

**Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen zur
Tryptophan-5-Halogenase aus der Biosynthese von
Pyrroindomycin B in *Streptomyces rugosporus***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin Susanne Zehner

geboren am 19. Januar 1975 in Suhl

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz van Pée
Prof. Dr. rer. nat. Lutz Heide
Prof. Dr. rer. nat. Michael Göttfert

Eingereicht am: 21. August 2003
Tag der Verteidigung: 10. Dezember 2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Technischen Universität Dresden unter der Anleitung von Prof. Dr. K.-H. van Pée im Zeitraum von 1998-2002 angefertigt.

Ich möchte allen Personen danken, die auf die eine oder andere Weise das Gelingen und den Abschluss dieser Dissertation ermöglicht haben.

Ich danke der Max-Buchner-Forschungstiftung, dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), dem Graduiertenkolleg „Struktur-Eigenschafts-Beziehungen bei Heterozyklen“, dem Fond der chemischen Industrie und dem Sächsische Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft für die finanzielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. K.-H. van Pée danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe, seine fachliche Unterstützung, die Freiheit aus meinen Fehlern zu lernen, sowie seine Geduld und Diskussionsbereitschaft. Ich möchte mich ausdrücklich für die Ermöglichung meiner Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen, Workshops und Symposien bedanken.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. J. A. Salas für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Gewährung eines sechsmonatigen Forschungsaufenthaltes in seinen Labors an der Universität in Oviedo/Spainien. Prof. Dr. J. A. Salas und Prof. Dr. C. Méndez bin ich für wissenschaftliche Anregungen und Unterstützung sehr dankbar.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. L. Heide für die Gespräche, Anregungen und Ratschläge.

Vielen Dank an Dr. Stefan Pelzer für die praktischen Tipps und Hinweise.

Mein besonderer Dank für die HPLC/MS-Analysen gilt B. Bister und Dr. R. Süßmuth aus dem Institut für Organische Chemie (Prof. Jung) der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen.

Dr. A. Braña (Universität Oviedo) danke ich für die HPLC-Analysen der *S. albus* Extrakte.

Dr. U. Schwarzenbolz (TU Dresden, Institut für Lebensmittelchemie) und Dr. H. Kroschwitz (TU Dresden, Institut für organische Chemie) danke ich für weitere HPLC/MS-Analysen.

In Dresden danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter des Instituts für Biochemie für die freundliche Aufnahme, die Hilfe und Unterstützung während der gesamten Dauer meiner Arbeit. Dank an Ina, Sandra, Sabine, Frank, Thomas, Susanne H., Karin, Christel, MaFi, Tobi, Sascha, Suse, Moni, Helge, Corina, Elke, Andrea, Sri, Silvana, Claudia, Katja, Alex, Gerhard, Markus, Yvonne, Anke A., Anke M., Alex K. und Wassily.

Suse und Tobi danke ich besonders für die Anleitung bei der Arbeit mit Proteinen.

Ich danke den technischen Angestellten des Instituts und der Werkstatt, den Forschungspraktikanten und HiWis für ihre Unterstützung.

Meinen Laborkolleginnen Corina, Elke, Ina und Sri danke ich vor allem für das freundliche Klima. Corina danke ich für ihre Teilnahme an meinen Erfolgen und die Motivation in schwierigen Phasen der Arbeit.

Alexander Kotzsch danke ich für die Fortsetzung der Untersuchungen zur Tryptophan-5-Halogenase im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Frau Schmidt danke ich für die vielfache Hilfe in bürokratischen Dingen.

Alex, Andrea, Corina und Tobi vielen Dank für die Durchsicht des Manuskripts.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Dr. Salas in Oviedo herzlichen Dank:

Gracias a todos los compañeros del laboratorio de Oviedo: Carlos, César, Ana, Rebeca y Tino, por su bienvenida en el „quinto“ y su amable presencia. Ana, Felipe, Leticia, David, Carlos, César, Luz Elena, Gloria, Nuria, Nerea, Eugenio, Carmela, María, Lorena, Macarena, Quinanen, Sonia, Aaroa, Santi, Álvaro, Fran, Isa, Miriam, Ismael, Gloria y Rosa, por hacer mi estancia en Oviedo más bonita e inolvidable.

A César por su ayuda y apoyo, y sobre todo, por su categoría humana y científica que me han impresionado. A Luz Elena y Eugenio por su interés por mi trabajo, por sus instrucciones y ánimos. A Carmen y Salas por su ayuda y consejos. A Alfredo por su sonrisa y su ayuda desinteresada.

Vielen Dank an Prof. Dr. M. Göttfert, dass ich die Zeit bekommen habe, diese Arbeit zu beenden.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während meines Studiums und der Promotion. Ihre Liebe und ihr Vertrauen zu mir waren stets eine Ermutigung. Vielen Dank an meine Schwestern Beate mit Familie und Katharina, an Tante Gisela, meine Verwandten und Freunde für die Motivation und ihr Interesse.

Meinen Freunden: Alex, Kathrin, Kai und Anja danke ich für ihre Freundschaft, ihre Motivation und Ablenkung.

A Eugenio, gracias por estar siempre ahí, por animarme y confiar en mi en todo momento. Por entenderme, por escucharme, por enseñarme, por « ser tan viejo!!! », por tu larga espera, gracias por todo y por mucho más.

Abkürzungen

®	geschütztes Warenzeichen
5-Br-Trp	5-Bromtryptophan
7-Cl-Trp	7-Chlortryptophan
A	Adenosin
A	Absorption
aa	Aminosäure(n), engl. <i>amino acids</i>
<i>aac3IV</i>	Gen der Apramycinacetyltransferase
Abb	Abbildung
ACP	<i>acyl carrier protein</i>
ALF	<i>automated laser fluorescence</i>
Amp	Ampicillin
Apr	Apramycin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	Acyltransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Burkholderia</i>
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
C	Cytidin
c_0	Ausgangskonzentration
CDP-Star®	Dinatrium 2-chlor-5-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chlor)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl)-1-phenyl phosphat
c_E	Endkonzentration
CIAP	alkalische Phosphatase, engl. <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
Cml	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
CPO	Chlorperoxidase
d	Tag(e)
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
dATP, dADP	Desoxyadenosintriphosphat, Desoxyadenosindiphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP, dCDP	Desoxycytidintriphosphat, Desoxycytidindiphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP, dGDP	Desoxyguanosintriphosphat, Desoxyguanosindiphosphat
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNDP	Desoxynukleotiddiphosphat(e), synonym für dADP, dCDP, dGDP, dTDP
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat(e), synonym für dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP, dTDP	Desoxythymidintriphosphat, Desoxythymidindiphosphat
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL-F	Eckardt-Lyse-Ficoll
engl.	aus dem Englischen
ET, ETCl, ETBr	Enzymtest, Enzymtest mit Chlorid, Enzymtest mit Bromid

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAD, FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADHOOH	Flavin-Adenin-Dinukleotid-Hydroperoxid
Fre	NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase aus <i>E. coli</i>
G	Guanosin
GC	Guanosin/Cytidin
GDH	dNDP-Glucosedehydratase
GTF	Glycosyltransferase
GYT	Glycerin-Hefe-Trypton-(Medium)
h	Stunde(n)
Hal	Halogenase
HNB	Hefenährboullion
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KPP	Kaliumphosphatpuffer
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
LB	Luria-Bertani-(Medium)
<i>M.</i>	<i>Myxococcus</i>
MCAP	Monodechloraminopyrrolnitrin
MCAP-3-Hal	Monodechloraminopyrrolnitrin-3-Halogenase
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MeOH	Methanol
MOPS	γ-Morpholinpropansulfonsäure
MS	Massenspektroskopie
MS	Mannit-Sojamehl-(Medium)
mut	Mutante
M _w	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
NAD ⁺ , NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziertes NAD ⁺
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NMR	kernmagnetische Resonanz engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen engl. <i>open reading frame</i>
P	Promotor
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PKS	Polyketidsynthase
PMM	<i>Pseudomonas</i> Minimal-(Medium)
PMP/PLP	Pyridoxaminphosphat/Pyridoxalphosphat
PP	Polypropylen
PrnA	Tryptophan-7-Halogenase
PrnC	Monodechloraminopyrrolnitrin-3-Halogenase
PVDF	Polyvinylidenfluorid

PyrH	Tryptophan-5-Halogenase aus <i>S. rugosporus</i>
<i>pyrH</i>	Tryptophan-5-Halogenase-Gen aus <i>S. rugosporus</i>
R	Resistenz
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonucleinsäure engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease
RP	engl. <i>reversed phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rotations per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	sensitiv
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
SSC	engl. <i>standard sodium citrat</i>
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TD-PCR	<i>touch-down-PCR</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	N-Tris-[hydroxymethyl]-methyl-2-aminomethansulfonsäure
<i>tet</i>	Gen vermittelt die Tetracyclinresistenz
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
T _H	Hybridisierungstemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp-5-Hal	Tryptophan-5-Halogenase
Trp-7-Hal	Tryptophan-7-Halogenase
T _S	Temperatur der Stringenzwaschschritte
<i>tsr</i>	Gen vermittelt die Thiostreptonresistenz
Tsr	Thiostrepton
Tween®	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
U	SI-Einheit der Enzymaktivität, engl. <i>units</i>
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V.	Version
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Halogenierte organische Verbindungen in der Natur	1
1.2	Bakterielle Halometaboliten	6
1.3	Enzymatische Halogenierung	10
1.3.1	Haloperoxidasen	11
1.3.2	Radikalische Halogenierung	12
1.3.3	S-Adenosylmethionin-Transferasen	13
1.3.4	Fluorierung.....	13
1.3.5	FADH ₂ -abhängige Halogenasen.....	14
1.4	Molekulargenetik der FADH ₂ -abhängigen Halogenasen.....	16
1.5	Biosynthesen von Halometaboliten	21
1.6	Die Pyrroindomycine	21
1.7	Aufgabenstellung	24
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Geräte und Materialien	25
2.2	Chemikalien und Enzyme	27
2.3	Mikroorganismen und Vektoren.....	30
2.4	Medien und Kulturbedingungen	32
2.4.1	Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>Pseudomonas</i> sp.	32
2.4.2	Medien für die Kultivierung von <i>Streptomyces</i> sp.	33
2.4.3	Antibiotika und Mediensupplemente.....	35
2.4.4	Stammhaltung.....	35
2.4.4.1	Zellsuspensionen in Glycerin für <i>E. coli</i> und <i>Pseudomonas</i> sp.	35
2.4.4.2	Streptomyceten Sporensuspension.....	35
2.4.5	Kultivierung.....	36
2.4.5.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>Pseudomonas</i> sp.	36
2.4.5.2	Kultivierung von <i>Streptomyces</i> sp.	36
2.5	Puffer, Lösungen und Reagenzien für molekulargenetische Arbeiten	36
2.5.1	Allgemein verwendete Lösungen	36
2.5.2	Lösungen für die DNA-Isolierung.....	37
2.5.3	Agarosegelelektrophorese.....	38
2.5.4	Lösungen für DNA-Blot und Hybridisierung.....	38
2.6	Organische Lösungen	40
2.7	Puffer, Lösungen und Reagenzien für biochemische Arbeiten	40
2.7.1	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	40
2.7.2	Puffer für den Western-Blot	41
2.7.3	Coomassie-Färbung	41
2.7.4	Immunodetektion und Detektionsreagenzien	42
2.7.5	<i>Metal-Chelating</i> -Chromatographie.....	43
2.7.6	Stammlösungen für den Aktivitätstest.....	43
2.8	Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i>	44
2.8.1	Plasmidisolierung durch alkalische Lyse.....	44
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA zur Sequenzierung	44
2.8.3	Alkalische Lyse nach KIESER	45
2.9	Isolierung von Gesamt-DNA.....	45
2.9.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Streptomyces rugosporus</i>	45
2.9.2	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Pseudomonas</i> sp.	46

2.10	Reinigung und Analyse von DNA	46
2.10.1	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen.....	46
2.10.2	Fällung von DNA	47
2.10.3	Bestimmung der Reinheit und der Konzentration von DNA	47
2.10.4	Agarosegelelektrophorese	47
2.10.5	Extraktion von DNA aus Gelen mit Säulen	48
2.10.6	Elution von DNA nach der <i>freeze-squeeze</i> -Methode	48
2.11	In vitro-Rekombination von DNA	49
2.11.1	Enzymatische Restriktionsspaltung von DNA	49
2.11.2	Auffüllreaktionen	49
2.11.3	Dephosphorylierung von 5'-Enden	50
2.11.4	Ligation	50
2.12	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	51
2.12.1	Herstellung elektrokompeter Zellen von <i>E. coli</i>	51
2.12.2	Elektroporation von <i>E. coli</i>	51
2.12.3	Präparation von Zellen zur Transfektion mit λ - Phagen	52
2.12.4	Transfektion von <i>E. coli</i> mit λ -Phagen (Cosmidtitering).....	52
2.13	Transformation von <i>Pseudomonas sp.</i>	52
2.14	Transformation von <i>Streptomyces albus</i>	53
2.14.1	Präparation von Protoplasten.....	53
2.14.2	Transformation von Protoplasten	54
2.15	Transformation von <i>Streptomyces rugosporus</i>	54
2.16	Analyse von Klonen/Screening nach positiven Klonen	54
2.16.1	Eckhardt-Lyse-Gele.....	54
2.17	Polymerasekettenreaktion	55
2.17.1	PCR für dNDP-4,6-Glucosedehydratase-Gene	56
2.17.2	PCR für Typ I-Polyketidsynthase-Gene.....	56
2.17.3	PCR für Halogenasegene.....	57
2.17.3.1	trpst-Primer.....	57
2.17.3.2	SZ002-SZ005-Primer	57
2.17.4	PCR für Glykosyltransferasegene	57
2.17.5	PCR für das Screening von Subklonen und die Herstellung von Sonden.....	58
2.17.6	PCR für die Expression des Halogenase-Gens.....	58
2.17.7	Amplifizierung von DNA aus <i>Streptomyces</i> -Sporen	59
2.18	DNA-Hybridisierung	59
2.18.1	Transfer von DNA auf Nylonmembranen (SOUTHERN Blot).....	59
2.18.2	Transfer von Zellen auf Membranen (Kolonieblot)	60
2.18.3	Markierung der Sonden.....	61
2.18.4	Prähybridisierung	61
2.18.5	Hybridisierungsreaktion und Stringenzwaschschritte	62
2.18.6	Detektion	62
2.18.7	Rehybridisierung	62
2.19	Konstruktion einer Cosmidgenbank	63
2.19.1	Präparation der Cosmidarme	63
2.19.2	Präparation der Gesamt-DNA aus <i>Streptomyces rugosporus</i>	63
2.19.3	Konstruktion der Cosmide.....	63
2.19.4	Screening der Cosmidgenbank.....	64
2.20	Sequenzierung	65
2.20.1	Sequenzanalyse	65

2.21	Einführung einer Mutation in <i>Streptomyces rugosporus</i>	65
2.21.1	Konstruktion des Mutationsplasmids	66
2.21.2	Selektion auf <i>double-crossover</i> Mutanten	69
2.21.2.1	Ermöglichung eines zweiten Rekombinationsereignisses	69
2.22	Untersuchung von Metaboliten aus <i>Streptomyces sp.</i>	69
2.22.1	Isolierung von Metaboliten aus <i>Streptomyces rugosporus</i>	69
2.22.2	Analyse von Metaboliten aus <i>Streptomyces rugosporus</i>	70
2.22.3	Isolierung von Metaboliten aus <i>Streptomyces albus</i>	71
2.22.4	Analyse von Metaboliten aus <i>Streptomyces albus</i>	71
2.23	Expression des Halogenasegens in <i>Pseudomonas sp.</i>	72
2.23.1	Konstruktion der Expressionsstämme	72
2.23.2	Screening auf Expression	72
2.24	Fütterung und Komplementationsversuche	72
2.24.1	Fütterung mit L-Tryptophan	72
2.24.2	Komplementationsversuch	73
2.25	Zellzüchtung, Zellaufschluss und Enzymanreicherung	73
2.25.1	Zellzüchtung	73
2.25.2	Zellernte	73
2.25.3	Zellaufschluss zur Analyse des löslichen Proteins (Kugelmühlaufschluss)	74
2.25.4	Zellaufschluss für Enzymtests (Ultraschall)	74
2.25.5	Gewinnung des Rohextraktes aus <i>E. coli</i>	74
2.25.6	Dialyse	74
2.25.7	Photometrische Proteinbestimmung	75
2.25.8	Konzentrierung von Proteinlösungen	75
2.25.9	<i>Metal-Chelating</i> -Chromatographie	75
2.26	Proteinanalytik	76
2.26.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	76
2.26.1.1	Herstellung und Zusammensetzung der Gele nach LAEMMLI (1970)	76
2.26.1.2	Probenaufbereitung:	77
2.26.1.3	Elektrophorese	77
2.26.1.4	Coomassie- Proteinfärbung	77
2.26.2	Western-Blot	78
2.26.3	Immunodetektion	78
2.26.3.1	Detektion des Antikörpers	78
2.27	Aktivitätstests	79
2.27.1	Bestimmung der Enzymaktivität der Flavinreduktase Fre aus <i>E. coli</i>	79
2.27.2	Enzymtest zum Nachweis der Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase	79
2.27.3	Analyse der Enzymtests mittels HPLC	80
2.27.4	Identifizierung der Reaktionsprodukte mittels HPLC/MS	80
2.27.5	Bestimmung der Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase	80
3	ERGEBNISSE	83
3.1	Hybridisierung von Gesamt-DNA aus <i>Streptomyces rugosporus</i>	83
3.1.1	Hybridisierung mit <i>prnA</i> aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> BL915	83
3.1.2	Hybridisierung mit einem Fragment des Tryptophan-6-Halogenase-Gens aus <i>Streptomyces albogriseolus</i>	84
3.2	Biosynthesemodell für Pyrroindomycin B	85
3.2.1	Modell für die Bildung der modifizierten Kohlenhydrate	85
3.2.2	Modell für die Biosynthese des chlorierten Indolpyrrolringes	87
3.2.3	Modell für die Biosynthese des polyketidischen Makrozyklus	88

