



ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG IM BREISGAU  
FAKULTÄT FÜR CHEMIE, PHARMAZIE UND GEOWISSENSCHAFTEN

**Halogenasen aus Actinomyceten:  
Funktionelle und phylogenetische Studien**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**DIPL.-ING. ANDREAS HORNUNG**

2005

Tag der Promotion:

Dekan:

Vorsitzender des Promotionsausschusses:

Referent:

Korreferent:

3. November 2005

Prof. Dr. A. Bechthold

Prof. Dr. G. E. Schulz

Prof. Dr. A. Bechthold

Prof. Dr. M. Müller

Mach Dir nicht vor, Du wolltest Irrtümer in der Natur verbessern.

In der Natur ist kein Irrtum, sondern der Irrtum ist in Dir.

(LEONARDO DA VINCI)

## DANKSAGUNG

### **Ich danke:**

Dr. Andreas Vente und Dr. Rolf Zettl für die Ermöglichung dieser Promotion bei der Combinature Biopharm AG und insbesondere Andreas für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft,

Prof. Dr. Andreas Bechthold (Institut für pharmazeutische Wissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) für die universitäre Betreuung sowie die Ermöglichung der Durchführung einer externen Promotion,

Dr. Stefan Pelzer für viele wichtige Hilfestellungen und die Herstellung des Kontaktes zu der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roderich Süßmuth,

Prof. Dr. Michael Müller für die Erstellung des Zweitgutachtens,

Prof. Dr. Roderich Süßmuth, seiner Arbeitsgruppe und insbesondere Dr. Marcelo Bertazzo für die vielen HPLC-MS-Messungen und die hervorragende Zusammenarbeit,

Agnieszka Dziarnowski, für die vielfältige Hilfe im Labor sowie die moralische Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit,

Ulrike Bauer und Hanna von Suchodoletz für die Hilfe im Labor und die vielen gemeinsamen lustigen Stunden bei der Combinature Biopharm AG,

Marlis Kurth für die Herstellung der vielen Medien und Puffer sowie allen weiteren Mitgliedern der Mikrobiologie, die mich und meine Arbeit unterstützt haben,

Dr. Sven-Eric Wohler, Dr. Meike Holzenkämpfer, Dr. Dirk Kreft, Dr. Carsten Fischer, Dr. Ulf-Dietrich Renner, Annett Möller und Ayhan Özdemir für die Unterstützung bei der chemischen Analytik,

allen Mitarbeitern der Abteilung „Genomics“ für die Herstellung der Cosmid-Genbanken,

Christine House für den hervorragenden Englischunterricht

und meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums und der Promotion unterstützt haben.

## ZUSAMMENFASSUNG

Actinomyceten produzieren eine enorme Vielfalt unterschiedlichster biologisch aktiver Sekundärmetabolite, die für die Suche nach neuen Medikamenten eingesetzt werden können. Die Nutzung dieser Ressource im Wirkstofffindungsprozess ist jedoch nicht trivial und meist recht aufwendig. Daher ist trotz großer historischer Erfolge in jüngerer Vergangenheit die Bedeutung von Naturstoffen in der Medikamentenentwicklung zurückgegangen.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte ein molekularbiologisches Verfahren etabliert werden, das bei geringem Kostenaufwand die Durchmusterung einer kompletten Stammsammlung bezüglich ihres biosynthetischen Potentials in kürzester Zeit ermöglicht. Dieses Verfahren nutzt den Zusammenhang zwischen Nukleotidsequenz und Substratspezifität eines Biosyntheseenzym. Wie in dieser Arbeit demonstriert wurde, kann durch seine Anwendung an geeigneten Biosynthesegenen, so genannten Markern, entweder ganz gezielt nach Produzenten einer bestimmten Sekundärmetabolitsubstanzklasse oder relativ breit nach Produzenten von Naturstoffen unterschiedlicher Klassen mit einem bestimmten Strukturmotiv gesucht werden.

In dieser Arbeit wurden Halogenasegene als genetische Marker verwendet, um eine Vorhersage treffen zu können, welche Sekundärmetabolitklassen von den etwa 550 untersuchten Actinomycetenstämmen produziert werden. Gene mit Homologien zu bekannten Halogenasen aus Naturstoff-Biosynthesegenclustern wurden in 20% der Stämme entdeckt. Sekundärmetabolite unterschiedlicher Klassen wurden isoliert und ihre Struktur bestimmt. Die Hypothese der Korrelation zwischen Nukleotidsequenz und Substratspezifität konnte für Halogenasen, die an der Biosynthese von Glykopeptiden und Xanthonen beteiligt sind, bestätigt werden. Des Weiteren wurden putative Produzenten von Lipoglykopeptiden, Enediynen, Ansamycinen, Aminocoumarinen und Makroliden identifiziert. Bei den Xanthonen konnte ein Derivat isoliert werden, das im Vergleich zu der bisher bekannten Verbindung über eine zusätzliche Aktivität gegen Gram-negative Bakterien verfügt.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass durch Nutzung der durch das oben beschriebene Suchverfahren identifizierten Enzyme und Biosynthesegencluster in molekularbiologischen Ansätzen, Naturstoffe derivatisiert werden können. Neue Derivate wurden durch Biokatalyse, kombinatorische Biosynthese und die Variation von Fermentationsparametern hergestellt. Zusätzlich konnte durch die Nutzung der „Transposon-Mutagenese“ erfolgreich eine Reihe neuer Xanthonderivate hergestellt werden.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Halogenierte organische Naturstoffe</b>	<b>1</b>
1.1.1	Halogenierte Naturstoffe aus marinen Pflanzen	2
1.1.2	Halogenierte Naturstoffe aus Schwämmen und anderen marinen Tieren	3
1.1.3	Halogenierte Naturstoffe aus marinen Bakterien und Pilzen	4
1.1.4	Halogenierte Naturstoffe aus terrestrischen Pflanzen	4
1.1.5	Halogenierte Naturstoffe aus Pilzen und Flechten	5
1.1.6	Halogenierte Naturstoffe aus Bakterien	5
1.1.7	Halogenierte Naturstoffe aus Insekten	6
1.1.8	Halogenierte Naturstoffe aus höheren Tieren und Menschen	7
<b>1.2</b>	<b>Enzymatische Halogenierung</b>	<b>7</b>
1.2.1	Haloperoxidasen (Häm-Typ)	7
1.2.2	Haloperoxidasen (Vanadium-Typ)	8
1.2.3	Perhydrolasen	9
1.2.4	FADH <sub>2</sub> -Halogenasen	10
1.2.5	Radikalische Halogenierung	13
1.2.6	Methylchlorid-Transferasen	14
1.2.7	Fluorierung	14
<b>1.3</b>	<b>Actinomyceten und ihr Sekundärstoffwechsel</b>	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>19</b>
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2	Chemikalien	20
2.1.3	Mikroorganismen	24
2.1.4	Vektoren	24
2.1.5	Kits für molekularbiologische Arbeiten	25
2.1.6	Enzyme	25
2.1.7	Antibiotika	26
2.1.8	Medien	26
2.1.9	Puffer	27
2.1.10	Primer	28
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
2.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	32
2.2.2	Kultivierung von Actinomyceten	32
2.2.3	Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i>	32
2.2.4	Isolierung von DNA aus Actinomyceten	33
2.2.5	Konzentrierung, Analyse und Reinigung von DNA	33
2.2.5.1	Konzentrierung von DNA	33
2.2.5.2	Agarosegelelektrophorese	33
2.2.5.3	Aufreinigung von DNA	34
2.2.6	<i>In Vitro</i> Rekombination von DNA	34
2.2.6.1	Restriktionsspaltung von DNA	34
2.2.6.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden	34
2.2.6.3	Ligation	35
2.2.6.4	Transposon-Mutagenese	35
2.2.7	Transformation von <i>E. coli</i>	36
2.2.7.1	Elektroporation	36
2.2.7.2	CaCl <sub>2</sub> -Methode	36
2.2.8	Transformation von <i>S. lividans</i> und <i>S. toyocaensis</i>	37
2.2.9	Direkte Transformation von <i>Amycolatopsis balhimycina</i>	37

2.2.10	Konjugation von <i>Streptomyces albus</i>	38
2.2.11	Hemmhofstest mit <i>Bacillus subtilis</i>	39
2.2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.12.1	Kolonie-PCR	40
2.2.12.2	Screening in Mikrotiterplatten (MTP)	41
2.2.12.3	PCR zur Amplifikation spezifischer Polyketidsynthasegene	42
2.2.12.4	PCR-Programme zur Amplifikation vollständiger Halogenasegene	43
2.2.12.5	PCR zur Qualitätskontrolle von isolierter genomischer DNA	44
2.2.13	Herstellung von Cosmid-Genbanken	45
2.2.14	Screening von Cosmid-Genbanken	45
2.2.15	Southern Blot	46
2.2.16	Sequenzierungen und Sequenzanalysen	47
2.2.17	Heterologe Expression von Halogenasegenen in <i>S. lividans</i>	48
2.2.18	Heterologe Expression von Cosmiden in <i>S. albus</i>	49
2.2.19	Heterologe Expression von Halogenasegenen in <i>A. balhimycina</i> und <i>S. toyocaensis</i>	50
2.2.20	Synthese von Monochlordimedon	50
2.2.21	HPLC-DAD-ESI-MS	51
2.2.22	Enzymaktivitätstests	52
2.2.22.1	Enzymtest zum Nachweis der Aktivität von Perhydrolasen	52
2.2.22.2	Enzymtest zum Nachweis der Aktivität von FADH <sub>2</sub> -Halogenasen	53
2.2.23	Chemisches Screening nach halogenierten Naturstoffen	53
2.2.24	Substanzaufreinigung und Strukturaufklärung	54
2.2.24.1	Aufreinigung von Sekundärmetaboliten	54
2.2.24.2	Strukturaufklärung	55
2.2.25	Isolierung von Naphthomevalin aus dem Stamm CB2365	56
2.2.26	Isolierung von CBS40 und Dechlor-CBS40	56
2.2.27	Isolierung von MM 47761 aus dem Stamm CB2364	57

### **3 ERGEBNISSE** **58**

#### **3.1 Perhydrolasen** **58**

3.1.1	Identifizierung neuer Perhydrolasen	58
3.1.2	Phenolrot als Substrat für Perhydrolasen	60

#### **3.2 Tryptophan-/Indol-Halogenasen** **62**

3.2.1	Identifizierung neuer Tryptophan-/Indol-Halogenasen	62
3.2.2	L-Tryptophan als Substrat für Tryptophan-/Indol-Halogenasen	65

#### **3.3 Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen** **70**

3.3.1	Identifizierung neuer Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen	71
3.3.2	Glykopeptid-Antibiotika	76
3.3.3	Xanthon-Antibiotika	81
3.3.3.1	PCR-basiertes Screening nach neuen Xanthon-Antibiotika-Produzenten	81
3.3.3.2	Sequenzanalyse	84
3.3.3.3	Strukturaufklärung von CBS40 und Aktivitätstests	85
3.3.4	Lipoglykodesipeptide	87
3.3.5	Naphthoquinone	88

#### **3.4 Derivatisierung von Naturstoffen** **91**

3.4.1	Lysolipin-Derivate	91
3.4.1.1	Naturstoffderivatisierung mittels Transposon-Mutagenese	91
3.4.1.2	Naturstoffderivatisierung (Fermentationsbedingungen)	94
3.4.2	Naturstoffderivatisierung mittels kombinatorischer Biosynthese	95
3.4.2.1	Derivatisierung von Balhimycin	96
3.4.2.2	Derivatisierung von A47934	98

### **4 DISKUSSION** **101**

#### **4.1 Halogenasen für biokatalytische Anwendungen** **103**

4.1.1	Perhydrolasen	103
4.1.2	Tryptophan-/Indol-Halogenasen	106

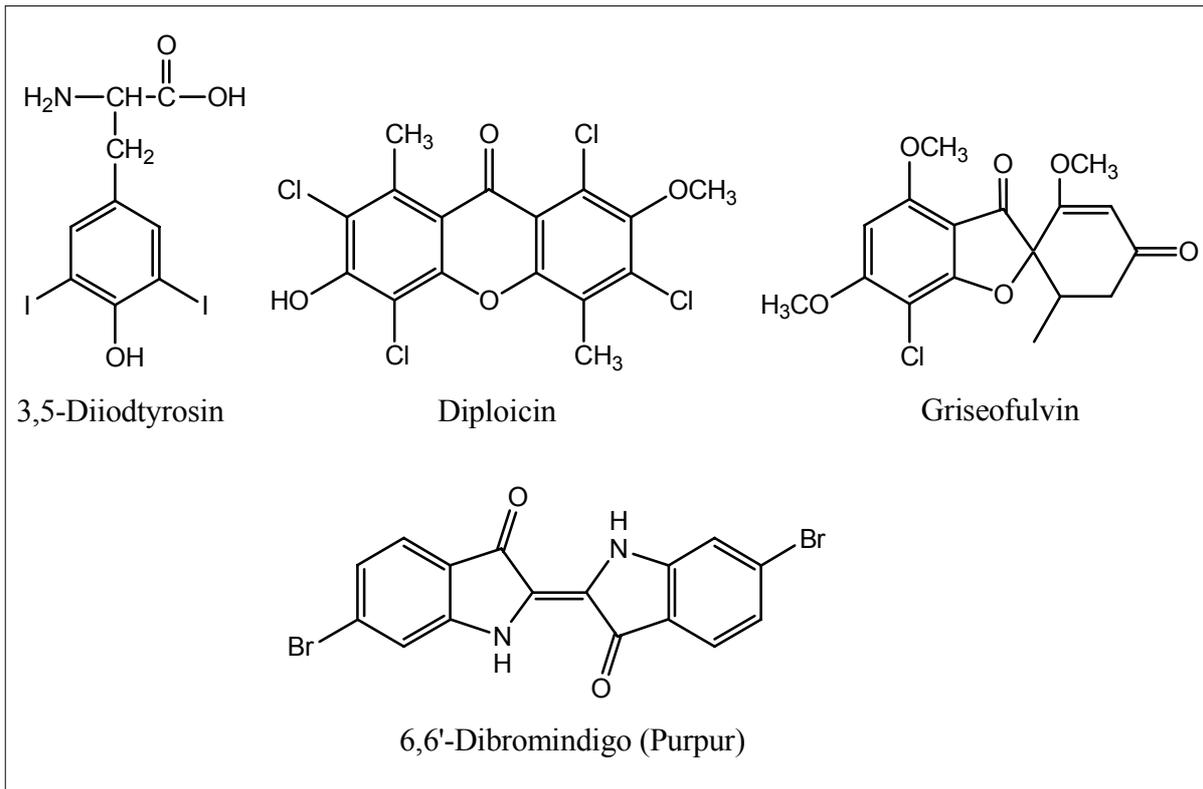
4.1.3	Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen	109
<b>4.2</b>	<b>Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen als genetische Marker</b>	<b>111</b>
4.2.1	Die Substanzklasse der Glykopeptid-Antibiotika	112
4.2.1.1	Derivatisierung von Balhimycin und A47934	113
4.2.2	Die Substanzklasse der Xanthone	115
4.2.2.1	Biosynthese, Wirkmechanismus und Derivatisierung von Lysolipin und CBS40	116
4.2.3	Die Substanzklasse der Naphthoquinone	120
<b>4.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>121</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>122</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Halogenierte organische Naturstoffe

Organische Halogenverbindungen existieren schon seit Jahrtausenden auf der Erde. Sie werden entweder von lebenden Organismen oder durch thermische Prozesse wie z.B. vulkanische Tätigkeiten und Waldbrände produziert (GRIBBLE, 2003). Die erste organische halogenierte Substanz, 3,5-Diodtyrosin (Abb. 1), wurde 1896 aus der Koralle *Gorgonia cavolinii* isoliert (DRECHSEL, 1896). 1904 wurde Diploicin (Abb. 1) als der erste halogenierte Naturstoff aus Mikroorganismen identifiziert (ZOPF, 1904). Der Darmstädter Professor P. Friedländer konnte 1909 aus 12.000 Purpurschnecken (*Muricidae*) 1,4 Gramm des schon in der Antike bekannten Farbstoffes Purpur isolieren und dessen Struktur (Abb. 1) bestimmen (MELZER et al., 2001). Zu den ersten entdeckten chlorierten Naturstoffen mit antibiotischer Wirkung gehören Griseofulvin (Abb. 1) aus *Penicillium griseofulvum* (OXFORD et al., 1939), Chloramphenicol aus *Streptomyces venezuelae* (EHRlich et al., 1947) und Chlortetracyclin aus *Streptomyces aureofaciens* (DUGGAR, 1948).

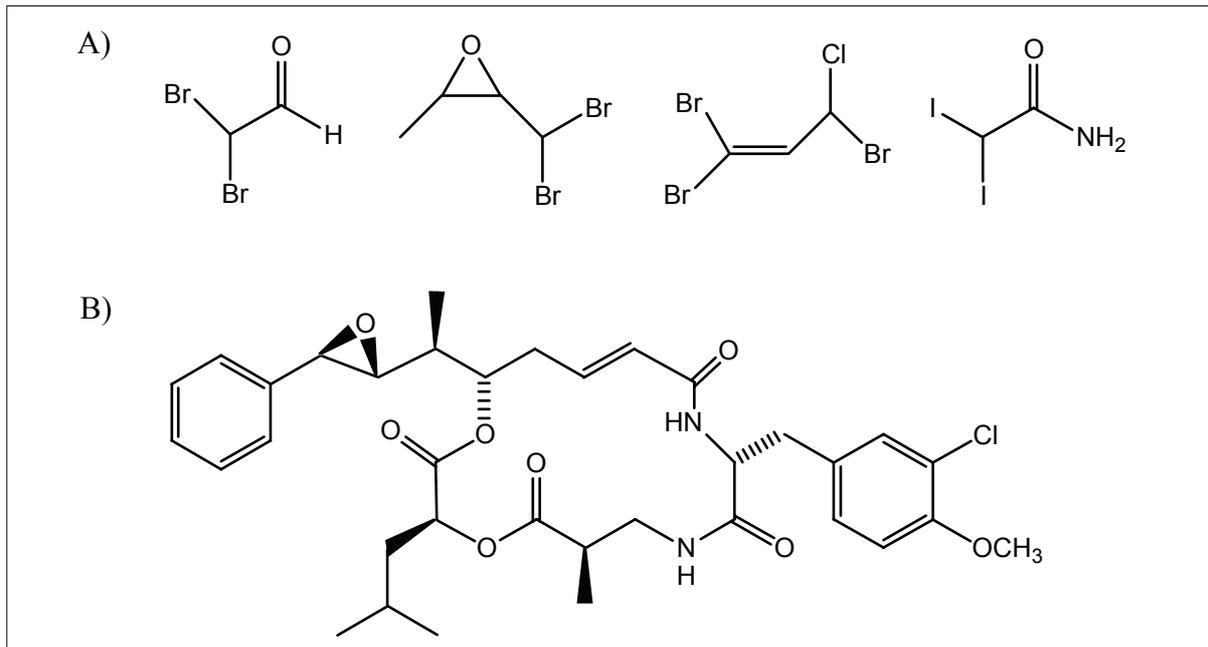
Bis 1961 wurden lediglich 29 halogenierte Naturstoffe, die sogenannten Halometabolite, identifiziert, darunter acht Verbindungen, die aus Bakterien stammen (PETTY, 1961). Inzwischen ist die Zahl der bekannten halogenierten Naturstoffe jedoch auf über 3800 angestiegen (GRIBBLE, 2003). Diese Entwicklung ist durch empfindlichere Meßmethoden, vor allem aber auch durch die intensive Suche der pharmazeutischen Industrie nach potentiellen Wirkstoffen zu erklären. Die meisten chlorierten Verbindungen (2200) werden von terrestrischen Organismen produziert, wohingegen im Meer aufgrund des relativ hohen Bromidgehaltes vermehrt bromierte Substanzen identifiziert wurden (1950). Der Anteil an iodierten Naturstoffen ist mit 95 sehr gering, genauso wie nur 100 fluoridierte Metabolite bekannt sind, trotz des für Organismen zur Verfügung stehenden Fluoridgehaltes im Boden, der höher ist als der Bromid- oder Iodidgehalt (GRIBBLE, 2003).



**Abb. 1:** Beispiele der ersten entdeckten halogenierten organischen Naturstoffe.

### 1.1.1 Halogenierte Naturstoffe aus marinen Pflanzen

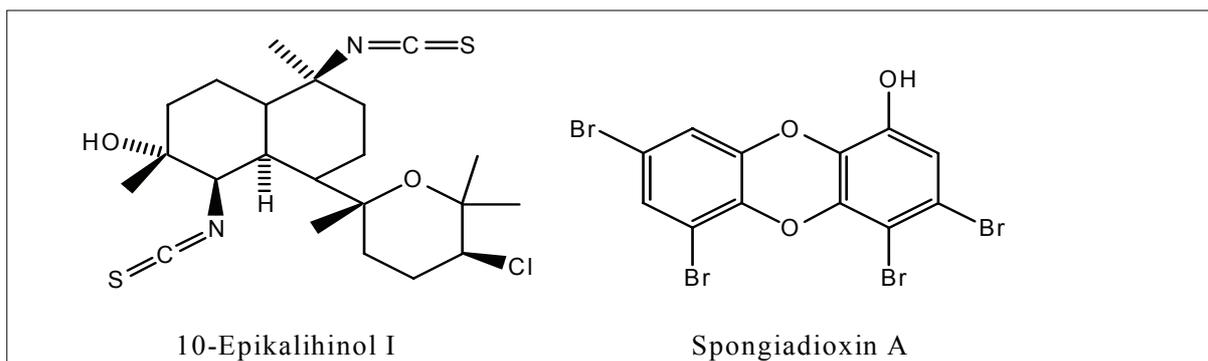
Seegräser synthetisieren eine Vielzahl an einfachen aber auch komplexeren halogenierten organischen Verbindungen. Phytoplankton produziert in Laborkulturen Chlormethan, Brommethan und Iodmethan (SCARRATT & MOORE, 1996). Das essbare und bei den Hawaiianern beliebte Seegras „limu koku“ (*Asparagopsis taxiformis*) enthält mehr als 100 halogenierte organische Substanzen (Abb. 2A), mit Bromoform als Hauptbestandteil (MCCONNELL & FENICAL, 1977 und MOORE, 1977). Die Rotalge *Laurencia* bildet verschiedenste halogenierte Terpene und andere komplexe Strukturen. Cyanobakterien, die auch als Blaugrünalgen bezeichnet werden, sind eine Quelle von biologisch hochaktiven Substanzen, wie z.B. Cryptophycin A, welches Antitumor-Wirkung besitzt (Abb. 2B). Ebenso werden von Cyanobakterien aber auch Toxine produziert, die bei der Trinkwasserbereitung beachtet werden müssen.



**Abb. 2:** A) Beispiele einiger Verbindungen, die von dem Seegrass *Asparagopsis taxiformis* produziert werden. B) *Cryptophycin A* aus Cyanobakterien.

### 1.1.2 Halogenierte Naturstoffe aus Schwämmen und anderen marinen Tieren

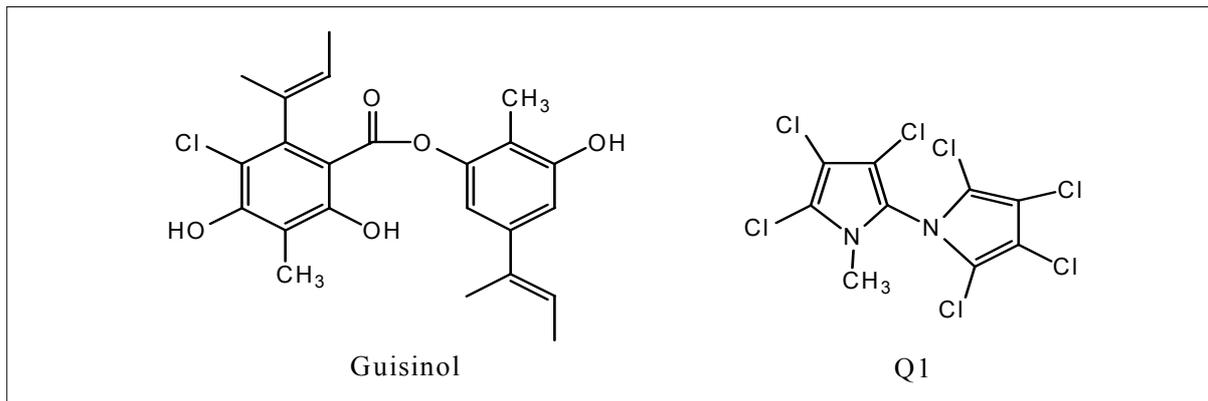
Schwämme sind ebenfalls dafür bekannt, diverse halogenierte Naturstoffe zu produzieren. Oft sind jedoch nicht die Schwämme selbst die Produzenten, sondern die mit ihnen in Symbiose lebenden Mikroorganismen. Einige kürzlich entdeckte Verbindungen sind in Abb. 3 dargestellt. Marine Bryozoen (Moostierchen) sind seit der Entdeckung der allerdings nicht halogenierten Bryostatine (PETTIT, 1991) aus *Bugula neritina* aufgrund ihrer antineoplastischen Eigenschaften von großem Interesse. Aus anderen Bryozoen wurden inzwischen aber auch viele bromierte Alkaloide isoliert. Weitere marine Organismen, in denen halogenierte Naturstoffe gefunden wurden, sind Korallen, Schnecken und Würmer.



**Abb. 3:** Halogenierte Sekundärmetabolite, die von Schwämmen produziert werden.

### 1.1.3 Halogenierte Naturstoffe aus marinen Bakterien und Pilzen

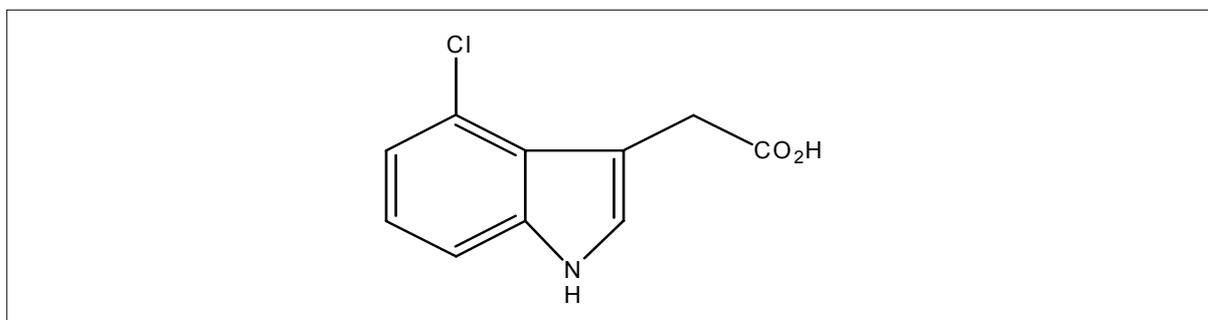
In marinen Bakterien und Pilzen wurden z.B. die in Abb. 4 dargestellten Substanzen gefunden. Stoffe, wie das Bipyrrrol Q1, welches von marinen Bakterien produziert wird, sind die ersten halogenierten organischen Verbindungen, bei denen eine Bioakkumulation beobachtet wurde. In der Muttermilch von Eskimofrauen, die sich von Walspeck ernährt haben, konnte Q1 nachgewiesen werden (VETTER et al., 2000).



**Abb. 4:** Von marinen Bakterien und Pilzen produzierte Substanzen. Q1 konnte in der Muttermilch von Eskimofrauen nachgewiesen werden, die diese Verbindung über die Nahrung aufgenommen haben.

### 1.1.4 Halogenierte Naturstoffe aus terrestrischen Pflanzen

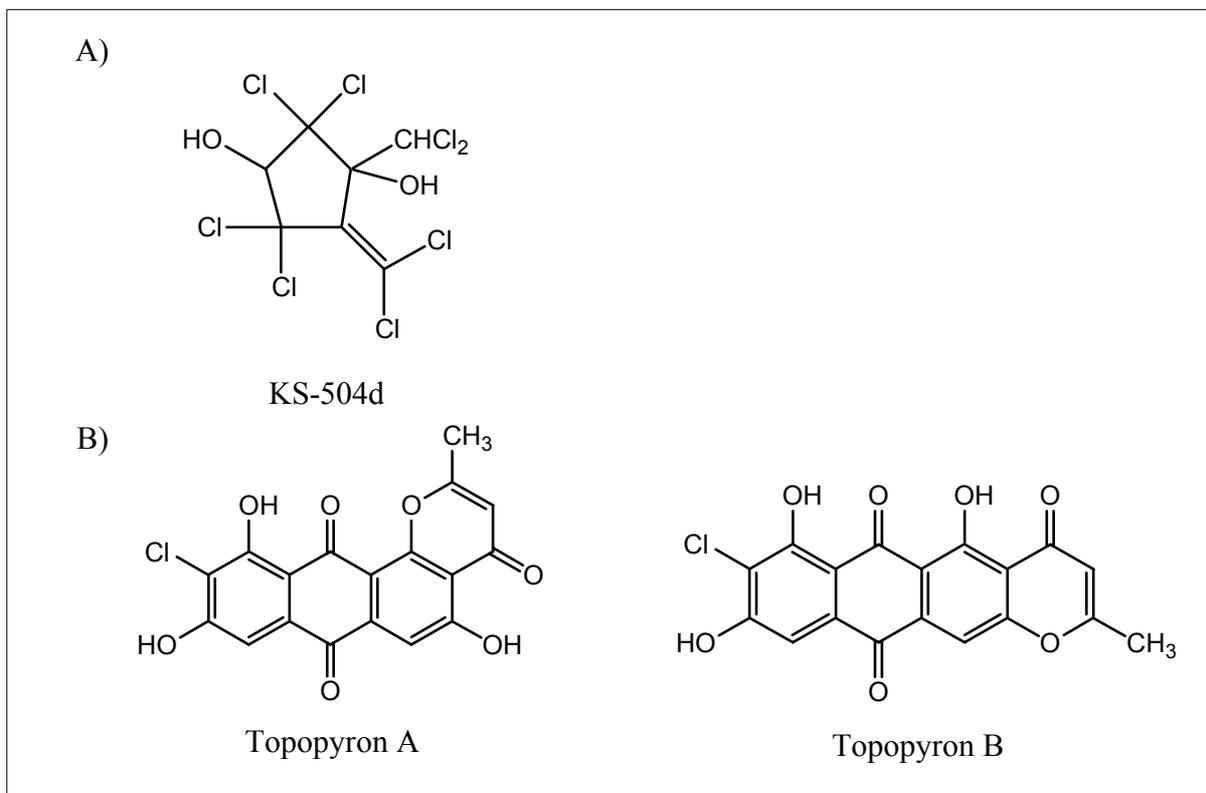
Im Vergleich zu marinen Pflanzen ist die Vielfalt an halogenierten organischen Verbindungen in terrestrischen Pflanzen gering. Einige Verbindungen sind dennoch bekannt. Das pflanzliche Wachstumshormon 4-Chlorindol-3-essigsäure (Abb. 5) wird z.B. von Hülsenfrüchten synthetisiert. Die weltweite Produktion an Brommethan durch Kohl wird jährlich auf mehrere hundert Tonnen geschätzt.



**Abb. 5:** Das von Pflanzen produzierte Wachstumshormon 4-Chlorindol-3-essigsäure.

### 1.1.5 Halogenierte Naturstoffe aus Pilzen und Flechten

Pilze und Flechten produzieren eine große Vielzahl an organischen Halogenverbindungen von einfachen Substanzen wie Chloroform oder Chlormethan bis hin zu hochkomplexen Molekülen. Der Pilz *Mollisia ventosa* bildet verschiedene Calmodulin-Inhibitoren wie z.B. KS-504d (Abb. 6), das zu 70% aus Chlorid besteht (NAKANISHI et al., 1989). Calmodulin ist ein Protein, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt und eine Schlüsselfunktion in der Stoffwechselregulation einnimmt. Andere isolierte Verbindungen sind die Topoisomerase-Inhibitoren Topopyron A und B (ISHIYAMA et al., 2000 und KANAI et al., 2000).

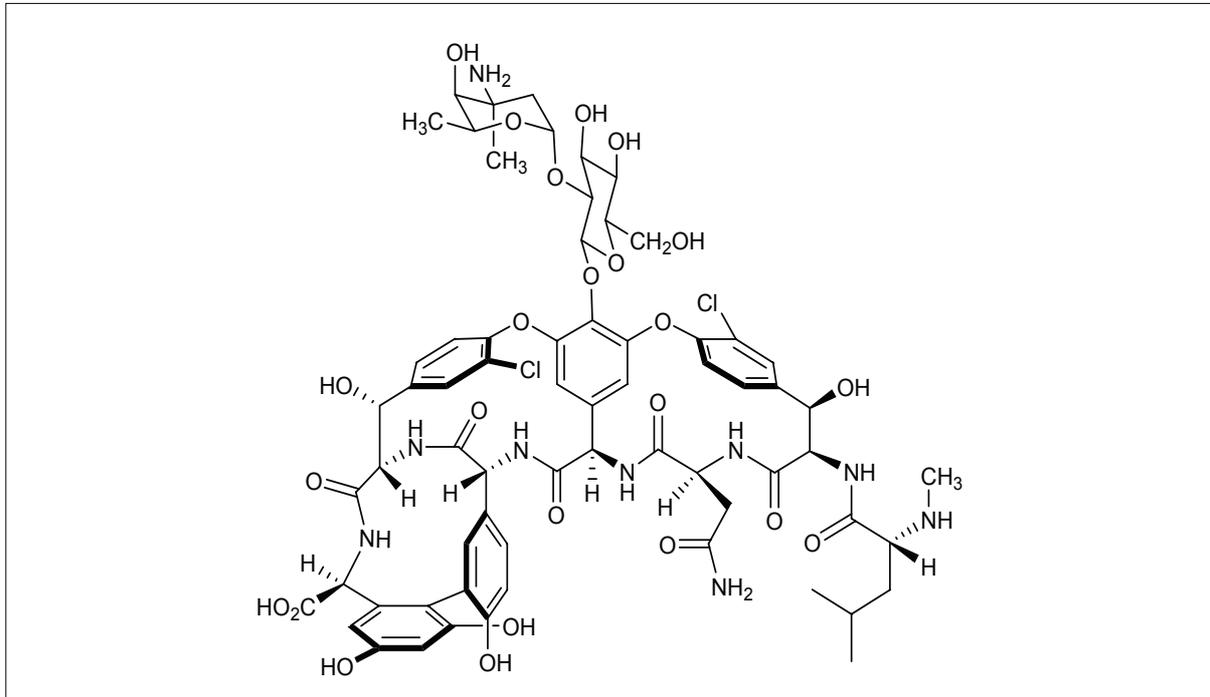


**Abb. 6:** A) Der von *Mollisia ventosa* produzierte Calmodulin-Inhibitor KS-504d. B) Die Topoisomerase-Inhibitoren Topopyron A und B aus dem Pilz *Phoma* sp.

### 1.1.6 Halogenierte Naturstoffe aus Bakterien

Bakterien produzieren eine riesige Anzahl an halogenierten Metaboliten von enormer Komplexität. Bisher sind alleine mehr als 50 *Streptomyces* Spezies bekannt, die diese Substanzen synthetisieren. Das Bakterium *Amycolatopsis orientalis* stellt das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin (Abb. 7) her, das schon seit fast 50 Jahren u.a. zur Behandlung von Penicillin-resistenten Infektionen eingesetzt wird (WILLIAMS,

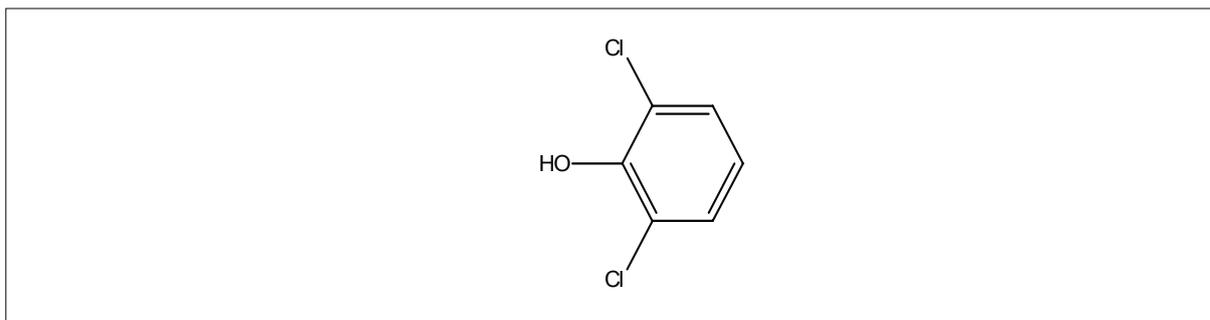
1996). Beide Chloratome in Vancomycin sind essenziell für seine optimale biologische Aktivität (HARRIS et al., 1985).



**Abb. 7:** Vancomycin aus *Amycolatopsis orientalis*.

### 1.1.7 Halogenierte Naturstoffe aus Insekten

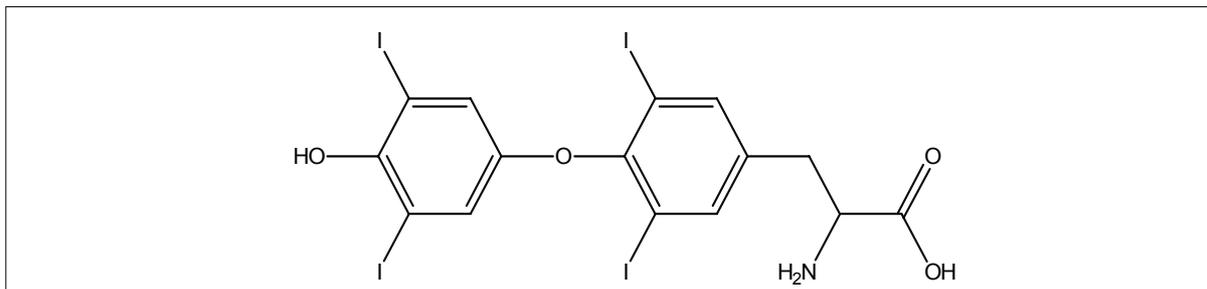
Es ist bekannt, dass Insekten verschiedene Verbindungen zur Kommunikation und Verteidigung benutzen. Allerdings sind nur wenige davon halogeniert. Eine Ausnahme ist das Pheromon 2,6-Dichlorphenol (Abb. 8), welches von mindestens einem Dutzend Zeckenarten produziert wird (BERGER, 1983). Die deutsche Küchenschabe verwendet zwei chlorierte Steroide als Pheromone und australische Termiten produzieren große Mengen an Chloroform.



**Abb. 8:** Von Zecken als Pheromon produziertes 2,6-Dichlorphenol.

### 1.1.8 Halogenierte Naturstoffe aus höheren Tieren und Menschen

In Tieren und Menschen sind organische Halogenverbindungen ebenfalls selten, dennoch sind einige entdeckt worden. Die bekannteste Substanz ist das Schilddrüsenhormon Thyroxin (Abb. 9). Andere chlorierte Verbindungen wurden als Reaktionsprodukte von weißen Blutkörperchen während Krankheitsprozessen beobachtet. Dabei werden Chlorphenole zu chlorierten Dioxinen und Dibenzofuranen umgesetzt (WITTSIEPE et al., 2000).



**Abb. 9:** Das Schilddrüsenhormon Thyroxin.

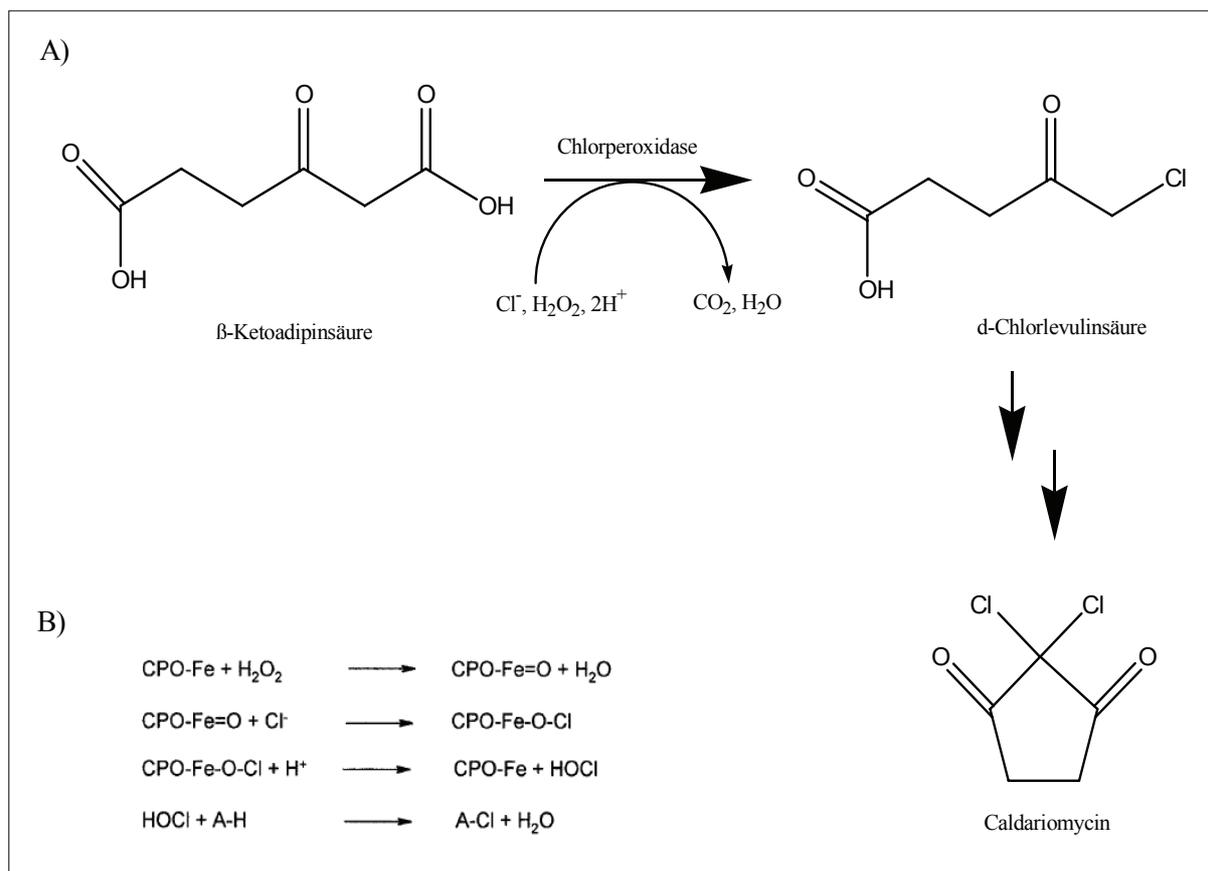
## 1.2 Enzymatische Halogenierung

Im Gegensatz zu den über 3800 bekannten organischen Halogenverbindungen weiß man wenig über die Enzyme, die diese Verbindungen synthetisieren. Bei Laborsynthesen werden drei Halogenierungsmechanismen genutzt: ein elektrophiler, radikalischer und nukleophiler (HARTUNG, 1999). Verschiedene Halogenasen, d.h. Enzyme, die die biologische Halogenierung katalysieren, sind inzwischen auch entdeckt und Untersuchungen zu den natürlichen Substraten bzw. den Reaktionsmechanismen durchgeführt worden.

### 1.2.1 Haloperoxidasen (Häm-Typ)

Das erste halogenierende Enzym wurde 1959 von SHAW & HAGER entdeckt. Bei Untersuchungen zur Biosynthese des Antibiotikums Caldariomycin aus dem Pilz *Caldariomyces fumago* wurde ein Enzym nachgewiesen, das die Chlorierung von  $\beta$ -Keto adipinsäure zu  $\delta$ -Chlorlevulinsäure katalysieren kann (Abb. 10A). Da für die Reaktion Chlorid und Wasserstoffperoxid benötigt werden, wurde es als Chlorperoxidase bezeichnet. Untersuchungen von gereinigtem Enzym zeigten, dass als prosthetische Gruppe ein Eisenprotoporphyrin IX vorhanden war (MORRIS & HAGER, 1966). Bis heute ist nicht bewiesen, dass dieses extrazelluläre Enzym

wirklich an der Biosynthese von Caldariomycin beteiligt ist, da diese intrazellulär erfolgt und Haloperoxidasen weder regioselektiv noch substratspezifisch sind (VAN PÉE, 2001). In den folgenden Jahren wurden etliche weitere Haloperoxidasen isoliert, die organische Substrate bromieren, chlorieren und iodieren konnten. Genauere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus wurden von SUNDARAMOORTHY et al., 1998 mittels Kristallographieexperimenten durchgeführt. Ein vereinfachtes Reaktionsschema ist in Abb. 10B dargestellt. Mechanistisch entspricht der Reaktionsmechanismus der Haloperoxidasen einer elektrophilen Substitution (HARTUNG, 1999).

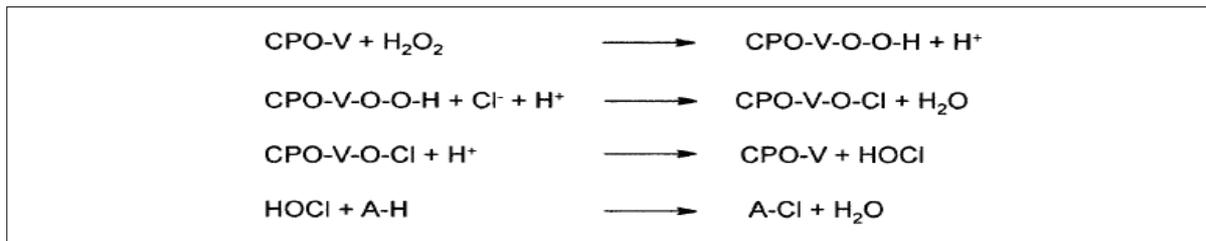


**Abb. 10:** A) Biosyntheseweg des von *Caldariomyces fumago* produzierten Antibiotikums Caldariomycin. B) Reaktionsschema der Haloperoxidasen (Häm-Typ) aus der Publikation von VAN PÉE, 2001.

### 1.2.2 Haloperoxidasen (Vanadium-Typ)

Eine weitere Klasse von Haloperoxidasen wurde 1984 in der Alge *Ascophyllum nodosum* entdeckt (VILTER, 1984). Statt Häm als prosthetische Gruppe, enthalten die in Algen, Flechten und Pilzen vorkommenden Haloperoxidasen Vanadium (V). Kinetische Untersuchungen sowie die Strukturaufklärung der Chlorperoxidase aus

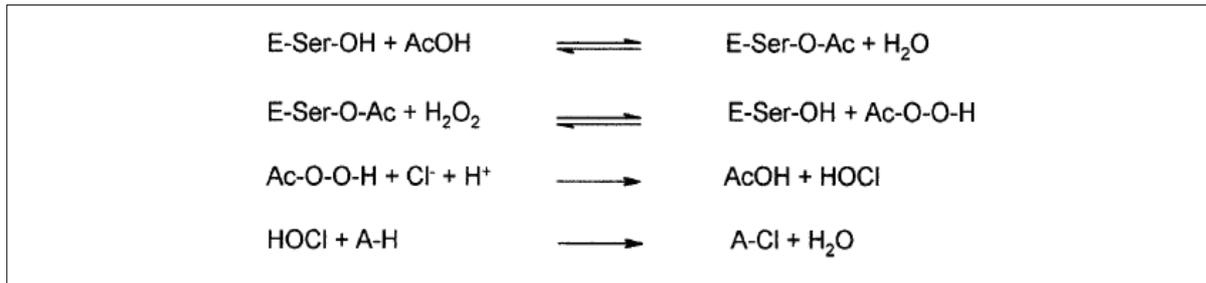
dem Pilz *Curvularia inaequalis* führten zu einem Vorschlag des Reaktionsmechanismus (MESSERSCHMIDT et al., 1997). Das vereinfachte Schema in Abb. 11 ist aus der Publikation von VAN PÉE, 2001 entnommen. Wie Häm-Haloperoxidasen zeigen die Vanadium-Haloperoxidasen weder Substratspezifität noch Regioselektivität. Der Grund hierfür könnte sein, dass das organische Substrat nicht gebunden wird, sondern die durch das Enzym gebildete freie hypochlorige Säure (HOCl) das eigentliche chlorierende Agens ist.



**Abb. 11:** Reaktionsschema der Haloperoxidasen (Vanadium-Typ) aus der Publikation von VAN PÉE, 2001.

### 1.2.3 Perhydrolasen

VAN PÉE et al., 1987 isolierten zum ersten Mal eine Haloperoxidase aus Bakterien. Dabei handelte es sich um eine Bromperoxidase aus dem 7-Chlortetracyclin-Produzenten *Streptomyces aureofaciens* Tü24. Untersuchungen zeigten, dass dieses Enzym keine weitere prosthetische Gruppe besaß. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Haloperoxidasen, die Halogenidionen mithilfe von Wasserstoffperoxid direkt oxidieren, wird hier zuerst mittels Wasserstoffperoxid eine Persäure gebildet, die dann das Halogenidion zur, als halogenierendes Agens fungierenden, hypochlorigen Säure oxidiert (PICARD et al., 1997). Dieser Reaktionsmechanismus ist in Abb. 12 abgebildet (VAN PÉE, 2001). Die dreidimensionale Struktur dieser Enzyme zeigte eine katalytische Triade, bestehend aus einem Serin, Aspartat und Histidin (HECHT et al., 1994), was vermuten ließ, dass sie zur Familie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen gehören und deshalb später als Perhydrolasen bezeichnet wurden.



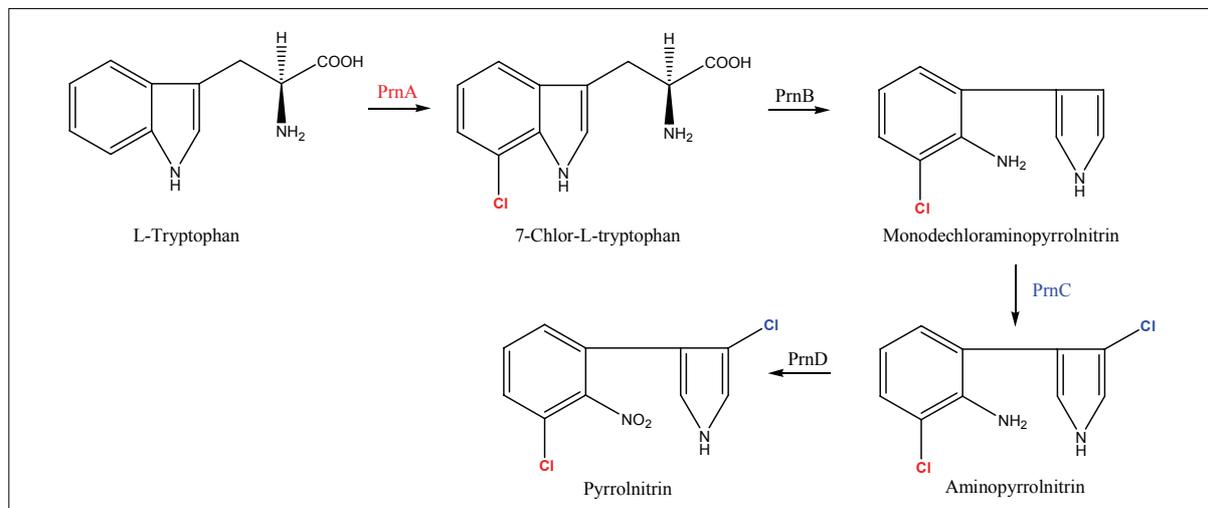
**Abb. 12:** Reaktionsschema der Perhydrolasen aus der Publikation von VAN PÉE, 2001.

### 1.2.4 FADH<sub>2</sub>-Halogenasen

Für alle drei bisher beschriebenen Klassen von Halogenasen konnte bis jetzt noch keine Beteiligung an der Biosynthese von halogenierten Sekundärmetaboliten nachgewiesen werden, was aufgrund des Reaktionsmechanismus und der damit zwangsläufig nicht vorhandenen Substratspezifität auch verwunderlich wäre. Über die natürliche Funktion dieser Enzyme ist bisher fast nichts bekannt. Ergebnisse über die physiologische Funktion einer bifunktionellen Perhydrolase, die die Hydrolyse von Esterbindungen und die Bromierung von organischen Verbindungen katalysieren kann, lassen vermuten, dass sie zusammen mit einer Katalase Persäuren abbaut (HONDA et al., 2003).

Den Beweis für die Existenz einer weiteren Klasse an halogenierenden Enzymen lieferten DAIRI et al., 1995. Diese Forschergruppe klonierte das Gencluster für die Biosynthese von 7-Chlortetracyclin und identifizierte das für die Chlorierung benötigte Enzym durch Komplementierungsexperimente. Die Aminosäuresequenz wies weder zu bisher bekannten Haloperoxidasen noch zu Perhydrolasen eine Ähnlichkeit auf. Arbeiten an der Biosynthese des Antibiotikums Pyrrolnitrin, produziert von verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen, bestätigten dieses Ergebnis (KIRNER et al., 1996 und HAMMER et al., 1997). Biochemische Untersuchungen zeigten, dass zwei der vier Gene des Biosynthesegenclusters halogenierende Enzyme kodieren, die sich gegenseitig nicht substituieren konnten. Die erste Halogenierungsreaktion ist die regioselektive Chlorierung von L-Tryptophan zu 7-Chlor-L-tryptophan durch die Halogenase PrnA. Die zweite Halogenase, PrnC, katalysiert die Chlorierung von Monodechloraminopyrrolnitrin zu Aminopyrrolnitrin (KIRNER et al., 1998). Erstaunlicherweise zeigten ihre Aminosäuresequenzen keine Ähnlichkeiten. PrnC dagegen

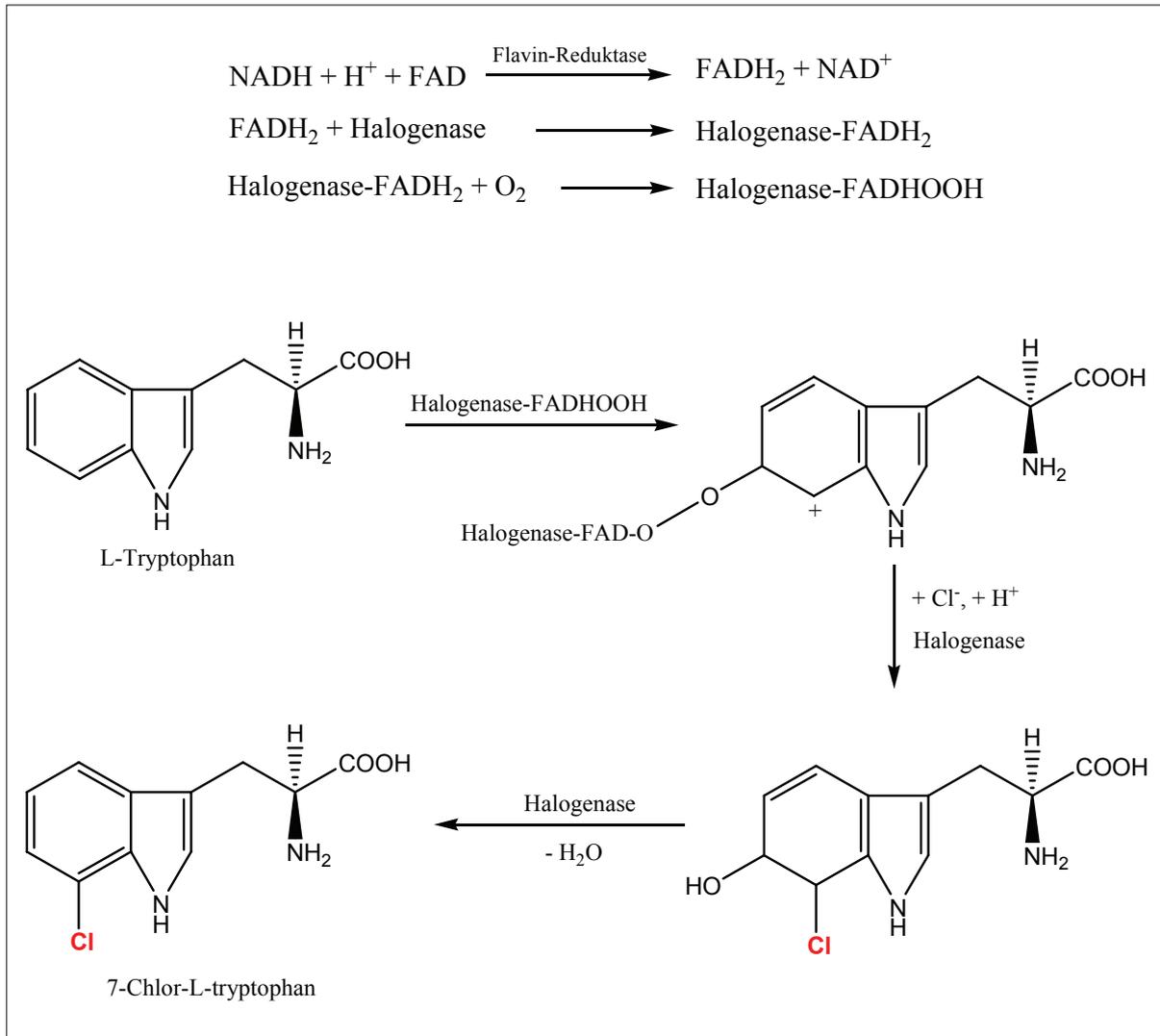
war homolog zu der Halogenase aus dem 7-Chlortetracyclin-Biosynthesegencluster. In Abb. 13 ist die Biosynthese von Pyrrolnitrin dargestellt.



