildet wird, wobei dessen N-terminale Domäne am DNA-Strangbruch und der Religation beteiligt ist. Die C-terminale Domäne ist in die DNA-Protein Interaktion involviert. Die GyrB-Untereinheit

besteht aus einem 90 kDa Protein, wobei dessen N-terminale Domäne (43 kDa) die ATPase-Funktion trägt, und die C-terminale Domäne an der Interaktion zwischen DNA und GyrA-Protein beteiligt ist (Maxwell, 1997).

Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> sind kompetitive Inhibitoren der ATPase-Reaktion, die durch das GyrB-Protein der DNA-Gyrase katalysiert wird. Röntgenstrukturanalysen einer 24 kDa N-terminalen Subdomäne der *E. coli* Gyrase Untereinheit B haben gezeigt, dass eine Komplexbildung zwischen dem GyrB Protein und den Antibiotika Novobiocin (Lewis *et al.*, 1996) und Clorobiocin (Tsai *et al.*, 1997) über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommt. Dabei besetzen die Liganden nicht die Bindungsstelle des eigentlichen Substrats ATP, sondern überlappen mit ihrem Desoxyzucker die Bindungstasche für den Adeninring von ATP. Im Vergleich dazu inhibieren Fluorochinolone die gyrasekatalysierte Supercoilingreaktion, indem sie den DNA-Strangbruch und die Religations-Reaktion durch Bindung an das GyrA-Protein hemmen (Jacoby, 2005). Hardy und Cozzarelli (Hardy & Cozzarelli, 2003) haben die Topoisomerase IV (Topo IV), ebenfalls eine wichtige bakterielle Typ II Topoisomerase, als ein weiteres Target von Novobiocin vorgeschlagen. Die Topoisomerase IV von *E. coli* weist eine ähnliche Struktur wie die bakterielle DNA-Gyrase auf: zwei ParC und zwei ParE Untereinheiten bilden einen ParC<sub>2</sub>ParE<sub>2</sub>-Enzymkomplex. ParC ist für den DNA-Strangbruch und dessen Religation verantwortlich, während ParE die ATP-Bindungstasche beinhaltet. Die Autoren haben nach Mutationsexperimenten in der ParE-Untereinheit gefolgert, dass Novobiocin die Topoisomerase IV in ähnlicher Weise wie die DNA-Gyrase hemmt.

*In vitro* Untersuchungen und Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, dass der Aminocoumarinring und der substituierte Desoxyzucker der Aminocoumarin-Antibiotika essentiell an der Targetbindung beteiligt sind (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996; Maxwell, 1993; Tsai *et al.*, 1997). Die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäureeinheit von Clorobiocin und Novobiocin hat ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die Bindungsaffinität der Substanzen (Galm *et al.*, 2004b; Lafitte *et al.*, 2002). Interessanterweise zeigt das Aglykon von Clorobiocin, d.h. Clorobiocinsäure, aber nicht Novobiocinsäure, inhibierende Wirkung auf die *in vivo* DNA-Synthese und die *in vitro* Gyraseaktivität (Althaus *et al.*, 1988; Reusser & Dolak, 1986). Dabei ließ sich eine wichtige Beteiligung des Chloratoms für die biologische Aktivität von Clorobiocin vermuten, was später durch die Herstellung und

Testung verschiedener Clorobiocinanaloga bestätigt werden konnte (Eustáquio *et al.*, 2003a; Eustáquio *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass Novobiocin und Clorobiocin die Gyrase B Untereinheit als Monomer binden, während Coumermycin A<sub>1</sub> die GyrB-Einheit als Dimer stabilisiert (Ali *et al.*, 1993; Maxwell & Lawson, 2003).

Die Aminocoumarin-Antibiotika weisen eine große Wirksamkeit gegenüber Gram-positiven Bakterien, einschließlich Methicillin- und Vancomycinresistenter *Staphylococcus*-Stämme, auf. Novobiocin wurde als einzige der drei Substanzen in den USA zur Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* unter dem Handelsnamen Albamycin<sup>®</sup> zugelassen. Die häufig auftretenden Nebenwirkungen und eine rasche Resistenzentwicklung verhinderten jedoch eine breite Anwendung dieses Antibiotikums. Jüngere Studien zeigen neben dem rein antibiotischen Effekt der Aminocoumarine auch eine synergistische Wirkung mit Antitumormedikamenten (Lorico *et al.*, 1992; Rappa *et al.*, 1992; Rappa *et al.*, 2000). Interaktionen mit dem eukaryotischen Hitzeschockprotein Hsp90 wurde ebenfalls beschrieben (Burlison *et al.*, 2006; Burlison & Blagg, 2006; Huang & Blagg, 2007).

### 1.4 Organisation der Aminocoumarin-Gencluster

Die Klonierung und Sequenzierung der drei Aminocoumarin-Gencluster bildete die Basis für Untersuchungen zur Novobiocin-, Clorobiocin- und Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthese. Vorangegangene Fütterungsexperimente mit Isotopen-markierten Substanzen, sowie die Verwendung von Mutantenstämmen lieferten bis dahin wichtige Erkenntnisse zum Verständnis dieser Stoffwechselwege (Birch *et al.*, 1962; Bunton *et al.*, 1963; Holzenkämpfer & Zeeck, 2002; Orihara *et al.*, 1998; Scannell & Kong, 1969). Sequenzvergleiche der drei Gencluster zeigen, dass sich die strukturelle Ähnlichkeit der Substanzen auch in der Organisation ihrer Gencluster widerspiegelt (Abbildung 2). Die drei Gencluster von Clorobiocin (35,4 kb), Novobiocin (23,2 kb) und Coumermycin A<sub>1</sub> (38,6 kb) zeigen dabei deutliche Gemeinsamkeiten in der Organisation der Gene, die beispielsweise an der Bildung des 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarinrings (*H, I, J, K*), oder an der Desoxyzuckerbiosynthese (*S, T, U, V, W*) beteiligt sind. Je nach strukturellen Gemeinsamkeiten finden sich in den Clustern die orthologen Gene an den

entsprechend selben Positionen. Das Gen für die C-8 Methylierung (*couO/novO*) des Aminocoumarinrings tritt sowohl im Coumermycin A<sub>1</sub>- als auch im Novobiocingencluster an der gleichen Position auf. Im Clorobiocingencluster findet sich an dieser Stelle das Gen *clo-hal*, das für die Halogenierung der 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarineinheit an Position C-8 verantwortlich ist (Eustáquio *et al.*, 2003a). Sequenzvergleiche sowie genetische und biochemische Untersuchungen haben die Funktionszuordnung für beinahe jedes Gen innerhalb der Aminocoumarin-Gencluster ermöglicht.

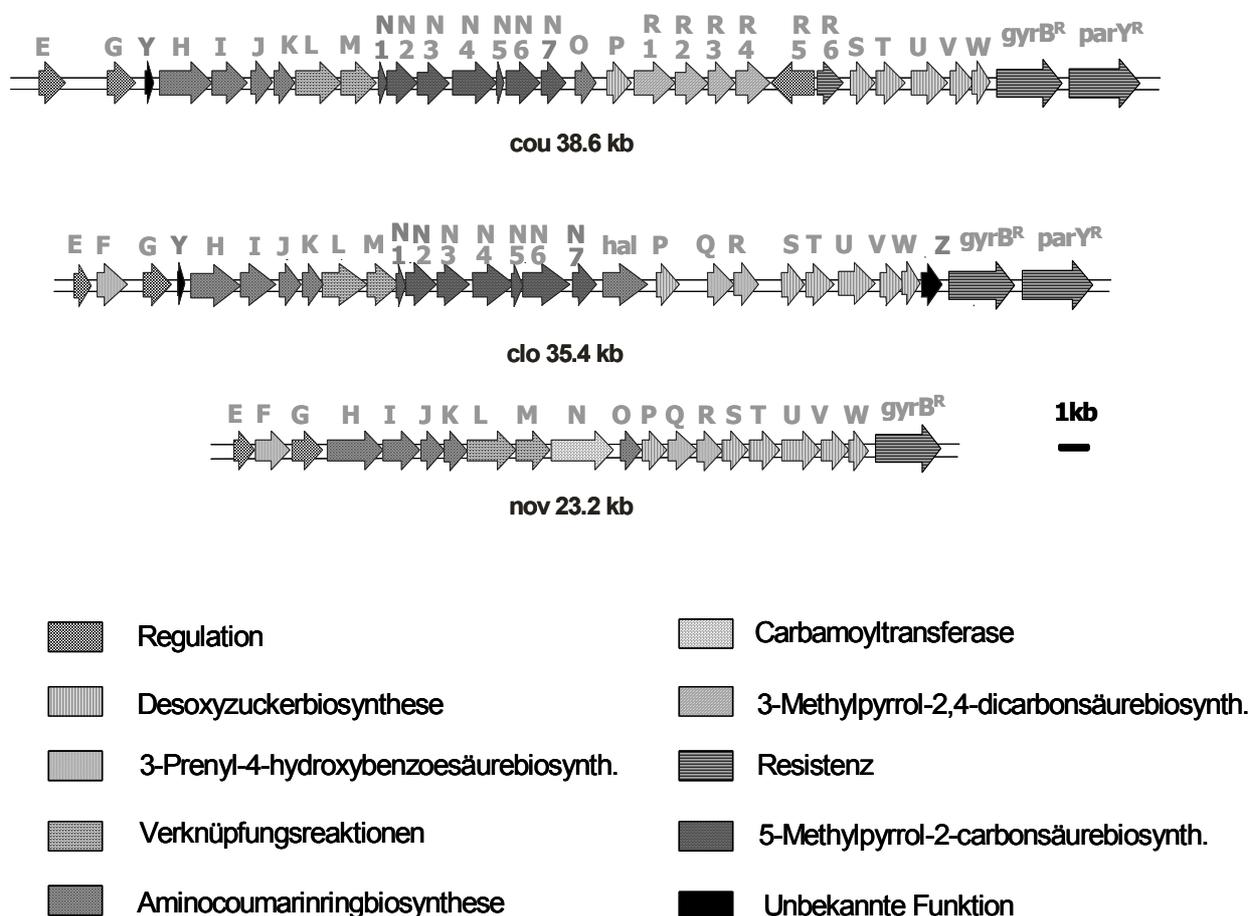


Abbildung 2: Biosynthesecluster von Coumermycin A<sub>1</sub> (cou), Clorobiocin (clo) und Novobiocin (nov).

### 1.4.1 Resistenzgene

Die Produktion hochwirksamer Antibiotika ist nur dann möglich, wenn sich die Produzenten vor dem inhibitorischen Effekt dieser Substanzen schützen können. Es wurde gezeigt, dass der Resistenzmechanismus des Novobiocinproduzenten *S. spheroides* auf der *de novo* Synthese einer aminocoumarinresistenten Gyrase B-Untereinheit beruht (Thiara & Cundliffe, 1988). Das GyrB<sup>R</sup>-Protein ersetzt dabei die konstitutiv gebildete coumarinsensitive Untereinheit GyrB<sup>S</sup> im aktiven Heterodimer der bakteriellen DNA-Gyrase. Das entsprechende *gyrB<sup>R</sup>*-Gen konnte in allen drei Aminocoumarin-Genclustern identifiziert werden. Daneben enthalten die Gencluster von Coumermycin A<sub>1</sub> und Clorobiocin ein weiteres Gen (*parY<sup>R</sup>*) das ebenfalls hohe Sequenzhomologie zur B-Untereinheit von Typ II Topoisomerasen zeigt. Die heterologe Expression von *gyrB<sup>R</sup>* und *parY<sup>R</sup>* in *S. lividans* TK24 resultierte in einer etwa vergleichbar stark ausgeprägten Resistenz gegenüber Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> (Schmutz *et al.*, 2003a). Ebenso konnte gezeigt werden, dass GyrB<sup>R</sup> alleine eine Resistenz gegen Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> vermittelt. Die heterologe Expression und Aufreinigung von GyrB<sup>R</sup> und ParY<sup>R</sup> des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters und der korrespondierenden Topoisomerase Untereinheiten GyrA und ParX aus *S. coelicolor* hat gezeigt, dass der *in vitro* Komplex GyrA/GyrB<sup>R</sup> die ATP-abhängige Überspiralisierung der DNA katalysiert. Für den ParX/ParY<sup>R</sup>-Komplex konnte eine ATP-abhängige Funktion bei der Relaxation und Entkettung der DNA nachgewiesen werden. Diese Funktion wird üblicherweise der Topoisomerase IV zugeschrieben (Schmutz *et al.*, 2004). Damit wurde die Hypothese gestärkt, dass Topo IV ein weiteres biologisches Target der Aminocoumarine darstellen könnte.

Im Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster findet sich zusätzlich das Gen *couR5*, das für ein putatives Transportprotein codiert. Die heterologe Expression von *couR5* in *S. lividans* TK24 führte zu einem moderaten Resistenzlevel gegenüber Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub>, was auf eine Funktion im Antibiotikatransport schließen lässt (Schmutz *et al.*, 2003a).

### 1.4.2 Regulatorgene

Die Aminocoumarin-Gencluster von Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> enthalten jeweils zwei Gene, die Sequenzhomologie zu Regulatorgenen aufweisen. Die Gene *novE*, *cloE* und *couE* zeigen Sequenzähnlichkeiten zu dem putativen

Regulator *ImbU* aus dem Lincomycingencluster (Peschke *et al.*, 1995). Die Inaktivierung von *novE* im natürlichen Novobiocinproduzenten *S. spheroides* NCIMB 11891 führte zu einer deutlich geringeren Novobiocinproduktion im Vergleich zum Wildtyp (Eustáquio *et al.*, 2003b). Daneben spricht das Vorhandensein eines TTA-Codons in der *novE* Sequenz für regulatorische Eigenschaften dieses Gens (Li *et al.*, 2007). Weitere Untersuchungen zum Einfluss von *novE* auf die Novobiocinbiosynthese werden derzeit von V. Dangel durchgeführt. Die Gene *novG*, *cloG* und *couG* zeigen Sequenzähnlichkeit zu *strR*, einem positiven Regulator im Streptomycingencluster von *S. griseus* (Retzlaff & Distler, 1995). Innerhalb von NovG konnte ein helix turn helix (HTH) Motiv identifiziert werden, welches charakteristisch für bakterielle Regulatorproteine ist (Pabo & Sauer, 1992). Die DNA-bindenden und regulatorischen Eigenschaften von NovG in der Novobiocinbiosynthese konnten weiterhin experimentell bewiesen werden (Eustáquio *et al.*, 2005b). Die Inaktivierung von *novG* im Novobiocingencluster resultierte in einer um 98 % verminderten Novobiocinproduktion. Überexpressionsexperimente mit *novG* führten hingegen zu einer dreifachen Produktionssteigerung (Eustáquio *et al.*, 2005b). Im Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster findet sich zusätzlich das Gen *couR6*. CouR6 besitzt in seiner N-terminalen Region ebenfalls ein putatives helix turn helix (HTH) Motiv und weist Sequenzhomologie zu transkriptionellen Regulatoren vom LysR-Typ auf. Es wird spekuliert, dass *couR6* in die Regulation des Transportproteins CouR5 (Schmutz *et al.*, 2003a) involviert ist.

### 1.4.3 Gene der Aminocoumarinringbiosynthese

Die Biosynthese des charakteristischen 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarinrings konnte innerhalb des Novobiocingenclusters den Genprodukten von *novH*, *I*, *J* und *K* zugeschrieben werden. Den entsprechend orthologen Genen *cloH*, *I*, *J*, *K* bzw. *couH*, *I*, *J*, *K* werden aufgrund großer Sequenzähnlichkeiten die selben Funktionen zugeschrieben. Chen und Walsh (2001) zeigten die Aktivierung von Tyrosin durch dessen Bindung an NovH und die anschließende  $\beta$ -Hydroxylierung durch das Cytochrom P<sub>450</sub> Enzym NovI. Das Heterotetramer NovJ<sub>2</sub>K<sub>2</sub> katalysiert anschließend die  $\beta$ -Ketotyrosin-Bildung ausgehend von  $\beta$ -Hydroxytyrosin (Chen & Walsh, 2001; Pacholec *et al.*, 2005a).

Während Coumermycin A<sub>1</sub> und Novobiocin an Position C-8 des Aminocoumarinrings eine Methylgruppe tragen, ist Clorobiocin an dieser Stelle mit einem Chloratom substituiert. Das für die C-8-Methylierung verantwortliche Gen (*couO* bzw. *novO*) als auch das für die Chlorierung verantwortliche Gen (*clo-hal*) konnte in den entsprechenden Genclustern identifiziert und der jeweiligen Funktion als Methyltransferase bzw. Halogenase zugeordnet werden (Eustáquio *et al.*, 2003a; Eustáquio *et al.*, 2004; Westrich *et al.*, 2003). Experimente zur kombinatorischen Biosynthese mit diesen Genen führten erfolgreich zur Synthese neuer Aminocoumarin-Derivate (Eustáquio *et al.*, 2003a; Eustáquio *et al.*, 2004).

### 1.4.4 Gene der Desoxyzuckerbiosynthese

Ein weiteres charakteristisches Strukturelement der Aminocoumarine Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> ist der O-glykosidisch gebundene Desoxyzucker 4-OH-methyl-L-Noviose. Jedes der drei Gencluster beinhaltet eine zusammenhängende Gruppe von fünf Genen [*(nov/clo/cou)S, T, U, V, W*] die am rechten (3') Ende der Cluster lokalisiert sind. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Genen die in Desoxyzuckerbiosynthesen involviert sind, wurden den Genen (*nov/clo/cou)S, T, U, V, W* die ersten fünf Schritten der Biosynthese der Desoxyzuckereinheit zugeordnet (He & Liu, 2002; Pojer *et al.*, 2002; Steffensky *et al.*, 2000b). NovS zeigt dabei Sequenzähnlichkeit zu dTDP-4-Keto-hexosereduktasen, NovT zu dTDP-Glucose-4,6-dehydratase, NovU zu S-Adenosylmethionin-(SAM)-abhängigen Methyltransferasen, NovV zu dTDP-Glucosesynthase und NovW zeigt Sequenzähnlichkeit zu dTDP-4-Keto-6-desoxy-glucoseepimerasen. Eine essentielle Beteiligung von *novT* an der Zuckerbiosynthese konnte durch Inaktivierungsexperimente im natürlichen Novobiocinproduzenten *S. spheroides* gezeigt werden (Steffensky *et al.*, 2000b).

### 1.4.5 Gene für die Biosynthese der Acylkomponenten

Novobiocin und Clorobiocin enthalten an Position 3 des Aminocoumarinrings einen prenylierten 4-Hydroxybenzoesäurerest. Im Gegensatz zum Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster finden sich im Novobiocin- und Clorobiocin-Gencluster drei Gene mit stark auffällender Sequenzähnlichkeit: *novF/cloF*, *novQ/cloQ* und *novR/cloR*. NovF und

CloF zeigen Sequenzähnlichkeit zu bekannten Prephenat-Dehydrogenasen, die die Bildung von 4-Hydroxyphenylpyruvat aus Prephenat katalysieren. Für CloQ wurde eine Funktion als Prenyltransferase nachgewiesen, die die Prenylierung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu 3-Dimethylallyl-4-hydroxyphenylpyruvat katalysiert (Pojer *et al.*, 2003b). CloR konnte die Funktion einer bifunktionellen *non-Häm* Eisenoxygenase zugewiesen werden, die 3-Dimethylallyl-4-hydroxyphenylpyruvat in zwei aufeinander folgenden Decarboxylierungsschritten zu 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure umwandelt (Keller *et al.*, 2006; Pojer *et al.*, 2003a). Es wurde somit gezeigt, dass die Gene *cloQ* und *cloR* essentiell für die Bildung der 4-Hydroxybenzoesäureeinheit sind. Den orthologen Genen des Novobiocingenclusters *novQ* und *novR* werden dieselben Funktionen zugeschrieben. Im Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster findet sich kein orthologes Gen zu *cloF* oder *novF*. Eine Sequenzanalyse des intergenetischen Bereichs upstream von *couG* führte zu zwei möglichen Proteinen von 121 As und 81 As. Diese weisen Sequenzhomologien von 77 % und 76 % zu CloF auf. Die dazugehörigen putativen Gene finden sich jedoch in zwei unterschiedlichen Leserahmen und die geringe Größe der Proteine von 121 As und 81 As lässt die Bildung einer funktionsfähigen Prephenat-Dehydrogenase (*cloF/novF* mit je 362 As) als unwahrscheinlich erscheinen. Entsprechend enthält Coumermycin A<sub>1</sub> auch keinen prenylierten 4-Hydroxybenzoesäurerest. Stattdesse findet sich im Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster eine Gruppe von Genen (*couR1* - *couR4*) denen eine Beteiligung bei der Bildung der zentralen 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäureeinheit von Coumermycin A<sub>1</sub> zugeschrieben wird (Wang *et al.*, 2000).

### 1.4.6 Gene für die Verknüpfung der einzelnen Strukturelemente

Die Verknüpfung des Aminocoumarinrings mit der Acylkomponente ist ein zentraler Schritt in der Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika. Im Fall von Clorobiocin und Novobiocin führt die Verknüpfung des Aminocoumarinrings mit der Acylkomponente zur Bildung der entsprechenden Aminocoumarinsäuren, d.h. Clorobiocinsäure oder Novobiocinsäure. Bei Coumermycin A<sub>1</sub>-Molekül werden zwei Aminocoumarinringe über zwei Amidbindungen mit der zentralen 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure verbunden. Überexpressions- sowie Inaktivierungsexperimente von NovL, CloL und CouL haben gezeigt, dass diese Enzyme als Amidsynthetasen fungieren und die beschriebenen Verknüpfungsreaktionen katalysieren (Galm *et al.*,

2004a; Schmutz *et al.*, 2003b; Steffensky *et al.*, 2000a). Die Übertragung des Desoxyzuckers auf die 7-OH-Gruppe des Aminocoumarinrings wird bei allen drei Antibiotika durch eine Glycosyltransferase katalysiert. Entsprechend konnten in den drei Genclustern die putativen Glycosyltransferasegene *cloM*, *novM* und *couM* identifiziert werden. Für NovM wurde gezeigt, dass es die Glykosylierung von Novobiocinsäure katalysiert. Das Aglykon Novobiocinsäure und TDP-L-Noviose waren hierbei die bevorzugten Substrate (Albermann *et al.*, 2003; Freel Meyers *et al.*, 2003).

### 1.4.7 Gene für die Substitution des Desoxyzuckers

Die drei Gene *novP*, *cloP* und *couP* zeigen große Sequenzhomologie zu bekannten O-Methyltransferasen. Inaktivierung von *couP* im natürlichen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten *S. rishiriensis* DSM40489 führte zur Synthese eines Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivats, das durch den Verlust der Methylgruppe an Position 4 des Desoxyzuckers gekennzeichnet war (Li *et al.*, 2002). Die Inaktivierung von *cloP* und heterologe Expression des  $\Delta cloP$  Clorobiocin-Genclusters in *S. coelicolor* M512 führte zur Produktion von 4''-Desmethylclorobiocin (Novclobiocin 112) (Freitag *et al.*, 2005a). Die Funktionszuordnung von NovP als O-Methyltransferase wurde weiterhin durch Überexpressionsexperimente bestätigt (Freel Meyers *et al.*, 2004).

Die Position 3 des Desoxyzuckers ist im Coumermycin A<sub>1</sub>- und Clorobiocin-Molekül mit einer 5-Methylpyrrol-2-carboxysäure verestert. Novobiocin trägt an dieser Position eine Carbamoylgruppe. In den Genclustern von Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> findet sich eine Gruppe von sieben Genen *cloN1-cloN7* bzw. *couN1-couN7*. Inaktivierungsexperimente der Gene *couN3* und *couN4* haben eine Beteiligung an der Biosynthese der terminalen Pyrrol-2-carbonsäureeinheit im Coumermycin A<sub>1</sub>-Molekül bewiesen. Damit wurde gleichfalls belegt, dass die Bildung der zentralen 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäureeinheit von Coumermycin A<sub>1</sub> durch einen anderen Biosyntheseweg zustande kommen muss (Xu *et al.*, 2002). Die Biosynthese der Pyrrol-2-carboxyleinheit konnte weitgehend auch durch die Überexpression von CloN3, CloN4 und CloN5, und deren *in vitro* Charakterisierung aufgezeigt werden (Garneau *et al.*, 2005). CloN2/CouN2 sind Acyltransferasen, die an der Übertragung des Pyrrolrings auf die 3''-OH Gruppe des Desoxyzuckers von Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> beteiligt sind (Xu *et al.*, 2003). Durch

Inaktivierungs- und Fütterungsexperimente konnte gezeigt werden, dass CloN1, CloN2 und CloN7 ebenfalls in den Acyltransfer mit eingebunden sind (Anderle *et al.*, 2007; Freitag *et al.*, 2005b). Inaktivierung des Gens *cloN6* in *S. roseochromogenes* und Untersuchungen der gebildeten Clorobiocin-Derivate zeigten, dass CloN6 für die C-5 Methylierung der Pyrroleinheit verantwortlich ist (Westrich *et al.*, 2003). Für *couN6* wird die selbe Funktion angenommen. Im Novobiocingencluster findet sich anstelle der Gene N1-N7 das Carbamoyltransferasegen *novN*. Der Nachweis von NovN als Carbamoyltransferase, wurde durch heterologe Expression von *novN* in einer *couN3* Defektmutante von *S. rishiriensis* und der dabei beobachteten Bildung eines carbamoylierten Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivats erbracht (Xu *et al.*, 2002).

### 1.4.8 Gene ohne eindeutige Funktionszuordnung

Die beiden Gencluster von Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> enthalten die zwei Gene *cloY* bzw. *couY*, die große Ähnlichkeit zu dem *mbtH*-Gen aus dem Mycobactingencluster von *Mycobacterium tuberculosis* aufweisen. Im Novobiocingencluster fehlt ein solches *mbtH*-ähnliches Gen. Teil dieser Arbeit war es u.a. dem Gen *cloY* eine Funktion zuzuordnen, respektive seine Notwendigkeit für die Clorobiocinbiosynthese zu beweisen.

Im Clorobiocingencluster findet sich upstream des Resistenzgens *gyrB<sup>R</sup>* das 761 bp große Gen *cloZ*, während im Novobiocin- und Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster ein *cloZ* homologes Gen fehlt. Eine vermutete Beteiligung an der Halogenierungsreaktion konnte nach Inaktivierungsexperimenten von *cloZ* jedoch nicht bestätigt werden (Eustáquio *et al.*, 2003a).

## 1.5 Klonierung der Aminocoumarin-Gencluster und heterologe Expression

Wie zuvor beschrieben sind die drei Gencluster der Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> weitgehend untersucht und charakterisiert worden (Li & Heide, 2005). Speziell die Erkenntnisse aus heterologen Expressionsversuchen und Geninaktivierungsexperimenten trugen zur Aufklärung der Biosynthese dieser Verbindungen bei. So wurden die beiden Gencluster für Novobiocin und Clorobiocin erfolgreich auf einem SuperCos1 basierenden Cosmid

kloniert (Pojer *et al.*, 2002; Steffensky *et al.*, 2000b) und nach Modifikation dieser Cosmide in das Wirtsgenom von *S. coelicolor* M512 und *S. lividans* TK24 integriert. Nach heterologer Expression der beiden Biosynthesegencluster konnten dabei Antibiotikaproduktionen ermittelt werden, die in etwa denen der natürlichen Produzenten entsprachen (Eustáquio *et al.*, 2005a). Verschiedene Modifikationen der Gencluster durch sog. „genetic engineering“ führten weiterhin zur Biosynthese neuer Aminocoumarin-Derivate. Da genetische Manipulationen der natürlichen Produzenten häufig zeitaufwendig oder schwer durchführbar sind, waren die gut beschriebenen Methoden zur Kultivierung und zur genetischen Manipulation der heterologen Expressionsstämmen *S. coelicolor* M512 und *S. lividans* TK24 von großem Nutzen (Eustáquio *et al.*, 2005a). Im Gegensatz zu den genannten Aminocoumarinen Clorobiocin und Novobiocin, standen Untersuchungen zur heterologen Expression des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters bisher aus. Der Grund hierfür war das Fehlen eines Cosmids, welches das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster beinhaltet. Studien zur Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthese setzten daher Manipulationen des natürlichen Produzenten *S. rishiriensis* DSM40489 voraus. Aufgrund der schweren Transformierbarkeit und der geringen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion (2 - 5µg/ml) von *S. rishiriensis* (Li *et al.*, 2002), schien die heterologe Expression des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters von großem Interesse. Teil dieser Arbeit war u.a. die Herstellung eines Cosmids mit dem vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster und dessen anschließende heterologe Expression. Eine Cosmidbank von *S. rishiriensis* wurde bereits auf dem replikativen Cosmidvektor pOJ446 angelegt (Wang *et al.*, 2000). Innerhalb dieser Cosmidbank konnte jedoch kein Klon identifiziert werden, der ein Cosmid mit dem vollständigen Gencluster beinhaltet. Die Sequenzierung des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters erfolgte daher ausgehend von überlappenden Cosmiden und wurde unter der Accession-Nummer AF235050 in der Datenbank hinterlegt (Wang *et al.*, 2000).

## 1.6 *mbtH* und *mbtH*-ähnliche Gene

Das Mycobactingencluster wurde 1998 von Quadri und Kollgen in *Mycobacterium tuberculosis* identifiziert (Cole *et al.*, 1998; Quadri *et al.*, 1998) und codiert für die Enzyme der Biosynthese des nichtribosomal gebildeten Peptid-Siderophors Mycobactin. Innerhalb des Genclusters konnte ein 216 bp kleiner *open reading frame* identifiziert werden, der als *mbtH* bezeichnet wurde. Eine Funktionszuordnung für dieses Gen fehlt. Gene mit hoher Sequenzähnlichkeit zu *mbtH* wurden in einer Vielzahl von bakteriellen Biosynthesegenclustern für Antibiotika und Siderophore identifiziert. Häufig treten die *mbtH*-ähnlichen Gene in Genclustern auf, die für Nichtribosomale-Peptidsynthetase (NRPS) codieren. Interessanterweise finden sich in pilzlichen NRPS-Genclustern keine *mbtH*-homologen Gene.

Der komplettsequenzierte Stamm *S. coelicolor* M145 besitzt zwei *mbtH*-ähnliche Gene. Dabei handelt es sich um das Gen *cchK* aus dem Coelichelinbiosynthesegencluster und um das Gen *CDA-ORFX* aus dem „calcium-dependent antibiotic“-Gencluster. Auch hier sind die *mbtH*-ähnlichen Gene innerhalb eines NRPS-clusters lokalisiert. In den Genclustern der Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin, Coumermycin A<sub>1</sub> und Simocyclinon D8 findet sich ebenfalls ein *mbtH*-ähnliches Gen. Trotz ihres häufigen Auftretens haben sich bisher nur wenige Studien mit Untersuchungen zur Funktion der *mbtH*-ähnlichen Gene befasst. In einigen Fällen wurde die Cotranskription von *mbtH*-Genen mit Genen die für Biosyntheseproteine codieren beobachtet (Carter *et al.*, 2002; Pettis & McIntosh, 1987). Bei Untersuchungen mittels Transposonmutagenese im Biosynthesegencluster des Siderophors Vicibactin aus *Rhizobium leguminosarum* wurden Insertionsmutanten im *mbtH*-ähnlichen Gen *vbsG* erhalten. *VbsG* ist das erste Gen eines Operons, welches auch die Nichtribosomale-Peptidsynthetase (NRPS)-Gene *vbsS* und *vbsO* enthält. Für *vbsO* wird angenommen, dass es die Hydroxylierung von Ornithin zu N<sup>5</sup>-Hydroxyornithin katalysiert (Carter *et al.*, 2002). Obwohl die Vicibactinbildung in der *vbsG* Insertionsmutante unterbrochen wurde, konnte eine essentielle Funktion von *vbsG* für die Vicibactinbiosynthese damit nicht zweifelsfrei belegt werden. Die Expression der nachfolgenden Gene *vbsS* und *vbsO* könnte ebenfalls durch die Transposoninsertion beeinflusst worden sein.

Lediglich eine experimentelle Studie hat sich bislang der Funktionszuordnung eines *mbtH*-ähnlichen Gens gewidmet. Stegmann und Kollegen (2006) berichteten, dass die Inaktivierung des *mbtH*-ähnlichen Gens *ORF1* im Biosynthesegencluster des

Glycopeptidantibiotikums Balhimycin keine Auswirkung auf die Balhimycinbiosynthese hatte. Es wurde daher angenommen, dass die *MbtH*-Proteine keine essentielle Rolle in der Sekundärstoffproduktion übernehmen (Stegmann *et al.*, 2006). Die Autoren erwähnten jedoch auch die Möglichkeit, dass *mbtH*-ähnliche Gene, die im Genom des natürlichen Balhimycinproduzenten *Amycolatopsis balhimycina* lokalisiert sind, die Funktion des inaktivierten *ORF1* übernehmen könnten.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

### 1.7.1 *mbtH*-Projekt

Durch Inaktivierungsexperimente, Sequenzvergleiche und biochemische Untersuchungen war nahezu allen Genen des Clorobiocingenclusters eine katalytische, regulatorische oder an Resistenzmechanismen beteiligte Funktion zugewiesen worden. Lediglich für das 280 bp große Gen *cloY* fehlte bisher ein Funktionsnachweis. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von *cloY* im Rahmen der Clorobiocinbiosynthese zu untersuchen. Dazu wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- Sequenzanalyse von *cloY* und bioinformatische Untersuchungen zum Vorkommen von *mbtH*-ähnlichen Genen
- Inaktivierung von *cloY* im Clorobiocingencluster und heterologe Expression des modifizierten Genclusters in *S. coelicolor* M512; Untersuchung der Clorobiocinproduktion des heterologen Produzenten

Die Durchführung dieser Arbeiten zeigte, dass neben *cloY* weitere *mbtH*-homologe Gene in die Untersuchungen miteinbezogen werden mussten, um eine konkrete Aussage zur Funktion von *cloY* treffen zu können. Folgende Arbeiten wurden daraufhin durchgeführt:

- Inaktivierung von zwei weiteren *mbtH*-homologen Genen im Genom des heterologen Clorobiocinproduzenten *S. coelicolor* M512 und anschließende heterologe Expression des  $\Delta cloY$  Genclusters in der resultierenden Mutante
- Komplementierung der  $\Delta mbtH$  Defektmutante mit vier verschiedenen *mbtH*-ähnlichen Genen sowie Fütterungsexperimente zur Aufklärung der Funktion von *cloY* in der Clorobiocinbiosynthese

### 1.7.2 Coumermycin-Projekt

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Konstruktion eines Cosmids, welches das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters beinhaltet und für heterologe Expressionsversuche eingesetzt werden kann. Anschließend sollte dieses Cosmid mit etablierten Techniken genetisch modifiziert und zur Herstellung neuer Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate verwendet werden. Folgende Arbeiten wurden hierzu durchgeführt:

- Herstellung und Screening einer Cosmidbank des natürlichen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten *S. rishiriensis* DSM40489
- Identifizierung von zwei überlappenden Cosmiden die zusammen das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster abdecken
- Entwicklung einer auf dem  $\lambda$  RED-System basierende Methode zur Zusammenführung von überlappenden Cosmidinserts
- Heterologe Expression des vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters in *S. coelicolor* M512 und Analyse der Sekundärstoffproduktion
- Herstellung von Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivaten mittels „genetic engineering“ und Untersuchungen zur antibakteriellen Eigenschaft der neuen Substanzen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

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

**Tabelle 4-1:** *Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile*

<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
Aventis, <i>Bad Soden</i>	Clorobiocin
Becton-Dickinson, <i>Heidelberg</i>	Casaminoacids Corn starch Yeast extract Nutrient Agar Peptone Tryptic Soy Broth (Soytone) Trypton
Biozym Scientific GmbH, <i>Oldendorf</i>	Agarose
Merck, <i>Darmstadt</i>	Fleischextrakt Malzextrakt Tetracyclin
Roth, <i>Karlsruhe</i>	Agar 5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) Carbenicillin Glucose Glycin Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid (IPTG) L-Prolin Rotiphenol <sup>®</sup> Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Polyethylenglykol (PEG) 1000 Sodiumdodecylsulfat (SDS) N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethanolsulfonsäure (TES)
Fluka, <i>Neu-Ulm</i>	Apramycin Thiostrepton
Sigma-Aldrich, <i>Deisenhofen</i>	Bromphenolblau Chloramphenicol Coumermycin A <sub>1</sub> Dimethylformamid (DMF)

	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	Distillers grains and solubles
	EDTA
	Kanamycin
	Lard oil
	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)
	Tris Base
	4-Amino-2-hydroxybenzoesäure (BDH)
	3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin
Pharmacia & Upjohn, <i>Kalamazoo, USA</i>	
Südzucker, <i>Mannheim</i>	Saccharose

## 2.2 Enzyme und Kits

**Tabelle 2-2:** *Verwendete Enzyme und Kits*

<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
Amersham Biosciences, <i>Freiburg</i>	Restriktionsendonukleasen T4-DNA Ligase
Fluka, <i>Neu-Ulm</i>	Lysozym (47000 U/mg) Lysozym (85400 U/mg)
Macherey-Nagel, <i>Düren</i>	Nucleobond Kit AX <sup>®</sup> 100 Nucleospin Extract <sup>®</sup> 2 in 1
New England Biolabs, <i>Schwalbach</i>	Restriktionsendonukleasen T4 DNA Ligase 100 bp DNA ladder (500 µg/ml)
Plant Bioscience Ltd., <i>Norwich, UK</i>	REDIRECT; PCR-targeting system
Promega, <i>Madison, USA</i>	pGEM-T Easy <sup>®</sup> Vector System 1 <i>Pfu</i> -Polymerase
Qiagen, <i>Hilden</i>	RNAse A (100 g/ml)
Roche Biochemicals, <i>Mannheim</i>	DNA molecular weight marker VII Expand High Fidelity PCR System
Stratagene, <i>Taufkirchen</i>	1 kb DNA-ladder (500 µg/ml) Restriktionsendonukleasen Gigapack <sup>®</sup> III XL Packaging Extract
Invitrogene, <i>Karlsruhe</i>	1 kb DNA ladder (1 µg/ml)

## 2.3 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Nachfolgend aufgeführte Nährmedienbestandteile beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf 1 l Medium. Alle Lösungen und Medien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Festmedien wurde 2 % (w/v) Agar zugesetzt. Die Zugabe von getrennt autoklavierten Lösungen und/oder hitzelabiler Substanzen erfolgte unter sterilen Bedingungen nach dem Autoklavieren. Die Medien und Lösungen wurden bei Raumtemperatur (RT) oder 4 °C gelagert.