3.3	PCR mit degenerierten Primern mit Gesamt-DNA aus <i>S. rugosporus</i>	90
3.3.1	Amplifizierung mit degenerierten Primern für dNTP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gene	90
3.3.2	Amplifizierung mit degenerierten Primern für Polyketidsynthase-Gene	91
3.3.3	Amplifizierung mit degenerierten Primern für Glycosyltransferase-Gene	92
3.3.4	PCR zur Detektion eines Tryptophanhalogenase-Gens	92
3.3.4.1	Amplifizierung mit den Oligonukleotiden trpst+/trpst-.....	92
3.3.4.2	Design von degenerierten Oligonukleotiden für Tryptophanhalogenase-Gene	92
3.3.4.3	Amplifizierung mit degenerierten Primern für Tryptophanhalogenase-Gene	95
3.4	Sequenzen der PCR-Amplifikate	97
3.4.1	Amplifikat für ein dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Genfragment	97
3.4.2	Amplifikate für Polyketidsynthase-Genfragmente.....	98
3.4.3	Amplifikat für ein Glycosyltransferase-Genfragment.....	99
3.4.4	Amplifikat für ein Tryptophanhalogenase-Genfragment	99
3.5	Anlage einer Cosmidgenbank von <i>Streptomyces rugosporus</i>	100
3.5.1	Screening der Cosmidgenbank	100
3.5.1.1	Analyse der Cosmidgenbank mit der homologen Sonde „PCR-GDH“	101
3.5.1.2	Analyse der Cosmidgenbank mit der homologen Sonde „PCR-PKS“	102
3.5.1.3	Analyse der Cosmidgenbank mit der homologen Sonde „PCR-Hal“	103
3.5.2	Analyse der positiven Cosmide	104
3.5.2.1	Hybridisierungsanalysen und PCR.....	104
3.5.2.2	Restriktionsanalyse.....	106
3.5.2.3	Partielle Restriktionskarte und Überlappung der Cosmide	106
3.6	Subklonierungen und Sequenzierungen	108
3.6.1	Subklone aus PKS-positiven Cosmiden	108
3.6.2	Subklone aus dem GDH-positiven Cosmid 26D4.....	108
3.6.3	Subklone aus dem Halogenase-positiven Cosmid 12D4.....	109
3.6.4	Subklone aus dem Halogenase-positiven Cosmid 6C1	110
3.7	Sequenzanalyse	110
3.7.1	Nukleotidsequenz des potenziellen Tryptophan-5-Halogenase-Gens <i>pyrH</i> ..	110
3.7.1.1	GC-Gehalt und <i>codon usage</i>	112
3.7.2	Aminosäuresequenz der potenziellen Tryptophan-5-Halogenase <i>PyrH</i>	114
3.7.3	Sequenzvergleiche der potenziellen Tryptophan-5-Halogenase	115
3.8	Expression des Cosmids 12D4 in <i>Streptomyces albus</i>	120
3.9	Genetische Inaktivierung der Tryptophan-5-Halogenase	121
3.9.1	Untersuchungen zur genetischen Modifizierbarkeit von <i>Streptomyces rugosporus</i>	121
3.9.2	<i>Gene-replacement</i> des Tryptophan-5-Halogenase-Gens <i>pyrH</i>	121
3.9.3	Genetischer Nachweis der Mutation	121
3.9.4	Auswirkung der Inaktivierung auf die Sekundärstoffproduktion.....	124
3.10	Expression des Tryptophan-5-Halogenase-Gens <i>pyrH</i>	126
3.10.1	Klonierung in den Expressionsvektor pCIBhis	126
3.10.2	Überexpression des Tryptophan-5-Halogenase-Gens in <i>Pseudomonas fluorescens</i> BL915 ΔORF1	126
3.10.3	Nachweis der Expression durch Western Blot	127
3.11	Nachweis der Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase	128
3.11.1	Nachweis der halogenierenden Aktivität <i>in vivo</i>	128
3.11.2	Komplementationsversuche mit der Pyrrolnitrinbiosynthese	131
3.11.3	Nachweis der halogenierenden Aktivität <i>in vitro</i>	131
3.11.3.1	Identifizierung der Reaktionsprodukte mittels HPLC/MS	133
3.11.3.2	Bestimmung der Enzymaktivität im Rohextrakt	135
3.11.3.3	Einfluss der NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase (Fre) auf die Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase	135

3.12	Anreicherung der Tryptophan-5-Halogenase	136
3.12.1	<i>Metal-Chelating</i> -Chromatographie.....	136
3.12.2	Aktivitätstest mit angereicherter Tryptophan-5-Halogenase	138
4	DISKUSSION	139
4.1	Nachweis eines Tryptophan-5-Halogenase-Gens aus	139
	<i>Streptomyces rugosporus</i>	
4.2	Nachweis des Biosyntheseclusters der Pyrroindomycine in	141
	<i>Streptomyces rugosporus</i>	
4.3	Sequenzanalyse des Tryptophan-5-Halogenase-Gens <i>pyrH</i>.....	153
4.3.1	Ribosomenbindestelle, Translationsstart und Translationsstop.....	153
4.3.2	GC-Gehalt und <i>codon usage</i>	155
4.3.3	Aminosäuresequenz der Tryptophan-5-Halogenase PyrH	155
4.3.4	Sequenzvergleiche mit der Tryptophan-5-Halogenase PyrH	156
4.4	Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase PyrH	158
4.4.1	Expression der Tryptophan-5-Halogenase PyrH	158
4.4.2	Fütterungsversuch.....	159
4.4.3	Metabolisierung von 5-substituierten Tryptophanen.....	160
4.4.4	Nachweis der Aktivität <i>in vitro</i>	162
4.5	Ausblick	167
5	ZUSAMMENFASSUNG	169
6	LITERATUR.....	171
7	ANHANG.....	1

1 Einleitung

1.1 Halogenierte organische Verbindungen in der Natur

Es wird oft behauptet, dass organische Halogenverbindungen erst durch den Menschen in die Umwelt gelangt sind. Organische Halogenverbindungen existieren aber schon seit Urzeiten in dieser Welt. Auf der Erde wurden bereits vor der Entwicklung höherer Lebewesen organische Halogenverbindungen z.B. bei vulkanischer Tätigkeit oder durch thermische Prozesse gebildet [GRIBBLE, 1998]. Aber auch Lebewesen sind in der Lage organische Halogenverbindungen zu bilden.

Die Biogenese von Halometaboliten durch lebende Organismen wurde lange Zeit als selten und ungewöhnlich betrachtet [VAN PÉE, 1996]. Die Bildung von organischen Halogenverbindungen ist in der Natur jedoch weit verbreitet. Es sind nahezu aus jeder Klasse der Naturstoffe halogenierte Beispiele bekannt [GRIBBLE, 1998]. Ein bedeutender Teil der natürlichen Halogenverbindungen wird von marinen Organismen gebildet. Vor allem Bromverbindungen wurden aus marinen Lebewesen isoliert. Von terrestrischen Organismen werden überwiegend chlorierte Verbindungen produziert. Es wurden auch natürliche fluor- und iodhaltige Verbindungen entdeckt, jedoch sind diese viel seltener [VAN PÉE, 1996].

Als einer der ersten halogenierten Metaboliten wurde 3,5-Diiodyrosin aus der Koralle *Gorgonia cavolinii* [DRECHSEL, 1896] am Ende des 19. Jahrhundert identifiziert. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts gelang es FRIEDLÄNDER (1909) die chemische Struktur des Tyrischen Purpurs zu bestimmen. Die kostbaren Farbstoffe, die in der Antike aus Meeresschnecken der Gattungen *Murex*, *Thais* und *Ocenabra* gewonnen wurden, bestehen u.a. aus 6,6'-Dibromindigo (Abb. 1.1). Als eines der ersten chlorierten Antibiotika wurde Griseofulvin 1939 von OXFORD *et al.* aus dem Pilz *Penicillium griseofulvum* isoliert (Abb. 1.1). Aus den Kulturen des Bodenbakteriums *Streptomyces venezuelae* isolierten EHRLICH *et al.* (1947) das hochwirksame Antibiotikum Chloramphenicol (damals noch Chloromycetin). Bereits ein Jahr später, 1948 wurde ein weiteres halogeniertes Antibiotikum, das Chlortetracyclin aus *Streptomyces aureofaciens*, von DUGGAR beschrieben (Abb. 1.1) [DUGGAR, 1948].

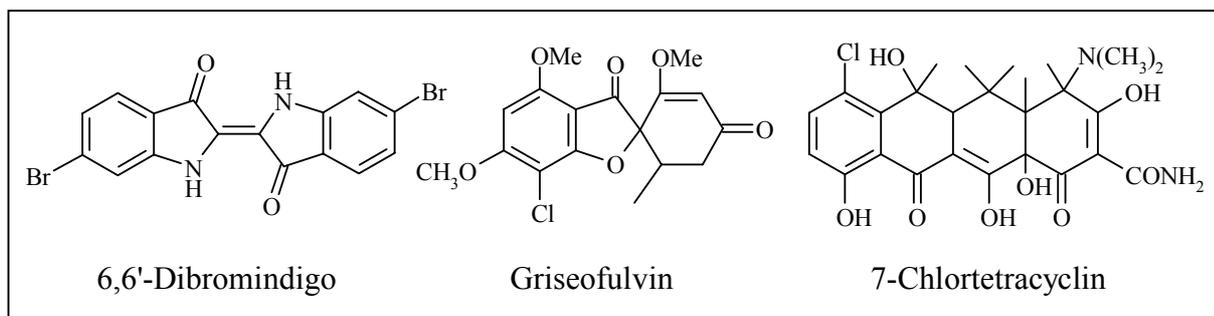


Abb. 1.1: Beispiele der ersten isolierten halogenierten Naturstoffe:

6,6-Dibromindigo aus *Murex*, *Thais* und *Ocenabra*

Griseofulvin aus *Penicillium griseofulvum*

7-Chlortetracyclin aus *Streptomyces aureofaciens*.

Bis 1961 wurden 29 halogenierte Naturstoffe identifiziert, darunter acht Verbindungen aus Bakterien [PETTY, 1961]. Durch empfindlichere Nachweismethoden wurden in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhundert eine Vielzahl neuer Verbindungen detektiert [GRIBBLE, 1998]. Vor allem die Suche nach Verbindungen mit biologischer Aktivität führte zur Entdeckung von immer mehr halogenierten Naturstoffen. Heute sind über 3000 organische Halometabolite aus Lebewesen bekannt [VAN PÉE, 2001].

Diese Verbindungen sind in ihren Strukturen und ihrer biologischen Wirkung sehr vielfältig. Die Halometaboliten werden von verschiedensten Organismen produziert. Von einigen Spezies mariner Algen werden bis zu 100 verschiedene kurzkettige halogenierte Kohlenwasserstoffe, darunter Bromoform, produziert [GRIBBLE, 1994; 1998]. Auch halogenierte Terpene wurden aus Algen beschrieben. Die Rotalge *Laurencia* bildet eine große Vielfalt komplexer halogenerter Verbindungen. Es wurden u.a. zyklische Ether, polybromierte Indole und Sesquiterpene, wie z.B. Elatol isoliert (Abb. 1.2) [SIMS, 1974; VAIRAPPAN *et al.*, 2001].

Cyanobakterien (auch als blaugrüne Algen bezeichnet) sind Produzenten biologisch meist hochaktiver Metaboliten. *Nostoc linckia* bildet toxische Chlorparacyclophane (Abb. 1.2) [CHEN *et al.*, 1991], die vor allem bei der Trinkwasserebereitung beachtet werden müssen [GRIBBLE, 1994]. *Fischerella ambigua* bildet Ambigol A, einen HIV-Reverse-Transkriptase-Inhibitor (Abb. 1.2) [FALCH *et al.*, 1993]. Aus *Kyrtuthrix maculans* wurden drei halogenierte Carbazole, zwei bromierte und eine iodierte Verbindung isoliert, deren Wirkung bisher noch nicht geklärt ist (Abb. 1.2) [LEE *et al.*, 1999].

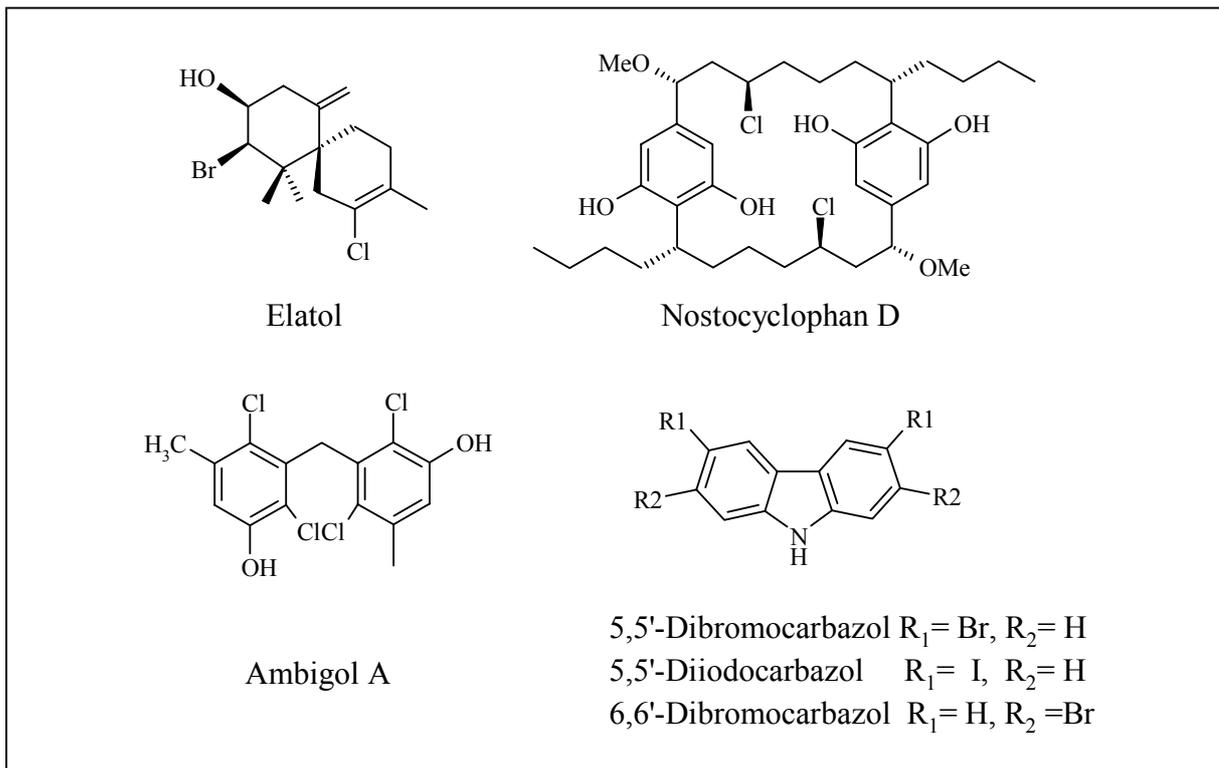


Abb. 1.2: Beispiele halogenerter Naturstoffe aus Algen und Cyanobakterien:

Elatol aus *Laurencia majuscula*

Nostocyclophan D aus *Nostoc linckia*

Ambigol A aus *Fischerella ambigua*

halogenierte Carbazole aus *Kyrtuthrix maculans*.

Marine Bryozoen finden seit der Entdeckung des stark antineoplastisch wirksamen Macrolids Bryostatin aus *Bugula neritina* besonderes Interesse in der Forschung [PETTIT, 1994; NARKOWICZ *et al.*, 2002]. Eine Spezies kann Quelle mehrerer komplexer, meist bromierter Strukturen mit hoher biologischer Aktivität sein. Aus *Amathia convoluta* wurden neben den unchlorierten Bryostatinen verschiedene chlorierte Verbindungen wie Amathamid G (Abb. 1.3), Convulotindol A und die Convulotamine isoliert [NARKOWICZ *et al.*, 2002]. Extrakte aus *A. convoluta* wurden auf nematozide Wirkung untersucht. Diese biologische Aktivität konnte den Verbindungen Convulotindol A und Convulotamin H zugeordnet werden. Aus *Securiflustra securifrons* wurden sieben chlorierte und bromierte Alkaloide, die Securamine, isoliert (Abb. 1.3) [RAHBÆK *et al.*, 1996; RAHBÆK & CHRISTOPHERSEN, 1997].

Aus Schwämmen und Korallen wurden besonders interessante Verbindungen isoliert. Die Verbindung Spongistatin 1 aus *Spongia* sp. ist heute eines der stärksten bekannten Cytostatika [PETTIT *et al.*, 1994]. Ähnliche Verbindungen, die Spongistatine 8 und 9, wurden aus dem marinen Schwamm *Spiraastrella spinispirulifera* isoliert [PETTIT *et al.*, 1994].

Aus der Koralle *Telesto riisei* wurden Prostanoid-Clavulone, die Punaglandine, isoliert [BAKER & SCHEUER, 1994]. Ähnliche Verbindungen sind die Chlorvulone, die in *Clavularia viridis* entdeckt wurden (Abb. 1.3) [IGUCHI *et al.*, 1985]. Diese Verbindungen sind aufgrund

ihrer Struktur analogie zu menschlichen Hormonen, den Prostaglandinen, interessant. Ihre biologische Wirkung ist sehr vielseitig. Sie weisen neben entzündungshemmender Wirkung auch antiproliferative und cytotoxische Wirkung auf [BAKER & SCHEUER, 1994; IGUCHI *et al.*, 1985].

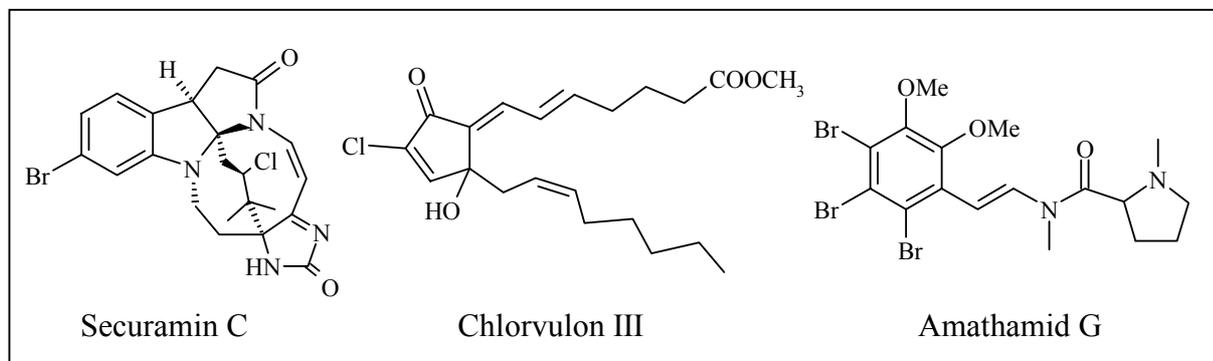


Abb. 1.3: Beispiele halogener Naturstoffe aus Bryozoen und Korallen:

Securamin C aus *Securiflustra securifrons*

Amathamid G aus *Amathia convoluta*

Chlorvulon III aus *Clavularia viridis*.