**Abb. 13:** Biosyntheseweg von Pyrrolnitrin.

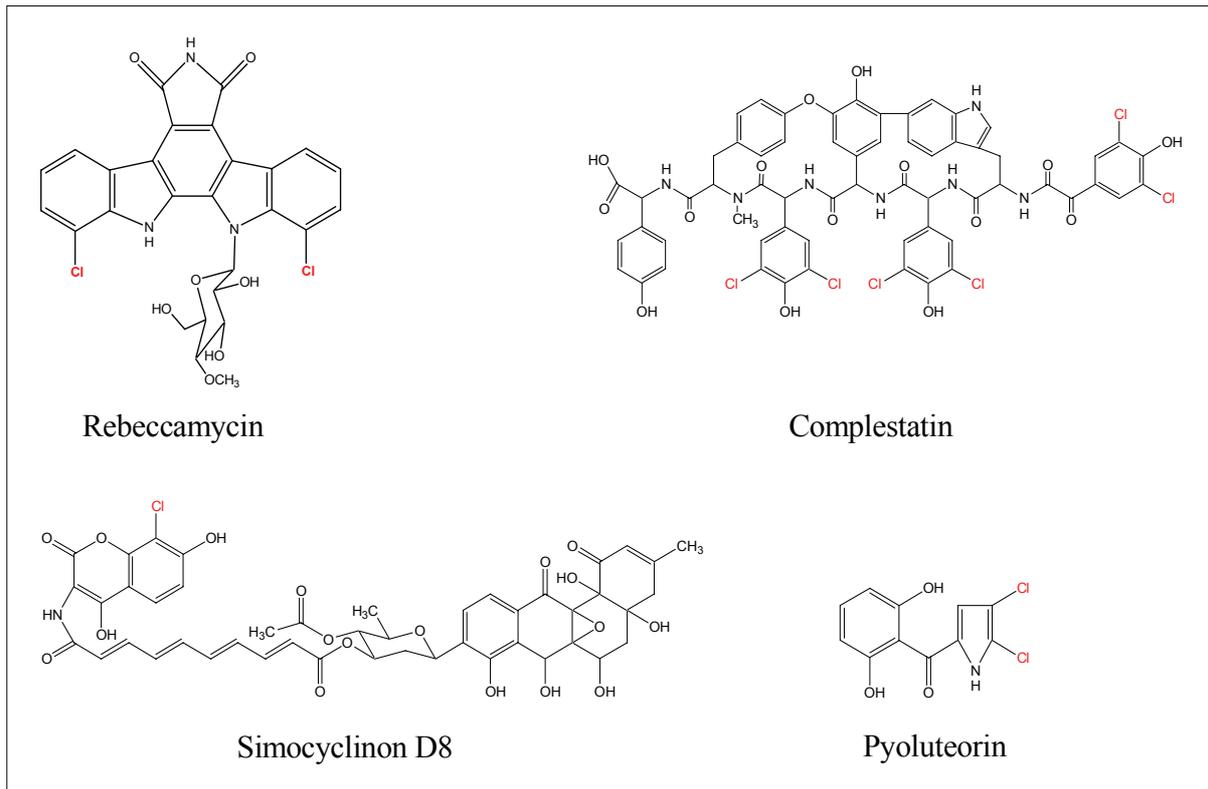
Weitere identifizierte Halogenasen dieser Klasse ermöglichten eine Einteilung nach ihrer Substratspezifität. Man kann demnach zwischen Halogenasen, die Tryptophan-/Indol-Derivate (PrnA), bzw. Phenyl-/Pyrrol-Derivate (PrnC) chlorieren, unterscheiden.

Diese Halogenaseklasse zeigte die postulierte Substratspezifität. Aktivitätsuntersuchungen ergaben, dass diese Enzyme NADH und FAD als Kofaktoren benötigen. Bei Aufreinigungsversuchen stellte sich heraus, dass für die Halogenierung zusätzlich noch eine unspezifische NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase vorhanden sein muss, die FAD mithilfe von NADH zu FADH<sub>2</sub> reduziert (HOHAUS et al., 1997, KELLER et al., 2000, VAN PÉE et al., 2000 und HÖLZER et al., 2001). Sequenzierungen der bisher gefundenen FADH<sub>2</sub>-Halogenasen ergaben, dass alle das für die Bindung des Kofaktors benötigte Motiv GxGxxG (SCRUTTON et al., 1990) besitzen. Zusätzlich wurden zwei konservierte Tryptophanreste identifiziert, die in Analogie zu Dehalogenasen an der Bindung der Halogenide beteiligt sein könnten. (VAN PÉE & UNVERSUCHT, 2003). Der postulierte nukleophile Reaktionsmechanismus ist in Abb. 14 dargestellt.



**Abb. 14:** Postulierter Reaktionsmechanismus der  $\text{FADH}_2$ -Halogenasen am Beispiel von Tryptophan.  $\text{FAD}$  wird von einer Oxidoreduktase zu  $\text{FADH}_2$  reduziert und bildet in Gegenwart von Sauerstoff einen  $\text{FADHOOH}$ -Enzymkomplex. Das organische Substrat kann dann an einer Doppelbindung aktiviert werden. Unter Wasserabspaltung erfolgt anschließend der nukleophile Angriff des Halogenids.

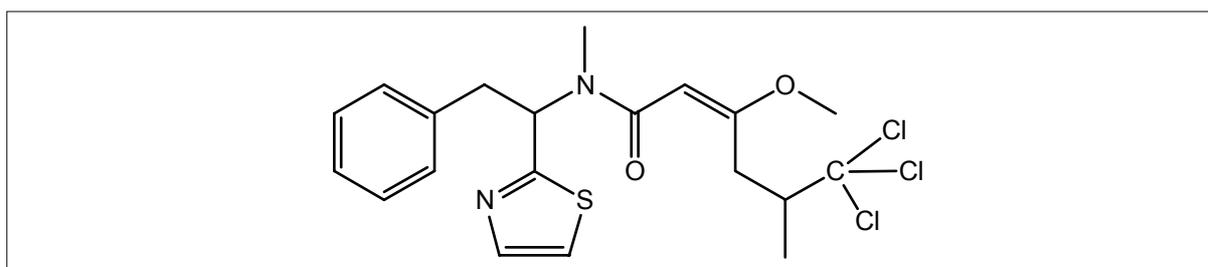
In weiteren Arbeiten wurden Halogenasen in Biosynthesegenclustern mit Homologie sowohl zu PrnA als auch zu PrnC identifiziert. Ein Beispiel einer Tryptophan-/Indol-Halogenase ist RebH aus dem für die Antitumor-Substanz Rebeccamycin (Abb. 15) kodierenden Biosynthesegencluster (SÁNCHEZ et al., 2002). Verbindungen wie Complestatin (CHIU et al., 2001), Simocyclinon (TREFZER et al., 2002 und GALM et al., 2002) oder Pyoluterorin (NOWAK-THOMPSON et al., 1999) werden von Genclustern kodiert, die Halogenasen mit Homologie zu Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen enthalten (Abb. 15).



**Abb. 15:** Beispiele einiger chlorierter Verbindungen, bei denen das Halogenid von Tryptophan-/Indol-Halogenasen (Rebeccamycin) oder Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen angefügt wird.

### 1.2.5 Radikalische Halogenierung

Während der Biosynthese von Barbamid, produziert vom Cyanobakterium *Lyngbya majuscula*, existiert keine Doppelbindung, die für den Halogenierungsmechanismus von FADH<sub>2</sub>-Halogenasen notwendig ist. Barbamid wird aus L-Cystein, L-Phenylalanin, S-Adenosylmethionin, Acetat und einem dreifachchloriertem L-Leucin aufgebaut (Abb. 16). Bei dieser Chlorierung wird ein radikalischer Halogenierungsmechanismus diskutiert (HARTUNG, 1999 und CHANG et al., 2002).



**Abb. 16:** Barbamid aus *Lyngbya majuscula*.

### 1.2.6 Methylchlorid-Transferasen

Atmosphärisches Methylchlorid wird vermutlich von Methylchlorid-Transferasen produziert. Eine Methylgruppe, die von S-Adenosyl-L-methionin (SAM) stammt, wird auf ein Halogenid übertragen. Diese Enzyme wurden in Pilzen, Algen und Pflanzen von WUOSMAA & HAGER, 1990 entdeckt. Das Gen einer Methylchlorid-Transferase aus einer Pflanze wurde heterolog in *E. coli* exprimiert, und es konnte *in vivo* die Bildung von Methylchlorid nachgewiesen werden (NI & HAGER, 1998 und NI & HAGER, 1999).

### 1.2.7 Fluorierung

Obwohl Fluor ein häufig vorkommendes Element ist, allerdings oft in einer unlöslichen Form, sind nur wenige fluorierte Metabolite bekannt. Aufgrund des hohen Redoxpotentials von Fluor ist eine Fluorierung mittels elektrophilem oder radikalischem Reaktionsmechanismus ausgeschlossen (ZECHEL et al., 2001). Erste fluorierende Enzyme waren Mutanten der  $\beta$ -Glucosidase (*Abg*) aus *Agrobacterium* sp. und der  $\beta$ -Mannosidase (*Man2A*) aus *Cellulomonas fimi*, bei denen die nukleophile Glutaminsäure im aktiven Zentrum durch Alanin, Glycin oder Serin ersetzt wurde. Der dadurch entstehende Aktivitätsverlust konnte in zellfreien Extrakten in Gegenwart von Fluorid, welches das fehlende Nukleophil im katalytischen Zentrum ersetzt, wieder hergestellt werden. Die *Man2A*-Mutante konnte auf diese Weise  $\beta$ -D-Mannosyl-Fluorid bilden (ZECHEL et al., 2001).

Fluoracetat und 4-Fluorthreonin sind von *Streptomyces cattleya* produzierte Sekundärmetaboliten. Das die Fluorierung katalysierende Enzym konnte identifiziert und in zellfreien Extrakten dessen Aktivität nachgewiesen werden (SCHAFFRATH et al., 2002 und O'HAGAN et al., 2002). Die Fluorinase bildet aus Fluorid und S-Adenosylmethionin (SAM), unter Abspaltung von L-Methionin, 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin (5'-FDA). Dabei handelt es sich um einen nukleophilen Angriff des Fluoridions am C-5' von SAM (DONG et al., 2004). 5'-FDA wird weiter zu Fluoracetat und 4-Fluorthreonin verstoffwechselt (Abb. 17).

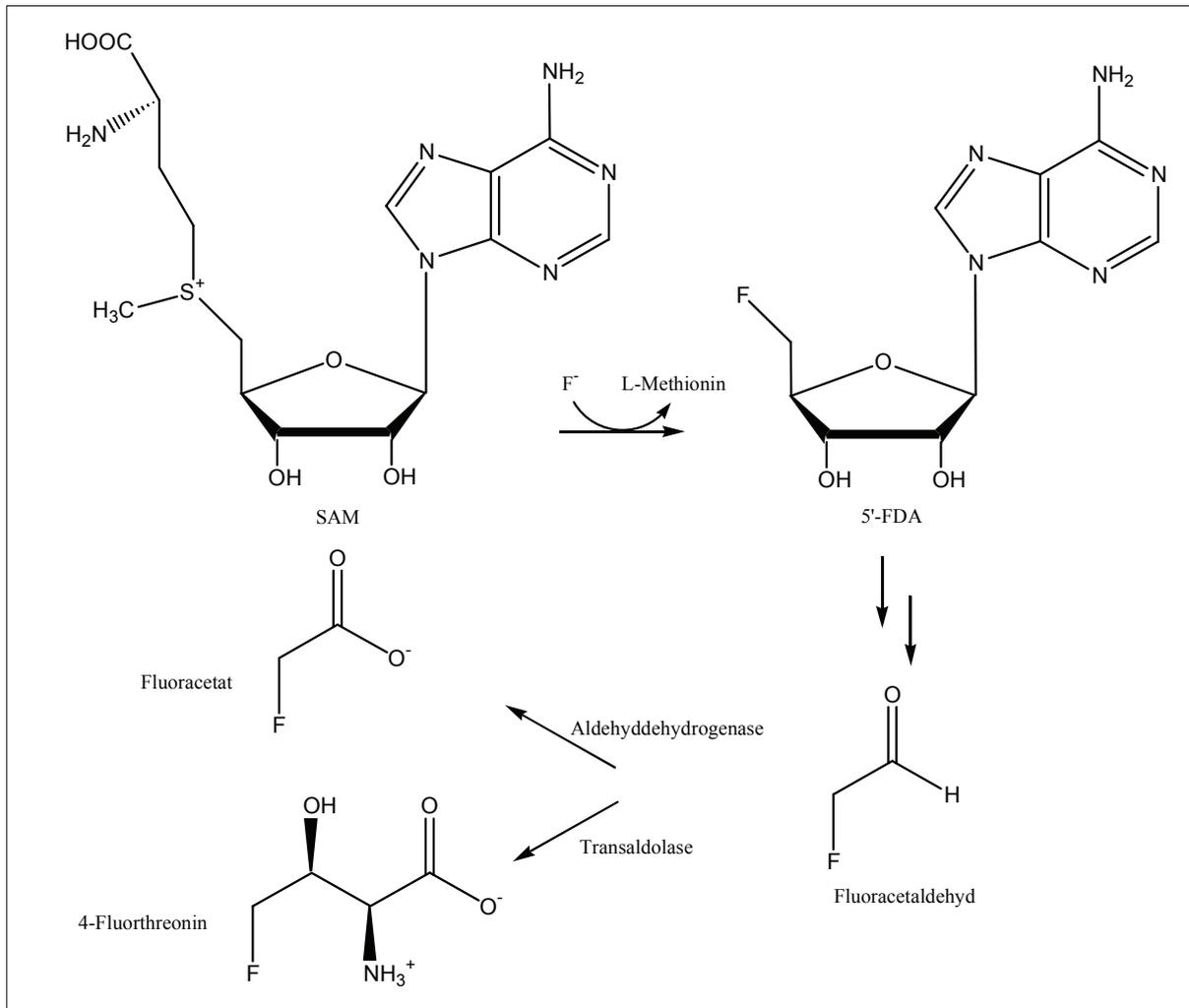
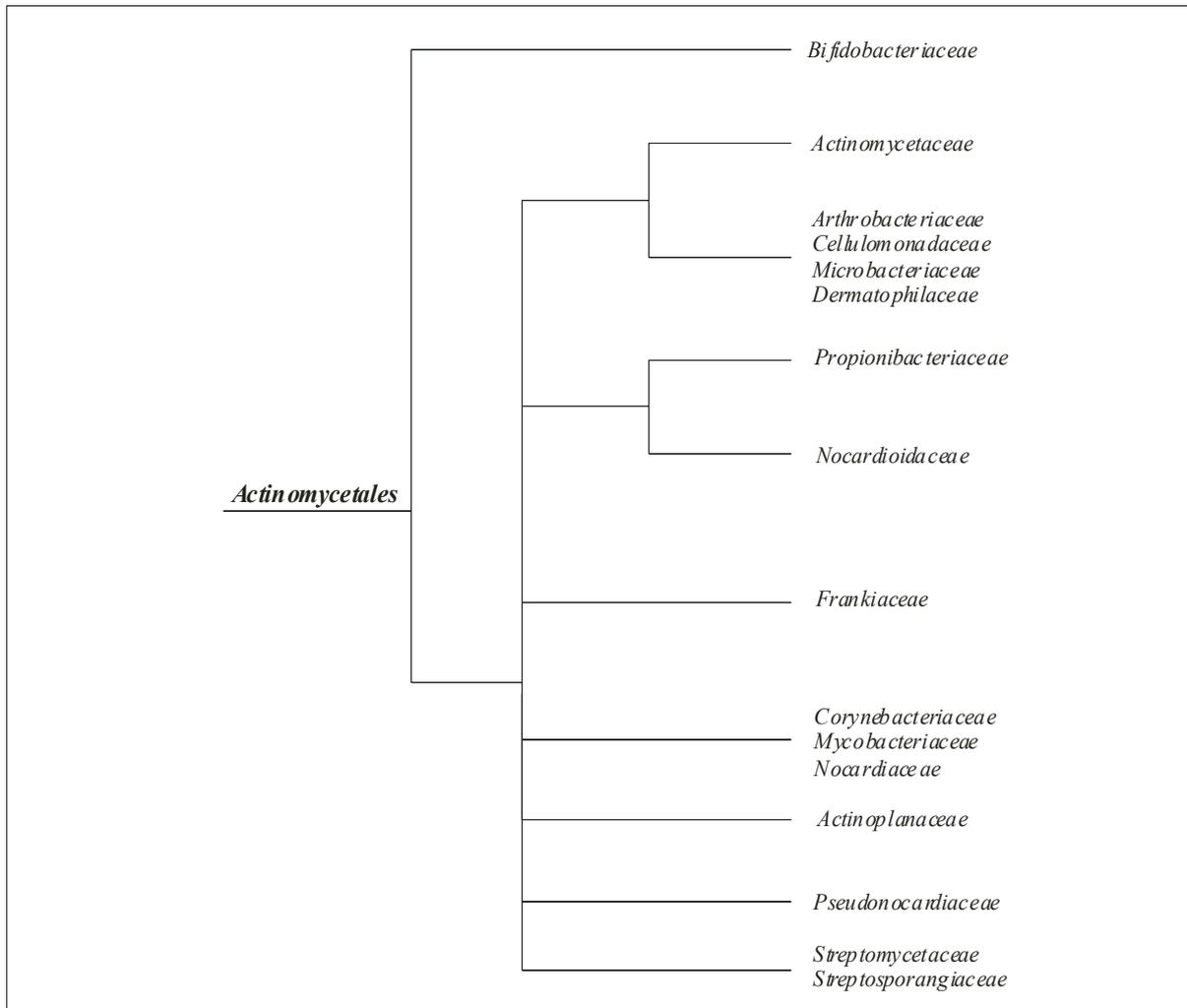


Abb. 17: Biosynthese von Fluoracetat und 4-Fluorthreonin.

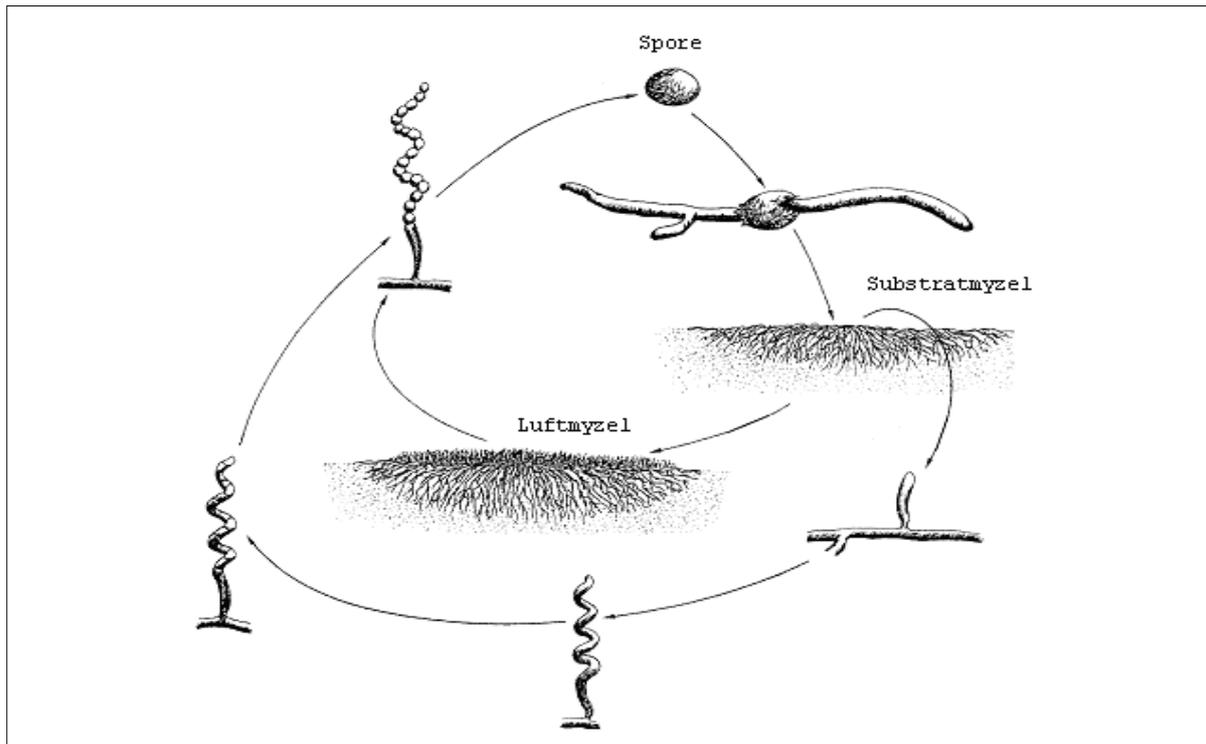
### 1.3 Actinomyceten und ihr Sekundärstoffwechsel

Actinomyceten [von griech. aktis=Strahl und mykēs=Pilz] gehören zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien, die myzelartig wachsen (WAKSMAN & HENRICI, 1943). Sie kommen vorwiegend im Boden vor und leben bis auf wenige Ausnahmen aerob. Actinomyceten lassen sich auf einfachen Nährböden gut kultivieren und anhand des Wachstums in und auf dem Agar, an der Bildung von Luftmyzel und Substratmyzel, der Bildung von Sporen, Sporangien usw. unterscheiden. In Abb. 18 ist der phylogenetische Stammbaum der Ordnung *Actinomycetales*, basierend auf 16S rRNA Analysen, dargestellt (EMBLEY & STACKEBRANDT, 1994).



**Abb. 18:** Phylogenetischer Stammbaum der Ordnung Actinomycetales, basierend auf 16S rRNA Analysen (EMBLEY & STACKEBRANDT, 1994).

Zu den Actinomyceten zählt insbesondere die große Gattung *Streptomyces*. Streptomyceten zeichnen sich durch einen charakteristischen Lebenszyklus aus, der mit dem Auskeimen der Sporen auf festem Nährboden beginnt. Die weitere morphologische Differenzierung verläuft zunächst über die Bildung eines verzweigten Substratmyzels. Durch die Vernetzung der entwickelten Filamente entstehen Kolonien mit glatter Oberfläche. Gegen Ende der vegetativen Wachstumsphase kommt es zur Ausbildung des Luftmyzels. Dabei werden die Hyphen des Luftmyzels durch die Einführung von Septen abgeschnürt. Es entstehen Konidiosporen, die der Verbreitung und dem Fortbestand dienen (Abb. 19).



**Abb. 19:** Lebenszyklus eines Streptomyceten unter Ausbildung von Substratmyzel, Luftmyzel und Sporen.

Das Streptomyceten-Genom ist mit 8 - 10 Mbp ungefähr doppelt so groß wie vergleichsweise das *Escherichia coli*-Genom und hat einen hohen GC-Gehalt, der im Durchschnitt bei ca. 73% liegt. Das Genom des Actinomyceten-Modellorganismus *Streptomyces coelicolor* wurde komplett sequenziert, wobei mehr als 20 Biosynthesegencluster entdeckt wurden die entsprechende Sekundärmetabolite kodieren (BENTLEY et al., 2002). Die Gene für diese Sekundärmetabolite liegen in Actinomyceten in Gruppen vor, den Genclustern (MARTIN & LIRAS, 1989 und MALPARTIDA & HOPWOOD, 1984). Actinomyceten spielen in der medizinischen Forschung eine wichtige Rolle, da mehr als zwei Drittel der heutzutage eingesetzten Antibiotika, die auf Naturstoffen basieren, von ihnen produziert werden, ebenso wie Substanzen mit antifungalen, antiviralen und immunsuppressiven Eigenschaften.

Nicht nur Antibiotika sind für Actinomyceten typische Sekundärmetabolite, sondern auch Pigmente (z.B. Melanin) oder Geruchsstoffe wie die für den erdigen Geruch von Waldboden verantwortliche Substanz Geosmin, die aus *Streptomyces griseus* isoliert wurde. Actinomyceten scheiden nicht nur eine Vielzahl niedermolekularer Sekundärmetabolite aus, sondern sie besitzen auch die Fähigkeit, eine Reihe reaktionsträger Biopolymere wie Cellulose oder Chitin abzubauen.

## 1.4 Zielsetzung

Die sich immer weiter ausbreitenden und neu auftretenden Resistenzen gegen existierende Antibiotika, machen vermehrte Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet unerlässlich. Insbesondere Actinomyceten haben ein riesiges Potential an Enzymen und Sekundärmetaboliten und nehmen deshalb nach wie vor eine herausragende Stellung in der Naturstoffforschung und Entwicklung von neuen Antibiotika ein. Viele dieser biologisch hochaktiven Verbindungen sind halogeniert. Aufgrund der Vielfaltigkeit von Halogenasen und halogenierten Naturstoffen sind diese Thema der vorliegenden Arbeit.

Nachfolgend soll die Hypothese bewiesen werden, dass die Proteinsequenz der Halogenasen mit ihrer Substratspezifität korreliert. Dafür wird das Produktionsspektrum ausgewählter Stämme einer vorher mittels PCR-basiertem Screening phylogenetisch charakterisierten Actinomyceten-Stammsammlung untersucht. Ziel ist es, auf diese Weise in kurzer Zeit zu neuen potentiellen Wirkstoffen zu gelangen.

Des Weiteren können die durch das Screening identifizierten Halogenasen (Perhydrolasen, Tryptophan-/Indol-Halogenasen und Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen) zur Derivatisierung potentieller Leitstrukturen verwendet werden. Zum einen können diese Enzyme für biokatalytische Anwendungen genutzt oder die sie kodierenden Gene zur Derivatisierung von Naturstoffen mittels kombinatorischer Biosynthese eingesetzt werden.

Weitere Aspekte dieser Arbeit sind die Methodenentwicklung zur Naturstoffderivatisierung und die Gewinnung neuer Erkenntnisse über den Halogenierungszeitpunkt während der Biosynthese halogenierter Sekundärmetabolite.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

BEZEICHNUNG	FIRMA
- 86C ULT Freezer	ThermoForma
96 Well PCR Platte	Biozym
Agilent 1100 HPLC System	Agilent Technologies
Alliance 2790 HT (HPLC)	Waters
AMX600 NMR Spectrometer	Bruker
APEX II FTICR Mass Spectrometer	Bruker-Daltonics
BD Sensi-Disc™	Becton Dickinson
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Bruker Avance 600	Bruker
Brutschrank	Heraeus
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Elektroporationsküvetten	Peqlab
Feinwaage	Sartorius
Filterpapiere	Carl Roth
French® Pressure Cell Press	Thermo Spectronic
Gene Genius Bio Imaging System	Syngene
Gene-Pulser® II	Bio-Rad
Holten LaminAir	Integra Biosciences
Hybond N+®	Amersham
Impfösen	Becton Dickinson
Lyophilisator Beta 1-16	Christ
Massenspektrometer (Micromass QTOF2)	Waters
Massenspektrometer Bruker Esquire 3000+	Bruker-Daltonics
Objektträger	Carl Roth
Pasteurpipetten	Carl Roth
PCR SoftTubes	Biozym

PDA 996 detector (DAD-Detektor)	Waters
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Präparative HPLC (Merck-Hitachi HTP-MS System)	Merck
PTC-225 Peltier Thermal Cycler	Biozym
Refrigerated Vapor Trap RVT400	Savant
Rotationsverdampfer	Heidolph
Schüttler A615	Infors AG
Schüttler CERTOMAT® BS-1	B. Braun Biotech International
Speed Vac® SPD111V	Savant
Spritzenfilter	Carl Roth
SUB-CELL®GT (Agarosegelelektrophorese)	Bio-Rad
Transfer-Membran aus Nitrocellulose	A. Hartenstein
Ultraschallbad Sonorex Super RK106	Bandelin
Ultraspec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer	Biochrom Ltd.
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad WB 14	Memmert
Zentrifuge Avanti™ J-20XP	Beckman
Zentrifuge Z513K	Hermle

### 2.1.2 Chemikalien

BEZEICHNUNG	FIRMA
(-)-Sulpiride	Sigma
2-Propanol	Merck
Aceton	Acros
Acetonitril	Acros
Agar Technical	Becton Dickinson
Ameisensäure	Sigma
Ammoniumheptamolybdat	Merck
Ampicillin Natriumsalz	Sigma
Anisaldehyd	Acros
Apramycinsulfat	Sigma
Arbutin	Alexis
Attophos®	Boehringer Mannheim

---

Bacto Casamino Acids	Becton Dickinson
Bacto Peptone	Becton Dickinson
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson
Bacto-Trypton	Becton Dickinson
Bromphenolblau	Sigma
Brom-Thymol-Blue	Becton Dickinson
Calciumcarbonat	Carl Roth
Cäsiumchlorid	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Carl Roth
D-(+)-Glucose	Becton Dickinson
DC-Platten Kieselgel	VWR
Deoxynucleotide Solution	NEB
Dichlormethan	Acros
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
di-Kaliumsulfat	Merck
Dimedon	Sigma
Dimethylformamid	Fluka
Dimethylsulfoxid	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth
di-Natriumtetraborat	Merck
DL- $\alpha,\epsilon$ -Diaminopimelic acid (DAP)	Sigma
DNA Ladder 1 kb	NEB
DNA Ladder 100 bp	NEB
Eisenchlorid	Merck
Eisessig	Acros
Ethanol	J.T. Barker
Ethidiumbromid Tablett	Sigma
Ethylacetat	Acros
FAD	Sigma
Glycerin	VWR
Glycin	Carl Roth
Hefeextrakt	Becton Dickinson
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kaliumacetat	Merck

---

Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kaliumsulfat	Carl Roth
Kanamycinsulfat	Serva
Kupfer (II)-chlorid-Dihydrat	Merck
LB Agar	Carl Roth
LB Broth	Carl Roth
Low melting point Agarose	Biozym
L-Prolin	Sigma
L-Tryptophan	Sigma
L-Tyrosin	Sigma
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth
Maisstärke	Carl Roth
Maleinsäure	Sigma
Malzextrakt	Becton Dickinson
Mangan (II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck
Mannit	Sigma
MaxPlax Packaging Extrakte	Biozym
Metaphor Agarose	Biozym
Methanol	Acros
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin	Serva
NADH	Sigma
Nalidixinsäure	Carl Roth
Natriumacetat	VWR
Natriumazid	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Carl Roth
Ninhydrin	Carl Roth
Novobiocin Sodium Salt	Sigma
Nutrient Broth	Becton Dickinson
Nystatin	Sigma
Petrolether	Acros
Pharmamedia	Southern Cotton Oil Company
Phenolrot Indikator	Carl Roth
Phosphomycin Dinatriumsalz	Sigma
Polyethylenglycol 1000	Carl Roth

---

Polyethylenglycol 2000	Carl Roth
Polyethylenglycol 4000	Carl Roth
R-(-)-1-Phenyl-1,2-ethandiol	Sigma
Saccharose	Becton Dickinson
Salzsäure	Carl Roth
Schwefelsäure	Carl Roth
SeaKem LE Agarose	Biozym
Sephadex LH-20	Amersham
SilicaGel 60	Acros
Sodiumbromide	J.T. Barker
Sodiumchloride	Acros
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Sodiumhypochlorite	Sigma
Sodiumperiodate	Acros
Streptomycinsulfate	Serva
Sultadimethoxine	Alexis
TES	VWR
Tetracyclin	Sigma
Thiostrepton	Fluka
Trichloressigsäure	Acros
Trimethoprim	Alexis
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Triton X-100	Sigma
Trizma <sup>®</sup> Base	Sigma
Trizma <sup>®</sup> Hydrochloride	Sigma
Tryptic Soy Broth	Becton Dickinson
Tryptone	Becton Dickinson
Tween 20	VWR
Voll-Soja	Hensel
Wasserstoffperoxid	Carl Roth
XAD1180	Varian
X-Gal	Serva
Zinkchlorid	Merck

### 2.1.3 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit für das genetische Screening verwendeten Mikroorganismen stammen aus der Actinomyceten-Stammsammlung der Combinature Biopharm AG. Stämme, die für Klonierungsarbeiten, Konjugationen oder Transformationen verwendet wurden, sind in Tab. 1 aufgeführt.

**Tab. 1:** Übersicht über verwendete Mikroorganismen.

Organismus	Stamm	Genotyp / Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i>	XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>f</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene
<i>E. coli</i>	XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIfZΔM15 Tn10 (Tetr)]$	Stratagene
<i>E. coli</i>	ET12567	<i>F dam<sup>-</sup> 13::Tn9 dcm<sup>-</sup>6 hsdM dsrR zj<sup>-</sup> 202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara<sup>-</sup>14 lacY1 xyl15 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx78 mtl glnV44 (Cm<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup>)</i>	MACNEIL et al., 1992
<i>E. coli</i>	DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	SAMBROOK et al., 1989
<i>E. coli</i>	GM5528 (pUB307)	Konjugation (Cm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> )	Combinature Biopharm AG
<i>S. albus</i>	J1074	Heterologe Expression (Cosmide)	CHATER & WILDE, 1980
<i>S. lividans</i>	TK23	Heterologe Expression (Gene)	GUSEK & KINSELLA, 1992
<i>A. balhimycina</i>	PH4	In frame-Deletionsmutante ( <i>bhaA</i> ) Kombinatorische Biosynthese	PUK et al., 2002
<i>S. toyocaensis</i>	NRRL 15009	Kombinatorische Biosynthese	POOTOOLAL et al., 2002
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Indikatorkeim für Bioassays	Universität Tübingen

### 2.1.4 Vektoren

In Tab. 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und ihre Eigenschaften, sowie ihr Verwendungszweck aufgeführt.

**Tab. 2:** Übersicht über verwendete Vektoren.

Vektor	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pBluescript® II SK (+/-)	<i>bla</i> , <i>ori (f1)</i> , <i>ori (ColE1)</i>	Subklonierungen	Stratagene

pUWL201oriT	<i>ermE</i> * <i>p</i> -Promotor, <i>tsr</i> , <i>bla</i>	Heterologe Expression (Gene)	Combinature Biopharm AG
pSET152ermEΔHindIII	<i>ermE</i> * <i>p</i> -Promotor, <i>aac</i> , <i>attP</i> ( $\Phi$ C31)	Kombinatorische Biosynthese	Combinature Biopharm AG
pOJ436	<i>oriT</i> , <i>aac</i> , <i>cos</i>	Cosmid-Genbank Heterologe Expression (Cosmide)	BIERMAN et al., 1992

### 2.1.5 Kits für molekularbiologische Arbeiten

In Tab. 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits aufgelistet.

**Tab. 3:** Übersicht über verwendete Kits.

Kit	Verwendung	Firma
QIAprep Spin Miniprep	Plasmidisolierung	Qiagen
Plasmid Midi	Plasmidisolierung	Qiagen
Plasmid Maxi	Plasmidisolierung	Qiagen
QIAquick PCR Purification	PCR-Produkt Aufreinigung	Qiagen
QIAquick Gel Extraction	DNA-Extraktion (Agarosegele)	Qiagen
NucleoSpin <sup>®</sup> Tissue	Isolierung genomischer DNA	Macherey-Nagel
EZ::TN <sup>™</sup> <KAN-2> Insertion	Transposon-Mutagenese	Epicentre
Gigapack <sup>®</sup> III Gold	Cosmid-Genbankenherstellung	Stratagene
DIG-High-Prime <sup>®</sup>	Sondenherstellung	Roche

### 2.1.6 Enzyme

In Tab. 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgelistet.

**Tab. 4:** Übersicht über verwendete Enzyme.

Enzym	Verwendung	Firma
Alkalische Phosphatase	Dephosphorylierung von DNA	Roche
Lysozym	Protoplastierung, Zellaufschluss	Serva
ProofStart DNA Polymerase	PCR	Qiagen
Taq DNA Polymerase	PCR	Roche
Taq DNA Polymerase	PCR	Qiagen
Vent-Polymerase	PCR	NEB
Platinum <sup>®</sup> Pfx DNA Polymerase	PCR	Epicentre
T4 DNA Ligase	Ligation	Biozym
Restriktionsenzyme	Restriktion	NEB
Gelase	Cosmid-Genbankenherstellung	Epicentre
Proteinase K	Cosmid-Genbankenherstellung	Merck

### 2.1.7 Antibiotika

In Tab. 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Medien-Supplemente zusammengefasst.

**Tab. 5:** Übersicht über verwendete Antibiotika und Medienzusätze.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung [c] = mg/ml	Endkonzentration [c] = µg/ml	Stamm
Ampicillin	dest. Wasser	100	100	<i>E. coli</i>
Apramycin	dest. Wasser	100	100 25 - 100	<i>E. coli</i> <i>Strep. sp.</i>
Chloramphenicol	EtOH 96%	34	34	<i>E. coli</i>
Kanamycin	dest. Wasser	50	50 50	<i>E. coli</i> <i>Strep. sp.</i>
Phosphomycin	dest. Wasser	50	400	<i>Strep. sp.</i>
Tetracyclin	EtOH 96%	5	10	<i>E. coli</i>
Thiostrepton	DMSO	50	25 - 100	<i>Strep. sp.</i>
DAP	dest. Wasser	10	50	<i>E. coli</i>
X-Gal	DMF	27	50 µl/Platte	<i>E. coli</i>
IPTG	dest. Wasser	20	40 µl/Platte	<i>E. coli</i>

### 2.1.8 Medien

In Tab. 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Medien zusammengefasst. Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter dest. Wasser. Für Festmedien wurden, wenn nicht anders angegeben, 18 g Agar zugefügt.

**Tab. 6:** Übersicht über verwendete Medien.

Medium	Bestandteile
LB (Lauria-Bertani)	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7,2
R5	103 g Saccharose, 10 g Glucose, 0,25 g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10,12 g MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0,1 g Casaminoacids, 5 g Hefeextrakt, 5,73 g TES, auffüllen auf 955 ml und mit NaOH auf pH 7,2 einstellen, autoklavieren, 2 ml Spurenelementelösung (40 mg ZnCl <sub>2</sub> , 200 mg FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 10 mg CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 10 mg MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 10 mg Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O, 10 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O), 10 ml 1 M CaCl <sub>2</sub> , 10 ml 0,54% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 15 ml 20% L-Prolin

R2L-Weichagar	0,1 g Casaminoacids, 10 g Glucose, 5 g Hefeextrakt, 0,25 g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 73,2 g Mannitol, 10,12 g MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 7 g LMP Agarose (Sigma Typ VII), auffüllen auf 820 ml, autoklavieren, 100 ml TES 0,25 M (pH 7,2), 80 ml CaCl <sub>2</sub> (3,68%)
S27M	5 g Pepton, 3 g Hefeextrakt, 73 g Mannitol, 17 g Agar
NB-Weichagar	8 g Nutrient Broth, 5 g Agar
MS (Mannitol-Sojamehl)	20 g Mannitol, 20 g Sojamehl, 1000 ml Leitungswasser
YEME	3 g Hefeextrakt, 5 g Bacto Peptone, 3 g Malzextrakt, 10 g Glucose, 340 g Saccharose, autoklavieren, 2 ml MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (2,5 M), zum Protoplastenherstellung: 50 ml Glycin (20%)
TSB (Tryptone soya broth)	30 g Oxoid Tryptone Soya Broth powder
2 x YT	16 g Tryptone, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl
CRM	20 g Oxoid Tryptone Soya Broth powder, 103 g Saccharose, 10 g Hefeextrakt
E1	20 g Glucose, 20 g Stärke, 5 g Hefeextrakt, 2,5 g Pharmamedium, 1 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,94 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 3 g NaCl, 3 g CaCO <sub>3</sub> , 1000 ml Leitungswasser, pH 7,5
AM (NaBr)	20 g Glucose, 20 g Vollfett-Sojamehl, 10 g NaBr, 1000 ml Leitungswasser, pH 7

### 2.1.9 Puffer

In Tab. 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer zusammengefasst. Alle Angaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf 1 Liter dest. Wasser.

**Tab. 7:** Übersicht über verwendete Puffer.

Puffer	Bestandteile
P-Puffer (Protoplastierung)	103 g Saccharose, 0,25 g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2,02 g MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 2 ml Spurenelemente, zu 80 ml Aliquots nach dem Autoklavieren: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5%), 10 ml CaCl <sub>2</sub> (3,68%), 10 ml TES (5,73%, pH 7,2)
Lysis-Puffer	P-Puffer + 0,5 – 2 mg/ml Lysozym
T-Puffer (Transformation)	1 ml Saccharose (25%), 5 ml PEG 1000 (50%), 0,1 ml MgCl <sub>2</sub> (1 M), 0,1 ml K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (140 mM), 0,1 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (40 mM), 1 ml Tris-Maleat

	(500 mM Tris, pH 8, Maleinsäure), 30 µl Spurenelemente, 2 ml H <sub>2</sub> O, 1 ml CaCl <sub>2</sub> (1 M)
20 x SSC	175,32 g NaCl, 88,23 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> x2H <sub>2</sub> O
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)
Church-Puffer	500 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M), 500 ml SDS (10%), 2 ml EDTA (0,5 M), pH 7,2
10 x Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure (1M), NaCl (1,5 M), pH 7,5 (NaOH)
10 x Tween-Waschpuffer	10 x Maleinsäure-Puffer, Tween 20 (3%)
1 x Blockpuffer	Milchpulver (3%) in 1 x Maleinsäure-Puffer
Detektions-Puffer	100 mM Tris, 300 mM NaCl
Denaturierungs-Puffer	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungs-Puffer	1 M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl
Puffer P1	50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA, pH 8
Puffer P2	0,2 M NaOH, 1% SDS
Puffer P3	3 M KAc (pH 5,5)
6 x Lade-Puffer	60% Saccharose, 100 mM EDTA (pH 8), 0,25% Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Färbebad	5 µg/ml dest. Wasser
TAE-Puffer	40 mM Tris, 2 mM EDTA, 10 mM NaAc, pH 7,8 (Eisessig)
20 x Kalium-Phosphat-Puffer	280 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2 M), 720 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M), pH 7,2
Natriumacetat-Puffer	100 mM Na(CH <sub>3</sub> COO) x 3H <sub>2</sub> O, pH 5,5 (Eisessig)
Aufschlusspuffer (FADH <sub>2</sub> -Halogenasen)	10 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 1 mg/ml Lysozym
Aufschlusspuffer (Perhydrolasen)	100 mM Natriumacetat-Puffer, 1 mg/ml Lysozym
Sprühreagenz	85 ml MeOH, 10 ml Essigsäure, 5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1 ml Anisaldehyd

### 2.1.10 Primer

In Tab. 8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt, die alle auf eine Konzentration von 30 pmol/µl bidest. Wasser verdünnt wurden. Primer für Sequenzierungen sind in dieser Arbeit nicht aufgelistet.

**Tab. 8:** Übersicht über verwendete Primer.

Primer	Sequenz
Halo-A1-FW	5'- GGSGARSTSGCSCGSTACGT -3'
Halo-A1-RV	5'- ASGAASGCSAGSAGSTC -3'

Halo-B4-FW	5'- TTCCCSCGSTACCASATCGGSGAG -3'
Halo-B7-RV	5'- GSGGGATSWMCCAGWACCASCC -3'
Halo-C1-FW	5'- GSGTSGGSGARGCSAC -3'
Halo-C6-RV	5'- GGGATCTYCCASGTCCASCC -3'
M13-Halo-B4-FW	5'- TGTA AACGACGGCCAGTTTCCCSCGSTACCASATCGGSGAG -3'
M13-Halo-B7-RV	5'- CAGGAAACAGCTATGACCGSGGGATSWMCCAGWACCASCC -3'
PKSI-KSII-FW	5'- CTSGGSGACCCSATCGAG -3'
PKSI-AT-I-RV	5'- GCSGCSGCGATCTCSCCCTGSSWGTGSCC -3'
PKSII-FW	5'- TSGCSTGCTTCGAYGCSATC -3'
PKSII-RV	5'- TGGAANCCGCCGAABCCGCT -3'
rppa-90-FW	5'- GGCGACTTTGTGCAGACCCTC -3'
rppa-90-RV	5'- GTCACGTCCTGCCGTATGCC -3'
HMG-CoA-FW	5'- AACTACTGCACSGACAAGAAG -3'
HMG-CoA-RV	5'- GAGSCGSCGSGCCGTTCTC -3'
T3	5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3'
T7	5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC -3'
16sRNA-FW	5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
16sRNA-RV	5'- AGAAAGGAGGTGATCCAGCC -3'
Apra low	5'- TCCGCCAAGGCAAAGC -3'
Apra up	5'- AGCTTCTCAACCTTGG -3'
2511-2F03-hind	5'- CGCCGCAAGCTTGGAGGTCTCCTGATGCCGT -3'
2511-2F03-spe	5'- GTGTCCGGTACTAGTTCAGGCGTCCTTTC -3'
52-6E20-hind	5'- CAGTCGCAAGCTTGAAGGATCAGTCATGGG -3'
52-6E20-spe	5'- CGCCGGCAACTAGTCTACGACTTC -3'
1699-5L21-hind	5'- GCGAGAAAGCTTGGAGGGGACCATGCCGTTC -3'
1699-5L21-spe	5'- GTACCGAACTAGTTCAGCTCTTGATG -3'
2686-5D09-hind	5'- GGTGTAAAGCTTGGAGGCTGTCCGGATG G -3'
2686-5D09-spe	5'- GGCCACGCACTAGTTCAGCGCCCGTGC -3'
14.2-6L22-hind	5'- CCCCTGAAGCTTGGAGGATGTCGGTGTC -3'
14.2-6L22-spe	5'- CAGGTCCCGGACTAGTTCAGCGGGCATG -3'
28-1B22-hind	5'- CCGACAAAGCTTGGAGGTCGCTTATGGCTG -3'
28-1B22-spe	5' - CGGCGACTAGTTCACTTGCTGTGCAGATGA -3'
93-2G07-hind	5'- AACTCCAAGCTTGGAGGGAATTCGATATGAC -3'
93-2G07-spe	5'- GCGGTGCGACTAGTCTACTTGCCGT -3'
908-6M17-hind	5'- ACGCGAAAGCTTGGAGGACTTCCGTGGCAC -3'
908-6M17-spe	5'- CGCCGGGCGGACTAGTCTACGCCGAG -3'
1641-5H24-hind	5'- CGGATCAAGCTTGGAGGGTGCCATGCCAAT -3'
1641-5H24-spe	5'- CATGTGCCTAACTAGTTTAGCACATGC -3'
2402-5M17-hind	5'- GTGATCAAGCTTGGAGGACATTTCCACATG G -3'
2402-5M17-spe	5'- GCCCAGCCGGACTAGTTCACTTGCCG -3'
1739-5K18-hind	5'- CCGACTAAGCTTGGAGGGCTGTTTCATG ACC -3'

1739-5K18-spe	5'- ACGCCGACTAGTTTACGCGCCGTGCAGG -3'
1688-5L05-hind	5'- CACCGCAAGCTTGGAGGTGACGTATGACCCAGG -3'
1688-5L05-spe	5'- AGGCCGACTAGTTCACCTTGGCCCAGGA -3'
1787-5J23-hind	5'- CAGTGCAAGCTTGGAGGCCGAATGAGTAC -3'
1787-5J23-spe	5'- GTCGTGCGACTAGTTCAGGACGGATGCG -3'
2005-3N18-hind	5'- CACCGCATGAAAGCTTGGAGACTCGGCATGACAAA -3'
2005-3N18-spe	5'- CCGCCCCACTAGTTCAGCGCTCCGGTTCGA -3'
2213-3H19-hind	5'- TTCTTGAAGCTTGGAAAGTCTCGTATGTCG -3'
2213-3H19-spe	5'- CACGGAAGGCACTAGTTCACCTTCGCG -3'
2214-6N04-hind	5'- GAACCCGAAGCTTGGAGACCAGCGATGACCTC -3'
2214-6N04-spe	5'- GGGCAGGGTCGACTAGTTCACGGCGCC -3'
1698-3I08-hind	5'- CTCAGCAAGCTTGGAGACCAGTGACTGCC -3'
1698-3I08-spe	5'- CCGACCAAAGCTAGTCTACGTCATTGCGG -3'
2412-6G17-hind	5'- GCCACGAAGCTTGGAGAACAGCAGTGATCGC -3'
2412-6G17-spe	5'- GTTCATGGGGCACTAGTTTACTTCCGG -3'
2413-3L07-hind	5'- ACGATAAAGCTTGGAGGGAAAGGCGTGAAT -3'
2413-3L07-spe	5'- GCACATGACTAGTTCAGGAAGCGGGC -3'
2414-6F08-hind	5'- CGAGTTAAGCTTGGAGATCTATTGTGAGTG -3'
2414-6F08-spe	5'- GACCGTGAAGCTTTCAGCTCGCCTGC -3'
2429-4I14-hind	5'- CGACAAAAGCTTGGAGGGAAATGTGCGTGC -3'
2429-4I14-spe	5'- GACGGGCACTAGTTCATACCGGGTGATG -3'
1713-2A05-hind	5'- CCGAGTAAGCTTGGAAAGGCCATGACACAG -3'
1713-2A05-spe	5'- CGGGGGGGACTAGTTCAGGAGACCTTC -3'
2478-4G12-hind	5'- GGAACAAAGCTTGGAGAGTGACGTGAGCAC -3'
2478-4G12-spe	5'- GTTCGGGTCGACTAGTTCAGGCCGCTC -3'
2485-1A07-1-hind	5'- CAGCCGAAGCTTGGAGAAGGAATGAGCCC -3'
2485-1A07-1-spe	5'- CGGCTTCTACTAGTTCAGGTGCTGGG -3'
2490-1J16-hind	5'- GAACACGAAGCTTGGAGGCTCCGGATGAC -3'
2490-1J16-spe	5'- CTCCTCACACTAGTTCAGGGCCGGAGC -3'
2501-2N12-hind	5'- GGTTCGAAGCTTGGAAAGTCTACGTATGTC -3'
2501-2N12-spe	5'- GCTTGGCCACTAGTTCATGACGACGCTTC -3'
2511-6G19-mfe/eco	5'- TGTTGCAATTGGGAAGGTGCGTCTCGATG -3'
2511-6G19-spe	5'- CGCCTGGGACTAGTTCATCGTGCCGTTTC -3'
2531-1J22-hind	5'- CGCGGGGAAGCTTGGAGGTCCGATGAG -3'
2531-1J22-spe	5'- CACGCCGACTAGTTCATGGACTTCCCC -3'
2541-2C20-hind	5'- CACAACAAGCTTGGAAAGGCTGCATTCTCATG -3'
2541-2C20-spe	5'- CCGGTCGGGACTAGTTCAGGCCGTC -3'
2544-3B10-hind	5'- CAGCCTCAAGCTTGGAGACGCACATGCG -3'
2544-3B10-spe	5'- CGCGCGACTAGTTCAGGCGCGTCGCAGC -3'
2560-3P14-hind	5'- CGCATCAAGCTTGGAAAGTCCTATATGTCG -3'
2560-3P14-spe	5'- CCGGCCGGCGCACTAGTTCAGCTGCCG -3'

2664-2D24-hind	5'- CAACGCAAGCTTGGAGGGGGAAACCATGAG -3'
2664-2D24-spe	5'- CGGACGACAGACTAGTTCAGGCCGG -3'
2665-2D20-hind	5'- TCCGGAAAGCTTGGAGAACCGCACCCGTG G -3'
2665-2D20-spe	5'- GTCGCGTACTAGTTCACGCCGACCGG -3'
2005-4J16-hind	5'- CCCTCTAAGCTTGGAGAACAACCATGAACC -3'
2005-4J16-spe	5'- CTCAGCTCGACTAGTTCATCCGGCCTCGG -3'
2192-3H15-hind	5'- CCCCTCAAGCTTGGAGGCCTTGATGACC -3'
2192-3H15-spe	5'- CCGACTCGACTAGTTCACACCACCC -3'
2485-1B20-hind	5'- ACCCCTAAGCTTGGAGGCAGGACATGCC -3'
2485-1B20-spe	5'- GGGGCGCGACTAGTTCACGTGACGGGTC -3'
2485-1A07-2-hind	5'- CGGCGCAAGCTTGGAGGACACACGGTGTC -3'
2485-1A07-2-spe	5'- GGGCGGGGACTAGTTCAGAATGTTGGTG -3'
2463-6B23-hind	5'- GACACTCAAGCTTGGAAAGGTGGGATATGTC -3'
2463-6B23-spe	5'- CTCCGCTAACTAGTTCAGCCGGGTGGTAC -3'
2192-3H18-hind	5'- CCGAAACAAGCTTGGAGGTGGCTGTGGC -3'
2192-3H18-spe	5'- GTCGGGGCTCGACTAGTTCAGGCGGTG -3'
28-4H04-hind	5'- TGCCCCAAGCTTGGAGATGATCATGC -3'
28-4H04-spe	5'- CCTCCCTTGAGACTAGTTCAGCTCCCGG -3'
2023-6G09-hind	5'- GAGTGAATAAGCTTGGAAAGGAAGGGGTGACC -3'
2023-6G09-spe	5'- GCGGGGGTACTAGTCTAGTCGCCTTCG -3'
2090-5L03-hind	5'- GATGCCAAAGCTTGGAGGGAAGCGTAATGAG -3'
2090-5L03-spe	5'- CGCTTGAACGACTAGTCTAGTGTGCGCC -3'
2312-1H09-hind	5'- CCGGGAGAAGCTTGGAGGAGGGATGACC -3'
2312-1H09-spe	5'- GCTTCTGCTACTAGTCTATTCCGGGCGGGC -3'
2364-3B18-hind	5'- CGACAAAAGCTTGGAGGGAAATGTCGGTCG -3'
2364-3B18-spe	5'- GACGGGCACTAGTTCATACCGGGTGATG -3'
3747-2C20-hind	5'- CGATACAAGCTTGGAGGGACATGTCCG -3'
3747-2C20-spe	5'- CTGACGGGCGACTAGTTCACACCGGGCG -3'
stal-hind	5'- TGATGGAAGCTTGGAGACCGGATGGACGGC -3'
stal-spe	5'- ACCTCGACTAGTTCATCCACGGTAGGGAAG -3'
staK-hind	5'- CGATCGAAGCTTGGAGGGTGAGAGATGTCCG -3'
staK-spe	5'- AGCACAACTAGTTCATCGGGCGTCCTCTCG -3'

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgt auf LB-Platten bzw. in LB-Medium bei 37°C und 180 Upm für 16 h unter Zugabe der jeweiligen Antibiotika. Für die Stammsammlung werden 500 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur mit 500 µl Glycerin (80%) gemischt und bei -80°C eingefroren.

### 2.2.2 Kultivierung von Actinomyceten

Zur Anzucht einer Actinomycetenkultur wird 20-100 ml Selektionsmedium mit einer homogenisierten Einzelkolonie oder homogenisiertem Myzel beimpft. Die Inkubation erfolgt für 2-3 d bei 30°C und 160 Upm. Hauptkulturen werden mit einem Volumen von 1-10% angeimpft und 2-6 d kultiviert. Durch Verwendung von Schikanekolben bzw. Kolben mit einer Edelstahlfeder wird ein disperses Wachstum gewährleistet. Die Kultivierung auf Festmedium erfolgt ebenfalls bei 30°C. Glycerinkulturen werden in Analogie zu *E. coli* angelegt.

### 2.2.3 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung (Mini-Präparation) aus Bakterien kann in drei Abschnitte (Lyse, Deproteinisierung und DNA-Fällung) eingeteilt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört die Zellmembran und führt so zur Zellyse. Die Zugabe von Natronlauge bewirkt eine irreversible Denaturierung chromosomaler DNA, während Plasmide bei einer anschließenden Neutralisierung wieder renaturieren. Die Plasmide befinden sich im Lysat, im Gegensatz zu Proteinen und cytoplasmamembrangebundener chromosomaler DNA, welche durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt werden. Mit einer Säulenchromatographie oder Fällung erfolgt die Aufreinigung der Plasmide. Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA können, wie auch nach einer DNA-Isolierung aus Agarosegelen, spektrometrisch bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm, wohingegen Proteine (aromatische Aminosäuren) ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen.

Für die Isolierung von DNA zur anschließenden Sequenzierung werden die Kits von Qiagen genutzt (Protokoll nach Angaben des Herstellers). Für Klonierungen wird DNA nach der Methode der alkalischen Lyse isoliert (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Die

Zellen aus einer 2 ml Übernachtskultur werden bei 13.000 Upm für 30 s in einem Eppi zentrifugiert und das Pellet anschließend in 250 µl Puffer P1 suspendiert. Nach der Zugabe von 350 µl Puffer P2 wird das Eppi viermal zum Mischen invertiert. Anschließend werden 350 µl Puffer P3 zugegeben und die Suspension wieder vorsichtig gemischt. Der entstehende Niederschlag wird bei 13.000 Upm für 10 min abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wird nach dessen Überführung in ein neues Eppi mittels Zugabe von 475 µl 2-Propanol gefällt (13.000 Upm / 15 min). Das Pellet wird mit Ethanol (70%) gewaschen und anschließend getrocknet. Die isolierte Plasmid-/Cosmid-DNA kann in 30-50 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen werden.