### 2.3.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

#### LB (Luria-Bertani)-Medium (Sambrook & 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 1l aufgefüllt und autoklaviert.

#### SOB-Medium

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

Die Bestandteile werden in 800 ml dem. Wasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1l aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend werden 10 ml einer sterilen 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben.

### 2.3.2 Medien zur Kultivierung von Streptomyceten

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

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

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

#### HA-Medium

Zu 1 l YMG-Medium wurde nach Autoklavieren 1 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben.

### TSB (Trypticase Soy Broth)-Medium (Kieser *et al.*, 2000)

30,0 g Trypticase Soy Broth werden in 1 l dem. Wasser gelöst und autoklaviert.

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

Saccharose	340,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Malzextrakt	3,0 g
Glucose	10,0 g

Zu 1 l Medium wird nach Autoklavieren 2 ml 2,5 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben.

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

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

Das Mannitol wurde in 1 l Leitungswasser gelöst und zu jeweils 100 ml auf 300 ml Erlenmeyer-Kolben mit je 2 g Agar und 2 g Sojamehl verteilt. Das Medium wurde zweimal für 15 min bei 115 °C unter vorsichtigem Schütteln zwischen den beiden Autoklavievorgängen autoklaviert.

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

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

Die Bestandteile werden in 1 l dem. H<sub>2</sub>O gelöst und zu jeweils 100 ml auf 300 ml Erlenmeyer-Kolben mit je 2 g Agar verteilt und autoklaviert. Vor Verwendung wird das Medium aufgeschmolzen und folgende Bestandteile unter sterilen Bedingungen zugegeben:

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

### Spurenelementlösung

ZnCl <sub>2</sub>	40,0 mg
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	200,0 mg
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10,0 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	10,0 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>6</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	10,0 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	10,0 mg

### DNA (Difco nutrient agar)-Medium (Kieser *et al.*, 2000)

4,6 g Difco nutrient Agar werden in 200 ml dem. Wasser gelöst und autoklaviert.

### **2.3.3 Clorobiocin-Produktionsmedium**

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

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

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

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

*Lösung A* (887 ml):

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

Die Bestandteile werden in 700 ml dem. Wasser gelöst und pH 7,8 eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6 g CaCO<sub>3</sub>. Die Lösung wird auf 887 ml aufgefüllt und autoklaviert.

*Lösung B* (200 ml):

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	32,0 g
---	--------

*Lösung C* (300 ml):

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

Alle drei Lösungen werden separat autoklaviert. Lösung A wird bei Gebrauch mit 13 ml Lösung B und 100 ml Lösung C versetzt.

### 2.3.4 Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktionsmedium

#### SK-Medium (Scannell & Kong, 1969)

Corn starch	20,0 g
Pharma Medium	20,0 g
Lard oil	20,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	2,5 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,5 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	202 µg

### 2.3.5 Medien zur Protoplastentransformation von Streptomyceten

#### CRM-Medium

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

Nach Autoklavieren erfolgt die Zugabe von 10 ml steriler 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung (pH 7,0).

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

Die Präparation von *S. coelicolor*-Protoplasten erfolgte nach Kultivierung der Zellen in YEME-Medium mit einer Endkonzentration von 0,5 % Glycin.

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

Saccharose	103,0 g
Glucose	10,0 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10,12 g
Casaminosäuren	0,1 g
Hefeextrakt	5,0 g

Die Bestandteile werden in 800 ml dem. Wasser gelöst. Je 80 ml werden in 300 ml Erlenmeyer-Kolben mit je 2,2 g Agar gegeben und anschließend autoklaviert. Vor Gebrauch des Mediums werden folgende Bestandteile unter sterilen Bedingungen zugegeben:

TES (250 mM)	1,0 ml
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (250 mM)	8,0 ml
L-Prolin (20 %)	1,5 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 %)	10,0 ml
Spurenelementlösung	0,2 ml
NaOH (1 M)	0,5 ml

## 2.4 Anzucht und Kultivierung von Bakterien

### 2.4.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*-Kulturen

*E. coli* Kulturen wurden in flüssigem oder festem LB-Medium (s. 2.3.1) mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht (ÜN) bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden zu 50 ml in 300 ml Erlenmeyer-Kolben unter Schütteln bei 170 - 200 rpm und 37 °C inkubiert. Die Kultivierung des *E. coli* Stamms BW25113/pIJ790 für PCR-targeting Experimente erfolgte aufgrund des temperatursensitiven Plasmids pIJ790 bei 30 °C (Gust *et al.*, 2004).

Zur Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen wurden 2 ml einer Bakteriensuspension abzentrifugiert (5 min, 3000 x g, 4 °C) und anschließend in 1 ml 20 %igem (v/v) Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

### 2.4.2 Anzucht und standardisierte Kultivierung von Streptomyceten

Die Anzucht aller verwendeten Streptomyceten erfolgte standardisiert in flüssigem TSB-Medium und auf festem MS-Medium bei 30 °C. Für Streptomyceten-Mutanten bei denen eine Selektion mit Thiostrepton erfolgte, wurde das Festmedium R5 oder R2YE verwendet. Flüssigkulturen wurden unter Schütteln bei 30 °C und 170 - 200 rpm in Doppel-Schikane Kolben mit Spiralfeder für 3 - 6 Tage kultiviert. Die jeweiligen Antibiotika wurden in entsprechenden Konzentrationen zugesetzt (s. 2.8.1). Zum Anlegen von Sporensuspensionen wurden zuvor isolierte Einzelkolonien mit einem Wattestäbchen konfluent auf MS- bzw. R5-Platten ausgestrichen und anschließend bei 30 °C bis zur Sporulation für 5 - 10 Tage inkubiert. Die Sporen wurden unter sterilen Bedingungen mit 5 - 10 ml 0,1 %iger Tween20 Lösung und einem Wattestäbchen, unter vorsichtigem Kratzen von der Platte geschwemmt. Zur Abtrennung von Mycelresten wurde die Sporensuspension stark gevortext und anschließend durch sterile Glaswolle filtriert. Nach Zentrifugation (2 min, 5000 x g, 4 °C) wurde das Pellet in 1 - 2 ml 20 %igem Glycerol resuspendiert und bei -70 °C

tiefgefroren. Zur Anzucht von TSB-Kulturen, wurden je 50 ml TSB-Medium in Doppel-Schikane Kolben und Spiralfeder mit 20 - 50 µl Sporensuspension inokuliert und wie beschrieben kultiviert. Für die Anzucht zur Präparation von Protoplasten, wurden *S. coelicolor* Wildtyp und Mutanten in YEME-Medium mit 0,5 % Glycin angezogen. Für *S. rishiriensis* erfolgte die Kultivierung in CRM-Medium mit 0,5 % Glycin. Die Protoplastenregeneration erfolgte auf R2YE-Platten.

### **2.4.3 Kultivierung von Streptomycceten zur Produktion von Clorobiocin und Novclobiocin 102**

Für die Produktion von Clorobiocin und Clorobiocin-Derivaten wurden 5 ml einer TSB-Vorkultur in 50 ml Corn starch-Medium in Doppel-Schikane Kolben mit Spiralfeder überimpft. Nach drei Tagen Kultivierung bei 30 °C und 170 - 200 rpm wurden 50 ml Distillers solubles Produktionsmedium mit 5 ml der Corn starch-Kultur inokuliert und zur Produktion für weitere 7 Tage bei 30 °C und 170 - 200 rpm kultiviert. Für Fütterungsexperimente wurden 1 mg 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin (gelöst in Ethanol p.A.) nach zwei und vier Tagen dem Produktionsmedium zugesetzt. Die Extraktion von Clorobiocin und Novclobiocin 102 erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben.

### **2.4.4 Kultivierung von Streptomycceten zur Produktion von Coumermycin A<sub>1</sub> und Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivaten**

Für die Produktion von Coumermycin A<sub>1</sub> und dessen Derivaten Coumermycin LW1, MW1 und MW2 wurden 7,5 ml einer 3 – 4 Tage alten TSB-Kultur in 50 ml SK-Medium in Doppel-Schikane Kolben mit Spiralfeder überimpft und bei 30 °C und 170 - 200 rpm für 7 Tage kultiviert. Die Extraktion der Kulturen erfolgte wie unter 2.5.2 beschrieben.

## **2.5 Extraktion von Streptomycceten-Kulturen**

### **2.5.1 Clorobiocin-Extraktion**

Für HPLC Analysen der produzierten Sekundärmetabolite der Streptomycceten-Mutanten mit integriertem Clorobiocingencluster, wurde 1 ml Produktionskultur mit 1 M HCl auf pH 4 angesäuert. Anschließend wurde zweimal mit 1 ml Ethylacetat

extrahiert. Das Lösungsmittel wurde abrotiert und der Rückstand in 200 - 500  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. Schwebeteilchen wurden durch Zentrifugation (10 min, 21000  $\times g$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ ) abgetrennt und 50 - 100  $\mu\text{l}$  des Überstands für HPLC Analysen eingesetzt. Bei der Extraktion großer Volumen wurden die Mengen der Extraktionsmittel entsprechend angeglichen.

### 2.5.2 Extraktion von Coumermycin A<sub>1</sub> und Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivaten

Für HPLC/LC-MS Analyse der Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion von Streptomyceten-Mutanten mit integriertem Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster, wurde je 1 ml der Produktionskulturen (SK-Medium) mit 1 M HCl auf pH 4 angesäuert und anschließend zweimal mit 0,75 ml Petrolether extrahiert. Das Abtrennen der lipophilen Petroletherphase erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 21000  $\times g$  und 4  $^{\circ}\text{C}$ . Die wässrige Phase wurde anschließend zweimal mit 0,75 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation wurden die Ethylacetatphasen abpipettiert und in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen vereinigt. Das Lösungsmittel wurde erneut abrotiert und der Rückstand in 100  $\mu\text{l}$  Ethanol (p.A.) aufgenommen. Bei Extraktion großer Volumen Produktionskultur wurden die Zellen zusätzlich durch Ultraturax-Behandlung (Janke & Kunkel, *Staufen*) für eine Minute aufgeschlossen. Die Volumen der Extraktionsmittel wurden entsprechend angeglichen. Nach Zentrifugation (10 min, 21000  $\times g$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ ) zum Abtrennen von Schwebeteilchen wurden der ethanolische Extrakt für HPLC Analysen verwendet.

## 2.6 Analytik

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen wurde eine Agilent HPLC-Anlage (1100 Series) verwendet. Die analytische Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min über eine Multosphere RP 18-5 Säule (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4.6 mm) (C&S Chromatographie Service, *Düren*), der eine Multoprep RP18-25/40 gefüllte Vorsäule (40  $\mu\text{m}$ , 30  $\times$  4 mm) vorgeschaltet war. Die verwendeten Fließmittel wurden vor Gebrauch durch Filtration über einen Membranfilter (0,45  $\mu\text{m}$ ; Millipore) von Partikeln befreit.

### 2.6.1 HPLC-Analytik von Clorobiocin und Novclobiocin 102

Die *S. coelicolor*-Mutanten mit integriertem Clorobiocingencluster wurden wie unter 2.4.3 beschrieben kultiviert. Nach Extraktion des Produktionsmediums wurde das

Extraktionsmittel einrotiert, der verbleibende Rückstand in Methanol gelöst und nach Zentrifugation für HPLC Analysen verwendet. Als Standard wurde in Methanol gelöstes Clorobiocin (Aventis, *Bad Sodes*) verwendet.

### **Chromatographie-Bedingungen**

Fließmittel A	MeOH/H <sub>2</sub> O/CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 50:49:1
Fließmittel B	MeOH/HCOOH, 99:1
Detektionswellenlänge	340 nm

### **HPLC-Gradient**

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0,0	40
2,0	40
27,0	100
32,0	100
32,1	40
37,0	40

### **2.6.2 HPLC-Analytik von Coumermycin A<sub>1</sub> und Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivaten**

Die *S. coelicolor*-Mutanten mit integriertem Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster wurden wie unter 2.4.4 beschrieben kultiviert. Nach Extraktion des Produktionsmediums (s. o.) mit Ethylacetat wurde das Lösungsmittel abrotiert und der verbleibende Rückstand in Ethanol (p. A.) aufgenommen. Nach Zentrifugation (10 min, 21000 x g, 4 °C) des Extrakts wurde der Überstand unter den nachstehenden Bedingungen mittels HPLC analysiert. Als Standard wurde in DMSO gelöstes Coumermycin A<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich, *Deisenhofen*) verwendet.

### **Chromatographie-Bedingungen**

Fließmittel A	H <sub>2</sub> O + 1 % CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Fließmittel B	CH <sub>3</sub> CN
Detektionswellenlänge	345 nm

### **HPLC-Gradient**

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0,0	60
2,0	60
15,0	100
19,0	100
19,1	60
25,0	60

### **2.6.3 Massenspektroskopie zur Strukturaufklärung neuer Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate**

Das negative „electrospray ionization“ (ESI) Massenspektrum wurde mit einem Thermo Finnigan TSQ Quantum triple quadrupol Massenspektrometer (Elektronenspray-Spannung 3,7 kV; Kapillartemperatur 320 °C; Trenn- und Hilfsgas Nitrogen) gekoppelt mit einem Surveyor HPLC-System und einer Nucleosil 120 - 5 C18 (5 µm, 250 x 2 mm) Säule (Macherey-Nagel, *Düren*) durchgeführt. Für alle Proben wurde ein Gradient von 98:2 H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (mit 0,1 % Ameisensäure) bis 70:30 über 35 min, gefolgt von einer isokratischen Elution mit 100 % CH<sub>3</sub>CN (+ 0,1 % Ameisensäure) für 15 min verwendet. Die Durchflussrate lag bei 200 µl/min. Das „collision induced dissociation“ (CID) Spektrum von Coumermycin A<sub>1</sub> während des HPLC-Laufs wurde bei einer Kollisionsenergie von 45 eV aufgenommen. Als Kollisionsgas wurde Argon bei einem Kollisionsdruck von 1,0 x 10<sup>-3</sup> torr verwendet.

## **2.7 Methoden der Molekularbiologie**

### **2.7.1 DNA-Isolation aus *E. coli***

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen, wurden 2 ml einer Bakterienkultur abzentrifugiert (2 min, 21000 x g, 4 °C) und anschließend in 250 µl S1-Puffer resuspendiert. Die Lösung wurde mit 250 µl S2-Puffer versetzt, durch Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 250 µl eiskalter S3-Puffer zugegeben. Zur Abtrennung denaturierter Proteine und chromosomaler DNA wurde die Lösung für 10 min bei 21000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die gelöste Plasmid-DNA über alkoholische Fällung präzipitiert. Hierfür wurde die Lösung mit 750 µl Isopropanol versetzt, kurz invertiert und für 10 min bei -

20 °C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurde bei 21000 x *g* und 4 °C für mindestens 20 min zentrifugiert und das DNA-Pellet anschließend mit 500 µl 75 %igem Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde die DNA in 50 - 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Für die Isolation größerer DNA Mengen wurden Nucleobond AX 100 Säulen (Macherey-Nagel, *Düren*) verwendet. Die Aufarbeitung des Zellmaterials erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### **2.7.2 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit einem GeneQuant Photometer (Pharmacia, *Freiburg*) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

### **2.7.3 Alkoholische DNA-Präzipitation**

Zur Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen oder zum Entfernen niedermolekularer Substanzen aus Reaktionsansätzen, wurde DNA mittels Alkoholfällung präzipitiert. Dazu wurde die Lösung mit 0,1 VT 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 1 VT Isopropanol versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 21000 x *g*, 4 °C) wurde das Pellet mit 75 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 10 - 100 µl H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer resuspendiert.

### **2.7.4 Phenol-Chloroform Extraktion**

Zur Entfernung von Proteinrückständen aus Nucleinsäurelösungen wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Rotiphenol®) versetzt, durch Vortexen intensiv gemischt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert (10 min, 21000 x *g*, 4 °C). Zur Entfernung von Phenolresten wurde die wässrige Phase mit 1 VT Chloroform/Isoamylalkohol (1:1; v/v) extrahiert und die DNA anschließend mittels alkoholischer DNA-Präzipitation gefällt.

### **2.7.5 Isolierung genomischer DNA aus Streptomycceten**

Die Isolierung genomischer DNA aus Streptomycceten erfolgte über die Kirby-Mix Methode (Kieser *et al.*, 2000). Hierzu wurden 25 ml TSB-Kultur kurz abzentrifugiert (6800 x *g*, 5 min, 4 °C), das Zellpellet mit 10 ml sterilem TE25S Puffer gewaschen

und anschließend in 5 ml TE25S Puffer und 6 mg/ml Lysozym resuspendiert und bis zur Lyse der Zellen für 5 - 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 4 ml 2 x Kirby-Mix Lösung versetzt und bis zur vollständigen Suspension invertiert. Nach Zentrifugation (6800 x g, 5 min, 4 °C) wurde die phenolische Phase abgenommen und die wässrige Phase mit Phenol/Chlorform/Isoamylalkohol (24:24:1; Rotiphenol®) 1 - 3 mal extrahiert. Die DNA wurde anschl. durch Isopropanol-Fällung aus der wässrigen Phase präzipitiert und mittels einer kleinen Pipettenspitze aus der Lösung gefischt. Genomische DNA wurde in einem Volumen von 0,5 - 1,5 ml TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### **2.7.6 Nachweis von Plasmiden aus Streptomycceten**

Da bei der Isolation genomischer DNA auch prinzipiell ungewollte Plasmid-DNA mitisoliert wird, wurde zum Nachweis von Plasmiden aus Streptomycceten-Mutanten genomische DNA in elektroporationskompetente *E. coli* Zellen transformiert. Nach Selektion der gewachsenen Transformanten für das erwartete Plasmid, konnten stets ausreichend *E. coli* Klone identifiziert werden, die das entsprechende DNA-Konstrukt enthielten.

### **2.7.7 DNA-Restriktion**

Analytische oder präparative DNA-Restriktionen erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers zur enzyspezifischen Inkubationstemperatur, Puffer und Enzymkonzentration. Analytische Ansätze wurden in der Regel in einem Volumen von 10 µl, präparative Ansätze wurden in größeren Volumen bis 200 µl durchgeführt. Bei präparativen Ansätzen erfolgte die Inaktivierung von Restriktionsendonukleasen durch Hitzebehandlung bei 65 °C für 15 min. Die DNA wurde anschließend über alkoholische DNA-Fällung aufkonzentriert und in H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.7.8 Auffüllreaktion von DNA mit Hilfe von T4-DNA-Polymerase**

Mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase aus *E. coli* wurden doppelsträngige DNA-Fragmente mit 5'-Überhang aufgefüllt. Überhängende 3'-Enden werden aufgrund der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms entfernt. Die damit erhaltenen blunt ends wurden anschließend religiert. 1 - 4 µg DNA wurden mit 0,2 mM dNTP-Mix (jeweils 200 pmol je Nukleotid), 1 x T4-DNA-Polymerase-Puffer, 1 mg/ml BSA und 4 U T4-

DNA-Polymerase (Amersham, *Braunschweig*) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 5 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Phenolisierung gestoppt. Die Aufkonzentrierung der DNA erfolgte über alkoholische DNA-Präzipitation.

### **2.7.9 Dephosphorylierung von DNA**

Dephosphorylierung von DNA erfolgte mit Hilfe der alkalischen Phosphatase A. Zur Vermeidung intramolekularer Ligation linearisierter DNA, wurde die 5'-Phosphatgruppe durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase entfernt. Die DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 1 x One-for-all-buffer und mit 0,1 U alkalischer Phosphatase (Pharmacia, *Freiburg*) für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung (20 min; 85 °C) gestoppt.

### **2.7.10 DNA-Ligation**

Ligationsansätze zur katalytischen Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen zwei doppelsträngigen DNA-Molekülen erfolgten unter Verwendung von T4 DNA-Ligase. Die Ligationsansätze enthielten 1 U T4 DNA-Ligase, 1 x Ligationspuffer und eine 1:1 molare Mischung aus Insert und Vektor in einem Gesamtvolumen von 10 - 20 µl. Die Ansätze wurden für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Ligationsansätze wurden direkt für die Transformation in CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* Zellen verwendet.

### **2.7.11 DNA-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer spezifischen Größe erfolgte über Gelelektrophorese. Elektrophoresegele mit Agarosekonzentrationen von 0,4 - 2 % ermöglichten die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von 100 bp - 13 kb. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE verwendet. Vor dem Beladen des Gels wurden die DNA-Proben mit 1/3 VT Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei RT unter konstanter Spannung von 75 - 120 V. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese in einem wässrigen Ethidiumbromidbad (0,1 %) für 15 min inkubiert und anschließend unter UV-Durchlicht (Transiluminator IL-200M, Bachofer, *Reutlingen*) bei einer Wellenlänge von 312 nm analysiert. Die Dokumentation erfolgte mit dem EagleEye II System (Stratagene, *Heidelberg*). Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus

präparativen Gelen erfolgte mit Hilfe des Nucleospin Extract 2 in 1 Kits nach den Angaben des Herstellers.

### **2.7.12 Herstellung chemisch kompetenter Zellen**

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen, wurden 50 ml LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika mit 1 ml einer *E. coli* ÜN-Kultur inokuliert und bei 37 °C bis zum Erreichen einer  $OD_{600}=0,5$  unter Schütteln inkubiert. Nach Kultivierung von 4 - 5 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g, 4 °C) abgetrennt und einmal mit 30 ml eiskalter 0,1 M  $CaCl_2$ -Lösung gewaschen. Nach Zentrifugation (5 min, 3000 x g, 4 °C) wurde das Pellet in 30 ml 0,1 M  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 2 - 5 ml eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$ /15 % (v/v) Glycerin-Puffer resuspendiert und zu je 200 µl aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

### **2.7.13 $CaCl_2$ -Transformation**

200 µl der transformationskompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 - 10 µl der zu transformierenden DNA vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgte durch Hitzeschockbehandlung. Hierzu wurden die Zellen für 2 min bei 42 °C inkubiert, und nach kurzem Abkühlen mit 1 ml LB-Medium gemischt. Der Transformationsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Selektion der Transformanten wurden verschiedene Verdünnungen des Ansatzes auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C ÜN inkubiert.

### **2.7.14 Herstellung elektroporationskompetenter Zellen**

Für die Herstellung elektroporationskompetenter Zellen wurden 50 ml LB- oder SOB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika mit 1 ml einer *E. coli* ÜN-Kultur inokuliert und bei 37 °C bis zum Erreichen einer  $OD_{600}=0,5$  unter Schütteln inkubiert. Bei der Herstellung von kompetenten Zellen die das temperatursensitive Plasmid pIJ790 enthalten, erfolgte die Kultivierung bei 30 °C. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (5 min, 3000 x g, 4 °C) abgetrennt und zweimal mit 25 ml eiskalter 10 %iger (w/v) Glycerinlösung gewaschen. Zur Lagerung wurde das

Zellpellet in dem verbleibenden Rest der Waschlösung resuspendiert und zu Aliquots von je 50 µl bei -70 °C tiefgefroren.

### **2.7.15 Elektroporation von *E. coli***

Ca. 100 ng DNA (1 - 5 µl) wurden in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (0,2 cm) mit 50 µl kompetenten Zellen luftblasenfrei gemischt und bis zur Elektroporation auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit einem BioRad Elektroporator bei 2,5 kV und einer optimalen Zeitkonstante von 4,5 - 5 ms. Nach Elektroporation wurde sofort 1 ml kaltes SOC-Medium zum Ansatz pipettiert und die Suspension für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Unterschiedliche Verdünnungen der Zellsuspension wurden anschließend auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C ÜN inkubiert.

Bei der Verwendung von Klonierungsvektoren, bei denen die Ligation in ein *lacZ*-Gen erfolgte, wurden rekombinante Plasmide über Blau-Weiß Selektion identifiziert. Hierfür wurden 10 µl einer IPTG-Lösung (80 mg/ml) mit 40 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) und 150 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gemischt und auf die entsprechenden LB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden anschließend 30 min lang zum Abdampfen des toxischen DMF unter der Sterilbank getrocknet.

### **2.7.16 Protoplastierung von Streptomyceten**

50 ml YEME-Medium mit 0,5 % Glycin wurden mit 1 ml TSB-Vorkultur inokuliert und für zwei Tage wie unter 2.4.2 beschrieben kultiviert. Nach Abtrennen der Zellen (10 min, 3000 x g, 4 °C) wurde das Zellpellet zweimal mit 25 ml 10,3 %iger Saccharoselösung gewaschen. Zur Protoplastierung wurden die Zellen in lysozymhaltigem P-Puffer (4 mg Lysozym/ml P-Puffer; 2 - 4 ml P-Puffer/g Zellen) resuspendiert und bei 30 °C im Brutschrank für 15 - 60 min inkubiert. Die fortschreitende Protoplastierung wurde in Zeitintervallen von 10 min mikroskopisch kontrolliert und die Reaktion bei Erreichen des gewünschten Protoplastierungsgrades durch Kühlen auf Eis gestoppt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt um eine Lyse der Zellen zu vermeiden. Zum Abtrennen größerer Mycelreste wurde die Lösung mit 5 ml eiskaltem P-Puffer versetzt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend durch sterile Glaswolle filtriert. Die Protoplasten wurden abzentrifugiert (5 min, 3000 x g, 4 °C) und das Pellet in 1 ml P-Puffer resuspendiert und aliquotiert. Zur Lagerung wurden die Protoplasten auf Eis

bei -70 °C tiefgefroren. Zur Überprüfung der Protoplastierungseffizienz wurden 10 µl der Protoplastensuspension mit 200 µl H<sub>2</sub>O gemischt und auf R2YE-Platten ausplattiert. Zur Bestimmung der Anzahl regenerierungsfähiger Protoplasten wurde eine Verdünnungsreihe der Suspension mit P-Puffer hergestellt und ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C für 5 - 10 Tage.

Für die Protoplastierung von *S. rishiriensis* erfolgte die Kultivierung in CRM-Medium mit 0,4 % Glycin. Alle weiteren Schritte wurden wie beschrieben durchgeführt.

### **2.7.17 PEG-vermittelte Protoplastentransformation**

Die Transformation von Streptomyceten-Protoplasten erfolgte mittels der Polyethylenglykol (PEG)-Methode nach Kieser *et al.* (2000). Hierfür wurden 10 - 20 µg nichtmethylierte DNA, die zuvor aus dem *E. coli* Stamm ET12567 isoliert wurde, mit 200 µl (ca. 10<sup>8</sup>) Protoplasten gemischt. Im Anschluss wurden 500 µl T-Puffer zugegeben und die Lösung durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Verschiedene Volumina des Transformationsansatzes wurden auf R2YE-Platten ausplattiert und ÜN bei 30 °C inkubiert. Für die Selektion der Mutanten wurden die Platten nach 16 - 18 Stunden mit je 1 ml H<sub>2</sub>O und den entsprechenden Antibiotika überschichtet („flooding“) und bis zur Sporulation 5 - 10 Tage bei 30 °C inkubiert. Für weitere Untersuchungen der Transformanten wurden Einzelkolonien mit einem Zahnstocher auf MS-Platten mit den erforderlichen Antibiotika ausgestrichen und nach Sporulation erneut konfluent zur Sporengewinnung ausplattiert.

### **2.7.18 Konjugation in Streptomyceten**

Das Einbringen von Cosmiden in Streptomyceten erfolgte neben der PEG-vermittelten Protoplastentransformation auch über bakterielle Konjugation (Kieser *et al.*, 2000). Für die triparentale Konjugation wurden 10 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* ET1256/pUB307 beimpft. Weitere 10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* ET12567 und dem zu transformierenden Cosmid (enthält *oriT*) inokuliert und unter Schütteln (175 rpm) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die ÜN-Kultur wurde anschließend in frischem LB-Medium 1:100 verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,4-0,6 kultiviert. Nach Zentrifugation (6800 x g, 5 min, 4 °C) wurde das Zellpellet zweimal mit einem äquivalentem Volumen LB-Medium gewaschen und anschließend in 0,1 VT LB-Medium resuspendiert. Ca. 10<sup>8</sup> *Streptomyces*-Sporen wurden zeitgleich mit 500 µl 2 x YT-Medium gewaschen und

anschließend in 500 µl 2 x YT-Medium zur Germination für 10 min bei 50 °C inkubiert. Die gekeimten Sporen wurden bis zur Konjugation unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Für die Konjugation wurden je 500 µl der zwei *E. coli* Kulturen und der gekeimten Sporen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt, kurz abzentrifugiert und in verschiedenen Verdünnungen auf MS-Platten (+10 mM MgCl<sub>2</sub>) ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 30 °C inkubiert und anschließend mit je 1 ml H<sub>2</sub>O und den entsprechenden Antibiotika sowie 0,5 mg/ml Nalidixinsäure überschichtet („flooding“). Die Platten wurden für 15 min unter der Impfbank getrocknet und bis zur Sporulation für 5 - 10 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Isolation ausgewählter Exkonjuganten erfolgte auf Festmedium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika und Nalidixinsäure (0,5 mg/ml).

Für die Übertragung von Cosmiden aus *E. coli* Zellen in Streptomycceten, wurde weiterhin die einfache Konjugation verwendet (Kieser *et al.*, 2000). Hierfür wurde das zu transformierende Cosmid (enthält *oriT*) in den *E. coli* Stamm ET12567/pUZ8002 eingebracht. Dieser Stamm wurde dann wie unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert, und anschließend direkt mit den gekeimten Sporen gemischt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie bereits beschrieben.

### **2.7.19 Herstellung von doppel cross-over Mutanten**

Die Herstellung von doppel cross-over Mutanten erfolgte über die Inaktivierung eines Gens auf dem Wirtsgenom von *S. coelicolor* mittels homologer Rekombination und der anschließenden Elimination des integrierten Cosmids. Dazu wurde eine Resistenzkassette über PCR amplifiziert, und das zu deletierende Gen primär auf einem Cosmid durch PCR-targeting inaktiviert. Nach Protoplastentransformation und Rekombination des modifizierten Cosmids mit dem Wirtsgenom, wurden gewachsene Transformanten auf die eingebrachte Resistenzkassette und die Resistenz des integrierten Cosmid-Vektors (Kan<sup>R</sup>) selektioniert. Anschließend wurden die Transformanten auf Medium ohne Kanamycin ausgestrichen. Das „ausloopen“ des Vektors durch homologe Rekombination wurde so durch den Wegfall des Kanamycin-Selektionsdrucks favorisiert. Nach Replicapating auf MS-Platten mit und ohne Kanamycin, konnten doppel cross-over Mutanten identifiziert werden, die das gewünschte Gen deletiert, und die Vektorsequenz eliminiert hatten.

### 2.7.20 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Cosmiden und rekombinanten Plasmiden erfolgte mit der Didesoxynucleotid-Kettenabbruch-Methode auf einem automatischen LI-COR Sequenzierer (MWG Biotech, Ebersberg). Die Komplettssequenzierung von Cosmid couMW16 erfolgte bei der Firma GenoTech (Korea). Zur Analyse von Sequenzdaten wurde das Sci Ed Central Programm (Clonemanager Version 6.0) verwendet. Sequenzvergleiche und Homologiesuchen wurden mit Hilfe des „BLAST“ Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Zur Identifizierung möglicher *open reading frames* (ORF) aus Sequenzrohdaten wurde das Programm ClustalX verwendet.

### 2.7.21 PCR-Bedingungen

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten über PCR wurde standardisiert folgender PCR-Ansatz pipettiert. Für die Amplifikation von Klonierungsfragmenten wurden die geeigneten PCR-Parameter zuerst durch Gradienten-PCR (iCycler PCR System, BioRad, München) ermittelt.

Komponente	Volumen
10 x Polymerase-Puffer	2,5 µl
dNTPs (2,5 mM/Nucleotid)	2,5 µl
Primer A (100 pmol)	0,5 µl
Primer B (100 pmol)	0,5 µl
Template DNA	0,5 - 1 µl
Taq-Polymerase	2 µl
DMSO	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Für die Überprüfung von DNA mittels PCR wurde Taq-Polymerase verwendet. Für die Amplifikation von PCR-Produkten, die für weiterführende Experimente eingesetzt wurden, wurde das High Fidelity PCR-Kit verwendet. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes folgte dabei den Angaben des Herstellers. Die Elongations-Temperatur wurde an das Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase angepasst. Die PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte standardisiert nach einem 3-Stufen Reaktionsprofil:

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiations-Denaturierung	94 °C	4 min	1
Denaturierung	94 °C	1 min	
Annealing	$T_{m[\text{Primer}]} - 2 \text{ °C}$	45 sec	20 - 35
Elongation	68 °C bzw. 72 °C	1 min kb <sup>-1</sup>	
Terminale Elongation	68 °C bzw. 72 °C	5 min	1
Kühlung	4 °C	∞	1

Zur Überprüfung von PCR-Produkten, wurden 5 µl des Reaktionsansatzes über Gelelektrophorese aufgetrennt und im Vergleich zu einem geeigneten Größenstandard analysiert.

### 2.7.22 Bestimmung der antibakteriellen Aktivität

Die antibakterielle Aktivität von Coumermycin A<sub>1</sub> und den neu hergestellten Derivaten Coumermycin LW1, MW1 und MW2 wurde in einem Agardiffusionstest gegen *Bacillus subtilis* ATCC14893 ermittelt. 11,5 g Nutrient Agar wurden in 500 ml dem. Wasser gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 40 °C wurden 2 x 10<sup>5</sup> Sporen *Bacillus subtilis* zugesetzt, vorsichtig gemischt und die Platten gegossen. Unterschiedliche Mengen der zu testenden Substanzen wurden in DMSO (100 %) gelöst, zu je 10 µl auf Filterrondelle (d=5mm) pipettiert und anschließend auf die Agarplatten aufgebracht. Die Bioassay-Platten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde DMSO (100 %) verwendet. Als Positivkontrolle wurde in DMSO gelöstes Coumermycin A<sub>1</sub> (Sigma) verwendet. Zur Ermittlung der antibakteriellen Aktivität wurden die resultierenden Hemmhofdurchmesser im Vergleich zur Positivkontrolle ermittelt.