Aus Pilzen sind ebenfalls einige halogenierte Metaboliten bekannt. Der filamentöse Pilz *Aspergillus ochraceus* bildet Ochratoxin A, eine hochtoxische Verbindung (Abb. 1.4) [VAN DER MERWE *et al.*, 1965]. Die Kontamination von Getreide, vor allem Mais und Gerste, mit diesem Pilz kann beim Verzehr zu schweren Nierenschäden führen [BELITZ & GROSCH, 1992]. Die unhalogenierten Analoga Ochratoxin B und C sind im Test in 1000facher Konzentration dagegen nicht toxisch [VAN DER MERWE *et al.*, 1965].

Organische Fluorverbindungen sind im Gegensatz zu Brom- und Chlorverbindungen relativ selten in der Umwelt zu finden. Bisher wurden einzelne Mikroorganismen und einige Pflanzen als Quellen organischer Fluorverbindungen beschrieben. Aus Zellkulturen von *Acacia georginae* und *Thea sinensis* wurde Fluoracetat und Fluorcitrat isoliert [PETERS & SHORTHOUSE, 1972].

Die Bedeutung der Halometabolite für die produzierenden Organismen ist bisher nur in einigen wenigen Fällen bekannt. In *Dictyostelium discoideum* wirkt ein dichloriertes Hydroxyphenylhexanon als Signalsubstanz für die Zelldifferenzierung (Abb. 1.4) [KAY, 1998; GRIBBLE, 1998]. Aus Erbsenkeimlingen und weiteren Leguminosen wurde 4-Chlorindol-3-essigsäure isoliert (Abb. 1.4) [MARUMO *et al.*, 1968]. Es wurde festgestellt, dass diese Verbindung die Wirkung eines Pflanzenwachstumshormons besitzt [KATAYAMA, 2000].

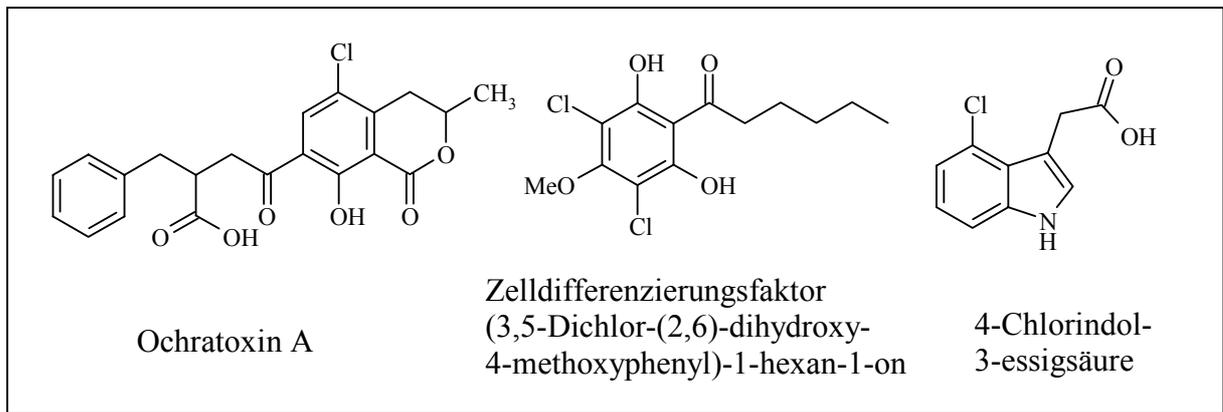


Abb. 1.4: Beispiele halogener Naturstoffe aus Pilzen, Amöben und Pflanzen:

Ochratoxin A aus *Aspergillus ochraceus*

Hydroxyphenylhexanon aus *Dictyostelium discoideum*

4-Chlor-3-indolessigsäure aus *Pisum sativum*.

Einige Insekten bilden halogenierte Metaboliten als Pheromone. Die Schabe *Blattella germanica* ist in der Lage, die halogenierten Steroide Blattellastanosid A und B zu bilden (Abb. 1.5) [SAKUMA & FUKAMI, 1993].

Auch in Säugetieren und im Menschen werden organische Halogenverbindungen gebildet. Die bekannteste Verbindung ist das Schilddrüsenhormon Thyroxin (Abb. 1.5). Eine überraschende Entdeckung war der Nachweis von endogenen Benzodiazepinen, darunter Diazepam (Valium), in Säugetieren und Menschen (Abb. 1.5) [SANGAMESWARAN *et al.*, 1985; SAND *et al.*, 2000]. Benzodiazepine sind als Substanzen mit Wirkung auf das zentrale Nervensystem bekannt, die auch medizinisch angewandt werden.

Der ecuadorianische Baumfrosch *Epipedobates tricolor* sekretiert Epibatidin, eine stark schmerzstillende Substanz (Abb. 1.5) [SPANDE, 1992]. Diese Verbindung wurde aus der Haut des Baumfrosches isoliert. Die Bedeutung dieser Substanz für den Organismus ist bisher nicht bekannt.

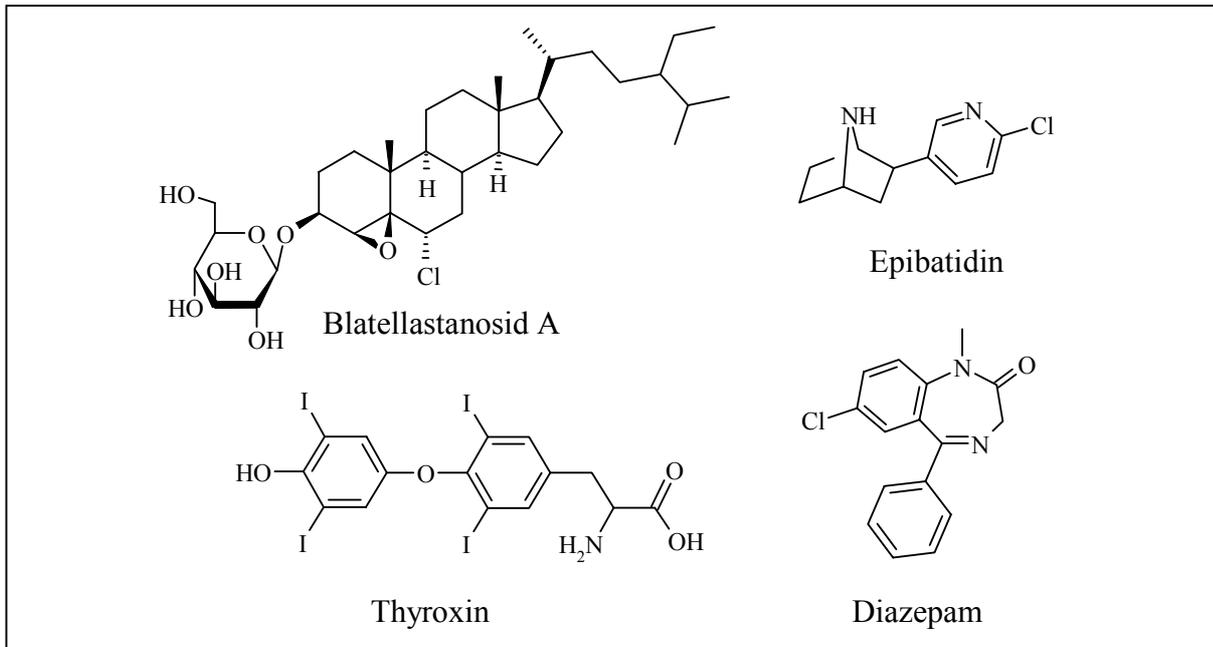


Abb. 1.5: Beispiele halogener Naturstoffe aus Insekten, Amphibien, Säugetieren und Menschen: Blatellastanosid A aus *Blatella germanica*
 Epibatidin aus *Epipedobates tricolor*
 Thyroxin aus Säugetieren und Menschen
 Diazepam aus Säugetieren und Menschen.

1.2 Bakterielle Halometaboliten

Die meisten bakteriellen Halometaboliten sind bisher aus Actinomyceten isoliert worden [VAN PÉE, 1996]. Diese Gattung ist verantwortlich für die Biosynthese von mehr als der Hälfte aller bekannten Antibiotika [DEMAIN, 1999]. Aber auch nichtfilamentöse Bakterien bilden Halometaboliten, wie z.B. Pseudomonaden. Es wurde häufiger berichtet, dass von unterschiedlichsten Mikroorganismen identische Verbindungen gebildet werden. So produzieren z.B. *Pseudomonas fluorescens*, *Myxococcus fulvus*, *Serratia marcescens* und *Enterobacter agglomerans* das Fungizid Pyrrolnitrin (Abb. 1.6) [ARIMA *et al.*, 1964; GERTH *et al.*, 1982; KALBE *et al.*, 1996; CHERNIN *et al.*, 1996].

Die strukturelle Vielfalt der bakteriellen Halogenverbindungen ist beeindruckend. Einige wenige Beispiele für halogenierte Aliphaten aus Mikroorganismen sind bekannt. Stellvertretend sind die nichtproteinogene Aminosäuren γ -Chlornorvalin aus *Streptomyces griseosporus* (Abb. 1.6) [NARAYANAN *et al.*, 1980] und 4-Amino-3-chlor-2-pentendionsäure aus *Streptomyces viridogenes* [CHAIET *et al.*, 1984] genannt.

Die seltenen Fluorverbindungen 4-Fluorthreonin und Fluoressigsäure wurden in *Streptomyces cattleya* nachgewiesen (Abb. 1.6) [SANADA *et al.*, 1986]. Das Glycosylfluorid Nucleocidin wurde 1969 aus *Streptomyces calvus* isoliert (Abb. 1.6) [MORTON *et al.*, 1969].

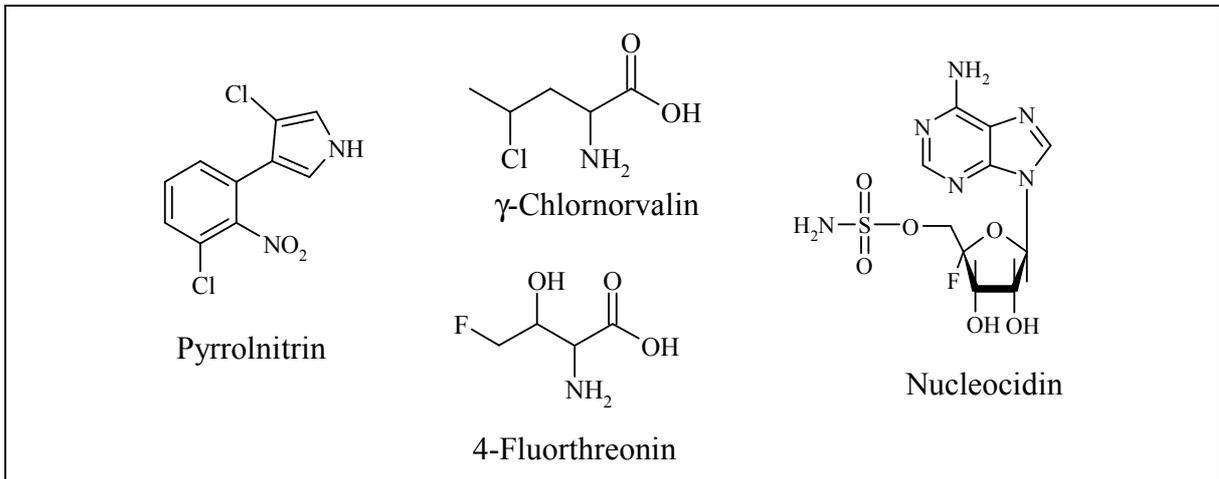


Abb. 1.6: Beispiele bakterieller Halometaboliten I:

Pyrrolnitrin aus verschiedenen Mikroorganismen (siehe Text)

γ -Chlornorvalin aus *Streptomyces griseosporus*

4-Fluorthreonin aus *Streptomyces cattleya*

Nucleocidin aus *Streptomyces calvus*.

Die Mehrheit der bekannten Halometaboliten sind am Aromaten halogeniert [VAN PÉE, 1996]. Die Vielfalt der Strukturen reicht von einfachen phenolischen Verbindungen bis hin zu sehr komplexen Strukturen (Abb. 1.7).

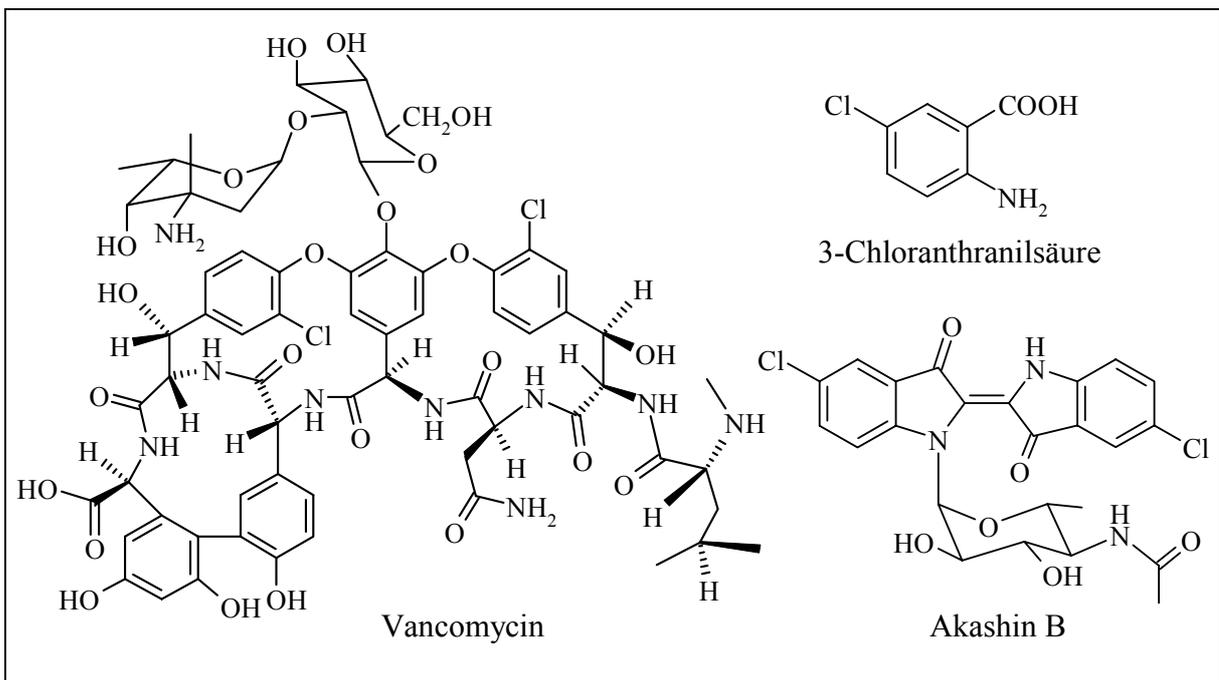


Abb. 1.7: Strukturelle Vielfalt bakterieller Halometaboliten:

Vancomycin aus *Amycolatopsis orientalis* [WILLIAMS *et al.*, 1980]

Chloranthranilsäure aus *Pseudomonas aureofaciens* [SALCHER & LINGENS, 1978]

Akashin B aus *Streptomyces* sp. GW48/1497 [MASKEY *et al.*, 2002].

Die Entdeckung der meisten Halometaboliten ist Resultat der intensiven Suche nach neuen Antibiotika in den letzten Jahrzehnten. So sind heute halogenierte Antibiotika aus verschiedenen Strukturklassen bekannt (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Ausgewählte Strukturklassen von Antibiotika mit Beispielen

STRUKTURKLASSE	HALOGENIERTE VERTRETER	REFERENZ
β -Lactame	Chlorocardicin	CHAN <i>et al.</i> , 1985
Glycopeptide	Vancomycin	WILLIAMS, 1980
	Balhimycin	NADKARNI <i>et al.</i> , 1994
Tetracycline	7-Chlortetracyclin	DUGGAR, 1948
Macrolide	Ansamitocin	ASAI <i>et al.</i> , 1979
	Chlorothricin	KELLER-SCHIERLEIN <i>et al.</i> , 1969
Orthosomycine	Avilamycin	BUZZETTI <i>et al.</i> , 1968
Polyether	CP-54.883 aus <i>Actinomadura sp.</i>	CULLEN <i>et al.</i> , 1987
Aminocumarine	Clorobiocin	BERGER & BATCHO, 1978
	Simocyclinon D8	SCHIMANA <i>et al.</i> , 2000

Es wurden aber nicht nur Verbindungen mit antimikrobieller Aktivität identifiziert, sondern auch Substanzen mit Aktivität gegen Tumoren, Pilze, Viren, Würmer und Parasiten. Einige Verbindungen weisen weitere interessante Eigenschaften auf, z.B. die Inhibierung von Enzymen.

Beispiele für biologisch aktive Halogenverbindungen aus Bakterien sind Pyoluteorin (Fungizid), Thienodolin (Auxin) und Dichlorgenistein (Enzyminhibitor) (Abb. 1.8) [HOWELL & STEPANOVIC, 1980; KANBE *et al.*, 1993a; KANBE *et al.*, 1993b; KÖNIG *et al.*, 1977].

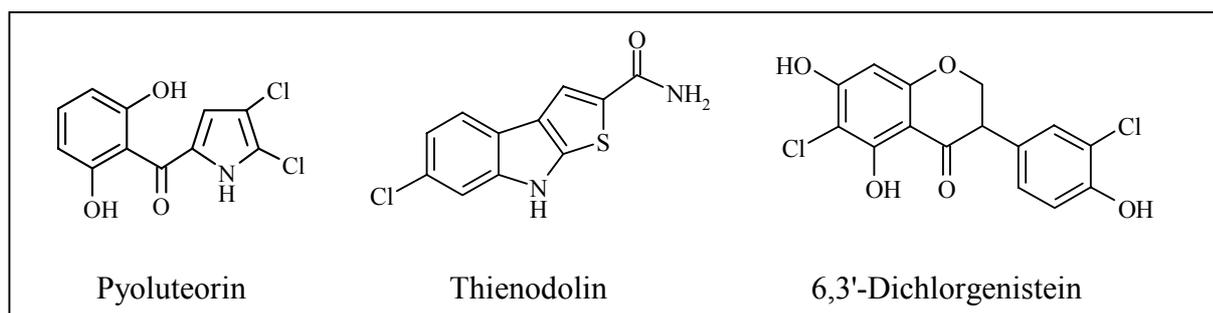


Abb. 1.8: Beispiele bakterieller Halometaboliten II:

Pyoluteorin aus *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

Thienodolin aus *Streptomyces albogriseolus*

6,3'-Dichlorgenistein aus *Streptomyces griseus*.

Die biologische Wirkung einer Verbindung basiert auf deren Gesamtstruktur [NAUMANN, 1999]. Die Halogenatome sind ein Beitrag zur Aktivität der Verbindung. Bei der Entwicklung von Arzneimitteln ist die Einführung von Halogensubstituenten in eine wirksame Grundstruktur eine häufig genutzte Möglichkeit zur Veränderung pharmakokinetischer und toxikologischer Eigenschaften.