#### **2.2.4 Isolierung von DNA aus Actinomyceten**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Actinomyceten werden 2 ml einer Kultur, die in einem Medium unter Zusatz von 1% Glycin gewachsen ist, zentrifugiert und das Myzel mit TE-Puffer + 20% Saccharose gewaschen. Das Myzel wird anschließend für 1 h bei -20°C eingefroren und dann in 250 µl Puffer P1 + 4 mg/ml Lysozym resuspendiert und bei 37°C für 1 h unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die weitere Plasmid-Isolierung erfolgt analog zu dem Qiagen-Protokoll für *E. coli*.

Für die Isolierung von genomischer DNA wird das NucleoSpin®Tissue Kit von Macherey-Nagel verwendet.

#### **2.2.5 Konzentrierung, Analyse und Reinigung von DNA**

##### **2.2.5.1 Konzentrierung von DNA**

Durch Zugabe von 3 Vol. Ethanol (96%) und 1/10 Vol. NaAc (3 M, pH 5,5) zu wässrigen DNA-Lösungen wird die Hydratisierung gestört, die zur Aufrechterhaltung der Löslichkeit notwendig ist. Die DNA fällt aus (20-30 min, -80°C) und kann über eine Zentrifugation (30 min, 13.000 Upm) vom restlichen Ansatz abgetrennt werden. Das Pellet kann mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer bzw. Wasser aufgenommen werden.

##### **2.2.5.2 Agarosegelelektrophorese**

Zur Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten werden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Da DNA im Zucker/Phosphat-Rückgrat bei

neutralem bis alkalischem pH-Wert negative Ladungen trägt, kann sie in einer Agarosematrix im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Konformation und Größe der DNA, der Agarosekonzentration sowie der angelegten Feldstärke.

Die Auftrennung erfolgt in Gelkammern mit einer Agarosekonzentration von 0,8-2% und einer Spannung von 70-140 V. Als Gel- und Laufpuffer wird TAE-Puffer verwendet. Die zu trennenden Proben werden vor dem Auftragen in 6 x Lade-Puffer zur Erhöhung der Dichte aufgenommen. Als Größenstandard werden die Marker der Firma NEB verwendet (1 kb DNA Leiter: 10.002, 8.001, 6.001, 5.001, 4.001, 3.001, 2.000, 1.500, 1.000, 500 bp; 100 bp DNA Leiter: 1.517, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). Zum Anfärben der DNA wird Ethidiumbromid verwendet, welches sich in die DNA einlagert und unter UV-Licht detektiert werden kann.

### **2.2.5.3 Aufreinigung von DNA**

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder zur Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen werden die Kits der Firma Qiagen verwendet (QIAquick PCR Purification, QIAquick Gel Extraction). Das Prinzip beruht auf der reversiblen Bindung von DNA an einer Säulenmatrix, wodurch Verunreinigungen abgetrennt werden können.

## **2.2.6 *In Vitro* Rekombination von DNA**

### **2.2.6.1 Restriktionsspaltung von DNA**

Unter Restriktion versteht man das durch Enzyme katalysierte Schneiden von DNA. Diese Restriktionsendonucleasen lagern sich an palindromische Erkennungssequenzen an und schneiden innerhalb dieser bzw. in benachbarten Regionen. Die Enzyme werden nach Angaben des Herstellers verwendet (Puffer, Inkubationstemperatur, Enzymkonzentration). Die Reaktion erfolgt über einen Zeitraum von 1-16 h. Eine Analyse der durchgeführten Restriktion erfolgt mittels Gelelektrophorese.

### **2.2.6.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden**

Um bei Klonierungen die Selbstligation des Vektors zu vermeiden, werden die DNA-Enden modifiziert. Die Abspaltung von Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA erfolgt

durch alkalische Phosphatase. Die Reaktionsbedingungen werden wie vom Hersteller angegeben gewählt. Zum anschließenden Entfernen der alkalischen Phosphatase bzw. zur Umpufferung wird das QIAquick PCR Purification Kit verwendet.

### **2.2.6.3 Ligation**

Zur Ligation von Vektor und Insert wird T4-DNA-Ligase eingesetzt. Diese verknüpft DNA-Moleküle unter ATP-Verbrauch in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen. Es wird eine kovalente Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe benachbarter Nukleotide gebildet. Für die Ligation von Insert- und Vektor-DNA wird ein molares Verhältnis von 3:1 gewählt. Die Reaktion findet über Nacht bei 16°C in einem Reaktionsvolumen von 10 µl statt. Zur Elektroporation wird 1 µl des Ligationsansatzes eingesetzt bzw. 2-10 µl für die Transformation von  $Ca^{2+}$ -kompetenten Zellen.

### **2.2.6.4 Transposon-Mutagenese**

Ein Transposon oder „springendes Gen“ ist ein DNA-Abschnitt auf einem Chromosom. Es umfasst ein oder mehrere Gene und ist von einer kleineren, gegenläufig-identischen, nicht informativen Nukleotidsequenz, die auch Insertions-element genannt wird, begrenzt. Das Transposon kann mithilfe von Enzymen (Transposasen) aus dem Chromosom herausgelöst und an einer anderen Stelle des Genoms wieder eingefügt werden.

Für die zufällige Inaktivierung von Genen durch Insertion eines Transposons wird das EZ::TN<sup>TM</sup> <KAN-2> Insertion Kit von Epicentre verwendet. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl werden 1 µl Puffer, 0,2 µg Cosmid-DNA, x µl EZ-Tn5 <KAN-2> Transposon (molares DNA-Verhältnis von 1:1), x µl bidest. Wasser und 1 µl EZ-Tn5 Transposase zusammenpipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Hitze (70°C, 10 min) und durch die Zugabe von Stopplösung beendet. Der Ansatz kann direkt für die Transformation von  $Ca^{2+}$ -kompetenten Zellen eingesetzt werden. Die Selektion erfolgt auf kanamycinresistente Klone.

## 2.2.7 Transformation von *E. coli*

### 2.2.7.1 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Bakterienmembran kurzfristig durch Anlegen eines elektrischen Feldes permeabilisiert, was eine Aufnahme freier DNA ins Zellinnere ermöglicht. Zur Herstellung geeigneter Zellen werden 250 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E. coli*-Vorkultur beimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600nm}$  von 0,5–0,7 im Luftschüttler bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wird bei 3.000 Upm abzentrifugiert (10 min, 4°C) und das Pellet zweimal mit eiskaltem  $H_2O_{bidest.}$  gewaschen. Die im Rücklauf resuspendierten Zellen werden mit eiskaltem Glycerin (15%) gewaschen und anschließend in dem 1,5 fachen Volumen des Bakterienpellets an Glycerin (15%) gelöst. Die Zellen werden aliquotiert (50 µl) und bei -80°C gelagert.

Für die Elektroporation wird 1 µl eines Ligationsansatzes mit 50 µl auf Eis aufgetauter elektrokompetenter Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand) überführt. Die Transformation wird bei 1,7 kV, 25 µF und 200 Ω in einem Gene-Pulser® II durchgeführt. Der Ansatz wird in 300 µl LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen, bei 37°C für 30 min im Schüttler inkubiert und auf eine LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

### 2.2.7.2 $CaCl_2$ -Methode

Durch  $CaCl_2$ -Behandlung erhalten exponentiell wachsende *E. coli*-Zellen die Fähigkeit, freie DNA aufzunehmen. Zur Herstellung geeigneter Zellen werden 50 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E. coli*-Vorkultur beimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600nm}$  von 0,5–0,7 im Luftschüttler bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wird bei 3.000 Upm abzentrifugiert (10 min, 4°C) und das Pellet in eiskaltem 0,1 M  $MgCl_2$  (15 ml) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 30 ml eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$  gelöst und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4°C) und das Pellet in 3 ml eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$  / 15% Glycerin aufgenommen. Die Zellen werden aliquotiert (50-200 µl) und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation werden 5 µl eines Ligationsansatzes mit 100 µl aufgetauter kompetenter Zellen auf Eis für 30 min inkubiert. Danach erfolgt eine Hitzeschockbehandlung der Zellen für 45 s bei 42°C. Zur Regeneration werden die Zellen nach

Zusatz von 500 µl LB-Medium bei 37°C für 45 min im Luftschüttler inkubiert und dann auf entsprechende Selektionsmedien ausplattiert.

### **2.2.8 Transformation von *S. lividans* und *S. toyocaensis***

Für die Transformation von Streptomyceten werden die Stämme zuerst protoplastiert (KIESER et al., 2000). Dafür wird eine 50 ml Hauptkultur für 2-3 d in einem geeigneten Medium unter Zusatz von 1% Glycin bei 30°C kultiviert und anschließend das Myzel abzentrifugiert (5.000 Upm, 10 min). Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und das Pellet mit 20 ml P-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 20 ml P-Puffer/Lysozym (0,5-2 mg/ml) zur Protoplastierung resuspendiert und für 20-60 min bei 30°C (*S. toyocaensis*: 37°C) im Luftschüttler inkubiert. Unter dem Mikroskop wird der Verlauf der Protoplastierung verfolgt. Zum Abstoppen der Lysozymbehandlung werden 10 ml eiskalter P-Puffer zu den Protoplasten gegeben. Zur Abtrennung von Myzelresten wird der Ansatz durch sterile Watte filtriert. Die Protoplasten werden bei 4.000 Upm abzentrifugiert, in 0,5-1 ml P-Puffer aufgenommen, aliquotiert (100 µl) und bei -20°C gelagert.

Die Transformation von Streptomyceten erfolgt durch Polyethylenglykol (PEG)-induzierte DNA-Aufnahme der Protoplasten. Dafür werden 5-20 µl Plasmid (*S. toyocaensis*: demethylierte DNA) mit 100 µl Protoplasten und 250 µl T-Puffer gemischt. Der Ansatz wird sofort auf 2 R5-Platten zur Regeneration der Protoplasten ausplattiert und für 16 h bei 30°C inkubiert. Zur Selektion werden die Platten mit 4 ml NB-Weichagar (1-2 mg Antibiotikum) überschichtet und für 3-4 weitere Tage bei 30°C inkubiert.

### **2.2.9 Direkte Transformation von *Amycolatopsis balhimycina***

Die „Direkte Transformation“ ist eine spezifische Methode zur Transformation einiger *Amycolatopsis*- und *Nocardia*-Stämme (MADÓN & HÜTTER, 1991). In der Gegenwart von PEG, Cäsiumchlorid und Kalbsthymus-DNA kann Myzel dieser Stämme direkt transformiert werden.

Für die Vorkultur werden 100 ml TSB-Medium mit homogenisiertem Myzel des Stammes beimpft und 24 h bei 30°C und 220 Upm inkubiert. Für die Hauptkultur werden 100 ml TSB-Medium mit 2 ml homogenisierter Vorkultur beimpft und 52-55 h bei 30°C und 220 Upm inkubiert. Die für die Kultivierung verwendeten Kolben haben

ein Volumen von 1 l und besitzen 4 Schikanen. Von der Hauptkultur werden 25 ml abgenommen und bei 4.500 Upm (10 min, 10°C) abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 25 ml TE-Puffer gewaschen, bei gleichen Bedingungen zentrifugiert, in 0,6 ml TE-Puffer aufgenommen und zur Transformation aliquotiert (100 µl). Zu dieser Zellsuspension werden 10 µl MgCl<sub>2</sub> (0,2 M), 60 µl CsCl (4,17 M), 4 µl Kalbsthymus-DNA (7,5 µg/µl), 26 µl demethylierte Plasmid-DNA und 200 µl PEG 2000 (65%) pipettiert. Dieser Ansatz wird vorsichtig gemischt, 40 min bei 30°C inkubiert und zweimal mit 1 ml S27M-Medium gewaschen (4.000 Upm, 2 min). Nach dem Waschen wird das Pellet in 400 µl S27M-Medium gelöst und zusammen mit 2 ml R2L-Weichagar auf einer S27M-Platte (frisch gegossen und 2 h getrocknet) verteilt. Die Platte wird nach 16 h (30°C) mit 4 ml NB-Weichagar (2 mg Antibiotikum) überschichtet und für 1-3 Wochen bei 30°C inkubiert.

Für die Herstellung der Kalbsthymus-DNA werden 7,5 mg DNA in 1 ml sterilem dest. Wasser im Ultraschallbad gelöst (5 min). Nach 15 min Zentrifugieren wird der Überstand in ein neues Eppi überführt, 20 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert.

### 2.2.10 Konjugation von *Streptomyces albus*

Unter Konjugation versteht man die Übertragung von DNA durch direkten Kontakt von Spenderzelle zu Empfängerzelle. Bifunktionelle Plasmide können von *E. coli* nach *Streptomyces* mittels intergenerischer Konjugation übertragen werden (BIERMAN et al., 1992 und FLETT et al., 1997). Hierbei werden zuerst die Transferfunktionen eines Helfer-Plasmids einem Shuttle-Vektor in *E. coli* zur Verfügung gestellt. Das auf diese Weise mobilisierte Plasmid ist in der Lage in Gram-negative, Gram-positive und manche eukaryontische Zellen zu transferieren.

*E. coli*-Zellen (ET12567 + pUB307) werden mit dem zu mobilisierenden Shuttle-Vektor nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode transformiert. 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika werden 1:100 aus einer Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 180 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 kultiviert. Nach Zentrifugation (3.000 Upm, 10 min) werden die Zellen zweimal mit jeweils 50 ml LB-Medium gewaschen und in 10 ml LB-Medium resuspendiert. Ungefähr 10<sup>8</sup> Sporen (50 µl) von *S. albus* werden in 500 µl 2 x YT-Medium suspendiert und für 10 min bei 50°C inkubiert (Hitzeschock). Zu diesem Ansatz werden 500 µl *E. coli*-Zellen pipettiert, vorsichtig gemischt, zentrifugiert und die im Rücklauf resuspendierten Zellen auf MS-

Platten + 10 mM MgCl<sub>2</sub> ausplattiert. Nach 16 h Inkubation bei 30°C werden die regenerierten Zellen mit 4 ml NB-Weichagar (1 mg Antibiotikum) überschichtet und für weitere 3 Tage inkubiert.

Als Alternative wurde in dieser Arbeit für die Konjugation ein anderer *E. coli*-Stamm (GM5528 + pUB307) verwendet. Dieser benötigt im Medium DL- $\alpha,\epsilon$ -Diaminopimelic acid (DAP) für die Zellwandbiosynthese, was als zusätzlicher Selektionsdruck zu den ansonsten verwendeten Antibiotika genutzt werden kann. Eine weitere Abänderung des Standardprotokolls ist anstelle einer CaCl<sub>2</sub>-Transformation des GM5528 + pUB307 mit dem Shuttle-Vektor bzw. Cosmiden eine Plattenkonjugation. Dafür werden 50  $\mu$ l einer ü/N-Kultur des Stammes GM5528 + pUB307 und 50  $\mu$ l ü/N-Kultur eines DH5 $\alpha$  (+ Plasmid bzw. Cosmid) Stammes auf einer LB-DAP-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden mit 500  $\mu$ l LB-DAP-Medium von der Platte abgeschwemmt und auf eine LB-Platte (Apramycin, Chloramphenicol, Kanamycin und DAP) ausplattiert. Die wieder über Nacht bei 37°C inkubierten Zellen werden mit 750  $\mu$ l LB-DAP-Medium erneut abgeschwemmt und zu den hitzegeschockten Sporen pipettiert. Analog zu dem oben beschriebenen Protokoll werden die Zellen zentrifugiert, im Rücklauf aufgenommen und auf MS-MgCl<sub>2</sub>-DAP-Platten ausplattiert. Die in dieser Arbeit zur Konjugation verwendeten Cosmide tragen eine Apramycin-Resistenz. *Streptomyces albus* ist im Gegensatz zu *E. coli* gegen Phosphomycin resistent, weshalb die MS-MgCl<sub>2</sub>-DAP-Platten mit NB-Weichagar (1 mg Apramycin und 1 mg Phosphomycin) überschichtet werden.

Für die Herstellung der Sporensuspension werden 500  $\mu$ l einer *S. albus*-Vorkultur auf einer MS-Platte ausplattiert und für 1 Woche bei 30°C inkubiert. Die Sporen werden mit 9 ml Tween 20-Lösung abgeschwemmt, in ein Falcontube überführt und 1 min stark gemixt (Ansatz von 2 Platten). Anschließend wird die Sporenlösung durch einen sterilen Wattefilter in ein neues Falcontube filtriert. Die Sporen werden zentrifugiert (4.000 Upm, 5 min, 4°C), in 1 ml Glycerin (20%) aufgenommen und zum Lagern bei -80°C eingefroren.

### **2.2.11 Hemmhoftest mit *Bacillus subtilis***

Als erster Hinweis, ob eine neue Substanz antibiotische Eigenschaften besitzt, kann sie gegen *B. subtilis* (Gram-positiv) getestet werden. Dafür werden 300 ml LB-Agar aufgekocht, auf 60°C abgekühlt und mit 300  $\mu$ l einer *B. subtilis*-Sporensuspension

beimpft. Dieses Testmedium wird anschließend in Petrischalen zum Abkühlen gegossen. Auf diese Platten werden Testblättchen aufgelegt, auf die wiederum die auf biologische Aktivität hin zu untersuchende Substanz geträufelt wird (10 µl). Die Testplatten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Wenn die zu untersuchende Substanz gegen *B. subtilis* aktiv ist, bildet sich um das Testblättchen ein Hemmhof.

### 2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (MULLIS et al., 1986) ist eine Möglichkeit, spezifische DNA-Segmente von bis zu mehreren Kilobasen Länge enzymatisch zu vervielfältigen. Bei dieser Methode wird Template-DNA, Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) und thermostabile DNA-Polymerase mit zwei sequenzspezifischen Primern zusammen inkubiert und somit die DNA-Synthese eingeleitet. Die Primer sind so gewählt, dass sie dem 5'- bzw. 3'-terminalen Ende des zu amplifizierenden DNA-Segments entsprechen. Durch multiple Zyklen dieses Prozesses wird die DNA exponentiell vervielfältigt. In jedem Zyklus werden zunächst die beiden Stränge der Duplex-DNA durch Hitzedenaturierung getrennt (94-95°C), dann die Primer an die DNA-Stränge angelagert (45-72°C) und schließlich die Stränge durch die Polymerase synthetisiert (68-72°C).

Polymerasen können sich insbesondere durch eine 3'-5'-Exonuklease „proofreading“ Aktivität unterscheiden. Vent-Polymerase, ProofStart-Polymerase, und Platinum® Pfx-Polymerase besitzen diese „Korrekturfunktion“. Ihre Fehlerrate liegt statistisch bei  $8,5 \times 10^{-6}$  im Vergleich zur Fehlerrate der Taq-Polymerasen von  $2,6 \times 10^{-5}$ .

#### 2.2.12.1 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung von subklonierten PCR-Fragmenten in dem pBluescript® II SK (+/-) Vektor bzw. von transformierten Actinomyceten-Stämmen, kann anstelle von isolierter DNA aus einer Bakterien-Kultur auch die ungereinigte DNA einer Bakterien-Kolonie vom Festmedium als Matrize verwendet werden. Dafür wird ein Teil einer Kolonie mit einem Zahnstocher in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) überführt und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst, 3 min bei 95°C inkubiert und 2 min zentrifugiert (13.000 Upm). Für die PCR werden 5 µl des Überstandes eingesetzt. In Tab. 9 ist das PCR-Programm dargestellt.

**Tab. 9:** Übersicht über das für die Kolonie-PCR verwendete Programm.

Komponente	Beschreibung	Menge
Puffer	10 x PCR-Puffer (Roche)	2,5 µl
Primer#1	T3-Primer (30 pmol/µl)	0,5 µl
Primer#2	T7-Primer (30 pmol/µl)	0,5 µl
Nukleotide	dNTP (10 mM)	1 µl
Polymerase	Taq (Roche)	0,25 µl
DNA	Kolonie (Überstand)	5 µl
Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	15,25 µl
Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	3 min	1
94°C	1 min	30
55°C	1 min	30
72°C	2 min	30
72°C	5 min	1
10°C	∞	1

### 2.2.12.2 Screening in Mikrotiterplatten (MTP)

Für das Screening genomischer DNA nach unterschiedlichen Halogenase-Klassen wird die PCR in Mikrotiterplatten (96 Wells) durchgeführt. Für Perhydrolasen, Tryptophan-/Indol-Halogenasen und Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen kann das gleiche PCR-Programm verwendet werden. Der Unterschied bei den Ansätzen besteht nur in dem für die jeweilige Klasse entwickelten Primerpaar.

Die PCR-Fragmente werden anschließend aufgereinigt und für die Sequenzierung in den pBluescript® II SK (+/-) Vektor subkloniert. Als Alternative zur Subklonierung können die PCR-Fragmente durch das Anfügen einer universellen Primerbindestelle (M13) mittels zweiter PCR auch direkt sequenziert werden. In Tab. 10 ist das für alle drei Klassen sowie das für die „M13-PCR“ geltende Programm dargestellt.

**Tab. 10:** Übersicht über das für das Screening verwendete PCR-Programm.

Komponente	Beschreibung	Menge
Puffer	10 x PCR-Puffer (Roche)	5 µl
Primer#1	A-, B- oder C-Klasse-Primer-FW , bzw. M13FW (30 pmol/µl)	1 µl
Primer#2	A-, B- oder C-Klasse-Primer-RV, bzw. M13RV (30 pmol/µl)	1 µl
Nukleotide	dNTP (10 mM)	2 µl
Polymerase	Taq (Roche)	0,5 µl
DMSO	Sigma	2,5 µl

Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	37 µl
DNA	Genomische DNA / PCR-Fragment (M13-PCR)	1 µl
Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	3 min	1
94°C	1 min	30
58°C	1,5 min	30
72°C	1 min	30
72°C	5 min	1
10°C	∞	1

### 2.2.12.3 PCR zur Amplifikation spezifischer Polyketidsynthasegene

Für die genauere Analyse der durch das Screening nach Halogenasegenen identifizierten Biosyntheseegencluster werden mittels PCR weitere für Polyketidsynthasen der Klassen I und II spezifische Gene amplifiziert und sequenziert. In Tab. 11 sind die entsprechenden Programme aufgelistet.

**Tab. 11:** Übersicht über die für das Screening nach spezifischen Polyketidsynthasegenen verwendeten PCR-Programme.

Komponente	Beschreibung	Menge
Puffer	10 x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl
Primer#1	PKSI-KSII-FW (30 pmol/µl)	1 µl
Primer#2	PKSI-AT-I-RV (30 pmol/µl)	1 µl
Nukleotide	dNTP (10 mM)	4 µl
Polymerase	Taq (Qiagen)	0,5 µl
DMSO	Sigma	2,5 µl
Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	35 µl
DNA	Genomische-/Cosmid-DNA	1 µl
Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	3 min	1
94°C	1 min	30
55°C	1 min	30
72°C	2 min	30
72°C	5 min	1
10°C	∞	1
Komponente	Beschreibung	Menge
Puffer	10 x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl
Primer#1	PKSII-FW (30 pmol/µl)	1 µl
Primer#2	PKSII-RV (30 pmol/µl)	1 µl
Nukleotide	dNTP (10 mM)	4 µl

Polymerase	Taq (Qiagen)	0,5 µl
DMSO	Sigma	2,5 µl
Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	35 µl
DNA	Genomische-/Cosmid-DNA	1 µl
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	2 min	1
95°C	1 min	30
72°C	2 min	30
72°C	1,5 min	30
72°C	5 min	1
10°C	∞	1

#### 2.2.12.4 PCR-Programme zur Amplifikation vollständiger Halogenasegene

In Tab. 12 sind verschiedene Programme aufgeführt, die für die Verwendung unterschiedlicher Polymerasen genutzt werden. Zur Amplifikation und anschließenden Klonierung in entsprechende Expressionsvektoren werden Polymerasen mit „proofreading“ Aktivität verwendet.

**Tab. 12:** Übersicht über verschiedene Programme für Polymerasen mit „proofreading“ Aktivität.

Komponente	Beschreibung	Menge
Puffer	10 x PCR-Puffer (ProofStart)	10 µl
Primer#1	FW (30 pmol/µl)	2 µl
Primer#2	RV (30 pmol/µl)	2 µl
Nukleotide	dNTP (10 mM)	3 µl
Polymerase	ProofStart (Qiagen)	2 µl
Q-Solution (5 x)	Qiagen	20 µl
Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	57 µl
DNA	Genomische-/Cosmid-DNA	4 µl
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	1
94°C	1 min	35
50-68°C	1,5 min	35
72°C	2 min	35
10°C	∞	1
Komponente	Beschreibung	Menge
Puffer	10 x PCR-Puffer (Pfx)	10 µl
Primer#1	FW (30 pmol/µl)	3 µl
Primer#2	RV (30 pmol/µl)	3 µl
Nukleotide	dNTP (10 mM)	3 µl
Polymerase	Platinum <sup>®</sup> Pfx (Epicentre)	1 µl

MgSO <sub>4</sub>	Epicentre	3 µl
Enhancer (10 x)	Epicentre	10 µl
Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	64 µl
DNA	Genomische-/Cosmid-DNA	3 µl
Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	2 min	1
94°C	15 s	30
45-65°C	30 s	30
68°C	2 min	30
68°C	5 min	1
10°C	∞	1
Komponente	Beschreibung	Menge
Puffer	10 x PCR-Puffer (Vent)	10 µl
Primer#1	FW (30 pmol/µl)	2 µl
Primer#2	RV (30 pmol/µl)	2 µl
Nukleotide	dNTP (10 mM)	4 µl
Polymerase	Vent (NEB)	1 µl
DMSO	Sigma	5 µl
Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	74 µl
DNA	Genomische-/Cosmid-DNA	2 µl
Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	3 min	1
94°C	1 min	30
55-65°C	1,75 min	30
72°C	2 min	30
72°C	5 min	1
10°C	∞	1

### 2.2.12.5 PCR zur Qualitätskontrolle von isolierter genomischer DNA

Zur Kontrolle der aus Actinomyceten isolierten genomischen DNA wird eine PCR zur Amplifikation von konservierten DNA-Bereichen durchgeführt. Das Programm ist in Tab. 13 dargestellt.

**Tab. 13:** PCR-Programm zur Amplifikation des konservierten 16S rRNA-kodierenden Bereiches als DNA-Qualitätskontrolle.

Komponente	Beschreibung	Menge
Puffer	10 x PCR-Puffer (Roche)	2 µl
Primer#1	16sRNA-FW (30 pmol/µl)	0,25 µl
Primer#2	16sRNA-RV (30 pmol/µl)	0,25 µl
Nukleotide	dNTP (10 mM)	0,25 µl
Polymerase	Taq (Roche)	0,25 µl

Glycerin (50%)	VWR	2 µl
Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	14 µl
DNA	Genomische-DNA	1 µl
Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	2 min	1
94°C	1 min	30
67°C	1 min	30
72°C	2 min	30
72°C	5 min	1
10°C	∞	1

### 2.2.13 Herstellung von Cosmid-Genbanken

Die Methode der Genbankherstellung basiert im Wesentlichen auf Protokollen, die von BEYE et al., 1998 und BURGTORF et al., 1998 beschrieben wurden. Homogenisierte Bakterienkulturen werden in 0.5% "low melting point agarose" eingebettet und anschließend mit 2 mg/ml Lysozym für 14 h bei Raumtemperatur und mit 1 mg/ml Proteinase K für 24 h bei 50°C inkubiert. Die eingebettete DNA wird partiell mit *Sau3AI* gespalten, mit Gelase extrahiert und nach beschriebenen Methoden dephosphoryliert. Die partiell verdaute genomische DNA wird mit 750 ng *Bam*HI gespaltenem Cosmidvektor (pOJ436) ligiert, entsalzt und verpackt. Anschließend werden damit DH5α Zellen transfiziert. Cosmidklone werden in 384er MTP gepickt und auf Nylonfilter gespottet. Nachdem die Kolonien auf den Membranen gewachsen sind, werden diese nach NIZETIC et al., 1991 prozessiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Cosmid-Genbanken wurden von der Gruppe „Genomics“ der Combinature Biopharm AG hergestellt. Die Cosmid-Genbank zur Auffindung der Halogenase aus dem Avoparcin-Cluster wurde von Agnieszka Dziarnowski hergestellt.

### 2.2.14 Screening von Cosmid-Genbanken

Zur Sondenherstellung werden gereinigte PCR-Fragmente, subklonierte DNA-Fragmente oder genomische DNA als Template für die Markierung mit Digoxigenin eingesetzt. Die Markierung erfolgt mit dem DIG-High-Prime<sup>®</sup>-Kit.

Für die Prähybridisierung werden die Filter in Schalen mit ca. 50 ml Church-Puffer bei 65°C für 4 h inkubiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung. Dafür wird die Sonde (5-25 ng/ml Hybridisierungslösung) mit TE-Puffer auf ein Volumen von 20 µl

aufgefüllt, 10 min bei 95°C denaturiert und auf eine EtOH/Eis-Mischung zum Abkühlen gestellt. Die Prähybridisierungslösung wird verworfen, die Sonde mit ca. 25 ml vorgewärmten (65°C) Church-Puffer gemischt und unter Schwenken sofort auf dem Filter verteilt. Die Hybridisierung erfolgt dann über Nacht bei 65°C im Schüttelinkubator.

Der mit der Sonde hybridisierte Filter wird für die Detektion 2 x 15 min gewaschen (2 x SSC/0,1% SDS). Danach erfolgt zweimal für 15 min eine Inkubation bei 65°C mit 0,1 x SSC/0,1% SDS (heterologe Sonden) bzw. 0,5 x SSC/0,1% SDS (homologe Sonden). Die SDS-Lösung wird anschließend mit 1 x Tween-Waschpuffer bei Raumtemperatur abgespült (5 min). Frisch hergestellter Blockpuffer (50 ml) wird danach bei Raumtemperatur für 45 min mit dem Filter inkubiert. Nach Verwerfen des Blockpuffers wird der Filter mit Anti-Dig-AP<sup>®</sup> (0,5 µl/10 ml Blockpuffer) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Filter wird 2 x 15 min Tween-Waschpuffer und 2 x 10 min Detektions-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Als letzter Schritt wird der Filter 5 min in Detektions-Puffer (0,5 ml Attophos<sup>®</sup>/10 ml Puffer) und anschließend zwischen zwei Folien für 2-24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Scannen und der Auswertung des Filters werden die in der Hybridisierung mit der eingesetzten Sonde positiven Cosmide mittels PCR und Southern Blot bestätigt.

### **2.2.15 Southern Blot**

Als Southern Blot bezeichnet man den Transfer von DNA auf Nylonmembranen. Dafür werden die mittels Hybridisierung identifizierten Cosmide mit *Bam*HI geschnitten und in einem Agarosegel (1%) aufgetrennt. Das Gel wird anschließend 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt und zur Denaturierung der DNA in Denaturierungs-Puffer für 30 min inkubiert. Zur Neutralisierung wird es in Neutralisierungs-Puffer inkubiert. Zwischen den Schritten wird das Gel kurz mit dest. Wasser gespült. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgt über Nacht mittels Kapillarblot. Als Puffer wird 20 x SSC verwendet. Anschließend wird die Membran getrocknet und die DNA mithilfe eines UV-Crosslinkers (2 min) irreversible an der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgt analog zu der oben beschriebenen Hybridisierung. Unterschiedlich ist nur die Konzentration der Anti-Dig-AP<sup>®</sup>-Lösung (2 µl/10 ml Blockpuffer).

## 2.2.16 Sequenzierungen und Sequenzanalysen

Die Sequenzierungen werden von den Firmen Agowa, GATC Biotech, SeqLab und der MWG Biotech AG durchgeführt. Dafür wird über Qiagen-Säulen aufgereinigte DNA in entsprechenden Konzentrationen verwendet. Die Qualität der Sequenzierläufe kann mit dem Programm Chromas<sup>®</sup> beurteilt werden. Die erhaltenen Sequenzen werden sowohl mit Nukleinsäuredatenbanken als auch mit Proteinsequenzdatenbanken verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Die Analyse der Leserahmen (ORF-Analyse) und die Übersetzung in Proteinsequenzen werden mit dem Programm DNASIS 2.1 unter Verwendung der für Streptomycceten geltenden Codon-usage-Tafel (Abb. 20) durchgeführt.

AS	Triplet	[%]	AS	Triplet	[%]	AS	Triplet	[%]	AS	Triplet	[%]
F	TTT	1.6	S	TCT	1.1	Y	TAT	5.0	C	TGT	12.0
F	TTC	98.4	S	TCC	39.1	Y	TAC	95.0	C	TGC	88.0
L	TTA	0.4	S	TCA	2.4	*	TAA	4.0	*	TGA	81.0
L	TTG	2.6	S	TCG	27.4	*	TAG	15.0	W	TGG	100.0
L	CTT	2.0	P	CCT	2.7	H	CAT	6.5	R	CGT	7.3
L	CTC	38.5	P	CCC	42.4	H	CAC	93.5	R	CGC	45.0
L	CTA	0.3	P	CCA	1.6	Q	CAA	6.1	R	CGA	3.7
L	CTG	56.1	P	CCG	53.3	Q	CAG	93.9	R	CGG	37.7
I	ATT	4.4	T	ACT	2.2	N	AAT	4.6	S	AGT	2.9
I	ATC	92.0	T	ACC	65.2	N	AAC	95.4	S	AGC	27.1
I	ATA	3.6	T	ACA	2.4	K	AAA	5.8	R	AGA	1.1
M	ATG	100.0	T	ACG	30.2	K	AAG	94.2	R	AGG	5.2
V	GTT	2.8	A	GCT	2.3	D	GAT	4.7	G	GGT	8.7
V	GTC	56.0	A	GCC	58.7	D	GAC	95.3	G	GGC	64.2
V	GTA	2.5	A	GCA	4.3	E	GAA	17.7	G	GGA	8.9
V	GTG	38.8	A	GCG	34.7	E	GAG	82.3	G	GGG	18.2

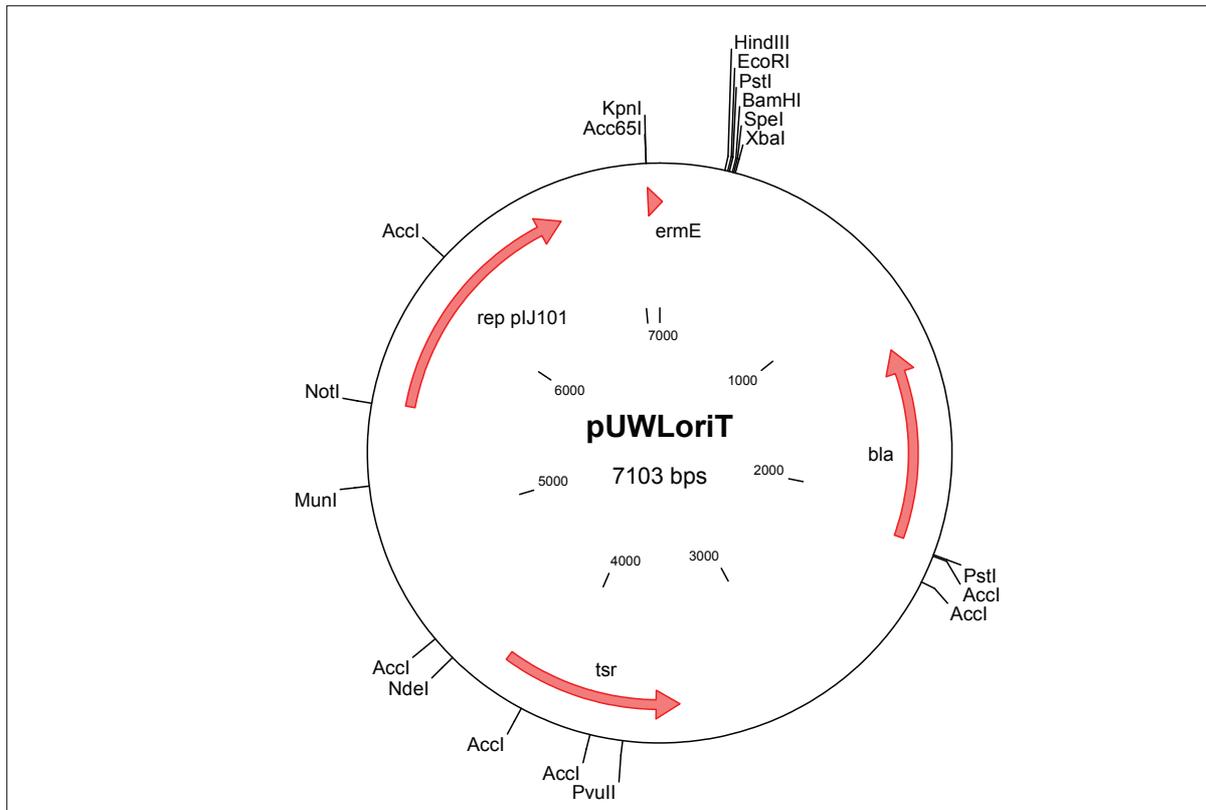
**Abb. 20:** Codon-usage-Tafel für Streptomycceten (KIESER et al., 2000). Dargestellt ist die statistische Häufigkeit in Prozent der von Streptomycceten verwendeten Basen-Triplets (Codons) für die jeweilige Aminosäure (AS) anhand von 100 Genen.

Streptomycceten verwenden zu 61% ein ATG, zu 36% ein GTG und zu 3% ein TTG als Startcodon. Die ribosomale Bindestelle befindet sich 5-9 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstartcodons mit der hoch konservierten Sequenz 5'---GGAGG---ATG/GTG/TTG---3' (STROHL, 1992).

Für die Erstellung von Vektor- bzw. Plasmidkarten wird das Programm Clone Manager 6 verwendet. Sequenzvergleiche zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume erfolgen mit den Programmen ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) und ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>). Für die grafische Darstellung der erzeugten phylogenetischen Stammbäume wird das Programm TrievView benutzt (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

### 2.2.17 Heterologe Expression von Halogenasegenen in *S. lividans*

Um Halogenasen in Enzymtests auf Aktivität bzw. Substratspezifität zu untersuchen, werden die sie kodierenden Gene heterolog exprimiert. Dafür wird *S. lividans* wie in 2.2.8 beschrieben transformiert und anschließend die positiven Transformanten in TSB-Medium + Thiostrepton für 2 Tage (100 ml Hauptkultur) kultiviert. Für die Expression wird der replikative Vektor pUWL201oriT verwendet, der über einen konstitutiven Promotor verfügt (Abb. 21). Alle Gene werden über die Schnittstellen *HindIII* und *SpeI* kloniert, wenn keine internen Schnittstellen vorhanden sind.



**Abb. 21:** Vektorkarte von pUWL201oriT.

Die zentrifugierten Zellen werden mit 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer (FADH<sub>2</sub>-Halogenasen) bzw. 100 mM Natriumacetat-Puffer (Perhydrolasen) gewaschen und das Pellet anschließend in 2-3 ml Aufschlusspuffer aufgenommen. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt der Zellaufschluss mittels French<sup>®</sup> Press (1.000 psi). Das Zelllysate wird 30 min bei 20.000 Upm zentrifugiert, und der Überstand kann als Rohextrakt in Enzymtests eingesetzt werden.

### 2.2.18 Heterologe Expression von Cosmiden in *S. albus*

Um Naturstoffe heterolog zu produzieren, werden die sie kodierenden Biosynthesegencluster in den nicht-replikativen Vektor pOJ436 (Abb. 22) kloniert (2.2.13). Dieser kann mittels site-spezifischer Integration über die  $\Phi$ C31-attachement-site in das Streptomycetenchromosom integrieren. Dafür wird *S. albus* konjugiert und die Transkonjuganten in entsprechenden Produktionsmedien wie beschrieben kultiviert.

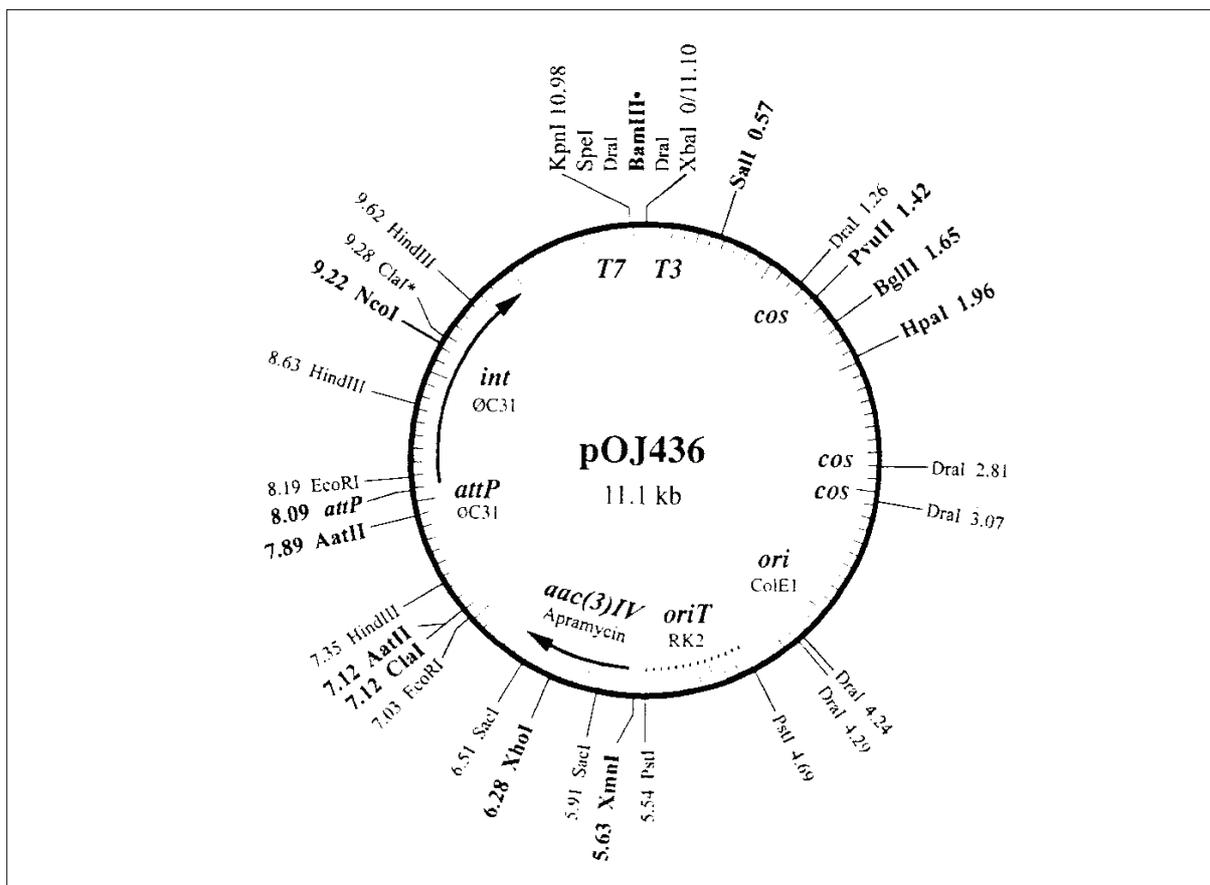


Abb. 22: Vektorkarte von pOJ436. Entnommen aus KIESER et al., 2000.

### 2.2.19 Heterologe Expression von Halogenasegenen in *A. balhimycina* und *S. toyocaensis*

Für die kombinatorische Biosynthese mit Halogenasen zur Derivatisierung von Naturstoffen werden die Halogenasegene unter Verwendung der Schnittstellen *HindIII* und *SpeI* in den nicht-replikativen Vektor pSET152ermE $\Delta$ HindIII (Abb. 23) kloniert. Dieser verfügt ebenfalls über den konstitutiven *ermE*\*p-Promotor (BIBB et al., 1985 und SCHMITT-JOHN & ENGELS, 1992). Die Integration erfolgt analog zu dem pOJ436 über die  $\Phi$ C31-attachment-site sowohl in das Chromosom von *A. balhimycina* (PH4), als auch in das Chromosom von *S. toyocaensis*. Zur Untersuchung auf neue Sekundärmetabolite werden die transformierten Stämme in R5-Medium und auf R5-Platten wie beschrieben kultiviert.

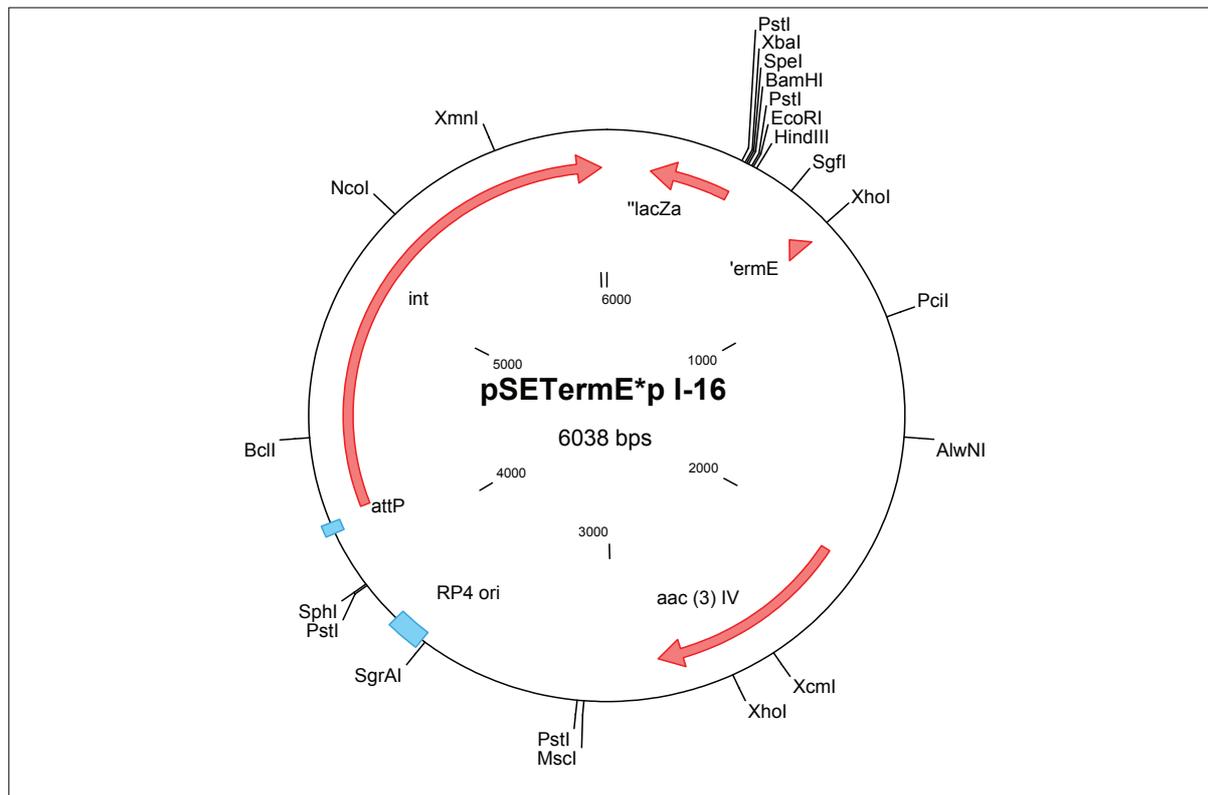


Abb. 23: Vektorkarte von pSET152ermE $\Delta$ HindIII.

### 2.2.20 Synthese von Monochlordimedon

Monochlordimedon wird als Substrat zur Testung der Enzymaktivität von Perhydro-lasen eingesetzt. Für die Synthese werden 7 g Dimedon in 100 ml NaOH (1 N) gelöst und in einem Rundkolben vorgelegt. Bei Raumtemperatur werden unter ständigem Rühren 71 g wässrige NaOCl-Lösung (5,25%) langsam zugetropft (30 min). Nebenprodukte werden mit 2 x 60 ml Diethylether extrahiert. Zu der wässrigen Phase

werden unter ständigem Rühren auf Eis 175 ml HCl (1 N) langsam zugetropft (45 min). Zu dem ausgefallenen abgenutzten Produkt wird etwas kalter EtOH gegeben. Unter leichtem Erwärmen wird die Substanz gelöst und zum Umkristallisieren durch einen Filter in ein Becherglas gekippt, das in einer Wasser-/Eismischung steht. In dem Becherglas kristallisiert dann das Produkt (Monochlordimedon) unter Reiben mit einem Glasstab aus.

### 2.2.21 HPLC-DAD-ESI-MS

Für die Analyse der entstehenden Reaktionsprodukte in den Enzymtests (FADH<sub>2</sub>-Halogenasen) und für das Screening nach halogenierten Sekundärmetaboliten wird ein gekoppeltes HPLC-DAD-ESI-MS-System verwendet. Mithilfe der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) werden die zu untersuchenden Substanzgemische zuerst nach Polaritäten getrennt und mittels Diodenarraydetektor (DAD) detektiert. Das HPLC-System ist mit einem Massenspektrometer (MS) zur Bestimmung der Molekülmassen gekoppelt. Die Ionenerzeugung erfolgt mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI). Durch die an der Ionenquelle angelegte Hochspannung (2-6 kV) werden kleine geladene Tröpfchen erzeugt, die je nach Polarität der angelegten Spannung positive oder negative Ladungen tragen. Diese geladenen Tröpfchen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und anschließend in einem Magnetfeld (Analysator), je nach Masse, unterschiedlich stark abgelenkt. Am Ende des Analysatorrohres werden die Teilchen von einem Ionensammler aufgefangen und erzeugen ein elektrisches Signal.

Sämtliche Analysen der Glykopeptide wurden von Dr. Marcelo Bertazzo an der Universität Tübingen durchgeführt. In den Tab. 14-16 sind unterschiedliche Gradienten aufgeführt.

**Tab. 14:** HPLC-Gradient Test-1. Das Injektionsvolumen beträgt 20 µl. Säule: Grom Sil 120 ODS-4 HE, 40 x 4 mm, 3 µm.

Lösungsmittel A [%] Ameisensäure (0,1%)	Lösungsmittel B [%] Acetonitril	Zeit [min]	Flussrate [ml/min]
98	2	0-5	1
16,7	83,3	5-6	1
4	96	6-8	1,7
4	96	8-8,5	1,7
98	2	8,5-10	1

**Tab. 15:** HPLC-Gradient Test-2. Das Injektionsvolumen beträgt 20 µl. Säule: Grom Sil 120 ODS-4 HE, 40 x 4 mm, 3 µm.

Lösungsmittel A [%] Ameisensäure (0,1%)	Lösungsmittel B [%] Acetonitril	Zeit [min]	Flussrate [ml/min]
80	20	0-7	1
0	100	7-9	1,7
0	100	9-9,5	1,7
80	20	9,5-10	1

**Tab. 16:** HPLC-Gradient Test-3. Das Injektionsvolumen beträgt 100 µl. Säule: Purospher-Star RP-18e, 125 x 4 mm, 5 µm.

Lösungsmittel A [%] TFA (0,1%) / Wasser	Lösungsmittel B [%] TFA (0,1%) / Acetonitril	Zeit [min]	Flussrate [ml/min]
100	0	0-1	1,5
90	10	1-3	1,5
88	12	3-8	1,5
60	40	8-14	1,5

## 2.2.22 Enzymaktivitätstests

### 2.2.22.1 Enzymtest zum Nachweis der Aktivität von Perhydrolasen

Für den Nachweis von Perhydrolase-Aktivität wird Monochlordimedon (HAGER et al., 1966 und WIESNER et al., 1988) oder Phenolrot (BANTLEON et al., 1994) als Substrat eingesetzt. Die Pipettierschemata sind in Tab. 17 dargestellt. Die Reaktion erfolgt bei 40°C für 0-120 min in einem Volumen von 500 µl.

**Tab. 17:** Pipettierschemata des Enzymaktivitätstests (Perhydrolasen).

Komponente	Beschreibung	Menge
Monochlordimedon	Synthetische Herstellung	44 µM
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth (30%)	7,2 mM
NaCl oder NaBr	2 M (Stammlösung)	82 mM
Natriumacetat-Puffer (pH 5,5)	1 M (Stammlösung)	100 mM
Rohextrakt	Enzym (Perhydrolase)	50 µl/500 µl Ansatz
Komponente	Beschreibung	Menge
Phenolrot (1 mg/ml Puffer)	Carl Roth	50 µl
Wasserstoffperoxid (3%)	Carl Roth	4 µl
NaBr	2 M (Stammlösung)	21 µl
NaN <sub>3</sub>	2 M (Stammlösung)	50 µl
Natriumacetat-Puffer (pH 5,5)	1 M (Stammlösung)	50 µl
Rohextrakt	Enzym (Perhydrolase)	50 µl
Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	275 µl

### 2.2.22.2 Enzymtest zum Nachweis der Aktivität von FADH<sub>2</sub>-Halogenasen

Für den Nachweis von Halogenase-Aktivität (Tryptophan-Halogenasen) wird das postulierte Substrat L-Tryptophan eingesetzt. In Analogie zu bereits beschriebenen Enzymtests für Tryptophan-7-Halogenasen, wird die Zusammensetzung des Enzymtests von HOHAUS et al., 1997, KELLER et al., 2000 und HÖLZER et al., 2001 übernommen. Zur Testung von anderen FADH<sub>2</sub>-Halogenasen wird Tryptophan durch das jeweilige Substrat, bei Beibehaltung der Konzentrationen, ersetzt. Das Pipettierschema ist in Tab. 18 dargestellt. Die Reaktion erfolgt bei 30°C für 16 h in einem Volumen von 1000 µl. Für die weitere Analyse mittels HPLC-MS (Gradient: Test-1; positiver und negativer Modus) werden die Proben 5 min bei 95°C erhitzt und die ausgefallenen Proteine bei 13.000 Upm abzentrifugiert.

**Tab. 18:** Pipettierschemata des Enzymaktivitätstests (FADH<sub>2</sub>-Halogenasen).

Komponente	Beschreibung	Menge
NADH	24 mM (Stammlösung)	2,4 mM
FAD	1 mM (Stammlösung)	10 µM
NaCl	2 M (Stammlösung)	100 mM
L-Tryptophan / Substrat X	10 mM (Stammlösung)	0,6 mM
K-Phosphat-Puffer (pH 7,2)	200 mM (Stammlösung)	10 mM
Rohextrakt	Enzym (FADH <sub>2</sub> -Halogenase)	500 µl
Wasser	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	232 µl

### 2.2.23 Chemisches Screening nach halogenierten Naturstoffen

Wildtypstämme werden für das chemische Screening aus einer Glycerinkultur auf einer Agarplatte ausplattiert, für zwei Tage als Vorkultur wie oben beschrieben kultiviert und dann für die Produktion in unterschiedlichen Produktionsmedien (E1, AM und R5) fermentiert. Zusätzlich wird die Produktion auch auf den jeweiligen Festmedien untersucht. Die Probennahme erfolgt nach 72 h, 96 h und 120 h. Bei der Produktion in Flüssigmedien wird zu dem jeweiligen Zeitpunkt 1 ml Hauptkultur mit 1 ml Ethylacetat gemixt, für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt und der Überstand nach einer Zentrifugation in der Speed Vac<sup>®</sup> bis zur Trockene eingengt. Bei der Produktion auf Agarplatten werden die bewachsenen Platten in 1 cm<sup>2</sup> große Blöckchen geschnitten und mit 5 ml Ethylacetat extrahiert. Nach der Ultraschallbehandlung werden 2 ml Überstand bis zur Trockene eingengt. Für die HPLC-MS-Analyse werden die Proben in 100 µl MeOH aufgenommen (Gradienten: Test-1 und

Test-2; positiver und negativer Modus). Für die Untersuchungen der Glykopeptide wird zentrifugierter Kulturüberstand direkt zur HPLC-MS-Analyse eingesetzt (Gradient: Test-3; positiver Modus).

Ob halogenierte Substanzen produziert werden, kann anhand des für Halogene (Chlor und Brom) charakteristischen Isotopenmusters im Massenspektrum festgestellt werden. Im Fall von Chlor handelt es sich um die Isotope  $^{35}\text{Cl}$  (75,8%) und  $^{37}\text{Cl}$  (24,2%). Die Brom-Isotope  $^{79}\text{Br}$  und  $^{81}\text{Br}$  kommen in der Natur in einer Häufigkeit von 50,7% bzw. 49,3% vor. Isotopenverteilungen und Massenspektren können mit dem Programm IsoPro 3.0 (<http://www.ionsource.com/links/programs.htm>) simuliert werden.

## **2.2.24 Substanzaufreinigung und Strukturaufklärung**

### **2.2.24.1 Aufreinigung von Sekundärmetaboliten**

Für die Aufreinigung von Metaboliten aus Fermentationsbrühen werden die Stämme zuerst in Produktionsmedien oder auf Agarplatten kultiviert und anschließend mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert. Produzierte Naturstoffe können sich sowohl im Myzel als auch im Kulturfiltrat befinden. Beide Fraktionen müssen deshalb getrennt aufgearbeitet werden. Im Fall der Glykopeptide wird der Kulturüberstand ohne Extraktion weiterverarbeitet.