## 2.8 Puffer und Lösungen der molekularen Zellbiologie

### 2.8.1 Antibiotikallösungen

Die Antibiotika wurden als Stammlösungen in den unten aufgeführten Konzentrationen hergestellt und bei -20 °C gelagert. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Die Antibiotika wurden den Medien nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 40 °C unter sterilen Bedingungen zugesetzt.

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Mediumkonz. [µg/ml]	Lösungsmittel
Apramycin	50	15 - 50	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Carbenicillin	50	50	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Chloramphenicol	50	25 - 50	Ethanol
Kanamycin	50	25 - 50	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Tetracyclin	25	12	Ethanol
Thiostrepton	50	8 - 15	DMSO
Streptomycin	50	10 - 50	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Spectinomycin	100	50 - 100	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Viomycin	30	15 - 30	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

### 2.8.2 Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden und Cosmiden aus *E. coli*

Puffer/Lösung	Bestandteile	Endkonzentration	Herstellung
S1	Tris-Base	50 mM	Mit HCl auf pH 8 einstellen; RNaseA vor Gebrauch zugeben
	EDTA	10 mM	
	RNaseA	100 µg/ml	
S2	NaOH	0,2 M	
	SDS	1 % (w/v)	
S3	Kaliumacetat	2,8 M	Mit Eisessig auf pH 5,1 einstellen
TE-Puffer	Tris Base	10 mM	Mit HCl auf pH 7,5 einstellen
	EDTA	1 mM	

### 2.8.3 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese

Puffer	Bestandteile	Endkonzentration	Herstellung
50 x TAE	Tris Base	2 M	Mit Eisessig auf pH 8 einstellen
	EDTA	0,05 M	
	Eisessig	57,1 ml	
Ladepuffer	Glycerin	30 % (w/v)	
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid	1 mg/l	

### 2.8.4 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten

Die einzelnen Bestandteile des Protoplastierungs- und Transformationspuffers wurden getrennt angesetzt, autoklaviert und kurz vor Gebrauch unter sterilen Bedingungen gemischt.

Puffer	Zusammensetzung	Menge
Protoplastierungspuffer (P-Puffer)	Saccharoselösung	103 g
	Spurenelementlösung	2,0 ml
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2,02 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 %)	1,0 ml
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (3,68 %)	10,0 ml
	TES (5,73 %; pH 7,2)	10,0 ml
Transformationspuffer (T-Puffer)	25 % PEG in P-Puffer	bei Gebrauch 1 g PEG aufschmelzen und mit 3 ml P-Puffer mischen.

### 2.8.5 Puffer und Lösungen zur Isolation von genomischer DNA aus Streptomyceten

#### 2 x Kirby Mix (100ml) (Kieser *et al.*, 2000)

SDS	2,0 g
Natrium-4-aminosalicylat (BDH)	12,0 g
2 M Tris-HCl, pH 8	5,0 ml
Phenol pH 8	6,0 ml

#### TE25S-Puffer (Kieser *et al.*, 2000)

Tris-HCl	25 mM; pH 8
EDTA	25 mM; pH 8
Saccharose	0.3 M

### 2.8.6 Lösungen zur Blau-Weiß-Selektion in *E. coli*

Lösung	Zusammensetzung	Pro Platte
X-Gal	20 mg/ml in DMF	40 µl
IPTG	80 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	10 µl

## 2.9 Plasmide, Cosmide und Bakterienstämme

**Tabelle 2-3:** Plasmide, Cosmide und Bakterienstämme

Plasmide	Genotyp/Beschreibung	Referenz
pIJ773	<i>aac(3)IV</i> (Apra <sup>R</sup> ) + <i>oriT</i>	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pIJ778	<i>aadA</i> (Spec/Strep) <sup>R</sup> + <i>oriT</i>	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pIJ780	<i>vph</i> from $\Omega$ – fragment (Vio <sup>R</sup> ) + <i>oriT</i>	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pIJ790	$\lambda$ RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>cat</i> (Cml <sup>R</sup> ), <i>araC</i> , <i>rep101</i> <sup>ts</sup>	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pUG019	<i>aac(3)IV</i> (Apra <sup>R</sup> )	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
pUB307	„Driver“-Plasmid für triparentale Konjugation; besitzt <i>oriT</i>	(Flett <i>et al.</i> , 1997)
pUZ8002	<i>tra</i> , <i>neo</i> (Kan <sup>R</sup> ), RP4	(Paget <i>et al.</i> , 1999)
pUWL201	<i>trs</i> (Thio <sup>R</sup> ), <i>bla</i> (Carb <sup>R</sup> ), <i>PermE</i> <sup>*</sup> , <i>colE1</i>	(Doumith <i>et al.</i> , 2000)
pMW01	pUWL201 mit <i>cloY</i> unter Kontrolle von <i>PermE</i> <sup>*</sup>	Diese Arbeit
pMW02	pUWL201 mit <i>cchK</i> unter Kontrolle von <i>PermE</i> <sup>*</sup>	Diese Arbeit
pMW03	pUWL201 mit <i>CDA-ORFX</i> unter Kontrolle von <i>PermE</i> <sup>*</sup>	Diese Arbeit
pMW04	pUWL201 mit <i>couY</i> unter Kontrolle von <i>PermE</i> <sup>*</sup>	Diese Arbeit
pMWcloF	pUWL201 mit <i>cloF</i> unter Kontrolle von <i>PermE</i> <sup>*</sup>	Diese Arbeit
pAE_ha7	pUWL201 mit <i>clo-hal</i> unter Kontrolle von <i>PermE</i> <sup>*</sup>	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2004)
pVD1	pUWL201 mit <i>novG</i> unter Kontrolle von <i>PermE</i> <sup>*</sup>	V. Dangel
<b>Cosmide</b>		
SuperCos1	Cosmid vector; <i>bla</i> (Carb <sup>R</sup> ), <i>neo</i> (Kan <sup>R</sup> ), <i>cos</i>	Stratagene, Germany
novBG01	Integratives Cosmid mit dem vollständigen Novobiocingencluster; <i>neo</i> (Kan <sup>R</sup> ), <i>bla</i> (Carb <sup>R</sup> ), <i>attP</i> , <i>int</i> , <i>tet</i> , <i>oriT</i>	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
cloBG01	Integratives Cosmid mit dem vollständigen Clorobiocingencluster; <i>neo</i> (Kan <sup>R</sup> ), <i>bla</i> (Carb <sup>R</sup> ), <i>attP</i> , <i>int</i> , <i>tet</i> , <i>oriT</i>	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
cloMW15	cloBG01 Derivat; <i>cloY</i> ist ausgetauscht durch <i>aac(3)IV</i> (Apra <sup>R</sup> )	Diese Arbeit

## Material und Methoden

cloMW16	<i>cloY</i> in-frame Deletion in cloBG01	Diese Arbeit
StE8	<i>S. coelicolor</i> Cosmid mit SCO03218 ( <i>CDA-ORFX</i> )	(Redenbach <i>et al.</i> , 1996)
StF76	<i>S. coelicolor</i> Cosmid mit SCO0489 ( <i>cchK</i> )	(Redenbach <i>et al.</i> , 1996)
StE8-vio <sup>R</sup>	StE8 mit SCO3218 ersetzt durch <i>vph</i> (Vio <sup>R</sup> )	Diese Arbeit
StF76-apra <sup>R</sup>	StF76 mit SCO0489 ersetzt durch <i>aac(3)IV</i> (Apra <sup>R</sup> )	Diese Arbeit
49F3	<i>S. rishiriensis</i> Cosmid; enthält das rechte (3') Ende des Coumermycin A <sub>1</sub> -Genclusters	Diese Arbeit
51D9	<i>S. rishiriensis</i> Cosmid; enthält das linke (5') Ende des Coumermycin A <sub>1</sub> -Genclusters	Diese Arbeit
couMW12	49F3 Derivat nach Insertion der <i>aac(3)IV/oriT</i> -Kassette; (Apra <sup>R</sup> )	
couMW13	51D9 Derivat nach Insertion der <i>aadA/oriT</i> -Kassette; (Spec/Strep) <sup>R</sup>	Diese Arbeit
couMW14	Cosmid mit dem vollständigen Coumermycin A <sub>1</sub> -Gencluster; <i>neo</i> (Kan <sup>R</sup> ), <i>bla</i> (Carb <sup>R</sup> ), <i>aadA/oriT</i> (Spec/Strep) <sup>R</sup>	Diese Arbeit
couMW15	Cosmid mit dem vollständigen Coumermycin A <sub>1</sub> -Gencluster, <i>neo</i> (Kan <sup>R</sup> ), <i>bla</i> (Carb <sup>R</sup> ), $\Delta aadA$ (Spec/Strep) <sup>S</sup>	Diese Arbeit
couMW16	Integratives Cosmid mit dem vollständigen Coumermycin A <sub>1</sub> -Gencluster, <i>neo</i> (Kan <sup>R</sup> ), <i>bla</i> (Carb <sup>R</sup> ), <i>attP</i> , <i>int</i> , <i>tet</i> , <i>oriT</i>	Diese Arbeit
couMW17	couMW16 Derivat; <i>couO</i> ist ausgetauscht gegen <i>aac(3)IV/oriT</i> (Apra <sup>R</sup> )	Diese Arbeit
couMW18	Integratives Cosmid mit 6 bp <i>couO</i> "scar"-Sequenz im Coumermycin A <sub>1</sub> -Gencluster	Diese Arbeit
<b><i>E. coli</i></b>		
BW25113	K12 Derivat; $\Delta araBAD$ , $\Delta rhaBAD$	(Datsenko & Wanner, 2000)
ET12567	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hdsS</i> , <i>cat</i> (Cml <sup>R</sup> ), <i>tet</i> (Tet <sup>R</sup> )	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992)
DH5 $\alpha$	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>relA1</i>	Stratagene, Germany

***S. coelicolor***

M512	M145 Derivat: $\Delta actII-ORF4$ , $\Delta redD$ , $SCP1^-$ , $SCP2^-$	(Bentley <i>et al.</i> , 2002)
<i>S. coelicolor</i> MW01	M512 $\Delta SCO3218$ ; <i>CDA-ORFX</i> ersetzt durch <i>vph</i> ( $Vio^R$ )	Diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> MW03	M512 $\Delta SCO3218$ und $\Delta SCO0489$ ; <i>CDA-ORFX</i> ersetzt durch <i>vph</i> ( $Vio^R$ ); <i>cchK</i> ersetzt durch <i>aac(3)IV</i> ( $Apra^R$ )	Diese Arbeit

**Tabelle 2-4:** Primer die in dieser Arbeit verwendet wurden

Primer	Sequenz (5'-3')
cloYF_Xba	CAAGACGCGTGAAATAACATCTGGGAGGTATTCG <b>TCATG</b> ATTCCGGGGATCTCTAGAT
cloYR_Spe	TCTCATATTGCCAAATCCACTTTTGAATGAGCAGAT <b>TGCTA</b> ACTAGTCTGGAGCTGCTTC
cloY_fwd	GCGGGATGTTCAACTGCTCG
cloY_rev	CACTTTTGAATGAGCAGATGC
CDA_Spe_F	GCCCCCTGCCGGGGACGTACGGGCGCTCGTGGTCCGGTCA <b>ACTAG</b> TTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
CDA_Xba_R	AGAGTCTCCAGCCGACGCTCCCGGAAGGAATGCGACGT <b>GTCTAGA</b> ATTCCGGGGATCCGTCGACC
CDA_fwd	GCTCACCAAGACGCACTGGC
CDA_rev	GTGGCCTTCCTCGACGAACG
cchK_Spe_F	TTGGGAGTTCACGGGCGACGCTTGACGGGGCTCGGCCTCA <b>ACTAG</b> TTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
cchK_Xba_R	AGGCGAGCCTAACCTAATCCACTGGGAGGTACCGGGTAT <b>GTCTAGA</b> ATTCCGGGGATCCGTCGACC
cchK_fwd	CGACCGCGGTGTCGTCAGAC
cchK_rev	CTTCACCGTACGCCCCGACG
cloY_Hind_F	TTTTT <b>AAGCTT</b> ATGGCGACGAACCCGTTTCGAGG
cloY_Spe_R	AAAA <b>ACTAG</b> TTGAATGAGCAGATGCTA
couY_Hind_F	AAAA <b>AAGCTT</b> ATGGCGACGAACCCGTTTCGATGAC
couY_Spe_R	AAAA <b>ACTAG</b> TCGAGCGGTTTCTACTCGTCACCC
cchK_Hind_F	AAAA <b>AAGCTT</b> ATGAGCACCAACCCCTTCGA
cchK_Spe_R	AAA <b>ACTAG</b> TCACGGCAGTTGGGAGTTCAC
CDA_Hind_F	AAAA <b>AAGCTT</b> GTGACCAATCCGTTTCGAAGA
CDA_Spe_R	AAAA <b>ACTAG</b> TCCGTCGTGGTCCGGTCAGTT
ermE_seq	CGACCCGAGCACGCGCCGGC
couE_fwd	ACTTCCGTCGGAAGCCGTCG
couE_rev	ACCGTGAGGATCCTTCCGCC
gyrB_fwd	GACTGGTTCGACCGCAACCC
gyrB_rev	CCGTCGAGCACCATCAGGTG
couH_fwd	AGGGCGTGATTCCATCACGC
couH_rev	GGACGGGTGCTCATCTCTCA
fwd49F3	CGTCTTCAAGAATTGCGGGCCGCAATTAACCCTCACTAA <b>AGCTAG</b> CTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
rev49F3	GGCCGCCAGTCCAGTGGTACGTGCGATCTTGCGGTCCG <b>AGACTAG</b> TATTCCGGGGATCCGTCGACC
fwdSpecStrep	CCGCCGCAACCGGCGCCGACCTTTTGTGGCGGGTCAAGAA <b>AGCTAG</b> CTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
revSpecStrep	GTTCAAGTTCGCCGTGGGCAGTGGCAAGGTCATCAAGGGC <b>ACTAG</b> TATTCCGGGGATCCGTCGACC
cloF_fwd	TTT <b>GAATTC</b> GTGCACACGGCCGTGAT
cloF_rev	AAAT <b>CTAG</b> AGATGTCAGGCGTCCGCT
couO_Xba_f	GATCAGTTCACTGACGCAGCACCGGGGGATCGAGAT <b>GTCTAGA</b> ATTCCGGGGATCCGTCGACC
couO_Xba_r	TCCGCCAGATCCTGAGCAGCGGGACCGAACGGCCGGT <b>CATCTAG</b> ATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
couO_test_f	GAGAACTCCCTACCGCGAAC
couO_test_r	CCGATGACTCCTTCGACGTC

In die Primer eingefügten Restriktionserkennungssequenzen sind fett gedruckt. Homologe Sequenzen für  $\lambda$  RED-vermittelte homologe Rekombination sind unterstrichen.

## 2.10 Herstellung verwendeter Bakterienmutanten und DNA-Konstrukte

### 2.10.1 Herstellung der $\Delta mbtH$ Cosmide cloMW15 und cloMW16

Für die Inaktivierung des *mbtH*-homologen Gens *cloY* auf Cosmid cloBG01 wurde das PCR-targeting System (Gust *et al.*, 2004) verwendet. Das Cosmid cloBG01 (Kan<sup>R</sup>) beinhaltet das komplette Clorobiocinbiosynthesegencluster sowie die *attP/int*-Kassette des Phagen phiC31 für die stabile Integration des Clusters in das *S. coelicolor* Genom (Eustáquio *et al.*, 2005a). Für die Inaktivierung von *cloY* wurde eine Apramycin-Resistenzkassette (*aac(3)IV*) mit den Primern cloYF\_Xba und cloYR\_Spe (Tabelle 2-4) aus Plasmid pUG019 amplifiziert. Die Primer enthalten jeweils 39 bp homologe Sequenz zur Sequenz upstream des *cloY* Start-Codons und downstream des *cloY* Stop-Codons. In die Primersequenzen wurden Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* für eine spätere Elimination der Resistenzkassette eingefügt. Das erhaltene 1077 bp große PCR-Produkt wurde verwendet, um das Gen *cloY* auf Cosmid cloBG01 mittels  $\lambda$  RED-vermittelter Rekombination (PCR-targeting) zu ersetzen (Gust *et al.*, 2004). Das resultierende  $\Delta cloY$  apramycinresistente Cosmid wurde cloMW15 genannt. Restriktion von cloMW15 mit *XbaI* und *SpeI* und Religation der kompatiblen Überhänge, führte zu dem apramycinsensitive Cosmid cloMW16 (Abbildung 4). Die Überprüfung der *cloY*-Deletion erfolgte durch Restriktionsanalysen der Cosmide cloMW15 und cloMW16 sowie mittels PCR unter Verwendung der Kontrollprimer cloY\_fwd und cloY\_rev.

### 2.10.2 Deletion der *mbtH*-homologen Gene in *S. coelicolor* M512

Die Deletion der *mbtH*-homologen Gene SCO3218 und SCO0489 in *S. coelicolor* M512 erfolgte mittels PCR-targeting. Hierfür wurde eine Viomycin-Resistenzkassette (*vph/oriT*) aus Plasmid pIJ780 mit den Primern CDA\_Spe\_F und CDA\_Xba\_R (Tabelle 2-4) amplifiziert. Das 1576 bp PCR-Produkt wurde anschließend für die Deletion von SCO3218 (*CDA-ORFX*) auf Cosmid StE8 (Kan<sup>R</sup>) (Redenbach *et al.*, 1996) eingesetzt. Das entstandene Cosmid wurde als StE8 $\Delta$ CDA-ORFX bezeichnet (Abbildung 4).

Für die Deletion des Gens SCO0489 (*cchK*) auf Cosmid StF76 (Kan<sup>R</sup>) (Redenbach *et al.*, 1996) wurde eine Apramycin-Resistenzkassette (*aac(3)IV/oriT*) mit den Primern

cchK\_Spe\_F und cchK\_Xba\_R (Tabelle 2-4) aus Plasmid pIJ773 amplifiziert. Das resultierende 1378 bp PCR-Produkt wurde anschließend für das PCR-targeting zur Deletion von SCO0489 (*cchK*) auf Cosmid StF76 eingesetzt. Das entstandene Cosmid wurde als StF76 $\Delta$ *cchK* bezeichnet.

Für das Einbringen der Cosmide in *S. coelicolor* M512 über Konjugation wurde StE8 $\Delta$ CDA-ORFX in den *E. coli* Stamm ET12567/pUZ8002 elektroporiert. Die Selektion entstandener *E. coli*-Transformanten erfolgte mit Viomycin (30  $\mu$ g/ml) und Chloramphenicol (25  $\mu$ g/ml). Die Konjugation von StE8 $\Delta$ CDA-ORFX in *S. coelicolor* M512 und anschließende Selektion für stabile doppel cross-over Mutanten (Vio<sup>R</sup>; Kan<sup>S</sup>) führte zur  $\Delta$ CDA-ORFX Mutante *S. coelicolor* MW01. Anschließend wurde Cosmid StF76 $\Delta$ *cchK* über Konjugation in den zuvor hergestellten Stamm *S. coelicolor* MW01 eingebracht. Selektion für stabile doppel cross-over Mutanten mit Apramycin (50  $\mu$ g/ml) und Viomycin (30  $\mu$ g/ml) führten zur  $\Delta$ *mbtH*-Doppelmutante ( $\Delta$ CDA-ORFX $\Delta$ *cchK*) die als *S. coelicolor* MW03 bezeichnet wurde.

### 2.10.3 Herstellung der Komplementationskonstrukte für *S. coelicolor* MW03

Für die Komplementierung der *S. coelicolor* Mutanten wurden die Gene *cloY*, SCO0489 (*cchK*), SCO3218 (*CDA-ORFX*) und *couY* über PCR amplifiziert. Hierzu wurden folgende Primerpaare verwendet: *cloY*\_Hind\_F/*cloY*\_Spe\_R, *cchK*\_Hind\_F/*cchK*\_Spe\_R, *CDA*\_Hind\_F/*CDA*\_Spe\_R und *couY*\_Hind\_F/*couY*\_Spe\_R (Tabelle 2-4). Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Nucleospin-Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und nach Restriktion mit *HindIII* und *SpeI* in den ebenfalls *HindIII*/*SpeI* linearisierten Expressionsvektor pUWL201 (Doumith *et al.*, 2000) unter Kontrolle des konstitutiven Promotors *PerME\** kloniert. Die entstandenen Plasmide wurden als pMW01, pMW02, pMW03 und pMW04 bezeichnet. Sequenzierung der hergestellten Plasmide mit dem Primer ermE\_seq (Tabelle 2-4) bestätigte die erwartete Insertsequenz in allen Konstrukten. Für die Protoplastentransformation wurden die vier Plasmide in den nicht-methylierenden *E. coli*-Stamm ET12567 elektroporiert und nach Inkubation über Nacht bei 37 °C die Plasmid-DNA isoliert. Die anschließende Transformation erfolgte mittels PEG-vermittelter Protoplastentransformation. Rekombinante Stämme wurden auf festem DNA-Medium mit Thiostrepton (8  $\mu$ g/ml) selektiert.

## 2.11 Herstellung der Plasmide pMWcloF, pAE\_ha7 und pVD1

### 2.11.1 Herstellung von pMWcloF

Das Gen *cloF* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cloF\_fwd* und *cloF\_rev* (Tabelle 2-4) aus Cosmid *cloBG01* amplifiziert. Die Primersequenzen enthalten Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *EcoRI*. Das 1093 bp PCR-Produkt wurde mit Hilfe des Nucleospin 2 in 1 Kits aufgereinigt und ÜN bei 37 °C mit *XbaI* und *EcoRI* verdaut. Anschließend wurde die DNA in den ebenfalls *XbaI/EcoRI* linearisierten Vektor pUWL201 unter den konstitutiven Promotor *PermE\** ligiert. Das entstandene Plasmid wurde als pMWcloF bezeichnet und die erwartete Insertsequenz nach Sequenzierung mit dem Primer *ermE\_seq* bestätigt.

### 2.11.2 Plasmide pAE\_ha7 und pVD1

Plasmid pAE\_ha7 wurde von A. Eustaquio hergestellt und enthält das Halogenasegen *clo-hal* des Clorobiocingenclusters unter dem konstitutiven Promotor *PermE\** von pUWL201 (Eustáquio *et al.*, 2003a). Plasmid pVD1 wurde von V. Dangel im Arbeitskreis L. Heide hergestellt und enthält das Regulatorgen *novG* unter dem konstitutiven Promotor *PermE\** von pUWL201.

## 2.12 Konstruktion der *S. rishiriensis*-Cosmidbank

Chromosomale-DNA des natürlichen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten *S. rishiriensis* DSM 40489 wurde aus 50 ml YMG-Kultur isoliert (Kieser *et al.*, 2000) und anschließend partiell mit *Sau3A* verdaut. Die DNA wurde dephosphoryliert und in den *XbaI/BamHI* linearisierten Cosmidvektor SuperCos1 ligiert. Die Ligationsprodukte wurden mit dem Gigapack III XL Kit (Stratagene, Heidelberg) „verpackt“ und in *E. coli* Sure<sup>®</sup> Zellen transformiert. Alle Schritte zur Herstellung der Cosmidbank erfolgten hierbei nach den Angaben des Herstellers. Die Zellsuspension wurde auf 25 x 25 cm LB-Platten mit Kanamycin und Carbenicillin (je 50 µg/ml) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. 10.000 Einzelkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in 96-well Microtiterplatten mit je 1 ml LB-Flüssigmedium (Kan 50 µg/ml) überführt und bei 37 °C ÜN im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Cosmidbank mittels eines Stempels zu je 48 Einzelkolonien auf LB-Platten (Kan 50 µg/ml) ausgestempelt und

ÜN bei 37 °C kultiviert. Zur Lagerung wurden alle 96 wells der Mikrotiterplatten mit 0,5 ml 60 %igem Glycerol versetzt und bei -70 °C tiefgefroren.

### 2.13 PCR-screening der Cosmidbank

Das Screening der neu hergestellten *S. rishiriensis*-Cosmidbank erfolgte mittels PCR-Amplifikation ausgewählter DNA-Fragmente. Die eingesetzten Primer *couE\_fwd* und *couE\_rev* (Tabelle 2-4) amplifizieren ein 1020 bp Fragment mit Beginn 806 bp upstream des Start-Codons von *couE*. Dieses PCR-Produkt diente zur Identifizierung des linken (5') Endes des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters. Das Primerpaar *gyrB\_fwd* und *gyrB\_rev* (Tabelle 2-4) amplifiziert ein 1009 bp Fragment einschließlich des Stop-Codons des Resistenzgens *gyrB<sup>R</sup>* und diente der Identifizierung des rechten (3') Endes des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters. Die Primersequenzen wurden aus der bereits annotierten Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclustersequenz AF235050 abgeleitet.

Zur Durchführung des PCR-screenings wurden je 48 ausgestempelte Einzelkolonien der Cosmidbank mit 2 ml H<sub>2</sub>O von LB-Platten abgespült und die Cosmid-DNA isoliert. Die isolierte Cosmid-DNA wurde anschließend zur Überprüfung mittels PCR eingesetzt. Bei positiven PCR-Ergebnissen mit den entsprechenden Primerpaaren, die auf einen 48er pool zurückzuführen waren, wurde dieser in drei Folgeschritten (24er und 12er pools) bis zu den Einzelkolonien aufgelöst. In einer zweiten PCR-screening Runde wurden die Primer *couH\_fwd* und *couH\_rev* (Tabelle 2-4) verwendet. Hierbei wurde ein 2014 bp Fragment amplifiziert, das einen Teil des intergenetischen Bereichs zwischen *couY* und *couH*, als auch das Gen *couH* beinhaltet. Innerhalb dieser Sequenz ist die einzige *NsiI*-Restriktionsschnittstelle des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters lokalisiert, deren Anwesenheit für die weiterführenden Arbeitsschritte von Bedeutung war.

### 2.14 Identifizierung der Cosmide 49F3 und 51D9

Aus der *S. rishiriensis* Cosmidbank wurden zwei Cosmide isoliert, die für Folgeexperimente näher charakterisiert wurden. Cosmid 49F3 zeigte sowohl mit den *gyrB*-Primern, als auch mit den *couH*-Primern, das erwartete PCR-Fragment. PCR mit den *couE*-Primern führte zu keinem Produkt. Das Cosmid 51D9 zeigte mit den *couH*-Primern und den *couE*-Primern das erwartete PCR-Fragment, jedoch nicht mit

den *gyrB*-Primern. Nach Isolation von DNA wurden die Endbereiche der Cosmide 49F3 und 51D9 mit T7- und T3-Primern des SuperCos 1-Vektors ansequenziert (MWG-Biotech, Ebersberg). Damit konnte das 5'-Ende des klonierten Inserts von 49F3 im Gen *couG* ermittelt werden. Das 3'-Ende des Inserts von Cosmid 51D9 befindet sich in der Sequenz von *coul*.

## 2.15 Klonierung des gesamten Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters über $\lambda$ RED-vermittelte Rekombination

### 2.15.1 Herstellung von Cosmid couMW12

Für die Klonierung des vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters ausgehend von zwei überlappenden Cosmiden, wurde eine modifizierte Strategie des PCR-targeting-Systems (Gust *et al.*, 2004) benutzt. Die aus der *S. rishiriensis* Cosmidbank isolierten Cosmide 49F3 (Kan<sup>R</sup>) und 51D9 (Kan<sup>R</sup>) wurden dabei modifiziert. Für die Modifikation von Cosmid 49F3 wurde zuerst eine Apramycin-Resistenzkassette (*aac(3)IV/oriT*) aus Plasmid pIJ773 mit den Primern fwd49F3 und rev49F3 (Tabelle 2-4) mittels PCR amplifiziert. Die Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme *NheI* und *SpeI* für eine spätere Elimination des Resistenzmarkers, wurden in die Primersequenzen eingefügt. Die Primer beinhalten jeweils 40 bp Sequenzhomologie zur Sequenz 979 bp und 868 bp upstream von *couY* innerhalb des Gens *couG*, die gerade noch auf 49F3 vorhanden ist. Nach PCR-Amplifikation wurde die 1381 bp große Resistenzkassette über  $\lambda$  RED-vermittelte homologe Rekombination (Gust *et al.*, 2004) in Cosmid 49F3 eingebracht. Das entstandene apramycin/kanamycinresistente Cosmid wurde als couMW12 bezeichnet.

### 2.15.2 Herstellung von Cosmid couMW13

Die Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzkassette (*aadA/oriT*) wurde mit den Primern fwdSpecStrep und revSpecStrep (Tabelle 2-4) aus Plasmid pIJ778 amplifiziert. Die Primer beinhalten je 40 bp homologe Sequenz für die Insertion der Resistenzkassette 1006 bp upstream von *couE* in Cosmid 51D9. Restriktionsschnittstellen für *NheI* and *SpeI* wurden für eine spätere Elimination der Kassette in die Primersequenzen eingefügt. Nach PCR-targeting von Cosmid 51D9 mit dem 1461 bp PCR-Fragment und anschließender Selektion auf

Spectinomycin/Streptomycin (50 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml), wurden einzelne Transformanten ausgewählt und die Cosmid-DNA isoliert. Anschließende Überprüfungen mittels Restriktionsanalyse und PCR bestätigten die korrekte Insertion der Kassette in Cosmid 51D9. Das resultierende spec/strep-resistente Cosmid wurde als couMW13 bezeichnet.

### 2.15.3 Herstellung von Cosmid couMW14

Die Herstellung von Cosmid couMW14 mit dem vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster erfolgte über λ RED-vermittelte homologe Rekombination nach dem PCR-targeting Prinzip. In einem präparativen Ansatz wurde couMW13 Cosmid-DNA mit *NheI* und *NsiI* verdaut und die entstandenen Fragmente über Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Isolation des 5930 bp Fragments aus der Gelmatrix erfolgte mit Hilfe des Nucleospin Extract 2 in 1 Kits. Das isolierte Fragment wurde anschließend für das PCR-targeting von Cosmid couMW12 eingesetzt. Hierfür wurde couMW12 in den *E. coli* Stamm BW25113/pIJ790 elektroporiert und gewachsene Transformanten mit Chloramphenicol (25 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und Apramycin (50 µg/ml) selektioniert. Nach Elektroporation von ET12567/pIJ790/couMW12 mit dem aufgereinigtem 5930 bp Restriktionsfragment, wurde der Transformationsansatz auf LB-Platten (Kan 50 µg/ml; Spec/Strep 50 µg/ml) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Gewachsene spec/strep-resistente *E. coli* Transformanten wurden in Flüssigkultur (Kan 50 µg/ml; Spec/Strep 50 µg/ml) kultiviert und nach Isolation der Cosmid-DNA, wurde die Integration des 5930 bp Fragments mittels PCR und Restriktionsanalysen überprüft. Cosmide, welche die erfolgreiche Insertion des Restriktionsfragments zeigten und damit das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthesegencluster enthielten, wurden als couMW14 bezeichnet.

### 2.15.4 Herstellung von Cosmid couMW15 und couMW16

Die Elimination der Spec/Strep-Resistenzkassette aus Cosmid couMW14 erfolgte durch *NheI*/*SpeI* Restriktion und anschließender Religation der kompatiblen Überhänge. Hierfür wurde Cosmid-DNA von couMW14 über Nacht mit *NheI* und *SpeI* verdaut und anschließend bei 16 °C ÜN religiert. Der Ligationsansatz wurde in CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* XL-1 Zellen transformiert und entstandene Transformanten anschließend mit Kanamycin (50 µg/ml) selektioniert. Die erfolgreiche Elimination der

Spec/Strep-Kassette wurde mit PCR und Restriktionsanalysen nach Isolation von Cosmid-DNA überprüft. Die so entstandenen Spec/Strep-sensitiven Cosmide wurden als couMW15 bezeichnet.

Für eine spätere Integration des Cosmids mit dem vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters in das Genom von *S. coelicolor* M512, wurde die *bla*-Sequenz des SuperCos1 Vektors von Cosmid couMW15 durch die *attP/oriT*-Kassette (*attP*, *int*, *tet*, *oriT*) aus Plasmid pIJ787 ersetzt (Eustáquio *et al.*, 2005a). Das resultierende Cosmid couMW16 beinhaltet damit das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster sowie die sequenzspezifischen Integrationsfunktionen des Phagen phiC31. Cosmid couMW16 wurde nach PCR-Überprüfung und Restriktionsanalysen zur Komplettssequenzierung verschickt.

### 2.15.5 Herstellung der $\Delta$ *couO* Cosmide couMW17 und couMW18

Zur Herstellung neuer Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate wurde das Methyltransferasegen *couO* auf Cosmid couMW16 durch die PCR-targeting Methode deletiert. Eine Apramycin-Resistenzkassette (*aac(3)IV/oriT*) wurde mit den Primern *couO\_Xba\_f* und *couO\_Xba\_r* (Tabelle 2-4) aus Plasmid pIJ773 amplifiziert. Die verwendeten PCR-Primer enthalten je 40 bp Homologie zur Sequenz unmittelbar vor dem Start- und nach dem Stop-Codon von *couO*, sowie eine *XbaI* Restriktionsschnittstelle. Das erhaltene PCR-Produkt (1439 bp) wurde für die Inaktivierung von *couO* in Cosmid couMW16 im *E. coli*-Stamm BW25113/pIJ790/couMW16 eingesetzt. Resultierende Transformanten welche die Resistenzkassette erfolgreich integriert hatten (couMW17), wurden auf apramycinhaltigem Medium selektioniert und die Cosmid-DNA ausgewählter Klone mit Hilfe der Testprimer *couO\_test\_f* und *couO\_test\_r* (Tabelle 2-4) überprüft. Die Amplifikation eines 1663 bp PCR-Produkts bestätigte dabei den Austausch von *couO* gegen die *aac(3)IV/oriT*-Kassette in Cosmid couMW17. Um mögliche polare Effekte der inserierten Resistenzkassette auf nachfolgende Gene zu vermeiden, wurde diese über Restriktion und Religation aus Cosmid couMW17 entfernt. Hierfür wurde Cosmid-DNA von couMW17 über Nacht bei 37 °C mit *XbaI* verdaut. Nach Religation bei 16 °C für 16 Stunden wurde der Ligationsansatz durch CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen eingebracht und auf kanamycinhaltigem Medium ausplattiert. Isolierte Cosmid-DNA aus kanamycinresistenten Transformanten wurde durch Restriktionsanalysen und PCR (*couO\_test\_f* und *couO\_test\_r*) untersucht. Das Entfernen der Apramycin-

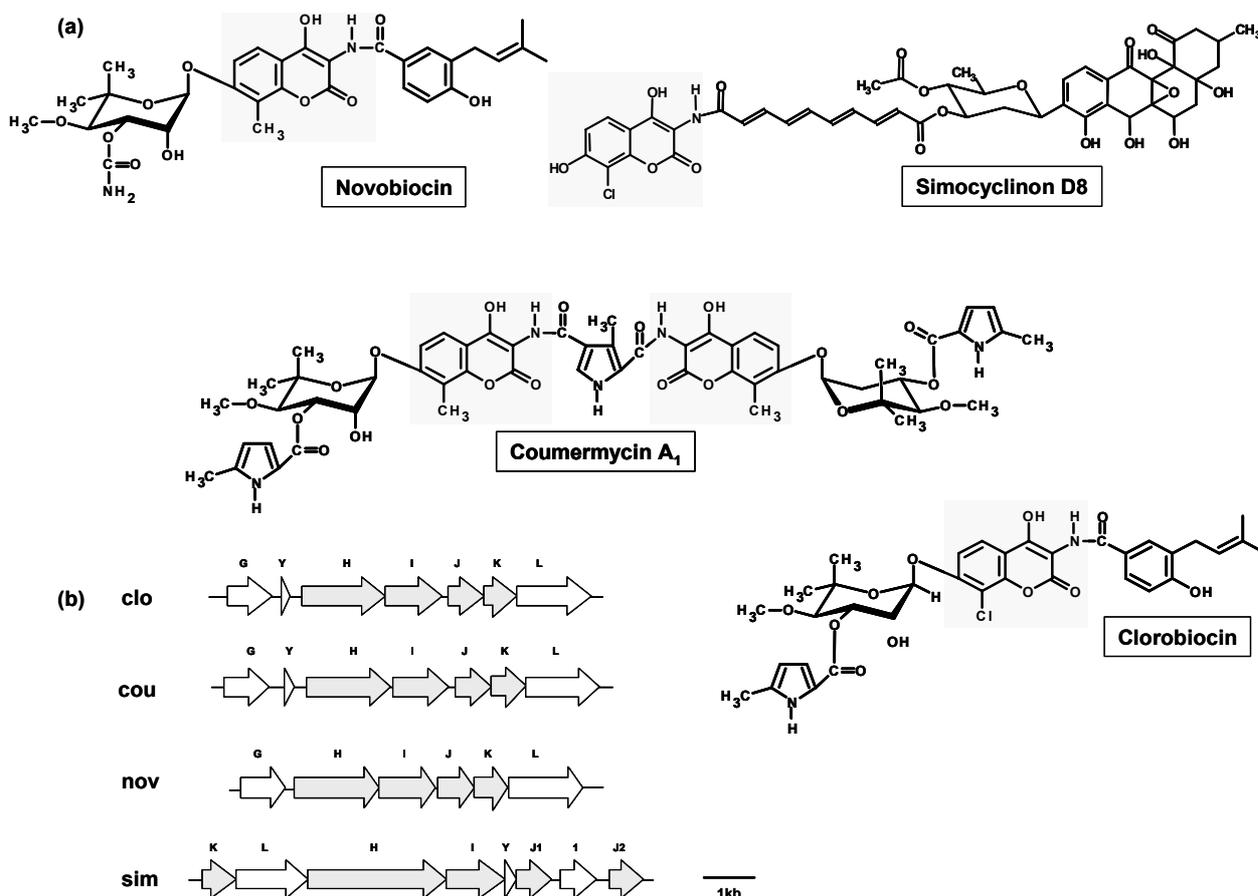
Resistenzkassette führte zum Verbleib einer 6 bp „scar“ innerhalb der ursprünglichen *couO*-Sequenz. Das resultierende Cosmid wurde als couMW18 bezeichnet. Nach Integration von couMW18 in das Genom von *S. coelicolor* M512 wurde der Genotyp der couMW18 Integrationsmutanten mit den Testprimern couO\_test\_f und couO\_test\_r überprüft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Funktion des *mbtH*-ähnlichen Gens *cloY* aus dem Clorobiocingencluster

##### 3.1.1 *mbtH*-ähnliche Gene und mögliche Funktionszuordnungen

*CloY* ist ein 218 bp großes Gen, das im Clorobiocingencluster downstream des putativen Regulorgens *cloG* (Eustáquio *et al.*, 2005b) und upstream des Gens *cloH* lokalisiert ist (Abbildung 3). Für die Gruppe der downstream von *cloY* gelegenen Gene *cloH*, *I*, *J*, und *K* konnte eine Beteiligung an der Biosynthese der 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarineinheit von Clorobiocin nachgewiesen werden (Chen & Walsh, 2001; Pacholec *et al.*, 2005a).