Die Art, Zahl und Position des Halogensubstituenten kann hohen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit besitzen. Die Einführung von Chloratomen an einer bestimmten Position in ein biologisch aktives Molekül kann dessen Aktivität signifikant verstärken [NAUMANN, 1999]. Für die antibiotische Wirksamkeit von Vancomycin sind die Chloratome entscheidend [HARRIS *et al.*, 1983]. Sie induzieren eine spezifische Konformation, die für die antibiotische Aktivität notwendig ist.

Das Antibiotikum Chloramphenicol zeigt eine vielfach höhere Aktivität gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien als seine unchlorierten Analoga, die Corynecine (Abb. 1.9) [SUZUKI *et al.*, 1972].

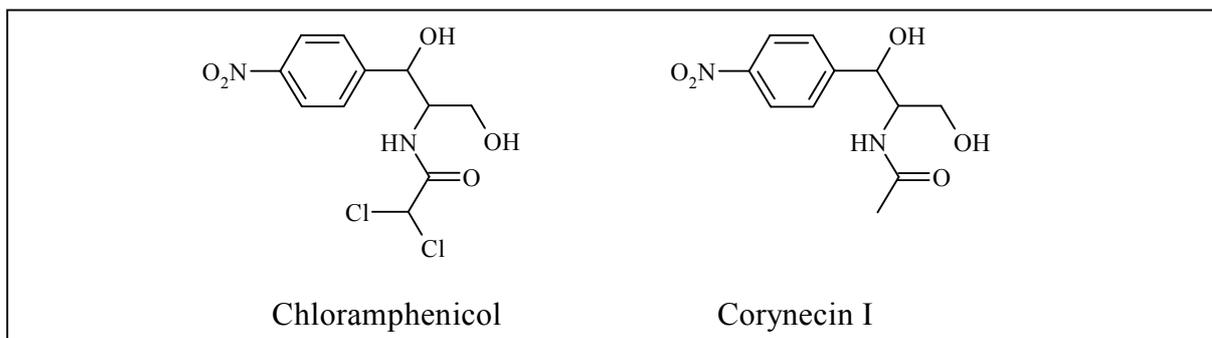


Abb. 1.9: Chloramphenicol und ein unchloriertes Analogon, Corynecin I:

Chloramphenicol aus *Streptomyces venezuelae*

Corynecin I aus *Corynebacterium hydrocarboclastus*.

Für Phenylpyrrolantibiotika wurde ein besonders deutlicher Einfluss auf die biologische Aktivität durch die Zahl und Art der Halogenatome im Molekül festgestellt [VAN PÉE & LIGON, 2000]. Bromverbindungen zeigen oft ein ähnliches oder schwächeres Potenzial als die entsprechenden Chlorverbindungen, z.B. ist die antifungische Aktivität von Brompyrrolnitrin gegenüber Pyrrolnitrin deutlich geringer [VAN PÉE *et al.*, 1983].

Umfassende Untersuchungen zum Einfluss der Art und Position der Halogensubstituenten wurden an Rebeccamycin durchgeführt. Rebeccamycin (Abb. 1.10) ist eine hochwirksame Substanz gegen Tumoren. Die Aktivität von Rebeccamycin wird auf die Bindung an DNA und die Hemmung der Topoisomerase I zurückgeführt [MOREAU *et al.*, 1999; PRUDHOMME, 2000].

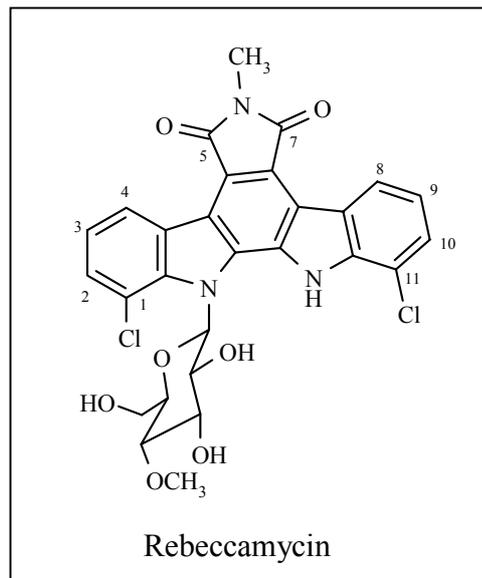


Abb. 1.10: Antitumorwirkstoff Rebeccamycin aus *Lechevalieria aerocolonigenes*.

Es wurden mehrere unterschiedlich substituierte Rebeccamycinanaloga (Indolcarbazole) hergestellt und auf ihre Aktivität untersucht. Für die Bromanaloga von Rebeccamycin wurde eine ähnliche Wirkungsintensität gegen Leukämiezellen und die Hemmung der Topoisomerase I festgestellt [LAM *et al.*, 1991; MOREAU *et al.*, 1999]. Für die 2,10- und 3,9-fluorierten Indolcarbazole wurde eine Vervielfachung der Aktivität gegen Leukämiezellen im Vergleich zu Rebeccamycin nachgewiesen [LAM *et al.*, 2001].

Dechlorrebeccamycin zeigt im Test eine deutlich bessere Bindung an DNA als Rebeccamycin, auch die Cytotoxizität ist *in vitro* für Dechlorrebeccamycin höher als für Rebeccamycin. Im Gegensatz dazu steht aber die geringere Aufnahmefähigkeit von Dechlorrebeccamycin in die Zellen [MARMINON *et al.*, 2002].

Am Beispiel von Rebeccamycin und seinen Derivaten wird die Bedeutung der Halogensubstituenten im Zusammenspiel von biologischer Wirkung und die Bioverfügbarkeit deutlich.

1.3 Enzymatische Halogenierung

Der beeindruckenden Zahl der halogenierten Metabolite in der Natur steht die geringe Kenntnis über die Bildung dieser Substanzen durch Organismen gegenüber. Über 3000 verschiedene organische Halogenverbindungen werden u.a. durch Bakterien, Pilze, Algen, höhere Pflanzen, marine Invertebraten, Insekten und Säugetiere gebildet [VAN PÉE, 2001]. Über die Biosynthese und die enzymatischen Reaktionen, die zu diesen Verbindungen führen, ist wenig bekannt.

In Studien über die biologische Halogenierung wurde nach den verantwortlichen Enzymen, den adäquaten Substraten und den richtigen Mechanismen geforscht. Im chemischen Labor

werden drei Halogenierungsmechanismen genutzt: die elektrophile, die radikalische und die nukleophile Halogenierung [HARTUNG, 1999].

1.3.1 Haloperoxidasen

Das erste halogenierende Enzym wurde 1959 entdeckt. In Untersuchungen zur Biosynthese des Antibiotikums Caldariomycin aus *Caldariomyces fumago* wurde ein extrazelluläres Enzym nachgewiesen, das die Chlorierung von β -Ketoadipinsäure zu δ -Chlorlevulinsäure katalysiert (Abb. 1.11) [SHAW & HAGER, 1959].

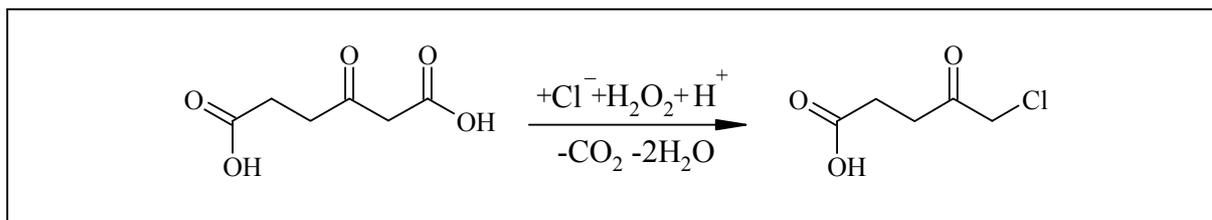


Abb. 1.11: Reaktion der Haloperoxidase aus *Caldariomyces fumago*.

Enzymatische Chlorierung von β -Ketoadipinsäure zu δ -Chlorlevulinsäure mit H₂O₂ als Cosubstrat [SHAW & HAGER, 1959].

Die Reinigung und Charakterisierung dieses Enzyms zeigte, dass es für die Chlorierung eines organischen Substrates Wasserstoffperoxid und Chlorid benötigt. Darum wurde es als Chlorperoxidase bezeichnet [MORRIS & HAGER, 1966]. In den folgenden Jahren wurden noch viele weitere Enzyme isoliert, die Wasserstoffperoxid und Halogenidionen für die Halogenierung organischer Substrate nutzen. Abhängig von der Oxidationskraft werden diese Enzyme als Chlorperoxidasen, Bromperoxidasen oder Iodperoxidasen bezeichnet (E.C. 1.11.1.X, Halogenid:Wasserstoffperoxid-Oxidoreduktase: E.C. 1.11.1.10). Durch Haloperoxidasen können vor allem Substrate mit elektronenreichen C-C-Doppelbindungen halogeniert werden. Es wurden drei Gruppen von Enzymen mit Haloperoxidaseaktivität detektiert: hämhaltige Haloperoxidasen, vanadiumhaltige Haloperoxidasen und bakterielle Perhydrolasen [VAN PÉE & ZEHNER, 2003].

Auch konnten für klassische Peroxidasen wie die Meerrettichperoxidase (Iodperoxidase), die Lactoperoxidase (Bromperoxidase) und die Myeloperoxidase (Chlorperoxidase) Haloperoxidase-Aktivität nachgewiesen werden [MORRISON & SCHONBAUM, 1976].

Diese Enzyme zeigen bezüglich der Halogenierung weder Regioselektivität noch Substratspezifität [VAN PÉE, 1996]. Mechanistisch entspricht die Haloperoxidase-Reaktion einer elektrophilen Substitution [HARTUNG, 1999]. In verschiedenen Arbeiten an Mikroorganismen konnte durch genetische Inaktivierung von Perhydrolasegenen die Beteiligung an der Biosynthese von Halometaboliten ausgeschlossen werden [FACEY *et al.*, 1996; KIRNER *et al.*, 1996].

1.3.2 Radikalische Halogenierung

Barbamid ist eine molluscizide Verbindung aus dem marinen Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* [ORJALA & GERWICK, 1996].

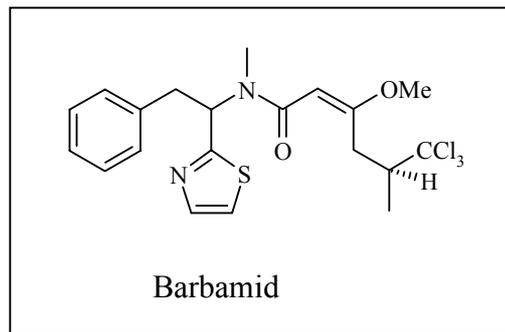


Abb. 1.12: Barbamid, eine alkylhalogenierte Verbindung aus *Lyngbya majuscula*

Durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen wurde gezeigt, dass Barbamid aus L-Leucin, L-Cystein, L-Phenylalanin, Acetat und S-Adenosylmethionin aufgebaut wird [SITACHITTA *et al.*, 2000]. Die Fütterung mit L-[²H₁₀]-Leucin führte zu der Erkenntnis, dass die Chlorierung des Leucins an einer nichtaktivierten Methylgruppe stattfindet [SITACHITTA *et al.*, 1998]. Dadurch kann die elektrophile Halogenierung durch Haloperoxidasen ausgeschlossen werden. SITACHITTA *et al.* (1998) vermuteten einen radikalischen Mechanismus für die Biosynthese von Barbamid.

Von CHANG *et al.* (2002) wurde das Biosynthesecluster für Barbamid identifiziert. Die Gene, die der Modifizierung des Leucins zugeordnet werden, besitzen Übereinstimmung mit Sequenzen aus dem Biosynthesecluster von Syringomycin aus *P. syringae*. Syringomycin ist ein Lipodepsinonapeptid und enthält eine 4-Chlorthreonin-Einheit. Im Cluster von Syringomycin wurde ein Gen (*syrC*) identifiziert, das gemeinsame konservierte Motive mit den bakteriellen Haloperoxidasen BPO-A2 aus *S. aureofaciens* und CPO aus *P. pyrrocinia* aufweist [ZHANG *et al.*, 1995; GUENZI, *et al.*, 1998]. Für die bakteriellen Haloperoxidasen BPO-A2 und CPO konnte bisher jedoch kein Beweis für die Beteiligung an der Biosynthese eines halogenierten Metaboliten erbracht werden. Für die Biosynthese von Syringomycin wurde postuliert, dass das Genprodukt SyrC für die Halogenierung von Threonin verantwortlich ist. Für die Biosynthese von Barbamid wurde eine Halogenierung von Leucin durch Haloperoxidasen ausgeschlossen [SITACHITTA *et al.*, 1998]. Die Biosynthese von Barbamid und Syringomycin erfolgt durch nichtribosomale Peptidsynthasen. Die Chlorierung könnte für beide Halometaboliten auf der Stufe einer peptidylgebundenen Aminosäure stattfinden [CHANG *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 1995; GUENZI *et al.*, 1998]. Die geläufigen Modellvorstellungen über die enzymatischen Halogenierung durch elektrophile bzw. nukleophile Substitution würden für die Biosynthese von Barbamid den Ergebnissen der Fütterungsversuche von SITACHITTA *et al.* (1998) widersprechen. Das Modell für die

Halogenierung nach einem radikalischen Mechanismus widerlegt diese Ergebnisse nicht. Das Modell der radikalischen Halogenierung konnte jedoch im Experiment bisher nicht bestätigt werden.

1.3.3 S-Adenosylmethionin-Transferasen

Die Bildung monohalogener Methane erfolgt vermutlich nach einem anderen Mechanismus. Die enzymatische Synthese von Methylhaliden wird vermutlich durch S-Adenosylmethionin-Transferasen katalysiert [HARPER, 1985; HARPER *et al.*, 1988]. Sie übertragen eine Methylgruppe als Carbeniumion auf ein Halogenidion (Cl^- , Br^- , I^-) [WUOSMAA & HAGER, 1990]. Diese Enzymaktivität wurde in zellfreien Extrakten aus *Phellinus promaceus* (Pilz) [HARPER & HAMILTON, 1988], *Endocladia muricata* (marine Rotalge) [WUOSMAA & HAGER, 1990] und *Mesembryanthemum crystallinum* (halophile Pflanze) [NI & HAGER, 1998] nachgewiesen. Das Gen einer Methylchlorid-Transferase aus *Batis maritima* (halophile Pflanze) wurde in *E.coli* exprimiert. Es konnte die Bildung von Methylchlorid durch *E. coli* nachgewiesen werden [NI & HAGER, 1999].

1.3.4 Fluorierung

Die ersten bekannten Enzyme, welche die Fluorierung von organischen Verbindungen katalysieren, waren Mutanten der β -Glucosidase Abg aus *Agrobacterium* sp. und der β -Mannosidase Man2A aus *Cellulomonas fimmii*. In Untersuchungen mit zellfreien Extrakten wurde die Bildung von Fluor-Kohlenstoff-Bindungen nachgewiesen [ZECHEL *et al.*, 2001; NASHIRU *et al.*, 2001]. Durch Punktmutationen der Glycosidasen wurde Glutaminsäure, das Nukleophil im aktivem Zentrum der Enzyme, gegen Alanin, Glycin oder Serin ausgetauscht. Die Glycosidaseaktivität wurde durch diese Mutation zerstört. In Gegenwart von Fluorid, kann sie wieder hergestellt werden. Dabei ersetzt Fluorid das fehlende Nukleophil im aktiven Zentrum. Im Aktivitätstest folgt die Bildung von 2,4-Dinitrophenyl- β -glucosyl- bzw. mannosyl-Fluorid [ZECHEL *et al.*, 2001].

In Untersuchungen zur Biosynthese von Fluoracetat und Fluorthreonin aus *Streptomyces cattleya* erhielten REID *et al.* (1995) erste Hinweise auf fluorierende Enzyme. Sie postulierten einen nukleophilen Halogenierungsmechanismus. O'HAGAN *et al.* (2002) identifizierten ein Enzym in *S. cattleya*, das für die Bildung von C-F-Bindungen verantwortlich ist. Die angereicherte Fluorinase bildet aus Fluorid und S-Adenosylmethionin (SAM) 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin (Abb. 1.13). Es wurde vermutet, dass diese Reaktion über einen nukleophilen Angriff des Fluoridions am C-5' des SAM erfolgt und anschließend Methionin abgespalten wird. Eine weitere Metabolisierung der Organofluorverbindung in Fluoracetat und

Fluorthreonin mit Rohextrakt aus *S. cattleya* konnte ebenfalls nachgewiesen werden [SCHAFFRATH *et al.*, 2002].

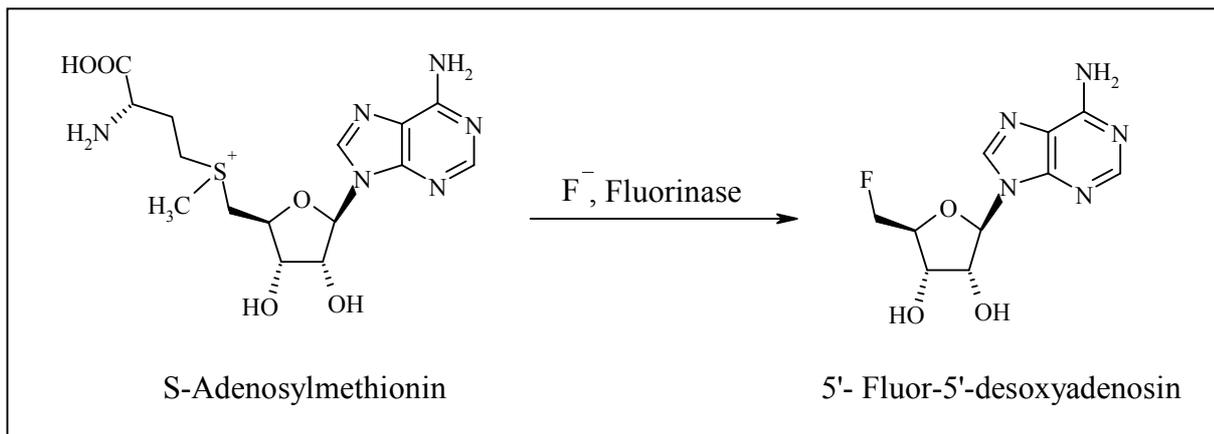


Abb. 1.13: Reaktion der Fluorinase mit S-Adenosylmethionin [O'HAGAN *et al.*, 2002].