Der erste Aufreinigungsschritt nach der Extraktion ist eine Säulenchromatographie. Bei dieser Chromatographieart (LSC) wird ein Substanzgemisch von einer mobilen flüssigen Phase an einer stationären festen Phase vorbeigeführt (Liquid-Solid-Chromatography). Dabei findet laufend ein Stoffaustausch der zu trennenden Substanzen zwischen stationärer und mobiler Phase statt. Je nach verwendeten Säulenmaterialien erfolgt die Auftrennung des Substanzgemisches entweder aufgrund unterschiedlicher Polaritäten (Adsorptionschromatographie: Kieselgel, XAD 1180) oder unterschiedlicher Molekülgrößen (Größenausschlusschromatographie: Sephadex, Biogel P2). Die unterschiedlichen Fraktionen werden in einem Fraktionssammler aufgefangen und auf ihre Reinheit hin mittels Dünnschichtchromatographie (DC) oder HPLC-MS überprüft.

Zum Detektieren der unterschiedlichen Substanzen wird die DC-Platte zuerst unter eine UV-Lampe gehalten ( $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$  und  $\lambda_2 = 365 \text{ nm}$ ) und anschließend mit

Sprühreagenz angefärbt. Gleiche Fraktionen werden vereinigt, einrotiert und weiterverarbeitet.

Für den zweiten Aufreinigungsschritt kann eine etwas kleinere Säule mit einer anderen Lösungsmittelzusammensetzung verwendet werden. Alternativ können die Substanzen mittels präparativer HPLC weiter gereinigt werden. Schritt drei ist eine Größenausschlusschromatographie. Falls die Substanz noch nicht sauber ist, wird noch eine weitere Adsorptionschromatographie durchgeführt. Für die Struktur- aufklärung werden 1-5 mg Reinsubstanz benötigt.

#### **2.2.24.2 Strukturaufklärung**

Die hochauflösende Massenspektrometrie liefert Hinweise auf die Summenformel des Moleküls. Für die eigentliche Strukturaufklärung müssen verschiedene NMR-Experimente (Nuclear Magnetic Resonance bzw. Kernresonanzspektroskopie) durchgeführt werden. Sämtliche NMR-Experimente und deren Datenauswertung wurden von der Abteilung „Lead Characterization & Production“ der Combinature Biopharm AG sowie der Arbeitsgruppe von Prof. Roderich Süßmuth (TU Berlin) durchgeführt.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Experiment liefert Hinweise auf die Protonenverteilung, die Anzahl der Gruppen äquivalenter Protonen, die Art der Protonengruppen, die Zahl der die Signale verursachenden Protonen und die Stellung der Protonengruppen zueinander. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experiment liefert dahingegen Daten über Art und Anzahl der im Molekül vorhandenen Kohlenstoffatome. Der Einsatz von 2D-Experimenten ermöglicht es, die Nachteile eines 1D-NMR-Experiments zu umgehen und zusätzliche Informationen über das zu untersuchende Molekül zu gewinnen. Es gibt Experimente, die räumlich benachbarte (NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), durch chemische Bindungen benachbarte (COSY: Correlation Spectroscopy) oder alle Signale eines ganzen Spinsystems (TOCSY: Total Correlation Spectroscopy) miteinander in Verbindung bringen. Weitere heteronukleare Techniken sind das HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)- und HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)-Experiment.

### 2.2.25 Isolierung von Naphthomevalin aus dem Stamm CB2365

Eine Vorkultur (TSB-Medium) des Stammes CB2365 wird für 48 h bei 160 Upm und 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur werden ca. 500 E1-Agarplatten beimpft, bei 30°C inkubiert und nach 120 h zerkleinert. Die zerkleinerten Agarstücke werden anschließend zweimal nach 15 min Ultraschallbehandlung mit Ethylacetat extrahiert. Die bis zur Trockene einrotierte Ethylacetat-Phase wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1) gelöst und über eine Kieselgelsäule chromatographisch aufgetrennt. Fraktionen, die Naphthomevalin enthalten, werden vereinigt, einrotiert, in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (7:3) gelöst und über eine zweite Kieselgelsäule aufgetrennt. Wieder werden die Fraktionen, die Naphthomevalin enthalten, vereinigt, einrotiert und in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (7:3) gelöst. Für den letzten Trennschritt wird eine Sephadex LH-20 Säule verwendet (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (7:3)).

### 2.2.26 Isolierung von CBS40 und Dechlor-CBS40

Für die heterologe Expression des CBS40-Biosynthesegenclusters wird das entsprechende Cosmid mittels Konjugation nach *S. albus* transferiert und bei 30°C in TSB (25 µl/ml Apramycin, 400 µl/ml Phosphomycin) für 48 h kultiviert. Für die Produktion werden 5 l R5-Medium (25 µl/ml Apramycin) angeimpft und 120 h kultiviert. Die Fermentation erfolgt in 50 Kolben, die mit je 100 ml Medium befüllt werden. Das Kulturfiltrat wird mit HCl auf pH 3 eingestellt und zweimal nach einer Ultraschallbehandlung mit Ethylacetat extrahiert. Die bis zur Trockene einrotierte Ethylacetat-Phase wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1) gelöst und über eine Kieselgelsäule chromatographisch aufgetrennt. Fraktionen, die CBS40 enthalten, werden vereinigt, einrotiert, in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (7:3) gelöst und über eine zweite Kieselgelsäule aufgetrennt. Wieder werden die Fraktionen, die CBS40 enthalten, vereinigt, einrotiert und in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (7:3) gelöst. Für den letzten Trennschritt wird eine Sephadex LH-20 Säule verwendet (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (7:3)).

Zur Isolierung von Dechlor-CBS40 wird statt R5-Medium modifiziertes E1-Medium (5 g/l NaBr anstelle von 3 g/l NaCl und dest. Wasser anstelle von Leitungswasser) verwendet. Extraktion sowie säulenchromatographische Aufreinigung verlaufen analog zu CBS40. Nach der Sephadex LH-20 Säule erfolgt ein zusätzlicher Reinigungsschritt mittels präparativer HPLC (Flussrate: 10 ml/min). Wässrige Fraktionen werden anschließend lyophilisiert.

### **2.2.27 Isolierung von MM 47761 aus dem Stamm CB2364**

Für die Produktion von MM 47761 werden 30 l R5-Medium verwendet. Die Fermentation erfolgt in 500 ml Erlenmeyerkolben für 120 h bei 30°C. Das Kulturfiltrat wird über eine XAD-Säule (60 x 8 cm) aufgereinigt (Gradient: Wasser/MeOH (1:0), Wasser/MeOH (4:2), Wasser/MeOH (3:2), Wasser/MeOH (2:3), Wasser/MeOH (2:4), Wasser/MeOH (0:1). Fraktionen, die MM 47761 enthalten, werden vereinigt, einrotiert und lyophilisiert. Eine weitere Aufreinigung erfolgt mittels Biogel P2 Säule (60 x 4 cm). Zuerst wird mit dest. Wasser gewaschen und anschließend mit Wasser/TFA (0,1%) eluiert. Der letzte Aufreinigungsschritt erfolgt mittels präparativer HPLC (Gradient: Test-3, Flussrate: 15 ml/min).

Die Isolierung der Verbindung MM 47761 wurde von Dr. Marcelo Bertazzo an der Universität Tübingen durchgeführt.

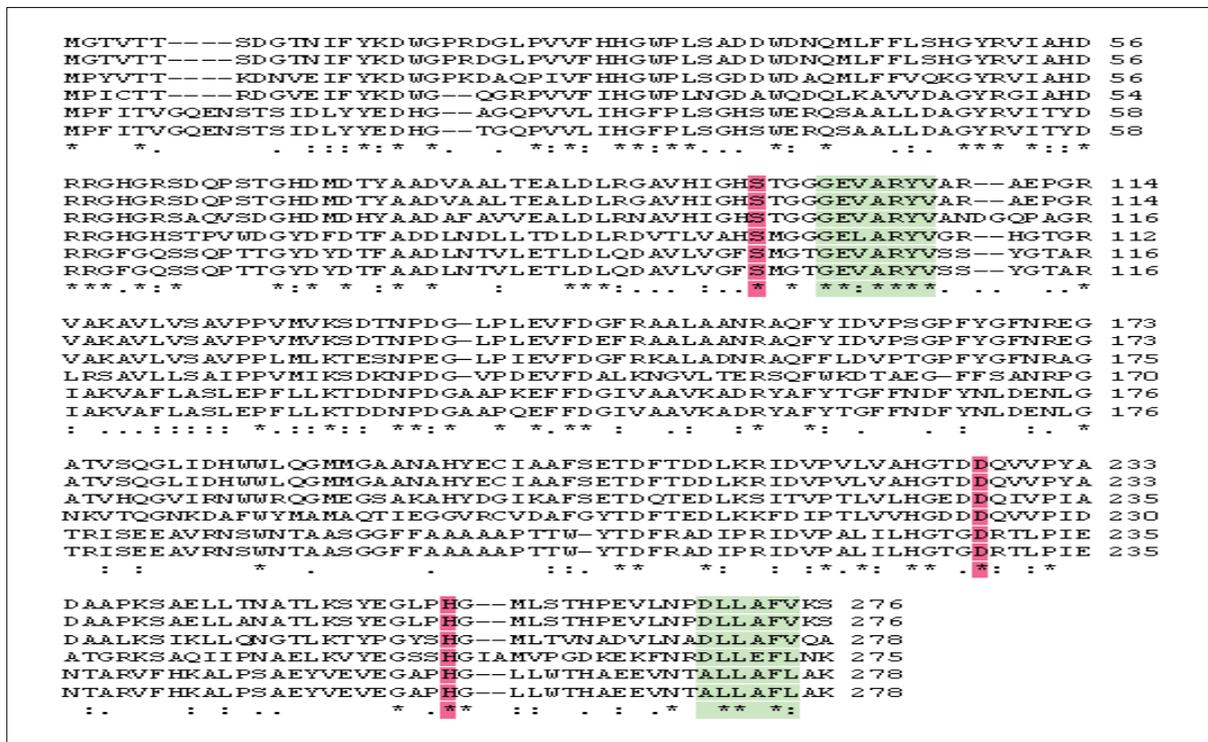
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Perhydrolasen

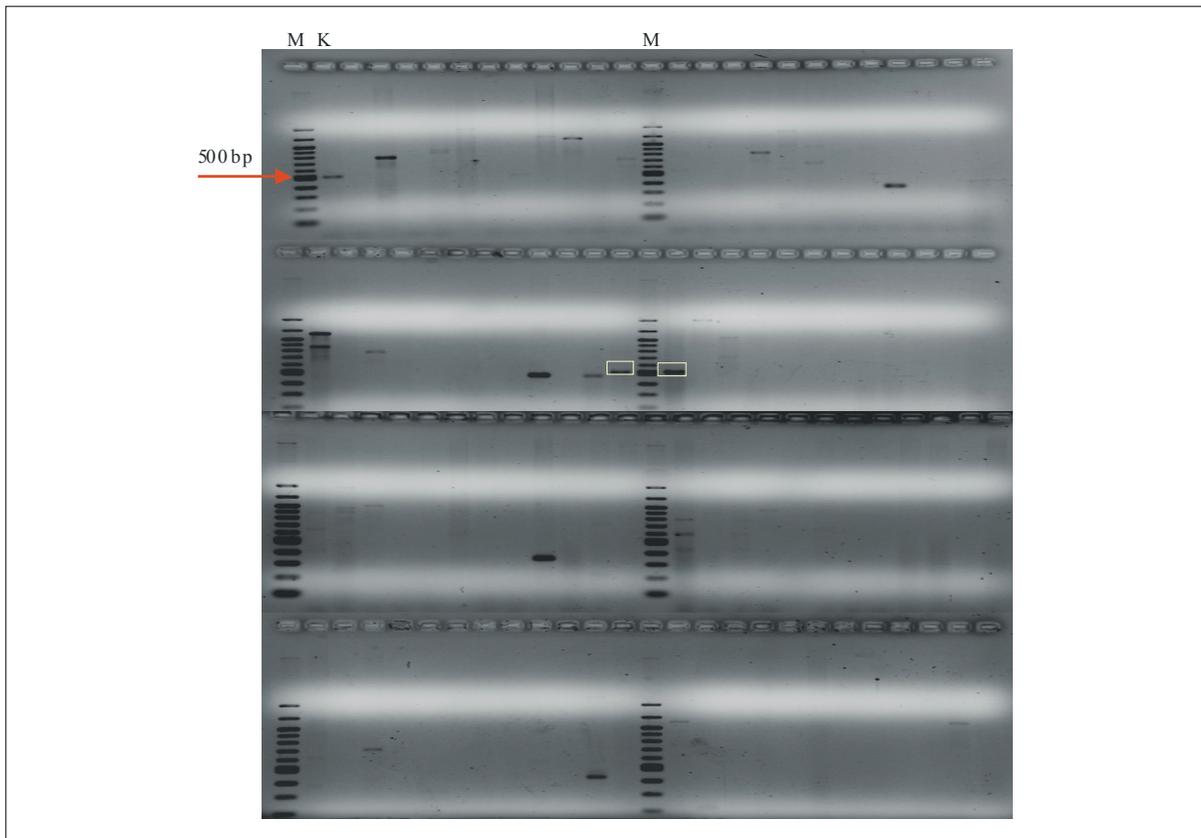
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Actinomyceten-Stammsammlung nach neuen Perhydrolasen (s. Punkt 1.2.3) durchmustert, um diese zuerst nach beschriebenen Enzymtests (HAGER et al., 1966, WIESNER et al., 1988, BANTLEON et al., 1994 und BURD et al., 1995) hinsichtlich ihrer Aktivität zu untersuchen. Anschließend sollte ihre Substratflexibilität charakterisiert werden.

##### 3.1.1 Identifizierung neuer Perhydrolasen

Für das Perhydrolase-Screening wurden spezifische PCR-Primer entwickelt und getestet. Dafür wurde ein Sequenzalignment mit 6 der zu Beginn der Arbeit in der Proteinsequenzdatenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information) bereits publizierten Perhydrolasen durchgeführt (Abb. 24).

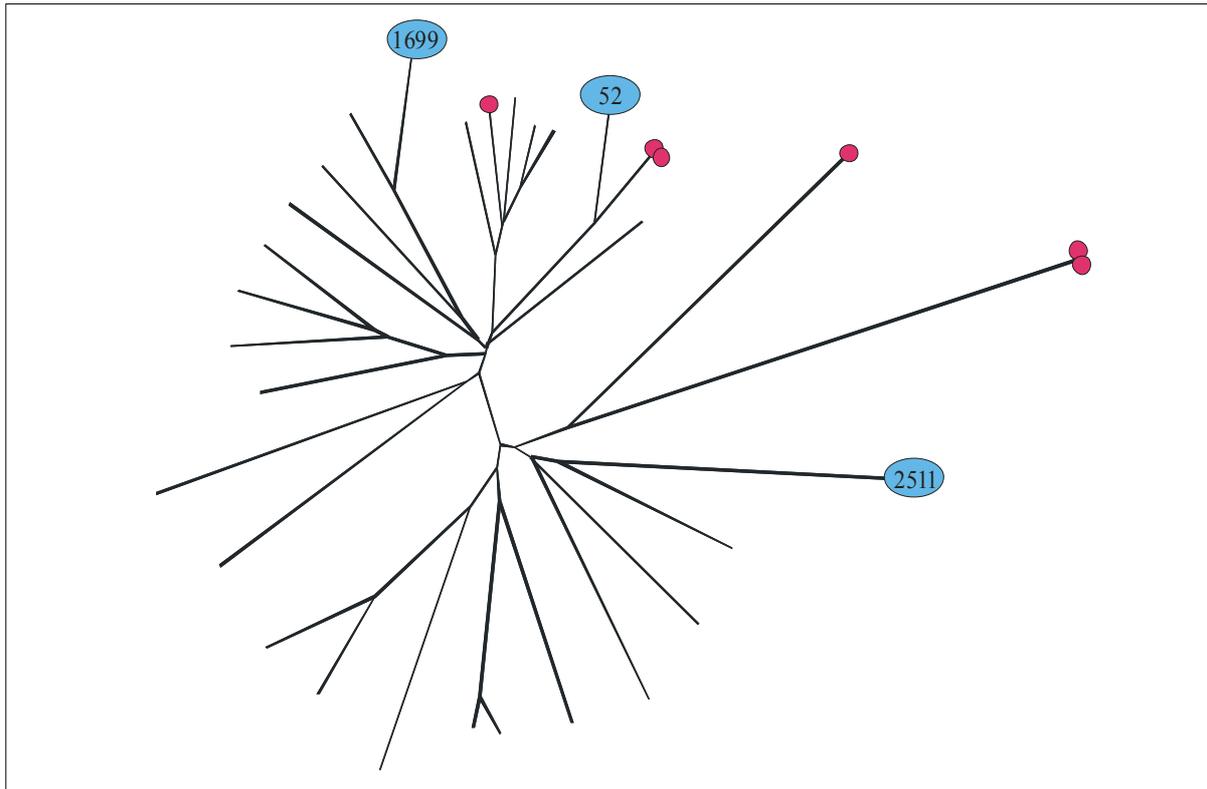


Als Kontrolle wurde die Halogenase BPOA2 aus dem Stamm *S. aureofaciens* verwendet. Unter Verwendung der Primer Halo-A1-FW/Halo-A1-RV konnte unter den in Material und Methoden beschriebenen Bedingungen ein PCR-Fragment der Größe von ca. 520 bp amplifiziert werden, was der erwarteten Größe entsprach. Mit diesem Primerpaar wurde die genomische DNA von ca. 250 Stämmen in Mikrotiterplatten nach Perhydrolasen durchmustert. Fragmente der erwarteten Größe wurden anschließend in den pBluescript® II SK (+/-)-Vektor subkloniert und sequenziert. In Abb. 25 ist als Beispiel ein Agarosegel aus dem Perhydrolase-Screening abgebildet.



**Abb. 25:** Foto eines Agarosegels (Perhydrolase-Screening). M: 100 bp DNA Leiter mit einem in rot markierten 500 bp großem DNA-Fragment. K: Kontrolle (520 bp großes PCR-Fragment der BPOA2 Halogenase). Die gelb markierten PCR-Fragmente wurden zum Sequenzieren subkloniert. Aufgetragen sind je 5 µl pro PCR-Ansatz der 95 untersuchten Stämme.

Es konnten 7 DNA-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden, was einer Hitrate von 2,8% entspricht. Die Sequenzierung und der anschließende Datenbankvergleich klonierter PCR-Produkte ergaben bei 4 Fragmenten eine Homologie zu Perhydrolasen. Von den Stämmen wurden Cosmid-Genbanken angelegt und von 3 der 4 neuen Perhydrolasen konnte die Vollständigensequenz bestimmt werden. In Abb. 26 ist der phylogenetische Stammbaum neuer und literaturbeschriebener Perhydrolasen dargestellt.



**Abb. 26:** Phylogenetischer Stammbaum neuer und publizierter Perhydrolasen. Die rot markierten Perhydrolasen wurden zum Primerdesign verwendet. Perhydrolasen, die durch das Screening neu identifiziert wurden, sind blau markiert.

Aminosäuresequenzvergleiche zwischen neuen und beschriebenen Perhydrolasen zeigen eine Identität von 64-87%. Die von HECHT et al., 1994 für die Perhydrolase (P29715) aus *Streptomyces aureofaciens* beschriebene katalytische Triade, bestehend aus Ser<sup>98</sup>, Asp<sup>228</sup>, und His<sup>257</sup>, ist auch in den beiden neu identifizierten Perhydrolasen Nr. 52 und Nr. 2511 zu finden. Bei der Perhydrolase Nr. 1699 ist das Serin durch ein Cystein ausgetauscht.

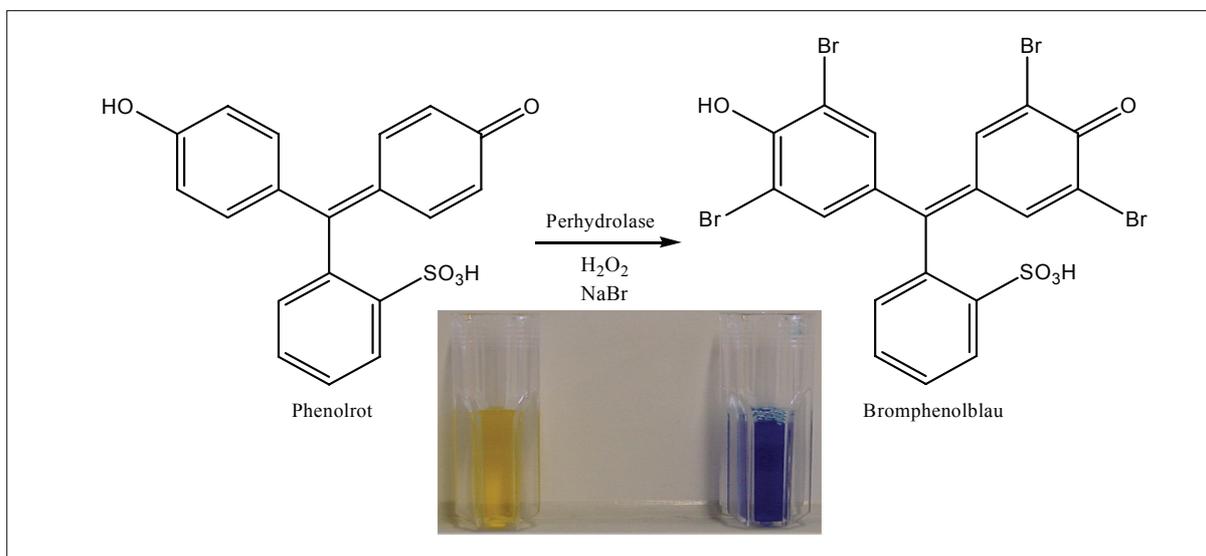
### 3.1.2 Phenolrot als Substrat für Perhydrolasen

HAGER et al., 1966 verwendeten Monochlordimedon als Substrat zur Testung der Aktivität einer Chlorperoxidase. Dabei handelt es sich um ein Analogon zum eigentlich vermuteten Substrat der Haloperoxidase bei der Biosynthese von Caldariomycin. Die Halogenierung verläuft mechanistisch analog zu der des natürlichen Substrats. Perhydrolasen katalysieren ebenfalls die Halogenierung von Monochlordimedon zu Monochlormonobromdimedon bzw. Dichlordimedon.

In dieser Arbeit hat die Synthese von Monochlordimedon nur mit geringem Umsatz funktioniert. Es war ein Gemisch aus Edukt und Produkt vorhanden, weshalb

Aktivitätstests der neuen Perhydrolasen nicht mit reinem Monochlordimedon als Substrat durchgeführt werden konnten.

BANTLEON et al., 1994 haben eine Methode beschrieben, bei der sie Phenolrot als Substrat für eine Chlorperoxidase verwendeten. In Anlehnung an den beschriebenen Aktivitätstest wurde ein modifizierter Enzymtest etabliert, bei dem Phenolrot zu Bromphenolblau umgesetzt wird. Phenolrot besitzt ein UV-Maximum bei  $\lambda_{\max} = 433$  nm und Bromphenolblau bei  $\lambda_{\max} = 592$  nm. Die Enzymaktivität kann deshalb photometrisch oder visuell bestimmt werden. In Abb. 27 ist die Reaktion dargestellt.



**Abb. 27:** Durch Perhydrolasen katalysierte Umsetzung von Phenolrot zu Bromphenolblau.

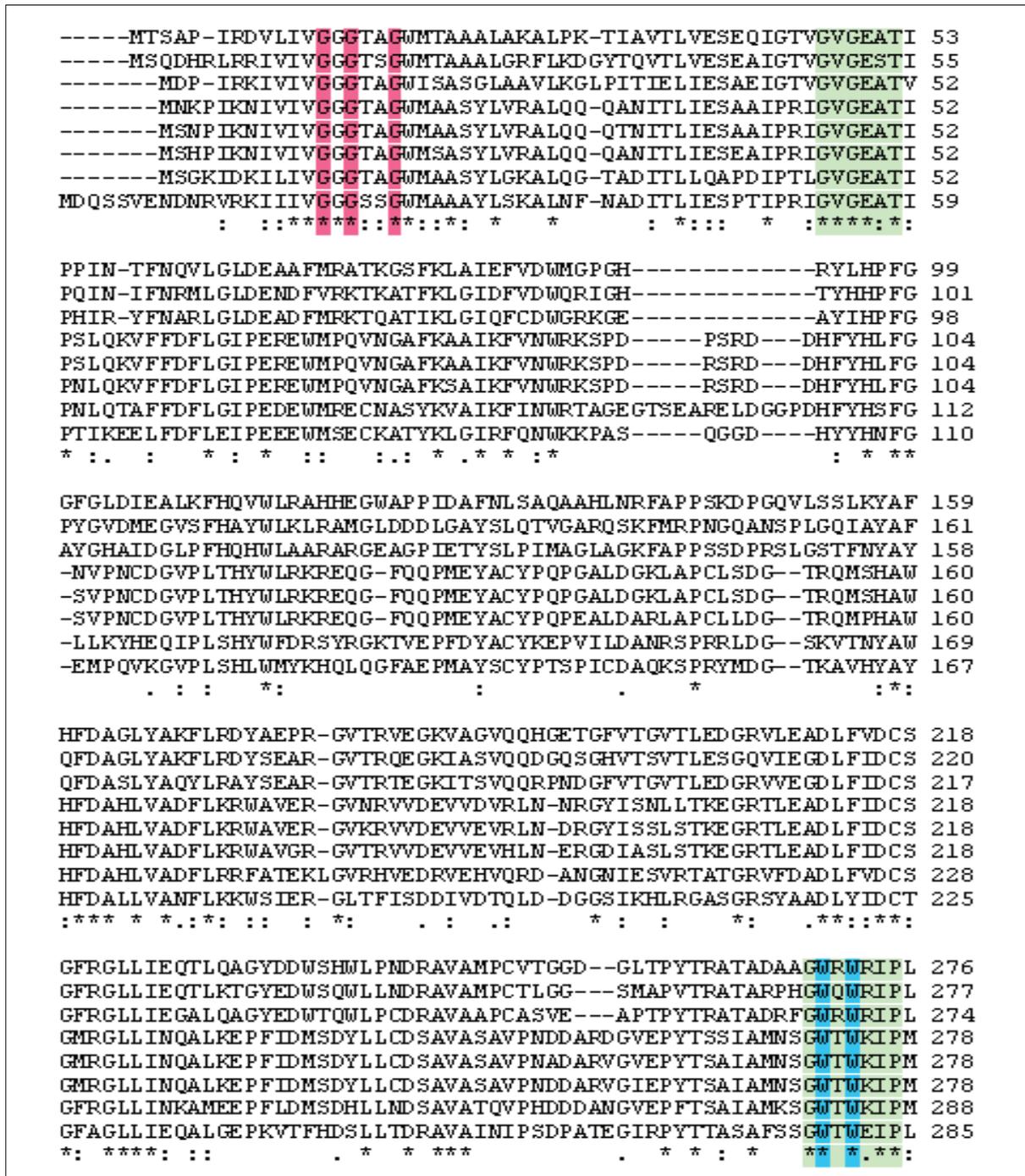
Zwei der drei neu identifizierten Perhydrolasen (Nr. 52 und Nr. 2511) katalysierten die Reaktion von Phenolrot zu Bromphenolblau. Die Perhydrolase Nr. 1699 zeigte keine Aktivität. Der Farbumschlag war nach etwa 15 min visuell zu erkennen. Nach zwei Stunden war das Edukt zu 100% in Produkt umgesetzt (Nr. 52). Die andere Perhydrolase setzte ca. 50% Edukt innerhalb von zwei Stunden um. Als Negativkontrolle wurde Rohextrakt ohne exprimierte Perhydrolase eingesetzt. Nach etwa 1-2 Tagen war auch hier eine leichte Blaufärbung zu beobachten. Die Reaktion läuft allerdings auch chemisch nur unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und NaBr-Zugabe ab, jedoch wesentlich langsamer.

## **3.2 Tryptophan-/Indol-Halogenasen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Actinomyceten-Stammsammlung auch nach neuen Tryptophan-/Indol-Halogenasen (s. Punkt 1.2.4) durchmustert, um diese nach beschriebenen Enzymtests (HOHAUS et al., 1997, KELLER et al., 2000 und HÖLZER et al., 2001) hinsichtlich ihrer Aktivität zu untersuchen und mittels phylogenetischer Analysen eine Einordnung bezüglich ihrer Regioselektivität vorzunehmen. Dafür wurden von Prof. van Pée (TU Dresden) die Sequenzen zweier Tryptophan-Halogenasen zur Verfügung gestellt, die Tryptophan an der Position 5 bzw. an der Position 6 chlorieren.

### **3.2.1 Identifizierung neuer Tryptophan-/Indol-Halogenasen**

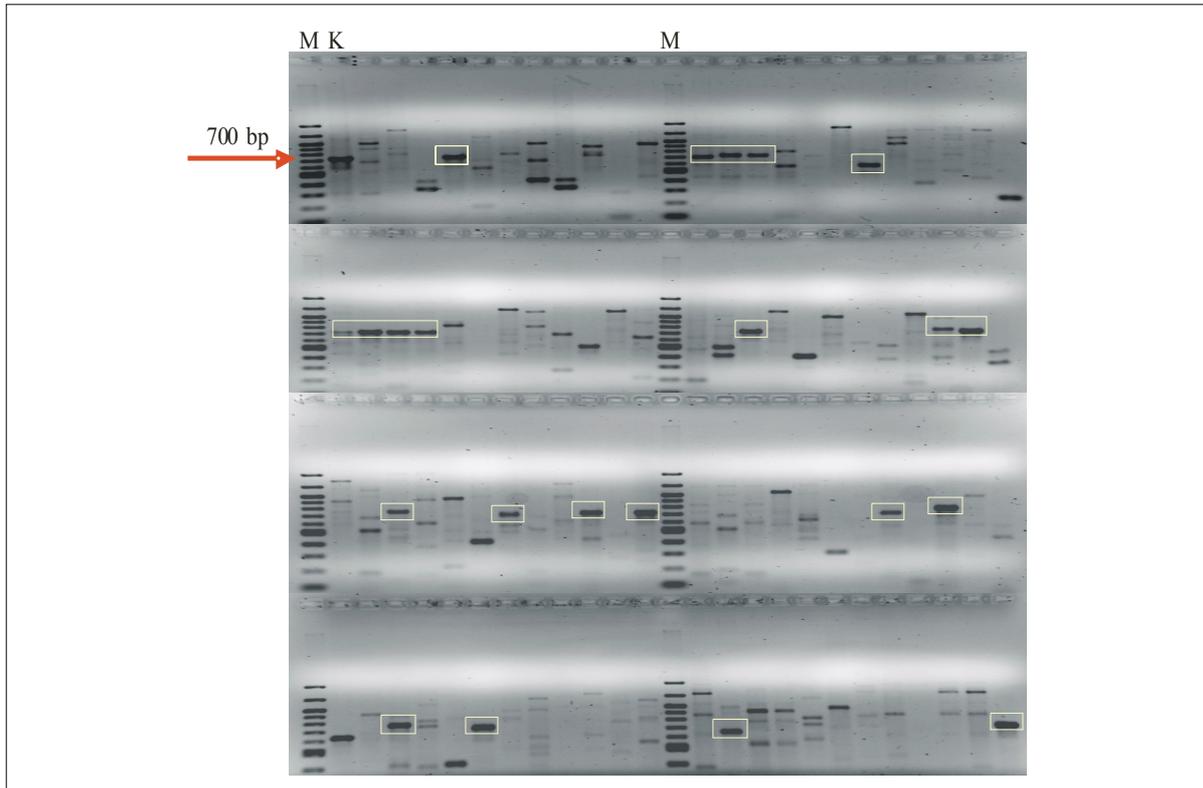
Für das Tryptophan-/Indol-Halogenase-Screening wurden spezifische PCR-Primer entwickelt und getestet. Dafür wurde ein Sequenzalignment mit 8 der zu Beginn der Arbeit in der Proteinsequenzdatenbank bereits publizierten Tryptophan-/Indol-Halogenasen durchgeführt (Abb. 28).



**Abb. 28:** Sequenzalignment mit publizierten Tryptophan-/Indol-Halogenasen (Accession no. von oben nach unten: AAK24771, AAK24772, AAK24769, U74493, AAD46370, AF161183, BAC10682, AAD46369). Die grün markierten konservierten Sequenzbereiche wurden zum Ableiten der degenerierten Primer Halo-C1-FW und Halo-C6-RV verwendet. Die für den Kofaktor postulierte Bindungsstelle GxGxxG ist rot markiert und die an der Bindung der Halogenide beteiligten Tryptophanreste blau. Es sind nur die ersten 288 AS der ca. 550 AS langen Sequenzen abgebildet.

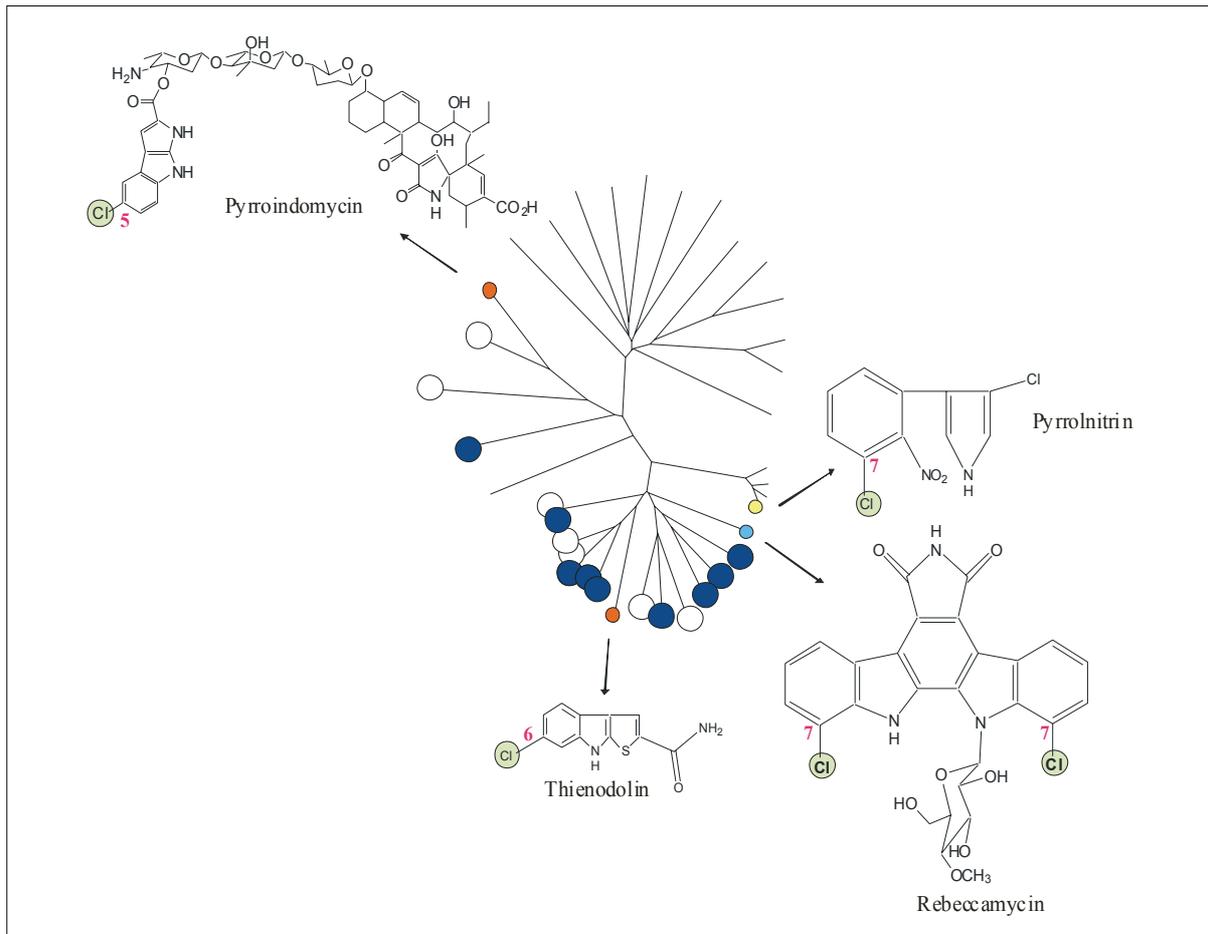
Als Template für die PCR-Optimierung wurde die Halogenase aus dem Rebecca-mycingencluster verwendet. Unter Verwendung der Primer Halo-C1-FW/Halo-C6-RV konnte unter den in Material und Methoden beschriebenen Bedingungen ein PCR-Fragment der Größe von ca. 705 bp amplifiziert werden, was der erwarteten Größe

entsprach. Mit diesem Primerpaar wurde die genomische DNA von ca. 250 Stämmen in Mikrotiterplatten nach Tryptophan-/Indol-Halogenasen durchmustert. DNA-Fragmente der erwarteten Größe wurden anschließend in den pBluescript® II SK (+/-)-Vektor kloniert und sequenziert. In Abb. 29 ist als Beispiel ein Agarosegel aus dem Tryptophan-/Indol-Halogenase-Screening abgebildet.



**Abb. 29:** Foto eines Agarosegels (Tryptophan-/Indol-Halogenase-Screening). M: 100 bp DNA Leiter mit einem in rot markierten 700 bp großem DNA-Fragment. K: Kontrolle (705 bp großes PCR-Fragment der rebH Halogenase). Die gelb markierten PCR-Fragmente wurden zum Sequenzieren subkloniert. Aufgetragen sind je 5 µl pro PCR-Ansatz der 95 untersuchten Stämme.

Es konnten 47 DNA-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden, was einer Trefferquote von 19% entspricht. Die Sequenzierung und der anschließende Datenbankvergleich 21 klonierter PCR-Produkte ergaben bei 18 Fragmenten eine Homologie zu Tryptophan-/Indol-Halogenasen. Von den Stämmen wurden Cosmid-Genbanken angelegt und von 9 der 18 neuen Tryptophan-/Indol-Halogenasen konnte die Volllänge sequenziert werden. In Abb. 30 ist der phylogenetische Stammbaum neuer und literaturbeschriebener Tryptophan-/Indol-Halogenasen dargestellt.



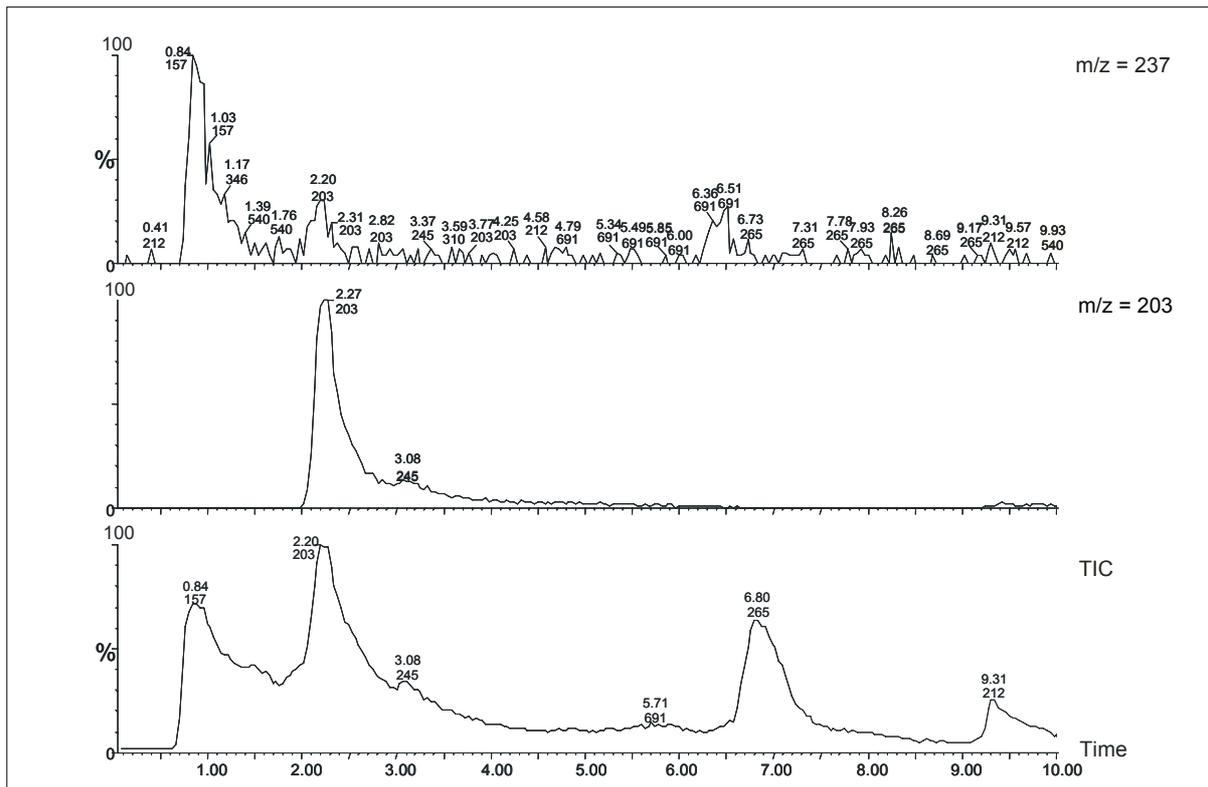
**Abb. 30:** Phylogenetischer Stammbaum neuer und publizierter Tryptophan-/Indol-Halogenasen. Bei den dunkelblau markierten Halogenasen handelt es sich um Vollängensequenzen. PCR-Fragmente, die nicht vollständig sequenziert wurden, sind weiß. Die gelbe Halogenase stammt aus einem Pyrolnitrin-Produzenten (Chlorierung an Position 7), der von Prof. van Pée zur Verfügung gestellt wurde, genauso wie die Sequenzen der Halogenasen aus dem Pyroindomycin-Cluster (Chlorierung an Position 5) und dem Thienodolin-Cluster (Chlorierung an Position 6). Die Halogenase aus dem Rebeccamycin-Cluster (Chlorierung an Position 7) ist blau markiert.

Aminosäuresequenzvergleiche zwischen neuen und beschriebenen Tryptophan-/Indol-Halogenasen zeigen eine Identität von 37-69%. Alle 9 neu gefundenen und vollständig sequenzierten Halogenasen verfügen über die in den publizierten Tryptophan-/Indol-Halogenasen am N-Terminus identifizierte FADH<sub>2</sub>-Bindestelle GxGxxG sowie über die zwei für die Bindung des Halogenids notwendigen Tryptophanreste.

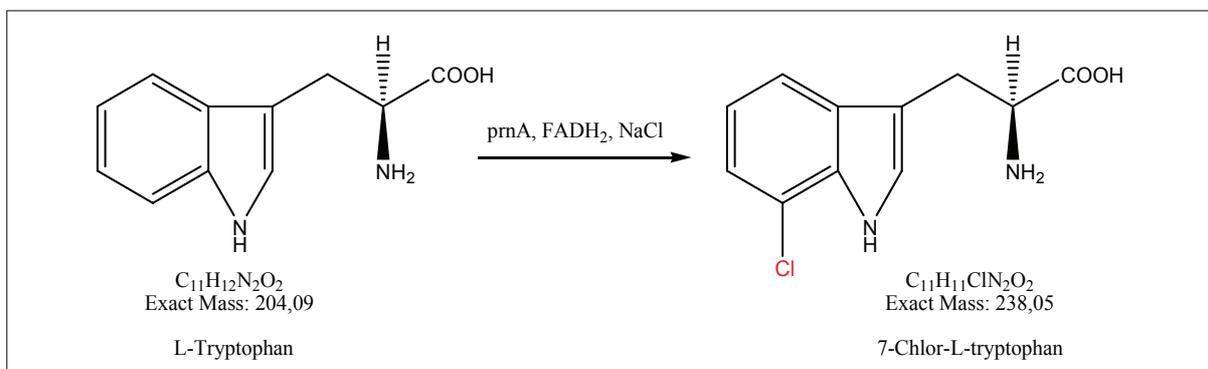
### 3.2.2 L-Tryptophan als Substrat für Tryptophan-/Indol-Halogenasen

Zur Untersuchung der Aktivität der neuen putativen Tryptophan-/Indol-Halogenasen wurde ein publiziertes Nachweisverfahren eingesetzt (HOHAUS et al., 1997, KELLER et al., 2000 und HÖLZER et al., 2001). Im Gegensatz zu den veröffentlichten Arbeiten

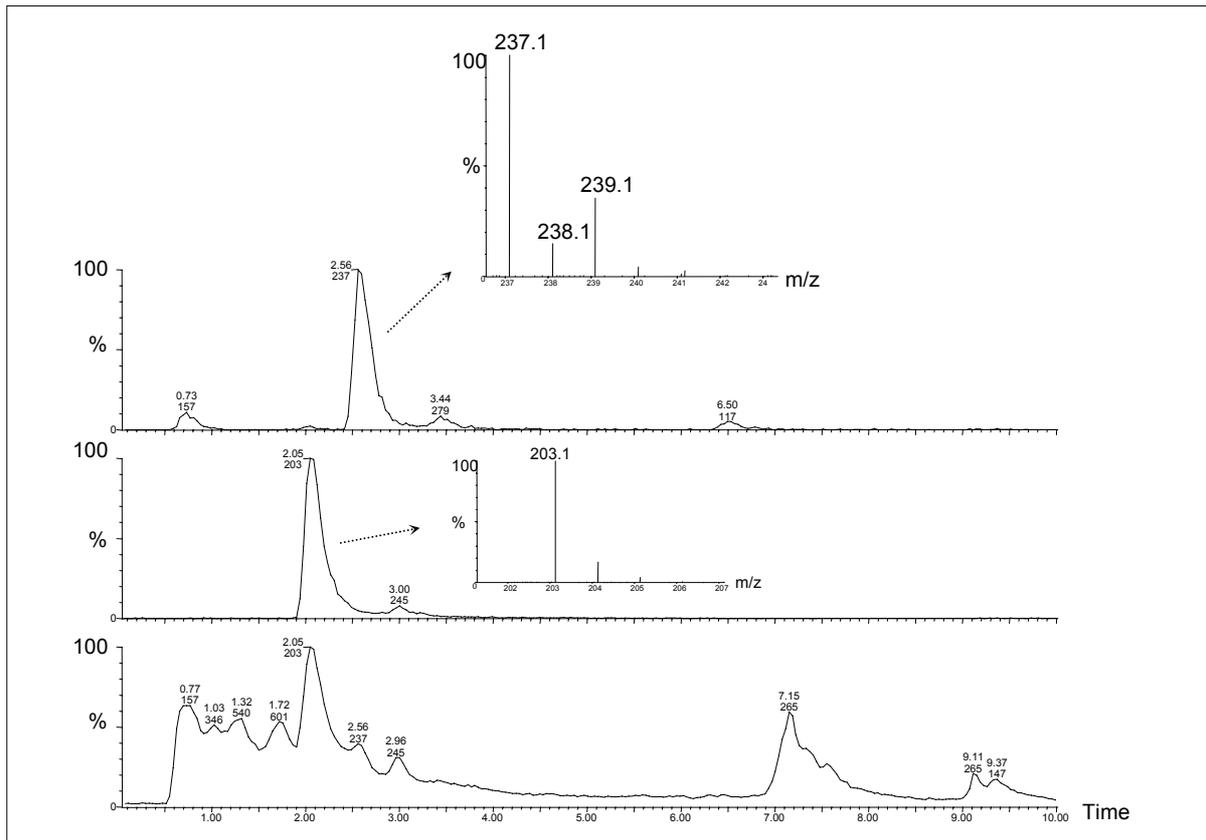
wurde hier nicht *E. coli* oder *Pseudomonas fluorescens*, sondern *Streptomyces lividans* als Expressionswirt verwendet. Eine für die Umsetzung von L-Tryptophan zu 7-Chlor-L-tryptophan notwendige NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase sollte in *S. lividans* natürlich vorhanden sein und wurde deshalb nicht zusätzlich in den Aktivitätstests eingesetzt. In Abb. 31-33 sind Beispielspektren der analysierten Tests sowie die von den Tryptophan-7-Halogenasen katalysierte Reaktion abgebildet.



**Abb. 31:** HPLC-MS-Analyse der Negativkontrolle (*pUWL201oriT*). Die Masse  $m/z = 203$  entspricht Tryptophan (negativer Modus). Substanzen mit der Masse  $m/z = 237$  (Cl-Tryptophan, negativer Modus) sind nur in Spuren im Extrakt vorhanden. Somit war keine Umsetzung von Tryptophan mit dem Vektor ohne Halogenase zu detektieren.

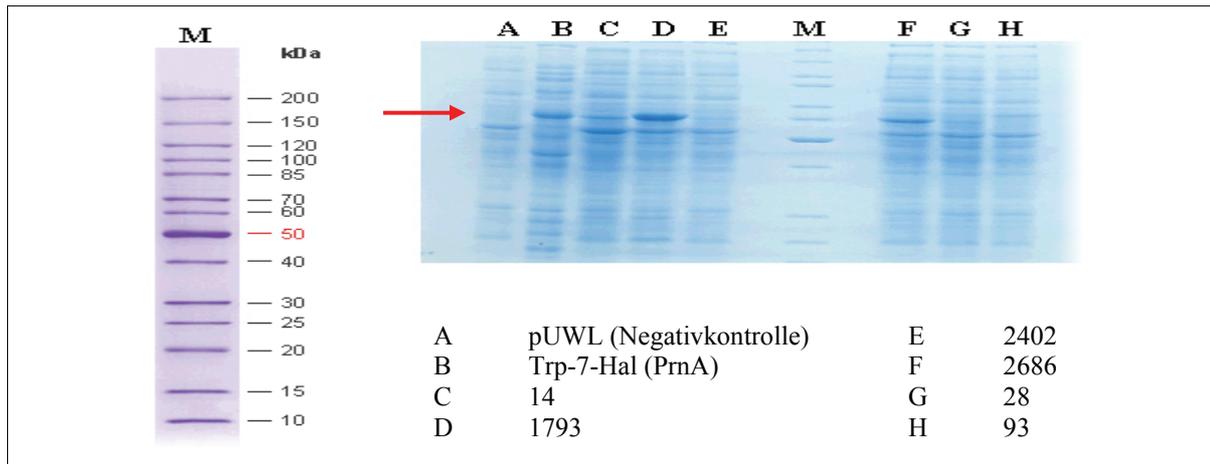


**Abb. 32:** Durch *PrnA* katalysierte Reaktion von L-Tryptophan zu 7-Chlor-L-tryptophan.

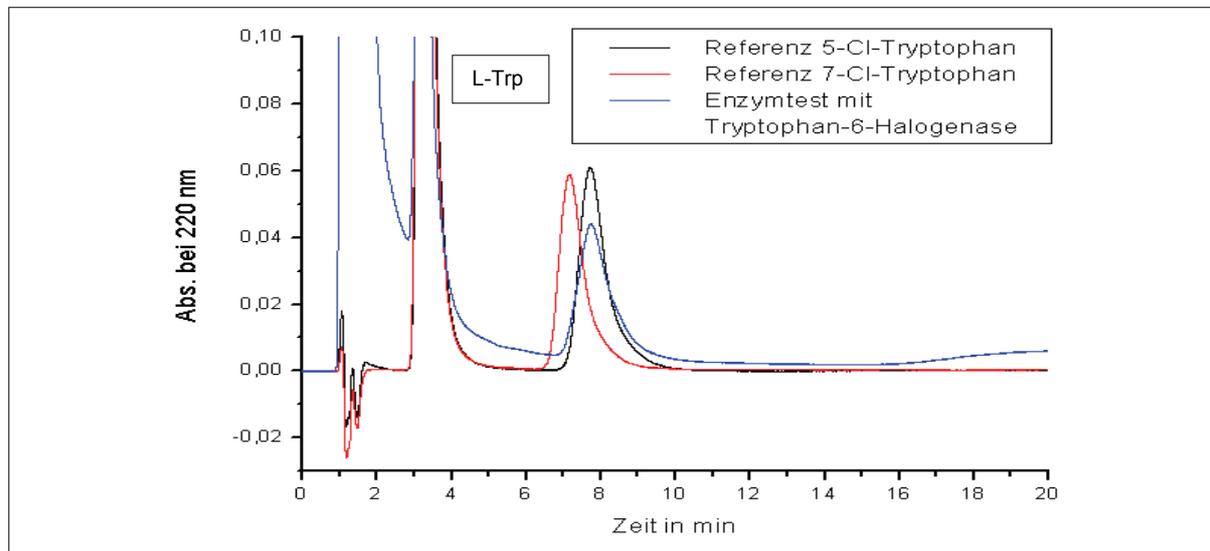


**Abb. 33:** HPLC-MS-Analyse der Positivkontrolle (*prnA* kloniert in *pUWL201oriT*; exprimiert in *S. lividans* TK23). Die Halogenase PrnA (Accession no.: AAD46360) wurde von Prof. van Pée zur Verfügung gestellt. Die Masse  $m/z = 203$  entspricht Tryptophan (negativer Modus). Die Masse  $m/z = 237$  entspricht Cl-Tryptophan (negativer Modus). Das für eine monochlorierte Verbindung typische Isotopenmuster ist vorhanden. Es war eine teilweise Umsetzung von Tryptophan zu Cl-Tryptophan zu beobachten.

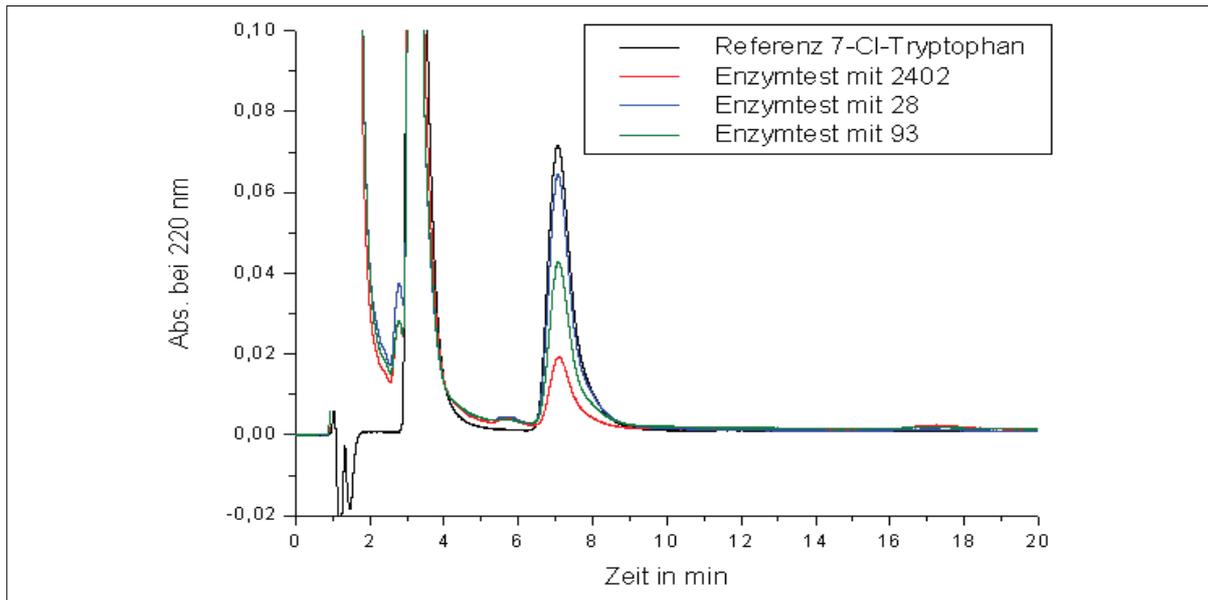
Acht der neun vollständig sequenzierten Halogenasen konnten in den Expressionsvektor kloniert und in *S. lividans* hinsichtlich ihrer Aktivität getestet werden. Sechs der acht untersuchten Halogenasen setzten L-Tryptophan zu Cl-Tryptophan um (16 h, 30°C). Um Aussagen hinsichtlich der Regioselektivität treffen zu können, wurden die sechs aktiven Halogenasen in einer Kooperation mit Prof. van Pée weiter untersucht. In seiner Arbeitsgruppe ist eine HPLC-Methode etabliert, die eine Differenzierung zwischen 5-Cl-Tryptophan, 6-Cl-Tryptophan und 7-Cl-Tryptophan ermöglicht. Um den Umsatz zu steigern, wurde zu den Enzymtests zusätzlich eine NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase (Fre) aus *E. coli* zugefügt (SPYROU et al., 1991). In Abb. 34 ist das Proteingel der Rohextrakte (Überstände) abgebildet. Nicht alle Enzyme sind, trotz Aktivität, im Gel aufgrund schwacher Expression sichtbar. In Abb. 35-37 sind die HPLC-Chromatogramme zur Unterscheidung verschiedener Cl-Tryptophanderivate dargestellt.