Eine ähnliche Anordnung dieser Gene findet sich auch im Novobiocin- und Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster. Während im Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster das *cloY* orthologe Gen *couY* an entsprechender Stelle wie *cloY* im Clorobiocincluster lokalisiert ist, fehlt im Novobiocincluster ein solches Gen. Sequenzanalysen auf Aminosäureebene ergaben eine Ähnlichkeit von CouY zu CloY von 81 %. Im Simocyclinon D8-Gencluster sind ebenfalls Orthologe aller Gene der Aminocoumarinbiosynthese, einschließlich des kleinen ORFs *simY*, vorhanden. Ein orthologes Gen zu *cloG* fehlt hier jedoch. Datenbankanalysen ergaben eine Sequenzähnlichkeit von SimY zu CloY von 59 %. *CloY*, *couY* und *simY* codieren für Proteine von 71, 71 und 70 Aminosäuren und weisen große Ähnlichkeiten zu *mbtH* aus dem Mycobactincluster von *Mycobacterium tuberculosis* auf. Mycobactin ist ein nichtribosomal gebildetes Peptid-Siderophor, das für die Komplexierung von Eisen und die anschließende Aufnahme in die Zelle verantwortlich ist (Quadri *et al.*, 1998). Eine Funktionszuordnung für *mbtH* in der Mycobactinbiosynthese konnte nicht hergestellt werden. Da bisher nur wenige Daten über mögliche Funktionen der *mbtH*-ähnlichen Gene vorliegen, wurde beschlossen die Bedeutung von *cloY* für die Clorobiocinbiosynthese experimentell zu untersuchen.

### **3.1.2 Inaktivierung von *cloY* im Clorobiocinbiosynthesegencluster und heterologe Expression des $\Delta cloY$ Genclusters**

Um festzustellen welche Auswirkung der Verlust des *mbtH*-ähnliche Gens *cloY* auf die Clorobiocinbiosynthese hat, wurde ein Inaktivierungsexperiment durchgeführt. Das integrative Cosmid cloBG01 (Abbildung 4) beinhaltet das komplette Clorobiocincluster und wurde bereits erfolgreich für die heterologe Expression von Clorobiocin in *S. coelicolor* M512 eingesetzt (Eustáquio *et al.*, 2005a). Für die Inaktivierung von *cloY* mittels PCR-targeting, wurde eine Apramycin-Resistenzkassette über PCR amplifiziert und anschließend für die Deletion von *cloY* auf Cosmid cloBG01 verwendet. Das resultierende apramycinresistente  $\Delta cloY$  Cosmid wurde als cloMW15 bezeichnet (Abbildung 4). Um mögliche polare Effekte der integrierten Kassette zu vermeiden, wurde diese durch *XbaI/SpeI*-Restriktion aus dem Cosmid entfernt. Die anschließende Religation der kompatiblen Überhänge führte zu Cosmid cloMW16 (Abbildung 4). In diesem Cosmid ist der gesamte *open*

*reading frame* von *cloY* deletiert und durch eine 18 bp „scar“-Sequenz zwischen dem *cloY* Start- und Stop-Codon ersetzt.

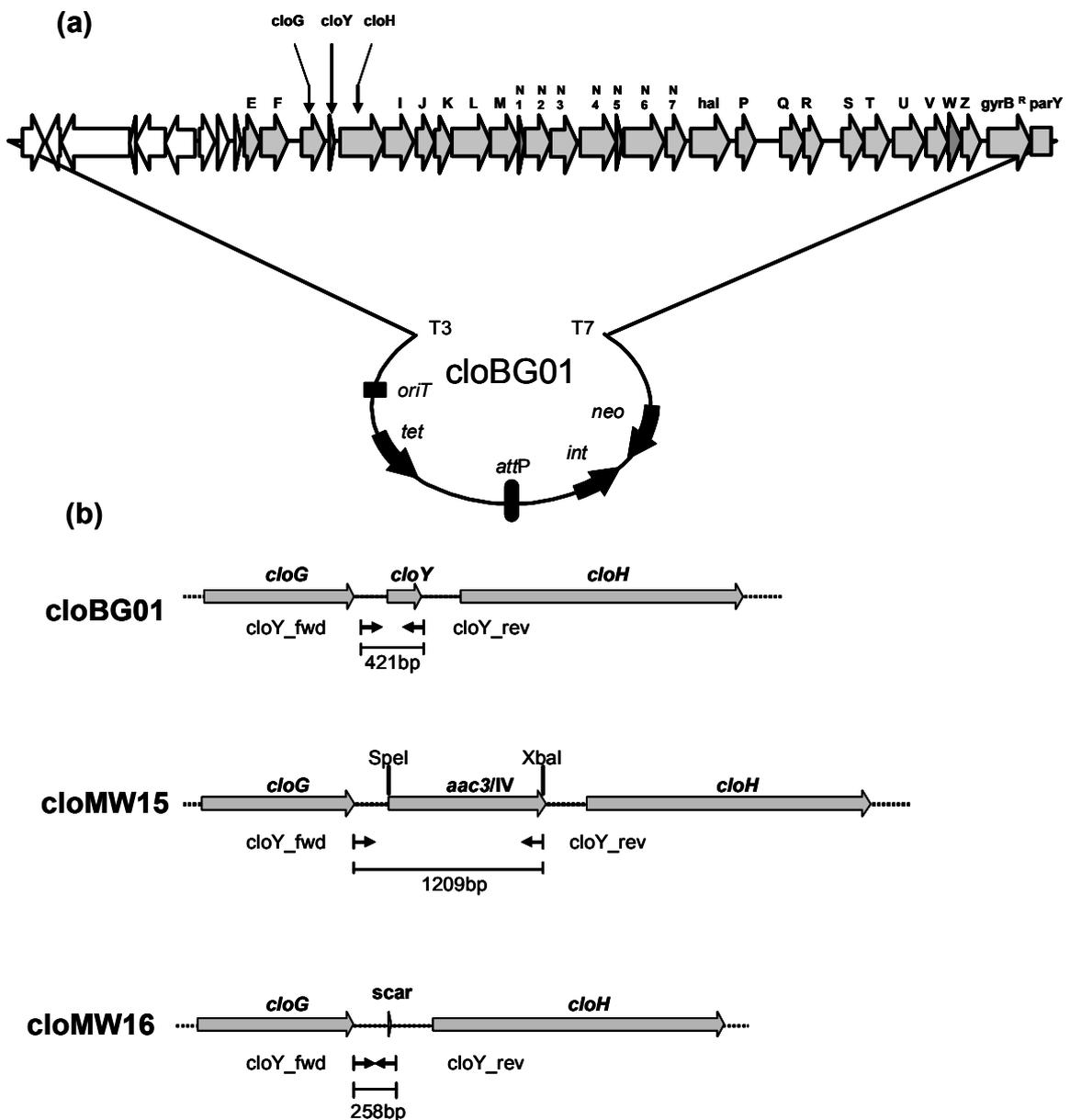
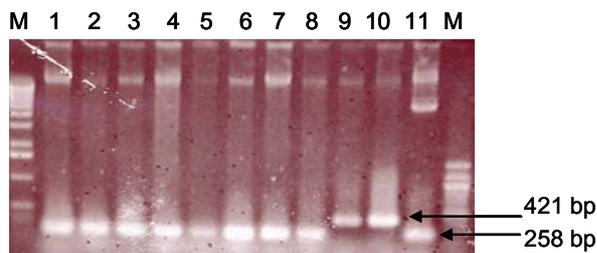


Abbildung 4: (a) Cosmid *cloBG01* enthält das intakte Clorobiocingencluster sowie die Integrationsfunktionen des Phagen  $\phi$ C31. Die Gene des Clorobiocingencluster sind grau unterlegt. (b) Inaktivierung von *cloY* auf Cosmid *cloBG01* und Konstruktion der Cosmide *cloMW15* und *cloMW16*. Die erwarteten PCR-Produkte bei Verwendung der Kontrollprimern *cloY\_fwd* und *cloY\_rev* sind eingezeichnet.

## Ergebnisse

---

Für die heterologe Expression des  $\Delta cloY$  Cosmids wurde cloMW16 über Konjugation in den heterologen Wirtstamm *S. coelicolor* M512 eingebracht. Vier individuelle Streptomyceten-Integrationsmutanten von *S. coelicolor*(cloMW16) wurden isoliert und die *cloY* „scar“-Version nach Isolation genomischer DNA mittels PCR Analyse nachgewiesen (Abbildung 5). Als Kontrolle wurde cloBG01 in das Genom von *S. coelicolor* M512 integriert und das intakte *cloY* Gen im Genom der Mutante nachgewiesen (Abbildung5).



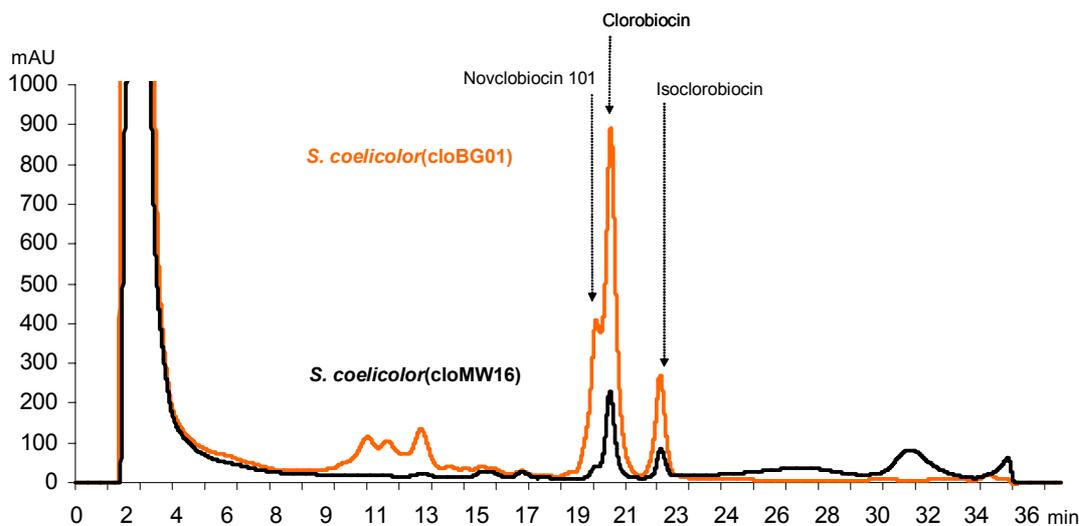
**Abbildung 5: PCR-Überprüfung genomischer DNA mit den Primern *cloY\_fwd* und *cloY\_rev* von verschiedenen *S. coelicolor* Mutanten. Vier individuelle *S. coelicolor*(cloMW16) Integrationsmutanten (1-4); Vier individuelle *S. coelicolor* MW03(cloMW16)  $\Delta mbtH$  Dreifachmutanten (5-8). Als Kontrolle wurde genomische DNA von *S. coelicolor*(cloBG01) (9), sowie die Cosmide cloBG01 (10) und cloMW16 (11) verwendet. Bei dem intaktem Gen *cloY* ist ein 421 bp PCR-Produkt zu erwarten. Für die *cloY* „scar“-Version ist ein 258 bp PCR-Produkt zu erwarten. DNA-Größenmarker (M). Bei allen Integrationsmutanten konnte das erwartete PCR-Produkte von 258 bp identifiziert werden.**

Für die Analysen zur Clorobiocinproduktion wurden die beiden Stämme *S. coelicolor*(cloBG01) und *S. coelicolor*(cloMW16) unter den in 2.3.3 beschriebenen Bedingungen zur Sekundärstoffproduktion kultiviert. Die Ermittlung der produzierten Clorobiocinmengen erfolgte mittels HPLC Analyse unter Verwendung eines Clorobiocinstandards. Für den Stamm mit dem vollständigen Clorobiocinengencluster *S. coelicolor*(cloBG01) lag die Clorobiocinproduktion bei 54 mg/l, während die durchschnittliche Produktion der  $\Delta cloY$  Defektmutante *S. coelicolor*(cloMW16) nur bei 12 mg/l lag (Abbildung 6). Frühere Inaktivierungsexperimente von Biosynthesegenen oder Regulatorgenen der Aminocoumarin-Gencluster hatten immer zu einem vollständigen oder fast-vollständigen Ausfall der Antibiotikaproduktion geführt (Eustáquio *et al.*, 2005b; Li & Heide, 2005). Die hier erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Clorobiocinbiosynthese auch nach Verlust des *mbtH*-ähnlichen

## Ergebnisse

Gens *cloY* funktionsfähig bleibt und weiterhin zu einer Clorobiocinproduktion von rund 22 % im Vergleich zum Kontrollstamm führt.

Die ermittelten Produktionsmengen der  $\Delta mbtH$  Defektmutante waren dabei aber deutlich geringer (12  $\mu\text{g/ml}$ ) als die des Kontrollstamms mit intaktem Genclusters (54  $\mu\text{g/ml}$ ). Eine regulatorische Funktion von CloY konnte daher nicht ausgeschlossen werden, während eine katalytische Funktion, u.a. wegen der geringen Größe des Proteins, weiterhin als unwahrscheinlich galt. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass nach Inaktivierung von *cloY* die Funktion dieses Gens von anderen Genen übernommen wird, die im Genom des heterologen Wirts *S. coelicolor* M512 lokalisiert sind. Für eine experimentelle Überprüfung dieser Annahme konnte dabei von zwei entscheidenden Vorteilen des heterologen Expressionssystems Gebrauch gemacht werden: Zum einen ist das Genom von *S. coelicolor* M145 komplett sequenziert und liegt als annotierte Sequenz vor (Bentley *et al.*, 2002), und zum Anderen sind sehr effiziente Methoden für die genetische Manipulation dieses Stamms beschrieben.



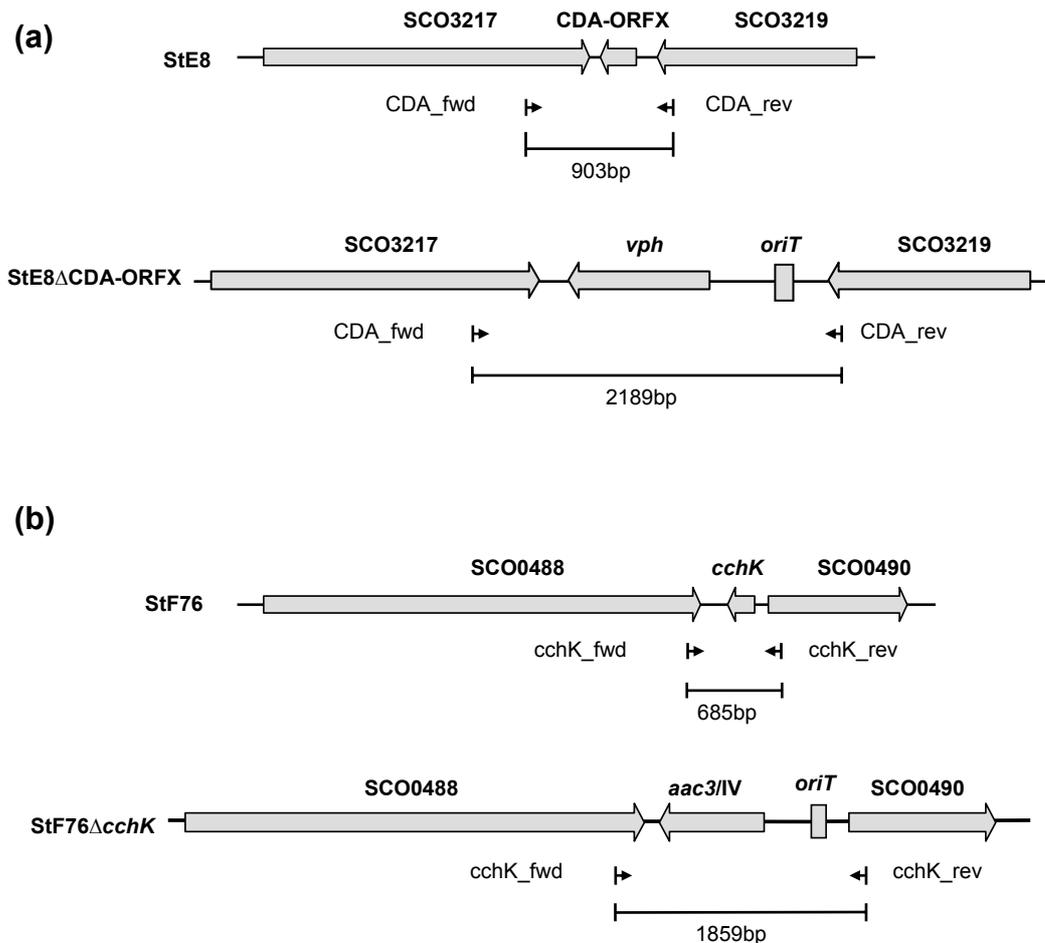
**Abbildung 6:** HPLC Analyse der Clorobiocinproduktion der *Streptomyces coelicolor* Mutanten *S. coelicolor*(cloBG01) und *S. coelicolor*(cloMW16). *S. coelicolor*(cloBG01) enthält das intakte Clorobiocingencluster und *S. coelicolor*(cloMW16) enthält das  $\Delta cloY$  Gencluster. Wie schon früher beobachtet (Eustáquio *et al.*, 2005a), tritt Clorobiocin zusammen mit den Strukturanaloga Novclobiocin 101 und Isoclorobiocin auf. Das Verhältnis zwischen Clorobiocin und dem unchlorierten Analogon Novclobiocin 101 schwankte innerhalb verschiedener Kultivierungen derselben Mutante.

### 3.1.3 Inaktivierung der *mbtH*-Homologen im Genom von *S. coelicolor* M512 und Herstellung der $\Delta$ *mbtH* Doppelmutante *S. coelicolor* MW03

Durch eine Analyse der Genomsequenz von *Streptomyces coelicolor* konnten zwei Gene identifiziert werden, die starke Sequenzähnlichkeit zu *cloY* zeigen. Dabei handelt es sich bei dem Gen SCO3218 um den als *CDA-ORFX* bezeichneten, 216 bp kleinen *open reading frame* aus dem calcium-dependent antibiotic (CDA)-Genclusters (Hopwood & Wright, 1983). Für die Sco-Nummer SCO0489 ist das 213 bp kleine Gen *cchK* aus dem Coelichelingencuster annotiert (Challis & Ravel, 2000). Die vorhergesagten Aminosäuresequenzen dieser beiden Gene zeigen eine Sequenzähnlichkeit zu *CloY* von 68 % für *CDA-ORFX* und 62 % für *CchK*. *CDA-ORFX* und *cchK* sind ebenfalls als *mbtH*-ähnliche Gene ohne bekannte Funktion in der Datenbank hinterlegt.

Die Deletion von *CDA-ORFX* und *cchK* erfolgte zuerst auf den zwei isolierten *S. coelicolor* Cosmiden StE8 und StF76 (Abbildung 7). Für die Inaktivierung von *CDA-ORFX* wurde das Gen SCO3218 mittels PCR-targeting auf dem Cosmid StE8 ( $\text{Kan}^{\text{R}}$ ) durch eine Viomycin-Resistenzkassette ersetzt. Integration des Cosmids StE8 $\Delta$ *CDA-ORFX* ( $\text{Kan}^{\text{R}}$ ,  $\text{Vio}^{\text{R}}$ ) in das Genom von *S. coelicolor* M512 und anschließendes Screening auf doppel cross-over Mutanten ( $\text{Kan}^{\text{s}}$ ,  $\text{Vio}^{\text{R}}$ ) führte zur  $\Delta$ *CDA-ORFX* Mutante *S. coelicolor* MW01.

Für die Inaktivierung des zweiten *mbtH*-homologen Gens *cchK* wurde das Gen SCO0489 auf Cosmid StF76 ( $\text{Kan}^{\text{R}}$ ) mittels PCR-targeting durch eine Apramycin-Resistenzkassette ersetzt. Anschließend wurde das entstandene Cosmid StF76 $\Delta$ *cchK* ( $\text{Kan}^{\text{R}}$ ,  $\text{Apra}^{\text{R}}$ ) (Abbildung 7) in *S. coelicolor* MW01 eingebracht und für doppel cross-over Mutanten ( $\text{Kan}^{\text{s}}$ ,  $\text{Vio}^{\text{R}}$ ,  $\text{Apra}^{\text{R}}$ ) selektioniert. Die resultierende  $\Delta$ *mbtH* Doppelmutante ( $\Delta$ *cchK* $\Delta$ *CDA-ORFX*) wurde als *S. coelicolor* MW03 bezeichnet.



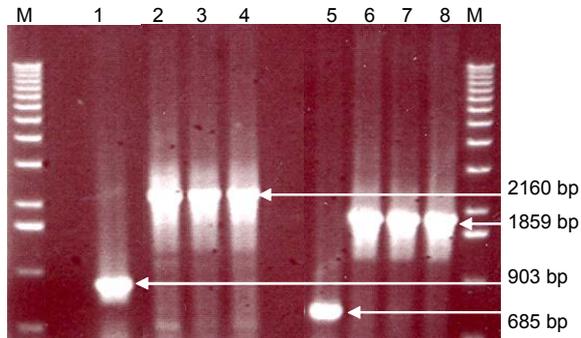
**Abbildung 7: Inaktivierung der *mbtH*-ähnlichen Gene *CDA-ORFX* und *cchK*. Die Inaktivierung des *mbtH*-ähnlichen Gens *CDA-ORFX* erfolgte auf Cosmid StE8 durch PCR-targeting mit einer Viomycin-Resistenzkassette (a). Die Inaktivierung von *cchK* auf Cosmid StF76 erfolgte mit einer Apramycin-Resistenzkassette (b).**

### 3.1.4 Heterologe Expression des $\Delta cloY$ Genclusters cloMW16 in der *S. coelicolor mbtH* Doppelmutante *S. coelicolor* MW03 und Analyse der Clorobiocinproduktion

Für die heterologe Expression des  $\Delta cloY$  Genclusters wurde Cosmid cloMW16 über triparentale Konjugation in den heterologen Stamm *S. coelicolor* MW03 eingebracht. Sequenzspezifische Integration in das Genom von *S. coelicolor* M512 führte zur  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante *S. coelicolor* MW03(cloMW16). Diese beinhaltet damit das  $\Delta cloY$  Clorobiocin-gencluster in einem Wirtsgenom, in dem zuvor alle *mbtH*-homologen Gene inaktiviert wurden. Nach Kultivierung auf Selektionsmedium wurden drei individuelle Exkonjuganten isoliert und nach Isolation von genomischer

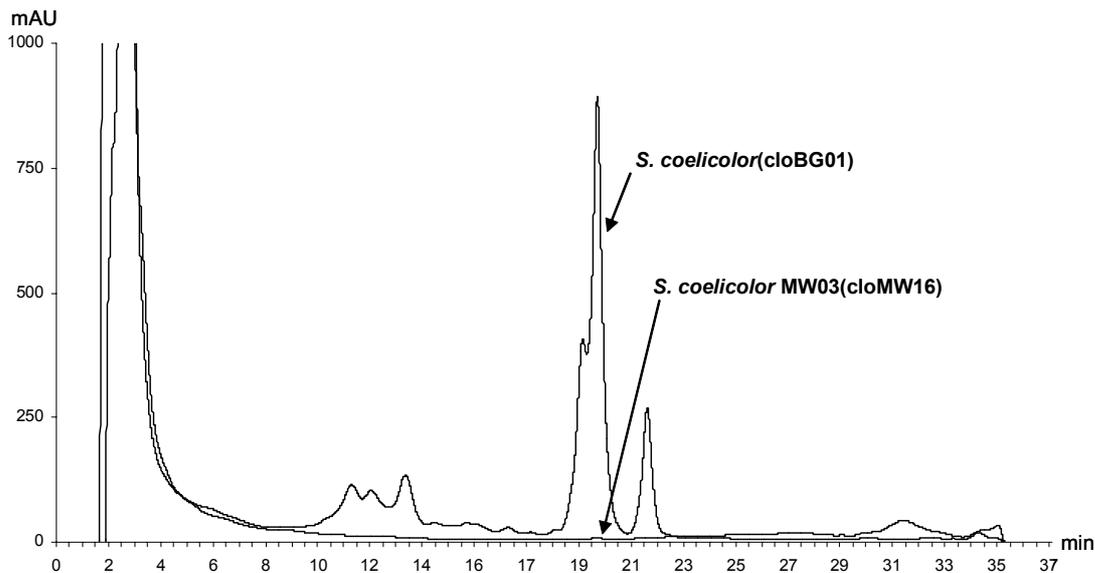
## Ergebnisse

DNA der Verlust aller *mbtH*-ähnlichen Gene mittels PCR Analyse bestätigt (Abbildung 8; Abbildung 5).



**Abbildung 8: PCR-Überprüfung zum Nachweis der Deletion der *mbtH*-ähnlichen Gene SCO3218 und SCO0489 in *S. coelicolor* MW03(cloMW16). Verwendete Kontrollprimern CDA\_fwd und CDA\_rev (1-4) sowie cchK\_fwd und cchk\_rev (Tabelle 2-4) (Spur 5-8). Genomischer DNA von drei  $\Delta mbtH$  Dreifachmutanten *S. coelicolor* MW03(cloMW16) (Spur 2, 3, 4 sowie 6, 7 und 8). Als Kontrolle wurde genomische DNA von *S. coelicolor* M512 verwendet (Spur 1 und 5). Für das intakte Gen SCO3218 wurde ein 903 bp Fragment erwartet. Bei Anwesenheit der Viomycin-Resistenzkassette wurde ein 2160 bp PCR-Produkt. Für das intakte Gen SCO0489 wurde ein 685 bp Fragment erwartet. Bei Anwesenheit der Apramycin-Resistenzkassette wurde ein 1859 bp PCR-Produkt erwartet. Die Deletion der beiden *mbtH*-ähnlichen Gene SCO3218 und SCO0489 konnte in allen  $\Delta mbtH$  Dreifachmutanten nachgewiesen werden.**

Nach Kultivierung in Produktionsmedium (s. Kapitel 2.4.3) wurde die Clorobiocinproduktion über HPLC Analysen ermittelt (Abbildung 9). Während für *S. coelicolor*(cloBG01) mit dem vollständigen Clorobiocingencluster eine Clorobiocinproduktion von rund 50  $\mu\text{g/ml}$  festgestellt wurde, lag die Clorobiocinproduktion der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutanten nur noch bei durchschnittlich 0,3  $\mu\text{g/ml}$ . Dieser dramatische Rückgang der Clorobiocinbiosynthese der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutanten von rund 99 % im Vergleich zum Kontrollstamm hat bewiesen, dass die Inaktivierung aller drei *mbtH*-ähnlichen Gene eine deutliche Auswirkung auf die Clorobiocinproduktion hat.

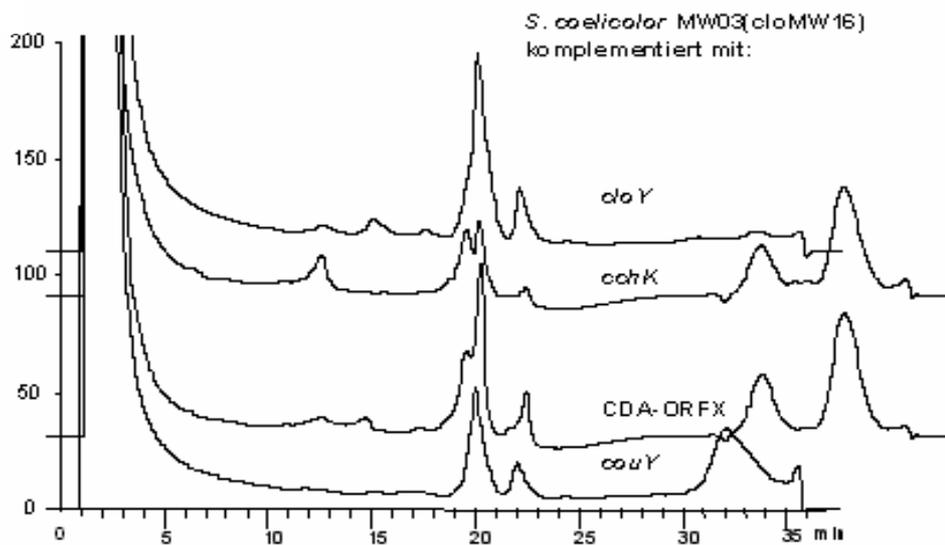


**Abbildung 9: HPLC Analyse der Clorobiocinproduktion von *S. coelicolor* MW03(cloMW16) und *S. coelicolor*(cloBG01). *S. coelicolor* MW03(cloMW16) enthält das  $\Delta cloY$  Clorobiocingencluster in einem *mbtH*-freien Wirtsgenom. *S.coelicolor*(cloBG01) ist der unveränderte heterologe Clorobiocinproduzent (Eustáquio *et al.*, 2005a).**

### **3.1.5 Komplementierung der *mbtH* Dreifachmutante *S. coelicolor* MW03(cloMW16) mit *cloY*, *CDA-ORFX* und *cchK***

Um zu zeigen, dass die beobachtete Reduktion der Clorobiocinbiosynthese tatsächlich auf die Inaktivierung der drei Gene *cloY*, *CDA-ORFX* und *cchK* zurückzuführen war, wurde die  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante *S. coelicolor* MW03(cloMW16) mit jedem dieser Gene komplementiert. Hierfür wurden die einzelnen Gene über PCR amplifiziert und anschließend unter den konstitutiven Promotor *ermE\** des replikativen Plasmids pUWL201 (Doumith *et al.*, 2000) kloniert (s. Kapitel 2.10.3). Sequenzierung der klonierten Gene in pUWL201 mit dem Primer *ermE\_seq* bestätigte die korrekte Sequenz der klonierten Inserts. Jedes der drei hergestellten Plasmide wurde in *S. coelicolor* MW03(cloMW16) eingebracht und jeweils drei unabhängige Transformanten pro Konstrukt isoliert. Kultivierung dieser Komplementationsmutanten in Clorobiocinproduktionsmedium und anschließende HPLC Analyse der Sekundärstoffproduktion, zeigten die Wiederherstellung der Clorobiocinproduktion in allen Mutanten (Abbildung 10). Die Komplementierung der

$\Delta mbtH$  Dreifachmutante mit *cloY* führte zu einer Clorobiocinproduktion von 8  $\mu\text{g/ml}$ . Die Komplementierung mit *cchK* (4,1  $\mu\text{g/ml}$ ) und *CDA-ORFX* (5,1  $\mu\text{g/ml}$ ) führte zu ähnlichen Produktionsmengen. Im Gegensatz dazu produzierte der Kontrollstamm mit leerem Vektor weniger als 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .



**Abbildung 10:** HPLC Analyse der Clorobiocinproduktion der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante *S. coelicolor* MW03(cloMW16) nach Komplementierung mit intakten Kopien von *cloY*, *cchK*, *CDA-ORFX* und *couY*. Wie schon früher beobachtet (Eustáquio *et al.*, 2005a), tritt Clorobiocin zusammen mit den Strukturanaloga Novclorobiocin 101 und Isoclorobiocin auf (s. Abbildung 6). Das Verhältnis zwischen Clorobiocin und dem unchlorierten Analogon Novclorobiocin 101 schwankte innerhalb verschiedener Kultivierungen derselben Mutante.

Damit wurde gezeigt, dass die Komplementierung der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante mit jedem der drei *mbtH*-homologen Gene *cloY*, *CDA-ORFX* und *cchK* mindestens zu einer Verzehnfachung der Clorobiocinproduktion führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich *mbtH*-ähnliche Gene verschiedener Gencluster gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können. Es ist jedoch anzumerken, dass die Komplementierungen der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante nicht zur vollen Wiederherstellung der ursprüngliche Produktionslevel führte. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die einzelnen Gene nicht unter ihren eigenen Promotoren, sondern unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors *ermE\** exprimiert wurden. Möglicherweise spielt auch die Anzahl der Genprodukte des Multicopyplasmids pUWL201 hierbei eine Rolle.

### 3.1.6 Komplementierung der *mbtH* Dreifachmutante *S. coelicolor* MW03(cloMW16) mit *couY* aus dem Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster

Das 216 bp große Gen *couY* ist im Coumermycin A<sub>1</sub>-Cluster zwischen den Genen *couG* und *couH* lokalisiert. Ähnlich wie *cloY* im Clorobiocin-Gencluster codiert *couY* für ein MbtH-Protein welches eine Sequenzähnlichkeit von 81 % zu CloY aufweist. Um zu überprüfen ob *couY* ebenfalls die  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante komplementieren kann, wurde *couY* in den Expressionsvektor pUWL201 kloniert und anschließend in *S. coelicolor* MW03(cloMW16) eingebracht. Drei unabhängige Transformanten wurden isoliert und für die Analyse zur Clorobiocinproduktion angezogen. Anschließende HPLC Analysen zeigten, dass die Inaktivierung von *cloY* durch das orthologe Gen *couY* aus dem Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster komplementiert, und die Clorobiocinproduktion in der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante wieder hergestellt werden kann. Die ermittelte Clorobiocinproduktion nach Komplementierung mit *couY* lag bei 5,3 µg/ml und war damit vergleichbar mit den Produktionen nach Komplementierung mit den Genen *cchK*, *CDA-ORFX* und *cloY* (Abbildung 10).