1.3.5 FADH₂-abhängige Halogenasen

Einen ersten Hinweis auf einen weiteren Typ halogenierender Enzyme erhielten DAIRI *et al.* (1995) während der Untersuchungen zur Biosynthese von 7-Chlortetracyclin in *Streptomyces aureofaciens*. Es wurden Mutanten, die im Chlorierungsschritt der Biosynthese von 7-Chlortetracyclin blockiert sind, isoliert. Durch Komplementation der Biosynthese konnte ein Gen für ein halogenierendes Enzym identifiziert werden. Die Sequenz des Proteins zeigte keine Sequenzähnlichkeit mit bis dahin bekannten halogenierenden Enzymen [DAIRI *et al.*, 1995]. Zwei Jahre später veröffentlichten HAMMER *et al.* (1997) die Klonierung der Gene *prnABCD* des Biosyntheseclusters von Pyrrolnitrin. Die Expression der Gene und Fütterungsversuche ergaben, dass die Chlorierungsschritte der Pyrrolnitrinbiosynthese durch zwei halogenierende Enzyme katalysiert werden. Die erste Halogenierungsreaktion ist die regioselektive Chlorierung von L-Tryptophan zu 7-Chlor-L-Tryptophan durch die Tryptophan-7-Halogenase (PrnA). Die zweite Halogenase, PrnC, katalysiert die regioselektive Chlorierung von Monodechloraminopyrrolnitrin zu Aminopyrrolnitrin [KIRNER *et al.*, 1998]. HOHAUS *et al.* (1997) zeigten für beide Halogenasen deren substratspezifische Halogenaseaktivität in zellfreien Extrakten. Es wurde ein Mechanismus postuliert, der einen nukleophilen Angriff des Halogenids an einem aktivierten organischen Substrat vorsieht [HOHAUS *et al.*, 1997]. Während der Reinigung der Tryptophan-7-Halogenase (PrnA) erkannte man, dass für die Aktivität NADH, FAD und eine NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase notwendig sind [HOHAUS *et al.*, 1997; VAN PÉE *et al.*, 2001; KELLER *et al.*, 2001]. Die NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase ist nicht spezifisch für die Halogenase. Sie reduziert FAD unter NADH-Verbrauch zu FADH₂. Die FADH₂-abhängigen Halogenasen benötigen FADH₂ (nicht NADH und FAD) und sind obligat sauerstoffabhängig [KELLER *et al.*, 2001; UNVERSUCHT, 2000]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde der postulierte Mechanismus von

HOHAUS erweitert (Abb. 1.14). Er beschreibt für die Halogenase eine Monooxygenase-Reaktion, bei der in einer vorgelagerten Reaktion FADH_2 aus FAD und NADH gebildet wird. In Gegenwart von Sauerstoff bildet sich FAD-HOOH . Das organische Substrat wird durch ein FADHOOH -Enzymkomplex an einer Doppelbindung aktiviert und das Halogenid kann nukleophil angreifen. Anschließend wird Wasser abgespalten [HOHAUS *et al.*, 1997; KELLER *et al.*, 2001].

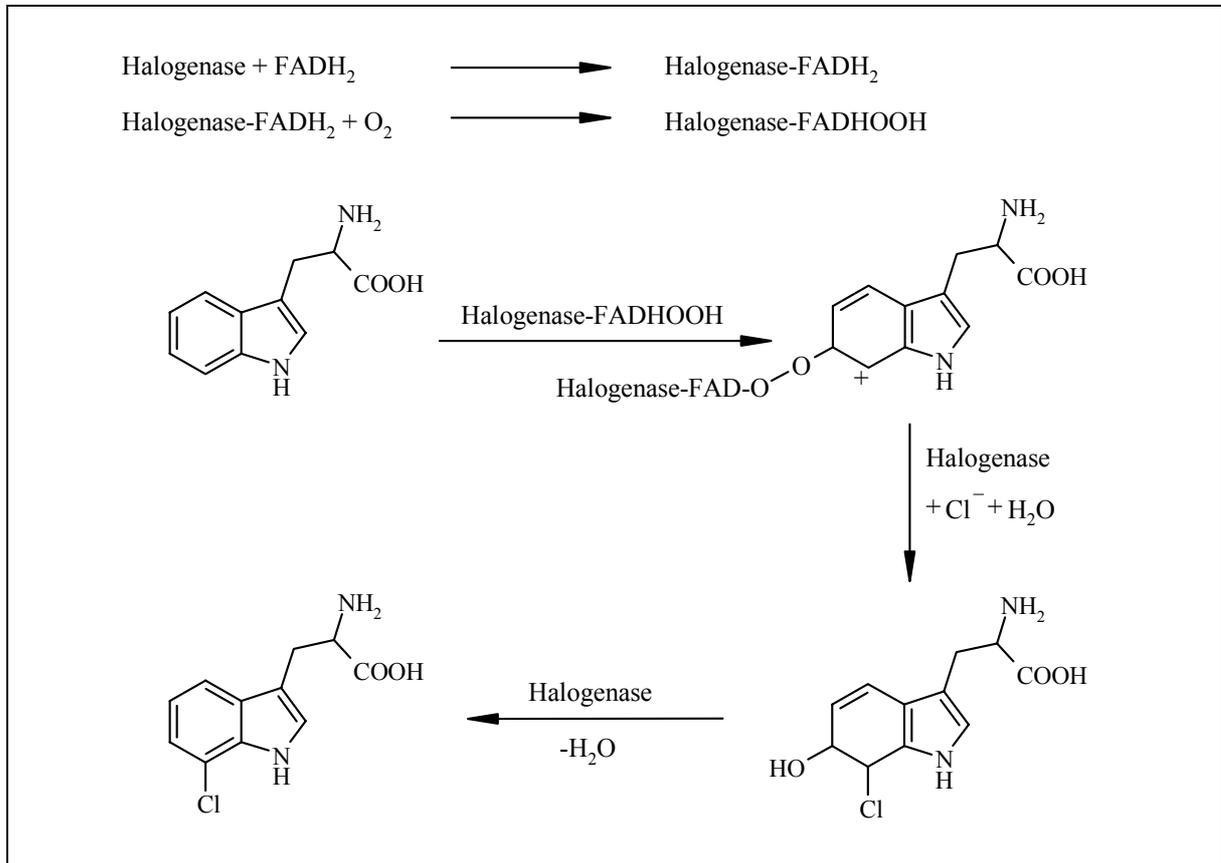


Abb. 1.14: Postulierter Mechanismus für die Halogenierung von Tryptophan durch FADH_2 -abhängige Halogenasen.

Durch HÖLZER *et al.* (2001) wurden Untersuchungen zur Regioselektivität und Substratspezifität der Tryptophan-7-Halogenase durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Halogenase nur ein enges Substratspektrum akzeptiert, wobei nur für das natürliche Substrat strenge Regioselektivität nachgewiesen werden konnte. Für andere Substrate zeigt die Tryptophan-7-Halogenase nur geringe Regioselektivität und erlaubt die Halogenierung an den chemisch bevorzugten Positionen [HÖLZER *et al.*, 2001].

1.4 Molekulargenetik der FADH₂-abhängigen Halogenasen

In Untersuchungen zur Pyrrolnitrinbiosynthese konnte eine neue Gruppe halogenierender Enzyme identifiziert werden. Für diese Enzyme wurde neben der *in vitro* Aktivität auch durch Mutation und Komplementation der Gene *in vivo* der zweifelsfreie Beweis für die Beteiligung an der Halogenierung eines Naturstoffes erbracht [HAMMER *et al.*, 1997].

Vergleicht man die Primärstruktur der Halogenasen der Pyrrolnitrinbiosynthese stellt man fest, dass sie weniger als 25% Sequenzähnlichkeit zueinander aufweisen [VAN PÉE & ZEHNER, 2003]. Es wurde vermutet, dass sich die Enzyme aufgrund ihrer verschiedenen Substrate stark unterscheiden. Sie zeigen nur in kurzen Abschnitten ähnliche Sequenzen.

In anderen Mikroorganismen wurde eine Reihe neuer Biosynthesecluster für halogenierte Naturstoffe identifiziert. In den Genclustern wurden Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu Halogenasen dieses Typs nachgewiesen.

Die identifizierten Sequenzen können anhand ihrer Sequenzidentität und den potenziellen Substraten in wenigstens zwei Gruppen eingeteilt werden [VAN PÉE & ZEHNER, 2003]. Die Enzyme der ersten Gruppe (PrnA-homologe) halogenieren Indol- bzw. Tryptophanderivate, während die Enzyme der zweiten Gruppe (PrnC-homologe) Phenyl- bzw. Pyrrolderivate halogenieren. Zwischen den Gruppen der Enzyme sind kaum Sequenzähnlichkeiten feststellbar. Als eine Gemeinsamkeit zeigen alle (potenziellen) FADH₂-abhängigen Halogenasen zwei konservierte Motive, eine potenzielle FAD-Bindestelle (GXGXXG) und ein konserviertes Tryptophanmotiv (WXWXIP) (Abb. 1.15) [VAN PÉE & ZEHNER, 2003].

FAD-Bindestelle:

<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	(PrnA)	IVIVGGGTAGWMAASYL
<i>Pseudomonas pyrrocinia</i>	(PrnA)	IVIVGGGTAGWMAASYL
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	(PrnA)	IVIVGGGTAGWMAASYL
<i>Burkholderia cepacia</i>	(PrnA)	IVIVGGGTAGWMAASYL
<i>Myxococcus fulvus</i>	(PrnA)	IIIVGGGSSGWMAAAYL
<i>Streptomyces albogriseolus</i>	(Thal)	VVILGGGTAGWMTAAAYL
<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	(RebH)	ILIVGGGTAGWMAASYL
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	(Chl)	VVIIIGSGLSGTMLGSIL
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PF-5	(PltM)	VIIIGSGIAGALTGAVL
	(PltA)	VVIIIGGGPAGSTMASYL
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	(CepH)	VVVAGGGPAGSTVATLV
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	(BhaA)	VVVAGGGPGGSTVATLV
<i>Actinoplanes</i> sp.	(HalA)	VVILGSGLAGSTLAACL
	(HalB)	VAILGSGIAGSMLGAIL
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	(AviH)	VLVIIGGGPAGSTAASLL
<i>Streptomyces venezuelae</i>	(Cml)	VAIIGGGPAGSVAGLTL
<i>Streptomyces lavendulae</i>	(ComH)	VAVVGGGPAGSTFAALV
<i>Anabena</i> sp.90	(AdpC)	VVICGGGLAGLTLARQL
<i>Xanthomonas oryzae</i>	(ORF11)	VLIVGGGPAGCTAAIAL

Tryptophanmotiv:

<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	(PrnA)	MNSGWTWKIPMLGRFGSGYVFST
<i>Pseudomonas pyrrocinia</i>	(PrnA)	MNSGWTWKIPMLGRFGSGYVFSS
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	(PrnA)	MNSGWTWKIPMLGRFGSGYVFSS
<i>Burkholderia cepacia</i>	(PrnA)	MNSGWTWKIPMLGRFGSGYVFSS
<i>Myxococcus fulvus</i>	(PrnA)	MNSGWTWEIPLYGRAGNGYVYSS
<i>Streptomyces albogriseolus</i>	(Thal)	MEAGWTWKIPMLGRFGSGHVYSD
<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	(RebH)	MKSGWTWKIPMLGRFGTGYVYSS
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	(PrnC)	FEGGWLWVIPFNNHPRSTNNLVSVGL
<i>Pseudomonas pyrrocinia</i>	(PrnC)	FAGGWLWVIPFNNHPRSTNNLVSVGL
<i>Burkholderia cepacia</i>	(PrnC)	FEGGWLWVIPFNNHARSTNNLVSVGL
<i>Myxococcus fulvus</i>	(PrnC)	FHGGWLWVIPFNNHSRATNGLVSVGL
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PF5	(PltM)	FEEGWLWVIPFNNHPQGTNQLCSIGF
	(PltA)	MTNTWVWQIP ITETITSVGV
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	(Chl)	FERGMMWIIPFNNHPGATNPLCSVGI
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	(CepH)	FDSGWFYIP LSDTLTSVGA
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	(BhaA)	FDSGWFYIP LSDTLTSVGA
<i>Actinoplanes sp.</i>	(HalA)	FERGMMWIIPFNNHPGATNPLCSVGI
	(HalB)	FKGGWIWVIPFNNHARSTNPLISVGL
<i>Streptomyces lavendulae</i>	(ComH)	FESGWFYIP LSDTLTSVGA
<i>Streptomyces venezuelae</i>	(Cml)	FEDGVMWVIP IKDDLVSVGL
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	(AviH)	APDGWYWVIP LRGDRYSVGF
<i>Anabena sp.90</i>	(AdpC)	GEGYVWWTIP LSTGHTSIGI
<i>Xanthomonas oryzae</i> (ORF11)	(ORF11)	HAHGMMWLIP LPEDIMSVGA

Abb. 1.15: Konservierte Motive der FADH₂-abhängigen Halogenasen:
FAD-Bindestelle (GXGXXG), Tryptophanmotiv (WXWXIP)

In der kleinen Gruppe der sogenannten Tryptophanhalogenasen wurden Sequenzen zusammengefasst, die signifikante Ähnlichkeiten zur ersten Halogenase (PrnA) der Pyrrolnitrinbiosynthese aufweisen. Dazu gehören mindestens sieben bekannte Sequenzen mit Sequenzidentitäten zwischen 49-95% (Tab. 1.2).

Tab. 1.2: Sequenzvergleiche der bekannten Tryptophanhalogenasen mit der Tryptophan-7-halogenase (PrnA) aus *Pseudomonas fluorescens* BL915 [VAN PÉE & ZEHNER, 2003]

METABOLIT	MIKROORGANISMUS	ENZYM	IDENTITÄT (% aa)	REFERENZ
Pyrrolnitrin	<i>Pseudomonas pyrrocinia</i>	PrnA	95	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
Pyrrolnitrin	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	PrnA	95	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
Pyrrolnitrin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	PrnA	94	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
Pyrrolnitrin	<i>Burkholderia cepacia</i>	PrnA	90	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
Pyrrolnitrin	<i>Myxococcus fulvus</i>	PrnA	49	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
Rebeccamycin	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	RebH	56	SANCHEZ <i>et al.</i> , 2002
Thienodolin	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	Thal	58	SCHMID, persönl. Mitteilung, 2002

In der Gruppe der Phenyl- bzw. Pyrrol-halogenierenden Enzyme wurden Sequenzen zusammengefasst, die Ähnlichkeit zur MCAP-3-Halogenase (PrnC) der Pyrrolnitrinbiosynthese aufweisen. Diese Gruppe von Enzymen ist sehr komplex. Die Ähnlichkeiten der Proteinsequenzen in dieser Gruppe der Phenyl- bzw. Pyrrol-halogenierenden Enzyme liegen im Bereich von 21-95% (Tab. 1.3) [VAN PÉE UND ZEHNER, 2003].

Tab. 1.3: Sequenzvergleiche der bekannten Phenyl-/Pyrrolhalogenasen mit der MCAP-3-Halogenase (PrnC) aus *Pseudomonas fluorescens* BL915 [VAN PÉE & ZEHNER, 2003]

METABOLIT	MIKROORGANISMUS	ENZYM	IDENTITÄT (% aa)	REFERENZ
Anabaenapeptilide	<i>Anabaena</i> sp. strain 90	ApdC	21	ROUHIAINEN <i>et al.</i> , 2000
A47934	<i>Streptomyces toyocaensis</i> NRRL15009	StaK StaI	26 27	POOTOOLAL <i>et al.</i> , 2002
Balhimycin	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> DSM5908	BhaA	27	PELZER <i>et al.</i> , 1999
Chloreremomycin	<i>Amycolatopsis orientalis</i> NRRL18098	CepH	25	VAN WAGENINGEN <i>et al.</i> , 1998
Complestatin	<i>Streptomyces lavendulae</i>	ComH	25	CHIU <i>et al.</i> , 2001
7-Cl-Tetracyclin	<i>Streptomyces aureofaciens</i> NRRL 3203	Chl	42	DAIRI <i>et al.</i> , 1995
Pyoluteorin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	PtlM PtlA	37 24	NOWAK-THOMPSON <i>et al.</i> , 1999
Ansamitocin	<i>Actinosynnema pretiosum</i> ssp. <i>auranticum</i> ATTC31565	Asm12	25	YU <i>et al.</i> , 2002
Clorobiocin	<i>Streptomyces roseochromogenes</i> var. <i>oscitans</i> DSM12976	Clohal	23	POJER <i>et al.</i> , 2002
Simocyclinon D8	<i>Streptomyces antibioticus</i> Tü6040	SimD4	26	TREFZER <i>et al.</i> , 2002
Avilamycin	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü57	AviH	22	WEITNAUER <i>et al.</i> , 2001
Pentachlorpseudilin	<i>Actinoplanes</i> sp. ATTC33002	HalA HalB	44 44	WYNANDS, persönl. Mitteilung, 2000
Pyrrolnitrin	<i>Pseudomonas pyrrocinia</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Myxococcus fulvus</i>	PrnC PrnC PrnC	95 94 80	HAMMER <i>et al.</i> , 1999

Die potenziellen Substrate der Enzyme in dieser zweiten Gruppe von Halogenasen sind strukturell sehr vielfältig. Es wurden Halogenasene aus Biosynthesegenclustern verschiedener komplexer Peptide, wie z.B. Balhimycin, Chloreremomycin und Complestatin und den Aminocumarinen, Simocyclinon D8 und Clorobiocin, in diese Gruppe eingeordnet. Die Halogenasene aus Biosynthesegenclustern von Polyketiden, wie z.B. 7-Chlortetracyclin, Pyoluteorin und Ansamitocin, gehören ebenfalls dieser Gruppe an.

Zwei homologe Gene (*halA*; *halB*) aus dem Pentachlorpseudilinproduzenten *Actinoplanes* sp. weisen Sequenzähnlichkeiten mit der Gruppe der bekannten Phenyl-/Pyrrolhalogenasen auf [WYNANDS, persönl. Mitteilung, 2000]. Es wird vermutet, dass die Genprodukte von *halA*

und *halB* an der Biosynthese von Pentachlorpseudilin beteiligt sein könnten [MANN, persönl. Mitteilung, 2003].

In der Gruppe der bekannten Phenyl-/Pyrrolhalogenasen kann eine Untergruppe anhand der potenziellen Substrate identifiziert werden. Diese Untergruppe umfasst potenzielle Tyrosin-/Peptidhalogenasen. Sequenzvergleiche bestätigen diese Einteilung. Die graphische Darstellung der Sequenzähnlichkeiten der FADH₂-abhängigen Halogenasen zeigt die Einteilung der Sequenzen in die genannten Gruppen (Abb. 1.16) [VAN PÉE & ZEHNER, 2003].