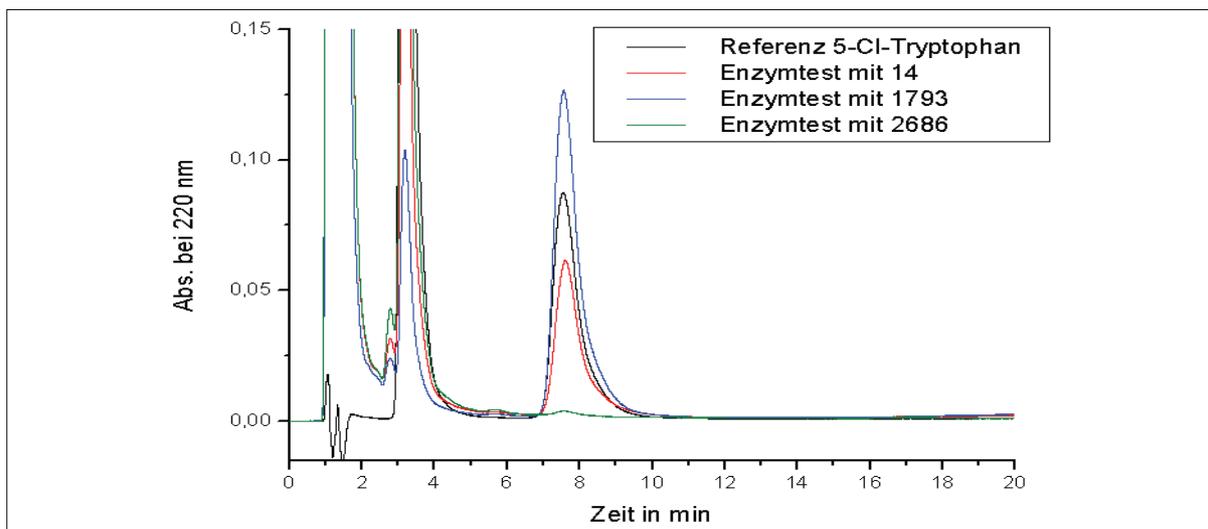
**Abb. 34:** Proteingel der 6 aktiven Tryptophan-/Indol-Halogenasen (C-H). A: Vektor ohne Halogenase. B: Positivkontrolle (PrnA) M: Marker. Die Banden bei ca. 60 kDa (roter Pfeil) entsprechen den in *S. lividans* überexprimierten Halogenasegenen.



**Abb. 35:** HPLC-Chromatogramm zur Trennung der beiden Standards 7-Cl-Tryptophan und 5-Cl-Tryptophan von enzymatisch umgesetzten L-Tryptophan zu 6-Cl-Tryptophan durch die Halogenase aus dem Thienodolin-Produzenten. Eine Trennung von 5-Cl-Tryptophan und 6-Cl-Tryptophan war unter diesen Bedingungen nicht möglich. L-Trp: L-Tryptophan.



**Abb. 36:** HPLC-Chromatogramm zur Untersuchung der neuen Tryptophan-/Indol-Halogenasen bezüglich ihrer Regioselektivität. Die drei Halogenasen (2402, 28 und 93) setzten L-Tryptophan zu 7-Cl-Tryptophan um.



**Abb. 37:** HPLC-Chromatogramm zur Untersuchung der neuen Tryptophan-/Indol-Halogenasen bezüglich ihrer Regioselektivität. Die drei Halogenasen (14, 1793 und 2686) setzten L-Tryptophan zu 5-Cl-Tryptophan oder 6-Cl-Tryptophan um.

Auf Basis der unterschiedlichen Retentionszeiten war es durch die Auftrennung mittels HPLC nicht möglich, zwischen 5-Cl-Tryptophan-Halogenasen und 6-Cl-Tryptophan-Halogenasen zu unterscheiden. 7-Cl-Tryptophan konnte jedoch von den beiden anderen Tryptophan-Derivaten getrennt werden. Drei der durch das Screening neu identifizierten Enzyme konnten den 7-Cl-Tryptophan-Halogenasen zugeordnet werden (Abb. 36). Drei weitere Enzyme setzten L-Tryptophan zu Cl-Tryptophan um. Die HPLC-Chromatogramme erlauben einen Ausschluss der

Halogenierung an Position 7. Diese neu gebildeten Derivate co-eluieren mit dem Standard 5-Cl-Tryptophan (Abb. 37).

### 3.3 Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Actinomyceten-Stammsammlung nach neuen Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen (s. Punkt 1.2.4) durchmustert, um die sie kodierenden Gene als Marker zur Identifizierung neuer Biosynthesegencluster zu nutzen. Durch phylogenetische Analysen sollte das biosynthetische Potential der entsprechenden Wildtypstämme bestimmt werden, um auf diese Weise vorherzusagen, welche Substanzklassen von den jeweiligen Stämmen produziert werden können.

In einem anschließenden chemischen Screening wurden Extrakte auf das typische Isotopenmuster halogener Verbindungen (Chlor und Brom) hin untersucht. Hitsubstanzen wurden für eine Strukturanalyse zur Verifizierung der vorhergesagten Substanzklassen aufgereinigt.

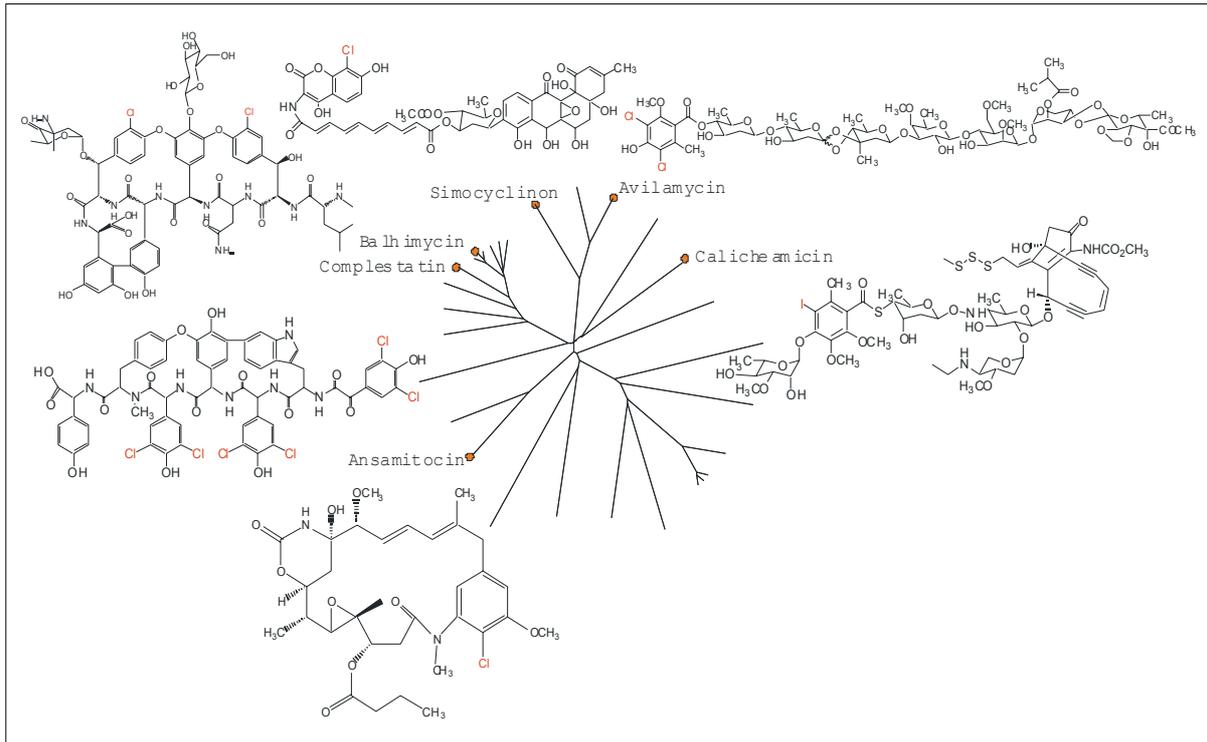
Des Weiteren wurden die neu identifizierten Halogenasen für Biokatalyse-Anwendungen zur Untersuchung ihrer Substratspezifität und zur Naturstoff-derivatisierung mittels kombinatorischer Biosynthese genutzt.

### 3.3.1 Identifizierung neuer Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen

Auch für diese Enzymklasse (Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen) wurden für das PCR-basierte Screening spezifische PCR-Primer entwickelt und getestet. Dafür wurde ein Sequenzalignment mit 6 der zu Beginn der Arbeit in der Proteinsequenzdatenbank bereits publizierten Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen durchgeführt (Abb. 38). Der phylogenetische Stammbaum publizierter Halogenasen ist in Abb. 39 dargestellt.

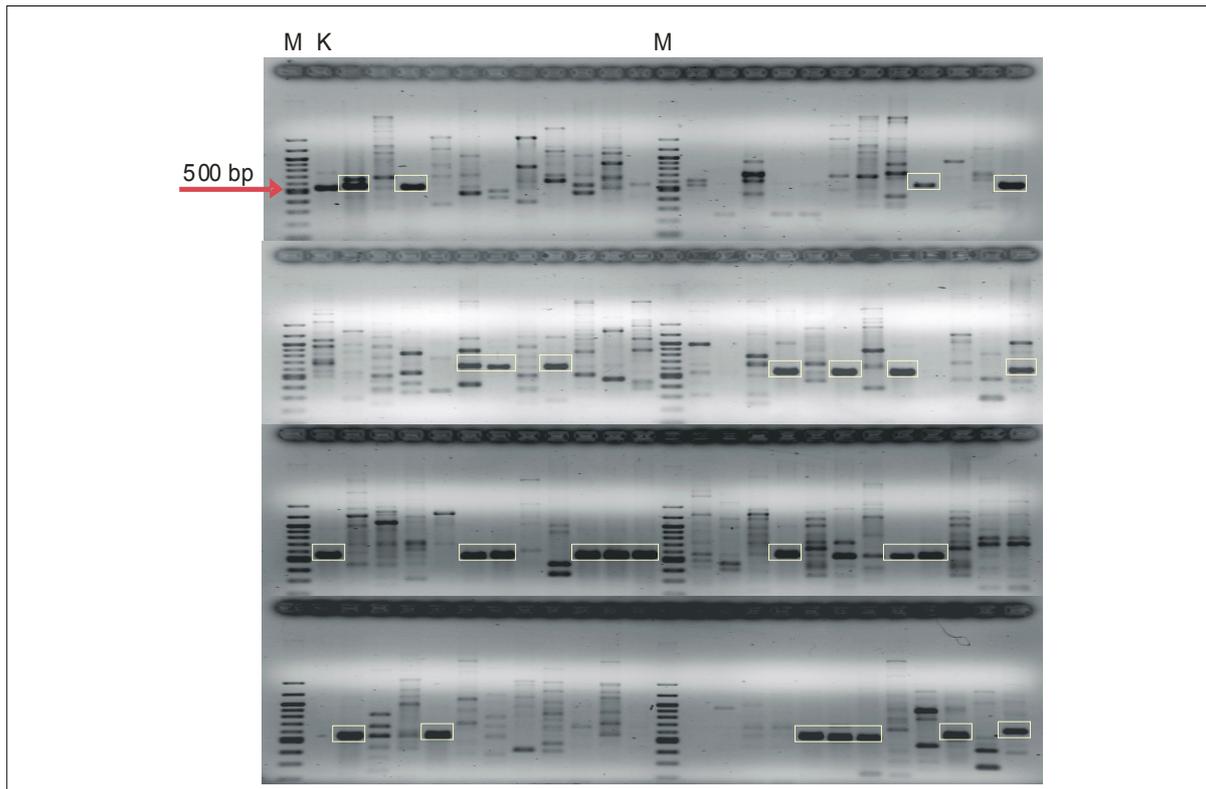
Avilamycin	MRRDVKPELSVGGSSMSKVLVIGGGPAGSTAASLLSKAGMSVKLLERETFPRYHIGESIA	60
Simocyclinon	-----VTQVIVVGGGPAGSTAAALLARAGISVTVLERATFPRYHIGESFS	45
Balhimycin	-----MSVEDFDVVVAGGGPGSTVATLVAMQGHRVLLLEKEVFPRYQIGESLL	49
Complestatin	-----MAAVTEEFDAVVVGGGPAGSTFAALVAKQGHRVVVLEKENFPRYQIGESLL	51
Calicheamicin	-----MSHPEPEYDVIVVGGGPAGSSTAGLLAQEGHRVLLLEKREKFFRPHIGESLI	51
Ansamitocin	-----MLDAIVMGGGPAGSVCAAVLARQGRSVLVLERQEFPRPHIGESML	45
	.. * ****.* * * :: : * * : ** : ***::****:	
Avilamycin	SS-CRTIIDLVGAL EEVDSRGYTVKNGVLLR--WGKE---DWAIDW---PKIFGPDVRSW	111
Simocyclinon	TS-CRVIDYLGALEKVDARGYTSKTGLLVR--WGQEK---DWAIDW---TDQFGSDVRSW	97
Balhimycin	PATVHGVCRMLGISDELANAGFP I KRGGTFR--WGARP-EPWTFHFGISAKMAGSTSHAY	106
Complestatin	PSTIHGVCRLSGAADDLAKAGFPLKRGGTFR--WGARP-EPWTFAPSVSPRMAGPTSVAY	108
Calicheamicin	SG-VTLTLDALGVRRERMAELRFQIKHGGSL--WGADQTAPWSFRFREIRDAR--FDYSW	106
Ansamitocin	PY-MVGLLERHGLLDVAVREQGYVVKRGGFIDPTGTKFFRAGVFRADFAKTGDGRHHETF	104
	. * : : : * * . * : : :	
Avilamycin	QVDRDDFDHVLLKNAVKQGADVTEGVTYKRVLF DGDRAAGAEWLDPD TGELVSEEFDYVI	171
Simocyclinon	QVDRDDFDTVLLDHAESGAKVVOGAHVHRVIFEGDRATGVEWTA PGETAKISRADPVL	157
Balhimycin	QVERARFDEMILLNNAKRKGVVREGC AVTDVVEDGERVTGARYTDP-DGTEREVSARFVI	165
Complestatin	QVERSKFDDILLKNARKQGADVREGC SVRGVIEGERVRLTYADA-DGNEREIRARYVYV	167
Calicheamicin	QVRRAEFDAMLLDRARELGVVVVEGATVRGPLTDGERVAGVSYQFRGEADPIDARAAIVV	166
Ansamitocin	QVERSHFDRVNLDOARAAAGATVREGAQVVGLEEGGRVVGVRVREG--GVEREERARYVYV	162
	** * ** : *. * * * * : : * * * * :	
Avilamycin	DASGRAGVIS-KHLKNRPPHEIFRNVAIWGYWGGSLPSS-PTGGINVISAPDGMVYWI	229
Simocyclinon	DASGRAGLISAQHFNNRPPHEIFRNVAIWGYWGGELLPGS-PSGGINVISDDGMVYWI	216
Balhimycin	DASGNKSRLYTKVGGSRMYSEFFRSLALFGYFEGGKRLPEP-VSGNILLSVAFDSGMVYWI	224
Complestatin	DASGNKSRLYNKVGGTREYSDFRSLALFGYFENGKRMPEP-NRFNILCVAFESGMVYWI	226
Calicheamicin	DASGQQRWLGHRFG-LVSWHDDLNRMAAWSYAGALRYPGD-HEGDLLVESCAQGMVYWI	224
Ansamitocin	DATGRAGVVAANRFG-LRRMIEDLRMVAVFHHRDGLDEAHNPGHEGDIQVGSVSDGMVYWI	221
	** : * . : : : * * * : : . : : : ** * :	
Avilamycin	ELRGDRYSVGFVCHQDRFLERRREHADLEAMLASLVEESP TVRDLMANGVYQPG-----V	284
Simocyclinon	ELRDNRLSVGFVSHKSIFGERRREFGSLDEMILLKMVDESPAVREILAKGTFQPG-----A	271
Balhimycin	ELSDTLTSGAVVRRREDAEKIQ---GDREKALNTL IAECLISEYLADATRVITGRYGL	281
Complestatin	ELSDTLTSGAVVRRREMAEKIQ---GDPEKALRAL IDECPMIADYLSDATRVTEGQYGEI	283
Calicheamicin	ELSPTLTGIGYVTPSDRFAETG---LPPDQLLEKQIAESNEVSWLTAGARRVDV-----Y	276
Ansamitocin	ELSADRISVGYTMHRDRLRGRT-----PAEAFAEHVERVPRINQRLTGTSATSD-----F	271
	** . : * * . : : . : : :	

**Abb. 38:** Sequenzalignment mit publizierten Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen. Die grün markierten konservierten Sequenzbereiche wurden zum Ableiten der degenerierten Primer Halo-B4-FW und Halo-B7-RV verwendet. Die für den Kofaktor postulierte Bindungsstelle GxGxxG ist rot markiert und die an der Bindung der Halogenide beteiligten Tryptophanreste blau. Es sind nur die ersten 284 AS der ca. 500 AS langen Sequenzen abgebildet.



**Abb. 39:** Phylogenetischer Stammbaum publizierter Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen. Halogenasen, deren Sequenzen für die Primerentwicklung verwendet wurden, sind mit zugehörigen Strukturen orange markiert.

Für das Screening wurde als Kontrolle die Halogenase aus dem Simocyclinon-gencluster verwendet. Unter Verwendung der Primer Halo-B4-FW/Halo-B7-RV konnte unter den in Material und Methoden beschriebenen Bedingungen ein PCR-Fragment der Größe von ca. 550 bp amplifiziert werden, was der erwarteten Größe entsprach. Mit diesem Primerpaar wurde die genomische DNA von ca. 550 Stämmen in Mikrotiterplatten nach Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen durchmustert. Fragmente der erwarteten Größe wurden anschließend in den pBluescript® II SK (+/-)-Vektor kloniert oder direkt sequenziert. In Abb. 40 ist als Beispiel ein Agarosegel aus dem Phenyl-/Pyrrol-Halogenase-Screening abgebildet.

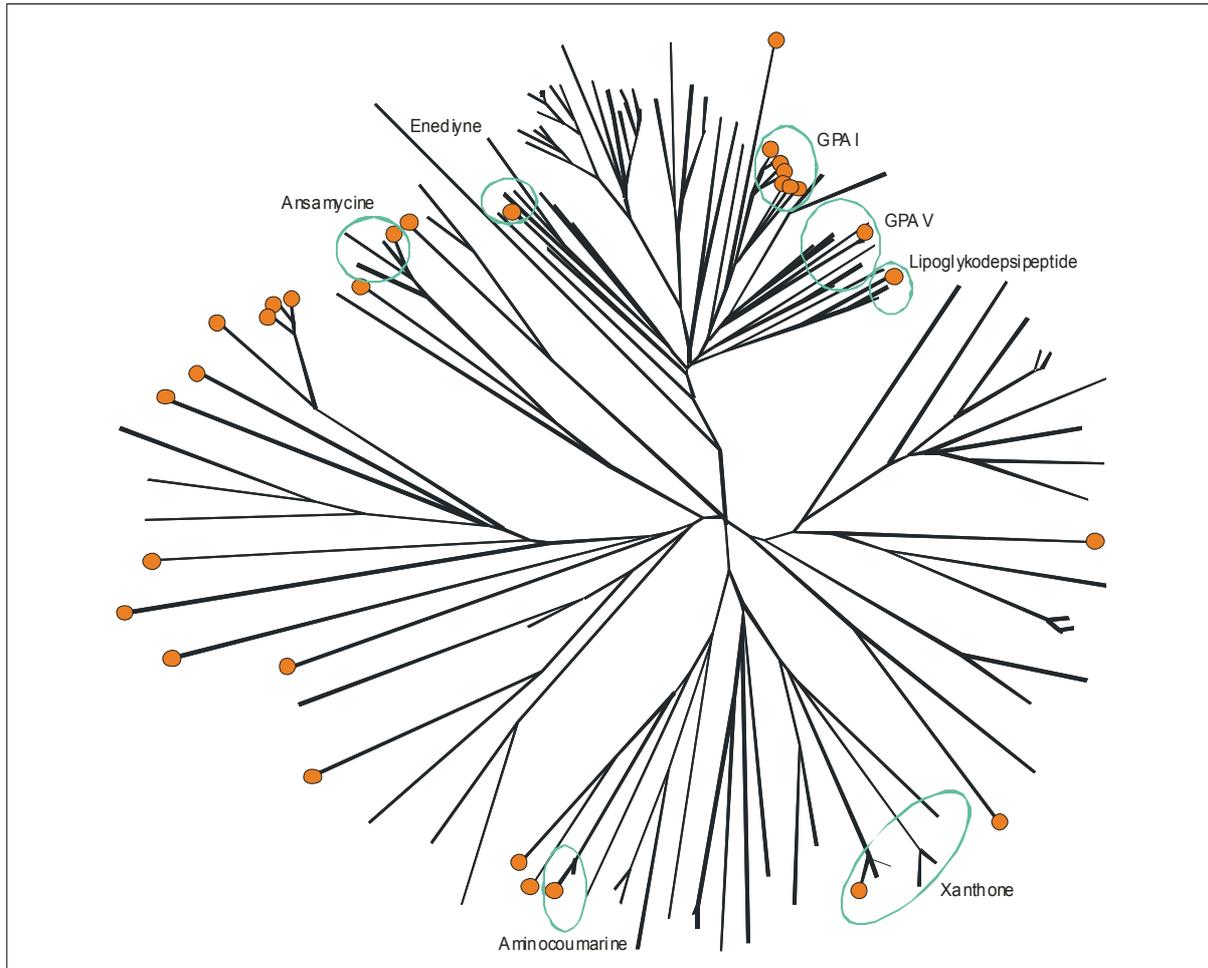


**Abb. 40:** Foto eines Agarosegels (Phenyl-/Pyrrol-Halogenase-Screening). M: 100 bp DNA Leiter mit einem in rot markierten 500 bp großem DNA-Fragment. K: Kontrolle (550 bp großes PCR-Fragment der *simD4* Halogenase). Die gelb markierten PCR-Fragmente wurden zum Sequenzieren subkloniert oder direkt sequenziert. Aufgetragen sind je 5  $\mu$ l pro PCR-Ansatz der 95 untersuchten Stämme.

Es konnten 110 DNA-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden, was einer Trefferquote von 20% entspricht. Durch Sequenzierung und anschließenden Datenbankvergleich der PCR-Produkte konnte bei 108 der 110 erhaltenen Sequenzen eine signifikante Homologie zu Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen nachgewiesen werden. Durch Anlegen von Cosmid-Genbanken wurde von 37 neuen Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen die Vollständigensequenz bestimmt. Durch das Screening konnte die Anzahl der bis heute beschriebenen Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen mehr als verdreifacht werden. In Tab. 19 sind Halogenasen aufgelistet, die eine Identität von mehr als 60% zu publizierten Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen aus unterschiedlichen Biosynthesegenclustern zeigen. Anhand dieser Information konnten verschiedene Substanzklassen vermutet werden, die von den jeweiligen Wildtypstämmen produziert werden. In Abb. 41 ist der phylogenetische Stammbaum neuer und publizierter Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen dargestellt.

**Tab. 19:** Vergleich zwischen publizierten und neu identifizierten Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen basierend auf Aminosäuresequenzen (AS). Die vermutlich von den Wildtypstämmen produzierten Substanzklassen (Glykopeptid-Antibiotika (GPA) Typ I und Typ V, Lipoglykocodepsipeptide, Enediyne, Ansamycine, Aminocoumarine und Xanthane) beziehen sich auf eine Referenzverbindung, die von einem Stamm produziert wird, der über eine Halogenase mit hoher Homologie zu der entsprechenden neu identifizierten Halogenase verfügt. Mit Stern sind Halogenasen gekennzeichnet, von denen nur das mit dem Primerpaar Halo-B4-FW/Halo-B7-RV amplifizierte PCR-Produkt sequenziert wurde. Die Sequenz der Halogenase aus dem Biosynthesgencluster von Lysolipin wurde von Prof. Wohlleben (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Halogenase (Nr.)	Vermutlich produzierte Substanzklasse	Referenzverbindung	Identität (AS)
2429	GPA Typ I	Balhimycin	93%
2364	GPA Typ I	Balhimycin	93%
2664	GPA Typ V	Complestatin	69%
1969*	GPA Typ V	Complestatin	64%
2557*	GPA Typ V	Complestatin	75%
2023	GPA Typ V	Complestatin	74%
2312	GPA Typ V	Complestatin	76%
97*	GPA Typ V	Complestatin	72%
2192	GPA Typ V	Complestatin	98%
1349*	Lipoglykocodepsipeptide	Ramoplanin	82%
1392*	Lipoglykocodepsipeptide	Ramoplanin	83%
2018*	Lipoglykocodepsipeptide	Ramoplanin	72%
1377*	Lipoglykocodepsipeptide	Ramoplanin	64%
127*	Enediyne	C-1027	97%
3477*	Enediyne	C-1027	98%
2538*	Enediyne	C-1027	66%
15*	Ansamycine	Naphthomycin	94%
216*	Ansamycine	Naphthomycin	89%
46*	Ansamycine	Naphthomycin	87%
2423*	Aminocoumarine	Simocyclinon	95%
2544	Xanthane	Lysolipin	82%
1365*	Xanthane	Lysolipin	81%
2412	Xanthane	Lysolipin	61%
2061*	Xanthane	Lysolipin	66%
108*	Xanthane	Lysolipin	61%



**Abb. 41:** Phylogenetischer Stammbaum publizierter (orange) und neu identifizierter Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen. Es wurden zu verschiedenen publizierten Halogenasen, die an der Biosynthese unterschiedlichster halogener Substanzen beteiligt sind, neue Halogenasen mit hoher Homologie gefunden (grün markierte Zweige). GPA: Glykopeptid-Antibiotika (Klasse I und V).

Aminosäuresequenzvergleiche zwischen neuen und beschriebenen Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen zeigen untereinander eine Identität von 5-100%. Die vollständige Sequenzierung der Halogenasen (37 von 108) führte zu keinen wesentlichen Veränderungen bei der Erstellung des Stammbaumes. Alle 37 neu identifizierten und vollständig sequenzierten Halogenasen verfügen über die am N-Terminus lokalisierte FADH<sub>2</sub>-Bindestelle GxGxxG sowie über die zwei für die Bindung des Halogenids notwendigen Tryptophanreste (s. Punkt 1.2.4).

Es sollte anhand ausgewählter Substanzklassen die Hypothese bewiesen werden, dass Biosynthesegencluster mit homologen Gensequenzen (Halogenasen) auch strukturell ähnliche Verbindungen kodieren. Dafür wurden Extrakte von Stämmen auf typische Isotopenmuster (Halogenierung) hin untersucht in denen zu publizierten Clustern ähnliche Halogenasen identifiziert wurden. Von einigen der auf diese Art gefundenen halogenierten Substanzen sollte die Struktur aufgeklärt werden.

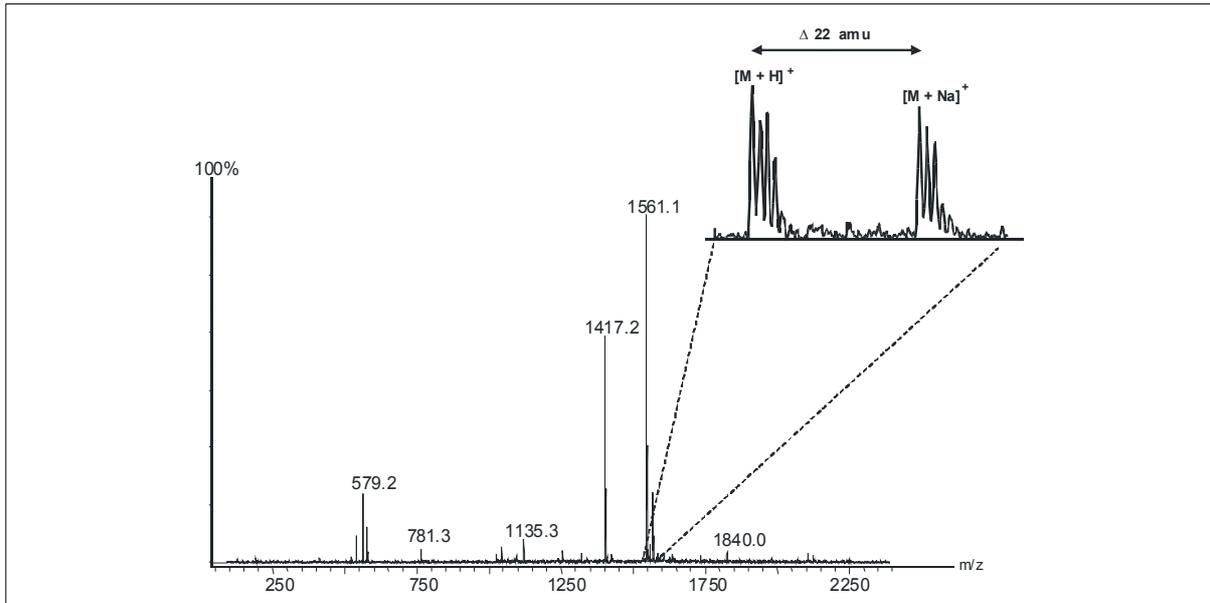
Des Weiteren wurden Stämme untersucht deren Halogenasen sich in einem Zweig befanden, wo keine bereits publizierte Halogenase eine hohe Homologie aufwies. Die Sequenzierung zu Halogenasen benachbarter Gene sollte weitere Hinweise auf das biosynthetische Potential der Wildtypstämme liefern, genauso wie ein zweites PCR-basiertes Screening nach für verschiedene Substanzklassen spezifischen Biosynthesegenen.

### 3.3.2 Glykopeptid-Antibiotika

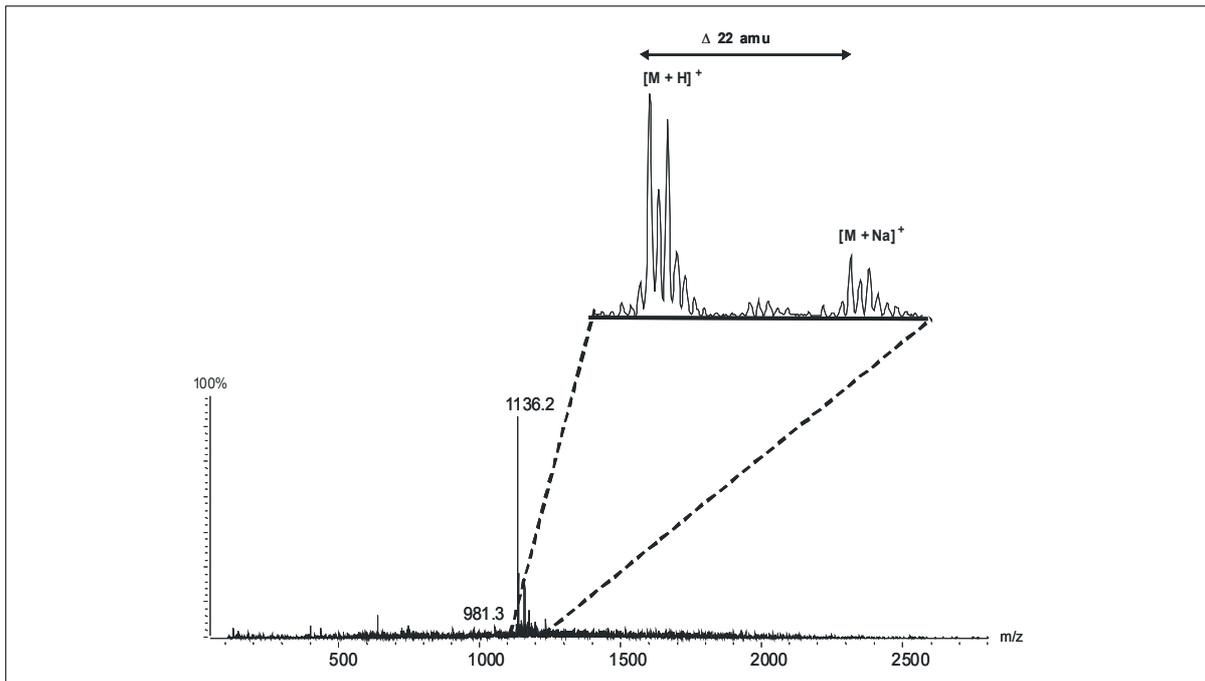
Glykopeptid-Antibiotika (GPA) lassen sich anhand der Struktur ihres Peptidrückgrates in fünf unterschiedliche Klassen einteilen. Alle bekannten GPA sind mindestens monochlorierte Verbindungen mit Ausnahme von Ristocetin. Einige der in den Biosynthesegenclustern vorhandenen Halogenasen sind bei den Klassen I (z.B. Balhimycin), III (z.B. A47943), IV (z.B. A40926) und V (z.B. Complestatin) bereits publiziert. Bis jetzt war noch keine Halogenase aus einem Biosynthesegencluster der Klasse II bekannt. Für diese Arbeit wurden daher die Sequenzen der Halogenasen aus dem Avoparcin-Cluster (Klasse II) sowie dem Aridicin-Cluster (Klasse IV) freundlicherweise von Agnieszka Dziarnowski (Combinature Biopharm AG) zur Verfügung gestellt.

Durch das PCR-basierte Screening nach Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen konnten 9 neue Halogenasen mit hoher Homologie zu bereits beschriebenen Halogenasen aus GPA-Biosynthesegenclustern (Klasse I und V) identifiziert werden (Tab. 19). Die Sequenzierung benachbarter Gene ließ weitere Rückschlüsse auf das biosynthetische Potential dieser Stämme zu.

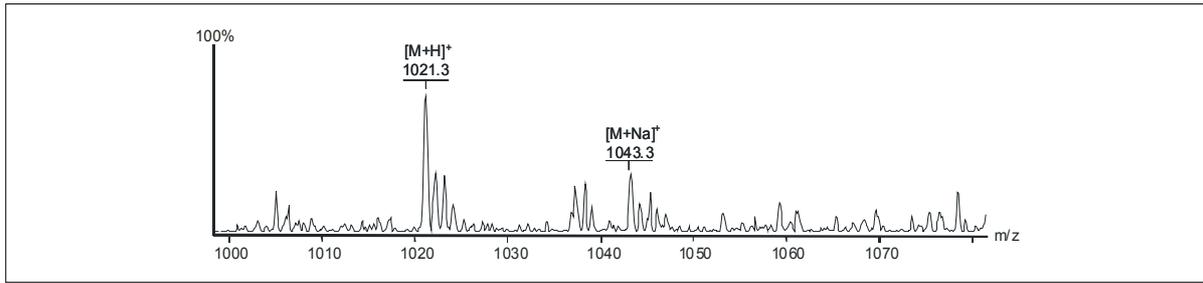
Einige der neu identifizierten potentiellen GPA-Produzenten wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Süssmuth von Dr. Marcelo Bertazzo auf die Produktion von GPA hin untersucht. Charakteristische Eigenschaften von GPA sind Massen zwischen  $m/z = 1000-1700$ , Chlorierungen und Zuckerfragmentierungen bei HPLC-MS-MS-Analysen. In Abb. 42-46 sind Beispielspektren der HPLC-MS-MS-Analysen potentieller GPA-Produzenten dargestellt.



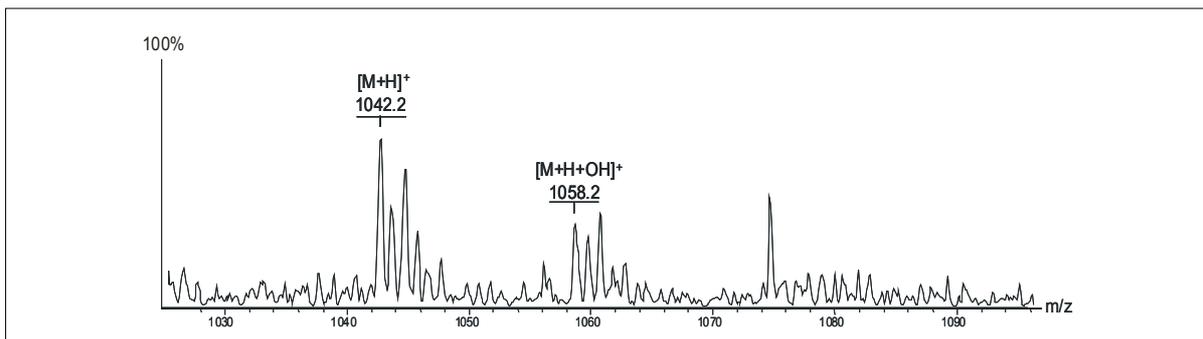
**Abb. 42:** HPLC-MS-Analyse des Stammes CB2429. Der Stamm produziert eine monochlorierte Substanz der Masse  $m/z = 1560$ . Dieselbe Substanz wird von dem Stamm CB2364 produziert.



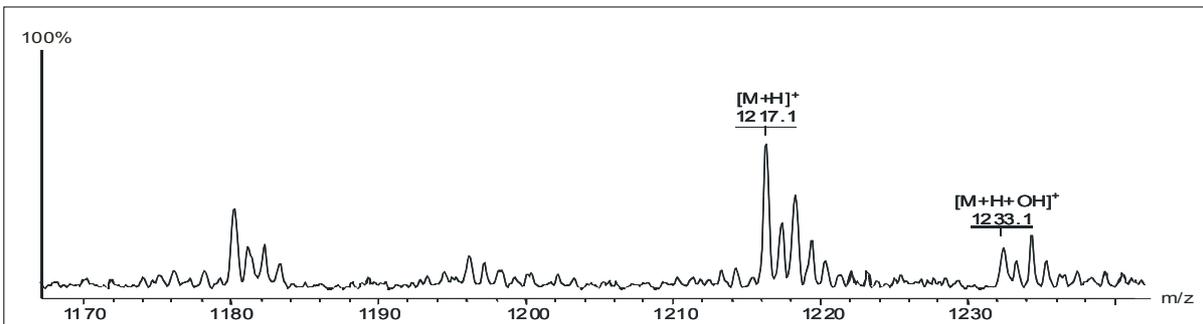
**Abb. 43:** HPLC-MS-Analyse des Stammes CB2023. Der Stamm produziert eine zweifach chlorierte Substanz der Masse  $m/z = 1135$ .



**Abb. 44:** HPLC-MS-Analyse des Stammes CB2192. Der Stamm produziert eine monochlorierte Substanz der Masse  $m/z = 1020$ .



**Abb. 45:** HPLC-MS-Analyse des Stammes CB2312. Der Stamm produziert eine zweifach chlorierte Substanz der Masse  $m/z = 1041$ .

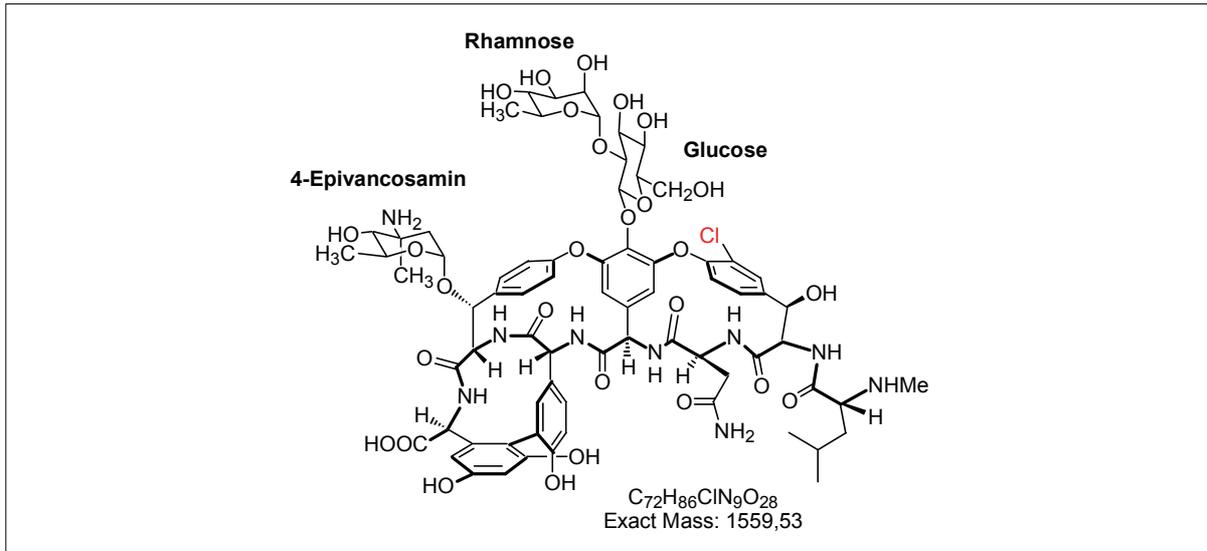


**Abb. 46:** HPLC-MS-Analyse des Stammes CB2664. Der Stamm produziert eine monochlorierte Substanz der Masse  $m/z = 1216$ .

Zur Verifizierung, dass GPA von den durch das genetische und chemische Screening identifizierten Wildtypstämmen produziert werden, wurde aus dem Wildtypstamm CB2364 eine monochlorierte Verbindung zur anschließenden Strukturaufklärung aufgereinigt. Aus einer 30 l Fermentation konnten 5 mg Reinsubstanz isoliert werden. In Tabelle 20 sind die NMR-Daten zusammengefasst. Bei dieser Substanz handelt es sich um MM 47761 (Box et al., 1990), ein Chloreremomycin-Derivat mit Aktivität gegen Gram-positive Bakterien (Abb. 47).

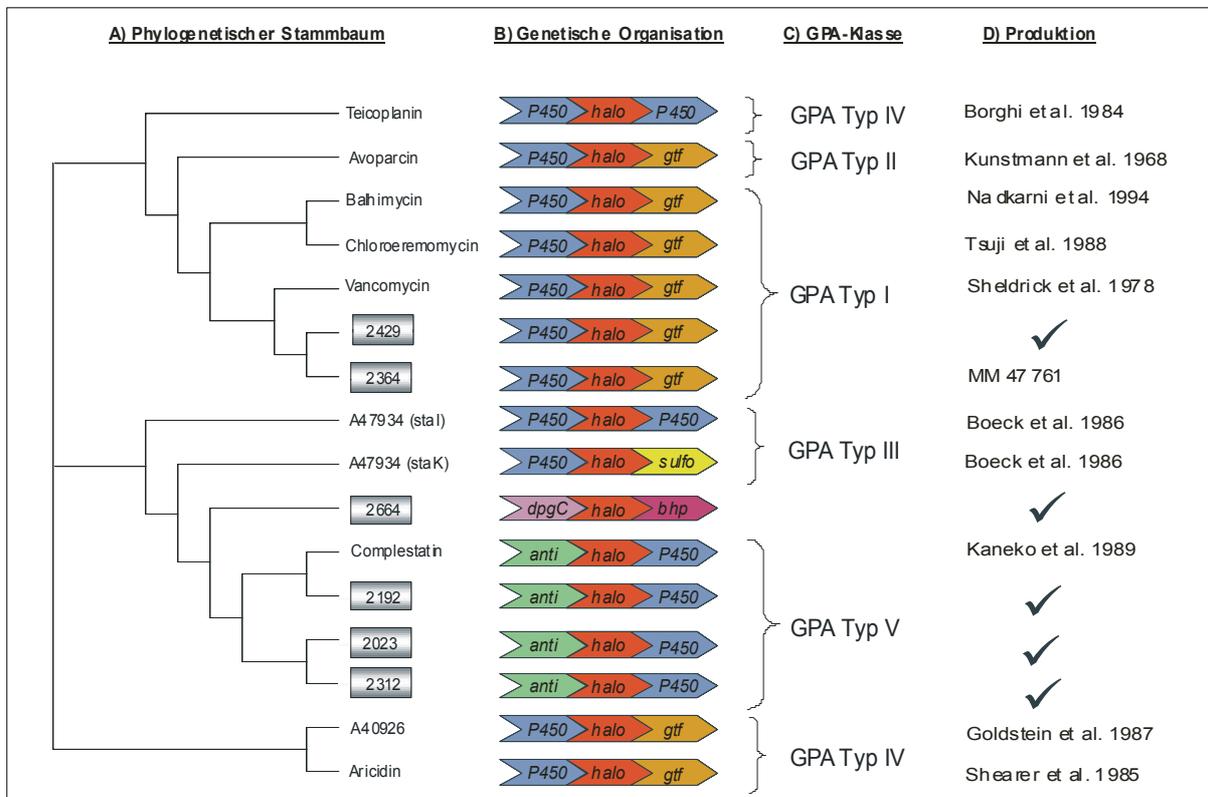
**Tab. 20:**  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR-chemische Verschiebungen von CB2364 ( $c_{\text{CB2364}} = 11 \text{ mg/ml}$ ,  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ , 305 K). Leu: Leucin, Cht: 3-Cl- $\beta$ -Hydroxytyrosin, Asn: Asparagin, Hpg: 4-Hydroxyphenylglycin, Hty:  $\beta$ -Hydroxytyrosin, Dpg: Dihydroxyphenylglycin Glc: Glucose, Rh: Rhamnose, Epi: 4-Epivancosamin. 1) Zuordnung nicht bestimmt.

	N, $\delta$	$\alpha$ , $\delta$	$\beta$ , $\delta$	Others, $\delta$			
$^1\text{Leu}$	8.92	4.02 59.1	1.66/1.53 39.0	$\gamma$ : 1.60; $\delta$ : 0.88/0.92, N-CH <sub>3</sub> : 2.58 $\gamma$ : 23.5; $\delta$ : 22.5/21.7 N-CH <sub>3</sub> : 30.8			
$^2\text{Cht}$	8.72	4.81 58.8	5.12 71.8	OH $^{\gamma}$ : 5.86; 2: 7.56; 1: 139.8; 2: 128.9; 3: 136.4; 4: 150.8; 5: 7.26; 6: 7.47 5: 128.5; 6: 127.7			
$^3\text{Asn}$	6.30	4.09 51.1	2.11/2.75 38.9	$\delta$ : $^1$ )			
$^4\text{Hpg}$	8.22	5.76 54.5	- -	2: 5.78 1: 134.3; 2: 108.8; 3: $^1$ ); 4: 132.4 6: 5.23 5: 152.7; 6: 107.3			
$^5\text{Hpg}$	8.86	4.49 53.3	- -	2: 7.11; OH $^4$ : 9.10 1: 125.8; 2: 136.8; 3: 121.6; 4: 155.0 5: 6.70; 6: 6.77 5: 116.8; 6: 126.3			
$^6\text{Hty}$	6.46 1	4.23 60.8	5.16 75.2	2: 7.65; 3: 7.15 1: $^1$ ); 2: 129.5; 3: 131.2; 4: 154.8; 5: 7.15; 6: 7.40 5: 123.4; 6: 129.8			
$^7\text{Dpg}$	8.65	4.44 56.4	- -	OH $^3$ : 8.96; OH $^5$ : 9.37; 4: 6.37 1: 136.1; 2: 118.2; 3: 156.9; 4: 102.9 6: 6.25; 5: 157.4; 6: 106.4			
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	
Glc $^{2)}$	5.54 100.2	3.61 76.8	3.43 77.6 5.22	3.22 70.3 5.03	3.25 77.6	3.75/3.47 61.2 3.45	
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	
Rh $^{3)}$	5.14 100.8	3.71 70.6 4.58	3.48 70.9 4.27	3.20 72.0 4.49	4.11 67.5	1.06 15.5	
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7' (CH <sub>3</sub> )
Epi $^{4)}$	4.75 93.1	1.86/2.11 38.4	- 55.1 NH <sub>2</sub> : 7.78	3.13 74.3 OH: 5.70	3.56 66.0	1.21 17.4	1.38 17.8



**Abb. 47:** MM 47761 aus CB2364.

In Abb. 48 ist ein Ausschnitt des phylogenetischen Stammbaumes gezeigt, der die Klasse der GPA umfasst. Anhand der genetischen Organisation publizierter Biosynthesegencluster lassen sich die durch das genetische Screening gefundenen Cluster in unterschiedliche GPA-Klassen einteilen (Typ I und Typ V).

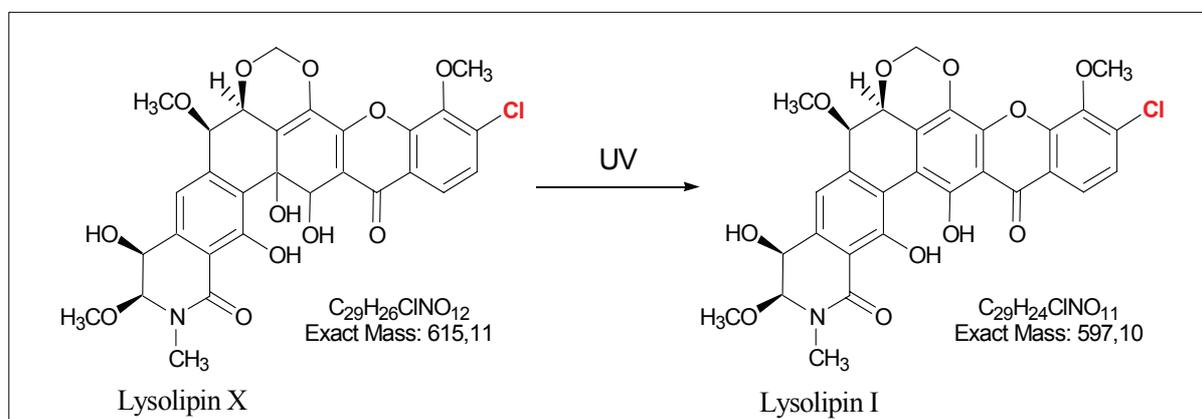


**Abb. 48:** A) Ausschnitt des phylogenetischen Stammbaumes, der die Substanzklasse der GPA umfasst. Neu identifizierte Halogenasen sind grau markiert. Der Stammbaum wurde ausschließlich mit Vollständigensequenzen erstellt. B) Genetische Organisation publizierter sowie neu gefundener Biosynthesegencluster. Die postulierten Funktionen der Enzyme basieren auf Sequenzhomologievergleichen. Die entsprechenden Gene sind wie folgt bezeichnet: P450, Cytochrom P450

*Monooxygenase; halo, Halogenase; gtf, Glycosyltransferase; sulfo, Sulfotransferase; anti, Antiporter; dpnC, Dehydrogenase; bhp, Hydrolase. C) Es konnten neue Biosynthesegencluster identifiziert werden, die stromaufwärts und stromabwärts der Halogenase eine gleiche genetische Organisation aufweisen wie publizierte Cluster der GPA-Klassen I und V. In dem Stamm CB2664 konnte ein Cluster mit einer neuartigen genetischen Organisation identifiziert werden. Stromaufwärts der Halogenase liegt ein Gen (dpgC) mit Homologie zu einer Hydroxyacyl-dehydrogenase, die an der Biosynthese von 3,5-Dihydroxyphenylglycin in *Amycolatopsis balhimycina* beteiligt ist und stromabwärts liegt ein Gen (bhp) mit Homologie zu der Perhydrolase (Hydroxytyrosin-Biosynthese) aus dem Balhimycin-Cluster. Alle als potentielle GPA-Produzenten identifizierten Stämme produzieren chlorierte Substanzen mit für GPA typischen Massen. Der Stamm CB2364 produziert ein Chloreremomycin-Derivat (MM 47761), das, wie vorhergesagt, zu den GPA der Klasse I gehört. Der Stamm CB2429 produziert ebenfalls diese Verbindung.*

### 3.3.3 Xanthon-Antibiotika

Der Stamm *Streptomyces tendae* Tü4042 (CB28) produziert das Polyketid-Antibiotikum Lysolipin, ein polyzyklisches, monochloriertes Xanthon mit starker antibiotischer Wirkung gegen Bakterien sowie Antitumorwirkung gegen verschiedene Tumorzelllinien. Lysolipin wurde 1975 erstmals als ein Metabolit des Stammes *Streptomyces violaceoniger* Tü96 beschrieben (DRAUTZ et al., 1975). Das von dem Produzenten synthetisierte Lysolipin X wird durch Licht, Hitze oder UV-Strahlung in das stabilere Lysolipin I umgewandelt (Abb. 49). Lysolipin I weist eine 10-50 fach höhere biologische Aktivität auf.

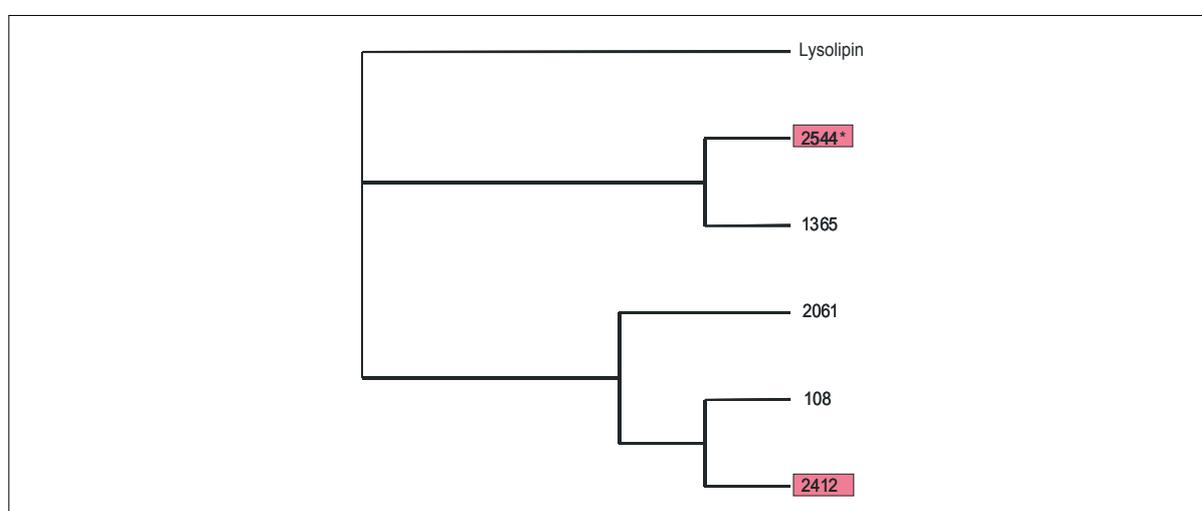


**Abb. 49:** Die Xanthon-Antibiotika Lysolipin X und Lysolipin I.

#### 3.3.3.1 PCR-basiertes Screening nach neuen Xanthon-Antibiotika-Produzenten

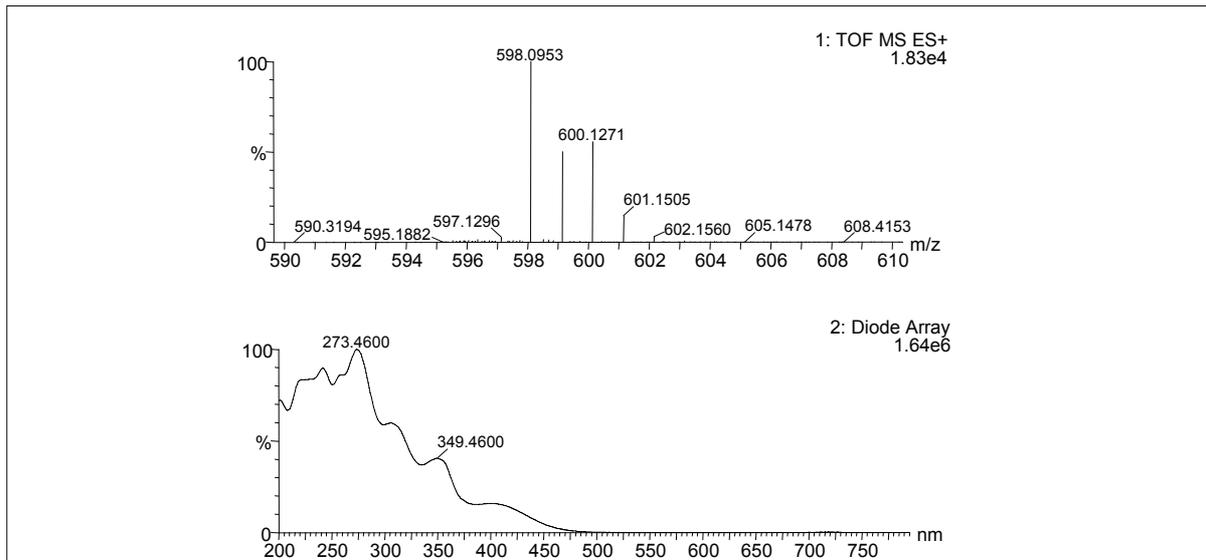
Durch das PCR-basierte Screening nach Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen konnten für die Substanzklasse der Xanthone 5 neue Halogenasen mit hoher Homologie zu der Halogenase aus dem Lysolipin-Biosynthesegencluster identifiziert werden (Tab. 19). Zur weiteren Charakterisierung der identifizierten Cluster wurde nach Polyketid-Synthase II-spezifischen Genen ( $\alpha$ -Ketosynthase (KS)) gesucht, da Lysolipin zur

Gruppe der aromatischen Polyketide gehört. Da nur Cosmid-Genbanken der Stämme CB2412 und CB2544 existierten, konnten nur Cosmide dieser Stämme untersucht werden. Auf beiden Cosmiden mit der jeweilig neu identifizierten Halogenase konnte die für PKS II-typische  $\alpha$ -KS-Domäne amplifiziert werden. Die KS-Domäne des CB2544-Clusters hat eine 71%ige Identität zur KS-Domäne des Rubromycin-Biosynthesegenclusters aus *Streptomyces collinus* und die des CB2412-Clusters eine 56%ige. In Abb. 50 ist der Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum (Halogenasen) der potentiellen Xanthon-Antibiotika-Produzenten dargestellt.



**Abb. 50:** Phylogenetischer Stammbaum potentieller Xanthon-Antibiotika-Produzenten. Durch das genetische Screening wurde ein alternativer Lysolipin-Produzent entdeckt (CB2544\*). Die Halogenase aus dem Stamm CB2544 ist zu 82% identisch zu der Halogenase aus dem Lysolipin-Biosynthesegencluster.