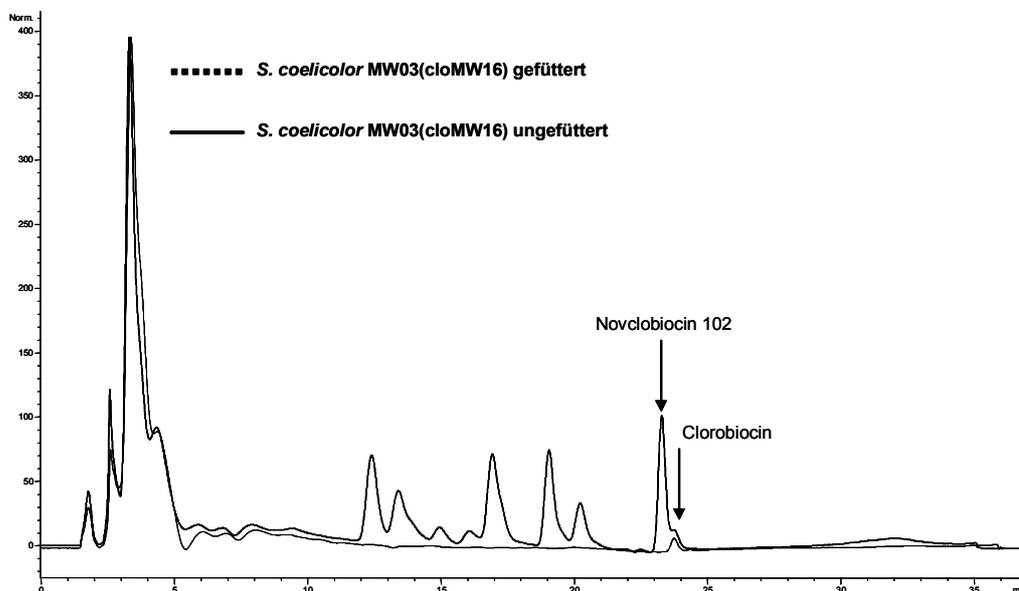
### 3.1.7 Nachweis des Einflusses von *cloY* auf die Bildung der 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarineinheit

Die oben beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass verschiedene *mbtH*-ähnliche Gene unterschiedlicher Gencluster sich gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können. Erst der Wegfall aller *mbtH*-ähnlichen Gene im heterologen Clorobiocinproduzenten führte zu einem Produktionsrückgang von 99 %. Es stellte sich daher die Frage, ob *cloY* als Regulator in der Clorobiocinbiosynthese fungiert, oder ob es an katalytischen, regulatorischen oder anderen Funktionen bei der Bildung des Clorobiocinmoleküls beteiligt ist. Da im Clorobiocin-, im Coumermycin A<sub>1</sub>- und im Simocyclinon D8-Gencluster die *cloY*-Homologen in enger Nachbarschaft zu den Genen für die Bildung des 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarinrings lokalisiert sind (Abbildung 3), konnte vermutet werden, dass *cloY* in die Biosynthese dieser spezifischen Struktur involviert ist. Um diese Theorie zu prüfen, wurde die  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante *S. coelicolor* MW03(cloMW16) mit der Aminocoumarineinheit aus Novobiocin gefüttert. Dieses Molekül besitzt an Position C-8 des 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarinrings eine Methylgruppe. Clorobiocin ist an dieser Position mit einem Chloratom halogeniert (Abbildung 3). Bereits früher durchgeführte

## Ergebnisse

Experimente haben gezeigt, dass die 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarineinheit von allen Enzymen der Clorobiocinbiosynthese gut akzeptiert wurde und zur Bildung des C-8 methylierten Clorobiocinanalogs Novclobiocin 102 führte (Eustáquio *et al.*, 2003a; Eustáquio *et al.*, 2004).

Für Fütterungsexperimente wurden insgesamt 2 mg 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin zu 50 ml Produktionskultur der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante *S. coelicolor* MW03(cloMW16) zugefüttert (s. 2.4.3). Nach Kultivierung für 7 Tage wurde die Sekundärstoffproduktion mittels HPLC analysiert (Abbildung 11). Es zeigte sich dass ohne Zufütterung weiterhin minimale Mengen an Clorobiocin produziert werden (0,3  $\mu\text{g/ml}$ ). Nach Zufütterung von 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin konnte die Akkumulation von Novclobiocin 102 (5,2  $\mu\text{g/ml}$ ) nachgewiesen werden (Abbildung 11). Die Identität dieser Substanz wurde anschließend mittels HPLC/LC-MS Analysen bestätigt (s. Anhang VII). Eine minimale Clorobiocinproduktion von durchschnittlich 0,3  $\mu\text{g/ml}$  wurde in der *S. coelicolor* MW03(cloMW6) Mutante identifiziert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Deletion der *mbtH*-ähnlichen Gene speziell die Biosynthese der Aminocoumarineinheit des Clorobiocinmoleküls beeinflussen, während die Biosynthese der anderen Strukturelemente und ihre Verknüpfungsreaktionen in der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante weiterhin möglich waren.



**Abbildung 11:** HPLC Analyse der gefütterten und ungefütterten  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante *S. coelicolor* MW03(cloMW16). Nach Fütterung mit der Aminocoumarineinheit des Novobiocinmoleküls entstand das C-8 methylierte Clorobiocinderivat Novclobiocin 102.

### 3.1.8 Heterologe Expression des Novobiocingenclusters in der *mbtH* Doppelmutante *S. coelicolor* MW03

Die *mbtH*-ähnlichen Gene *cloY*, *couY* und *simY* finden sich in den Genclustern von Clorobiocin, Coumermycin A<sub>1</sub> und Simocyclinon D8 während im Novobiocingencluster kein *mbtH*-ähnliches Gen vorhanden ist (Abbildung 3). Das integrative Cosmid novBG01 beinhaltet das vollständige Novobiocingencluster und wurde bereits erfolgreich für die heterologe Novobiocinbiosynthese in *S. coelicolor* M512 eingesetzt (Eustáquio *et al.*, 2005a). Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass *cloY* für die Clorobiocinbiosynthese in einem *mbtH*-freien Wirtsgenom benötigt wird. Damit stellt sich die Frage, ob die Biosynthese von Novobiocin ohne *mbtH*-ähnliche Gene auskommt, oder ob die Abwesenheit eines *mbtH*-ähnlichen Gens im Novobiocingencluster durch die im Wirtsgenom codierten *mbtH*-homologen Gene kompensiert wird. Um diese Fragestellung zu klären, wurde das Novobiocingencluster in das Genom der  $\Delta mbtH$  Doppelmutante *S. coelicolor* MW03 integriert (Eustáquio *et al.*, 2005a). Vier unabhängige Integrationsmutanten wurden anschließend selektiert und nach Isolation genomischer DNA die Anwesenheit des Novobiocingenclusters in *S. coelicolor* MW03(novBG01) mittels PCR verifiziert. Der Kontrollstamm *S. coelicolor*(novBG01) und die  $\Delta mbtH$  Doppelmutanten *S. coelicolor* MW03(novBG01) wurden in Produktionsmedium kultiviert und die Novobiocinproduktion anschließend mittels HPLC Analyse ermittelt. Die  $\Delta mbtH$  Doppelmutanten *S. coelicolor* MW03(novBG01) produzierte im Durchschnitt 33  $\mu\text{g/ml}$  Novobiocin, während die Produktion der parallel angezogenen Kontrollstämme durchschnittlich bei 58  $\mu\text{g/ml}$  lag. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Biosynthese von Novobiocin auch ohne *mbtH*-ähnliche Gene erfolgen kann. Jedoch scheint es, dass die intakten Gene *CDA-ORFX* und *cchK* des heterologen Wirtsgenoms *S. coelicolor* M512 die Novobiocinproduktion verstärken.

## 3.2 Untersuchungen zur heterologen Expression des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters und zur Herstellung neuer Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate

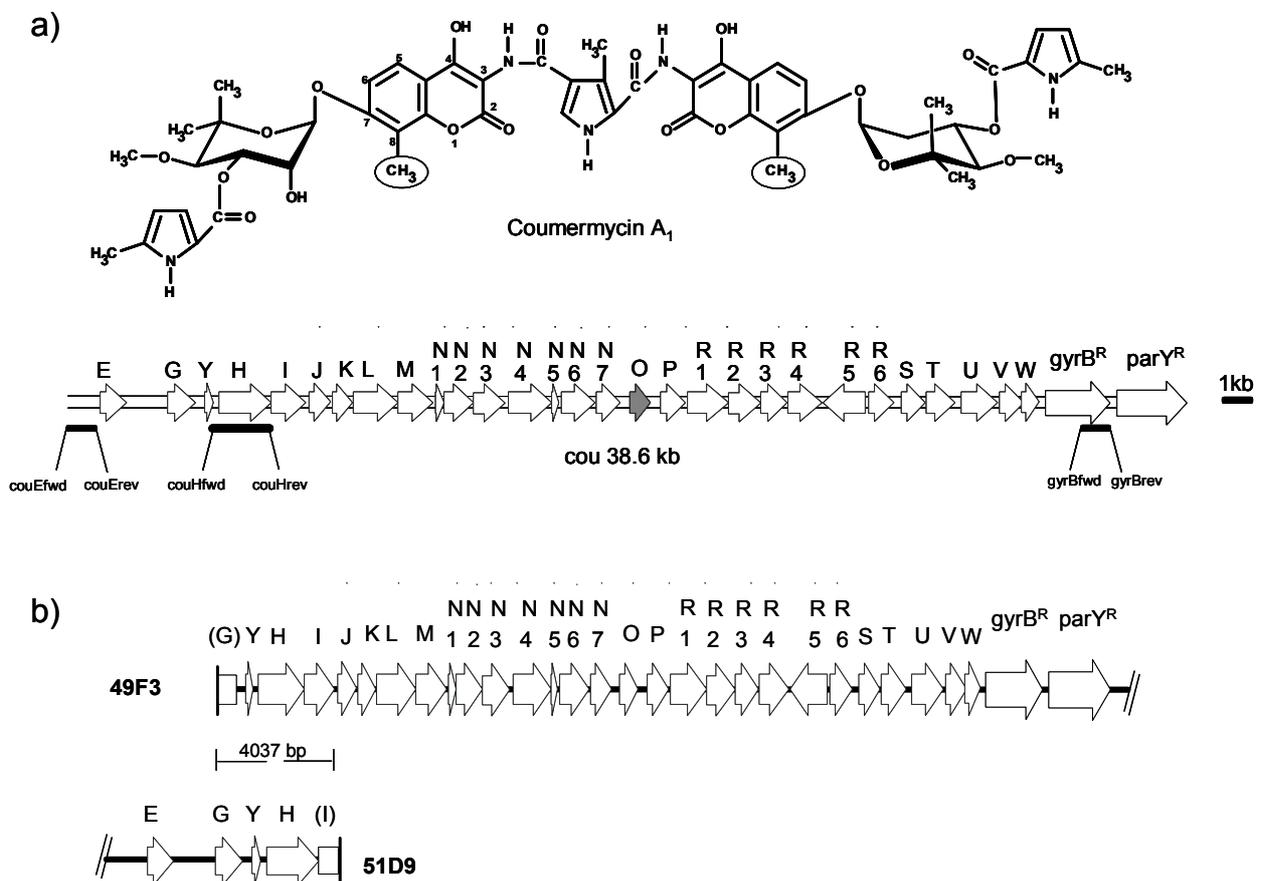
### 3.2.1 Herstellung einer *S. rishiriensis* Cosmidbank und Konstruktion des Cosmids couMW16 mit dem vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster

Um Untersuchungen zur heterologen Produktion von Coumermycin A<sub>1</sub> durchführen zu können und die Herstellung von modifizierten Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivaten zu erleichtern, sollte ein Cosmid welches das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster beinhaltet hergestellt werden. Dazu wurde eine auf SuperCos1 basierende Cosmidbank des natürlichen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten *S. rishiriensis* DSM40489 angelegt und rund 10.000 Klone dieser Genbank über PCR mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren gescreent. Die Primer couE\_fwd und couE\_rev (Tabelle 2-4) amplifizieren dabei ein 1020 bp Fragment mit Beginn 806 bp upstream des Start-Codons von *couE*. Dieses PCR-Produkt diente zur Identifizierung des linken (5') Endes des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters. Das Primerpaar gyrB\_fwd und gyrB\_rev (Tabelle 2-4) amplifiziert ein 1009 bp Fragment innerhalb des Resistenzgens *gyrB*<sup>R</sup> und diente der Identifizierung des rechten (3') Endes des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters (Abbildung 12). Die Primersequenzen wurden aus der bereits bekannten Genclustersequenz AF235050 abgeleitet. Bereits früher durchgeführte Experimente haben gezeigt, dass die Anwesenheit von *gyrB*<sup>R</sup> alleine ausreicht, um eine Resistenz gegen Coumermycin A<sub>1</sub> in *Streptomyces* zu vermitteln (Schmutz *et al.*, 2004). Es erschien daher nicht notwendig, das zweite Resistenzgen des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters, *parY*<sup>R</sup>, in dem PCR-Screening zu berücksichtigen. Das Screening auf die Anwesenheit von *gyrB*<sup>R</sup> reduzierte somit die benötigte Insertgröße des gewünschten Cosmids von 38,6 kb auf 36,6 kb und erhöhte die Wahrscheinlichkeit, einen Klon mit dem vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster isolieren zu können. Innerhalb der *S. rishiriensis* Cosmidbank konnten 28 Cosmide identifiziert werden, die nach PCR mit den couE-Primern zur Amplifikation des gewünschten 1020 bp Fragments führten. Nach PCR mit den gyrB-Primern zeigten 32 Cosmide die Amplifikation des erwarteten 1009 bp Fragments. Das Screening der Cosmidbank führte jedoch zu keinem Cosmid, welches mit beiden

## Ergebnisse

Primerpaaren zu den gewünschten PCR-Produkten führte und damit die Sequenz von *couE* bis *gyrB<sup>R</sup>* beinhaltete.

Daraufhin wurden fünf zufällig ausgewählte Cosmide die das Gen *gyrB<sup>R</sup>* enthielten isoliert und mittels PCR auf die Anwesenheit von *couH* überprüft. Das Gen *couH* ist im Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster 3624 bp downstream des Start-Codons von *couE* lokalisiert (Abbildung 12). Die beiden Cosmide 49F3 und 97D3 führten dabei zu dem gewünschten PCR-Produkt von 2014 bp. Cosmid 49F3 wurde für weitere Analysen verwendet. DNA-Sequenzierung der Enden des klonierten Inserts von 49F3 mit T3- und T7-Primern des SuperCos1-Vektors, zeigten das 5'-Ende des klonierten Inserts innerhalb des Gens *couG*, 353 bp downstream des Start-Codons von *couG* (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster und Organisation der Gene im überlappenden Bereich der verwendeten Cosmide 49F3 und 51D9. (a) Die für das Screening der Cosmidbank verwendeten Primerpaare sind im Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster eingezeichnet. Das in die Experimente zur Herstellung neuer Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate miteinbezogene Gen *couO*, sowie die beteiligte C-8 Methylgruppe des Aminocoumarinrings sind hervorgehoben. (b) Die beiden terminal ansequenzierten Cosmide 49F3 und 51D9 der *S. rishiriensis* Cosmidbank beinhalten einen überlappenden Bereich von 4037 bp.**

Das 3'-Ende konnte 7,1 kb downstream des Resistenzgens *gyrB*<sup>R</sup> ermittelt werden. Cosmid 49F3 beinhaltet damit auch das zweite Resistenzgen *parY*<sup>R</sup>, sowie eine weitere Sequenz von 4983 bp downstream des Stop-Codons von *parY*<sup>R</sup> (Tabelle 5). Obwohl Cosmid 49F3 damit den Großteil des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters beinhaltet, waren die putativen Regulatorgene *couE* und *couG* in der klonierten Sequenz nicht, oder nicht vollständig vorhanden. Es wurden daraufhin fünf zufällig ausgewählte Cosmide, die zuvor mit den *couE*-Primern zu dem erwarteten PCR-Produkt führten, auf die Anwesenheit von *couH* hin untersucht. Das Cosmid 51D9, welches mit den *couE*- und den *couH*-Primern zu den erwarteten PCR-Produkten führte, wurde isoliert und für weitere Analysen verwendet. Endsequenzierung des klonierten Inserts von 51D9 mit T3- und T7-Primern zeigte, dass das 3'-Ende der klonierten Sequenz innerhalb des Gens *coul*, 698 bp downstream des *coul* Start-Codons liegt. Die zwei Cosmide 49F3 und 51D9 beinhalteten damit eine überlappende DNA-Sequenz von 4037 bp und decken zusammen das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster ab (Abbildung 12).

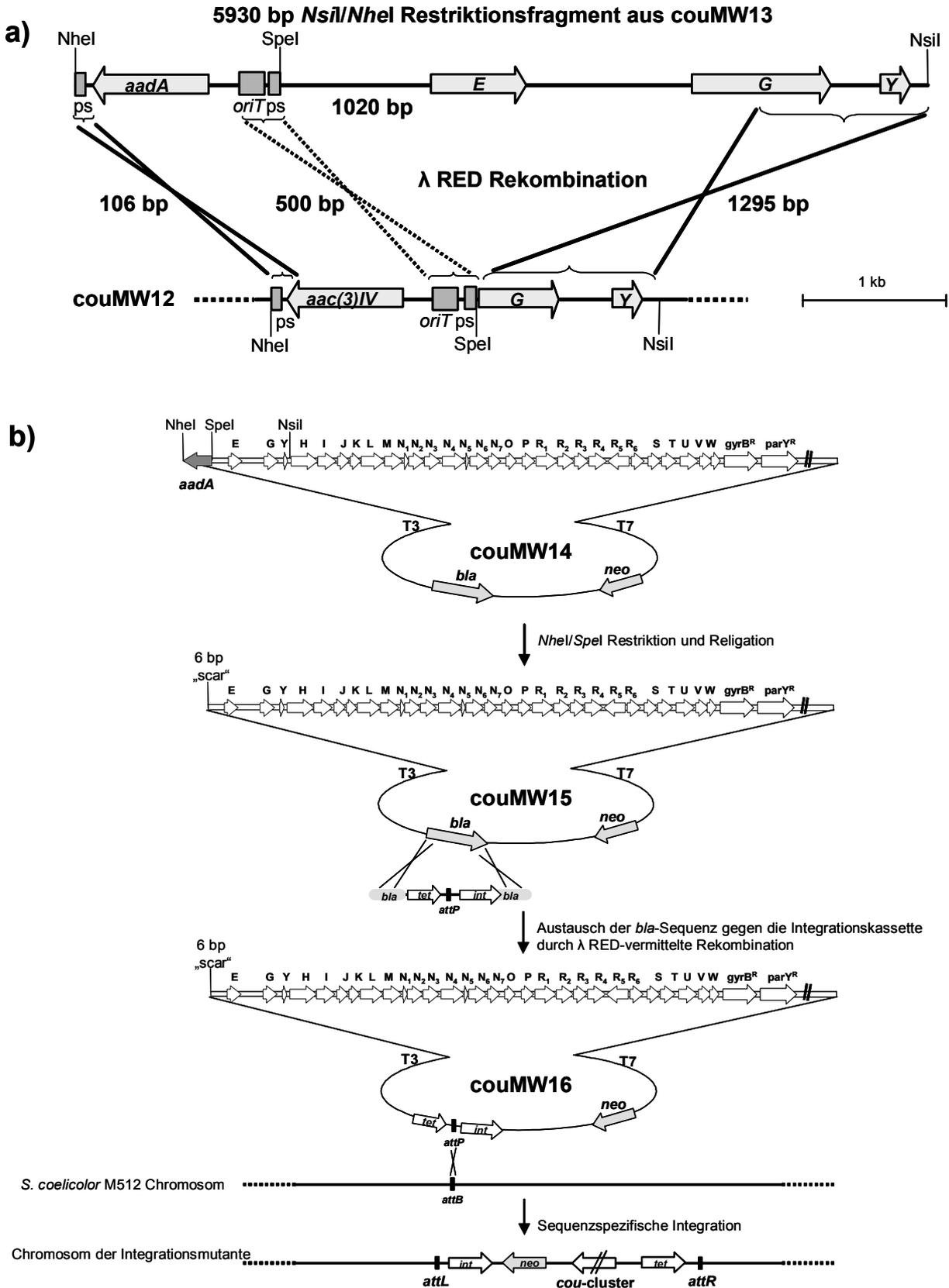
Für die Zusammenführung des vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters auf einem Cosmid wurde das λ RED System verwendet. Dieses System erfordert die Anwesenheit von zwei identischen DNA-Sequenzen innerhalb der zu verbindenden DNA-Fragmente. Durch die überlappenden Bereiche der beiden Cosmide war bereits ein identischer DNA-Abschnitt gegeben. Das Einbringen einer weiteren homologen Sequenz erfolgte durch die Insertion von Resistenzkassetten die ihrerseits untereinander identische Sequenzen von 500 bp und 106 bp enthalten. Hierzu wurde eine Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzkassette über PCR aus dem Plasmid pIJ787 (Gust *et al.*, 2004) amplifiziert. Die verwendeten Primer beinhalteten jeweils eine 40 bp große Sequenz, welche die Insertion der Kassette über λ RED-vermittelte homologe Rekombination 1006 bp upstream des *couE* Start-Codons in Cosmid 51D9 erlaubte. Zusätzlich wurde eine *NheI*-Restriktionsschnittstelle in die forward-Primer eingebaut. Das resultierende spec/strep-resistente Cosmid wurde als couMW13 bezeichnet. Restriktion von couMW13 an der nativen *NsiI*-Restriktionsschnittstelle im intergenetischen Bereich zwischen *couY* und *couH*, sowie an der über die Primer eingebrachten *NheI*-Restriktionsschnittstelle führte zur Freilegung eines 5930 bp Restriktionsfragments, welches neben der *aadA/oriT* Kassette auch die Gene *couE*, *couG* und *couY* beinhaltet (Abbildung 13). Weiterhin wurde eine Apramycin-Resistenzkassette (*aac(3)IV/oriT*) aus Plasmid pIJ773 (Gust *et al.*, 2004) amplifiziert

und über homologe Rekombination in die noch vorhandene Teilsequenz von *couG* auf Cosmid 49F3 inseriert. Das resultierende apramycinresistente Cosmid wurde als couMW12 bezeichnet. Beide Resistenzkassetten waren von den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *SpeI* flankiert, um eine spätere Elimination der Kassetten durch Restriktion (*NheI/SpeI*) und Religation der kompatiblen Überhänge zu ermöglichen. Wie Abbildung 13 zeigt, war die homologe Rekombination zwischen couMW12 und dem 5930 bp *NheI/NsiI* Restriktionsfragment innerhalb von drei Regionen möglich: (1) die 1295 bp Region die aus der ursprünglich überlappenden Sequenz der beiden Cosmide resultierte, (2) eine 500 bp Region mit *oriT* und einer priming site (ps) für die Amplifikation der Resistenzkassette und (3) eine 106 bp große Sequenz, die downstream der Stop-Codons der eingebauten Resistenzmarker lag. Die  $\lambda$  RED-vermittelte Rekombination zwischen Cosmid couMW12 und dem 5930 bp *NheI/NsiI* Restriktionsfragment führt nur dann zu spectinomycin/streptomycin-resistenten Transformanten, wenn die homologe Rekombination zwischen der 106 bp Region und einer der beiden anderen Regionen, d.h. 1295 bp versus 500 bp, stattfindet (Abbildung 13). Da die Effizienz von  $\lambda$  RED von der Größe der identischen Sequenzen die an der Rekombination beteiligt sind abhängig ist (Yu *et al.*, 2000), konnte erwartet werden, dass die meisten spectinomycin/streptomycin-resistenten Klone, welche das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster beinhalten, aus dem Rekombinationsereignis der Regionen 106 bp und 1295 bp resultieren.

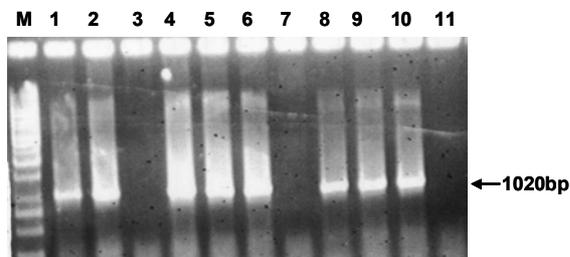
CouMW12 wurde hierfür in den für  $\lambda$  RED erforderlichen *E. coli* Stamm BW25113/pIJ790 (Datsenko & Wanner, 2000; Gust *et al.*, 2004) eingebracht. Elektroporationskompetente BW25113/pIJ790/couMW12 Zellen wurden anschließend mit dem aus dem Gel isolierten 5930 bp *NheI/NsiI*-Restriktionsfragment transformiert. Elf spectinomycin/streptomycin-resistente Transformanten wurden ausgewählt und isolierte Cosmid-DNA mittels PCR Analyse überprüft. Bei der Verwendung der couE-Primern zeigten acht Klone das erwartete PCR Fragment von 1020 bp (Abbildung 14). Das resultierende Cosmid wurde als couMW14 bezeichnet (Abbildung 13). Zur Entfernung der *aadA/oriT* Kassette aus Cosmid couMW14 wurde ein *NheI/SpeI* Restriktionsverdau und eine anschließende Religation der kompatiblen Überhänge durchgeführt. Das resultierende Cosmid wurde als couMW15 bezeichnet. Das *bla* Gen innerhalb des SuperCos1 Vektors von Cosmid couMW15 wurde anschließend durch die *attP/int/tet* Kassette aus Plasmid

## Ergebnisse

pIJ787 ersetzt (Eustáquio *et al.*, 2005a). Das gewünschte integrative Cosmid mit dem vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster wurde als couMW16 bezeichnet (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** (a) Strategie für den Zusammenbau des vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub> Genclusters. Das Restriktionsfragment, welches die *aadA/oriT* Kasette sowie die Gene *couE*, *couG*, und *couY* sowie die 1020 bp upstream Region vor *couE* enthält, stammt aus der *NheI/NsiI* Restriktion von Cosmid couMW13. Cosmid couMW12 entstand nach Insertion der Apramycin-Resistenzkasette (*aac(3)IV/oriT*) in die noch vorhandene Teilsequenz von *couG* in Cosmid 49F3. Die daraus resultierenden homologen Bereiche von 106 bp, 525 bp und 1296 bp für die  $\lambda$  RED-vermittelte homologe Rekombination sind eingezeichnet. Das Rekombinationsereignis für die Herstellung von Cosmid couMW14 ist durch fette Linien gekennzeichnet. ps: priming sites; *oriT*: Replikationsursprung. (b) Konstruktion von Cosmid couMW14, couMW15 und couMW16 und sequenzspezifische Integration von Cosmid couMW16 in das Wirtsgenom von *S. coelicolor* M512.



**Abbildung 14:** PCR-Überprüfung von couMW14 Cosmid DNA von elf spectinomycin/streptomycinresistenten *E. coli*-Transformanten (1-11) nach PCR-targeting von Cosmid couMW12 mit dem 5930 bp Restriktionsfragment aus Cosmid couMW13. Mit den Kontrollprimern *couE\_fwd* und *couE\_rev* wurde das erwartete 1020 bp PCR-Produkt in acht Mutanten nachgewiesen.

### 3.2.2 Sequenzierung von Cosmid couMW16

Restriktions- und PCR Analysen haben die erfolgreiche Insertion des 5930 bp Restriktionsfragments in Cosmid couMW12 gezeigt. Weitere Modifikationen des so hergestellten Cosmids couMW14 führten zu dem integrativen Cosmid couMW16, welches das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster beinhaltet.

Um die gesamte Sequenz von couMW16 verfügbar zu machen, wurde das Cosmid zur Komplettssequenzierung verschickt. Dabei ergab sich eine Cosmidgröße von 54.789 bp mit einem klonierten Insert von 43.868 bp. In der nachstehenden Tabelle sind alle identifizierten Gene des klonierten Inserts von couMW16 aufgelistet.

**Tabelle 5:** Identifizierte Gene im Cosmidinsert von couMW16

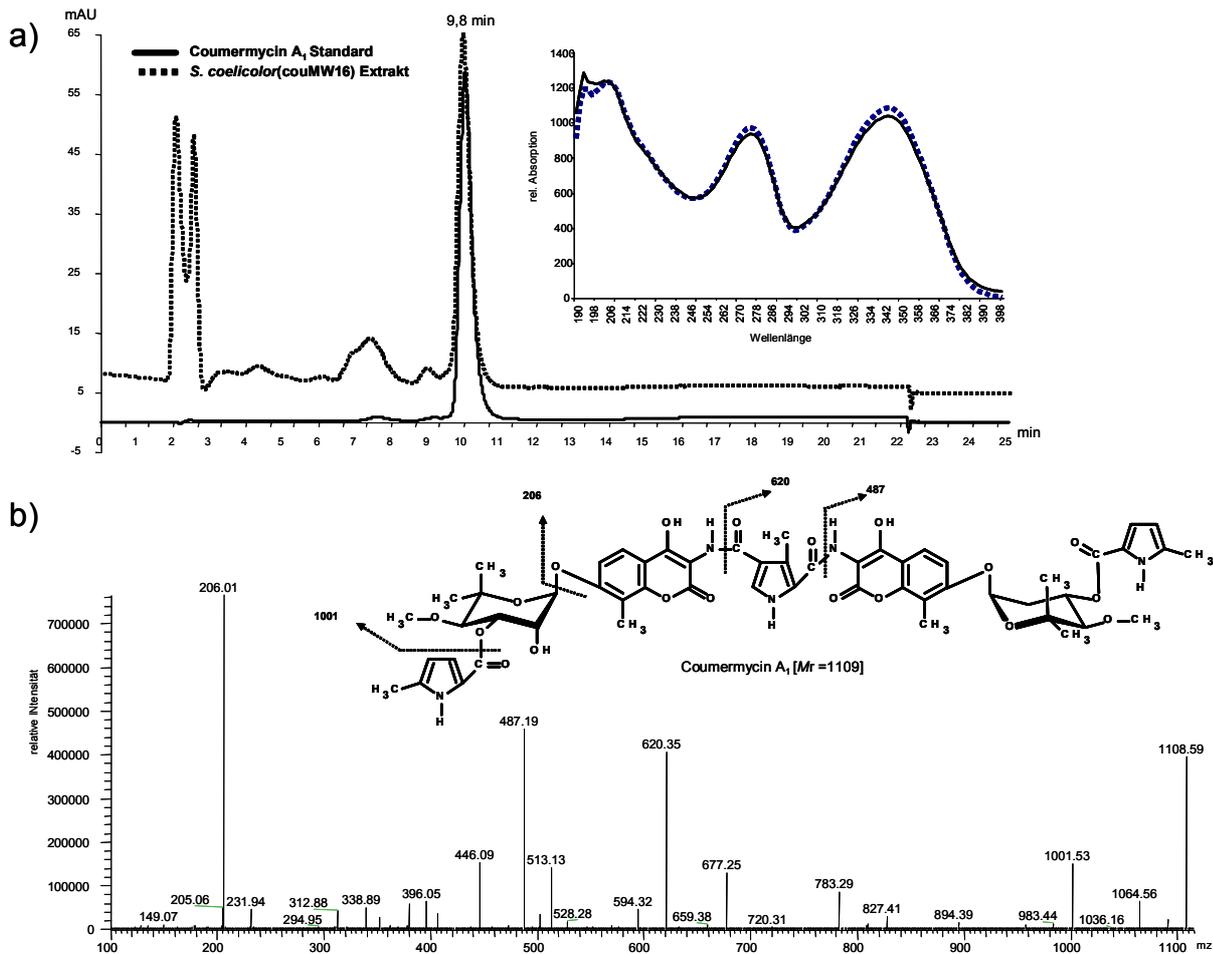
Name	Start (in couMW16)	Stop (in couMW16)	bp	AS	Accession Nr.	Beschreibung
<i>Orf1</i>	218	721	503	167	AAR11884	Hypothetisch AF435444_3
<i>couE</i>	1052	1705	653	217	AAR11885	Putativer Regulator
<i>couG</i>	2859	3818	959	319	AAG29778	Putativer Regulator
<i>couY</i>	4155	4370	215	71	AAG29779	<i>mbtH</i> -homologes Gen
<i>couH</i>	4676	6475	1799	599	AAG29780	Acyl-CoA-Synthase
<i>couI</i>	6479	7702	1223	407	AAG29781	Cytochrom P <sub>450</sub> Enzym
<i>couJ</i>	7862	8638	776	258	AAG29782	CouJ [ <i>S. rishiriensis</i> ]
<i>couK</i>	8635	9372	737	245	AAG29783	Putative Reduktase
<i>couL</i>	9379	10968	1589	529	AAG29784	Putative Ligase
<i>couM</i>	10982	12190	1208	402	AAG29785	Glycosyltransferase
<i>couN1</i>	12271	12558	287	95	AAG29786	Unbekannt [ <i>S. rishiriensis</i> ]
<i>couN2</i>	12569	13636	1067	355	AAG29787	3-Ketoacyl-[ACP]-Synthase
<i>couN3</i>	13626	14756	1130	376	AAN65232	Acyl-CoA-Dehydrogenase
<i>couN4</i>	14875	16380	1505	501	AAG29789	Acyl-CoA-Synthetase
<i>couN5</i>	16384	16653	269	89	AAG29790	CouN5 [ <i>S. rishiriensis</i> ]
<i>couN6</i>	16711	18393	1682	560	AAG29791	C-Methyltransferase
<i>couN7</i>	18442	19287	845	281	AAG29792	Putative Hydrolase
<i>couO</i>	19637	20329	692	230	AAG29793	C-Methyltransferase
<i>couP</i>	20729	21559	830	276	AAG29794	O-Methyltransferase
<i>couR1</i>	21656	23080	1424	474	AAG29795	Unbekannt [ <i>S. rishiriensis</i> ]
<i>couR2a</i>	23080	23598	519	172	(AAG29796)	Decarboxylase alpha subunit
<i>couR2b</i>	23595	24212	618	205	(AAG29796)	Decarboxylase beta subunit
<i>couR3</i>	24245	25153	908	302	AAG29797	CouR3 [ <i>S. rishiriensis</i> ]
<i>couR4</i>	25208	26377	1169	389	AAG29798	Dehydrogenase
<i>couR5[c]</i>	27906	26431	1475	491	AAG29799	Putatives Resistenzprotein
<i>couR6</i>	28041	28916	875	291	AAG29800	Put. transkriptioneller Regulator
<i>couS</i>	29170	30036	866	288	AAG29801	dTDP-4-Keto-6-desoxyhexosereduktase
<i>couT</i>	30070	31080	1010	336	AAG29802	dTDP-Glucose-4,6-dehydratase
<i>couU</i>	31306	32568	1262	420	AAG29803	C-Methyltransferase
<i>couV</i>	32627	33517	890	296	AAG29804	dTDP-Glucosesynthase
<i>couW</i>	33514	34110	596	198	AAG29805	dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose-3,5-epimerase [ <i>S. rishiriensis</i> ]
<i>gyrB<sup>R</sup></i>	34662	36695	2033	677	AAO47225	DNA-Gyrase Untereinheit B
<i>parY<sup>R</sup></i>	36774	38885	2111	703	AAO47226	DNA-Gyrase Untereinheit B

## Ergebnisse

<i>Hyp. Prot. I</i>	39300	39896	404	134	NP_627878	Hypothetisches Protein SCO3686 [ <i>S. coelicolor</i> A3(2)]
<i>Hyp. Prot. II</i>	39983	40981	998	332	YP_871815	Mg <sup>2+</sup> Transportprotein, Protein der CorA-Familie
<i>Hyp. Prot. III</i>	42735	41868	380	126	NP_825628	Hypothetisches Protein SAV4451 [ <i>S. avermitilis</i> MA-4680]

### 3.2.3 Heterologe Expression von Cosmid couMW16 und Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion in *S. coelicolor* M512

Um die Funktionalität des klonierten Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters auf Cosmid couMW16 zu überprüfen, und um zu testen ob *S. coelicolor* M512 ( $\Delta redD$ ,  $\Delta actII-ORF4$ ,  $SCP1^-$ ,  $SCP2^-$ ) als Wirtstamm für die heterologe Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion geeignet ist, wurde couMW16 über PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Nach Integration in das Wirtsgenom, wurden gewachsene Mutanten aufgrund ihrer Kanamycinresistenz identifiziert und als *S. coelicolor*(couMW16) bezeichnet. Sieben unabhängige Mutanten wurden für weitere Untersuchungen isoliert und nach Kultivierung in Produktionsmedium die Sekundärstoffbildung mittels HPLC/LC-MS Analysen untersucht (Abbildung 15). HPLC-Messungen zeigten dabei die Akkumulation einer Substanz bei einer Retentionszeit, die identisch zu der des Coumermycin A<sub>1</sub>-Standards (9,8 min) war (Abbildung 15). Das UV Absorptionsspektrum dieser Verbindung besitzt zwei charakteristische Maxima bei 275 nm und 345 nm und war damit ebenfalls identisch zu dem von Coumermycin A<sub>1</sub> (Abbildung 15). Die Fragmentierung von Coumermycin A<sub>1</sub> während negativer Elektronengasierung ((-)-ESI) erfolgte an der Glykosid-, der Amid- und der Esterbindung und führte dabei zu Ionen mit den Massen  $m/z$  1108, 1001, 620, 487 und 206 (s. Anhang I und II). Die Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion des heterologen Produzenten konnte bei durchschnittlich 7  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt werden und war damit leicht größer als die des natürlichen Produzenten *S. rishiriensis* (2 - 5  $\mu\text{g/ml}$ ) (Li *et al.*, 2002). Jedoch ist zu vermerken, dass durch auftretende Produktionsschwankungen innerhalb verschiedener Kultivierungsexperimente, auch Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktionen von maximal 22  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt werden konnten. Damit wurde die Funktionalität des klonierten Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters auf Cosmid couMW16 experimentell bewiesen und *S. coelicolor* M512 als geeigneter heterologer Antibiotikaproduzent erneut bestätigt.