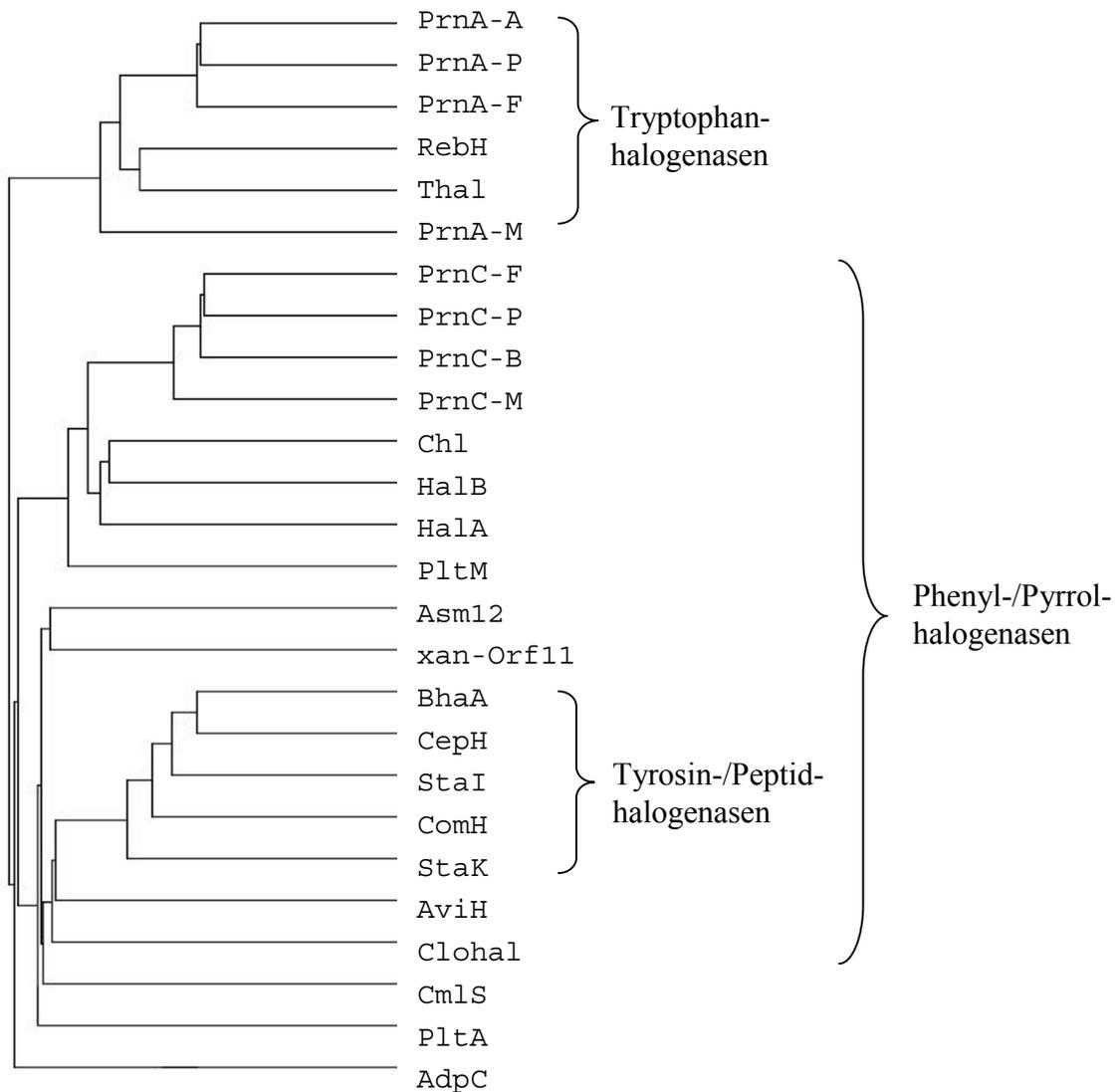


Abb. 1.16: Graphische Darstellung der Sequenzähnlichkeiten von potenziellen FADH₂-abhängigen Halogenasen. (Bezeichnungen vgl. Tab. 1.2; Tab. 1.3.)

CmlS: Alkylhalidase aus *S. venezuelae* [PIRAEE, 2002]

xan-ORF11: potenzielle Halogenase aus *Xanthomonas sp.* [GOEL *et al.*, 2002]

Von PIRAE & VINING (2002) wurde in *Streptomyces venezuelae*, dem Produzenten von Chloramphenicol, ein Halogenasegen nachgewiesen. Als Funktion des Enzyms wird die Halogenierung der aliphatischen Seitenkette von Chloramphenicol vermutet [PIRAEE & VINING, 2002]. Damit steht diese potenzielle Halogenase als einziges Beispiel für eine Alkylhalidase. Die Sequenz dieser potenziellen Alkylhalidase steht zwischen den beiden Gruppen der FADH₂-abhängigen Halogenasen, mit einer Übereinstimmung von 25 % der Sequenz mit PrnA und PrnC.

Für einige FADH₂-abhängige Halogenasen konnte die Beteiligung an der Biosynthese gezeigt werden. Durch die Inaktivierung der entsprechenden Gene wurde die Halogenierung der Verbindungen im Organismus unterbunden. In Tab. 1.4 sind die Halogenasegene zusammengefasst, deren Funktion in der Biosynthese der entsprechenden Halometaboliten genetisch nachgewiesen wurde.

Tab. 1.4: Validierte Halogenasegene aus Biosynthesen halogener Verbindungen

HALOMETABOLIT	HALOGENASEGEN	REFERENZ
Pyrrrolnitrin	<i>prnA, prnC</i>	HAMMER <i>et al.</i> , 1997
Rebeccamycin	<i>rebH</i>	SANCHEZ <i>et al.</i> , 2002
7-Cl-Tetracyclin	<i>chl</i>	DAIRI <i>et al.</i> , 1995
Avilamycin	<i>aviH</i>	WEITNAUER <i>et al.</i> , 2001
Ansamitocin	<i>asm12</i>	YU <i>et al.</i> , 2002
Clorobiocin	<i>clohal</i>	EUSTAQUIO <i>et al.</i> , 2003
Balhimycin	<i>bhaA</i>	PUK <i>et al.</i> , 2002

Die *in vitro* Aktivität der Halogenasen wurde bisher neben PrnA und PrnC [HOHAUS *et al.*, 1997; KELLER *et al.*, 2001; HÖLZER *et al.*, 2001], für HalB aus *Actinoplanes* sp. [WYNANDS, persönl. Mitteilung, 2001], für PltM aus *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 [FALKE, 2001] und Thal aus *Streptomyces albogriseolus* [SCHMID, persönl. Mitteilung, 2002] gezeigt.

Weitere potenzielle Halogenasegene wurden u.a. in *Caulobacter crescentus* [NIERMAN *et al.*, 2001], *Streptomyces coelicolor* [REDENBACH *et al.*, 1996], *Streptomyces collinus* Tü 1892 [CHEN *et al.*, 1999], *Mus musculus* [MARRA *et al.*, 1999] und *Xenopus laevis* [CLIFTON *et al.*, 1999] detektiert, die bisher aber ohne Bezug zur Bildung halogener Metabolite stehen.

1.5 Biosynthesen von Halometaboliten

Die FADH₂-abhängigen Halogenasen sind Enzyme des Sekundärstoffwechsels. Sie gehören, wie z.B. Methyltransferasen und Glycosyltransferasen, zu den modifizierenden Enzymen.

Die Biosynthesegene des Sekundärstoffwechsels in Bakterien liegen meist in Clustern vor [MALPARTIDA *et al.*, 1984]. Für einige halogenierte Verbindungen aus Bakterien wurden die Biosynthesegencluster kloniert und vollständig sequenziert. Dabei wurden Halogenasogene vom Typ der FADH₂-abhängigen Halogenasen immer im Biosynthesegencluster nachgewiesen. Durch genetische Inaktivierung ist deren Beteiligung an der Halogenierung zweifelsfrei nachgewiesen worden.

Die Bereitstellung von FADH₂ für die Halogenierungsreaktion scheint hingegen nicht an eine bestimmte, im Gencluster codierte, NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase gebunden zu sein. Es wurde bisher nur in einem Fall, im Rebecamycinproduzenten *Saccharothrix aerocolonigenes* im Biosynthesegencluster ein Leserahmen identifiziert der für eine NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase codieren könnte [SÁNCHEZ *et al.*, 2002].

1.6 Die Pyrroindomycine

Die Pyrroindomycine wurden aus Kulturen von *Streptomyces rugosporus* LL-42D005 isoliert [DING *et al.*, 1994]. Sie gehören zu einer Gruppe neuer Antibiotika, die gute *in-vitro*-Aktivität gegen Gram-positive Bakterien zeigen [SINGH *et al.*, 1994]. Fermentationsproben zeigten Aktivität gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*- und Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium*- Stämme. Gegen Gram-negative Bakterien konnte keine antibiotische Wirksamkeit nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass ihre Wirkung auf der Inhibierung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese beruht [SINGH *et al.*, 1994]. Die Pyrroindomycine wurden für Untersuchungen zur Inhibierung von Zellsekretionssystemen ausgewählt. Es konnte aber kein Einfluss auf das SecA-Sekretionssystem nachgewiesen werden. Die beobachtete Wirkung der Verbindungen beruht nur auf einem unspezifischen Effekt gegen die Integrität der Zellmembranen [ALKSNE *et al.*, 2000].

Die Pyrroindomycine erreichten bisher kein pharmakologisches Interesse, da sie *in vivo* kaum Aktivität zeigen [SINGH *et al.*, 1994].

Die Pyrroindomycine A und B sind die zwei isolierten Hauptkomponenten (Abb. 1.17). Strukturell enthalten die Pyrroindomycine eine Tetransäure, die in einem polyketidischen Makrozyklus integriert ist. Der Makrozyklus ist glycosidisch an ein unverzweigtes Desoxytrisaccharid geknüpft. Am anderen Ende ist an das Trisaccharid ein Indolpyrrolrest über eine Esterbindung gebunden [DING *et al.*, 1994]. Pyrroindomycin B ist in Position 5 am Indolpyrrol chloriert.

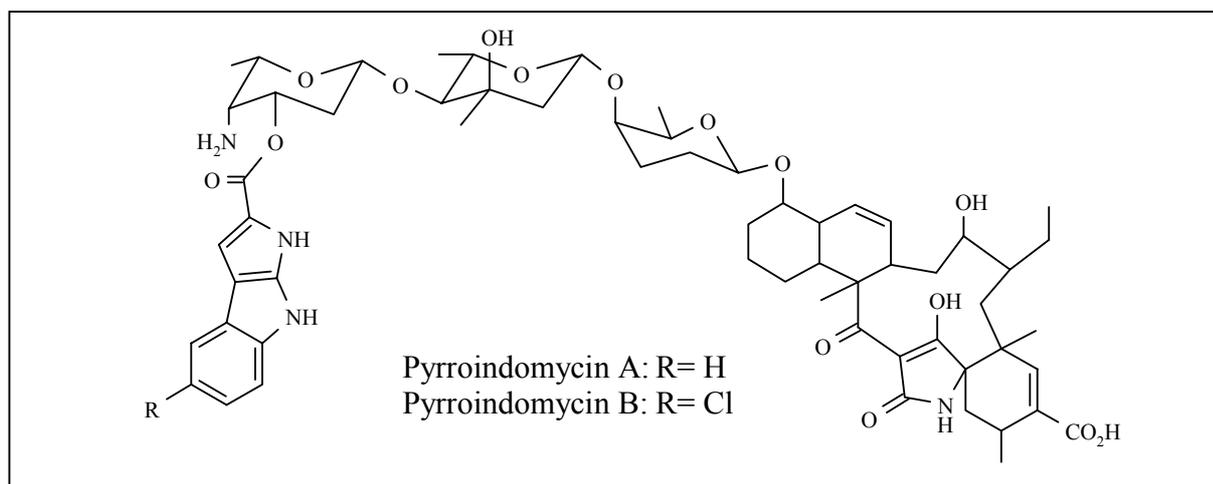


Abb. 1.17: Pyrroindomycin A und B aus *Streptomyces rugosporus* [DING et al., 1994].

Einzelne verwandte, jedoch strukturell abweichende Verbindungen wurden ebenfalls beschrieben (Abb. 1.18). Einen ähnlichen Aufbau wie die Pyrroindomycine zeigt Chlorothricin [KELLER-SCHIERLEIN *et al.*, 1969]. Beispiele für Verbindungen mit einer integrierten Tetransäure in einen Makrozyklus sind Maltophilin [JAKOBI *et al.*, 1996] und Ikarugamycin [JOMON *et al.*, 1972]. Eine weitere Tetransäureverbindung ist Tirandamycin [KARWOWSKY *et al.*, 1992].

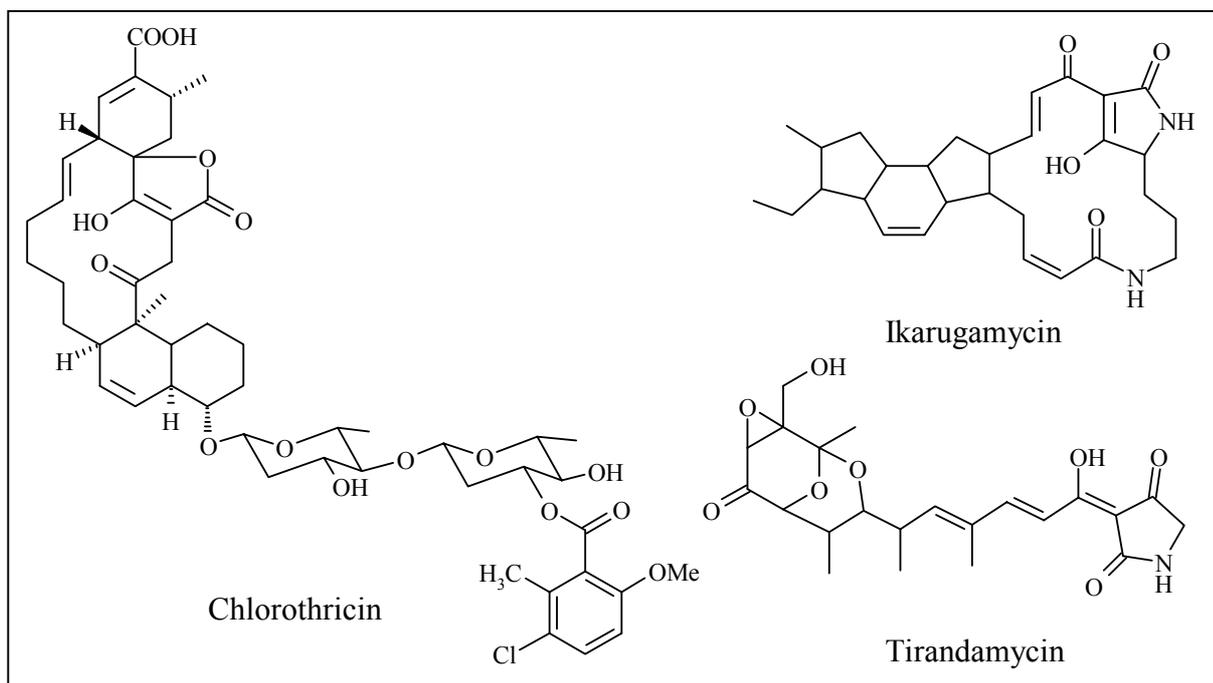


Abb. 1.18: Strukturverwandte Verbindungen der Pyrroindomycine [DING *et al.*, 1994].

Chlorothricin aus *S. antibioticus* Tü99

Ikarugamycin aus *S. phaeochromogenes* var. *ikaruganensis*

Tirandamycin aus *S. tirandis* ssp. *unidis*

Einen wichtigen Einfluss auf die biologische Aktivität von Naturstoffen hat deren Glycosylierung. Durch die Art und die Position der Zucker, die an ein Aglykon gebunden sind, wird die molekulare Erkennung eines zellulären Targets beeinflusst [MÉNDEZ & SALAS, 2001]. Beispiele für glycosylierte Verbindungen mit biologischer Aktivität sind Rebeccamycin und Vancomycin. Das Trisaccharid der Pyrroindomycine besteht aus drei modifizierten Zuckerbausteinen, einer 2,3,6-Tridesoxy-D-*threo*-hexose (D-Rhodinose), einer L-Mycarose und einem 4-Amino-2,4,6-tridesoxy-L-*lyxo*-hexose.

Der Indolpyrrolrest der Pyrroindomycine wird vermutlich aus Tryptophan gebildet. Durch Fütterungsversuche wurde der Einfluss von Tryptophan auf die Produktion von Pyrroindomycin B untersucht [ABBANAT *et al.*, 1999]. Die Fütterung von Tryptophan führte nicht zu Erhöhung der Gesamtkonzentration der Pyrroindomycine. Allerdings konnte eine Verschiebung des Verhältnisses von Pyrroindomycin A und B zugunsten der unchlorierten Verbindung, Pyrroindomycin A, festgestellt werden. Pyrroindomycin A wurde bei der Fütterung mit Tryptophan als Hauptkomponente nachgewiesen [ABBANAT *et al.*, 1999].

In weiteren Fütterungsversuche wurde der Einfluss von Glucose, verschiedenen C-Quellen, N-Quellen und Biotin auf die Produktion von Pyrroindomycin B untersucht, um Rückschlüsse auf die Biosynthese ziehen zu können [ABBANAT *et al.*, 1999].

Der Glucosezusatz beeinflusst die Produktion der Verbindungen so deutlich, dass ein regulatorischer Effekt für die Biosynthese der Pyrroindomycine postuliert wurde.

Die Bildung der Pyrroindomycine wurde durch Biotinmangel stark inhibiert. Diese Wirkung begründen ABBANAT *et al.* (1999) mit der Biotinabhängigkeit von Acetyl-CoA-Carboxylasen. Sie vermuten, dass diese Enzyme an der Biosynthese des polyketidischen Makrozyklus beteiligt sind.

1.7 Aufgabenstellung

Von einigen Organismen werden halogenierte Tryptophanderivate produziert. Die Position des Halogensubstituenten ist dabei in jeder Struktur spezifisch. An einzelnen Beispielen konnte gezeigt werden, dass FADH₂-abhängige Halogenasen verantwortlich für die Halogenierung von Naturstoffen sind [VAN PÉE & ZEHNER, 2003]. Diese Enzyme sind in der Lage Halogensubstituenten substratspezifisch und regioselektiv in organische Substrate einzuführen [HÖLZER *et al.*, 2001]. Gene für FADH₂-abhängige Halogenasen konnten in verschiedenen Mikroorganismen durch DNA-Hybridisierungen [HAMMER *et al.*, 1997; SCHNERR & WYNANDS, persönl. Mitteilung, 1998], mittels PCR [SANCHÉZ *et al.*, 2002; PIRAEÉ & VINING, 2002] oder durch Untersuchungen an Biosyntheseclustern [PELZER *et al.*, 1999; POJER *et al.*, 2002] nachgewiesen werden.