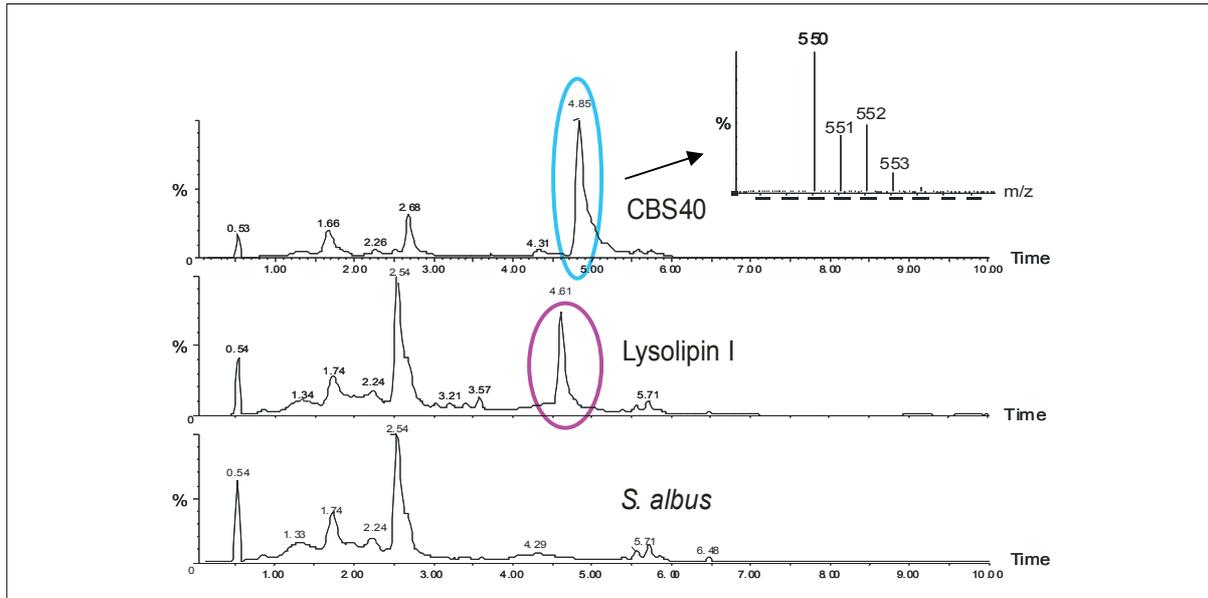
Die durch das genetische Screening identifizierten Stämme wurden anschließend chemisch weiter untersucht, ob sie Lysolipin oder andere Xanthon-Antibiotika produzieren. Dafür wurden sie kultiviert, mit Ethylacetat extrahiert und auf für Halogenierungen typische Isotopenmuster hin untersucht. In einem Extrakt des Stammes CB2544 konnte Lysolipin I mittels HPLC-MS nachgewiesen werden (Abb. 51). In den weiteren 4 Wildtypstämmen konnten keine halogenierten Substanzen detektiert werden.



**Abb. 51:** HPLC-MS-Analyse eines Extraktes des Stammes CB2544. Masse (positiver Modus) und UV-Spektrum stimmen mit den Daten von Lysolipin I überein.

Da sich PKS II-Cluster aufgrund ihrer geringen Größe von ca. 40 kb eignen heterolog exprimiert zu werden, wurden alle durch Southern Blot bestätigten Cosmide (Halogenase-Sonde) der Stämme CB28, CB2544 und CB2412 mittels Konjugation nach *S. albus* transferiert. Dadurch sollte eine Cluster/Metabolit-Korrelation nachgewiesen bzw. im Fall von CB2412 ein weiterer Xanthon-Antibiotika-Produzent identifiziert werden.

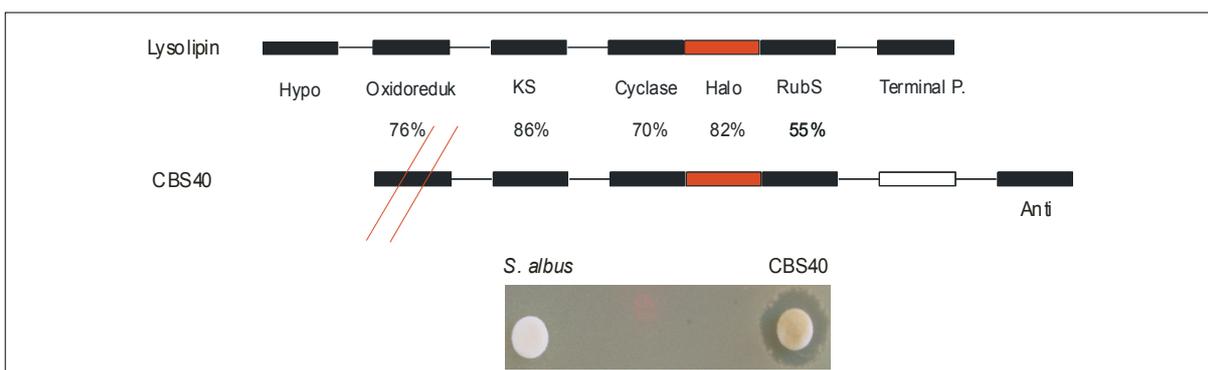
In einem Extrakt eines Transkonjuganten (*S. albus* + Cosmid<sub>28-4H04</sub>) konnte Lysolipin mittels HPLC-MS detektiert werden (Abb.52). Ein anderer Transkonjugant (*S. albus* + Cosmid<sub>2544-3B10</sub>) produzierte eine monochlorierte Substanz der Masse  $m/z = 549$  (Abb. 52). Keiner der weiteren Transkonjuganten (*S. albus* + Cosmide<sub>2412</sub>) produzierte Lysolipin I oder eine andere halogenierte Verbindung.



**Abb. 52:** HPLC-MS-Analyse. Als Negativkontrolle wurde ein Extrakt von *S. albus* analysiert. In einem Extrakt (*S. albus* + Cosmid<sub>28-4H04</sub>) konnte Lysolipin detektiert werden und in einem anderen Extrakt (*S. albus* + Cosmid<sub>2544-3B10</sub>) eine monochlorierte Verbindung (CBS40) der Masse  $m/z = 549$  (positiver Modus).

### 3.3.3.2 Sequenzanalyse

Die Ansequenzierung des Cosmid-Inserts (2544-3B10) ergab, dass das Cluster aus dem Stamm CB2544 unvollständig kloniert wurde. Stromaufwärts einer sich am 5'-Ende befindenden Oxidoreduktase ist das Cluster unvollständig im Vergleich zum Lysolipin-Cluster (Cosmid<sub>28-4H04</sub>), wodurch auch die Biosynthese von Lysolipin nicht abgeschlossen werden kann (persönliche Mitteilung von Patricio Lopez). Die von diesem Transkonjuganten produzierte Substanz (CBS40) zeigt dennoch, wie Lysolipin, eine Aktivität gegen Gram-positive Bakterien. In Abb. 53 ist ein schematischer Aufbau der beiden Cluster dargestellt sowie der Hemmhofstest mit CBS40 gegen *B. subtilis*.

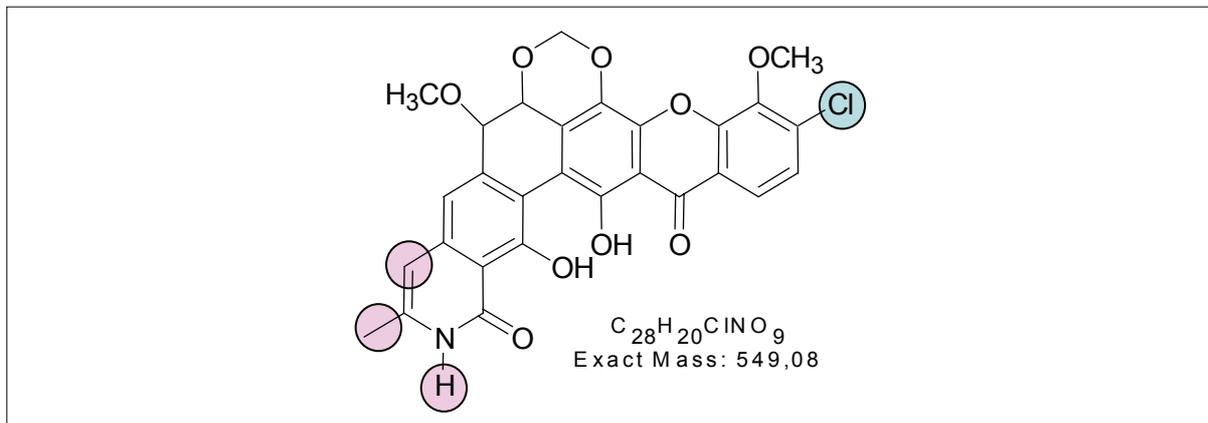


**Abb. 53:** Schematischer Aufbau der beiden heterolog exprimierten Cluster (Lysolipin und CBS40). Das Cluster des alternativen Lysolipin-Produzenten (CB2544) ist nicht vollständig kloniert (N-Terminus

der Oxidoreduktase fehlt), weshalb heterolog in *S. albus* nicht Lysolipin, sondern CBS40 produziert wird. Hypo: Hypothetical Protein, Oxidoreduk: Oxidoreduktase, KS: Ketosynthase, Halo: Halogenase, RubS: Regulator, Terminal P.: Terminal Protein, Anti: Antiporter. Die Homologien der jeweiligen AS-Sequenzen zwischen den beiden Clustern sind in Prozent angegeben. Der Extrakt (CBS40) zeigt eine Aktivität gegen *B. subtilis*. Als Negativkontrolle wurde ein Extrakt von *S. albus* verwendet.

### 3.3.3.3 Strukturaufklärung von CBS40 und Aktivitätstests

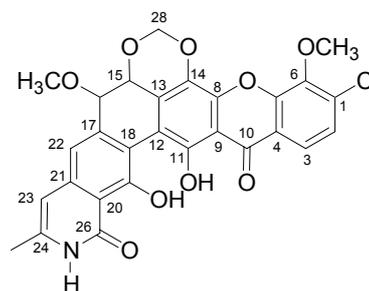
Für die Strukturaufklärung (Tab. 21) der Verbindung CBS40 konnten aus 5 Liter Kultur 10 mg Reinsubstanz isoliert werden. In Abb. 54 ist die Struktur von CBS40 dargestellt. Für Lysolipin I sowie für CBS40 wurden MIC-Werte (Minimal Inhibitory Concentration) für verschiedene Bakterien bestimmt. Im Vergleich zu Lysolipin I zeigt CBS40 zusätzlich eine Aktivität gegen Gram-negative Bakterien. Teilweise ist auch die Aktivität gegen Gram-positive Bakterien höher als die von Lysolipin I (Tab. 22).



**Abb. 54:** Struktur von CBS40. Die Chlorierung ist im Vergleich zu Lysolipin I an derselben Position (hellblaue Markierung). Lysolipin I verfügt über eine weitere Hydroxylgruppe sowie eine O-Methylierung anstatt einer C-Methylierung und eine weitere N-Methylierung (rosa Markierungen).

**Tab. 21:**  $^1\text{H}$  (600,01 MHz) und  $^{13}\text{C}$  (150,87 MHz) NMR-chemische Verschiebungen von CBS40 ( $C_{\text{CBS40}}$  = 17 mg/ml,  $d_1$ -Chloroform, 298 K).

Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	134.2 s
2	7.36 d, 8.6 Hz	125.5 d
3	7.94 d, 8.6 Hz	120.8 d
4	-	121.0 s
5	-	150.0 s
6	-	145.3 s
6-OCH <sub>3</sub>	4.15 s	61.6 q
8	-	143.5 s
9	-	109.0 s
10	-	181.4 s
11	-	151.7 s
1-OH	12.97 s	-
12	-	111.3 s
13	-	127.6 s
14	-	133.3 s
15	5.05 d, 2.6 Hz	75.5 d
16	4.48 d, 2.6 Hz	79.5 d
16-OCH <sub>3</sub>	3.32 s	57.3 q
17	-	139.0 s
18	-	113.5 s
19	-	159.1 s
19-OH	13.37 s	-
20	-	112.1 s
21	-	139.6 s
22	6.89 s	115.9 d
23	6.34 s	106.0 d
24	-	137.4 s
24-CH <sub>3</sub>	2.36 br s	19.3 q
25	10.01 s	-
26	-	166.9 s
28	5.63 d, 5.6 Hz 5.39 d, 5.6 Hz	91.0 t



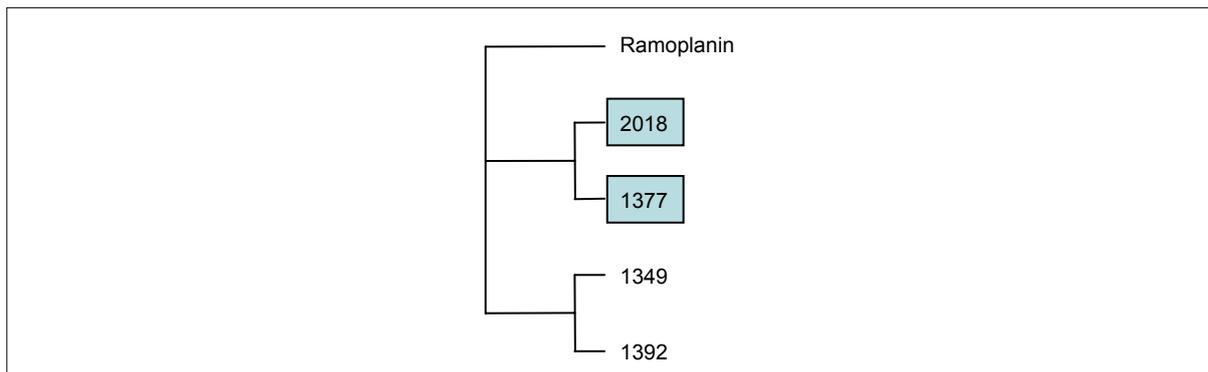
**Tab. 22:** MIC-Werte für Lysolipin I und CBS40.

Organismus	MIC (Lysolipin I)	MIC (CBS40)
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC51575	30 ng/ml	10 ng/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33592	1 ng/ml	0,3 ng/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	1 ng/ml	0,3 ng/ml
<i>Streptococcus pneumoniae</i> EM & AM	10 ng/ml	10 ng/ml
<i>E. coli</i> ATCC10536	100 µg/ml	3 µg/ml

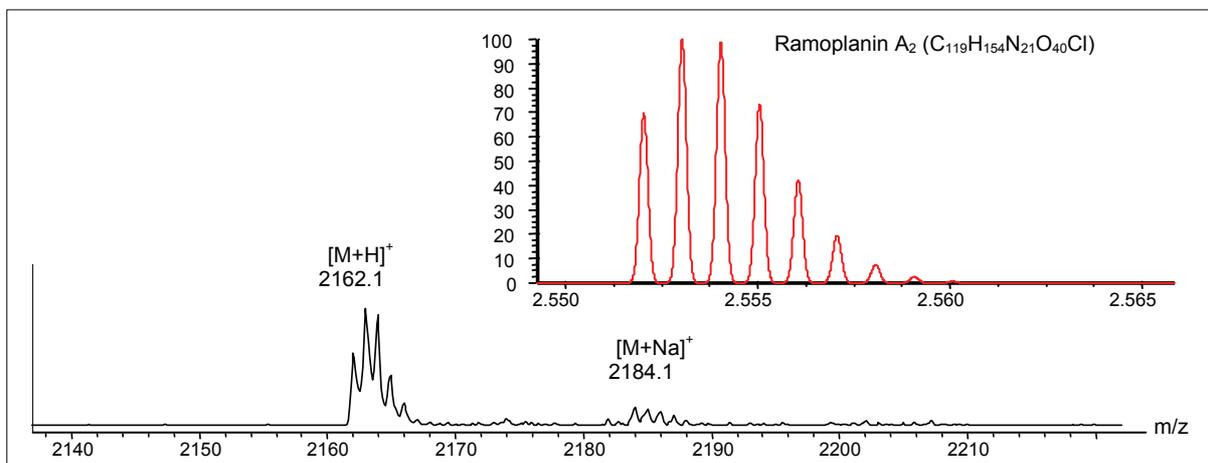
### 3.3.4 Lipoglykodepsipeptide

Ramoplanin (CAVALLERI et al., 1984) gehört zu den Lipoglykodepsipeptiden und befindet sich in einer klinischen Phase III Studie. Es ist wirksamer als Vancomycin gegen Gram-positive Bakterien. Ramoplanin ist eine monochlorierte Verbindung (3-Cl-4-Hydroxyphenylglycin), die aus 17 AS-Resten sowie einer N-Acylierung und einem Disaccharid (2 Mannosen) besteht (CUDIC et al., 2002).

Durch das genetische Screening nach Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen konnten 4 Halogenasen mit Homologie (64-83%) zu der Halogenase aus dem Ramoplanin-Cluster identifiziert werden (Abb. 55). Zwei dieser Stämme produzierten eine wahrscheinlich chlorierte Verbindung der Masse  $m/z = 2161$ . Ramoplanin  $A_2$  hat eine Masse von  $m/z = 2552$ . In Abb. 56 sind das Massenspektrum der chlorierten Verbindung aus CB2018 sowie das mit IsoPro 3.0 simulierte Isotopenmuster von Ramoplanin  $A_2$  dargestellt.



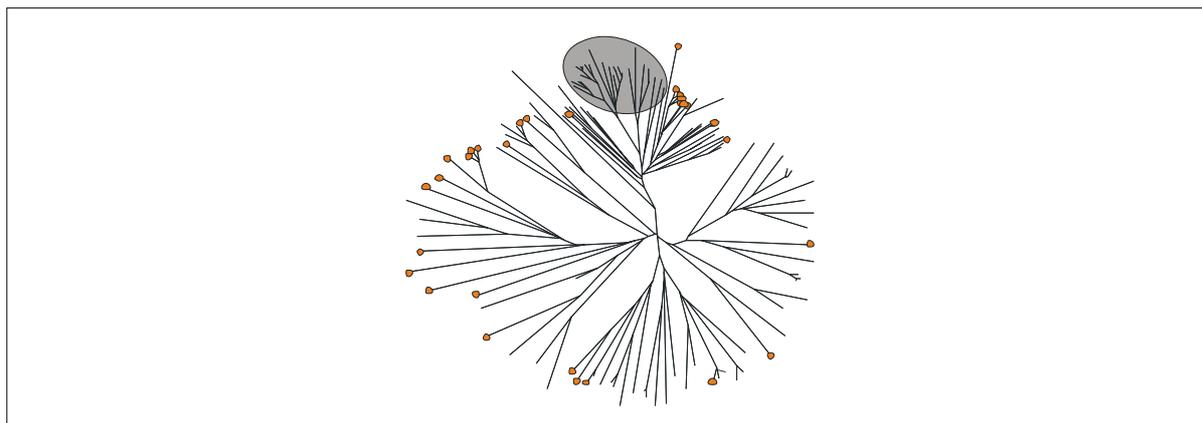
**Abb. 55:** Phylogenetischer Stammbaum von Halogenasen aus potentiellen Lipoglykodepsipeptid-Produzenten. Durch das HPLC-MS-Screening wurden zwei Stämme entdeckt (blaue Markierung), die eine chlorierte Verbindung produzieren.



**Abb. 56:** HPLC-MS-Analyse von CB2018 (positiver Modus). Das von Ramoplanin  $A_2$  simulierte Isotopenmuster stimmt mit dem Isotopenmuster der Verbindung aus CB2018 überein.

### 3.3.5 Naphthoquinone

Der phylogenetische Stammbaum, der in Abb. 41 abgebildet ist, zeigt mehrere Untergruppen mit neuen Halogenasen, zu denen keine publizierte Halogenase eine signifikante Homologie aufweist. Um Hinweise über die von diesen Stämmen produzierten Sekundärmetabolite zu bekommen, wurden Stämme einer Untergruppe (Abb. 57) mittels HPLC-MS analysiert.



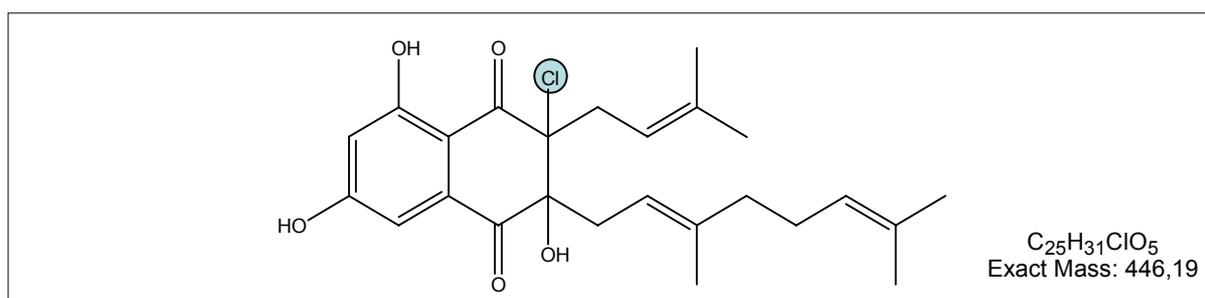
**Abb. 57:** Phylogenetischer Stammbaum publizierter (orange) und neu identifizierter Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen. Die grau markierte Untergruppe neuer Halogenasen wurde mittels HPLC-MS auf das Vorhandensein halogener Verbindungen untersucht.

In dem Stamm CB2365 konnten mehrere chlorierte Verbindungen einer Substanzklasse detektiert werden. Von der monochlorierten Verbindung der Masse  $m/z = 446$  konnten aus einer Fermentation auf Agarplatten (12 l Festmedium) 2 mg Reinsubstanz zur Strukturaufklärung (Tab. 23) isoliert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um das zu den Naphthoquinonen zählende Naphthomevalin handelt (HENKEL & ZEECK, 1991). In Abb. 58 ist die Struktur von Naphthomevalin dargestellt.

**Tab. 23:** NMR-Daten von CB2365 (Naphthomevalin).

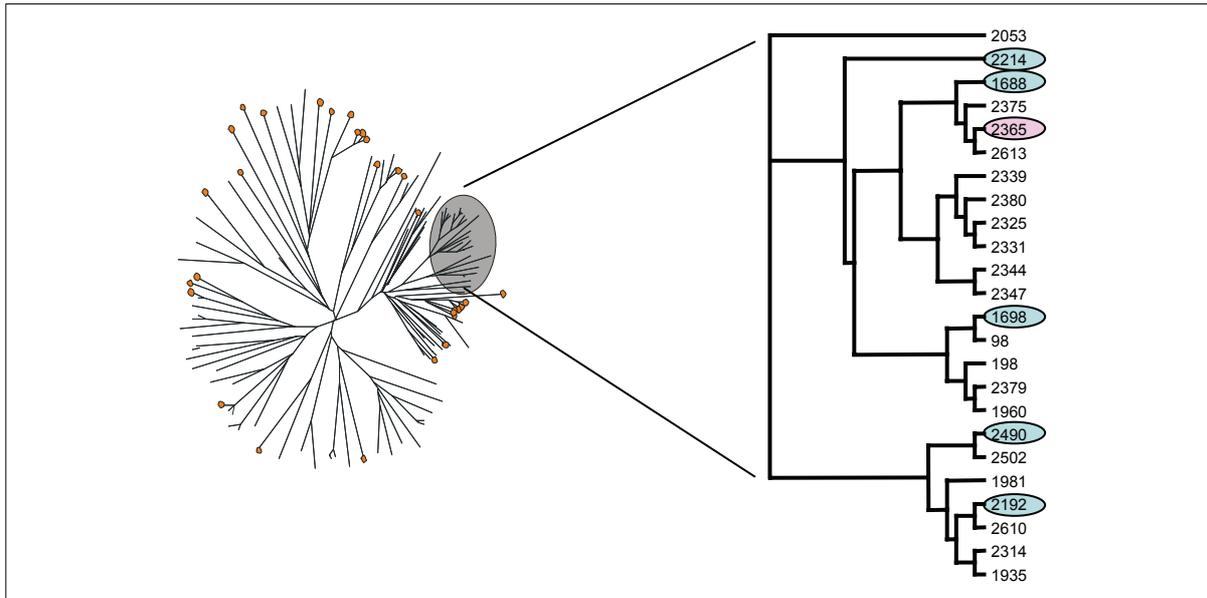
Position	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) <sup>1)</sup>	COSY	HMBC
C-1	-	195.2 s		
C-2	-	83.2 s		
C-3	-	83.9 s		
C-3-OH	4.10 s, 1 H			196.7, 83.3
C-4	-	196.7 s		
C-4a	-	n.d. <sup>1)</sup>		
C-5	6.99 d, 1 H, 2.3 Hz	106.9 d	6.67	196.7, 110.5
C-6	-	164.1 s		
C-6-OH	6.38 s br, 1 H			
C-7	6.67 d, 1 H, 2.3 Hz	109.1 d	6.99	164.1, 110.5, 106.9
C-8		164.5 s		

C-8-OH	11.95 s, 1 H			164.5, 109.1
C-8a	-	110.5 s		
C-1'	2.96 dd, 1 H, 7.2, 15.5 Hz 2.47 dd, 1 H, 7.9, 15.5 Hz	38.3 t	4.90, 2.47 4.90, 2.96	195.2, 138.0, 116.6, 83.3 195.2, 138.0, 116.6, 83.3
C-2'	4.90 dd br, 1 H, 7.2, 7.9 Hz	116.6 d	2.96, 2.47, 1.54, 1.26	25.6*, 17.6
C-3'	-	138.0 s		
C-4'	1.54 s, 3 H	25.6 q	4.90	138.0, 116.6, 83.3, 17.6
C-5'	1.26 s, 3 H	17.6 q		138.0, 116.6, 83.3, 25.6*
C-1''	2.93 dd, 1 H, 7.2, 15.5 Hz 2.26 dd, 1 H, 7.9, 15.5 Hz	37.3	4.80, 2.26 4.80, 2.93	196.7, 141.5, 115.5, 83.9 141.5, 115.5, 83.9
C-2''	4.80 dd br, 1 H, 7.2, 7.9 Hz	115.5 d	2.93, 2.26, 1.26	39.7, 37.3, 16.0
C-3''	-	141.5 s		
C-4''	1.88 m, 2 H	39.7 t	1.95	141.5, 123.8, 115.5, 26.3*, 16.0
C-5''	1.95 m, 2 H	26.3 t	5.00, 1.88	141.5, 131.8, 123.8, 39.7
C-6''	5.00 dd br, 1 H, 6.8, 7.9 Hz	123.8 d	1.95, 1.68, 1.57	26.3 / 25.7*, 17.6
C-7''	-	131.8 s		
C-8''	1.68 s, 3 H	25.7 q	5.00	131.8, 123.8, 17.6
C-9''	1.57 s, 3 H	17.6 q	5.00, 1.68	131.8, 123.8, 25.7*
C-10''	1.26 s, 3H	16.0 q		141.5, 115.5, 39.7



**Abb. 58:** Struktur von Naphthomevalin.

In keinem weiteren Extrakt von Stämmen dieser Untergruppe konnten chlorierte Verbindungen identifiziert werden. Die Sequenzierung und der anschließende Datenbankvergleich des Gens stromaufwärts einiger Halogenasen dieser Untergruppe zeigte eine Homologie zur Thioesterase-Domäne aus dem Erythromycin-Biosynthesegencluster. Erythromycin wird von einer PKS I synthetisiert und zählt zu den Makrolid-Antibiotika. Hybridisierungen mit PKS I-Sonden und ein PCR-Screening mit für PKS I-spezifischen Primern auf Cosmiden von Stämmen dieser Untergruppe, deuteten zusätzlich darauf hin, dass keine Korrelation zwischen dem in Stamm CB2365 identifizierten Biosynthesegencluster und Naphthomevalin besteht. Dieses Cluster kodiert wahrscheinlich eine PKS des Typs I, genauso wie die anderen Cluster dieser Untergruppe (Abb. 59). In dem Stamm CB2365 muss deshalb noch eine weitere Halogenase vorhanden sein, die an der Biosynthese von Naphthomevalin beteiligt ist.



**Abb. 59:** Ausschnitt aus dem in Abb. 57 dargestellten vollständigen phylogenetischen Stammbaum neuer und publizierter Halogenasen. Die Halogenasen enthaltenden Cosmide bzw. Cluster der grau markierten Untergruppe wurden auf das Vorhandensein PKS I-spezifischer Gene mittels PCR, Hybridisierungen und Sequenzierung zur Halogenase benachbarter Gene hin untersucht. In dem Biosynthesegencluster des Naphthomevalinproduzenten (*rosa*) sowie in 5 weiteren identifizierten Clustern (hellblau) konnten PKS I-spezifische Gene identifiziert werden.

### 3.4 Derivatisierung von Naturstoffen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden etabliert, um bereits bekannte Naturstoffe als Leitstrukturen zu nutzen und zu derivatisieren. Grundlage stellten hierbei die neu identifizierten Halogenasen und die dadurch entdeckten Biosynthesegencluster da.

Zielmoleküle waren Lysolipin I bzw. CBS40 als Vertreter der Xanthone sowie Balhimycin (GPA Typ I) und A47934 (GPA Typ III). Zum einen sollte die für solche Zwecke bisher noch nicht verwendete Methode der Transposon-Mutagenese angewendet werden und zum anderen klassische Methoden wie die kombinatorische Biosynthese und Veränderungen von Fermentationsbedingungen.

#### 3.4.1 Lysolipin-Derivate

Lysolipin I ist aufgrund seiner starken Aktivität gegen Gram-positive Bakterien eine für die pharmazeutische Industrie interessante Substanz. Nachteile dieser Verbindung sind stark toxische Eigenschaften sowie die schlechte Löslichkeit in Wasser (0,762 µg/ml, 0,8% NaCl, pH 7,2). Deshalb ist es von großem Interesse, durch die Generierung verschiedener Lysolipin-Derivate, diese schlechten Eigenschaften zu minimieren. Ausgangsverbindung für die Herstellung verschiedener Derivate war nicht nur Lysolipin I, sondern auch das durch das Screening identifizierte Lysolipin-Derivat CBS40.

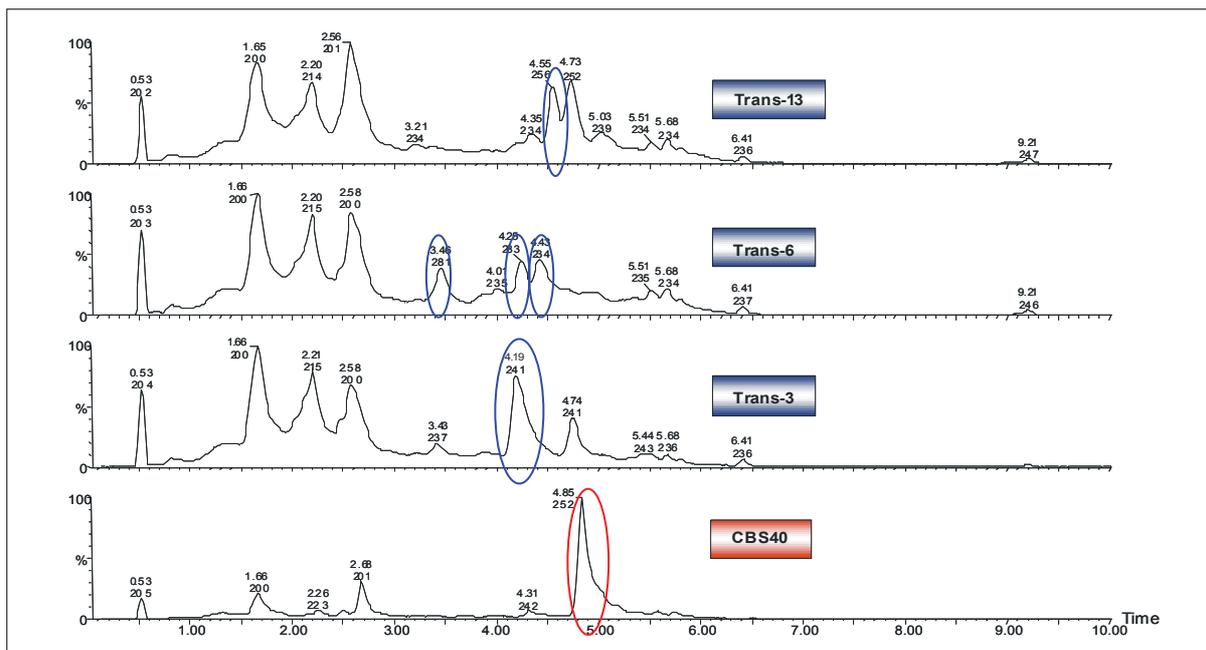
##### 3.4.1.1 Naturstoffderivatisierung mittels Transposon-Mutagenese

Die Firma Epicentre vertreibt ein Kit, der eigentlich als Alternative für die schnellere Sequenzierung von größeren DNA-Fragmenten verwendet wird. Das Kit basiert auf einem Tn5-Transposase-System, und die Selektion erfolgt mithilfe einer Kanamycin-resistenz.

Die unspezifische Integration des Transposons in ein beliebiges DNA-Fragment sollte für diese Arbeit genutzt werden, um willkürlich Gene eines Biosynthesegenclusters zu inaktivieren und auf diese Weise eine große Vielzahl nicht vorhersagbarer Derivate einer Verbindung zu generieren. Als Target-DNA wurden Cosmide, die das Lysolipin- und CBS40-Biosynthesegencluster tragen, eingesetzt, in die das Transposon unspezifisch integrierte. Auf die Ergebnisse bezüglich des Lysolipin-Clusters wird in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

Im Fall von CBS40 konnten 18 Transposon tragende *E. coli*-Klone identifiziert werden. Von diesen 18 Cosmiden konnten 16 mittels Konjugation nach *S. albus* transferiert werden. Die Ethylacetat-Extrakte dieser Transkonjuganten wurden auf zusätzliche UV-Peaks im Vergleich zu *S. albus* + Cosmid<sub>2544-3B10</sub> (CBS40-Produzent) analysiert. Drei der Transkonjuganten zeigten UV-Peaks, die nicht in dem CBS40 produzierenden Transkonjuganten detektierbar waren (Abb. 60). Die Transposon tragenden Cosmide, die neue Verbindungen produzieren, wurden ansequenziert, um den Integrationsort und die damit verbundene Geninaktivierung zu untersuchen (Tab. 24). Eine dieser Verbindungen (CBS52) konnte aus der Transkonjugante „Trans-3“ isoliert und die Struktur bestimmt werden (Abb. 61).

Die Aufreinigung erfolgte analog zu CBS40 und wurde von der Abteilung „Lead Characterization & Production“ der Combinature Biopharm AG durchgeführt. Die NMR-Daten sind in Tab. 25 aufgeführt.



**Abb. 60:** HPLC-MS-Analyse der drei Transkonjuganten Trans-3, Trans-6 und Trans-13. Als Kontrolle wurde der Ethylacetat-Extrakt von *S. albus* + Cosmid<sub>2544-3B10</sub> (CBS40-Produzent) verwendet. Neue UV-Peaks sind blau markiert.

**Tab. 24:** Sequenzvergleich der inaktivierten Gene (CBS40-Cluster) mit der von Prof. Wohlleben zur Verfügung gestellten Sequenz des Lysolipin-Biosynthesegenclusters sowie die Massen der von den entsprechenden Transkonjuganten produzierten Verbindungen. Die dazugehörigen Massenspektren sind nicht dargestellt. Die UV-Peaks sind in Abb. 65 blau markiert.

Cosmid-Nr.	Gen (inaktiviert)	Homologie (Lysolipin-Cluster)	Verbindung [m/z]; Chlorierung [ja / nein]
Trans-3	Monooxygenase	78% (llpOVIII)	m/z = 518; nein (CBS52)
Trans-6	Monooxygenase	76% (llpOI)	m/z <sub>1</sub> = 492; nein, m/z <sub>2</sub> = 476; nein, m/z <sub>3</sub> = 476; nein
Trans-13	Glykosyltransferase	66% (llpG)	521; ja

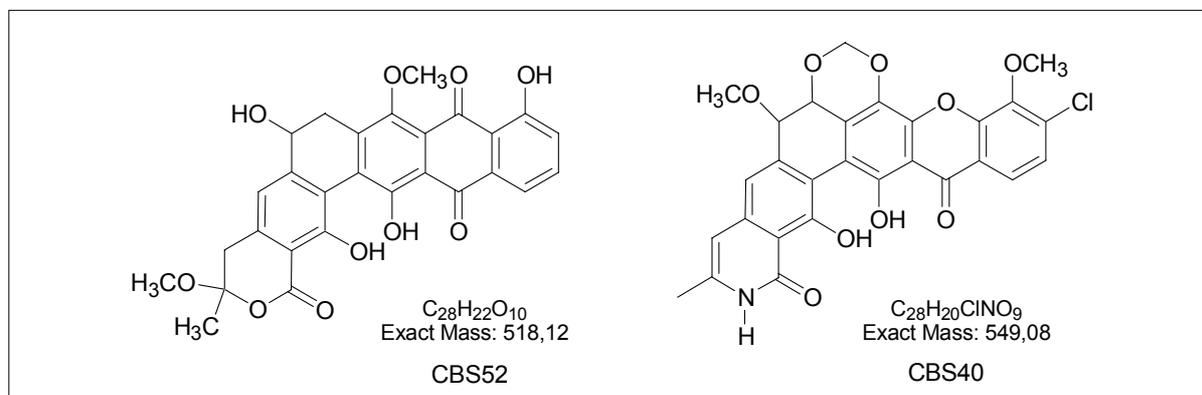
Auch diese Sequenzierungen des CBS40-Clusters ergeben einen analogen Aufbau im Vergleich zu dem Lysolipin-Cluster (s. Abb. 53). Bei „Trans-3“ und „Trans-6“ integrierte das Transposon jeweils in eine Monooxygenase und bei „Trans-13“ in eine Glykosyltransferase.

Allerdings besteht kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen inaktiviertem Gen und produzierten Verbindungen bzw. den detektierten Massendifferenzen.

**Tab. 25:** NMR-Daten von CBS52 (Trans-3). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton), <sup>13</sup>C-NMR (150.9 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton)

Position	δ <sup>1</sup> H (ppm)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>13</sup> C (ppm) in CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	COSY	HMBC
C-1	7.36 d	125.6 d	125.3	7.80	117.9, 119.4, 163.5
C-2	7.80 dd	137.3 d	136.7	7.36, 7.84	133.9, 163.5
C-3	7.84 d	119.4 d	119.2	7.80	117.9, 125.6, 189.2
C-4		133.9 s	133.4		
C-5		117.9 s	117.4		
C-6		163.5 s	163.1		
6-OH	13.05 s				117.9, 125.6, 163.5
C-7		188.6 s	188.2		
C-8		114.1 s	113.6*		
C-9		115.2 s	115.0		
C-10		189.2 s	188.7		
C-11		158.8 s	158.3		
11-OH	14.11 s				115.2, 130.9, 158.8
C-12		130.9 s	130.2		
C-13		143.8 s	140.1*		
C-14		153.4 s	152.0		
14-OCH <sub>3</sub>	3.92 s	61.8 q	62.0		153.4
C-15	2.54 m 3.54 m	32.9 t	32.6	3.54 2.54	130.9, 143.8, 153.4 68.8, 143.8, 153.4
C-16	4.69 m	68.8 d	68.9	2.54, 3.54, 5.10	
16-OH	5.10 d			4.69	
C-17		n.o	142.5*		
C-18		n.o.	117.4 od 123.1		
C-19		160.2 s	159.7		
19-OH	12.02 s				107.9, 117.1, 160.2
C-20		107.9 s	107.8		
C-21		141.3	140.5*		
C-22	7.22 s	114.6 d	113.7*		39.3, 68.8, 107.9, 117.1

C-23	3.32 m 3.49 m	39.3 t	39.5		107.9, 114.6, 141.3 106.7, 141.3
C-24		106.7 s	106.2		
24-CH <sub>3</sub>	1.74	22.9 q	23.1		39.3, 106.7, 141.3, 170.3
24-OCH <sub>3</sub>	3.41	50.6 q	51.1		106.7
C-26		170.2 s	169.6		

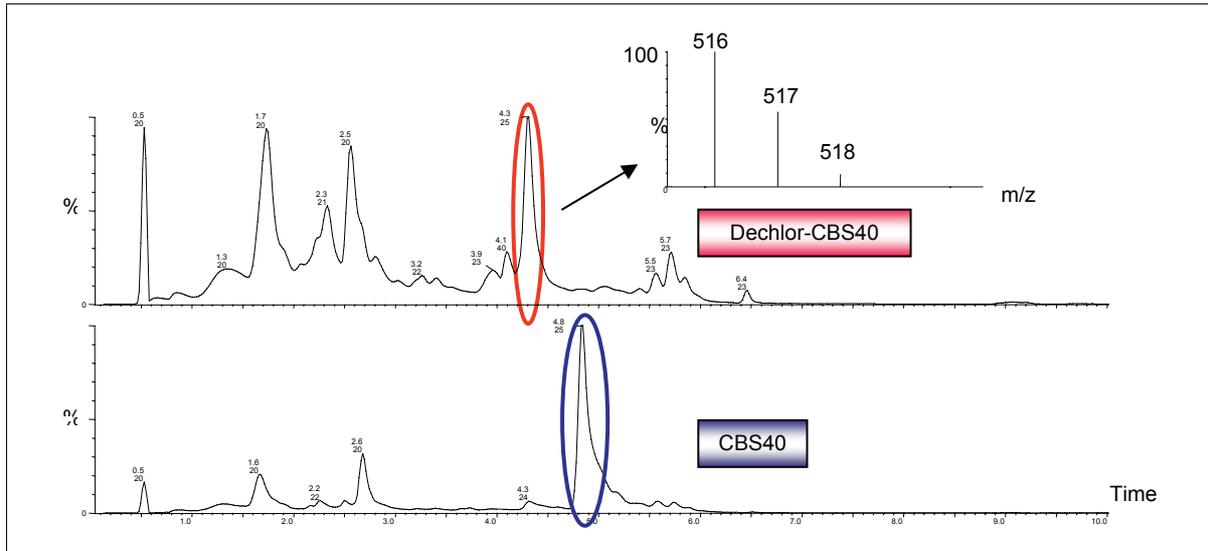


**Abb. 61:** Struktur von CBS52 im Vergleich zu CBS40.

Das Ziel war, durch die Transposon-Mutagenese neue CBS40-Derivate mit verbesserten Eigenschaften zu erhalten. Deshalb wurde CBS52 hinsichtlich seiner antibiotischen Wirkung gegen *B. subtilis* getestet. Diese von CBS40 vorhandene Aktivität ging allerdings verloren, was nicht eindeutig einem Strukturteil zuzuordnen war, da die Substanz etliche Veränderungen gegenüber CBS40 aufweist.

### 3.4.1.2 Naturstoffderivatisierung (Fermentationsbedingungen)

Um den Einfluss der Chlorierung auf die biologische Aktivität zu untersuchen, sollte bei der Substanz CBS40 das Chloratom gegen ein Bromatom ersetzt werden. Deshalb wurde, wie auch schon für Balhimycin beschrieben (BISTER et al., 2003), im Medium für die Fermentation Natriumchlorid durch Natriumbromid ausgetauscht. Es wurde aber nicht wie erwartet Brom-CBS40, sondern Dechlor-CBS40 produziert (Abb. 62). Aus einer 5-Liter Fermentation konnte 1 mg Reinsubstanz isoliert werden. In Tab. 26 sind die MIC-Werte im Vergleich zu CBS40 dargestellt. Die chlorierte Verbindung (CBS40) ist deutlich stärker antibiotisch wirksam als die nicht chlorierte Substanz Dechlor-CBS40.



**Abb. 62:** HPLC-MS-Analyse von *S. albus* + *Cosmid<sub>2544-3B10</sub>* (CBS40-Produzent) in einem NaBr-haltigen Medium. Es wird eine nicht chlorierte Verbindung der Masse  $m/z = 515$  (positiver Modus) produziert (Dechlor-CBS40). Die Massendifferenz von  $m/z = 34$  entspricht einem Chloratom (+ 1H) im Vergleich zu CBS40 (blauer UV-Peak,  $m/z = 549$ ).

**Tab. 26:** MIC-Werte für Dechlor-CBS40 im Vergleich zu CBS40. Es ist ein Aktivitätsverlust aufgrund der fehlenden Chlorierung zu beobachten. Die Aktivität gegen ein Gram-negatives Bakterium ist vollständig verloren gegangen.

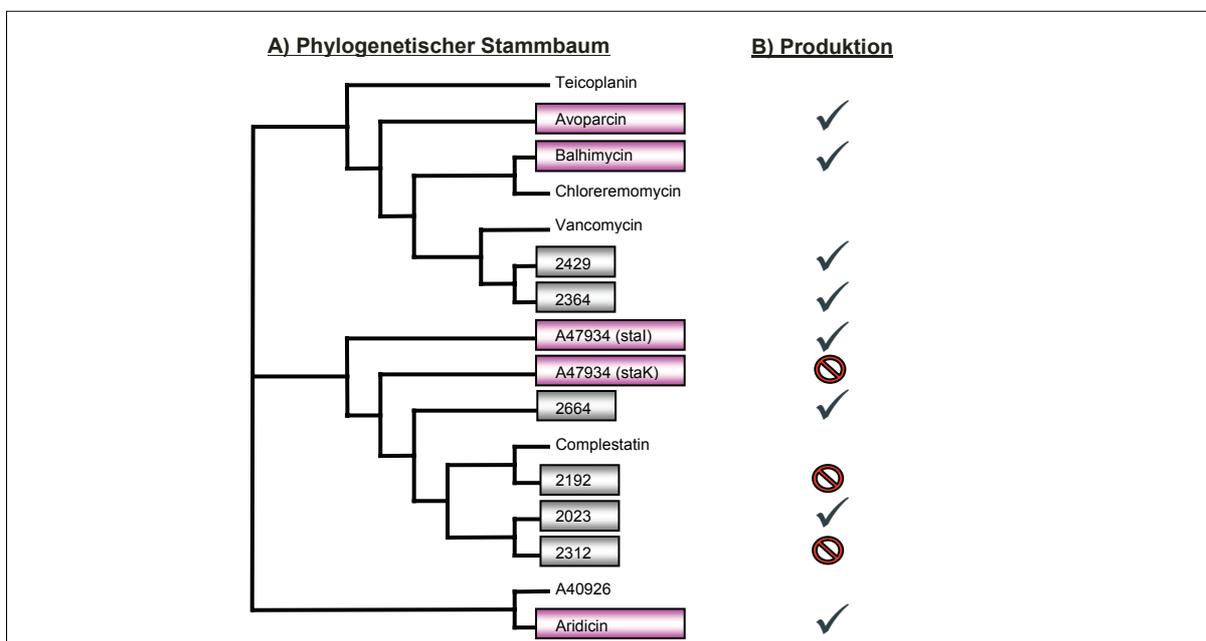
Organismus	MIC (Dechlor-CBS40)	MIC (CBS40)
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC51575	30 ng/ml	10 ng/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33592	3 ng/ml	0,3 ng/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	3 ng/ml	0,3 ng/ml
<i>Streptococcus pneumoniae</i> EM & AM	30 ng/ml	10 ng/ml
<i>E. coli</i> ATCC10536	> 100 µg/ml	3 µg/ml

### 3.4.2 Naturstoffderivatisierung mittels kombinatorischer Biosynthese

Die durch das PCR-basierte Screening identifizierten Halogenasen mit hoher Homologie zu Halogenasen aus publizierten GPA-Clustern wurden genutzt, um das Chlorierungsmuster der beiden GPA Balhimycin (GPA Typ I) und A47934 (GPA Typ III) zu verändern. Im Fall von Balhimycin stand eine Mutante (*PH4*) zur Verfügung, bei der die in dem Cluster vorhandene Halogenase deletiert war. In diese Dechlor-Balhimycin produzierende Mutante (Puk et al., 2002) sollten sowohl neue als auch publizierte Halogenasen chromosomal integriert werden. Dieselben Halogenasen sollten in das Chromosom des Stammes *S. toyocaensis* (A47934-Produzent) integriert werden.

### 3.4.2.1 Derivatisierung von Balhimycin

Balhimycin ist ein zweifach chloriertes GPA. Um Balhimycin-Derivate mit einem anderen Chlorierungsmuster zu generieren, wurden 6 neue Halogenasen sowie die Halogenasen aus dem Avoparcin-, A47934-, und Aridicin-Cluster in die Dechlor-Balhimycin produzierende PH4-Mutante transferiert. Von den insgesamt 11 hergestellten Transformanten produzierten 8 chlorierte Substanzen (Balhimycin oder Balhimycin-Derivate). In Abb. 63 ist der phylogenetische Stammbaum der GPA-Halogenasen im Zusammenhang mit dem Potential zur Modifikation des Dechlor-Balhimycin dargestellt.

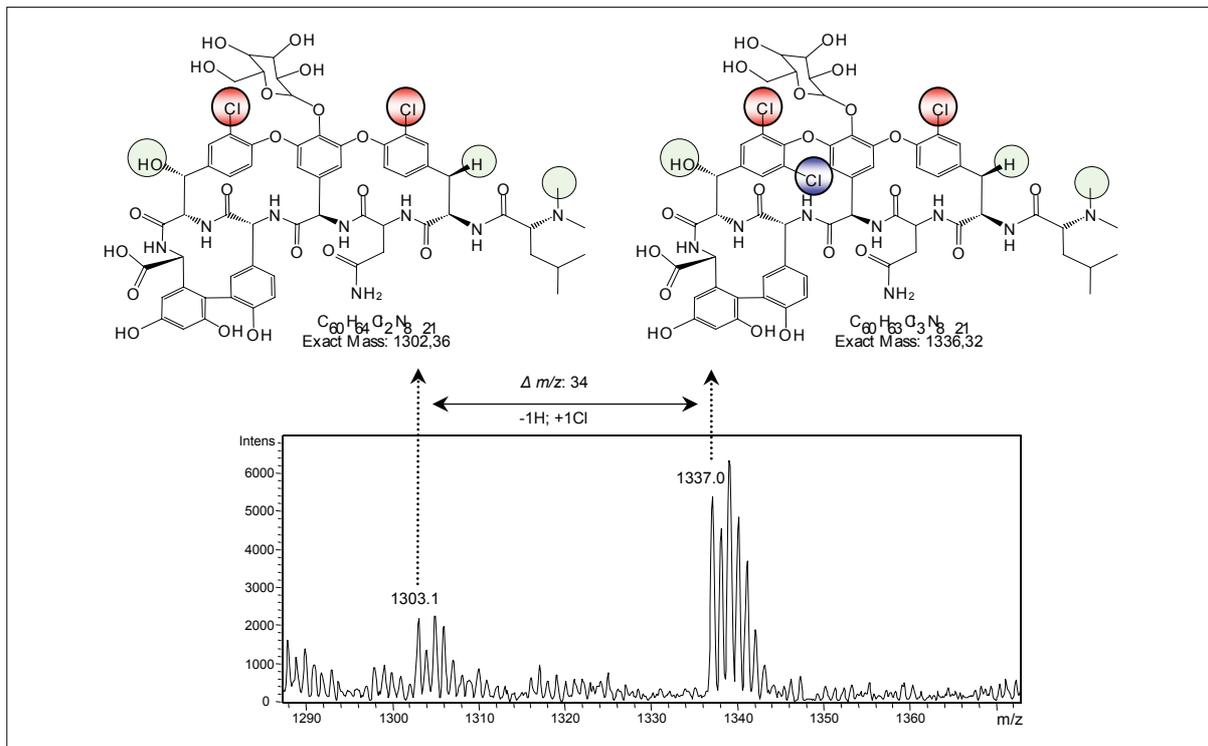


**Abb. 63:** A) Phylogenetischer Stammbaum der GPA-Halogenasen. B) Die Balhimycin-Halogenase (Puk et al., 2002) sowie 7 weitere publizierte und neu identifizierte Halogenasen konnten die deletierte Balhimycin-Halogenase ersetzen. In den Extrakten der Transformanten konnten mittels HPLC-MS chlorierte Balhimycin-Metabolite detektiert werden.

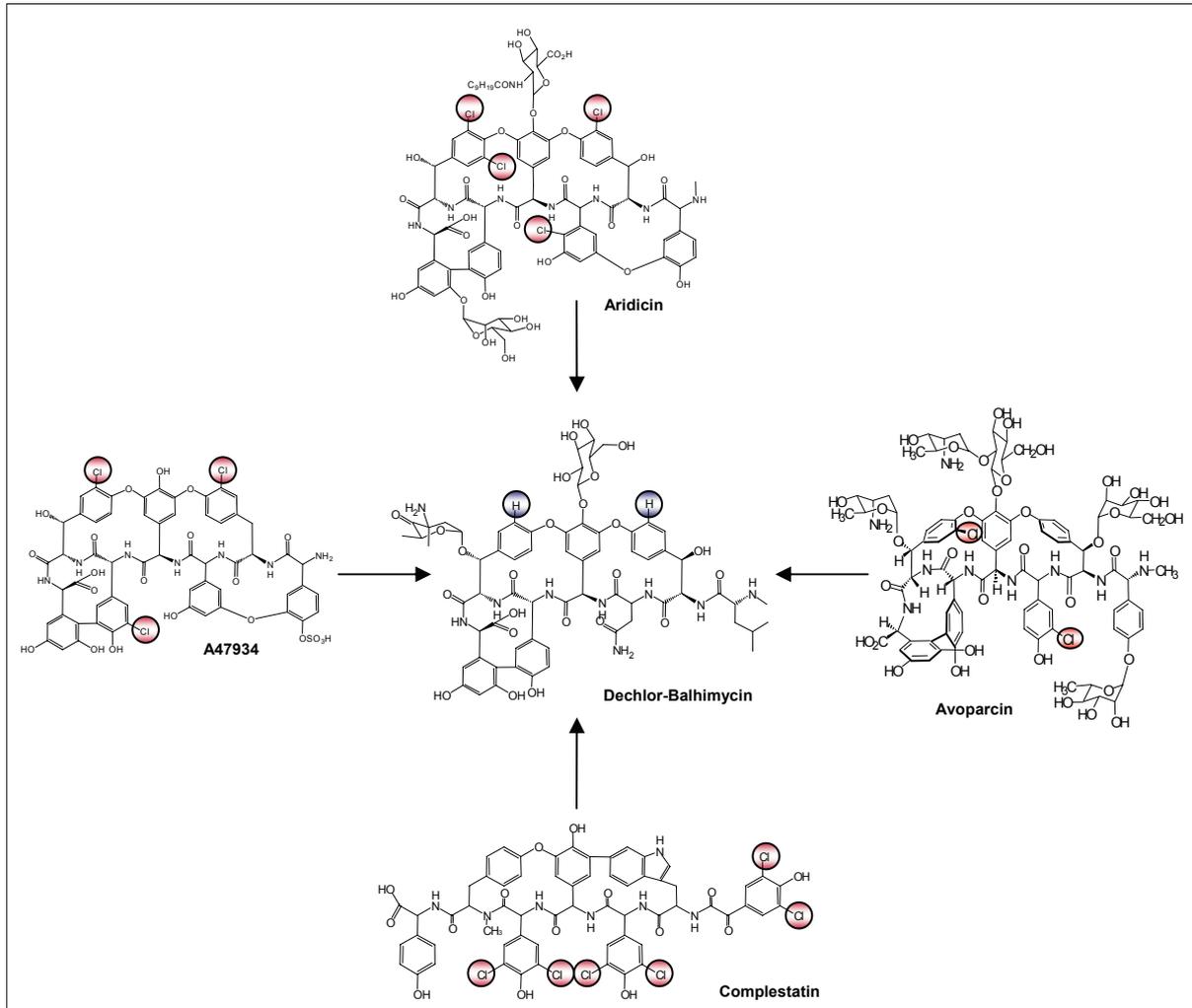
Um zu untersuchen an welchen Positionen die Chlorierungen erfolgten, hätten die Metabolite für eine NMR-Analyse isoliert werden müssen. Aufgrund der relativ geringen Substanzmengen (< 5% im Vergleich zu Dechlor-Balhimycin) war dies im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Sieben der acht Transformanten produzierten zweifach chlorierte Verbindungen. Die Massen und Retentionszeiten dieser Metabolite stimmten mit den Daten von Balhimycin überein. Die Transformante mit der Halogenase aus dem Aridicin-Cluster produzierte eine dreifach chlorierte Substanz. Ein dreifach chloriertes Balhimycin-Derivat ist bisher nicht bekannt gewesen. Bei dieser Verbindung handelt es sich

aufgrund der Masse wahrscheinlich um ein dreifach chloriertes Zwischenprodukt der Balhimycin-Biosynthese (Dissertation: Daniel Bischoff), da die Masse kleiner ist als dreifach chloriertes Balhimycin (Abb. 64). In Abb. 65 sind die Positionen der Chloratome bei den Substanzen markiert, deren Halogenase aus dem jeweiligen Biosynthesegencluster verwendet wurde, um Balhimycin zu derivatisieren.



**Abb. 64:** HPLC-MS-Analyse des Extraktes der Transformanten mit der Halogenase aus dem Aridicin-Cluster. Bei der zweifach chlorierten Verbindung der Masse 1302 (positiver Modus) handelt es sich um ein Zwischenprodukt der Balhimycin-Biosynthese (Dissertation: Daniel Bischoff). Die grün markierten Reste unterscheiden sich von Balhimycin. Die Masse 1336 entspricht dem dreifach chlorierten Derivat. Die auf der Struktur von Aridicin basierende postulierte Position der dritten Chlorierung ist blau markiert.