**Abbildung 15: Analyse der Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion nach heterologer Expression von Cosmid couMW16 in *S. coelicolor* M512. (a) HPLC Analyse von *S. coelicolor*(couMW16) Extrakt. Als Standard wurde Coumermycin A<sub>1</sub> eingesetzt. Die Detektion erfolgte bei 345 nm. Die UV Spektren der resultierenden Peaks bei einer Retentionszeit von 9,8 min sind rechts der HPLC-Chromatogramme abgebildet. (b) Theoretisches Fragmentierungsschema von Coumermycin A<sub>1</sub> und ESI-CID Fragmentierungsmuster des Peaks mit einer Retentionszeit bei 9,8 min.**

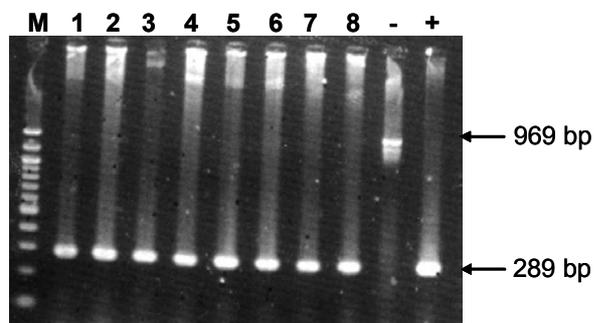
### 3.2.4 Inaktivierung des C-Methyltransferasegens *couO* und Expression des resultierenden Cosmids couMW18 in *S. coelicolor* M512

Nach erfolgreicher heterologer Expression des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters, sollten nun strukturell veränderte Antibiotika durch „genetic engineering“ hergestellt werden. Ziel war dabei der Austausch der Methylgruppen durch Chloratome an Position C-8 der zwei Aminocoumarineinheiten im Coumermycin A<sub>1</sub>-Molekül. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass die C-Methyltransferase CouO für die Methylierung an Position 8 der Aminocoumarinringe verantwortlich ist (Li *et al.*, 2002). Die Inaktivierung von *couO* erfolgte mittels PCR-targeting (Gust *et al.*, 2004). Dabei wurde die *couO*-

## Ergebnisse

---

Sequenz vom Ende des Start-Codons bis zum Anfang des Stop-Codons in Cosmid couMW16 durch eine Apramycin-Resistenzkassette ersetzt. Diese Kassette wurde von zwei *Xba*I-Restriktionsschnittstellen flankiert, um eine spätere Eliminierung des Resistenzmarkers zu ermöglichen. Das apramycinresistente  $\Delta couO$  Cosmid wurde als couMW17 bezeichnet. Um mögliche polare Effekte der integrierten Resistenzkassetten auf nachfolgende Gene zu vermeiden, wurde die Resistenzkassette über *Xba*I-Restriktion und Religation aus Cosmid couMW17 entfernt. Das resultierende apramycinsensitive  $\Delta couO$  Cosmid wurde als couMW18 bezeichnet und beinhaltet eine 6 bp große „scar“-Sequenz anstelle des Gens *couO*. Cosmid couMW18 wurde über PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht und resultierende Mutanten nach sequenzspezifischer Integration in das Wirtsgenom aufgrund ihrer Kanamycinresistenz selektioniert. Anschließend wurden acht Mutanten isoliert und nach Isolation genomischer DNA die *couO* „scar“-Sequenz mittels PCR im Genom des heterologen Stamms *S. coelicolor*(couMW18) nachgewiesen (Abbildung 16). Die verwendeten Testprimer banden dabei 125 bp upstream und 158 bp downstream der verbliebenen „scar“-Sequenz und führten bei allen Transformanten zu dem erwarteten PCR-Produkt von 289 bp. Das Wildtypgen *couO* (969 bp) konnte nicht identifiziert werden konnte.



**Abbildung 16: PCR-Überprüfung von acht *S. coelicolor*(couMW18) Mutanten. Genomische DNA von *S. coelicolor*(couMW18) Mutante 1 – Mutante 8 (Spur 1-8). (-) Negativkontrolle Cosmid couMW16; (+) Positivkontrolle Cosmid couMW18. (M) DNA Größenmarker. Die Größen der PCR Fragmente des *couO* Wildtyps (969 bp) und der *couO* „scar“-Version (289 bp) sind eingezeichnet.**

### 3.2.5 Identifizierung von Coumermycin LW1 aus *S.*

#### *coelicolor*(couMW18)

Acht unabhängige *S. coelicolor*(couMW18) Transformanten und der Kontrollstamm *S. coelicolor*(couMW16) wurden in Produktionsmedium kultiviert und die Sekundärstoffproduktion anschließend mittels HPLC/LC-MS Analysen untersucht (Abbildung 17). Wie erwartet konnte die Produktion von Coumermycin A<sub>1</sub> (Retentionszeit 9,8 min) in der *S. coelicolor*(couMW16) Mutante nachgewiesen werden. Bei der  $\Delta$ *couO* Defektmutante *S. coelicolor*(couMW18) wurde nach HPLC Analysen kein Peak bei dieser Retentionszeit beobachtet. Stattdessen zeigten die Extrakte der Mutante einen dominanten Peak bei einer Retentionszeit bei 8,1 min mit einem zu Coumermycin A<sub>1</sub> identischen UV Spektrum. Diese Substanz wurde über HPLC isoliert und für weitere Analysen verwendet.

Anschließend durchgeführte LC-MS Analysen (Anhang III) führten nach ESI-CID Fragmentierung u. a. zu folgenden Ionen (*m/z*, rel. Int.): 1080 (51), 973 (19) 606 (44), 473 (100), 192 (80). Das Ion mit einer Masse von *m/z* 1080, entspricht dem Verlust von zwei Methylgruppen im Coumermycin A<sub>1</sub>-Molekül relativ zu Coumermycin A<sub>1</sub> (*M<sub>r</sub>* 1109; [*M-H*]<sup>-</sup> bei *m/z* 1108) (Abbildung 17). Das Ion mit der Masse *m/z* 206 ((-)-ESI) repräsentiert den methylierten Aminocoumarinring und wurde als Hauptfragment (rel. Int. 100) bei der Fragmentierung von Coumermycin A<sub>1</sub> beobachtet (Abbildung 15). Im Gegensatz hierzu wurde bei der Analyse des *S. coelicolor*(couMW18) Extrakts ein Ion mit einer Masse von *m/z* 192 (rel. Int. 80) identifiziert (Abbildung 17), was auf einen Verlust der Methylgruppe an Position 8 der Aminocoumarineinheit schließen lässt. Alle weiteren genannten Ionen konnten ebenfalls dem theoretischen Fragmentierungsschema von C-8 unsubstituierten Coumermycin A<sub>1</sub> zugeordnet werden (Abbildung 17). Diese Substanz wurde bereits früher identifiziert und als Coumermycin LW1 beschrieben (Li *et al.*, 2002). Die durchschnittliche Produktionsmenge von Coumermycin LW1 (7,8 µg/ml) war dabei ähnlich zur Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion von *S. coelicolor* mit dem integrierten intakten Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster.

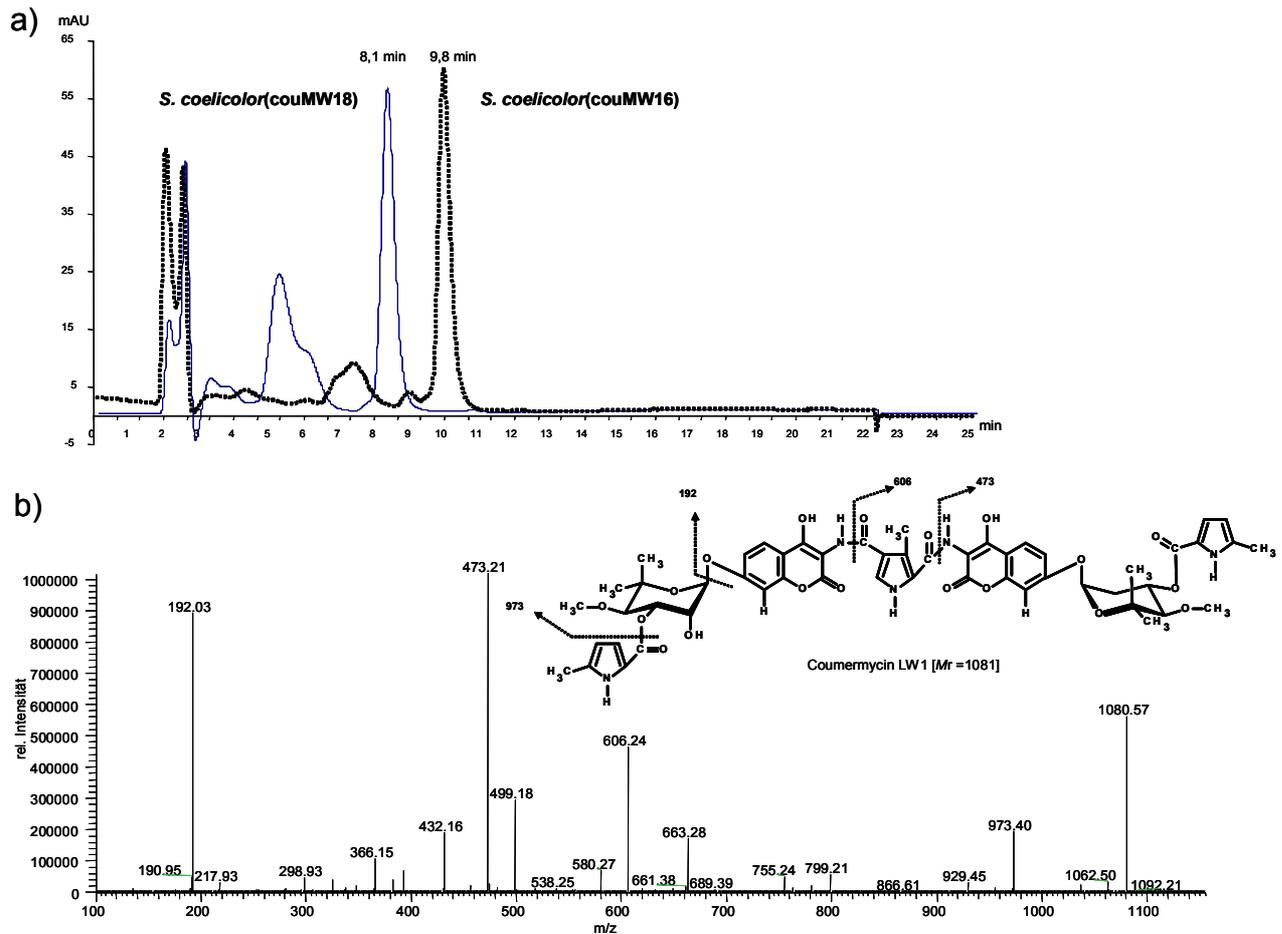


Abbildung 17: Analyse der Coumermycin A<sub>1</sub>- und Coumermycin LW1-Produktion nach heterologer Expression von Cosmid couMW16 und couMW18 in *S. coelicolor* M512. (a) HPLC Analyse der Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion (9,8 min) von *S. coelicolor*(couMW16) und Coumermycin LW1-Produktion (8,1 min) von *S. coelicolor*(couMW18). (b) Theoretisches Fragmentierungsschema von Coumermycin LW1 und ESI-CID Fragmentierungsmuster des Peaks mit einer Retentionszeit bei 8,1 min.

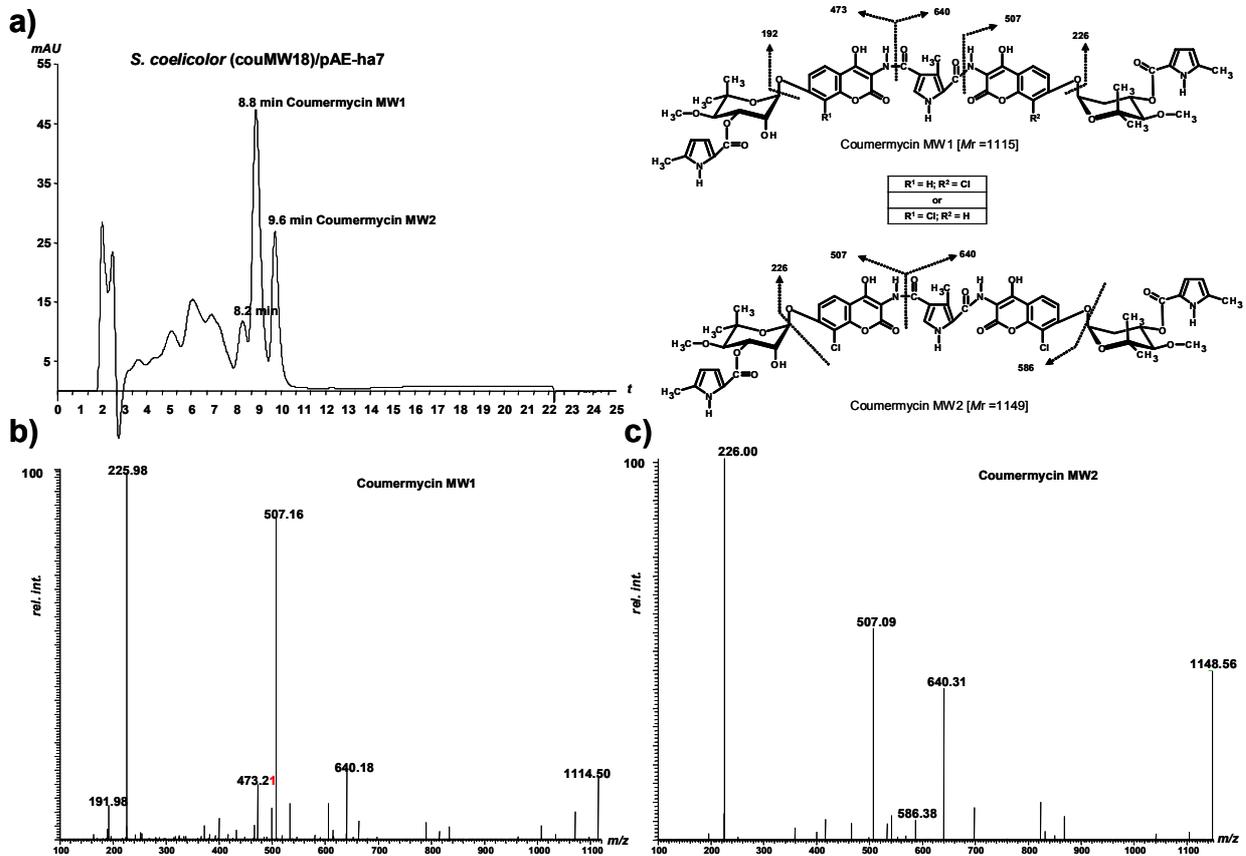
### 3.2.6 Heterologe Expression des Halogenasegens *clo-hal* in *S. coelicolor*(couMW18)

Um neue chlorierte Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate herzustellen, wurde das Gen *clo-hal* aus dem Clorobiocingenclaster in die *S. coelicolor*(couMW18) Mutante eingebracht. Es konnte bereits in früheren Experimenten gezeigt werden, dass die Halogenase Clo-hal für die Chlorierung an Position C-8 der Aminocoumarineinheit im Clorobiocinmolekül verantwortlich ist (Eustáquio *et al.*, 2003a). Das Gen *clo-hal* wurde hierzu in den replikativen thiostreptonresistenten Vektor pUWL201 unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors *ermEp\** kloniert. Das so hergestellte Konstrukt

pAE\_ha7 (Eustáquio *et al.*, 2004) wurde über PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor*(couMW18) eingebracht und führte zur *S. coelicolor*(couMW18)/pAE\_ha7 Mutante. Acht individuelle thioestreptonresistente Transformanten wurden isoliert und die Anwesenheit von pAE\_ha7 nach Retransformation chromosomaler DNA in *E. coli* Zellen und der anschließenden Isolation von pAE\_ha7 Plasmid-DNA über Restriktionsanalysen bestätigt. Wie im HPLC-Chromatogramm abgebildet (Abbildung 18), produzierten die *clo-hal* Transformanten zwei neue Substanzen mit Retentionszeiten von 8,8 min und 9,6 min. Ein weiterer dritter Peak mit einer Retentionszeit bei 8,2 min konnte nach LC-MS Analysen dem nicht-methylierten Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivat Coumermycin LW1 zugeordnet werden (Anhang IV). Das negative ESI-CID Fragmentierungsmuster (Anhang V) der Substanz mit einer Retentionszeit von 8,8 min (Abbildung 18) zeigte ein Ion mit der Masse  $m/z$  1114 ((-)-ESI), was auf ein Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivat schließen lässt, bei dem zwar zwei Methylgruppen fehlen, jedoch nur ein Chloratom vorhanden ist. Dementsprechend konnten zwei weitere Ionen mit den Massen  $m/z$  192 und  $m/z$  226 identifiziert werden, die mit den erwarteten Massen eines nicht-substituierten und eines chlorierten Aminocoumarinrings korrelieren (Abbildung 18). Das weitere Auftreten der Ionen mit den Massen  $m/z$  507 und  $m/z$  473, die einen chlorierten und einen nicht-substituierten Aminocoumarinring repräsentieren, der mit dem substituierten Desoxyzucker verbunden ist, bestätigten die Annahme, dass nur eine der C-8 Methylgruppen durch ein Chloratom ersetzt wurde. Diese Substanz wurde als Coumermycin MW1 bezeichnet und in Mengen (10,8 µg/ml) ähnlich denen von Coumermycin A<sub>1</sub> produziert.

Für die zweite neue Substanz mit einer Retentionszeit bei 9,6 min konnte nach LC-MS Analysen (Anhang VI) ein Ion mit der Masse  $m/z$  1148 ( $[M-H]^-$ ) nachgewiesen werden. Dies entspricht der erwarteten Masse von Coumermycin A<sub>1</sub> nach dem Austausch von zwei Methylgruppen gegen Chloratome (Abbildung 18). Negative ESI-CID Fragmentierung zeigte weiterhin ein Ion mit der Masse  $m/z$  226 (rel. Int. 100; (-)-ESI), was mit der erwarteten Masse nach einem Austausch der Methylgruppen gegen Chloratome in der Aminocoumarineinheit korreliert. Demgegenüber konnte das Ion des C-8 unsubstituierten Aminocoumarinrings,  $m/z$  192, nicht nachgewiesen werden. Der Austausch der zwei C-8 Methylgruppen gegen zwei Chloratome wurde durch das Auftreten des Ions mit der Masse  $m/z$  586 bestätigt. Die Masse entspricht hierbei zwei chlorierten Aminocoumarineinheiten, die mit der zentralen 3-

Methylpyrrol-2,4-dicarboxylsäureeinheit verbunden sind. Diese Verbindung wurde als Coumermycin MW2 bezeichnet und durchschnittlich in Mengen von 5,6 µg/ml produziert (Abbildung 18).

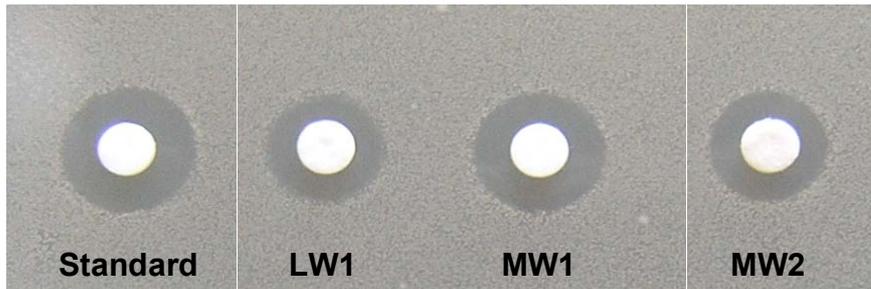


**Abbildung 18: HPLC/LC-MS Analyse von Kulturextrakten des heterologen Coumermycin MW1 und MW2-Produzenten *S. coelicolor*(couMW18)/pAE\_ha7. (a) HPLC-Diagramm von *S. coelicolor*(couMW18)/pAE\_ha7. Die Retentionszeiten der neuen Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate Coumermycin MW1 und Coumermycin MW2 sind den korrespondierenden Peaks zugeordnet. Die Detektion erfolgte bei 345 nm. (b) MS-Fragmentierungsmuster von Coumermycin MW1 (HPLC Retentionszeit 8,8 min) und (c) Coumermycin MW2 (Retentionszeit 9,6 min). Das erwartete Fragmentierungsschema von Coumermycin MW1 (R1 = H; R2 = Cl) und Coumermycin MW2 durch negative Elektronengasionisierung ((-)ESI) ist separat abgebildet.**

### 3.2.7 Antibakterielle Aktivität der neuen Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate

Alle drei Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate wurden mittels HPLC isoliert und auf ihre antibakteriellen Eigenschaften gegen *Bacillus subtilis* in einem Agar-Diffusionstest untersucht. Wie frühere Experimente erwarten ließen (Eustáquio *et al.*, 2003b; Flatman *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2002) zeigte Coumermycin LW1 eine geringere antibakterielle Aktivität als die Referenzsubstanz Coumermycin A<sub>1</sub> (Abbildung 19).

Der Austausch einer Methylgruppe an Position C-8 des Aminocoumarinrings gegen ein Chloratom in Coumermycin MW1 führte dagegen zur Wiederherstellung der antibakteriellen Aktivität wie sie für Coumermycin A<sub>1</sub> beobachtet wurde. Überraschenderweise resultierte der Austausch beider Methylgruppen gegen Chloratome bei Coumermycin MW2 in einer verschlechterten antibakteriellen Wirkung.



**Abbildung 19: Antibakterielle Aktivität von Coumermycin A<sub>1</sub> (Standard), Coumermycin LW1 (LW1), Coumermycin MW1 (MW1) und Coumermycin MW2 (MW2) gegen *Bacillus subtilis*. Für den Agar-Diffusionstest wurden von jedem Antibiotikum identische Mengen von 0.75 nmol eingesetzt.**

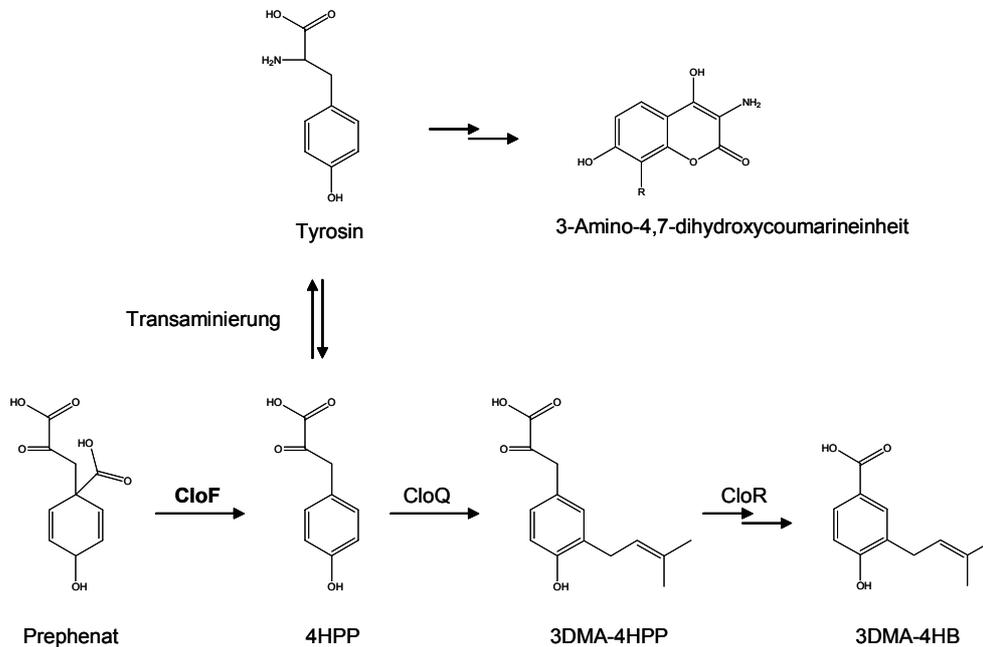
### 3.2.8 Expression der putativen Prephenat-Dehydrogenase *cloF* im heterologen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten

Die Sequenzierung von Cosmid couMW16 zeigte das Vorhandensein eines intergenetischen Bereichs von 1153 bp zwischen den Genen *couE* und *couG*. Im Clorobiocin- und Novobiocin-Cluster befindet sich an dieser Stelle das 1092 bp bzw. 1088 bp große Gen *cloF* bzw. *novF*. CloF und NovF zeigen große Sequenzähnlichkeiten zu Prephenat-Dehydrogenasen, welche die Umsetzung von Prephenat zu 4-Hydroxyphenylpyruvat (4HPP) katalysieren (Abbildung 20). 4HPP ist das Substrat für die Prenyltransferase CloQ in der Clorobiocinbiosynthese (Pojer *et al.*, 2003b). Das Produkt dieser Reaktion, 3-Dimethylallyl-4-hydroxyphenylpyruvat (3DMA-4HPP), wird anschließend durch die *nicht-Häm*-abhängige Eisenoxxygenase CloR zu 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (3DMA-4HB) umgesetzt (Pojer *et al.*, 2003b).

Sequenzanalysen des intergenetischen Bereichs zwischen *couE* und *couG* im Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster zeigten zwei ORFs, die Homologien zu Teilsequenzen der Gene *cloF* bzw. *novF* aufweisen. Diese können aber aufgrund ihrer geringen

## Ergebnisse

Größe von 378 bp und 339 bp und ihrer unterschiedlichen Determination in verschiedenen Leserahmen nicht zur Bildung eines funktionsfähigen Prephenat-Dehydrogenase Proteins führen.



**Abbildung 20: Ausschnitt aus dem postulierten Biosyntheseweg der Aminocoumarineinheit und der prenylierte 4-Hydroxybenzoesäureeinheit von Clorobiocin.**

Um zu prüfen, welche Auswirkung eine intakte Kopie eines Prephenat-Dehydrogenasegens auf die Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthese hat, wurde das Gen *cloF* unter den konstitutiven Promotor *ermEp*\* des replikativen, thioestreptonresistenten Plasmids pUWL201 kloniert. Das entstandene Konstrukt wurde als pMWcloF bezeichnet und über PEG-vermittelte Protoplastentransformation in den heterologen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten *S. coelicolor*(couMW16) eingebracht. Sechs individuelle *S. coelicolor*(couMW16)/pMWcloF Mutanten wurden aufgrund ihrer Thioestreptonresistenz isoliert und die Anwesenheit von pMWcloF nach Isolation von Plasmid-DNA aus den Mutanten bestätigt. Nach Kultivierung in Produktionsmedium wurde die Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion mittels HPLC Analysen ermittelt. Im Vergleich zum Kontrollstamm *S. coelicolor*(couMW16) (2,9 - 5,3 µg/ml) konnte für die Mutanten mit pMWcloF (2,6 - 3,3 µg/ml) keine gesteigerte Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion nachgewiesen werden. Es scheint, dass die zusätzliche Expression des Prephenat-Dehydrogenasegens *cloF* keinen Einfluß auf die Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion ausübt.

### 3.2.9 Expression des Regulorgens *novG* im heterologen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten

Für das Gen *novG* konnte gezeigt werden, dass es ein positiver Regulator der Novobiocinbiosynthese darstellt (Eustáquio *et al.*, 2005b). Die Inaktivierung von *novG* im heterologen Novobiocinproduzenten *S. coelicolor*(novBG01) führte zu einem deutlichen Rückgang der Novobiocinproduktion, während die Überexpression von *novG* zu einer um 300 % gesteigerten Novobiocinproduktion führte (Eustáquio *et al.*, 2005). Im Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster findet sich das *novG* orthologe Gen *couG* und im Clorobiocincluster das orthologe Gen *cloG*. Sequenzanalysen auf Aminosäureebene zeigten eine Übereinstimmung von CouG zu NovG von 77 % und zu CloG von 86 %. Es wurde daher angenommen, dass sowohl CouG als auch CloG regulatorischen Einfluss auf die Biosynthese der entsprechenden Antibiotika ausüben. Bereits vorangegangene Versuche haben gezeigt, dass einzelne Gene der unterschiedlichen Aminocoumarin-Gencluster (*cloY/couY*) untereinander austauschbar sind und sich in ihrer Funktion ersetzen können. Aufgrund der Sequenzhomologie von *couG* zu *novG* sollte daher untersucht werden, ob die Expression des Regulorgens *novG* im heterologen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten zu einer erhöhten Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthese führt.

Hierzu wurde das Plasmid pVD1 benutzt, das das Gen *novG* unter Kontrolle des konstitutiven Promotors *ermEp\** in dem replikativen Plasmids pUWL201 enthält (V. Dangel, persönliche Mitteilung). Nach Transformation von *S. coelicolor*(couMW16) mit pVD1 wurden sechs *S. coelicolor*(couMW16)/pVD1 Transformanten isoliert und zur Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion angezogen. Die Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion wurde anschließend mittels HPLC Analysen ermittelt. Es zeigte sich, dass die Coexpression des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters mit dem Regulorgen *novG* nicht zur Steigerung der Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthese führte.

## 4 Diskussion

### 4.1 *mbtH*-Projekt

Das Gen *cloY* des Clorobiocingenclusters gehört zur Familie der *mbtH*-ähnlichen Gene, für die mehr als 106 Datenbankeinträge hinterlegt sind (Stegmann *et al.*, 2006). Diese *mbtH*-ähnlichen Gene finden sich sowohl in den Biosynthesegenclustern von Peptid- und Aminocoumarin-Antibiotika, als auch in Siderophorgenclustern verschiedenster Bakterienarten. Abbildung 21 zeigt ein Alignment von 24 *MbtH*-ähnlichen Proteinen, die alle den Genclustern von gut untersuchten Substanzen entstammen. Dabei sind Peptid- und Glycopeptid-Antibiotika, Phosphinotricin, Enterochelin, Mycobactin und Aminocoumarine enthalten. Während die *mbtH*-ähnlichen Gene gewöhnlich als eigenständige *open reading frames* auftreten, gibt es drei nennenswerte Ausnahmen: der N-Terminus des NikP1-Proteins der Nikkomycinbiosynthese zeigt hohe Sequenzhomologie zu *MbtH*-ähnlichen Proteinen. Für NikP1 wurde gezeigt, dass es die Aktivierung von Histidin durch Bildung eines  $\beta$ -OH-His-S-NikP1 Intermediats katalysiert (Chen *et al.*, 2002). Die anschließende  $\beta$ -Hydroxylierung der Aminosäure erfolgt dann durch das Cytochrom  $P_{450}$  Enzym NikQ (Chen *et al.*, 2002). Die Reaktionsabfolge, die damit von den Enzymen NiP1 und NikQ katalysiert wird, d.h. Aktivierung und anschließende  $\beta$ -Hydroxylierung von Histidin, weist starke Ähnlichkeit zu den von CloH und CloI katalysierten Reaktionen in der Clorobiocinbiosynthese auf. Hierbei wird Tyrosin durch die Bildung eines Thioesters mit CloH aktiviert und anschließend durch das Cytochrom  $P_{450}$  Enzym CloI  $\beta$ -hydroxyliert (Chen & Walsh, 2001). Der zweite Fall, in dem der N-terminale Rest eines größeren Proteins hohe Sequenzähnlichkeit zu *MbtH* zeigt, ist das Gen *ltxB* aus dem Lyngbyatoxingencluster (Edwards & Gerwick, 2004). Die vorhergesagte Aminosäuresequenz von LtxB zeigt bei Datenbankvergleichen große Ähnlichkeit zu Cytochrom  $P_{450}$  Enzymen. Für LtxB wird angenommen, dass es die Epoxidbildung von Tryptophan während der nichtribosomalen Biosynthese des Dipeptids Lyngbyatoxins katalysiert. Im dritten Fall konnte eine 65 As große *MbtH*-ähnliche Sequenz in einem deutlich größeren Protein (187 As) der Bleomycinbiosynthese identifiziert werden (Du *et al.*, 2000). Experimentelle Daten oder Spekulationen zur Funktion dieses Gens oder Proteins liegen bislang nicht vor.

Das in Abbildung 21 gezeigte Alignment der postulierten Aminosäuresequenzen von 24 *mbtH*-ähnlichen Genen lässt für viele Proteine eine Konservierung der Sequenz X<sub>2</sub>.

$_4\text{NPF(D/E)(D/N)X}_2\text{GX(F/Y)LVLVNXEXQHSLWPXFAXVPXGW(T/R)X}_7\text{RX(D/E)CLX(Y/F)V(E/N)X}_2\text{WTDXRPSLX}_{2-12}$  erkennen. Die deutliche Konservierung von drei Tryptophanresten (W) in allen *MbtH*-ähnlichen Proteinen ist fett gedruckt.