Pyroindomycin B ist ein halogeniertes Tryptophanderivat und wird von *Streptomyces rugosporus* produziert. Der Halogensubstituent der Verbindung befindet sich in Position 5 am Tryptophanrest [DING *et al.*, 1994]. Für die Biosynthese von Pyroindomycin B wurde eine FADH₂-abhängige Tryptophan-5-Halogenase postuliert. Bisher war kein Enzym mit Substratspezifität für Tryptophan und der Regioselektivität für die Position 5 bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der postulierten Tryptophan-5-Halogenase aus *Streptomyces rugosporus*. Ein potentiell Tryptophan-5-Halogenase-Gen sollte in genomischer DNA von *Streptomyces rugosporus* identifiziert werden. Die Analyse der Sequenz und deren Vergleich mit bekannten Sequenzen können Aufschluss über die Ähnlichkeiten von FADH₂-abhängigen Halogenasen und die Konservierung bestimmter Motive geben. Dafür muss das Gen der potentiellen Tryptophan-5-Halogenase kloniert und sequenziert werden. Um mehr über die Biosynthese halogenierter Naturstoffe zu erfahren sollte die Funktion der potentiellen Tryptophan-5-Halogenase in der Biosynthese von Pyroindomycin B in *Streptomyces rugosporus* untersucht werden.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit bestand darin ausreichende Mengen Protein für biochemische Untersuchungen zugänglich zu machen. Dazu sollte das Tryptophan-5-Halogenase-Gen in einem heterologen Wirt exprimiert werden. Als Beweis für die Funktion des Enzyms sollte die Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase *in vitro* nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

Amicon-Membranen

Diaflo[®] ultrafiltration membranes, Amicon Inc., Beverly, USA

DC-Platten

Polygram Sil G/UV254, 40 x 80 mm, Machery-Nagel, Düren, D

Dialyseschläuche

Servapor dialysis tubing, diameter: 6mm, Visking- Dialyseschlauch Typ 20/32 Serva
Feinbiochemie GmbH &Co. KG, Heidelberg, D

DNA-Blot

Hybond NX Amersham Pharmacia biotech, Little Calfont, GB

Nylonmembranen für Koloniehybridisierung, Roche Diagnostics, Mannheim, D

DNA-Dokumentation

Gel Doc 1000 Mini-Transilluminator, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

DNA-Gelsysteme

ComPhor L Mini, Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, D

Elektroporationssystem

EasyjecT Basic, peQLab Biotechnologie, Erlangen, D

Filme

Cirux medical X-ray films, AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, B

Filtration

Spritzenfilter 0,2 µm Porengröße, Millipore, Eschborn, D

Cellulosenitrat-Membranfilter, Sartorius, Göttingen, D

HPLC Anlagen

LC1110 HPLC-Pump, PHD 601 Detektor, LC 1610 Autosampler

GAT-Chrom Chromatographie-Software 1993-1995

Gamma Analysen Technologie (GAT), Bremerhaven, D

HPLC- Säulen

Lichrosphere 100, RP18, 5,0 µm, SC (125x4,6 mm)

Lichrosphere 100, RP18, 5,0 µm, LC (250x4,6 mm)

Bischoff Analystechnik und -geräte GmbH, Leonberg, D

Kugelmühle

MM 2000, Retsch, Haan, D

PCR-System

Mastercycler[®] gradient, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D

Photometer

Novaspec[®] II, Pharmacia, Freiburg, D

Ultrospec 3100 Pro, Pharmacia Biotech, Freiburg, D

Biochrom 4060, Pharmacia Biotech, Freiburg, D

Proteingelsystem PAGE

Gel-Elektrophorese PROT-RESOLV MINI LC, PHASE Gesellschaft für Phorese, Analytik und Separation mbH, Lübeck, D

PVDF-Membran

Immobilon-P Transfermembran, Millipore, Eschborn, D

Reinstwasseranlage

SG-Reinstwasser-System Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Hamburg-Barsbüttel, D

Ultraschallaufschlussgerät

BRANSON Digital Sonifier[®] Modell 450D, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, D

Westernblot

TRANS-BLOT[®] CELL, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

Zentrifugen

GS-15R Centrifuge (Rotoren: S4180, F0850, F3602, F2402), Beckman Instruments, München, D

Sorvall, RC5C Plus (Rotoren: SS-34; GS3(SLA-300)), Sorvall GmbH, Bad Homburg, D

Centrifuge 5415C, 5415D, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D

2.2 Chemikalien und Enzyme

In Tab. 2.1 sind die verwendeten Chemikalien und Enzyme zusammengefasst. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden dem Bestand des Institutes für Biochemie entnommen und waren mindestens von ‚reinst‘- Qualität.

Tab. 2.1: Chemikalien und Enzyme

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Acetonitril rein	Acros organics, Geel, B
3-Aminophthalhydrazid (Luminol)	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, D
Acrylamid	Serva, Heidelberg, D
Agar	MARCOR, Hackensack, USA
Agarose	FMC [®] BioProducts, Rockland, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deishoven, NL
Anti-DIG [®] (fab-Fragment)	Roche diagnostics, Mannheim, D
Anti-Xpress [®] -HRP-Antibody	Invitrogen, Paisley, GB
Apramycinsulfat	Sigma-Aldrich, Deishoven, NL
APS	GATC, Konstanz, D
ATP [50 mM]	MBI Fermentas, Vilnius, LT
Bacto-Pepton	Difco, Augsburg, D
Bacto-Trypton	Difco, Augsburg, D
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg, D
5-Br-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Deishoven, NL
Blocking Reagenz	Roche diagnostics, Mannheim, D
CDP-Star [®]	Roche diagnostics, Mannheim, D
Chloramphenicol	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, D
Chloroform	Baker, Deventer, NL
CIAP [1 U/μl]	MBI Fermentas, Vilnius, LT
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck, Darmstadt, D
DIG High prime [®]	Roche diagnostics, Mannheim, D
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck, Darmstadt, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
DTT	Biomol, Hamburg, D
DNA-Standards	MBI Fermentas, Vilnius, LT
DNA-modifizierende Enzyme	MBI Fermentas, Vilnius, LT
dNTP- MIX	Eppendorf, Wesselin-Berzdorf, D
EDTA	Riedel-de Haën, Seelze, D
Eisessig	Merck, Darmstadt, D
Essigester	Fisher scientific, Schwerte, D
Ethanol	Baker, Deventer, NL

Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, D
E.Z.N.A. [®] Plasmid Miniprep Kit II	PeQLab Biotechnologie, Erlangen, D
FAD-Na ₂ -Salz	Sigma-Aldrich, Deishoven, NL
Fleischextrakt	Merck, Darmstadt, D
Gigapack III XL [®] packaging extract	Stratagene, La Jolla, USA
Glasperlen	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Degussa-Hüls, Hanau, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Harnstoff	Laborchemie Apolda GmbH, Apolda, D
Hefeextrakt	Difco, Augsburg, D
IPTG	Biomol, Hamburg, D
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Baker, Deventer, NL
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydroxid	Baker, Deventer, NL
Kanamycinsulfat	ICN Biochemicals, Meckenheim, D
Lysozym	Serva, Heidelberg, D
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, D
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	Laborchemie Apolda GmbH, Apolda, D
Maismehl	Difco, Augsburg, D
Maleinsäure	Serva, Heidelberg, D
Maltose	Merck, Darmstadt, D
Malzextrakt	Difco, Augsburg, D
Mannit	Merck, Darmstadt, D
Mark12 [®] MW Standard	Novex, San Diego, USA
Melasse	Südzucker GmbH, Zeitz, D
MOPS	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, D
Methanol	Fisher scientific, Schwerte, D
Natriumchlorid	Baker, Deventer, NL
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydroxid	Baker, Deventer, NL
NADH-Na ₂ -Salz	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, D
Nalidixinsäure	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, D
Oligonukleotide (Auftragssynthesen)	MWG Biotech AG, Ebersberg, D
p-Cumarsäure	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, D
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase [2,5 U/μl]	MBI Fermentas, Vilnius, LT

Pepton aus Fleisch	Serva, Heidelberg, D
Proteinase K	Merck, Darmstadt, D
RNase A	Merck, Darmstadt, D
Roti [®] -Phenol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
Salzsäure	Riedel-de Haën, Seelze, D
Sojamehl (fettarm)	Reformhaus Hensel, Magstadt, D
Spectinomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, NL
Streptomycin	Boehringer Mannheim, Mannheim, D
T4-DNA-Ligase [1 U/ μ l]	MBI Fermentas, Vilnius, LT
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase [5 U/ μ l]	MBI Fermentas, Vilnius, LT
TEMED	Merck, Darmstadt, D
Tetracyclin-HCl	Roche diagnostics, Mannheim, D
Thiostrepton	Squibb & Sons, New York, USA
Tris	ICN Biochemicals, Meckenheim, D
Tryptic soya broth	bioMérieux, Marcy l'Etoile, F
Trypton	Difco, Augsburg, D
Tryptophan (L-Tryptophan)	Berlin Chemie AG, Berlin D
Tween 20 [®]	ICN Biochemicals, Meckenheim, D
λ -DNA [0,3 mg/ml]	MBI Fermentas, Vilnius, LT

2.3 Mikroorganismen und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tab. 2.2 aufgeführt. In Tab. 2.3 sind die Vektoren und Plasmide und deren Eigenschaften, sowie deren Verwendungszweck zusammengefasst.

Tab. 2.2: Übersicht über die verwendeten Mikroorganismen

ORGANISMUS	STAMM	GENOTYP	REFERENZ
<i>Escherichia coli</i>			
<i>E. coli</i>	TG1	<i>supE thi- 1 Δ (lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(r_K- m_K-) [F' <i>traD36 pro AB lacI^fZ ΔM15]</i></i>	GIBSON, 1984
<i>E. coli</i>	XL1 Blue	<i>recA 1 endA1 gyrA96 thi-1 sdR 17 supE44 relA1 lac [F' <i>pro AB lacI^fZ Δ M15 Tn10 (Tet^R)]</i></i>	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i>	XL1 Blue MRA	<i>Δ(mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi- 1 gyrA96 relA1 lac</i>	Stratagene
<i>E. coli</i>	ET12567	<i>F-dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202::Tn10 galK2 gasIT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44 (Cml^R, Kan^R)</i>	MACNEIL <i>et al.</i> , 1992
<i>E. coli</i>	S17-1	<i>pro, thi, hsdR</i> , RP4-Derivat im Genom integriert, tet::Mu, kan::Tn7(Sp ^R Sm ^R), Tn1	SIMON <i>et al.</i> , 1983
<i>Pseudomonas sp.</i>			
<i>P. pyrocinia</i>	ATCC 15958	wt, Pyrrolnitrinproduzent	IMANAKA <i>et al.</i> , 1965
<i>P. fluorescens</i>	BL915	wt, Pyrrolnitrinproduzent	HILL <i>et al.</i> , 1994
<i>P. fluorescens</i>	BL915 ΔORF1	Prn ⁻ , Mutante in Trp-7-Hal (<i>prnA</i>) (Kan ^R)	HAMMER <i>et al.</i> , 1997
<i>P. fluorescens</i>	BL915 ΔORF1 pSZexM2	Prn ⁻ , Mutante in Trp-7-Hal (<i>prnA</i>) ; Expression des Halogenasegens <i>pyrH</i> (Kan ^R , Tet ^R)	diese Arbeit
<i>Streptomyces sp.</i>			
<i>S. rugosporus</i>	LL-42D005 NRRL 21084	wt, Pyrroindomycinproduzent	DING <i>et al.</i> , 1994
<i>S. rugosporus</i>	pSET152	pSET152- Integration in wt (Apr ^R)	diese Arbeit
<i>S. rugosporus</i>	SZTF1Hal	Mutation im Halogenasegen <i>pyrH</i> (Apr ^R)	diese Arbeit
<i>S. albus</i>	J1074	<i>ilv-1 sal-2 R⁻ M⁻</i>	CHATER & WILDE, 1980
<i>S. albus</i>	SZ12D4	<i>ilv-1 sal-2 R⁻ M⁻</i> , Cosmid 12D4 (Apr ^R)	diese Arbeit

Tab. 2.3: Übersicht über die verwendeten Vektoren und Plasmide

VEKTOREN	kb	EIGENSCHAFTEN	VERWENDUNG	REFERENZ
pUC18/pUC19	2,7	Plasmid ori, <i>bla</i> , <i>lacZα</i>	Klonierung, Sequenzierung	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
pBluescript SK II+	2,9	ori (ColE1), ori (f1), <i>bla</i> , <i>lacZα</i>	Klonierung, Sequenzierung	Stratagene
pUK21	3,1	ori (rep) ori (M13) <i>lacZα</i> , <i>kan</i>	Klonierung	VIERA & MESSING, 1991
pSET152	5,5	ori (pUC18), <i>lacZα</i> <i>aac(3)IV</i> , int, attP (ϕ C31) oriT(RK2)	Integration in <i>Streptomyces</i> ϕ C31-site specific	BIERMAN <i>et al.</i> , 1992
pOJ446	10,4	oriT(RK2), <i>aac(3)IV</i> , ori(SCP2), cos	Klonierung Cosmidgenbank	BIERMAN <i>et al.</i> , 1992
pCIBhis	21,1	oriT, oriV, <i>tra</i> , <i>tet</i> , P _{<i>tac</i>} , (his) ₆ -tag	Expression in <i>Pseudomonas</i>	WYNANDS & SCHMID, persönl. Mitteilung, 2000
pEFBA	4,4	ori (pUC18), ori(f1), <i>bla</i> , <i>aac(3)IV</i>	Klonierung	FERNANDÉZ, persönl. Mitteilung, 2001
pHZ1358	10,7	ori(ColE1), <i>bla</i> , cos, oriT(RP4), <i>tsr</i> , ori (pIJ101), <i>rep sti</i> (pIJ101), Tn5(<i>neo</i>)	Klonierung, Inaktivierung in <i>Streptomyces</i>	BAO & DENG, 2000
PLASMIDE				
pWB-FA	4,4	Derivat von pUC18, enthält ein 1,7 kbp <i>Bam</i> HI-Insert (<i>prnA</i>) aus <i>P. fluorescens</i>	Herstellung von <i>prnA</i> -Sonde	BURD, Arbeitsbericht, 1998
pHI1536	7,2	pUC18-Derivat, enthält ein 4,5 kbp- <i>Kpn</i> I/ <i>Pae</i> I- Insert aus <i>S. albobruseolus</i>	Herstellung von „PCR- <i>thal</i> “-Sonde	SCHNERR, 1999
pSZ-PKS-Familie	3,5	pUC19-Derivate, enthalten PCR-PKS- Fragmente (750 bp) (<i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III)	Sequenzierung, Herstellung von „PCR-PKS“- Sonden	diese Arbeit
pSP11-14-Familie		pUC19-Derivate, enthalten: <i>random-Bgl</i> II- Fragmente aus Cosmid 7D3	Sequenzierung	diese Arbeit
pSP41-45-Familie		pUC19-Derivate, enthalten: <i>random-Bgl</i> II- Fragmente aus Cosmid 29H5	Sequenzierung	diese Arbeit
pSP50-51-Familie		pUC19-Derivate, enthalten: <i>random-Bgl</i> II- Fragmente aus Cosmid 63A1	Sequenzierung	diese Arbeit
pSZ26B	4,3	pUC18-Derivat, enthält <i>Bam</i> HI-Fragment (1,6 kbp) aus Cosmid 26D4	Sequenzierung	diese Arbeit

pSZ26P	6,7	pUC18-Derivat, enthält <i>Pst</i> I-Fragment (4000 bp) aus Cosmid 26D4	Sequenzierung	diese Arbeit
pB1G	7,2	pBluescript SKII+-Derivat mit <i>Bam</i> HI-Fragment (4,3 kbp) aus Cosmid 6C1	Sequenzierung	diese Arbeit
pSZ12Sal-Familie		pBluescript SKII+-Derivate mit <i>random-Sal</i> I-Fragmenten aus Cosmid 12D4	Sequenzierung	diese Arbeit
pSZHA1 = pSZ594	8,7	pB1G mit ~1,5 kbp Apramycinkassette aus pEFBA im Insert kloniert	Konstruktion für Inaktivierung	diese Arbeit
pSZ614	16,5	pHZ1358-Derivat mit <i>Bam</i> HI-Fragment (5,8 kbp) aus pSZ594	Inaktivierungs-konstrukt	diese Arbeit
pBSKexM1 pBSKexM2	4,5 4,4	pBluescript SKII+-Derivate mit PCR-Amplifikat: ORF-Hal (<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III)	Sequenzierung der Expressions-konstrukte	diese Arbeit
pSZexM1 pSZexM2 (siehe Anhang Abb. A.2)	22,7 22,6	pCIBhis-Derivate mit Halogenase-ORF aus pBSKexM1/pBSKexM2 (<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III)	Expression der Halogenase	diese Arbeit
pSZ1050	4,7	pUK21-Derivat mit Halogenase-ORF aus pBSKexM2 (<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III)	zur Expression mit Genen des Rebeccamycin-genclusters	diese Arbeit

2.4 Medien und Kulturbedingungen

Die Methoden zur Züchtung von *E. coli* und *Streptomyces* sp. wurden grundlegend von SAMBROOK *et al.* (1989) und KIESER *et al.* (2000) beschrieben. Im Folgenden sind die verwendeten Kulturmedien und Bedingungen für die Kultivierung im Detail aufgeführt. Die Medien und Zusätze wurden bei 121°C/2,1 bar in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre für 30 min autoklaviert. Antibiotika wurden sterilfiltriert.

2.4.1 Medien für die Kultivierung von *E. coli* und *Pseudomonas* sp.

Für entsprechende Festmedien wurden die angegebenen Rezepturen mit 1,5 % (w/v) Agar komplettiert.

LB-Medium [SAMBROOK *et al.*, 1989]:

10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, in dest. Wasser

Dieses Medium wurde für die Herstellung kompetenter Zellen, Präparation von Zellen für die Konjugation sowie für die DNA-Isolierung zur Sequenzierung verwendet.

HNB-Medium:

3 g/l Fleischextrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, in dest. Wasser.

Dieses Medium wurde standardmäßig zur Züchtung von *E. coli* und *Pseudomonas* sp. für DNA-Isolierungen verwendet.