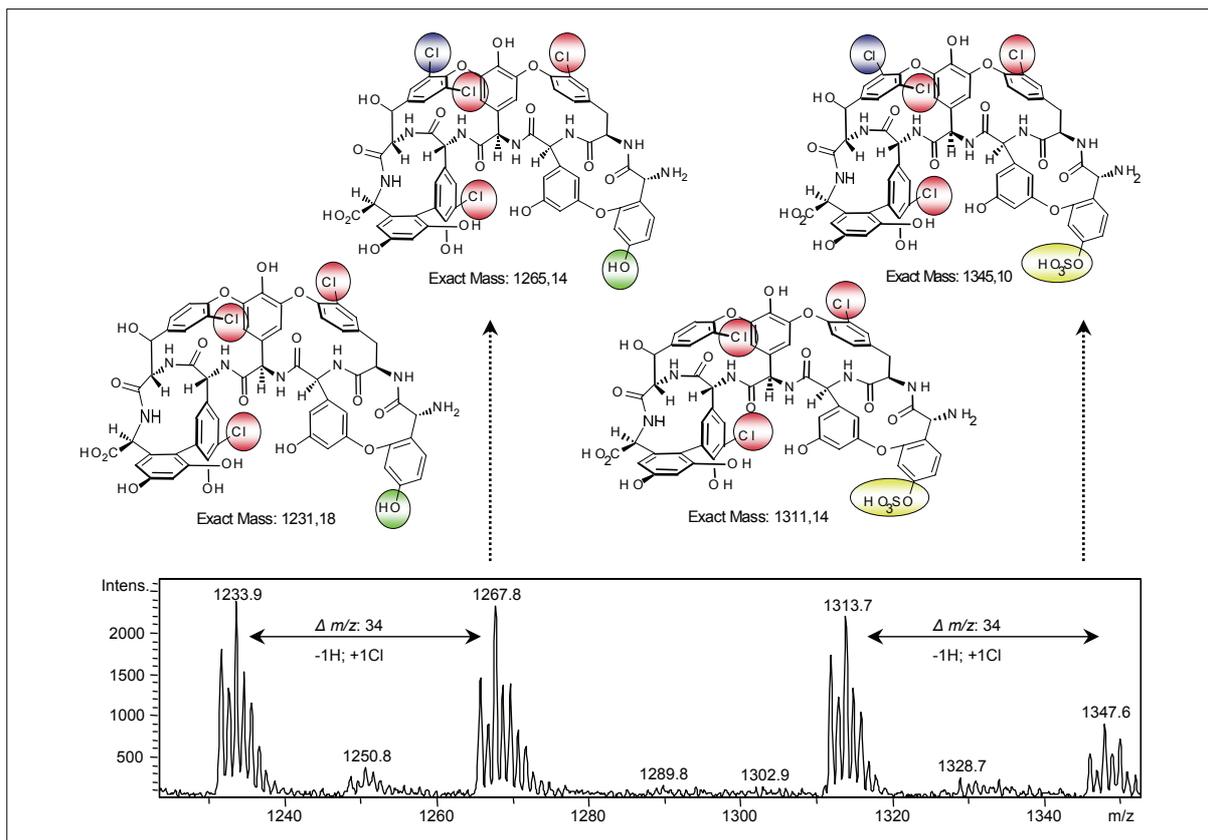


**Abb. 65:** Struktur von Dechlor-Balhimycin. Die bei Balhimycin chlorierten Positionen sind blau markiert (AS 2: Chlor- $\beta$ -Hydroxytyrosin, AS 6: Chlor- $\beta$ -Hydroxytyrosin). Die Positionen der Chlorierungen bei den anderen GPA sind rot markiert. Avoparcin: AS 3 (Chlor-Hydroxyphenylglycin), AS 6: (Chlor- $\beta$ -Hydroxytyrosin; A47934: AS 2 (Chlor-Tyrosin), AS 5 (Chlor-Hydroxyphenylglycin), AS 6 (Chlor-Hydroxytyrosin); Aridicin: AS 2 (Chlor- $\beta$ -Hydroxytyrosin), AS 3 (Chlor-Dihydroxyphenylglycin), AS 6 (Dichlor- $\beta$ -Hydroxytyrosin); Complestatin: AS 1 (*p*-Hydroxy-3,5-dichlorbenzoylformiat), AS 3 (*p*-Hydroxy-3,5-dichlorphenylglycin), AS 5 (*p*-Hydroxy-3,5-dichlorphenylglycin). Die PH4-Mutante (Puk et al., 2002) wurde nicht mit der Halogenase aus dem Complestatin-Cluster transformiert, da der Stamm nicht zur Verfügung stand. Drei Halogenasen aus Clustern mit identischer genetischer Organisation stromaufwärts und stromabwärts der Halogenase wurden stattdessen für die kombinatorische Biosynthese genutzt.

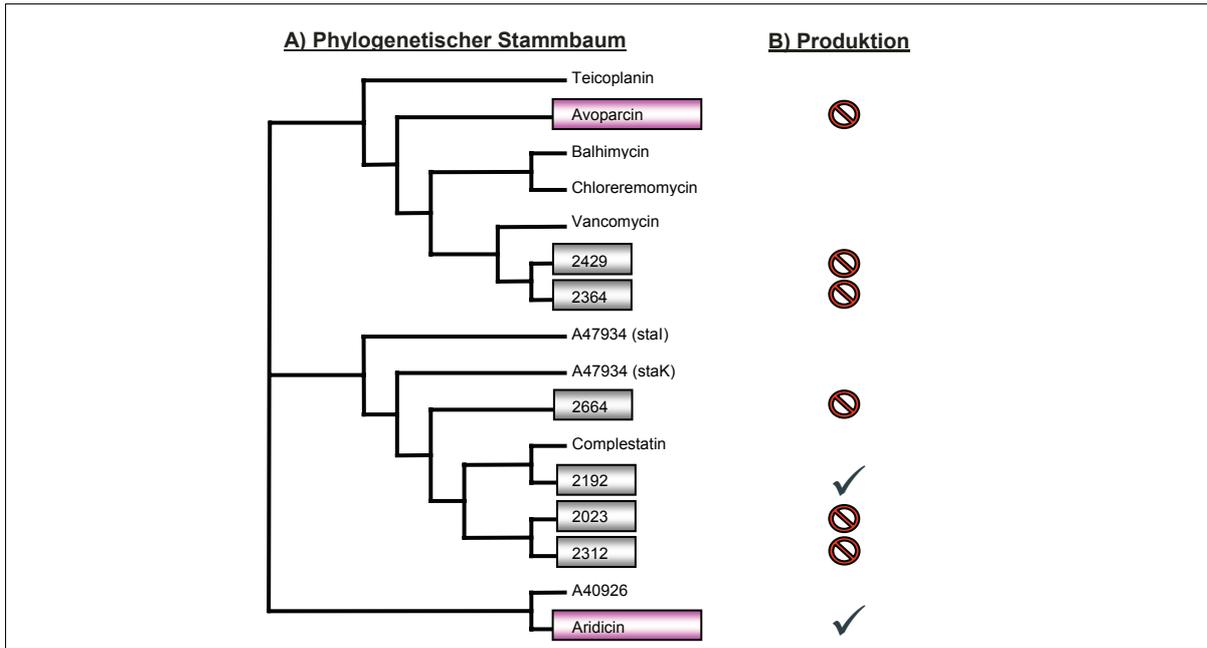
### 3.4.2.2 Derivatisierung von A47934

A47934 ist ein GPA (Typ III) und wird von *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009 produziert (BOECK & MERTZ, 1986). Die Verbindung ist nicht glykosyliert, besitzt eine für GPA ungewöhnliche Sulfongruppe und ist dreifach chloriert. Bei der Sequenzierung des Biosynthesegenclusters wurden zwei Gene (*staI* und *staK*) mit Homologie zu Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen identifiziert (POOTOOLAL et al., 2002). Bisher ist nicht bekannt, welche der beiden Halogenasen die jeweilige Chlorierung an den drei Aminosäureresten katalysiert.

Da von *S. toyocaensis* keine Mutante existiert, die Dechlor-A47934 produziert, wurde der Wildtyp für die kombinatorische Biosynthese genutzt. Es konnten sechs potentielle GPA-Halogenasen sowie GPA-Halogenasen aus dem Avoparcin- und Aridicin-Cluster nach *S. toyocaensis* transferiert werden. Die Halogenase aus dem Aridicin-Cluster katalysierte eine vierte Chlorierung. Die Position kann nur aufgrund der Struktur von Aridicin (Abb. 65) vermutet werden (Abb. 66). Im Extrakt des Wildtyps konnte sowohl die sulfonylierte Verbindung (A47934) als auch die Verbindung ohne Sulfongruppe nachgewiesen werden. Die Transformante mit der Aridicin-Halogenase produzierte entsprechend beide vierfach chlorierte Derivate. Die Halogenase aus dem Stamm CB2192 produzierte ebenfalls eine vierfach chlorierte Verbindung. In den Extrakten der anderen Transformanten konnten nur dreifach chlorierte Verbindungen nachgewiesen werden. Eine Übersicht dieser Ergebnisse ist in Abb. 67 dargestellt.



**Abb. 66:** HPLC-MS-Analyse (positiver Modus) der Transformante (A47934) mit der Halogenase aus dem Aridicin-Cluster. Es konnten sowohl die dreifach chlorierten Verbindungen mit und ohne Sulfongruppe als auch die vierfach chlorierten A47934-Derivate mit und ohne Sulfongruppe detektiert werden. Die postulierte Position des vierten Chloratoms ist blau markiert.



**Abb. 67:** A) Phylogenetischer Stammbaum der GPA-Halogenasen. B) Die Halogenase aus dem Aridicin-Cluster sowie die Halogenase aus dem Stamm CB2192 fügten eine vierte Chlorierung an das A47934-Rückgrat an.

## 4 DISKUSSION

Heutzutage ist der Bedarf an neuen Antiinfektiva größer als jemals zuvor, da Infektionskrankheiten weltweit die zweithäufigste Todesursache darstellen (FAUCI, 2001). Dies wird durch die Tatsachen unterstrichen, dass ca. 60% der vornehmlich in Krankenhäusern auftretenden *Staphylococcus aureus* Stämme bereits gegen das halbsynthetische Penicillin-Derivat Methicillin resistent sind (BREITHAUPT, 1999) und dass die ersten gegen das Notfallantibiotikum Vancomycin resistenten Erreger beobachtet wurden (COATES, 2002).

Obwohl fast 80% der zwischen 1981-2002 neu entdeckten antibakteriell wirkenden Substanzen Naturstoffe sind oder auf ihnen basieren (NEWMAN et al., 2003), nutzt die pharmazeutische Industrie trotz alledem wieder vermehrt synthetische Substanzen. Dies hat mehrere Ursachen. Zum einen werden immer wieder dieselben Substanzen beim Durchmustern von Naturstoffbibliotheken entdeckt und zum anderen ist es aufgrund der Komplexität von Naturstoffen meist schwierig, diese mittels medizinischer Chemie zur anschließenden Leitstrukturoptimierung zu derivatisieren. Weitere Gründe sind die hohen Produktionskosten von Naturstoffprodukten wegen der geringen Ausbeuten und der daraus resultierenden komplexen Aufarbeitung (KHOSLA, 2000).

Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die negativen Aspekte der Naturstoffe zu reduzieren. Mithilfe eines genetischen Screenings wurde das vorhandene biosynthetische Potential einer Actinomyceten-Stammsammlung zur Produktion von halogenierten Naturstoffen bzw. Halogenasen untersucht, da insbesondere Actinomyceten eine riesige Quelle an neuen Naturstoffen und Enzymen darstellen. Die Genomsequenzierungen von *S. coelicolor* (BENTLEY et al., 2002) und *S. avermitilis* (IKEDA et al., 2003 und OMURA et al., 2001) belegten dies eindrucksvoll. In *S. coelicolor* konnten 23 und in *S. avermitilis* 30 Biosynthesegencluster identifiziert werden, obwohl bis dahin durch klassische Aufreinigung erst einige wenige von diesen Stämmen produzierte Sekundärmetabolite bekannt waren.

In dieser Arbeit wurde die Tatsache genutzt, dass Verbindungen mit ähnlichen Strukturelementen durch Biosynthesewege produziert werden, an denen hoch homologe Enzyme beteiligt sind. Die Idee, Gene als Marker zu nutzen, um das biosynthetische Potential von Wildtypstämmen vorherzusagen, ist nicht neu. Bisher

wurden allerdings ausschließlich Gene verwendet, die Enzyme kodieren, die an der Biosynthese des Rückgrates verschiedener Naturstoffe beteiligt sind. Solche Enzyme sind hoch spezifisch und dadurch immer nur auf eine Substanzklasse beschränkt. Nichtsdestotrotz konnten ZAZOPOULOS et al., 2003 und LIU et al., 2003 für die Substanzklasse der Enediyne, unter Verwendung von für deren Biosynthese spezifischen Markergenen, erfolgreich ihre Produktion vorhersagen. METSÄ-KETELÄ et al., 2002 und METSÄ-KETELÄ et al., 2004 untersuchten mittels phylogenetischer Analysen der Ketosynthasegene verschiedener Cluster in Actinomyceten das biosynthetische Potential zur Produktion von aromatischen Polyketiden. PKS I- und NRPS- (nicht-ribosomale Peptidsynthetase) Cluster wurden in Actinomyceten von AYUSO-SACIDO & GENNILOUD, 2005 untersucht. Metagenom-Bibliotheken wurden auf das Vorhandensein von PKS I-Clustern von COURTOIS et al., 2003 (Ketosynthasen) und PIEL et al., 2004 (Ketosynthasen und Acyltransferasen) überprüft. ANDERSON et al., 2002 durchmusterten genomische DNA von Actinomyceten mit für Aminoglycosid-Phosphotransferasen spezifischen Primern. Dieses Enzym ist an einem Resistenzmechanismus von Aminoglycosid-Produzenten beteiligt und kann deshalb indirekt genutzt werden, um diese zu identifizieren.

Halogenasen dagegen zählen zu den „Tailoring“-Enzymen, die das Grundgerüst einer Verbindung modifizieren. Deshalb können unter Verwendung von „Tailoring“-Enzymen, bzw. der sie kodierenden Gene, unterschiedlichste Substanzklassen adressiert werden. Bei der Combinature Biopharm AG wurden bisher die einzigen Arbeiten durchgeführt, bei denen „Tailoring“-Enzyme zur Vorhersage von Substanzklassen verwendet wurden, auch hier aber nur anhand eines Beispiels, den Indolocarbazolen, unter Verwendung von Methyltransferasegenen als Marker (PELZER et al., 2005a und PELZER et al., 2005b).

In der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal unter Verwendung von nur einem genetischen Marker (Halogenasegene) erfolgreich mehrere von Actinomyceten produzierte Strukturklassen vorhergesagt werden. Zum einen für die Klasse der GPA vom Typ I (MM 47767) und zum anderen für die Xanthone (Lysolipin bzw. CBS40). Weitere potentiell produzierte Substanzklassen sind GPA vom Typ V, Lipoglykdepsipeptide, Enediyne, Ansamycine, Aminocoumarine und Makrolide.

Mit nur einem einzigen Primerpaar wurden ca. 550 verschiedene Actinomyceten auf das Vorhandensein von Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen durchmustert. Die hohe Trefferquote (20%) übersteigt bei weitem die Frequenz, mit der halogenierte Naturstoffe aus

dieser Spezies bis jetzt isoliert wurden. Fast zu jeder bisher publizierten Halogenase wurden neue homologe Enzyme gefunden. Zusätzlich konnten über 40 Halogenasen identifiziert werden, die sich nicht in den unterschiedlichen Untergruppen einordnen. Diese Enzyme könnten entweder an der Biosynthese von bekannten Verbindungen beteiligt sein, deren Biosynthesegencluster bisher aber noch nicht identifiziert wurden, oder sie sind an der Biosynthese von bisher unbekanntem Sekundärmetaboliten beteiligt.

Diese 550 unterschiedlichen Stämme nur chemisch zu charakterisieren, wäre um ein Vielfaches aufwendiger gewesen, da alleine eine HPLC-MS-Analyse für eine Verbindungsklassenzuordnung nicht ausreichen würde. Es müssten viel mehr Substanzen isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden, was sehr zeitintensiv wäre. Durch die genetische Charakterisierung erhält man auch sofort Zugang zu den Biosynthesegenclustern, um diese entweder für die Herstellung von Derivaten eines Sekundärmetaboliten zu manipulieren, oder die dadurch zur Verfügung stehenden Gene bzw. Enzyme für die kombinatorische Biosynthese oder biokatalytische Anwendungen zu nutzen. Alle drei Methoden wurden ebenfalls erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit angewendet. Das CBS40-Biosynthesegencluster wurde genutzt, um die Substanz CBS40 mittels Transposon-Mutagenese zu verändern. Die neu entdeckten Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen wurden genutzt, um zwei unterschiedliche Leitstrukturen mittels kombinatorischer Biosynthese zu derivatisieren (Balhimycin und A47934). Die zur Verfügung stehende Stammsammlung wurde auch genutzt, um sie nach zwei weiteren Enzymklassen zu durchmustern (Perhydrolasen und Tryptophan-/Indol-Halogenasen). Diese wurden anschließend erfolgreich zur Naturstoffderivatisierung mittels Biokatalyse eingesetzt.

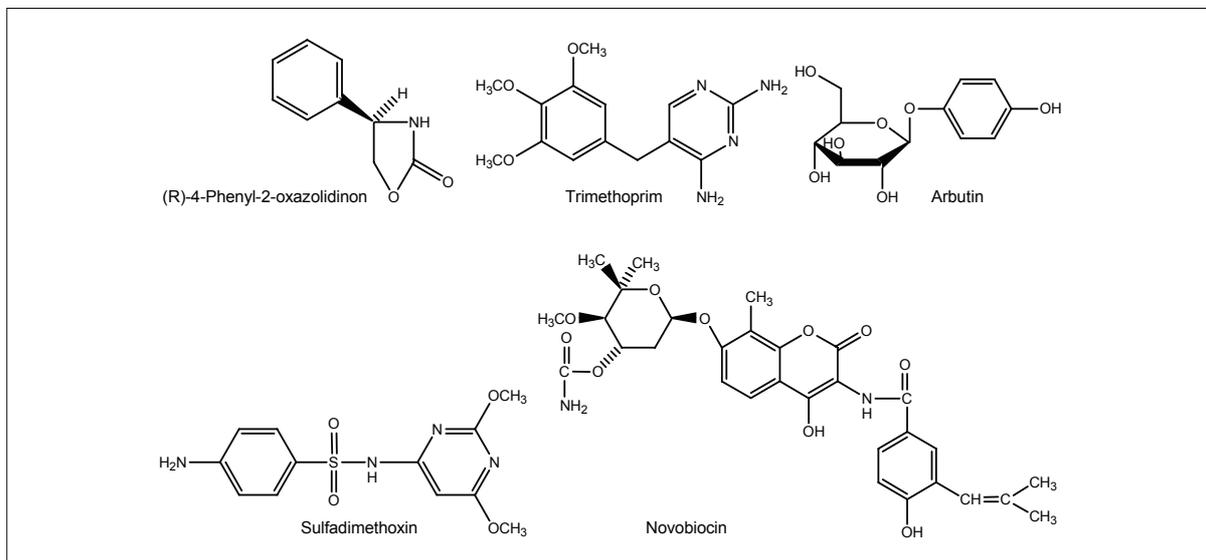
## **4.1 Halogenasen für biokatalytische Anwendungen**

### **4.1.1 Perhydrolasen**

Sowohl Haloperoxidasen als auch Perhydrolasen katalysieren unspezifische Halogenierungen organischer Verbindungen. Diese Eigenschaft machte man sich bis jetzt zu nutze, um unter Verwendung von Monochlordimedon als Substrat (HAGER et al., 1966) nach diesen Enzymklassen aktivitätsbasiert zu suchen. Die natürliche Funktion dieser Enzyme ist weiterhin unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich ein PCR-basiertes Screening für Perhydrolasen durchgeführt. In 4 von 250 verschiedenen Actinomyceten konnten neue Perhydrolasen identifiziert werden. Anschließend wurden 3 Perhydrolasen untersucht, ob sie das Substrat Phenolrot zu Bromphenolblau umsetzen. Zwei der 3 Enzyme zeigten eine Aktivität. Eines der 3 Enzyme war inaktiv. Grund hierfür könnte die nicht vorhandene katalytische Triade, bestehend aus einem Serin, Aspartat und Histidin (HECHT et al., 1994), sein. Bei der inaktiven Perhydrolase ist das Serin durch ein Cystein ausgetauscht.

Am Beispiel einer neuen Perhydrolase (Nr. 52) wurde ihre Substratflexibilität unter Verwendung verschiedener käuflich erhältlicher Antibiotika als Substrate (Abb. 68) untersucht (nicht in den Ergebnissen dargestellt).

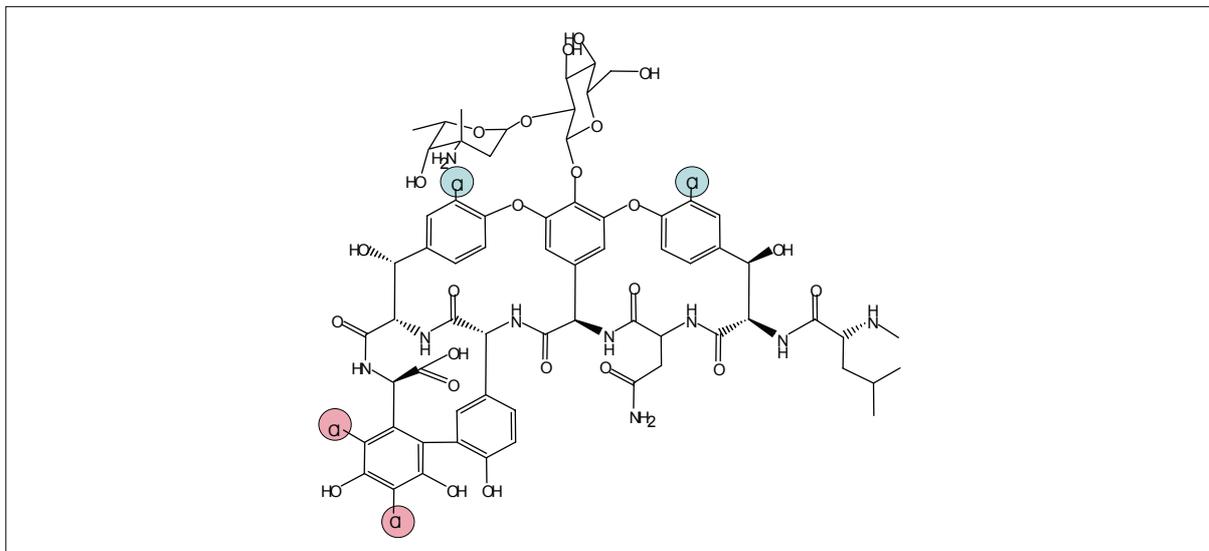


**Abb. 68:** Strukturen von verschiedenen Antibiotika, die als Substrate für Perhydrolasen und Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen untersucht wurden.

Die Analyse dieser Enzymtests erfolgte mittels HPLC-MS. Keines der Substrate wurde chloriert. Unter Verwendung von Natriumbromid waren eine Einfachbromierung bei Trimethoprim und eine Dreifachbromierung bei Sulfadimethoxin zu detektieren. Bei der Negativkontrolle (kein Enzym) konnte ebenfalls eine Umsetzung beider Verbindungen beobachtet werden, allerdings in geringeren Mengen. Die Reaktion läuft bei diesen beiden Verbindungen also nicht nur enzymkatalysiert, sondern auch chemisch unter Verwendung von Wasserstoffperoxid ab, wie es schon für Phenolrot beobachtet wurde (3.1.2). An welchen Positionen die Bromierung erfolgte, müsste mittels NMR untersucht werden.

Der Grund, warum diese Perhydrolase (Nr. 52) nur Bromid und nicht Chlorid als Halogenid akzeptiert, ist nicht klar. Allerdings haben schon HAGER et al., 1966 für die Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago* eine um den Faktor 3 höhere Aktivität von Bromid gegenüber Chlorid beschrieben. Eine mögliche Erklärung wären sterische Gründe, da der Atomradius von Brom 114,5 pm und der von Chlor nur 99,4 pm beträgt. (Iod: 133,3 pm und Fluor: 70,9 pm).

MALNAR & SIH, 2000 nutzten die oben beschriebene Chlorperoxidase zur Derivatisierung von Didechloraglucovancomycin und Vancomycin. Zusätzlich zu den zwei in Vancomycin vorhandenen Chlorierungen an Aminosäure (AS) 2 und AS 6 wurde AS 7 (Dihydroxyphenylglycin) zweifach chloriert (Abb. 69). Didechloraglucovancomycin allerdings auch nur an AS 7. Die bei dieser Verbindung fehlenden Chloratome (AS 2 und AS 6) wurden nicht angefügt. Das so generierte vierfach chlorierte Vancomycin-Derivat zeigte jedoch keine Aktivitätssteigerung gegenüber Vancomycin.



**Abb. 69:** Struktur des durch eine Chlorperoxidase katalysierten Vancomycin-Derivates (MALNAR & SIH, 2000). An AS 7 sind zwei zusätzliche Chloratome vorhanden (rote Markierungen).

Ein Nachteil der  $H_2O_2$ -abhängigen Perhydrolasen und Haloperoxidasen für die Biokatalyse ist ihre fehlende Substrat- und Stereospezifität bzw. Regioselektivität aufgrund des Reaktionsmechanismus'. Die eigentliche Halogenierung wird nicht von dem Enzym, sondern von freiem HOCl katalysiert.

#### 4.1.2 Tryptophan-/Indol-Halogenasen

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Perhydrolasen bzw. Haloperoxidasen, sind die Tryptophan-/Indol-Halogenasen substratspezifisch und regioselektiv. Die bisher bekannten Halogenasen dieser Klasse stammen aus Biosynthesegenclustern, die Verbindungen produzieren, bei deren Vorstufe es sich um ein an der Position 5, 6 oder 7 chloriertes Tryptophan-/Indol-Derivat handelt.

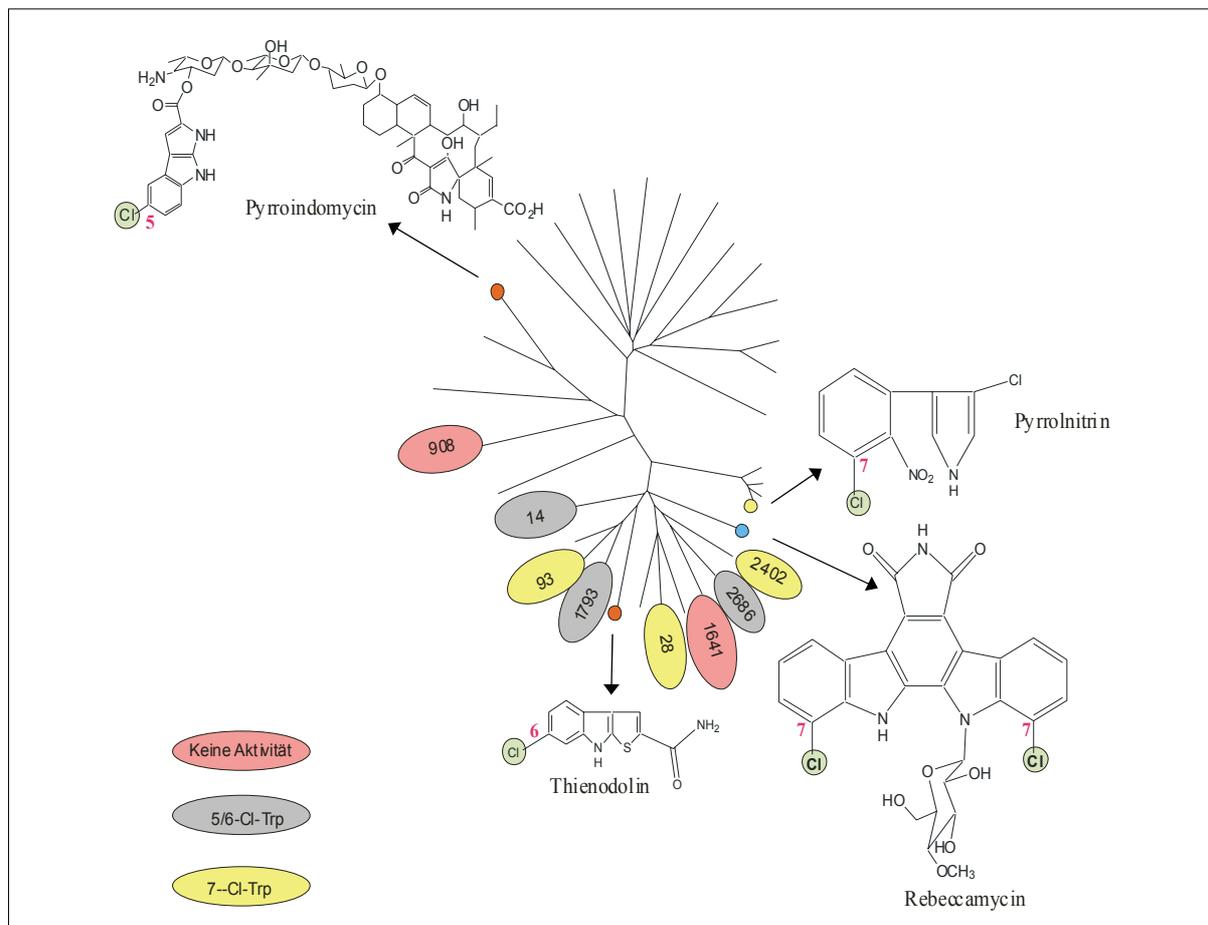
Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich ein PCR-basiertes Screening für Tryptophan-/Indol-Halogenasen durchgeführt. In 18 von 250 Actinomyceten konnten neue Tryptophan-/Indol-Halogenasen identifiziert werden. Anschließend wurden 8 dieser 18 Halogenasen untersucht, ob sie L-Tryptophan zu Cl-Tryptophan umsetzen. Sechs der 8 Enzyme zeigten eine Aktivität. Zwei setzten kein Tryptophan um, obwohl die bisher für die Reaktion postulierten essentiellen AS-Reste (VAN PÉE & UNVERSUCHT, 2003) vorhanden sind.

Eine Möglichkeit hierfür könnten falsch postulierte Startcodons der beiden Halogenasene gene sein, da nur auf Basis seltener Codons, Blast-Analyse (Basic Local Alignment Search Tool) und möglicher ribosomaler Bindestellen das Startcodon gewählt wurde. Bei einer der beiden nicht aktiven Halogenasen konnte im Bereich des gewählten Startcodons nicht die für die ribosomale Bindestelle (RBS) in Streptomyceten typische konservierte Sequenz 5'---GGAGG---ATG/GTG/TTG---3' identifiziert werden. Hier wurde mittels Primerdesign eine synthetische RBS eingefügt. Diese beiden Halogenasen wurden in Abb. 70 mit den Nrn. 908 und 1641 bezeichnet. Die phylogenetische Analyse zeigte keine Auffälligkeiten, da die beiden Halogenasen keine separate Untergruppe innerhalb des Stammbaums bilden, was also Tryptophan als natürliches Substrat nicht ausschließt.

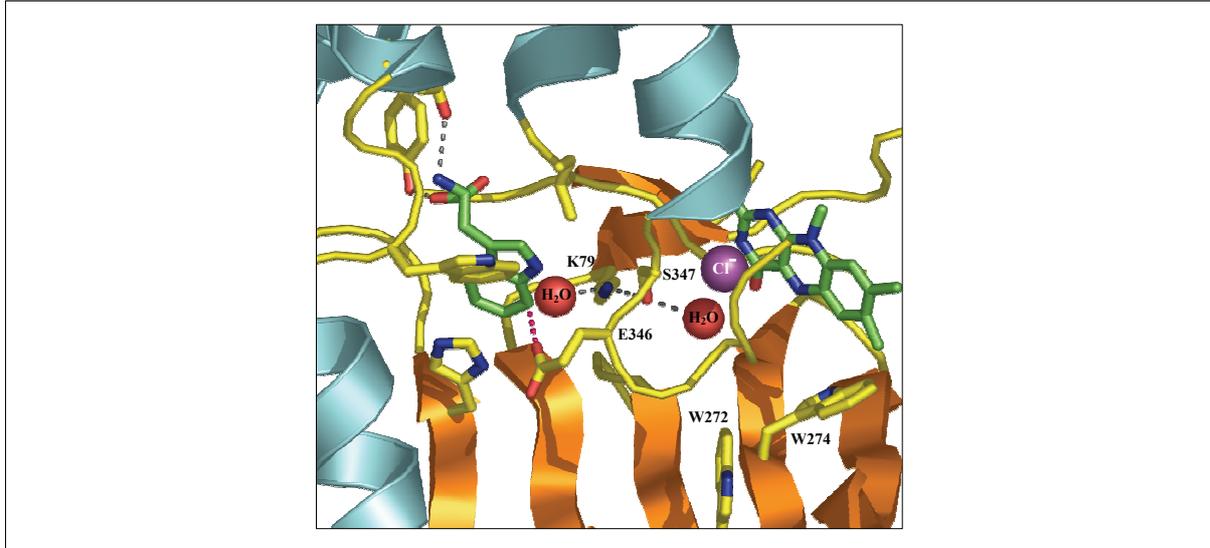
Mittels phylogenetischer Stammbaumanalyse (Abb. 70) wurde versucht, eine Korrelation zwischen Aminosäuresequenzen der aktiven Halogenasen und ihrer vermuteten Regioselektivität herzustellen. Diese war aufgrund der Sequenzhomologien von weniger als 70% zu publizierten Halogenasen allerdings nicht eindeutig. Insbesondere die Halogenase Nr. 2686 ist entweder für die Position 5 oder 6 spezifisch (s. Abb. 37) und ordnet sich in der Untergruppe der Halogenase aus dem Rebeccamycin-Biosynthesegencluster (Position 7) ein. Durch diese Methode werden allerdings nur die kompletten Sequenzen betrachtet, nicht aber vielleicht nur einzelne für die Selektivität entscheidende Aminosäurereste im aktiven Zentrum.

Bisher liegen nur Kristallstrukturdaten von einer 7-Cl-Tryptophan-Halogenase als Kofaktor/Substrat-Komplex vor, die erste Hinweise auf die für die Regioselektivität essentiellen Aminosäuren lieferten (DONG et al., 2004). Das aktive Zentrum dieser Halogenase ist in Abb. 71 gezeigt, welche der Posterpräsentation von FLECKS et al., 2005 entnommen wurde. Die Aminosäure E346 ist hier derartig positioniert, dass die Chlorierung von Tryptophan ausschließlich an Position 7 erfolgen kann. Sowohl alle 8 neu identifizierten und getesteten Tryptophan-Halogenasen, als auch die beiden bekannten 5/6-Cl-Tryptophan-Halogenasen, enthalten die in Abb. 71 im aktiven Zentrum markierten essentiellen AS. Mithilfe von simulierten Strukturmodellen der neu identifizierten Halogenasen könnten Thesen über deren Regioselektivität aufgestellt werden, solange keine weiteren Strukturdaten von bekannten 5/6-Cl-Tryptophan-Halogenasen verfügbar sind.

Eine endgültige Aussage über die Regioselektivität der neu identifizierten Halogenasen würde jedoch nur die Bestimmung der Position der durch sie katalysierten Chlorierung am Tryptophan mittels NMR-Analyse zulassen.

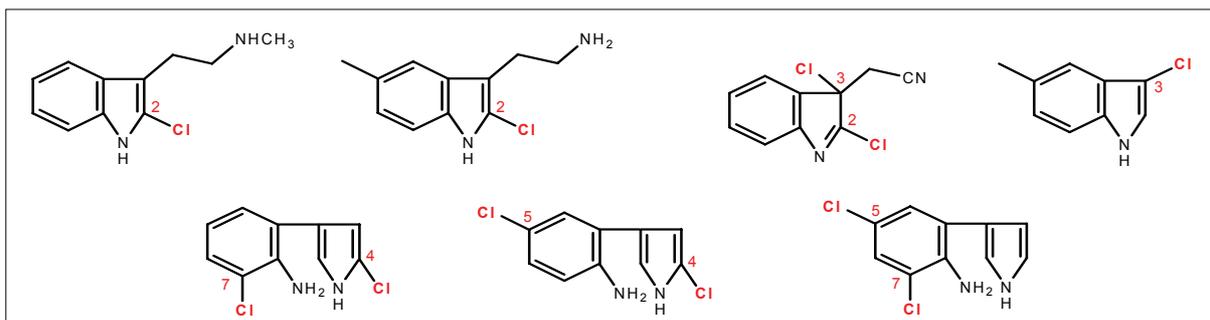


**Abb. 70:** Phylogenetische Analyse der Tryptophan-/Indol-Halogenasen. Die Halogenasen, die L-Tryptophan nicht umsetzen, sind rot markiert. Gelb markierte Halogenasen chlorieren Tryptophan an Position 7. Für die grau markierten Halogenasen war keine eindeutige Zuordnung möglich.



**Abb. 71:** Aktives Zentrum einer 7-Cl-Tryptophan-Halogenase mit Tryptophan und FAD als Komplex (Posterpräsentation FLECKS et al., 2005).

Durch die Zugabe einer unspezifischen NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase (Fre) aus *E. coli* (SPYROU et al., 1991) zu dem Reaktionsansatz konnte der Umsatz der aktiven Halogenasen gesteigert werden. Um die Substratflexibilität der neuen Halogenasen weiter zu untersuchen, könnten in Anlehnung an die Arbeit von HÖLZER et al., 2001 verschiedene Tryptophan- und Indol-Derivate als unnatürliche Substrate getestet werden. Die dabei untersuchte Halogenase aus einem Pyrrolnitrin-Produzenten (Position 7) chlorierte verschiedene Tryptophan- und Indol-Derivate. Es wurde allerdings nur Tryptophan regioselektiv an Position 7 des Indolrings chloriert. Sowohl Tryptophan- als auch Indol-Derivate wurden zusätzlich an anderen Positionen chloriert. In Abb. 72 sind ein paar Beispiele entstandener Produkte abgebildet. Indol-Derivate, bei denen entweder nur eine Carboxylgruppe in der Seitenkette vorhanden war (z.B. Indol-3-essigsäure) oder die an der Position 3 substituiert waren (z.B. Indol-3-carboxaldehyd), wurden nicht chloriert.



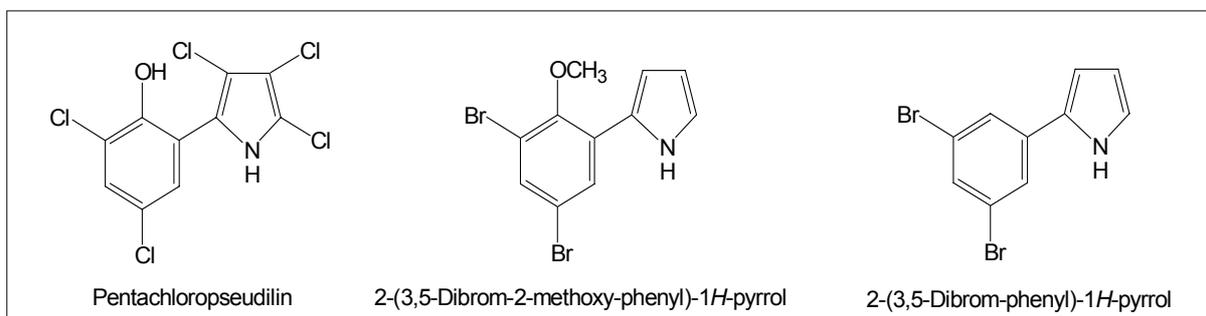
**Abb. 72:** Strukturen der durch eine *prnA*-Halogenase entstandenen chlorierten Produkte (HÖLZER et al., 2001).

Die Substratflexibilität der 5-Cl-Tryptophanhalogenase aus dem Pyrroindomycin-Biosynthesegencluster wurde bisher nicht untersucht. Es konnte aber gezeigt werden, dass die gereinigte Halogenase *in vitro* Tryptophan regioselektiv chloriert und bromiert (ZEHNER et al., 2005). Die 6-Cl-Tryptophanhalogenase aus dem Thienodolin-Biosynthesegencluster wurde ebenfalls noch nicht genauer untersucht. Beide Halogenasen wurden allerdings für die kombinatorische Biosynthese zur Generierung von Rebeccamycin-Derivaten mit Halogenierungen an neuen Positionen (5 und 6) genutzt (SÁNCHEZ et al., 2005).

Des Weiteren konnte nur noch für die Tryptophan-/Indol-Halogenase aus dem Rebeccamycin-Biosynthesegencluster eine *In-vitro*-Aktivität nachgewiesen werden. Diese war ebenfalls regioselektiv und halogenierte (Chlor und Brom) Tryptophan ausschließlich an Position 7 (YEH et al., 2005).

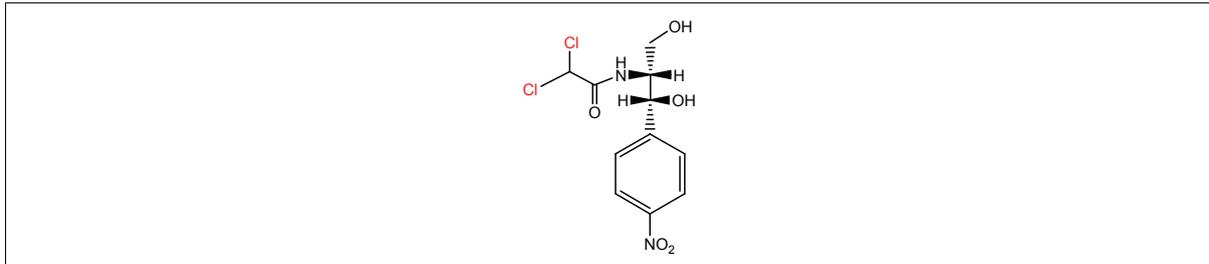
#### 4.1.3 Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen

Ebenso wie die Tryptophan-/Indol-Halogenasen sind die Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen substratspezifisch und regioselektiv. Allerdings ist im Gegensatz zu den Tryptophan-/Indol-Halogenasen nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt der Biosynthese die Halogenierung erfolgt. Ihre natürlichen Substrate sind deshalb unbekannt, was einen Einsatz für biokatalytische Anwendungen erschwert. Eine Ausnahme stellt eine Halogenase aus dem Pentachloropseudilin-Produzenten dar. Zwei synthetische Substrate mit Ähnlichkeit zu Pentachloropseudilin (Abb. 73) wurden unter Verwendung dieser Halogenase chloriert (WYNANDS & VAN PÉE, 2004).



**Abb. 73:** Strukturen von Pentachloropseudilin und zwei synthetischen Substraten, die durch die Halogenase halbiert chloriert werden. Die Position der Chlorierung wurde noch nicht bestimmt.

Eine Ausnahme bezüglich der Position der Chlorierung liegt bei Chloramphenicol vor, da hier die Chlorierung an einem aliphatischen Rest ist (Abb. 74). Die AS-Sequenz dieser Halogenase zeigte bei der Einordnung in den phylogenetischen Stammbaum trotzdem keine Auffälligkeiten. Versuche, die nicht chlorierte Vorstufe von Chloramphenicol zu identifizieren, scheiterten (PIRAEE et al., 2004, GROSS et al., 2002 und HE et al., 2001).



**Abb. 74:** Struktur von Chloramphenicol.

Für die Biosynthese von Pyoluteorin (Abb. 15) wurde ebenfalls ein möglicher Biosyntheseweg und damit die natürlichen Substrate für die drei in diesem Cluster vorhandenen Halogenasen (pltA, pltM und pltD) postuliert (NOWAK-THOMPSON et al., 1999). PltD verfügt allerdings weder über die eigentlich notwendige Kofaktor-Bindestelle noch über die zwei konservierten Tryptophanreste. Auch für die anderen beiden Halogenasen konnten die hypothetischen Substrate noch nicht bestätigt werden.

Untersuchungen zur Biosynthese von 7-Chlortetracyclin lassen 4-Ketoanhydro-tetracyclin als natürliches Substrat der Halogenase aus dem Cluster vermuten (KLING et al., 2005 und VAN PÉE, 1996). Dies wurde ebenfalls noch nicht bestätigt.

Für die Klasse der Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen konnte bisher nur ein natürliches Substrat identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Monodechloraminopyrrolnitrin (Pyrrolnitrin-Biosynthese: Abb. 13). Trotzdem wurde in dieser Arbeit versucht, dieselben Substrate (Abb. 68), die auch schon mit den Perhydrolasen getestet wurden, mit einer Reihe von neuen Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen umzusetzen (nicht in den Ergebnissen dargestellt). Die getesteten Halogenasen wiesen eine hohe AS-Sequenzdiversität auf, und die ausgewählten Substrate verfügten alle über einen als essentiell für eine Umsetzung postulierten Aromaten. Trotzdem wurde keines der Substrate halogeniert. Es wurde sowohl Natriumchlorid als auch Natriumbromid getestet.

Die eigentlich zur Untersuchung des Einflusses einer Chlorierung auf die biologische Aktivität isolierte Verbindung Dechlor-CBS40 wurde ebenfalls versucht, mit der Halogenase aus dem CBS40-Cluster umzusetzen. Es konnte keine Chlorierung von Dechlor-CBS40 detektiert werden. Allerdings deuteten die schon vorhandenen Informationen darauf hin, dass Dechlor-CBS40 ( $m/z = 515$ ) nicht das natürliche Substrat dieser Halogenase war, da mittels Transposon-Mutagenese eine chlorierte Verbindung der Masse  $m/z = 521$  generiert werden konnte. Deshalb muss es eine Verbindung der Masse  $m/z = 487$  ( $\Delta m/z = 34$ ) oder kleiner geben, die das Substrat dieser Halogenase darstellt. Dass die Halogenierung dennoch einer der letzten Biosyntheseschritte sein muss, zeigten die recht großen, mittels HPLC-MS identifizierten, nicht chlorierten Verbindungen (Tab. 24). Rückschlüsse auf den Halogenierungszeitpunkt anderer Verbindungen, insbesondere Verbindungen anderer Substanzklassen, kann man dennoch nicht ziehen. Um also Halogenasen dieser Klasse als Biokatalysatoren zu nutzen, muss erst einmal der Halogenierungszeitpunkt verschiedener Biosynthesen aufgeklärt werden. Mithilfe dieses Wissens könnten dann gezielter Substanzen ausgesucht werden, die von den entsprechenden Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen als Substrat erkannt werden.

## 4.2 Phenyl-/Pyrrol-Halogenasen als genetische Marker

Durch die Identifizierung von neuen Phenyl-/Pyrrol-Halogenasegenen und deren Verwendung als genetische Marker konnten für acht verschiedene Substanzklassen potentielle Produzenten dieser Verbindungen identifiziert werden. Für zwei dieser Klassen konnte die Hypothese der Sequenz-/Metabolit-Korrelation bewiesen werden (GPA Typ I und Xanthone). Die Diversität der potentiell durch das Screening adressierbaren Sekundärmetaboliten spiegelt sich in der Diversität der identifizierten Halogenasen mit einer Sequenzidentität untereinander von 5-100% wieder.

Es konnten allerdings nicht in allen der mittels HPLC-MS untersuchten Stämme halogenierte Substanzen detektiert werden. Insbesondere bei den Untergruppen der Xanthone und Makrolide konnte jeweils nur in dem Extrakt eines Stammes eine halogenierte Verbindung identifiziert werden. Es wurden zwar verschiedene Medien für die Fermentation verwendet und die Probennahme erfolgte zu 3 verschiedenen Zeiten, trotzdem könnte bei den Fermentationsbedingungen noch viel variiert werden. Wenn eine halogenierte Substanz detektiert werden konnte, wurde sie in allen verwendeten Medien produziert. Unterschiede waren nur in den produzierten

Mengen zu beobachten. Ebenso müssten andere Lösungsmittel für die Extraktion getestet werden, da möglicherweise andere Verbindungen der untersuchten Substanzklassen in dem hier als Extraktionsmittel verwendeten Ethylacetat nicht lösbar sind. Aufgrund der oben aufgeführten Gründe ist die relativ geringe Hitrate bei dem chemischen Screening dieser beiden Untergruppen (Xanthone und Makrolide) zu erklären.

Die Arbeit von BODE et al., 2002 verdeutlicht den Einfluss der Fermentationsparameter bei der Fermentation eindrucksvoll. Aus nur einem Stamm konnten durch deren Veränderung 20 verschiedene Substanzen isoliert werden, die fast sämtliche bekannte Hauptstrukturklassen abdecken. Auch die Produktionsmengen waren mit bis zu 2,6 g/l sehr groß. Mit einem mathematischen Modell haben WATVE et al., 2001 das biosynthetische Potential von Streptomyceten zur Produktion von Naturstoffen beschrieben. Bisher ist erst ein Bruchteil dessen entdeckt, was diese Mikroorganismen in der Lage sind zu produzieren.

#### **4.2.1 Die Substanzklasse der Glykopeptid-Antibiotika**

Heute sind Vancomycin und Teicoplanin Notfallantibiotika und damit unentbehrlich für durch resistente Bakterienstämme infizierte Patienten. So wurden zusätzlich zu diesen Hunderte von verwandten Naturstoffen identifiziert und Tausende von semisynthetischen Analoga synthetisiert. Diese bilden zusammen die große Klasse der Verbindungen, die als Glykopeptid-Antibiotika (GPA) bezeichnet werden. Vancomycin wurde bei Eli Lilly 1956 entdeckt und nach der FDA-Zulassung im Jahre 1958 für die klinische Nutzung als Anti-Staphylokokken-Wirkstoff zugänglich gemacht (NICOLAOU et al., 1999).

Glykopeptid-Antibiotika sind nur gegen Gram-positive Bakterien wirksam, da sie die äußere Zellmembran Gram-negativer Bakterien nicht durchdringen können. Angriffsort der GPA ist die Zellwandbiosynthese. Gram-positive Bakterien besitzen eine nicht durch eine äußere Zellmembran geschützte Peptidoglycanschicht, die durch eine Quervernetzung von kovalenten Peptidbrücken stabilisiert wird. GPA komplexieren über Wasserstoffbrückenbindungen das Substrat der Transpeptidasen, die diese Quervernetzung einführen, wodurch es zur Schädigung der Zellwand kommt. Der Selbstschutz von GPA-Produzenten kann zum einen durch Transmembranproteine erfolgen, die die Antibiotika aus der Zelle pumpen oder zum anderen durch eine Umprogrammierung der Peptidoglycansynthese. Die Trans-

peptidasen erkennen ein anderes Substrat, zu dem die GPA eine wesentlich geringere Affinität besitzen (HUBBARD & WALSH, 2003). Da es immer mehr resistente Stämme gegen diese Notfallantibiotika gibt, ist es unabdingbar, neue Derivate dieser Verbindungen herzustellen.

Die höchste Trefferquote wurde bei dem PCR-basierten Screening für die Klasse der Glykopeptide mit fast 2% erzielt (9 von 550). Durch Sequenzierung der zu den Halogenasegenen benachbarten Gene war eine Unterscheidung aufgrund der Clusterorganisation zwischen den GPA vom Typ I und Typ V eindeutig möglich. Zusätzlich wurde bei einem Stamm eine neue Cluster-Organisation entdeckt. Durch das chemische Screening konnten von den 9 Stämmen 6 als potentielle GPA-Produzenten identifiziert werden. Diese im Vergleich zu den anderen Substanzklassen sehr hohe Trefferquote liegt vermutlich an den gut untersuchten Produktionsbedingungen und Aufarbeitungsmethoden für GPA.

Nicht immer müssen nur Produzenten von bisher unbekanntem Substanzen gefunden werden. Die Identifizierung eines alternativen GPA-Produzenten wie im Fall von MM 47761 kann ebenfalls von großer Bedeutung sein. Zwei Stämme konnten identifiziert werden, die diese Verbindung produzieren (CB2364 und CB2429). Der Stamm CB2429 produziert etwa die fünffache Menge dieser Verbindung im Vergleich zu dem Stamm CB2364, ist dafür aber genetisch nicht handhabbar (nicht in den Ergebnissen dargestellt). Dagegen ist der Stamm CB2364 ab einer Antibiotikakonzentration von 50 µg/ml im Agar apramycinsensitiv und kann deshalb als Wirt für die kombinatorische Biosynthese zur Derivatisierung von MM 47761 eingesetzt werden, da er sich mittels Protoplastentransformation manipulieren lässt (persönliche Mitteilung von Agnieszka Dziarnowski).

#### **4.2.1.1 Derivatisierung von Balhimycin und A47934**

Bisher wurden nur in einer Arbeit Phenyl-/Pyrrol-Halogenasegene für die kombinatorische Biosynthese eingesetzt. EUSTÁQUIO et al., 2004 konnten ein chloriertes Novobiocin-Derivat unter Verwendung des Halogenasegens aus dem Chlorobiocin-Cluster erzeugen. Die Halogenase aus dem Balhimycin-Produzenten chlorierte Novobiocin dagegen nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl publizierte als auch durch das PCR-Screening neu identifizierte GPA-Halogenasegene erfolgreich zur Derivatisierung von Balhimycin und A47934 eingesetzt (s. Punkt 3.4.2). Dechlor-Balhimycin konnte

durch Halogenasen aus GPA-Clustern aller fünf Typen chloriert werden. In einem Stamm (CB2664) konnte ein Biosynthesegencluster identifiziert werden, das eine neuartige genetische Organisation aufwies, weshalb keine Einteilung in eine GPA-Klasse möglich war. Auch diese Halogenase chlorierte Dechlor-Balhimycin.

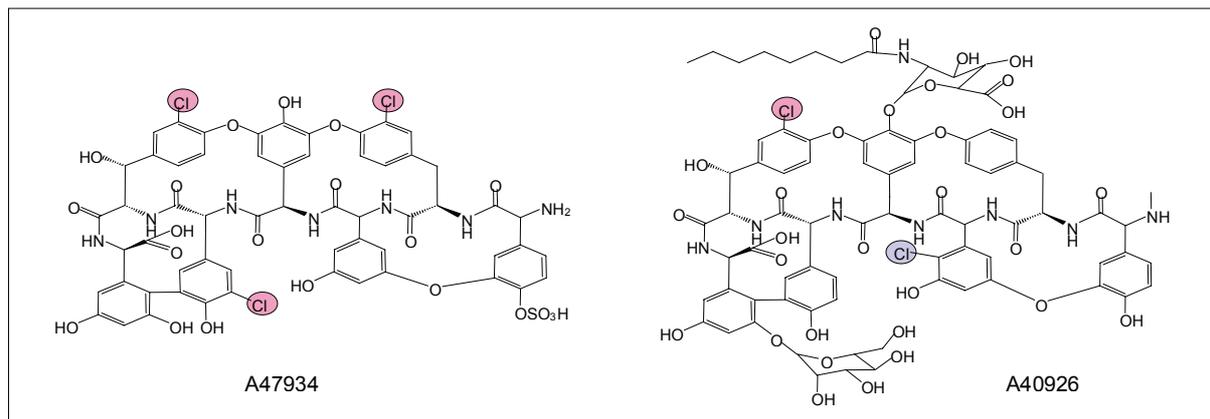
Bei beiden Halogenierungen an Balhimycin (Aminosäure 2 und 6) handelt es sich um eine Chlorierung an  $\beta$ -Hydroxytyrosin. Aridicin verfügt ebenfalls über diese beiden Chlorierungen. Dahingegen ist Avoparcin nur an einem der beiden  $\beta$ -Hydroxytyrosine (AS 6) chloriert, und bei A47934 handelt es sich um ein chloriertes Tyrosin an AS 2. Trotzdem wurden zweifach chlorierte Verbindungen von der jeweiligen Transformante produziert. Da das natürliche Substrat der Balhimycin-Halogenase und der damit verbundene Halogenierungszeitpunkt bisher nicht bekannt sind, lässt sich aufgrund dieser Daten weiterhin keine Aussage treffen inwieweit die GPA-Halogenasen substratspezifisch (Art der Aminosäure) bzw. regioselektiv (Position der Aminosäure) sind. Dafür müssten zunächst auch erst die Positionen der Chlorierungen der von den Transformanten produzierten Verbindungen bestimmt werden.

Die zusätzliche vierte Chlorierung (AS 6) an A47934 durch die Aridicin-Halogenase wurde bereits unter Punkt 3.4.2.2 diskutiert. Die Position der Chlorierung wurde im Zusammenhang mit den Ergebnissen der *PH4*-Mutante (Dechlor-Balhimycin-Produzent) postuliert. Allerdings wäre auch eine Chlorierung an AS 3 denkbar, da es sich bei dieser AS sowohl bei Aridicin als auch bei A47934 um 3,5-Dihydroxyphenylglycin handelt. Die A47934-Transformante (Aridicin-Halogenase) produzierte jedoch keine fünffach chlorierte Verbindung (AS 3 und AS 6). Da das Aridicin-Cluster noch nicht vollständig sequenziert wurde, könnte auch noch eine weitere Halogenase vorhanden sein, die die Chlorierung an AS 3 katalysiert.