Name	Aminosäuren
	*                    20                    ↓                    *                    ↓                    40                    *                    ↓                    60                    *                    80
cloY	: -M A I N P F E D E N C S Y L V L I N G E G O H S L W P S F A D V E N G W T V I F N E A S R Q D C I D Y V N E H W T D M R P L S I Q R A M G G E ----- : 71
couY	: -M A I N P F D D E N C V Y L L L V N D E G C H S L W P S F A A L P K G M T V I L D E A S R Q E C I D Y V N E H W T D M R P L S I Q P A M G D E ----- : 71
simY	: --M A N P F D D Q R C S F L V L R N A B E C V S L W P A F A G V E T G M Q V A K G P N S R A A C L A Y I E E A W T D L R P K S I I D A T D P S ----- : 70
cchK	: -M S T N P F D D A D G R F L V L V N D E G C H S L W P A F A A V P G G M T V F E E N T R D A C L A Y V E A N W T D L R P R S I A R T A D A ----- : 70
ORFX	: --M T N P F E D A D C R Y L V L V N D E G C H S L W P S F V D V P A C M T V A L G E S D R E A C L E Y V E K N W T D M R P R S I V E A M S T G N ----- : 71
ORF1/van	: --M T N P F D N E D C S F F V L V N D E G C H S L W P S F A E V S P G M T R V L G E T T R Q E C L A Y V E E N W T D L R P K S I I Q E A G A ----- : 69
ORF1/bal	: --M S N P F D N E D C S F F V L V N D E G C H S L W P T F A E V P A G M T R V H G E A G Q E C L A Y V E E N W T D L R P K S I I R E A S A ----- : 69
ORF7/comE	: --M T N P F D N E N C T F L V L V N D E G C H S L W P V F A E I P Q G M T A F G E A S R A E C L E F V E Q N W T D M R P K S I V A R M E G T A T A ----- : 73
tcp13	: --M T N P F D N E D C S F L V L V N D E G C H S L W P A F A E V P D G M T G V H G P A S R Q D C I G Y V E Q N W T D L R P K S I I S Q I S D ----- : 69
tcp17	: --M T N P F D N E D C S F L V L V N D E G C H S L W P A F A E V P D G M T G V H G P A S R Q D C I G Y V E Q N W T D L R P R S I V E Q A D A ----- : 69
dbv15	: --M T N P F E N E D C S F L V L V N D E G C H S L W P S F A E V P E G M T R V H G V A T R Q E C L A Y V E E N W T D I R P K S I I A E A G A ----- : 69
dptG	: -M A -N P F E N N D C S Y L V L V N D E G C Y S L W P A F A D V P A G M T V T F G E S S R Q E C I D H I N E M W T D M R P K S I I R O M E N D R T T A A --- : 75
mppT	: -M G T N P F D D P D C R Y L V L V N E E D C H S L W P A F A E V P Q G M T V A L A E T D R Q S A L D F I T E H W T D M R P R S I V R A M E E A ----- : 71
lptG	: M T M N P F D D T E C V F H V L V N D E N C H S L W P H E V E I P D G M R A V V R E R P R Q E C I D Y I E A N W T D M R P Q S I I D A M E A H E K S E G A I R : 80
mbtH/myc	: -M S T N P F D D N C A F F V L V N D E D C H S L W P V F A D I P A G M R V V H G E A S R A A C I D Y V E K N W T D L R P K S I I R D A M V E D ----- : 71
nikP1*	: --M V N P I H D D N C A C L V L V N S E N R H A L W A D G P D V P E G M R V A H R A A G S R E C L E Y I G A H P E D I R P A R I P D T G K ----- : 677
ltxB*	: --M T N P F A D P S R D Y N V L C N A E G C Y S L W P E T S L E I P E G M Q T A F G P E S W Q N C I D N V E K N W T D M R P L S ----- : 460
bleo*	: -M T T P R T A A E P T Y H V V N D E E C Y S I L A E Q E I P A G M R A T G T S G T Q E E C I R H I D E V W T D M R P R S I R ----- : 187
nocI	: -M L G E --N E D S C E F F V V V N H E E C Y S L W P A D R A V E D G M R T A G R G A K R A C L E W I D A N W T D M R P L S I R E A L R G A G D R A --- : 73
vbsG	: -M D N L --E P H D D L M I A V I D T E R R Y S V W P Q D K R I P L G M E P A G F A G S R Q C C L A H I R D V W A D P R P L S I R S A I A G D A R L ----- : 72
phpA	: -M L D ---G A T T R E L V V V N H E G C Y S V W P E D R E P A G M R P H G T R G T R A E C L E V I R T H W D D M R P L S I R S T F E E G G A ----- : 69
vioN	: -M N D ---T P A D T A Y Q V L N D E E C Y S V W P V G R P L P A G M R A E G T V G G R Q A C I D H I E T V W T D L R P L S A R A ----- : 63
ybdZ/ent	: M A F S N P F D D P Q C A F Y I L R N A Q G C F S L W P Q C C V L P A C M D I V C P Q S Q A S C Q Q W L E A H R T L T P T N F T Q I Q E A Q ----- : 72
tioT	: -M S V N P F D E D C E F Y V L V N D E E C H S L W P T E G D V E D G M R I V F G P A G R A E S V A Y V E E N W T D M R P K S I I R E A M S A A ----- : 71
	n p                    g                    v l                    n e                    q                    s l w p                    P                    G W                    r                    c l                    W t d                    r P                    s l

**Abbildung 21: Alignment der vorhergesagten Aminosäuresequenz der *mbtH*-ähnlichen Gene die in den Biosynthesegenclustern verschiedener Anibiotika und Siderophore identifiziert wurden. cloY, Clorobiocin (Pojer *et al.*, 2002); couY, Coumermycin A<sub>1</sub> (Wang *et al.*, 2000); simY, Simocyclinone (Galm *et al.*, 2002); cchK, Coelichelin (Challis & Ravel, 2000); ORFX, calcium dependent antibiotic (Bentley *et al.*, 2002); ORF1/van, Vancomycin (Zerbe *et al.*, 2002); ORF1/bal, Balhimycin (Stegmann *et al.*, 2006); ORF7/comE, Complestatin (Chiu *et al.*, 2001); tcp13, Teicoplanin (Sosio *et al.*, 2000); tcp17, Teicoplanin (Sosio *et al.*, 2000); dbv15, Glycolipid Antibiotikum A40926 (Sosio *et al.*, 2003); dptG, Daptomycin (Miao *et al.*, 2005); mppT, Mannopeptimycin (Magarvey *et al.*, 2006); lptG, Lipopeptid Antibiotikum A54145 (Miao *et al.*, 2006); mbtH/myc, Mycobactin (Cole *et al.*, 1998); nikP1\*, Nikkomycin (Wang *et al.*, 2003); ltxB\*, Lyngbyatoxin (Edwards & Gerwick, 2004); bleo\*, Bleomycin (Shen *et al.*, 2002); nocI, Nocardicin (Gunsior *et al.*, 2004); vbsG, Vicibactin (Carter *et al.*, 2002); phpA, Phosphinotricinriptide (Blodgett *et al.*, 2005); vioN, Viomycin (Thomas *et al.*, 2003); ybdZ/ent, Enterobactin (Bentley *et al.*, 2002); tioT, Thiocoraline (Lombo *et al.*, 2006).**

\*) Für die Proteine NikP1 (677 as), LtxB (460 as) und Bleo (187 as), sind nur die *mbtH*-ähnlichen Regionen gezeigt.

Diese Tatsache lässt einen evolutionären Druck vermuten, der eine solche Sequenzkonservierung favorisiert, und MbtH-Proteine mit bestimmter Funktion determiniert. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit ließen weder Datenbankvergleiche noch experimentelle Untersuchungen auf eine Funktion der *mbtH*-ähnlichen Gene schließen. Ebenso wie für die Aminocoumarinbiosynthese sind die unterschiedlichen Schritte der Enterochelinbiosynthese (Crosa & Walsh, 2002), der Phosphinotricinbiosynthese (Schwartz *et al.*, 2004) und der Glycopeptid-Antibiotikabiosynthese (Sosio *et al.*, 2003) in *in vitro* Untersuchungen detailliert beschrieben worden. Dabei konnte den MbtH-Proteinen der jeweiligen Gencluster keine essentielle katalytische Funktion zugeordnet werden. Es wurde daher spekuliert, dass MbtH-ähnliche Proteine in Regulations- oder Transportprozesse (Yeats *et al.*, 2003), oder an anderen Protein-Protein Interaktionen beteiligt sein könnten (Stegmann *et al.*, 2006). Experimentelle Daten fehlen jedoch bislang. Die Biosynthese aller in Abbildung 21 genannten Substanzen beinhaltet die Aktivierung von Aminosäuren oder aromatischen Säuren durch Bildung einer Thioesterbindung über den 4'-Phosphopantethein-Cofaktor eines spezifischen Enzyms. Häufig folgen chemische Modifikationen der aktivierten Aminosäure und der anschließende Transfer auf Amino- oder Hydroxygruppen zur Bildung von Peptid- oder Esterbindungen. In der Biosynthese von Clorobiocin treten zwei solche Reaktionssequenzen auf. Die Aktivierung und  $\beta$ -Hydroxylierung von Tyrosin durch die Enzyme CloH und CloI sind die ersten Schritte in der Synthese Aminocoumarineinheit von Clorobiocin (Chen *et al.*, 2002; Pacholec *et al.*, 2005a). In die Biosynthese der terminalen Pyrrolleinheit sind die Proteine CloN3, CloN4 und CloN5 involviert, welche die Aktivierung von Prolin und dessen anschließende Oxidation zu Pyrrol-2-carboxyl-S-cloN5 katalysieren (Garneau *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Zufütterung einer intakten Aminocoumarineinheit zu einem heterologen Clorobiocinproduzenten bei dem alle *mbtH*-ähnlichen Gene deletiert wurden, zur Wiederherstellung der Antibiotikabiosynthese führte. Die dabei erzielten Produktionsmengen waren ähnlich zu denen, die durch die Komplementierung der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante mit *cloY* oder den anderen *mbtH*-Orthologen *cchK*, *CDA-ORFX* und *couY* erhalten wurden. Dies legt nahe, dass in der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante alle Biosyntheseschritte mit Ausnahme der Aminocoumarinringbiosynthese funktionsfähig sind. Frühere Inaktivierungsexperimente mit Genen die an der Bildung der Pyrrol-2-carboxyleinheit

beteiligt sind, haben zu Mutanten geführt, die das Clorobiocin-Derivat Novclobiocin 104 akkumulierten. Dieses Struktur analogon ist durch das Fehlen der Pyrrol-2-carboxyleinheit gekennzeichnet (Freitag *et al.*, 2005b; Xu *et al.*, 2003). Die Akkumulation von Novclobiocin 104 konnte bei den hier durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden. Es wird daher angenommen, dass *cloY* für die effiziente Bildung der Aminocoumarineinheit von Clorobiocin und nicht für die Synthese oder den Transfer der Pyrrol-2-carboxyleinheit benötigt wird. Ob CloY dabei an Protein-Protein Interaktionen, an katalytischen oder an regulatorischen Prozessen für Translation oder Transkription beteiligt ist, kann derzeit nicht gesagt werden. Die Inaktivierung von *cloY* und zwei weiteren *mbtH*-ähnlichen Genen im heterologen Clorobiocinproduzenten führte zu einem dramatischen Rückgang der Clorobiocinbiosynthese. Im Gegensatz hierzu wurde von Stegmann und Kollegen (2006) berichtet, dass die Inaktivierung des *mbtH*-ähnlichen *ORF1* im Balhimycincluster keine Auswirkung auf die Balhimycinproduktion hatte. Jedoch vermerkten die Autoren, dass im Genom des natürlichen Produzenten mindestens zwei weitere *mbtH*-ähnliche Gene vorhanden sind, und es nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Gene die Funktion von *ORF1* übernehmen. Die hier gezeigten Ergebnisse zur Clorobiocinbiosynthese beweisen, dass verschiedene *mbtH*-ähnliche Gene sich gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können. Bei weiterführenden Untersuchungen zur *in vivo* Funktion von *mbtH*-ähnlichen Genen muss daher die Beteiligung weiterer Genkopien im Produzentengenom beachtet werden. Um eine detaillierte Aussage über die Notwendigkeit der *mbtH*-ähnlichen Gene für die Balhimycinbiosynthese treffen zu können, müssen zuvor alle *mbtH*-ähnlichen Gene des natürlichen Balhimycinproduzenten inaktiviert werden. Weiterführende Untersuchungen zur *in vivo* Funktion von *mbtH*-ähnlichen Genen sollten daher nur in komplettsequenzierten Stämmen durchgeführt werden.

## 4.2 Coumermycin-Projekt

Coumermycin A<sub>1</sub> ist durch seine hohe Affinität zur bakteriellen Gyrase und seiner ausgeprägten antibakteriellen Eigenschaften von pharmazeutischem Interesse (Maxwell & Lawson, 2003). Die schwierige genetische Manipulation des natürlichen Produzenten *S. rishiriensis* DSM40489 sowie dessen geringe Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion machten ein heterologes Expressionssystem für das Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthesegencluster äußerst wünschenswert. Die Gencluster von Clorobiocin und Novobiocin wurden bereits erfolgreich in *S. coelicolor* M512 heterolog exprimiert und resultierten in der Produktion der entsprechenden Antibiotika in Größenordnungen, die denen der natürlichen Produzenten entsprachen (Eustáquio *et al.*, 2005a). Für das Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster (38.6 kb) war eine heterologe Expression bisher nicht möglich, da kein Cosmid zur Verfügung stand, welches das vollständige Gencluster beinhaltet. Die beträchtliche Größe vieler Biosynthesegenclustern ist ein weithin verbreitetes Problem bei der Gewinnung von Cosmiden oder BAC-Klonen, die ein vollständiges Gencluster enthalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde das  $\lambda$  RED Rekombinationssystem verwendet, um das komplette Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthesegencluster aus zwei überlappenden Cosmidinserts zusammenzuführen. Alle hierfür notwendigen Schritte wurden zuerst in *E. coli* durchgeführt, bevor das gesamte, auf einem Cosmid vorliegende Gencluster, in das Genom des gut untersuchten Streptomyeten *S. coelicolor* M512 integriert wurde. Für die Klonierung des Genclusters wurde in jedes der beiden Ursprungscosmide eine Resistenzkassette über  $\lambda$  RED-vermittelte homologe Rekombination eingebracht. Beide Resistenzkassetten wurden dabei von den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *SpeI* flankiert, die in den Original-Cosmiden nicht vorhanden waren. Die Restriktion von Cosmid couMW13 mit *NheI* und einem weiteren Enzym im überlappenden Bereich des Cosmidinserts (*NsiI*), resultierte in einem ca. 6 kb großen Fragment welches eine rund 4 kb große Sequenz des linken (5') Endes des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters beinhaltet. Aufgrund der Tatsache, dass beide Resistenzkassetten identische Sequenzen enthalten, konnte über  $\lambda$  RED-vermittelte homologe Rekombination die Resistenzkassette des Zielcosmids couMW12 durch das *NsiI/NheI* Restriktionsfragment aus Cosmid couMW13 ersetzt werden. Das daraus resultierende Cosmid couMW14 beinhaltet damit das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster. Die heterologe Expression des klonierten

Genclusters in *S. coelicolor* M512 führte anschließend zur Produktion von Coumermycin A<sub>1</sub>. Das Zusammenfügen eines Genclusters auf einem Cosmid durch  $\lambda$  RED-vermittelte homologe Rekombination wurde bereits durch die Arbeiten von Perlova und Kollegen (2006) demonstriert. Dabei wurde das komplette Myxothiazolgencluster mittels gängiger Klonierungstechniken sowie dem  $\lambda$  RED/ET-Rekombinationssystem auf einem Cosmid kloniert (Perlova *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu ist die hier beschriebene Strategie unabhängig von Klonierungsschritten. Durch eine konsequente Eliminierung der Resistenzkassetten aus dem entsprechenden Zielcosmid, könnte diese Methode auch für Klonierungen großer DNA-Abschnitte aus mehr als zwei überlappenden Cosmiden verwendet werden.

Die erfolgreiche heterologe Expression des Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthesegenclusters in *S. coelicolor* M512 eröffnete neue Möglichkeiten für die Veränderung des Coumermycin A<sub>1</sub>-Moleküls durch genetische Manipulation. Diese Möglichkeit wurde durch die Herstellung der drei Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate Coumermycin LW1, MW1 und MW2 demonstriert. Jede dieser Substanzen wurde in Mengen produziert, die ähnlich denen der Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion des natürlichen Produzenten *S. rishiriensis* DSM40489 waren. Coumermycin MW1 und MW2 beinhalten dabei ein oder zwei Chloratome anstelle der Methylgruppe an Position 8 der Aminocoumarineinheit. Die Halogenierung erfolgte durch die heterologe Coexpression eines methyltransferase-defekten Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters mit dem Halogenasegen *clo-hal* aus dem Clorobiocingencluster. Unklar ist dabei, in welchem Schritt der Coumermycin MW1- und MW2-Biosynthese die Chloratome eingefügt werden. Walsh und Kollegen haben gezeigt, dass in der Novobiocinbiosynthese die SAM-abhängige C-Methyltransferase NovO Desmethylnovobiocinsäure, d.h. die über eine Amidbindung mit der 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure verbundene 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarineinheit, als Substrat verwendet (Pacholec *et al.*, 2005b). In der Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthese substituiert die Methyltransferase *couO* die korrespondierenden Mono- und Bisamide welche eine oder zwei Aminocoumarineinheiten enthalten. In beiden Fällen erfolgt die Methylierung an Position 8 der Aminocoumarineinheit (Pacholec *et al.*, 2005b). Es erscheint plausibel, dass in der Clorobiocinbiosynthese die Halogenase Clo-hal Desmethylnovobiocinsäure als Substrat für die Halogenierung verwendet. Das Auftreten der mono- und di-chlorierten Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate Coumermycin MW1

und MW2 läßt vermuten, dass Clo-hal sowohl die Mono- als auch die Bisamide der 3-Methyl-2,4-dicarbonsäureeinheit als Substrat akzeptiert, was auf eine außergewöhnlich breite Substrattoleranz dieses Enzyms hindeutet. Es kann z. Zt. jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Halogenierung zu einem früheren Zeitpunkt der Biosynthese stattfindet. Die Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate Coumermycin LW1, MW1 und MW2 wurden isoliert und auf ihre antibakterielle Aktivität getestet. Wie frühere Studien erwarten ließen (Eustáquio *et al.*, 2003a; Flatman *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2002), führte die Entfernung der Methylgruppe an Position 8 der Aminocoumarineinheit zu einer verminderten antibakteriellen Aktivität. Die folgende Einführung eines Chloratoms an dieser Position führte zur Wiederherstellung der antibakteriellen Aktivität. Auf den ersten Blick erscheint es überraschend, dass die Halogenierung von nur einer Aminocoumarineinheit für die optimale Aktivität ausreichend war, und dass die Halogenierung der zweiten Aminocoumarineinheit die antibakterielle Aktivität nicht verbesserte, sondern eher verschlechterte. Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, dass nur eine Aminocoumarineinheit und der gebundene Desoxyzucker mit seinen Substituenten die Aminocoumarin-Antibiotika Bindungstasche der Gyrase B Untereinheit besetzten (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996). Die Substituenten der 3-Aminogruppe der Aminocoumarineinheit führten im Gegensatz dazu nur zu einer schwachen Interaktion mit dem Zielenzym (Maxwell & Lawson, 2003).

Die Sequenzierung des vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters zeigte im intergenetischen Bereich von *couE* und *couG* das Vorhandensein von zwei kleinen *open reading frames*, die nach Sequenzanalyse hohe Ähnlichkeit zu Teilsequenzen der putativen Prephenat-Dehydrogenasen CloF und NovF aufweisen. Um zu untersuchen welchen Einfluss eine intakte Kopie eines Prephenat-Dehydrogenasegens auf die Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion hat, wurde das Gen *cloF* im heterologen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten exprimiert. Nach HPLC Analysen konnte dabei keine gesteigerte Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion nachgewiesen werden. Das Auftreten von redundanten DNA-Sequenzen, die nach Sequenzanalysen zwar noch Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion aufweisen, jedoch nicht mehr zur Bildung eines funktionsfähigen Proteins führen, steht in Übereinstimmung mit dem Verlust des 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäurerests im Coumermycin A<sub>1</sub>-Molekül. Es ist anzunehmen, dass während der natürlichen Evolution des Aminocoumarin-Antibiotikums Coumermycin A<sub>1</sub> der evolutionäre Druck, der die

Aufrechterhaltung einer Prephenat-Dehydrogenase-codierenden Sequenz favorisierte, verloren ging und eben damit zur Weiterentwicklung der Aminocoumarin-Antibiotika beitrug.

Die drei Gencluster von Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> beinhalten die putativen Regulatorgene *cloG*, *novG* und *couG*. Für NovG konnte ein positiver regulatorischer Effekt in der Novobiocinbiosynthese nachgewiesen werden (Eustáquio *et al.*, 2005b). Die Überexpression von *novG* im heterologen Novobiocinproduzenten führte zu einer Verdreifachung der Novobiocinproduktion. Um zu prüfen, ob NovG einen positiven regulatorischen Effekt auf die Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthese ausübt, wurde das Gen *novG* im heterologen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten exprimiert. Nach anschließender HPLC Analyse von Kulturextrakten konnte dabei keine Zunahme der Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion nachgewiesen werden. Trotz der auffallend starken Sequenzähnlichkeiten von *couG* und *novG* scheint die Überexpression von *novG* keinen Einfluß auf die Coumermycin A<sub>1</sub>-Biosynthese zu nehmen. Für NovG konnte gezeigt werden, dass es DNA-bindende Funktionen besitzt und als positiver Regulator in der Novobiocinbiosynthese wirkt (Eustáquio *et al.*, 2005b). Möglicherweise sind die geringen Sequenzunterschiede von NovG und CouG dafür verantwortlich, dass keine spezifische DNA-Protein Interaktion zwischen NovG und dem Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster stattfindet. Es bleibt jedoch auch zu vermerken, dass ein positiver regulatorischer Effekt von *couG* bisher nicht gezeigt wurde.

## 5 Zusammenfassung

Die Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> werden von unterschiedlichen Streptomycceten Stämmen gebildet und sind Hemmstoffe der bakteriellen DNA-Gyrase. Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der Aminocoumarinbiosynthesegencluster haben zu einem detaillierten Verständnis der Biosynthese dieser Antibiotika geführt. So konnte für nahezu alle Gene des Clorobiocingenclusters eine katalytische, regulatorische oder an Resistenzmechanismen beteiligte Funktion bewiesen werden. Lediglich für das Gen *cloY* fehlte eine Funktionszuordnung. *cloY* gehört zur Gruppe der sog. *mbtH*-ähnlichen Gene, die in einer großen Zahl von bakteriellen Antibiotika- und Siderophor-Biosynthesegenclustern vorkommen. Heute liegen mehr als 106 Datenbankeinträge solcher *mbtH*-ähnlichen Gene vor, jedoch ist deren Funktion noch völlig unbekannt.

Zur Untersuchung der Funktion von *cloY* in der Clorobiocinbiosynthese wurde ein Inaktivierungsexperiment durchgeführt. Dabei wurde das Gen *cloY* im Clorobiocingencluster deletiert und das entstandene  $\Delta cloY$  Cosmid im heterologen Produzenten *S. coelicolor* M512 exprimiert. Im Vergleich zu einem Kontrollstamm mit intaktem Clorobiocingencluster (54  $\mu\text{g/ml}$ ) lag die Clorobiocinproduktion der  $\Delta cloY$  Mutante bei 12  $\mu\text{g/ml}$ . Früher durchgeführte Inaktivierungsexperimente mit Biosynthese- oder Regulatorgenen der Aminocoumarin-Gencluster hatten demgegenüber immer zu einem vollständigen oder fast vollständigem Ausfall der Antibiotikaproduktion geführt. Die Analyse des sequenzierten Genoms von *S. coelicolor* zeigte das Vorhandensein von zwei weiteren *mbtH*-homologen Genen, *cchK* aus dem Coelichelingencluster und *CDA-ORFX* aus dem Gencluster des „calcium dependent antibiotic“. Inaktivierung beider Gene im *S. coelicolor* M512 Genom und eine anschließende heterologe Expression des  $\Delta cloY$  Cosmids in dieser Mutante, führte zu einer Clorobiocinproduktion von nur 0,3  $\mu\text{g/ml}$ . Die Komplementierungen dieser  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante mit jedem der zuvor deletierten Gene führte zur Wiederherstellung der Clorobiocinproduktion in Mengen bis zu 8  $\mu\text{g/ml}$ . Komplementierung der  $\Delta mbtH$  Dreifachmutante mit dem *mbtH*-homologen Gen *couY* aus dem Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster führte zu einer ähnlichen Clorobiocinproduktion. Das beweist, dass unterschiedliche *mbtH*-ähnliche Gene sich in ihrer Funktion ersetzen können. Anschließende Fütterungen der  $\Delta mbtH$

Dreifachmutante mit der Aminocoumarineinheit aus Novobiocin führten zur Bildung des Clorobiocin-Derivats Novclobiocin 102, in Produktionsmengen vergleichbar zu denen, die bei den Komplementierungsexperimenten ermittelt wurden. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass *cloY* eine spezielle Funktion bei der Biosynthese der 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarineinheit des Clorobiocinmoleküls besitzt.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der heterologen Wxpression des Biosynthesegenclusters von Coumermycin A<sub>1</sub>. Die Biosynthesegencluster der Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin und Novobiocin waren bereits erfolgreich kloniert und im Genom des heterologen Produzenten *S. coelicolor* M512 exprimiert worden. Da jedoch kein Cosmid mit dem vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster zur Verfügung stand, war die heterologe Expression von Coumermycin A<sub>1</sub> bisher nicht möglich. Für die heterologe Expression des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters und für die Herstellung neuer Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate mittels genetic engineering, sollte daher ein Cosmid mit dem vollständigen Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster hergestellt werden. Dafür wurde eine auf SuperCos1 basierende Cosmidbank des natürlichen Produzenten *S. rishiriensis* DSM40489 angelegt. Durch das PCR-Screening von rund 10.000 Klonen dieser Cosmidbank konnte kein Cosmid identifiziert werden, das in seiner Sequenz das vollständige Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster abdeckte. Es wurde daraufhin eine auf dem  $\lambda$  RED-System basierende Strategie entwickelt, um zwei überlappende Cosmidinserts zusammenzuführen und das komplette Coumermycin A<sub>1</sub>-Gencluster auf einem Cosmid zu konstruieren. Nach heterologer Expression des resultierenden Konstruktes in *S. coelicolor* M512 konnte tatsächlich die erfolgreiche Coumermycin A<sub>1</sub>-Produktion mittels HPLC/LC-MS Analysen nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Produktionsmenge von ~7  $\mu\text{g/ml}$  lag dabei leicht über der des natürlichen Produzenten *S. rishiriensis* (2 - 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Das vorliegende integrative Cosmid erlaubt gentechnische Modifikationen des Biosynthesegenclusters und damit die Produktion von Strukturanaloga von Coumermycin A<sub>1</sub>. Die Herstellung solcher neuer Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivate wurde durch die Inaktivierung des C-Methyltransferasegens *couO* und die darauffolgende Expression des Halogenasegens *clo-hal* aus dem Clorobiocingencluster im heterologen Coumermycin A<sub>1</sub>-Produzenten demonstriert. Dabei konnte die Bildung eines mono- und eines di-chlorierten Coumermycin A<sub>1</sub>-Derivats mittels HPLC/LC-MS Analysen nachgewiesen werden. Die antibakteriellen Eigenschaften dieser neuen Substanzen wurden in einem Agar-Diffusionstest gegen *B. subtilis* ermittelt. Dabei

zeigte sich eine in etwa gleich starke antibakterielle Wirkungen des mono-chlorierten Derivates Coumermycin MW1 und Coumermycin A<sub>1</sub>. Im Gegensatz dazu war das di-chlorierte Derivat Coumermycin MW2 etwas schlechter wirksam.

Die hier verwendete Methode für die Klonierung des Coumermycin A<sub>1</sub>-Genclusters zeigt eine neue Möglichkeit für das Zusammenführen großer DNA-Sequenzabschnitte mittels  $\lambda$  RED-vermittelter Rekombination. Die durchgeführten Modifikationen des Genclusters und die Herstellung der beiden neuen Hybridantibiotika haben die Möglichkeit der kombinatorischen Biosynthese von neuen Aminocoumarin-Antibiotika weiter belegt.

- Albermann, C., Soriano, A., Jiang, J., Vollmer, H., Biggins, J. B., Barton, W. A., Lesniak, J., Nikolov, D. B. & Thorson, J. S. (2003).** Substrate specificity of NovM: Implications for novobiocin biosynthesis and glycorandomization. *Organic Letters* **5**, 933-936.
- Ali, J. A., Jackson, A. P., Howells, A. J. & Maxwell, A. (1993).** The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. *Biochemistry* **32**, 2717-2724.
- Althaus, I. W., Dolak, L. & Reusser, F. (1988).** Coumarins as inhibitors of bacterial DNA gyrase. *Journal of Antibiotics* **41**, 373-376.
- Anderle, C., Alt, S., Gulder, T., Bringmann, G., Kammerer, B., Gust, B. & Heide, L. (2007).** Biosynthesis of clorobiocin: investigation of the transfer and methylation of the pyrrolyl-2-carboxyl moiety. *Arch. Microbiol* **187**, 227-237.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L. et al. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
- Berger, J. & Batcho, A. D. (1978).** Coumarin-glycoside antibiotics. In *Antibiotics. Isolation, Separation and Purification.*, pp. 101-158. Edited by. M. J. Weinstein & G. H. Wagman. Amsterdam, Oxford, New York.
- Bibb, M. J., Findlay, P. R. & Johnson, M. W. (1984).** The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30**, 157-166.
- Birch, A. J., Holloway, R. W. & Rickards, R. W. (1962).** Biosynthesis of noviose, a branched-chain monosaccharide. *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 148-5.
- Blodgett, J. A., Zhang, J. K. & Metcalf, W. W. (2005).** Molecular cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the phosphinothricin tripeptide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 230-240.
- Bunton, C. A., Kenner, G. W., Robinson, M. J. T. & Webster, B. R. (1963).** Experiments related to the biosynthesis of novobiocin and other coumarins. *Tetrahedron* **19**, 1001-1010.
- Burlison, J. A. & Blagg, B. S. (2006).** Synthesis and evaluation of coumermycin A1 analogues that inhibit the Hsp90 protein folding machinery. *Org. Lett* **8**, 4855-4858.
- Burlison, J. A., Neckers, L., Smith, A. B., Maxwell, A. & Blagg, B. S. (2006).** Novobiocin: redesigning a DNA gyrase inhibitor for selective inhibition of hsp90. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 15529-15536.
- Carter, R. A., Worsley, P. S., Sawers, G., Challis, G. L., Dilworth, M. J., Carson, K. C., Lawrence, J. A., Wexler, M., Johnston, A. W. & Yeoman, K. H. (2002).** The *vbs* genes that direct synthesis of the siderophore vicibactin in *Rhizobium leguminosarum*: their expression in other genera requires ECF sigma factor Rpol. *Molecular Microbiology* **44**, 1153-1166.

- Challis, G. L. & Ravel, J. (2000).** Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiology Letters* **187**, 111-114.
- Chen, H., Hubbard, B. K., O'Connor, S. E. & Walsh, C. T. (2002).** Formation of  $\beta$ -hydroxy histidine in the biosynthesis of nikkomycin antibiotics. *Chemistry & Biology* **9**, 103-112.
- Chen, H. & Walsh, C. T. (2001).** Coumarin formation in novobiocin biosynthesis:  $\beta$ -hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI. *Chemistry & Biology* **8**, 301-312.
- Chiu, H.-T., Hubbard, B. K., Shah, A. N., Eide, J., Fredenburg, R. A., Walsh, C. T. & Khosla, C. (2001).** Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 8548-8553.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T. et al. (1998).** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544.
- Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002).** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 223-249.
- Datsenko, K. A. & 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.
- Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U. F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.-M., Piepersberg, W. & Raynal, M.-C. (2000).** Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular and General Genetics* **264**, 477-485.
- Du, L., Sanchez, C., Chen, M., Edwards, D. J. & Shen, B. (2000).** The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chemistry & Biology* **7**, 623-642.
- Edwards, D. J. & Gerwick, W. H. (2004).** Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 11432-11433.
- Eustáquio, A. S., Gust, B., Galm, U., Li, S.-M., Chater, K. F. & Heide, L. (2005a).** Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2452-2459.
- Eustáquio, A. S., Gust, B., Li, S.-M., Pelzer, S., Wohlleben, W., Chater, K. F. & Heide, L. (2004).** Production of 8'-halogenated and 8'-unsubstituted novobiocin derivatives in genetically engineered *Streptomyces coelicolor* strains. *Chemistry & Biology* **11**, 1561-1572.
- Eustáquio, A. S., Gust, B., Luft, T., Li, S.-M., Chater, K. F. & Heide, L. (2003a).** Clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces*. Identification of the halogenase and generation of structural analogs. *Chemistry & Biology* **10**, 279-288.

**Eustáquio, A. S., Li, S.-M. & Heide, L. (2005b).** NovG, a DNA-binding protein acting as a positive regulator of novobiocin biosynthesis. *Microbiology* **151**, 1949-1961.

**Eustáquio, A. S., Luft, T., Wang, Z.-X., Gust, B., Chater, K. F., Li, S.-M. & Heide, L. (2003b).** Novobiocin biosynthesis: inactivation of the putative regulatory gene *novE* and heterologous expression of genes involved in aminocoumarin ring formation. *Arch. Microbiol.* **180**, 25-32.

**Flatman, R. H., Eustaquio, A., Li, S. M., Heide, L. & Maxwell, A. (2006).** Structure-activity relationships of aminocoumarin-type gyrase and topoisomerase IV inhibitors obtained by combinatorial biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1136-1142.

**Flett, F., Mersinias, V. & Smith, C. P. (1997).** High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters* **155**, 223-229.

**Freel Meyers, C. L., Oberthuer, M., Xu, H., Heide, L., Kahne, D. & Walsh, C. T. (2004).** Characterization of NovP and NovN: Completion of novobiocin biosynthesis by sequential tailoring of the noviosyl ring. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 67-70.

**Freel Meyers, C. L., Oberthur, M., Anderson, J. W., Kahne, D. & Walsh, C. T. (2003).** Initial characterization of novobiocic acid noviosyl transferase activity of NovM in biosynthesis of the antibiotic novobiocin. *Biochemistry* **42**, 4179-4189.

**Freitag, A., Rapp, H., Heide, L. & Li, S.-M. (2005a).** Metabolic engineering of aminocoumarins: Inactivation of the methyltransferase gene *cloP* and generation of new clorobiocin derivatives in a heterologous host. *ChemBiochem* **6**, 1411-1418.

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

**Galm, U., Dessoy, M. A., Schmidt, J., Wessjohann, L. A. & Heide, L. (2004a).** *In vitro* and *in vivo* production of new aminocoumarins by a combined biochemical, genetic and synthetic approach. *Chemistry & Biology* **11**, 173-183.

**Galm, U., Heller, S., Shapiro, S., Page, M., Li, S. M. & Heide, L. (2004b).** Antimicrobial and DNA gyrase-inhibitory activities of novel clorobiocin derivatives produced by mutasynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1307-1312.

**Galm, U., Schimana, J., Fiedler, H. P., Schmidt, J., Li, S.-M. & Heide, L. (2002).** Cloning and analysis of the simocyclinone biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Arch. Microbiol.* **178**, 102-114.

**Garneau, S., Dorrestein, P. C., Kelleher, N. L. & Walsh, C. T. (2005).** Characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A<sub>1</sub> biosynthesis. *Biochemistry* **44**, 2770-2780.

**Gunsior, M., Breazeale, S. D., Lind, A. J., Ravel, J., Janc, J. W. & Townsend, C. A. (2004).** The biosynthetic gene cluster for a monocyclic beta-lactam antibiotic, nocardicin A. *Chem. Biol.* **11**, 927-938.

- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. & 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.
- Gust, B., Chandra, G., Jakimowicz, D., Yuqing, T., Bruton, C. J. & Chater, K. F. (2004).**  $\lambda$  RED-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**, 107-128.
- Hardy, C. D. & Cozzarelli, N. R. (2003).** Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 941-947.
- He, X. M. & Liu, H. W. (2002).** Formation of unusual sugars: Mechanistic studies and biosynthetic applications. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 701-754.
- Holzenkämpfer, M. & Zeeck, A. (2002).** Biosynthesis of simocyclinone D8 in an 18O<sub>2</sub>-rich atmosphere. *Journal of Antibiotics* **55**, 341-342.
- Hopwood, D. A. & Wright, H. M. (1983).** CDA is a new chromosomally-determined antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol* **129**, 3575-3579.
- Huang, Y. T. & Blagg, B. S. (2007).** A library of noviosylated coumarin analogues. *Journal of Organic Chemistry* **72**, 3609-3613.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. & Omura, S. (2003).** Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**, 526-531.
- Jacoby, G. A. (2005).** Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* **41 Suppl 2**, S120-S126.
- Kawaguchi, H., Miyaki, T. & Tsukiura, H. (1965).** Studies on coumermycin, a new antibiotic. 3. Structure of coumermycin A2. *Journal of Antibiotics* **18**, 220-222.
- Keller, S., Pojer, F., Heide, L. & Lawson, D. M. (2006).** Molecular replacement in the "twilight zone": crystal structure determination of the non-heme iron oxygenase NovR from *Streptomyces spheroides* through repeated density modification of a poor molecular replacement solution. *Acta Cryst D* **62**, 1564-1570.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000)** *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Lafitte, D., Lamour, V., Tsvetkov, P. O., Makarov, A. A., Klich, M., Deprez, P., Moras, D., Briand, C. & Gilli, R. (2002).** DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry* **41**, 7217-7223.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Wang, L., Li, W., Liu, Z. & Swings, J. (2002).** The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 823-829.

**Lewis, R. J., Singh, O. M. P., Smith, C. V., Skarzynski, T., Maxwell, A., Wonacott, A. J. & Wigley, D. B. (1996).** The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.* **15**, 1412-1420.

**Li, S.-M. & Heide, L. (2005).** New aminocoumarin antibiotics from genetically engineered *Streptomyces* strains. *Curr. Med. Chem.* **12**, 419-427.