Die Verwendung der CB2192-Halogenase führte ebenfalls zu einer weiteren Chlorierung an A47934. Hierbei handelt es sich um eine Halogenase, die hohe Homologie zu der Halogenase aus dem Complestatin-Produzenten aufweist. Vergleicht man die Positionen der Chlorierung von Complestatin und A47934 findet man eigentlich keine weitere freie Stelle für eine zusätzliche Chlorierung an A47934. Allerdings kennt man auch nicht die Struktur der von dem Wildtypstamm CB2192 produzierten chlorierten Verbindung. Eine denkbare Möglichkeit wäre die Chlorierung an AS 1 (Hydroxyphenylglycin), da Complestatin ebenfalls über Hydroxyphenylglycin verfügt (AS 3 und AS 5: *p*-Hydroxy-3,5-dichlorphenylglycin). Da nur das nicht sulfonylierte und vierfach chlorierte A47934-Derivat nachgewiesen werden konnte,

könnte durch die Chlorierung an dieser Aminosäure die Funktion der Sulfotransferase gestört sein.

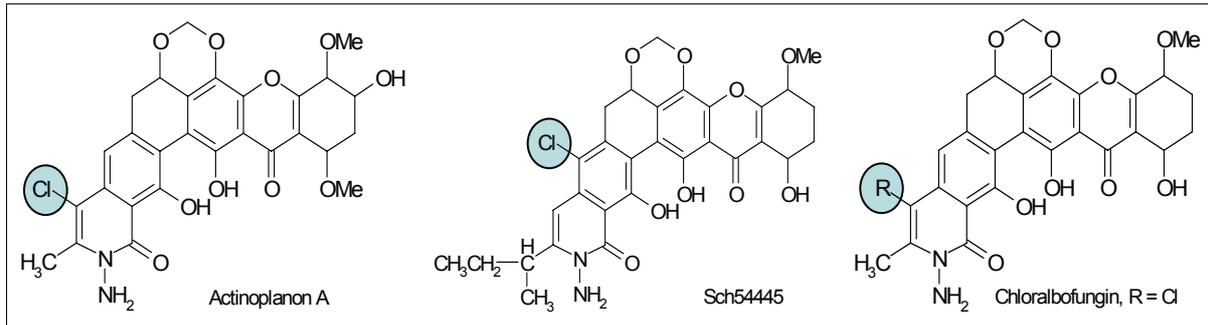
Für eine zusätzliche Chlorierung an A47934 würde sich die Halogenase aus dem A40926-Biosynthesegencluster eignen (SOSIO et al., 2003). Bei A40926 handelt es sich um eine zweifach chlorierte Verbindung (AS 3: Chlor-Dihydroxyphenylglycin und AS 6: Chlor- $\beta$ -Hydroxytyrosin). Da A47934 ebenfalls an AS 3 über ein Dihydroxyphenylglycin verfügt, das nicht chloriert ist, wäre dort eine freie Stelle (Abb. 75).



**Abb. 75:** Struktur von A47934 und A40926. A47934 ist nicht wie A40926 an AS 3 chloriert (blaue Markierung).

#### 4.2.2 Die Substanzklasse der Xanthone

Lysolipin gehört zu den stickstoffhaltigen polyzyklischen Xanthonen. Einige weitere chlorierte Verbindungen dieser Klasse sind in Abb. 76 dargestellt. Bisher wurden noch keine Cluster publiziert, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind. Patricio Lopez stellte freundlicherweise die Sequenz des Lysolipin-Clusters zur Verfügung. Durch das Screening nach Phenyl-Pyrrol-Halogenasegenen konnten in 5 Stämmen Halogenasen mit einer Identität von 61-82% zu der aus dem Lysolipin-Cluster stammenden Halogenase identifiziert werden. Einer dieser Stämme (CB2544) produzierte Lysolipin. Die möglichen Gründe warum keine chlorierten Verbindungen in den anderen 4 Stämmen detektiert werden konnten wurden bereits unter Punkt 4.2 diskutiert.



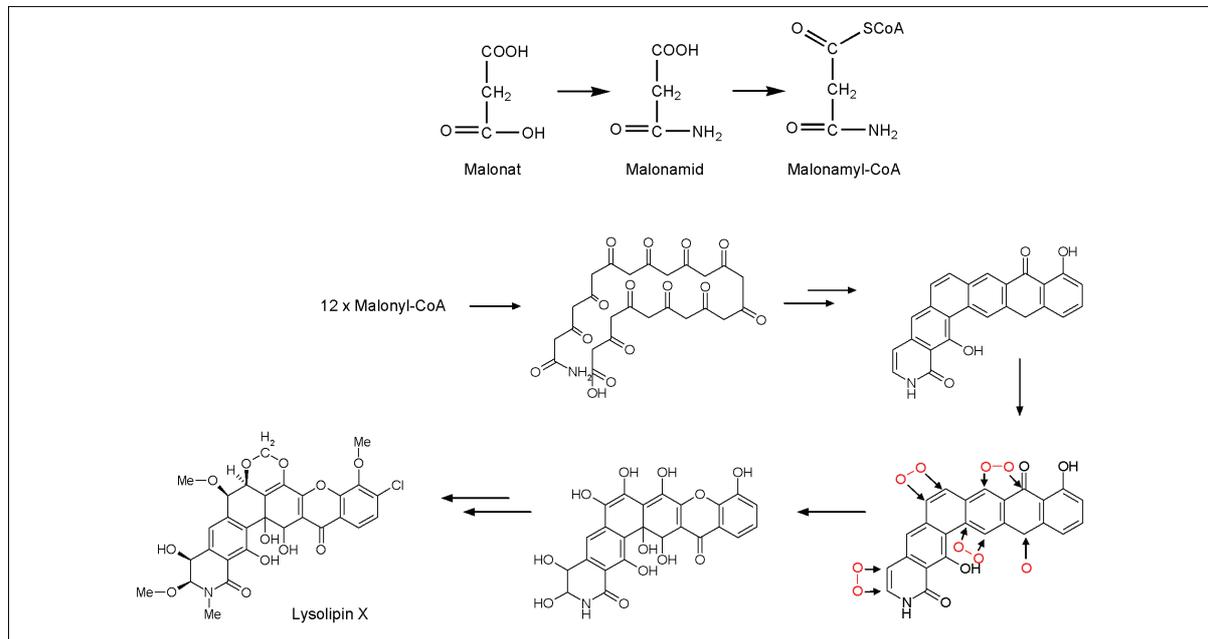
**Abb. 76:** Strukturen dreier chlorierter polyzyklischer Xanthone: Actinoplanon A (KOBAYASHI et al., 1988), Sch54445 (CHU et al., 1997) und Chloralbofungin (GUREVICH et al., 1972).

Um zum einen eine Korrelation zwischen dem identifizierten Biosynthesegencluster und dem von dem Stamm CB2544 produzierten Lysolipin herzustellen und zum anderen weitere Sekundärmetabolite zu finden, wurden beide Cluster heterolog exprimiert. Auch für den ursprünglichen Lysolipin-Produzenten CB28 lag bis zu diesem Zeitpunkt noch kein Beweis für die Korrelation zwischen Substanz und Cluster vor. Die elegante Alternative der heterologen Expression von ganzen Clustern, statt „Null-Mutanten“ zu generieren, haben LI & PIEL, 2002 und XU et al., 2005 bei Arbeiten an anderen PKS II-Clustern auch schon angewandt. Eine Cluster/Metabolit-Korrelation konnte sowohl für CB28 als auch CB2544 hergestellt werden. Alle anderen heterolog exprimierten putativen PKS II-Cluster führten zu keinen neuen Verbindungen. Hier könnte eine Sequenzierung der Randbereiche, die von dem Cluster kloniert wurden, darüber Aufschluss geben, ob für die Biosynthese essentiell notwendige Gene nicht auf diesen Cosmiden liegen.

#### 4.2.2.1 Biosynthese, Wirkmechanismus und Derivatisierung von Lysolipin und CBS40

Die Biosynthese von Lysolipin wurde mit Hilfe von Einbaustudien radioaktiv markierter Vorstufen untersucht (BOCKHOLT et al., 1994). Dabei wurde festgestellt, dass die Synthese von Lysolipin aus 12 Malonyl-CoA-Einheiten nach einem typischen Polyketidsyntheschema des Typs II erfolgt. Ungewöhnlich ist die Verwendung von Malonyl-CoA als Starter-Einheit ohne vorherige Decarboxylierung. Der stickstoffhaltige Heterozyklus des Lysolipins wird vermutlich über die Zwischenstufe eines Malonamid-Intermediats ausgebildet (MOORE & HERTWECK, 2002), das durch eine Asparagin-Synthetase synthetisiert wird. Nach der Biosynthese des Grundgerüsts müssen etliche Modifikationen stattfinden, um das Endprodukt Lysolipin X bzw. I zu erzeugen (Einführung von Sauerstoffatomen, Methylierungen,

Chlorierung und Zyklisierung). In Abb. 77 ist der postulierte Biosyntheseweg von Lysolipin dargestellt.



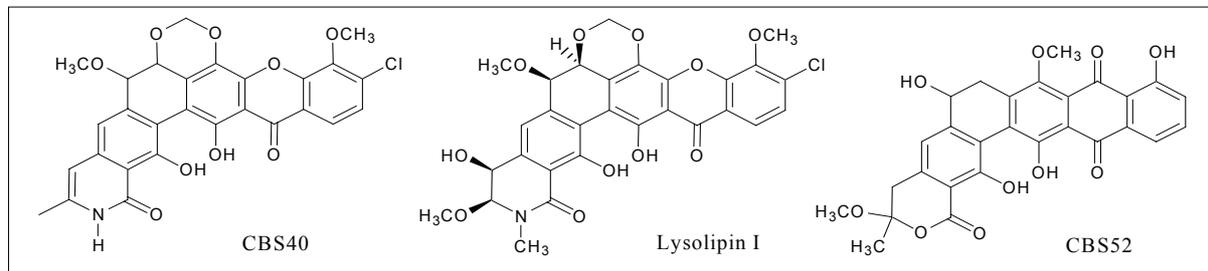
**Abb. 77:** Postulierter Biosyntheseweg von Lysolipin (BOCKHOLT et al., 1994).

Der Stamm CB2544 produziert wahrscheinlich ebenfalls Lysolipin. Diese Aussage basiert aber nur auf HPLC-MS Daten (Masse, UV-Spektrum und Retentionszeit). Zur Verifizierung müsste die Substanz aus dem Wildstamm isoliert und ihre Struktur mittels NMR aufgeklärt werden.

Allerdings wurde durch die heterologe Expression des Clusters aus dem alternativen Lysolipin-Produzenten CB2544 von *S. albus* nicht Lysolipin, sondern CBS40 produziert. Die Substanz CBS40 wird nur aufgrund des nicht vollständig klonierten Clusters und einer dadurch inaktiven Oxidoreduktase produziert. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen dem CBS40-Cluster und dem Lysolipin-Cluster verläuft die Biosynthese wahrscheinlich ähnlich. Die Unterschiede in der Struktur dieser beiden Substanzen (Abb. 78) lassen sich mit den Daten, die über die Biosynthese von Lysolipin zur Verfügung stehen, nur vermuten. Durch die Inaktivierung der Oxidoreduktase kann an dem stickstoffhaltigen Heterozyklus keine Oxigenierung erfolgen, wodurch möglicherweise die N-Methyltransferase ihr Substrat nicht mehr erkennt. Dafür erfolgt ebenfalls an diesem Heterozyklus anstelle einer O-Methylierung eine C-Methylierung was eine große Substratflexibilität der entsprechenden O-Methyltransferase voraussetzen würde.

Noch schwieriger sind die Strukturunterschiede der durch die Transposon-Mutagenese generierten Verbindung CBS52 zu erklären, da diese nicht über den stickstoffhaltigen Heterozyklus verfügt (Abb. 78). Bei dieser Mutante wurde eine Monooxygenase inaktiviert. Ebenso konnten neue Verbindungen in einer Mutante detektiert werden, bei der eine Glykosyltransferase inaktiviert wurde, deren Funktion aufgrund einer nicht vorhandenen Glykosylierung unbekannt ist. Eine Erklärung dieser Phänomene könnten polare Effekte durch die Integration des Transposons in das CBS40-Cluster sein.

Die durch die Transposon-Mutagenese erhaltenen Erkenntnisse über den Zeitpunkt der Chlorierung wurden bereits unter Punkt 4.1.3 diskutiert.



**Abb. 78:** Vergleich der Strukturen von CBS40, CBS52 und Lysolipin I.

Über den Wirkmechanismus von Lysolipin gibt es ebenfalls wenige Daten. DRAUTZ et al., 1975 haben eine Hemmung der Zellwandbiosynthese postuliert. Inzwischen wird allerdings ein mit der Zellmembran interagierender Wirkmechanismus diskutiert (persönliche Mitteilung von Dr. Stefan Pelzer).

Obwohl die MIC-Werte von Lysolipin sehr gering sind, diese Substanz aber auch über stark toxische Eigenschaften verfügt (akute Toxizität: 1 mg/kg Maus intravenös ist letal), wurden Lysolipin-Derivate mittels verschiedener Methoden hergestellt (CBS40, CBS52 und Dechlor-CBS40). Insbesondere wurde der Einfluss der Halogenierung auf die biologische Aktivität untersucht. Die Abteilung „Lead Characterization & Production“ der Combinature Biopharm AG konnte weitere Verbindungen für Aktivitätstests isolieren, Dechlor-Lysolipin und Brom-Lysolipin. In Tab. 27 sind alle bisher bestimmten MIC-Werte zusammengefasst.

**Tab. 27:** Einfluss der Halogenierung auf die MIC-Werte verschiedener Lysolipin-Derivate.

Organismus	Lysolipin	Br-Lysolipin	$\Delta$ Cl-Lysolipin	CBS40	$\Delta$ Cl-CBS40
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC51575	30 ng/ml	30 ng/ml	30 ng/ml	10 ng/ml	30 ng/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33592	1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	0,3 ng/ml	3 ng/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	1 ng/ml	1 ng/ml	3 ng/ml	0,3 ng/ml	3 ng/ml
<i>Streptococcus pneumoniae</i> EM & AM	10 ng/ml	3 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml	30 ng/ml
<i>E. coli</i> ATCC10536	100 $\mu$ g/ml	30 $\mu$ g/ml	> 100 $\mu$ g/ml	3 $\mu$ g/ml	> 100 $\mu$ g/ml

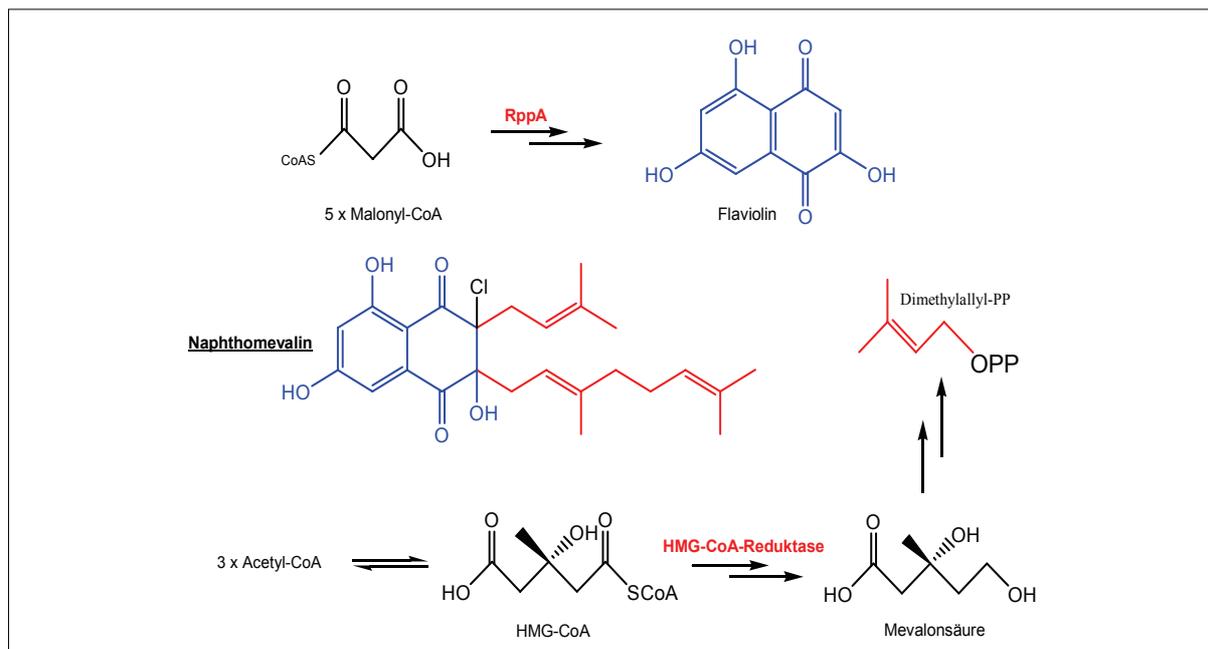
Sowohl bei Lysolipin als auch bei CBS40 hat die Chlorierung einen Einfluss auf die MIC-Werte. In Abhängigkeit der getesteten Mikroorganismen verschlechterten sich die Werte um den Faktor 3-10 unter Verwendung der jeweiligen  $\Delta$ Cl-Derivate. Die Aktivität gegen Gram-negative Bakterien ging bei  $\Delta$ Cl-Lysolipin und bei  $\Delta$ Cl-CBS40 vollständig verloren. Dagegen hat der Austausch von Chlor gegen Brom einen positiven Einfluss auf die antibiotischen Eigenschaften von Lysolipin. Teilweise konnten die MIC-Werte um den Faktor 3 verbessert werden. Da Br-CBS40 bisher nicht isoliert werden konnte, liegen für diese Verbindung noch keine Daten vor, genauso wie die Daten zur akuten Toxizität der Lysolipin-Derivate.

Der Einfluss einer Halogenierung auf die biologische Aktivität einer Substanz wurde auch schon in anderen Arbeiten gezeigt. Beispiele für eine Aktivitätssteigerung durch eine Chlorierung sind Rebeccamycin (SANCELME et al., 1994), Griseofulvin (CROSSE et al., 1964) und Vancomycin (HARRIS, 1985 und LI-SUN et al., 2004). Es gibt allerdings auch Gegenbeispiele, die in einer Zusammenfassung des Einflusses von Halogenierungen auf die biologische Aktivität von Verbindungen in der Arbeit von NAUMANN, 2000 beschrieben sind.

### 4.2.3 Die Substanzklasse der Naphthoquinone

Wie schon unter Punkt 3.3.5 beschrieben besteht wahrscheinlich kein Zusammenhang zwischen dem in CB2365 identifizierten Biosynthesegencluster und der aus diesem Stamm isolierten Verbindung (Naphthomevalin). Da Naphthomevalin zu den Naphthoquinonen zählt, wurde die Cosmid-Genbank dieses Stammes mit zwei für diese Substanzklasse spezifischen Sonden hybridisiert (nicht in den Ergebnissen dargestellt), um das Naphthomevalin-Cluster zu identifizieren. Zum einen wurde als homologe Sonde das 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktasegen (*hmg-CoA-Reduktase*) verwendet. Die HMG-CoA-Reduktase ist an der Isoprenoid-Biosynthese durch den Mevalonatweg beteiligt (HAMANO et al., 2001 und MAHMUD et al., 2005). Zum anderen wurde für die Herstellung einer heterologen Sonde aus *S. lividans* ein Chalconsynthase-ähnliches Gen (*rppA*) amplifiziert. Bei dem entsprechenden Enzym handelt es sich um eine bakterielle PKS des Typs III, die die Synthese von aromatischen Polyketiden katalysiert (MOORE & HOPKE, 2001 und FUNA et al., 1999).

Naphthomevalin besteht aus einem aromatischen Strukturteil, der von einer PKS III synthetisiert werden könnte sowie aus mehreren Terpeneinheiten, die entsprechend über den Mevalonatweg gebildet werden könnten. In Abb. 79 sind die Biosynthesewege beider Strukturteile dargestellt.



**Abb. 79:** Biosynthese von Dimethylallyl-PP (Mevalonatweg) und Flaviolin (PKS III). Der jeweilige Strukturteil von Naphthomevalin ist blau (Flaviolin) bzw. rot (Terpen) gezeichnet.

Unter Verwendung dieser beiden Sonden (*hmg-CoA* und *rppA*) konnten mittels Hybridisierung der Cosmid-Genbank des Stammes CB2365 14 co-hybridisierende Cosmide identifiziert werden. Auf keinem dieser Cosmide ließ sich unter Verwendung der Primer Halo-B4-FW/Halo-B7-RV ein Halogenasegenfragment amplifizieren. Da bei Naphthomevalin die Chlorierung an einer ungewöhnlichen Position vorliegt (an keinem Aromaten), könnte es sich hierbei um eine Halogenase handeln, die sich in ihrer AS-Sequenz von den anderen bekannten Halogenasen unterscheidet und mit diesem Primerpaar nicht detektierbar ist. Ob das Naphthomevalin-Biosynthesegencluster auf einem dieser Cosmide lokalisiert ist, könnte mittels heterologer Expression in *S. albus* überprüft werden.

### 4.3 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war, Möglichkeiten zu finden, das Potential an Enzymen und Sekundärmetaboliten einer Stammsammlung zu erkennen und für die Entwicklung neuer Antibiotika zu nutzen. Durch die Verwendung von Halogenasegenen als Marker konnten beim Durchmustern einer Stammsammlung sowohl neue Biosynthesegencluster als auch neue Substanzen detektiert werden. Zur weiteren Charakterisierung dieser Stammsammlung könnten zusätzliche Markergene eingesetzt werden.

Die durch das PCR-basierte Screening identifizierten Stämme in Untergruppen des phylogenetischen Phenyl-/Pyrrol-Halogenase-Stammbaumes können bezüglich der Produktion von putativen Leitsubstanzen weiter untersucht werden. Beispiele hierfür sind insbesondere die Lipoglykocodepsipeptide, Enediyne und Aminocoumarine.

Alle durch kombinatorische Biosynthese und Transposon-Mutagenese generierten Substanzen könnten isoliert und in anschließenden Untersuchungen sowohl ihre biologische Aktivität als auch Toxizität bestimmt werden.

Die entdeckten Enzyme können für Biokatalyse-Anwendungen genutzt werden und stellen eine Ausgangsbasis für deren weitere Optimierungen mit Methoden wie z.B. „directed evolution“ dar.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, A. S., CLARK, D. J., GIBBONS, P. H. & SIGMUND, J. M. (2002): The detection of diverse aminoglycoside phosphotransferases within natural populations of actinomycetes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 60-69.

AYUSO-SACIDO, A. & GENILLOUD, O. (2005): New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb. Ecol.* 49, 10-24.

BANTLEON, R., ALTENBUCHNER, J. & VAN PÉE, K. H. (1994): Chloroperoxidase from *Streptomyces lividans*: isolation and characterization of the enzyme and the corresponding gene. *J. Bacteriol.* 176, 2339-2347.

BENTLEY, S. D., CHATER, K. F., CERDENO-TARRAGA, A. M., CHALLIS, G. L., THOMSON, N. R., JAMES, K. D., HARRIS, D. E., QUAIL, M. A., KIESER, H., HARPER, D., ET AL. (2002): Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.

BERGER, R. S. (1983): Occurrence of 2,6-dichlorophenol in *Dermacentor albipictus* and *Haemaphysalis leporispalustris* (acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 20, 103.

BEYE, M., POCH, A., BURGTORF, C., MORITZ, R. F. & LEHRACH, H. (1998): A gridded genomic library of the honeybee (*Apis mellifera*): a reference library system for basic and comparative genetic studies of a hymenopteran genome. *Genomics* 49, 317-320.

BIBB, M. J., JANSSEN, G. R. & WARD, J. M. (1985): Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* 38, 215-226.

BIERMAN, M., LOGAN, R., O'BRIEN, K., SENO, E. T., RAO, R. N. & SCHONER, B. E. (1992): Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116, 43-49.

BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

BISTER, B., BISCHOFF, D., NICHOLSON, G. J., STOCKERT, S., WINK, J., BRUNATI, C., DONADIO, S., PELZER, S., WOHLLEBEN, W. & SÜSSMUTH, R. D. (2002): Bromobalhimycin and chlorobromobalhimycins--illuminating the potential of halogenases in glycopeptide antibiotic biosyntheses. *ChemBiochem.* 4, 658-662.

BOCKHOLT, H., UDVARNOKI, G., ROHR, J., MOCEK, U., BEALE, J. M. & FLOSS, H. G. (1994): Biosynthetic Studies on the Xanthone Antibiotics Lysolipins X and I. *J. Org. Chem.* 59, 2064-2069.

BODE, H. B., BETHE, B., HÖFS, R. & ZEECK, A. (2002): Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBiochem*. 3, 619-627.

Boeck, L. D. & Mertz, F. P. (1986): A47934, a novel glycopeptide-aglycone antibiotic produced by a strain of *Streptomyces toyocaensis* taxonomy and fermentation studies. *J. Antibiot.* 39, 1533-1540.

BORGHI, A., CORONELLI, C., FANIUOLO, L., ALLIEVI, G., PALLANZA, R. & GALLO, G. G. (1984): Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. IV. Separation and characterization of the components of teichomycin (teicoplanin). *J. Antibiot.* 37, 615-620.

BOX, S. J., ELSON, A. L., GILPIN, M. L. & WINSTANLEY, D. J. (1990): MM 47761 and MM 49721, glycopeptide antibiotics produced by a new strain of *Amycolatopsis orientalis*. Isolation, purification and structure determination. *J. Antibiot.* 43, 931-937.

BREITHAUPT, H. (1999): The new antibiotics. *Nat. Biotechnol.* 17, 1165-1169.

BURD, W., YOURKEVICH, O., VOSKOBEOV, A. J. & VAN PÉE, K. H. (1995): Purification and properties of a non-haem chloroperoxidase from *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 255-260.

BURGTORF, C., WELZEL, K., HASENBANK, R., ZEHETNER, G., WEIS, S. & LEHRACH, H. (1998): Gridded genomic libraries of different chordate species: a reference library system for basic and comparative genetic studies of chordate genomes. *Genomics* 52, 230-232.

CAVALLERI, B., PAGANI, H., VOLPE, G., SELVA, E. & PARENTI, F. (1984): A-16686, a new antibiotic from *Actinoplanes*. I. Fermentation, isolation and preliminary physico-chemical characteristics. *J. Antibiot.* 37, 309-317.

CHANG, Z., FLATT, P., GERWICK, W. H., NGUYEN, V. A., WILLIS, C. L. & SHERMAN, D. H. (2002): The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit. *Gene* 296, 235-247.

CHATER, K. F. & WILDE, L. C. (1980): *Streptomyces albus* G mutants defective in the *Sa*/GI restriction-modification system. *J. Gen. Microbiol.* 116, 323-334.

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. USA* 98, 8548-8553.

CHU, M., TRUUMES, I., MIERZWA, R., TERRACCIANO, J., PATEL, M., LOEBENBERG, D., KAMINSKI, J. J., DAS, P. & PUAR, M. S. (1997): Sch 54445: a new polycyclic xanthone with highly potent antifungal activity produced by *Actinoplanes* sp. *J. Nat. Prod.* 60, 525-528.

- COATES, A., HU, Y., BAX, R. & PAGE, C. (2002): The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 895-910.
- COURTOIS, S., CAPPELLANO, C. M., BALL, M., FRANCOU, F. X., NORMAND, P., HELYNCK, G., MARTINEZ, A., KOLVEK, S. J., HOPKE, J., OSBURNE, M. S., ET AL. (2003): Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 49-55.
- CROSSE R, MCWILLIAM, R. & RHODES, A. (1964): Some relations between chemical structure and antifungal effects of griseofulvin analogues. *J. Gen. Microbiol.* 34, 51-65.
- CUDIC, P., BEHENNA, D. C., KRANZ, J. K., KRUGER, R. G., WAND, A. J., VEKLIČH, Y. I., WEISEL, J. W. & MCCAFFERTY, D. G. (2002): Functional analysis of the lipoglycopeptide antibiotic ramoplanin. *Chem. Biol.* 9, 897-906.
- DAIRI, T., NAKANO, T., AISAKA, K., KATSUMATA, R. & HASEGAWA, M. (1995): Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1099-1106.
- DONG, C., HUANG, F., DENG, H., SCHAFFRATH, C., SPENCER, J. B., O'HAGAN, D. & NAISMITH, J. H. (2004): Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme. *Nature* 427, 561-565.
- DONG, C., KOTZSCH, A., DORWARD, M., VAN PÉE, K. H. & NAISMITH, J. H. (2004): Crystallization and X-ray diffraction of a halogenating enzyme, tryptophan 7-halogenase, from *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Crystallogr. D60*, 1438-1440.
- DRAUTZ, H., KELLER-SCHIERLEIN, W. & ZAHNER, H. (1975): Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Lysolipin I, ein neues Antibiotikum aus *Streptomyces violaceoniger*. *Arch. Microbiol.* 106, 175-190.
- DRECHSEL, E. (1896): Contribution to the chemistry of a sea animal. *Z. Biol.* 33, 85-107.
- DUGGAR, B. M. (1948): Aureomycin: a product of the continued search for new antibiotics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 177-181.
- EHRlich, J., BARTZ, Q. R., SMITH, R. M. & JOSELYN, A. A. (1947): Chloramphenicol a New Antibiotic from Soil Actinomycetes. *Science* 106, 417.
- EMBLEY, T. M. & STACKEBRANDT, E. (1994): The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 257-289.

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. *Chem. Biol.* 11, 1561-1572.

FAUCI, A. S. (2001): Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* 32, 675-685.

FLECKS, S., DONG, C., UNVERSUCHT, S., HAUPT, C., FARACK, J., NAISMITH, J. H. & VAN PÉE, K. H. (2005): The three-dimensional structure of tryptophan 7-halogenase, a member of the new flavin-dependent halogenase superfamily. *Posterpräsentation*, BioPerspectives.

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 Microbiol. Lett.* 155, 223-229.

FUNA, N., OHNISHI, Y., FUJII, I., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. & HORINOUCI, S. (1999): A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* 400, 897-899.

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.

GOLDSTEIN, B. P., SELVA, E., GASTALDO, L., BERTI, M., PALLANZA, R., RIPAMONTI, F., FERRARI, P., DENARO, M., ARIOLI, V. & CASSANI, G. (1987): A40926, a new glycopeptide antibiotic with anti-*Neisseria* activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1961-1966.

GRIBBLE, G. W. (2003): The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere* 52, 289-297.

GROSS, F., LEWIS, E. A., PIRAE, M., VAN PÉE, K. H., VINING, L. C. & WHITE, R. L. (2002): Isolation of 3' - O-acetylchloramphenicol: a possible intermediate in chloramphenicol biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 283-286.

GUREVICH, A. I., KARAPETIAN, M. G., KISELEVA, O. A., KOLODITSKAIA, T. A. & KOLOSOV, M. N. (1972): The chemistry of albofungin. The antibiotics albofungin and chloralbofungin. *Antibiotiki.* 17, 771-774.

GUSEK, T. W. & KINSELLA, J. E. (1992): Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 system for gene cloning. *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 247-60.

HAGER, L. P., MORRIS, D. R., BROWN, F. S. & EBERWEIN, H. (1966): Purification and characterization of a novel bacterial non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrrocinia*. Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. *J. Biol. Chem.* 241, 1769-1777.

HAMANO, Y., DAIRI, T., YAMAMOTO, M., KAWASAKI, T., KANEDA, K., KUZUYAMA, T., ITOH, N. & SETO, H. (2002): Cloning of a gene cluster encoding enzymes responsible for the mevalonate pathway from a terpenoid-antibiotic-producing *Streptomyces* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 1627-1635.

HAMMER, P. E., HILL, D. S., LAM, S. T., VAN PÉE, K. H. & LIGON, J. M. (1997): Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2147-2154.

HARRIS, C. M., KANNAN, R., KOPECKA, H., & HARRIS, T.M. (1985): The role of the chlorine substituents in the antibiotic vancomycin: preparation and characterization of mono- and didechloro-vancomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6652-6658.

HARTUNG, J. (1999): The Biosynthesis of Barbamide - A Radical Pathway for „Biohalogenation“? *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 1209-1211.

HE, J., MAGARVEY, N., PIRAEI, M. & VINING, L. C. (2001): The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular non-ribosomal peptide synthetase gene. *Microbiology* 147, 2817-2829.

HECHT, H. J., SOBEK, H., HAAG, T., PFEIFER, O. & VAN PÉE, K. H. (1994): The metal-ion-free oxidoreductase from *Streptomyces aureofaciens* has an alpha/beta hydrolase fold. *Nat. Struct. Biol.* 1, 532-537.

HENKEL, T. & ZEECK, A. (1991): Secondary metabolites by chemical screening, 15. Structure and absolute configuration of naphthomevalin, a new dihydro-naphthoquinone antibiotic from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 44, 665-669.

HOHAUS, K., ALTMANN, A., BURD, W., FISCHER, I., HAMMER, P. E., HILL, D. S., LIGON, J. M. & VAN PÉE, K. H. (1997): NADH-abhängige Halogenasen sind wahrscheinlich eher an der Biosynthese von Halogenmetaboliten beteiligt als Haloperoxidasen. *Angew. Chem.* 18, 2102-2104.

HÖLZER, M. BURD, W., REISSIG, H. U. & VAN PÉE, K. H. (2001): Substrate Specificity and Regioselectivity of Tryptophan 7-Halogenase from *Pseudomonas fluorescens* BL915. *Adv. Synth. Catal.* 343, 591-595.

HONDA, K., KATAOKA, M., SAKURADANI, E. & SHIMIZU, S. (2003): Role of *Acinetobacter calcoaceticus* 3,4-dihydrocoumarin hydrolase in oxidative stress defence against peroxyacids. *Eur. J. Biochem.* 270, 486-494.

HUBBARD, B. K. & WALSH, C. T. (2003): Vancomycin assembly: nature's way. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 730-765.

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.

ISHIYAMA, D., KANAI, Y., SENDA, H., IWATANI, W., IWATANI, W., KONNO, H. & KANAZAWA, S. (2000): Novel human topoisomerase I inhibitors, topopyrones A, B, C and D. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.* 53, 873-878.

KANAI, Y., ISHIYAMA, D., SENDA, H., IWATANI, W., TAKAHASHI, H., KONNO, H., TOKUMASU, S. & KANAZAWA, S. (2000): Novel human topoisomerase I inhibitors, topopyrones A, B, C and D. I. Producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activity. *J. Antibiot.* 53, 863-872.

KANEKO, I., KAMOSHIDA, K. & TAKAHASHI, S. (1989): Complestatin, a potent anti-complement substance produced by *Streptomyces lavendulae*. I. Fermentation, isolation and biological characterization. *J. Antibiot.* 42, 236-241.

KELLER, S., WAGE, T., HOHAUS, K., HÖLZER, M., EICHHORN, E. & VAN PÉE, K. H. (2000): Purification and Partial Characterization of Tryptophan 7-Halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39, 2300-2302.

KHOSLA, C. (2000): Natural product biosynthesis: a new interface between enzymology and medicine. *J. Org. Chem.* 65, 8127-8133.

KIESER, T., BIBB, M. J., BUTTNER, M. J., CHATER, K. F. & HOPWOOD, D. A. (2000): Practical *Streptomyces* Genetics. *The John Innes Foundation*, John Innes Centre, Norwich, England.

KIRNER, S., KRAUSS, S., SURY, G., LAM, S. T., LIGON, J. M. & VAN PÉE, K. H. (1996): The non-haem chloroperoxidase from *Pseudomonas fluorescens* and its relationship to pyrrolnitrin biosynthesis. *Microbiology* 142, 2129-2135.

KIRNER, S., HAMMER, P. E., HILL, D. S., ALTMANN, A., FISCHER, I., WEISLO, L. J., LANAHAN, M., VAN PÉE, K. H. & LIGON, J. M. (1998): Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 180, 1939-1943.

KLING, E., SCHMID, C., UNVERSUCHT, S., WAGE, T., ZEHNER, S. & VAN PÉE, K. H. (2005): Enzymatic incorporation of halogen atoms into natural compounds. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* 51, 165-194.

KOBAYASHI, K., NISHINO, C., OHYA, J., SATO, S., MIKAWA, T., SHIOBARA, Y. & KODAMA, M. (1988): Actinoplanones A and B, new cytotoxic polycyclic xanthenes from *Actinoplanes* sp. *J. Antibiot.* 41, 502-511.

KUNSTMANN, M. P., MITSCHER, L. A., PORTER, J. N., SHAY, A. J. & DARKEN, M. A. (1968): LL-AV290, a new antibiotic. I. Fermentation, isolation, and characterization. *Antimicrobial Agents Chemother.* 8, 242-245.

Li, A. & Piel, J. (2002): A gene cluster from a marine *Streptomyces* encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A. *Chem. Biol.* 9, 1017-1026.

LI-SUN, LINDBECK, A. C., NILIUS, A. M., TOWNE, T. B., ZHOU, C. C. & PAULUS T. J. (2004): Synthesis, isolation, and antibacterial activities of monodechlorovancomycins. *J. Antibiot.* 57, 691-694.

LIU, W., AHLERT, J., GAO, Q., WENDT-PIENKOWSKI, E., SHEN, B. & THORSON, J. S. (2003): Rapid PCR amplification of minimal enediyne polyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11959-11963.

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.

MADÓN, J. & HÜTTER, R. (1991): Transformation system for *Amycolatopsis (Nocardia) mediterranei*: direct transformation of mycelium with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 173, 6325-6331.

MAHMUD, T., WENZEL, S. C., WAN, E., WEN, K. W., BODE, H. B., GAITATZIS, N. & MULLER, R. (2005): A biosynthetic pathway to isovaleryl-CoA in myxobacteria: the involvement of the mevalonate pathway. *Chembiochem.* 6, 322-330.

MALNAR, I. & SIH, C. J. (2002): Chloroperoxidase-catalyzed chlorination of didechloroaglucovancomycin and vancomycin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10, 545-549.

MALPARTIDA, F. & HOPWOOD, D. A. (1984): Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* 309, 462-464.

MARTIN, M. F. & LIRAS, P. (1989): Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 173-206.

MCCONNELL, O. & FENICAL, W. (1977): Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. *Phytochemistry* 16, 367-374.

MELZER, R. R., BRANDHUBER, P., ZIMMERMANN, T. & SMOLA, U. (2001): Farben aus dem Meer: Der Purpur. *Biologie in unserer Zeit* 31, 30-39.

MESSERSCHMIDT, P., PRADE, L. & WEVER, R. (1997): Implications for the catalytic mechanism of the vanadium-containing enzyme chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* by X-ray structures of the native and peroxide form. *Biol. Chem.* 378, 309–315.

METSÄ-KETELÄ, M., HALO, L., MUNUKKA, E., HAKALA, J., MÄNTSÄLÄ, P. & YLIHONKO, K. (2002): Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4472-4479.

METSÄ-KETELÄ, M., Ylihonko, K. & Mantsala, P. (2004): Partial activation of a silent angucycline-type gene cluster from a rubromycin beta producing *Streptomyces* sp. PGA64. *J. Antibiot.* 57, 502-510.

MOORE, B. S. & HERTWECK, C. (2002): Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat. Prod. Rep.* 19, 70-99.

MOORE, B. S. & HOPKE, J.N. (2001): Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *Chembiochem.* 2, 35-38.

MOORE, R. E. (1997): Volatile compounds from marine algae. *Acct. Chem. Res.* 10, 40-47.

MORRIS, D. R., & HAGER, L. P. (1966): Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 241, 1763-1768.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., & ERLICH, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.

NADKARNI, S. R., PATEL, M. V., CHATTERJEE, S., VIJAYAKUMAR, E. K., DESIKAN, K. R., BLUMBACH, J., GANGULI, B. N. & LIMBERT, M. (1994): Balhimycin, a new glycopeptide antibiotic produced by *Amycolatopsis* sp. Y-86,21022. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* 47, 334-341.

NAKANISHI, S., ANDO, K., KAWAMOTO, I., YASUZAWA, T., SANO, H. & KASE, H. (1989): KS-504 compounds, novel inhibitors of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Mollisia ventosa*. *J. Antibiot.* 42, 1775-1783.

NAUMANN, K. (2000): Influence of chlorine substituents on biological activity of chemicals: a review. *Pest. Manag. Sci.* 56, 3-21.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. & SNADER, K. M. (2003): Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66, 1022-1037.

NI, X., HAGER & L.P. (1998): cDNA cloning of *Batis maritima* methyl chloride transferase and purification of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12866-12871.

NI, X., HAGER & L.P. (1999): Expression of *Batis maritima* methyl chloride transferase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3611-3615.

NICOLAOU, K. C., BODDY, C. N., BRASE, S. & WINSSINGER, N. (1999): Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 2096-2152.

NIZETIC, D., ZEHETNER, G., MONACO, A. P., GELLEN, L., YOUNG, B. D. & LEHRACH, H. (1991): Construction, arraying, and high-density screening of large insert libraries of human chromosomes X and 21: their potential use as reference libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3233-3237.

NOWAK-THOMPSON, B., CHANEY, N., WING, J. S., GOULD, S. J. & LOPER, J. E. (1999): Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 181, 2166-2174.

O'HAGAN, D., SCHAFFRATH, C., COBB, S. L., HAMILTON, J. T. & MURPHY, C. D. (2002): Biochemistry: biosynthesis of an organofluorine molecule. *Nature* 416, 279.

OMURA, S., IKEDA, H., ISHIKAWA, J., HANAMOTO, A., TAKAHASHI, C., SHINOSE, M., TAKAHASHI, Y., HORIKAWA, H., NAKAZAWA, H., OSONOE, T., ET AL. (2001): Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12215-12220.

OXFORD, A. E., RAISTRICK, H. & SIMONART, P. (1939): Griseofulvin, C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>O<sub>6</sub>Cl, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum*. *Dierks. Biochem. J.* 33, 240-248.

PELZER, S., VENDE, A. & BECHTHOLD, A. (2005b): Novel natural compounds obtained by genome-based screening and genetic engineering. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 8, 228-238.

PELZER, S., WOHLERT, S. E. & VENDE, A. (2005a): Tool-box: tailoring enzymes for bio-combinatorial lead development and as markers for genome-based natural product lead discovery. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* 51, 233-259.

PETTIT, G. R. (1991): The bryostatins. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 57, 153-195.

PETTY, M. A., (1961): An introduction to the origin and biochemistry of microbial halometabolites. *Bacteriol. Rev.* 25, 111-130.

PICARD, M., GROSS, J., LÜBBERT, E., TÖLZER, S., KRAUSS, S., VAN PÉE, K. H. & BERKESSEL, A. (1997): Metal-free bacterial haloperoxidases as unusual hydrolases: activation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the formation of peracetic acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* 36, 1196-1199.

PIEL, J., HUI, D., FUSEYANI, N. & MATSUNAGA, S. (2004): Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ. Microbiol.* 6, 921-927.

PIRAEE, M., WHITE, R. L. & VINING, L. C. (2004): Biosynthesis of the dichloroacetyl component of chloramphenicol in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: genes required for halogenation. *Microbiology* 150, 85-94.

POOTOOLAL, J., THOMAS, M. G., MARSHALL, C. G., NEU, J. M., HUBBARD, B. K., WALSH, C. T. & WRIGHT, G. D. (2002): Assembling the glycopeptide antibiotic scaffold: The biosynthesis of A47934 from *Streptomyces toyocaensis* NRRL15009. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 8962-8967.

PUK, O., HUBER, P., BISCHOFF, D., RECKTENWALD, J., JUNG, G., SÜSSMUTH, R. D., VAN PÉE, K. H., WOHLLEBEN, W. & PELZER, S. (2002): Glycopeptide biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908: function of a halogenase and a haloperoxidase/perhydrolase. *Chem. Biol.* 9, 225-235.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning : a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA.

SANCELME, M., FABRE, S. & PRUDHOMME, M. (1994): Antimicrobial activities of indolocarbazole and bis-indole protein kinase C inhibitors. *J. Antibiot.* 47, 792-798.

SÁNCHEZ, C., BUTOVICH, I. A., BRANA, A. F., ROHR, J., MENDÉZ, C. & SALAS, J. A. (2002): The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem. Biol.* 9, 519-31.

SÁNCHEZ, C., ZHU, L., BRANA, A. F., SALAS, A. P., ROHR, J., MÉNDEZ, C. & SALAS, J. A. (2005): Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 461-466.

SCARRATT, M. G. & MOORE, R. M. (1996): Production of methyl chloride and methyl bromide in laboratory cultures of Marine Phytoplankton. *Marine Chem.* 54, 263-272.

SCHAFFRATH, C., COBB, S. L. & O'HAGAN, D. (2002): Cell-free biosynthesis of fluoroacetate and 4-fluorothreonine in *Streptomyces cattleya*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 3913-3915.

SCHMITT-JOHN, T. & ENGELS, J. W. (1992): Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 493-498.

SCRUTTON, N. S., BERRY, A. & PERHAM, R. N. (1990): Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* 343, 38-43.

SHAW, P. D., & HAGER, L. P. (1959): Biological chlorination. IV. Peroxidative nature of enzymatic chlorination. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 6527-6528.

SHEARER, M. C., ACTOR, P., BOWIE, B. A., GRAPPEL, S. F., NASH, C. H., NEWMAN, D. J., OH, Y. K., PAN, C. H. & NISBET, L. J. (1985): Aridicins, novel glycopeptide antibiotics. I. Taxonomy, production and biological activity. *J. Antibiot.* 38, 555-560.

SHELDRIK, G. M., JONES, P. G., KENNARD, O., WILLIAMS, D. H. & SMITH, G. A. (1978): Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature* 271, 223-225.

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. *Chem. Biol.* 10, 541-549.

SPYROU, G., HAGGARD-LJUNGQUIST, E., KROOK, M., JORNvall, H., NILSSON, E. & REICHARD, P. (1991): Characterization of the flavin reductase gene (*fre*) of *Escherichia coli* and construction of a plasmid for overproduction of the enzyme. *J. Bacteriol.* 173, 3673-3679.

STROHL, W. R. (1992): Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 20, 961-974.

SUNDARAMOORTHY, M., TERNER, J. & POULOS, T. L. (1998): Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chem. Biol.* 5, 461-473.

TREFZER, A., PELZER, S., SCHIMANA, J., STOCKERT, S., BIHLMAIER, C., FIEDLER, H. P., WELZEL, K., VENDE, A. & BECHTHOLD, A. (2002): Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46, 1174-1182.

TSUJI, N., KAMIGAUCHI, T., KOBAYASHI, M. & TERUI, Y. (1988): New glycopeptide antibiotics: II. The isolation and structures of chloroorienticins. *J. Antibiot.* 41, 1506-1510.

VAN PÉE, K. H. & UNVERSUCHT, S. (2003): Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere* 52, 299-312.

VAN PÉE, K. H. (1996): Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 375-399.

VAN PÉE, K. H. (2001): Microbial biosynthesis of halometabolites. *Arch. Microbiol.* 175, 250-258.

VAN PÉE, K. H., KELLER, S., WAGE, T., WYNANDS, I., SCHNERR, H. & ZEHNER, S. (2000): Enzymatic halogenation catalyzed via a catalytic triad and by oxidoreductases. *Biol. Chem.* 381, 1-5.

VAN PÉE, K. H., SURY, G. & LINGENS, F. (1987): Purification and properties of a nonheme bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 368, 1225-1232.

VETTER, W., ALDER, L., KALLENBORN, R. & SCHLABACH, M. (2000): Determination of Q1, an unknown organochlorine contaminant, in human milk, Antarctic air, and further environmental samples. *Environ. Pollut.* 110, 401-409.

VILTER, H. (1984): Peroxidases from Phaeophyceae: a vanadium (V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 23, 1387-1390.

WAKSMAN, S. A. & HENRICI, A. T. (1943): The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 46, 337-341.

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.

WIESNER, W., VAN PÉE, K. H. & LINGENS, F. (1988): Purification and characterization of a novel bacterial non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrocinia*. *J. Biol. Chem.* 263, 13725-13732.

WILLIAMS D. H. (1996): The glycopeptide story - how to kill the deadly „superbugs“. *Nat. Prod. Rep.* 13, 469-477.

WITTSIEPE, J., KULLMANN, Y., SCHREY, P., SELENKA, F. & WILHELM, M. (2000): Myeloperoxidase-catalyzed formation of PCDD/F from chlorophenols. *Chemosphere* 40, 963-968.

WUOSMAA, A. M. & HAGER, L. P. (1990): Methyl chloride transferase: a carbocation route for biosynthesis of halometabolites. *Science* 249, 160-162.

WYNANDS, I. & VAN PÉE, K. H. (2004): A novel halogenase gene from the pentachloropseudilin producer *Actinoplanes* sp. ATCC 33002 and detection of *in vitro* halogenase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 363-367.

XU, Z., JAKOBI, K., WELZEL, K. & HERTWECK, C. (2005): Biosynthesis of the antitumor agent chartreusin involves the oxidative rearrangement of an anthracyclic polyketide. *Chem. Biol.* 12, 579-588.

YEH, E., GARNEAU, S. & WALSH, C. T. (2005): Robust *in vitro* activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3960-3965.

ZAZOPOULOS, E., HUANG, K., STAFFA, A., LIU, W., BACHMANN, B. O., NONAKA, K., AHLERT, J., THORSON, J. S., SHEN, B. & FARNET C. M. (2003): A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nat. Biotechnol.* 21, 187-190.

ZECHEL, D. L., REID, S. P., NASHIRU, O., MAYER, C., STOLL, D., JAKEMAN, D. L., WARREN, R. A. & WITHERS, S. G. (2001): Enzymatic synthesis of carbon-fluorine bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 4350-4351.

ZEHNER, S., KOTZSCH, A., BISTER, B., SÜSSMUTH, R. D., MENDEZ, C., SALAS, J. A. & VAN PÉE, K. H. (2005): A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005. *Chem. Biol.* 12, 445-452.

ZOPF, W. (1904): Zur Kenntnis der Flechtenstoffe. *Liebigs Ann. Chem.* 336, 46-85.

## PUBLIKATIONEN

HORNUNG, A., BERTAZZO, M., DZIARNOWSKI, A., SCHNEIDER, K., WELZEL, K., WOHLERT, S. E., HOLZENKÄMPFER, M., SÜSSMUTH, R. D., BECHTHOLD, A., PELZER, S. & VENDE, A. (2005): A genetic approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources (*in Vorbereitung*).

\*HORNUNG, A., \*DZIARNOWSKI, A., \*BERTAZZO, M., BAUER, U., SÜSSMUTH, R. D., BECHTHOLD, A., VENDE, A. & PELZER, S. (2005): Combinatorial biosynthesis with halogenase genes for the generation of balhimycin- and A47934 derivatives. \*These authors contributed equally to this work (*in Vorbereitung*).

LOPEZ, P., WEBER, T., HORNUNG, A., PELZER, S., WELZEL, K. & WOHLLEBEN, W. (2005): Lysolipin biosynthesis in *Streptomyces tendae* Tü4042: cloning, analysis and heterologous expression of the gene cluster (*in Vorbereitung*).

HORNUNG, A. (2005): Biochemische Untersuchungen des Moduls 6 der 6-Desoxyerythronolid-B-Synthase. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin 44*, (*angenommen*).

HANS, M., HORNUNG, A., DZIARNOWSKI, A., CANE, D. E. & KHOSLA, C. (2003): Mechanistic analysis of acyl transferase domain exchange in polyketide synthase modules. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 5366-5374.

## VORTRÄGE

HORNUNG, A. (2005): Genetic screening for halogenases and their use for GPA combinatorial biosynthesis. "COMBIG-TOP" Meeting, TU Berlin, 10.-12. Juli 2005, Berlin.

PELZER, S., DZIARNOWSKI, A., HORNUNG, A., VENDE, A. & WOHLERT, S. E. (2005): Drug development by genome-based technologies. *BioPerspectives 2005*, 10.-12. Mai 2005, Wiesbaden.

LOPEZ, P., WELZEL, K., HORNUNG, A. & WOHLLEBEN, W. (2004): Characterization of the putative lysolipin biosynthetic gene cluster. "International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Compounds" (VAAM), 26.-28. September 2004, Jena.

PELZER, S., DZIARNOWSKI, A., HORNUNG, A., VENDE, A. & WOHLERT, S. E. (2004): Expanding Nature's Diversity: Novel Natural Compounds by Combinatorial Biosynthesis and Genome Mining. *BioPerspectives 2004*, 4.-6. Mai 2004, Wiesbaden.

HORNUNG, A. (2004): Biochemische Untersuchungen des Moduls 6 der 6-Desoxyerythronolid-B-Synthase. *Jahrestagung der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin*, 20. Januar 2004, Berlin.

## PATENTE

10 2004 047 269.6: Neue Lysolipin Biosyntheseegencluster.

## POSTER

HORNUNG, A., FISCHER, C., WOHLERT, S. E., BECHTHOLD, A., PELZER S. & VENDE A. (2005): Transposon mediated lead derivatization: A tool to generate novel lead analogs. *“International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Compounds” (VAAM), 7.-9. Oktober 2005, Dresden.*

\*DZIARNOWSKI, A., \*HORNUNG, A., \*BAUER, U., \*BERTAZZO, M., SÜSSMUTH, R., WOHLLEBEN, W., BECHTHOLD, A., VENDE A. & PELZER, S. (2005): Combinatorial biosynthesis on A47934 using glycosyltransferases and halogenases. \*These authors contributed equally to this work. *“International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Compounds” (VAAM), 7.-9. Oktober 2005, Dresden.*

UNSIN, C., LOPEZ, P., WEBER, T., HORNUNG, A., PELZER, S. & WOHLLEBEN, W. (2005): Investigations on the polyketide antibiotic lysolipin. *“International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Compounds” (VAAM), 7.-9. Oktober 2005, Dresden.*

HORNUNG, A., DZIARNOWSKI, A., BERTAZZO, M., SÜSSMUTH, R. D., BECHTHOLD, A., WOHLLEBEN, W., PELZER, S. & VENDE, A. (2005): “Genome mining” and combinatorial biosynthesis with halogenases. *BioPerspectives 2005, 10.-12. Mai 2005, Wiesbaden.*

LOPEZ, P., WELZEL, K., HORNUNG, A. & WOHLLEBEN, W. (2005): Characterization of the biosynthetic gene cluster of the pradixanthone lysolipin. *BioPerspectives 2005, 10.-12. Mai 2005, Wiesbaden.*

HORNUNG, A., WELZEL, K., WOHLERT, S. E., HOLZENKÄMPFER, M., BECHTHOLD, A., PELZER, S. & VENDE, A. (2004): “Genome Mining”: A strategy to identify novel halogenated natural compounds. *“International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Compounds” (VAAM), 26.-28. September 2004, Jena.*

HANS, M., HORNUNG, A., DZIARNOWSKI, A. & KHOSLA, C. (2002): Investigations on engineered polyketide synthase modules: Tools for the biosynthesis of “unnatural” natural products. *Annual meeting of the German microbiologist association (VAAM), 24.-27. März 2002, Göttingen.*

## PREISE

KATHARINA-HEINROTH-PREIS (2004): Verliehen von der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin für herausragende naturwissenschaftliche Diplomarbeiten. *Jahrestagung der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin, 20. Januar 2004, Berlin.*

## CURRICULUM VITAE – DIPL.-ING. ANDREAS HORNING

### PERSONALIEN

18.06.1974 geboren in Berlin

### SCHULAUSSBILDUNG

1980 – 1985 Bruno-H.-Bürgel-Grundschule, Berlin

1985 – 1993 Georg-Büchner-Oberschule, Berlin (Abitur: Juni 1993)

### WEHRDIENST

1993 – 1994 Sanitäter, Hamburg und Eggesin

### HOCHSCHULAUSSBILDUNG

10/1994 – 11/2001 Studium der Biotechnologie an der TU Berlin

06/1997 Vordiplom

01/1998 – 09/2000 Tutor am Fachgebiet Mikrobiologie und Genetik (Prof. Ulf Stahl), TU Berlin

10/1998 – 01/1999 Studienarbeit bei der Schering AG, Berlin

*Titel: Klonierung der katalytischen Domäne von Fused aus dem humanen Hedgehog-Signalweg*

Betreuer: PD Dr. Hans von Döhren, TU Berlin

02/2001 – 11/2001 Diplomarbeit an der Stanford University (Department of Chemical Engineering, Prof. Chaitan Khosla), Kalifornien, USA

*Titel: Einflüsse des Acyltransferase-Domänen austausches auf Aktivität und Stabilität des Moduls 6 der 6-Desoxyerythronolid-B-Synthase*

Betreuer: PD Dr. Hans von Döhren, TU Berlin

11/2001 Abschluss: Dipl.-Ing. der Biotechnologie (Studienrichtung: Medizinische Biotechnologie)

Gesamturteil: „Mit Auszeichnung“

### BERUFSPRAXIS

11/2001 – 12/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Combinature Biopharm AG, Berlin

01/2003 – 06/2005 Doktorand, Combinature Biopharm AG

Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der universitären Betreuung von Prof. Andreas Bechthold, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie des Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

*Titel: Halogenasen aus Actinomyceten: Funktionelle und phylogenetische Studien*

Betreuer: Dr. Andreas Vente, Combinature Biopharm AG

03/2005 – heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Combinature Biopharm AG