**Li, S.-M., Westrich, L., Schmidt, J., Kuhnt, C. & Heide, L. (2002).** Methyltransferase genes in *Streptomyces rishiriensis*: new coumermycin derivatives from gene-inactivation experiments. *Microbiology* **148**, 3317-3326.

**Li, W., Wu, J., Tao, W., Zhao, C., Wang, Y., He, X., Chandra, G., Zhou, X., Deng, Z., Chater, K. F. & Tao, M. (2007).** A genetic and bioinformatic analysis of *Streptomyces coelicolor* genes containing TTA codons, possible targets for regulation by a developmentally significant tRNA. *FEMS Microbiol Lett* **266**, 20-28.

**Lombo, F., Velasco, A., Castro, A., de la, C. F., Brana, A. F., Sanchez-Puelles, J. M., Mendez, C. & Salas, J. A. (2006).** Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species. *Chembiochem.* **7**, 366-376.

**Lorico, A., Rappa, G. & Sartorelli, A. C. (1992).** Novobiocin-induced accumulation of etoposide (VP-16) in WEHI-3B D+ leukemia cells. *Int. J. Cancer* **52**, 903-909.

**MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H. & MacNeil, T. (1992).** Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**, 61-68.

**Magarvey, N. A., Haltli, B., He, M., Greenstein, M. & Hucul, J. A. (2006).** Biosynthetic pathway for mannopeptimycins, lipoglycopeptide antibiotics active against drug-resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2167-2177.

Mancy, D., Ninet, L. and Preud'Homme, J. Antibiotic 18631 RP. (Rhone-Poulenc S.A.). 189,259[3,793,147]. 1974. U.S. 1974.

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

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

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

**Miao, V., Brost, R., Chapple, J., She, K., Gal, M. F. & Baltz, R. H. (2006).** The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 129-140.

**Miao, V., Coeffet-Legal, M. F., Brian, P., Brost, R. et al. (2005).** Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **151**, 1507-1523.

**Ninet, L., Benazet, F., Charpentie, Y., Dubost, M., Florent, J., Mancy, D., Preud'Homme, J., Threlfall, T. L. & Vuillemin, B. (1972).** Clorobiocin (18.631 R.P.), a new chlorinated antibiotic produced by several *Streptomyces species*. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences, Serie C: Sciences Chimiques* **275**, 455-458.

**Orihara, N., Kuzuyama, T., Takahashi, S., Furihata, K. & Seto, H. (1998).** Studies on the biosynthesis of terpenoid compounds produced by actinomycetes - 3. Biosynthesis of the isoprenoid side chain of novobiocin via the non-mevalonate pathway in *Streptomyces niveus*. *Journal of Antibiotics* **51**, 676-678.

**Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1992).** Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61:1053-95.**, 1053-1095.

**Pacholec, M., Hillson, N. J. & Walsh, C. T. (2005a).** NovJ/NovK catalyze benzylic oxidation of a  $\beta$ -hydroxyl tyrosyl-S-pantetheinyl enzyme during aminocoumarin ring formation in novobiocin biosynthesis. *Biochemistry* **44**, 12819-12826.

**Pacholec, M., Tao, J. & Walsh, C. T. (2005b).** CouO and NovO: C-Methyltransferases for tailoring the aminocoumarin scaffold in coumermycin and novobiocin antibiotic biosynthesis. *Biochemistry* **44**, 14969-14976.

**Paget, M. S., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S. J. & Buttner, M. J. (1999).** Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **181**, 204-211.

**Perlova, O., Fu, J., Kuhlmann, S., Krug, D., Stewart, A. F., Zhang, Y. & Muller, R. (2006).** Reconstitution of the myxothiazol biosynthetic gene cluster by Red/ET recombination and heterologous expression in *Myxococcus xanthus*. *Appl. Environ. Microbiol* **72**, 7485-7494.

**Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H. Z. & Piepersberg, W. (1995).** Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Molecular Microbiology* **16**, 1137-1156.

**Pettis, G. S. & McIntosh, M. A. (1987).** Molecular characterization of the *Escherichia coli* enterobactin cistron entF and coupled expression of entF and the fes gene. *J. Bacteriol.* **169**, 4154-4162.

**Pojer, F., Kahlich, R., Kammerer, B., Li, S.-M. & Heide, L. (2003a).** CloR, a bifunctional non-heme iron oxygenase involved in clorobiocin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 30661-30668.

**Pojer, F., Li, S.-M. & Heide, L. (2002).** Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology* **148**, 3901-3911.

**Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C. T., Li, S.-M. & Heide, L. (2003b).** CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2316-2321.

- Quadri, L. E., Sello, J., Keating, T. A., Weinreb, P. H. & Walsh, C. T. (1998).** Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chemistry & Biology* **5**, 631-645.
- Rappa, G., Lorico, A. & Sartorelli, A. C. (1992).** Potentiation by novobiocin of the cytotoxic activity of etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26). *Int. J. Cancer* **51**, 780-787.
- Rappa, G., Shyam, K., Lorico, A., Fodstad, O. & Sartorelli, A. C. (2000).** Structure-activity studies of novobiocin analogs as modulators of the cytotoxicity of etoposide (VP-16). *Oncol. Res.* **12**, 113-119.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Hopwood, D. A. (1996).** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Molecular Microbiology* **21**, 77-96.
- Retzlaff, L. & Distler, J. (1995).** The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Molecular Microbiology* **18**, 151-162.
- Reusser, F. & Dolak, L. A. (1986).** Novenaminate is the active moiety in novobiocin. *Journal of Antibiotics* **39**, 272-274.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001)** *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scannell, J. & Kong, Y. L. (1969).** Biosynthesis of coumermycin A1: incorporation of L-proline into the pyrrole groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**, 139-143.
- Schmutz, E., Hennig, S., Li, S.-M. & Heide, L. (2004).** Identification of a topoisomerase IV in actinobacteria: purification and characterization of ParYR and GyrBR from the coumermycin A1 producer *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Microbiology* **150**, 641-647.
- Schmutz, E., Mühlenweg, A., Li, S.-M. & Heide, L. (2003a).** Resistance genes of aminocoumarin producers: Two type II topoisomerase genes confer resistance against coumermycin A1 and clorobiocin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 869-877.
- Schmutz, E., Steffensky, M., Schmidt, J., Porzel, A., Li, S.-M. & Heide, L. (2003b).** An unusual amide synthetase (CouL) from the coumermycin A1 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *European Journal of Biochemistry* **270**, 4413-4419.
- Schwartz, D., Berger, S., Heinzelmann, E., Muschko, K., Welzel, K. & Wohlleben, W. (2004).** Biosynthetic gene cluster of the herbicide phosphinothricin tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7093-7102.
- Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Edwards, D. J., Chen, M. & Murrell, J. M. (2002).** Cloning and Characterization of the Bleomycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces verticillus* ATCC15003(1). *Journal of Natural Products* **65**, 422-431.

- Smith, C. G., Dietz, A., Sokolski, W. T. & Savage, G. M. (1956).** Streptonivicin, a new antibiotic. I. Discovery and biologic studies. *Antibiot. Chemother.* **6**, 135-142.
- Sosio, M., Bianchi, A., Bossi, E. & Donadio, S. (2000).** Teicoplanin biosynthesis genes in *Actinoplanes teichomyceticus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**, 379-384.
- Sosio, M., Stinchi, S., Beltrametti, F., Lazzarini, A. & Donadio, S. (2003).** The gene cluster for the biosynthesis of the glycopeptide antibiotic A40926 by *Nonomuraea* species. *Chemistry & Biology* **10**, 541-549.
- Steffensky, M., Li, S.-M. & Heide, L. (2000a).** Cloning, overexpression, and purification of novobiocin acid synthetase from *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 21754-21760.
- Steffensky, M., Mühlenweg, A., Wang, Z.-X., Li, S.-M. & Heide, L. (2000b).** Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1214-1222.
- Stegmann, E., Rausch, C., Stockert, S., Burkert, D. & Wohlleben, W. (2006a).** The small MbtH-like protein encoded by an internal gene of the balhimycin biosynthetic gene cluster is not required for glycopeptide production. *FEMS Microbiol Lett* **262**, 85-92.
- Thiara, A. S. & Cundliffe, E. (1988).** Cloning and characterization of a DNA gyrase B gene from *Streptomyces sphaeroides* that confers resistance to novobiocin. *EMBO J.* **7**, 2255-2259.
- Thomas, M. G., Chan, Y. A. & Ozanick, S. G. (2003).** Deciphering tuberactinomycin biosynthesis: isolation, sequencing, and annotation of the viomycin biosynthetic gene cluster. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2823-2830.
- Tsai, F. T. F., Singh, O. M., Skarzynski, T., Wonacott, A. J. et al. (1997).** The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin. *Proteins* **28**, 41-52.
- von Döhren, H. & Gräfe, U. (1997).** General aspects of secondary metabolism. In *Products of Secondary Metabolism*, pp. 1-55. Edited by. H. Kleinkauf & H. v.Döhren VCH.
- Wang, G., Nie, L. & Tan, H. (2003).** Cloning and characterization of *sanO*, a gene involved in nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 452-457.
- Wang, Z.-X., Li, S.-M. & Heide, L. (2000).** Identification of the coumermycin A1 biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3040-3048.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M. & Bhole, B. D. (2001).** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* **176**, 386-390.
- Westrich, L., Heide, L. & Li, S.-M. (2003).** CloN6, a novel methyltransferase catalysing the methylation of the pyrrole-2-carboxyl moiety of clorobiocin. *Chembiochem* **4**, 768-773.

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

**Xu, H., Wang, Z. X., Schmidt, J., Heide, L. & Li, S. M. (2002).** Genetic analysis of the biosynthesis of the pyrrole and carbamoyl moieties of coumermycin A1 and novobiocin. *Mol. Genet. Genomics* **268**, 387-396.

**Yeats, C., Bentley, S. & Bateman, A. (2003).** New knowledge from old: in silico discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. *BMC. Microbiol* **3**, 3.

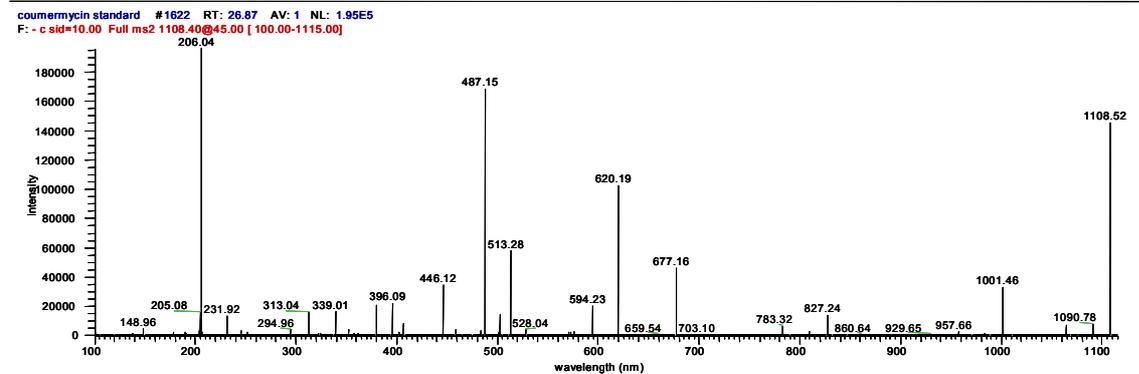
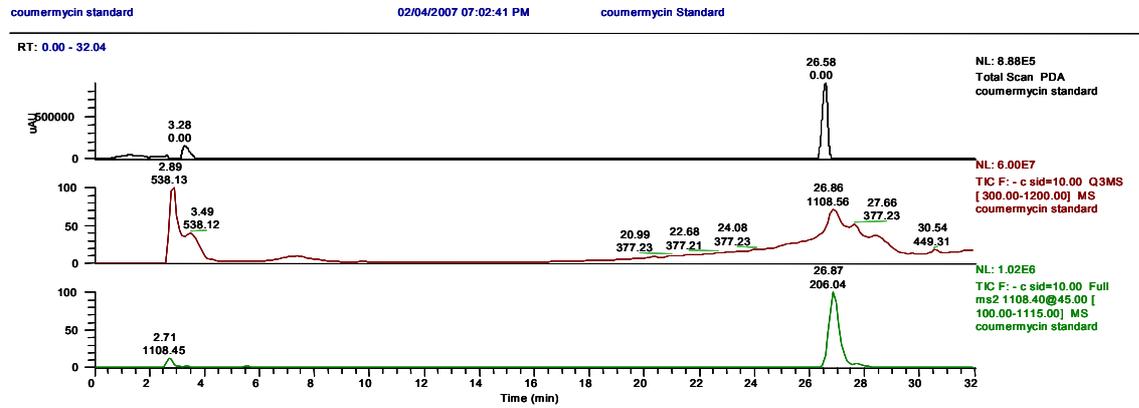
**Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. & Court DL (2000).** An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5978-5983.

**Zerbe, K., Pylypenko, O., Vitali, F., Zhang, W. et al. (2002).** Crystal structure of OxyB, a cytochrome P450 implicated in an oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 47476-47485.

# 6 Anhang

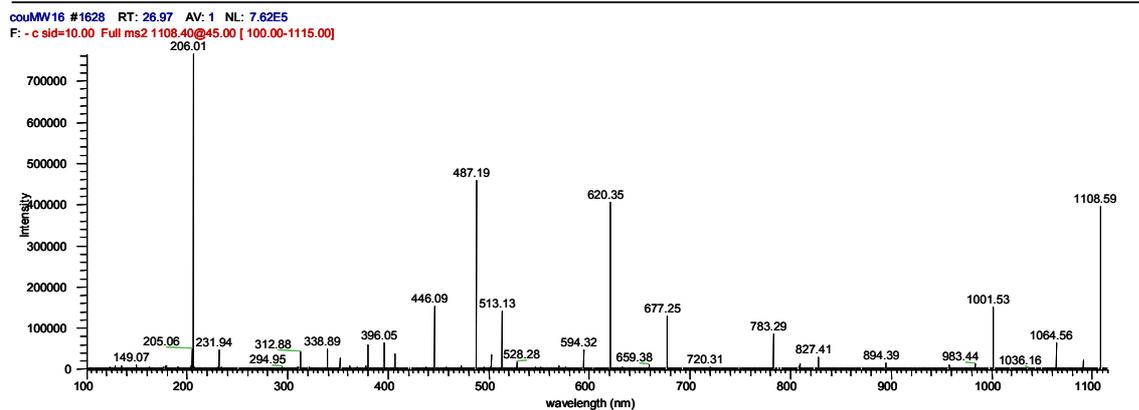
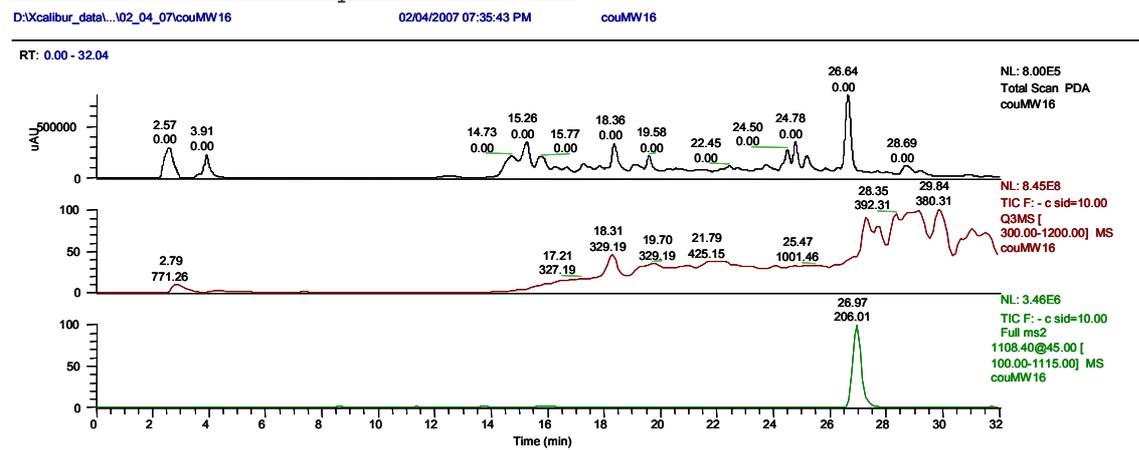
I)

## LC-MS/MS Analyse von Coumermycin A<sub>1</sub>-Standard



II)

## LC-MS/MS Analyse von Coumermycin A<sub>1</sub> aus *S. coelicolor*(couMW16)



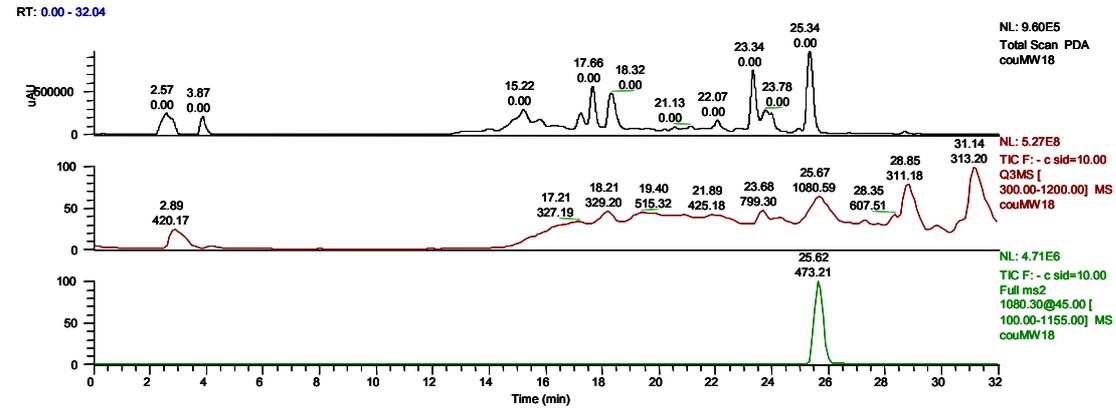
III)

LC-MS/MS Analyse von Coumermycin LW1 aus *S. coelicolor*(couMW18)

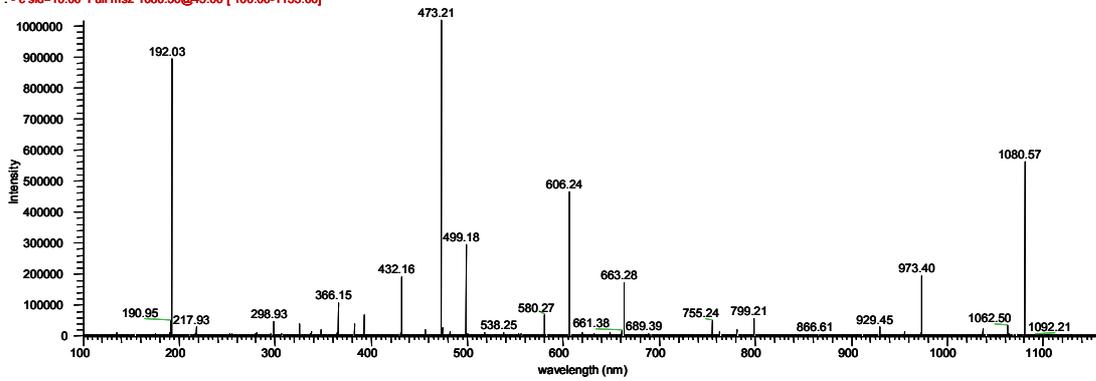
D:\Xcalibur\_data\...\_02\_04\_07\couMW18

02/04/2007 08:14:43 PM

couMW18



couMW18 #1546 RT: 25.62 AV: 1 NL: 1.01E6  
F: - c sid=10.00 Full ms2 1080.30@45.00 [ 100.00-1155.00 ]



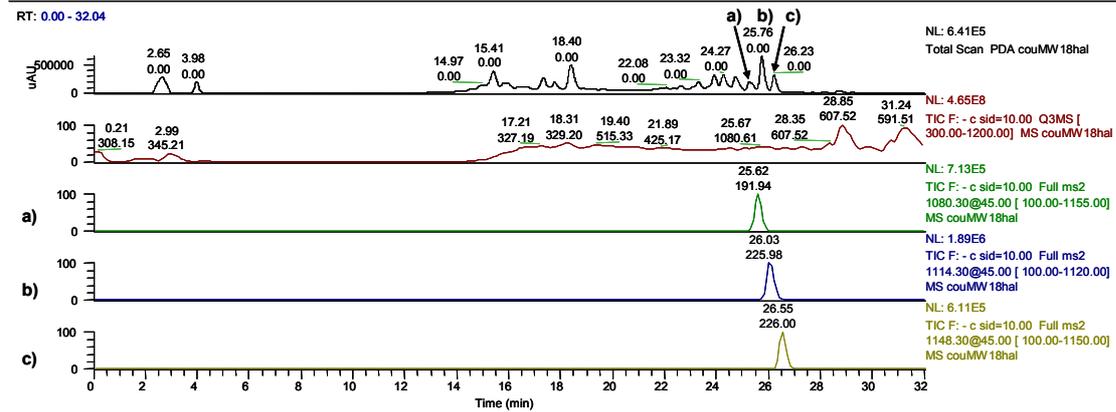
IV)

LC-MS/MS Analyse von Coumermycin LW1, MW1 und MW2 aus *S. coelicolor*(couMW18)/pAEha7

D:\Xcalibur\_data\...\_02\_04\_07\couMW18hal

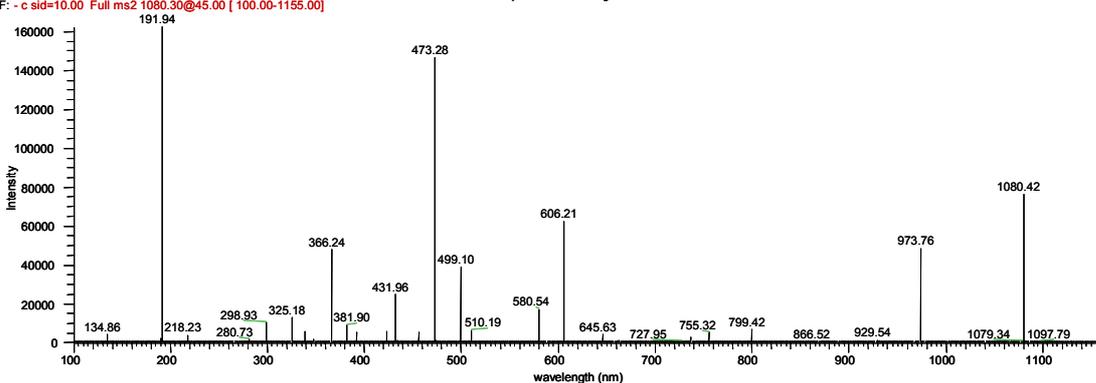
02/04/2007 08:47:30 PM

couMW18hal



couMW18hal #1546 RT: 25.62 AV: 1 NL: 1.62E5  
F: - c sid=10.00 Full ms2 1080.30@45.00 [ 100.00-1155.00 ]

a) Coumermycin LW1



# Anhang

V)

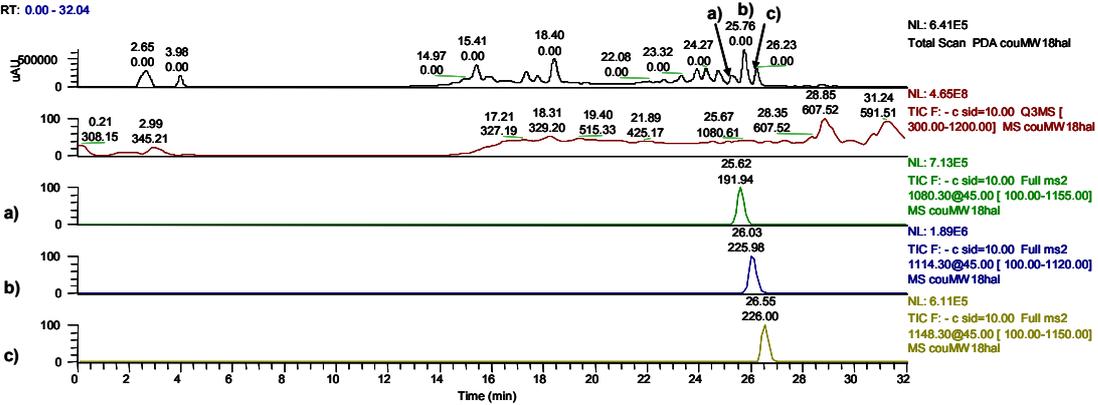
## LC-MS/MS Analyse eines *S. coelicolor*(couMW18)/pAE ha7 Extrakts

D:\Xcalibur\_data\...\_02\_04\_07\couMW18hal

02/04/2007 08:47:30 PM

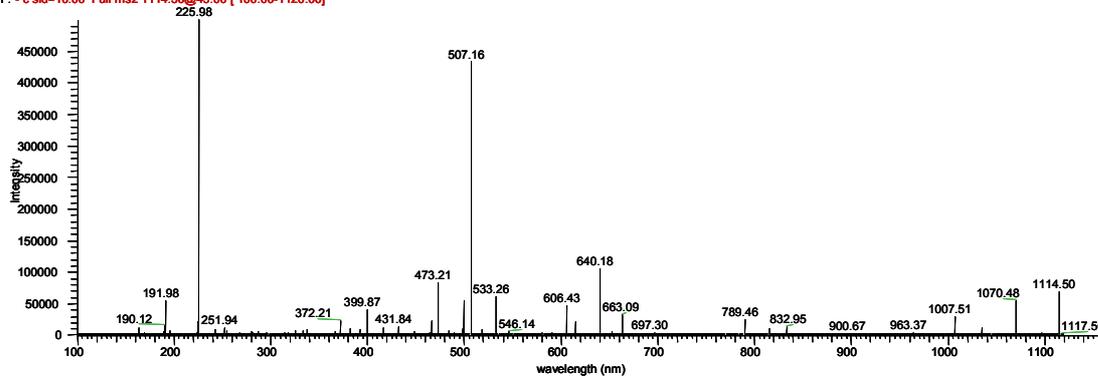
couMW18hal

RT: 0.00 - 32.04



couMW18hal #1571 RT: 26.03 AV: 1 NL: 4.98E5  
 F: - c sid=10.00 Full ms2 1114.30@45.00 [ 100.00-1120.00]

### b) Coumermycin MW1



VI)

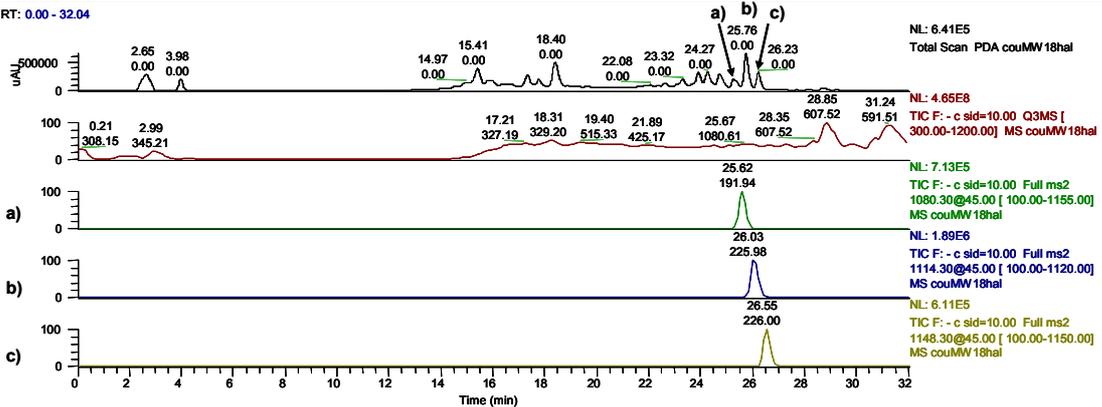
## LC-MS/MS Analyse eines *S. coelicolor*(couMW18)/pAE ha7 Extrakts

D:\Xcalibur\_data\...\_02\_04\_07\couMW18hal

02/04/2007 08:47:30 PM

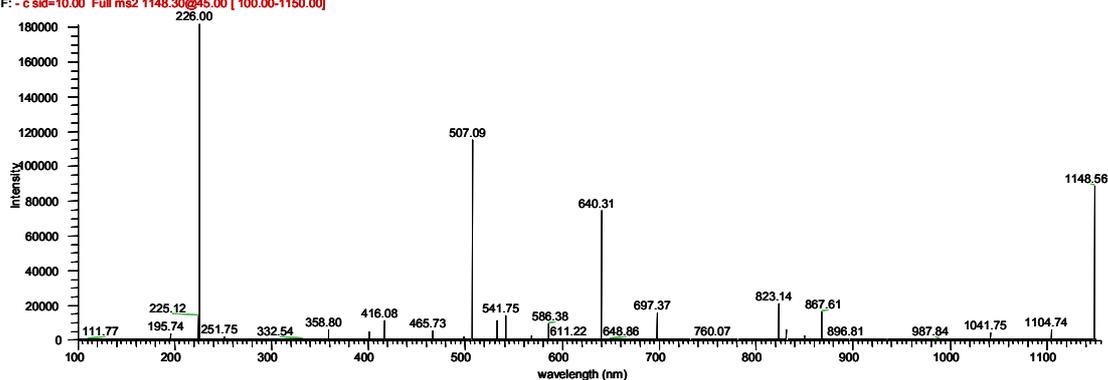
couMW18hal

RT: 0.00 - 32.04



couMW18hal #1602 RT: 26.55 AV: 1 NL: 1.81E5  
 F: - c sid=10.00 Full ms2 1148.30@45.00 [ 100.00-1150.00]

### c) Coumermycin MW2



VII)

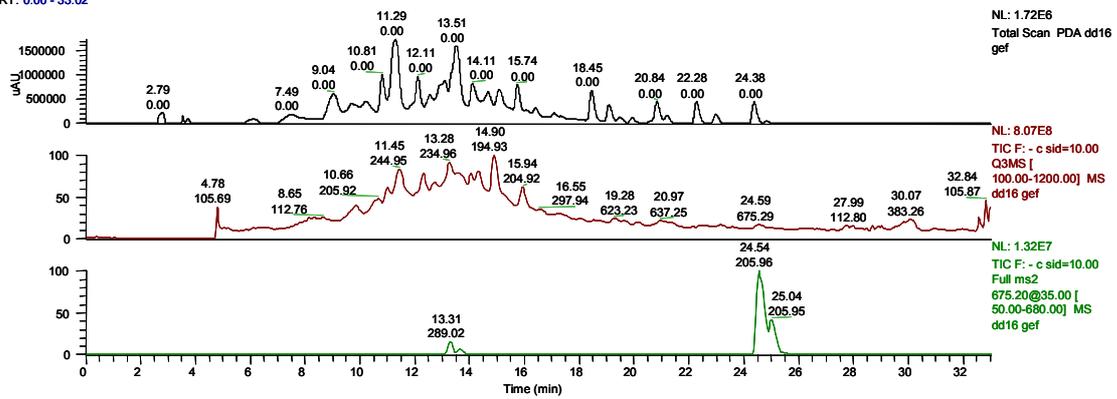
LC-MS/MS Analyse von Novclobiocin 102

D:\Xcalibur\_data\...dd16 gef

14/08/2006 05:00:17 PM

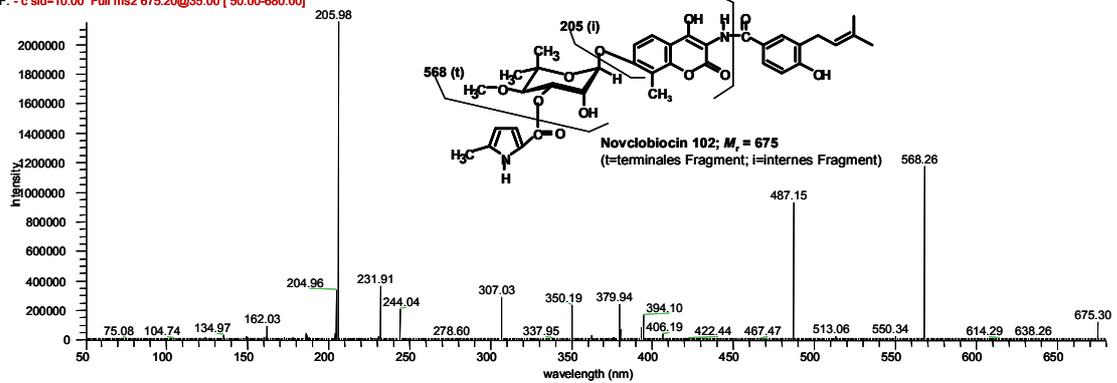
dd16gef

RT: 0.00 - 33.02



dd16 gef #2055 RT: 24.57 AV: 1 NL: 8.57E6  
 F: - c sid=10.00 Full ms2 675.20@35.00 [50.00-680.00]

Fragmentierungsschema Novclobiocin 102 487 (t)



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Heide und Dr. Bertolt Gust für die Überlassung des Themas sowie für die Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bertolt Gust danke ich außerdem ganz herzlich für die guten Diskussionen und seine Hilfsbereitschaft und praktischen Tips im Laboralltag.

Herrn Prof. Dr. S.-M. Li danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Betreuung und Unterstützung während der ersten Hälfte meiner Promotionszeit.

Meinen Laborpartnern Volker und Alessandra danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, das angenehme Klima im Labor und die oft amüsanten Stunden auch außerhalb der Arbeitszeit. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle auch an die Doktores Haagen und Unsöld, denen ich weiterhin auch für viele lustige Stunden innerhalb des Laboralltags danke.

Emmanuel, Ute, und Kerstin danke ich für die zahlreichen fröhlichen gemeinsamen Stunden in den letzten Jahren.

Herrn Trefzer danke ich für die Herstellung von Medium, Frau Bauer und Frau Frickmann für die Hilfsbereitschaft bei der Sauberhaltung des Labors.

Corinna und Frau Lörcher danke ich ganz herzlich für die Verarbeitung aller Büro-Formalitäten

Ich danke allen Kollegen, die dazu beigetragen haben, dass ich die Promotionszeit immer positiv im Gedächtnis behalten werde: Leo, Orwa, Yvonne, Volker, Inge, Christine, Alessandra, Ute, Katharina, Kerstin, Silke, Thomas, Alexander, Nicola, Hanli, Rebecca, Katja, Heike, Anja, Bernd, Stephanie, Emmanuel, Susanne, Lucia und Corinna.

Ganz besonders herzlich danke ich meiner allerliebsten Lena sowie meiner Familie für die stetige Unterstützung in den letzten 29 Jahren.

## **Akademische Lehrer**

Ich danke meinen akademischen Lehrern der Karl-Ruprechts-Universität Heidelberg und der Eberhard-Karls-Universität Tübingen:

Prof. Dr. R. Beiderbeck

Prof. Dr. H. Bujard

Prof. Dr. C. Clayton

Dr. B. Gust

Prof. Dr. L. Heide

Prof. Dr. P. Leins

Prof. Dr. S.-M. Li

Prof. Dr. T. Rausch

Prof. Dr. J. Reichling

Prof. Dr. M. Stitt

Prof. Dr. V. Storch

Prof. Dr. M. Wink

Dr. R. Zrenner

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Manuel Wolpert  
Geburtsdatum: 07.07.1978  
Geburtsort: Bad Mergentheim

## Schulbildung

1984 - 1988 Grundschule Stadt-Mitte, Bad Mergentheim  
1988 - 1994 Kopernikus Realschule, Bad Mergentheim  
1994 - 1997 Wirtschaftsgymnasium, Bad Mergentheim

## Hochschulausbildung

09/1997 - 06/2002 Biologiestudium an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg  
06/2002 - 03/2003 Diplomarbeit in der Fakultät für Biowissenschaften an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg  
03/2003 Abschluss als Diplom Biologe  
04/2003 - 2007 Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, im Labor von Prof. Dr. Lutz Heide

## Lehrtätigkeit und Fortbildung

04/2005 Forschungsaufenthalt am Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institut (GBB), Groningen, Niederlande, im Labor von Prof. Dr. Lubbert Dijkhuizen  
2003 - 2007 Organisation und Betreuung pharmazeutischer Praktika  
Teilnahme und Präsentationen auf internationalen Fachkongressen  
Leitung studentischer Exkursionen und Systematik der Arzneipflanzen  
05/2006 Lehrtätigkeit am Mibeg-Institut für berufliche Weiterbildung GmbH