GYT-Medium [TUNG & CHOW, 1995]:

100 g/l (w/v) Glycerin; 1,25 g/l Hefeextrakt; 2,5 g/l Trypton aus Fleisch; in dest. Wasser

Dieses Medium wurde zum Suspendieren elektrokompenter Zellen (*E. coli*) eingesetzt.

SOB-Medium [SAMBROOK *et al.*, 1989]:

20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 1 ml 250 mM KCl; in dest. Wasser

SOC-Medium [SAMBROOK *et al.*, 1989]:

1 ml SOB Medium ergänzen mit 5 µl einer sterilen 2 M MgCl₂-Lösung und 20 µl einer sterilen 1 M Glucoselösung.

Dieses Medium wurde zur Regeneration frisch transformierter Zellen (*E. coli*) eingesetzt.

PMM-Medium [KIRNER *et al.*, 1996]:

8 g/l K₂HPO₄ x 3H₂O; 3 g/l KH₂PO₄; 1 g/l (NH₄)₂SO₄; 6,75 g/l Na₂-succinat; pH 7,0 in dest Wasser; nach dem Autoklavieren 600µl 1 M MgSO₄ steril zugeben.

Dieses Medium wurde für die Konjugation von *E. coli* mit *Pseudomonas* sp. eingesetzt. Auf diesem Medium können nur *Pseudomonas* sp. wachsen, nicht *E. coli*. Es wurde nur als Festmedium verwendet.

Mais-Melasse-Medium:

25 g/l Melasse; 2,1 g/l Maismehl; 10 g/l Malzextrakt; 10 g/l Hefeextrakt; 30 g/l Saccharose; 2 g/l KH₂PO₄; in dest Wasser; pH 7 mit KOH.

Dieses Medium wurde zur Proteinexpression in *Pseudomonas* sp. eingesetzt.

2.4.2 Medien für die Kultivierung von *Streptomyces* sp.

Die Festmedien für *Streptomyces* sp. wurden mit 2 % Agar hergestellt.

Mannit-Soja-Medium (MS) [HOBBS *et al.*, 1989]:

20 g/l Sojamehl fettarm, 20 g/l Mannit. Mannit in dest. Wasser lösen und erhitzen. Sojamehl unter Rühren langsam in die heisse Lösung geben, anschließend Agar zusetzen, autoklavieren.

Dieses Medium wurde zur Sporulation von *S. rugosporus* verwendet.

NZ-Amine A Medium (ATCC 172 Medienkatalog):

10 g/l Glucose (nach Autoklavieren steril hinzufügen); 20 g/l lösliche Stärke; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NZ-Amine A (Sigma C0626); 1 g/l CaCO₃; in dest. Wasser.

Dieses Medium wurde für *S. rugosporus* zur Gesamt-DNA-Isolierung verwendet.

SO7-Produktionsmedium [ABBANAT *et al.*, 1999]:

10 g/l Glucose; 20 g/l Melasse; 1 g/l Eisenammoniumcitrat (grün); 1 g/l CaCO₃; 10 g/l Bacto-Pepton (nach autoklavieren steril hinzufügen); in dest. Wasser.

Produktionsmedium für Pyrroindomycine aus *S. rugosporus*.

R5A-Medium [FERNÁNDEZ *et al.*, 1998]:

103 g/l Saccharose; 0,25 g/l K₂SO₄; 10,12 g/l MgCl₂ x 6H₂O; 10 g/l Glucose; 0,1 g/l Casaminosäuren; 5 g/l Hefeextrakt; 2 ml Spurenelementelösung; 21 g/l MOPS; in dest. Wasser; pH 6,8 mit KOH. Allgemeines Produktionsmedium für *Streptomyces* sp.

R5-Medium [HOPWOOD *et al.*, 1985]:

103 g/l Saccharose; 0,25 g/l K₂SO₄; 10,12 g/l MgCl₂ x 6H₂O; 10 g/l Glucose; 0,1 g/l Casaminosäuren; 5 g/l Hefeextrakt; 5,73 g/l TES-Puffer; 2 ml Spurenelementelösung; in dest. Wasser. Nach dem Autoklavieren werden folgende Lösungen steril zugestzt: 10 ml einer 0,5% KH₂PO₄-Lösung; 4 ml einer 5M CaCl₂-Lösung; 15 ml einer 20% L-Prolinlösung und 7 ml einer 1N NaOH-Lösung. Regenerationsmedium für Protoplasten

Spurenelementelösung [KIESER *et al.*, 2000]:

40 mg/l ZnCl₂; 200 mg/l FeCl₃ x 6H₂O; 10 mg/l CuCl₂ x 2H₂O; 10 mg/l MnCl₂ x 4H₂O; 10 mg/l Na₂B₄O₇ x 10H₂O; 10 mg/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O; in dest. Wasser.

TSB-Medium [McCULLOGH, 1949]:

30 g/l Tryptic soya broth, in dest. Wasser.

Das Medium wurde zur Züchtung und Protoplastierung von *S. albus* verwendet.

2.4.3 Antibiotika und Mediensupplemente

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antibiotika und Mediensupplemente sind in Tab. 2.4 zusammengefasst. Die entsprechenden Konzentrationen der Stammlösungen c_0 (mg/ml) und die verwendeten Lösungsmittel, sowie die Endkonzentrationen im Medium c_E (μ g/ml) sind angegeben.

Tab. 2.4: Antibiotika und Mediensupplemente

ZUSÄTZE	LÖSUNGSMITTEL	STAMMLÖSUNG [c_0]	ENDKONZENTRATION [c_E]	STÄMME
Ampicillin	dest. Wasser	100 mg/ml	100 μ g/ml	<i>E. coli</i>
Apramycin	dest. Wasser	100 mg/ml	100 μ g/ml	<i>E. coli</i>
Chloramphenicol	EtOH 100 %	100 mg/ml	25 (5) μ g/ml ¹	<i>Streptomyces</i>
Kanamycin	dest. Wasser	50 mg/ml	50 μ g/ml	<i>E. coli</i>
		25mg/ml	25 μ g/ml	<i>E. coli</i>
			50 μ g/ml	<i>Pseudomonas</i>
Spectinomycin	dest. Wasser	50 mg/ml	100 μ g/ml	<i>E. coli</i>
Streptomycin	dest. Wasser	50 mg/ml	30 μ g/ml	<i>E. coli</i>
Tetracyclin	EtOH 50% v/v	10mg/ml	15 μ g/ml	<i>E. coli</i>
			30 μ g/ml	<i>Pseudomonas</i>
Thiostrepton	DMSO	50 mg/ml	25 (5) μ g/ml ¹	<i>Streptomyces</i>
Nalidixinsäure	0,15 M NaOH	25 mg/ml	20 μ g/ml	<i>Streptomyces</i>
IPTG	dest. Wasser	200 mM	200 μ M	<i>E. coli</i>
X-Gal	DMF	2 % (v/v)	0,004 % (v/v)	<i>E. coli</i>
Maltose	dest. Wasser	2 % (v/v)	0,2 % (v/v)	<i>E. coli</i>

¹ Die in Klammern angegebene Endkonzentration gilt für Flüssigmedien.

2.4.4 Stammhaltung

2.4.4.1 Zellsuspensionen in Glycerin für *E. coli* und *Pseudomonas sp.*

E. coli und Pseudomonaden wurden in 5 ml HNB-Medium (flüssig) mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht gezüchtet. Die Zellen wurden geerntet und in 800 μ l frischem Medium mit entsprechendem Antibiotikum suspendiert. Es wurden 200 μ l Glycerin steril zugegeben. Diese Zellsuspension wurde sofort bei -80°C eingelagert.

2.4.4.2 Streptomyceten Sporensuspension

Von Streptomyceten wurde zur Lagerung eine Sporensuspension hergestellt [KIESER *et al.*, 2000]. Dazu wurde eine Platte dicht mit dem Stamm beimpft und inkubiert, bis ausreichende Luftmycel- und Sporenbildung stattgefunden hatte (bis zu 10 Tage).

Zur Ernte der Sporen wurden 9 ml steriles Wasser auf die Agarplatte gegeben und das Luftmycel mit den Sporen entweder mit einer Impföse oder einem sterilen Wattetupfer vom Mycel gelöst. Wurden viele größere Mycelfragmente dabei von der Platte gerieben, wurde die Suspension durch sterile Watte filtriert. Die Suspension wurde in ein Universal[®] überführt und 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Sporen wurden nochmals mit dest. Wasser gewaschen und in gleicher Weise zentrifugiert. Anschließend

wurden die Sporen im verbleibenden Tropfen Flüssigkeit resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 20 % Glycerin (v/v) auf 1 ml verdünnt und im 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei -80°C eingelagert.

2.4.5 Kultivierung

2.4.5.1 Kultivierung von *E. coli* und *Pseudomonas* sp.

Zur Kultivierung von *E. coli* und *Pseudomonas* sp. wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine Einzelkolonie von einer frischen Agarplatte gepickt und damit flüssiges Medium beimpft.

Plasmidhaltige Stämme wurden unter Selektionsbedingungen gezüchtet. *E. coli* wurde bei 37°C , *Pseudomonas* sp. bei 30°C in Schüttelmaschinen mit 150 rpm kultiviert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Kulturen 12-16 h inkubiert.

2.4.5.2 Kultivierung von *Streptomyces* sp.

Zur Kultivierung von *Streptomyces* sp. wurden Kulturflaschen mit Schikane oder Erlenmeyerkolben mit Edelstahlspirale verwendet, um ein feindisperses Wachstum zu erreichen und für ausreichenden Sauerstoffeintrag ins Medium zu sorgen. Das Kulturvolumen betrug maximal 1/3 des Kolbenvolumens. Die Vorkultur wurde mit frisch geernteten Sporen oder einer Sporensuspension dicht beimpft und bei $27-30^{\circ}\text{C}$ und > 150 rpm für min 36 h kultiviert. Damit wurde die Hauptkultur beimpft, die bei $27-30^{\circ}\text{C}$ und > 150 rpm $\sim 66-72$ h gezüchtet wurde.

2.5 Puffer, Lösungen und Reagenzien für molekulargenetische Arbeiten

Um Kontaminationen mit Mikroorganismen oder Nukleasen zu vermeiden, wurden alle molekulargenetischen Arbeiten mit sterilen Materialien durchgeführt. Dazu wurden verwendeten Geräte, Gefäße und Lösungen sterilisiert. Lösungen wurden im Autoklaven bei $121^{\circ}\text{C}/2,1$ bar für 30 min, thermostabile Geräte und Gefäße im Heißluftsterilisator bei 160°C für 4 h sterilisiert. Hitzelabile Lösungen wurden durch sterile Mikrofilter der Porengröße $0,25\ \mu\text{m}$ sterilfiltriert. Detergenzien und organische Lösungsmittel wurden nicht sterilisiert.

2.5.1 Allgemein verwendete Lösungen

TE-Puffer

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0 mit HCl, in dest. Wasser	

RNase-Stammlösung

RNase	1 mg
in Saline	1 ml

RNase vollständig lösen und 15 min bei 96°C inkubieren,
Lagerung bei -20°C

**TE-RNase
(20 µg/ml)**

RNase-Stammlösung	20 µl
in TE-Puffer	1 ml

SM-Puffer für Phagen

Tris	20 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 mM
NaCl	500 mM
Gelatine	1 g/l

Gelatine in 10 ml dest. Wasser durch Erhitzen vollständig lösen,
weitere Lösungsbestandteile zufügen, pH 7,5 mit HCl einstellen

Saline

NaCl	5 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,12 g/l
in dest. Wasser	

2.5.2 Lösungen für die DNA-Isolierung**alkalische-Lyse-Lösung I**

Glucose	50 mM
Tris	20 mM
EDTA	10 mM
pH 8,0 mit HCl, in dest. Wasser	

alkalische-Lyse-Lösung II

SDS (w/v)	1 %
NaOH	0,2 M

alkalische-Lyse-Lösung III

5 M Kaliumacetat	60 ml
Eisessig	11,5 ml
dest. Wasser	28,5 ml

Lysozymlösung für DNA-Isolierung nach KIESER (2.8.3)

Saccharose	0,3 M
Tris	25 mM
EDTA	25 mM
in dest. Wasser	

pH 8,0 mit HCl einstellen, Lysozym 2 mg/ml in Lysozymlösung
wird sterilfiltriert und direkt vor dem Gebrauch zugegeben

alkalische SDS-Lösung für DNA-Isolierung nach KIESER (2.8.3)

SDS (w/v)	2 %
NaOH	0,3 M
in dest. Wasser	

Lysozympuffer (Gesamt-DNA-Isolierung)

Tris	10 mM
Saccharose	0,3 M
pH 8,0 mit HCl, in dest. Wasser	

NAE-Puffer

NaCl	0,15 M
EDTA	0,1 M
pH 8,0 mit NaOH, in dest. Wasser	

2.5.3 Agarosegelelektrophorese**TAE-Puffer 50x**

Tris	2 M
EDTA	50 mM
Eisessig	57 ml

mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen, vor Gebrauch verdünnen
1x für Agarosegele und Elektrophorese-Puffer

BPB-Ladepuffer

Saccharose (w/v)	25 %
Bromphenolblau (w/v)	0,05 %
EDTA, pH 8,0	100 mM
in dest. Wasser	

EL-F-Lösung

Saccharose (w/v)	25 %
Ficoll 400 (w/v)	3 %
SDS (w/v)	0,05 %
Bromphenolblau (w/v)	0,04 %
in dest. Wasser	

2.5.4 Lösungen für DNA-Blot und Hybridisierung**Denaturierungslösung**

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M
in dest. Wasser	

Neutralisationslösung

NaCl	1,5 M
Tris-OH	0,5 M
EDTA	1 mM
pH 7,2 mit HCl, in dest. Wasser	

20xSSC

NaCl	3 M
Na-Citrat	0,3 M
pH 7,0 mit NaOH, in dest. Wasser	

Blocking- Stammlösung

Blockingreagenz [®] (w/v) in Maleinsäurepuffer	10 %
--	------

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	0,1 M
NaCl	0,15 M
NaOH	0,2 M
pH 7,5 mit NaOH (fest), in dest. Wasser	

Waschpuffer

Tween 20 [®] (w/v) in Maleinsäurepuffer	0,3 %
---	-------

Blockpuffer II

Magermilchpulver (w/v) in Maleinsäurepuffer	3 %
--	-----

Detektionspuffer III

Tris	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl ₂	50 mM
pH 9,5 mit HCl, in dest. Wasser	

Rehybridisierungslösung

NaOH	0,2 M
SDS (w/v) in dest. Wasser	0,1 %

2.6 Organische Lösungen

Phenol-Chloroform-Mischung

Phenol	50 %(v/v)
Chloroform	49 %(v/v)
Isoamylalkohol	1 %(v/v)

mischen und zur Phasentrennung stehen lassen,
kühl und dunkel lagern

saures Phenol- Chloroform

Phenol kristallin	5 g
Chloroform	5 ml
dest. Wasser	1 ml
8-Hydroxychinolin	5 mg

vollständig lösen, mischen und zur Phasentrennung stehen lassen,
kühl und dunkel lagern

2.7 Puffer, Lösungen und Reagenzien für biochemische Arbeiten

0,1 M KPP, pH 7,2 [GREEN, 1933]

$K_2HPO_4 \times 6 H_2O$	16,4 g/l
KH_2PO_4	3,9 g/l
in dest Wasser	

0,01 M KPP, pH 7,2 [GREEN, 1933]

$K_2HPO_4 \times 6 H_2O$	1,4 g/l
KH_2PO_4	0,5 g/l
in dest Wasser	

0,1 M Tris, pH 8,5

Tris	12,1 g/l
pH 8,5 mit HCl	
in dest. Wasser	

2.7.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Elektrophoresepuffer PAGE (4x)

25 mM Tris	12,1 g/l
200 mM Glycin	57,5 g/l
3 mM SDS	4,0 g/l
in dest. Wasser	

Verdünnung 1:4 zur Elektrophorese

Auftragspuffer (PAGE)

8 M Harnstoff	48,05 g
100 mM Tris	1,2 g
70 mM SDS	2,0 g

mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen;
bei 4°C aufbewahren, vor Gebrauch auf RT erwärmen

DTT	200 mM DTT in Auftragspuffer	30 mg 1 ml
BPB- Lösung	14 mM Bromphenolblau in Auftragspuffer	0,1 g 10 ml
PAGE Lösung I	4 M Acrylamid 50 mM Bisacrylamid	29,2 g 0,9 g
mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen, vollständig lösen, filtrieren; dunkel und kühl (4°C) aufbewahren		
PAGE-Lösung II	7 mM SDS 75 mM Tris	0,4 g 18,16 g
pH 8,8 mit HCl, mit dest. Wasser auf 200 ml auffüllen		
PAGE-Lösung III	25 mM SDS 7 mM Tris	0,2 g 3,03 g
pH 6,8 mit HCl, mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen		
APS	9 mM (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ in dest. Wasser	0,21 g 10 ml
nach der Herstellung wurde die Lösung sofort aliquotiert und bei -20°C eingelagert		

2.7.2 Puffer für den Western-Blot

Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol	3,03 g 14,4 g 100 ml
mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen		

2.7.3 Coomassie-Färbung

Färber für SDS- Polyacrylamidgele	Coomassie Brilliant Blue R250 Methanol dest. Wasser Essigsäure	1,3 g 220 ml 220 ml 60 ml
Coomassie-Farbstoff in Methanol lösen, anschließend dest. Wasser und Essigsäure zugeben		
Entfärber für SDS-Polyacrylamidgele	Ethanol Eisessig dest. Wasser	250 ml 150 ml 600 ml

Färber für PVDF- Membranen

Coomassie Brilliant Blue R250	0,1 g
Methanol	50 ml
Eisessig	7 ml
dest. Wasser	43 ml

Coomassie-Farbstoff in Methanol lösen,
anschließend dest. Wasser und Eisessig zugeben

Entfärber I für PVDF-Membran

Methanol	100 ml
Eisessig	14 ml

mit dest. Wasser auf 200 ml auffüllen

Entfärber II für PVDF-Membran

Methanol	180 ml
Eisessig	20 ml

2.7.4 Immunodetektion und Detektionsreagenzien**Tris-gepufferte Saline (TBS)**

10 mM Tris	1,21 g/l
150 mM NaCl	8,77 g/l
pH 7,5 mit HCl, in dest. Wasser	

TBS-T

0,05 % Tween 20 [®] (v/v) in TBS	0,5 ml 1000 ml
--	-------------------

TBS-Milch

5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS	0,5 g 10 ml
--------------------------------------	----------------

Antikörperlösung

Anti-Xpress-HRP [®] Antibody (0,5 µg/ml) in TBS-Milch	2 µl 10 ml
---	---------------

Luminol-Lösung

2,5 mM 3-Aminophthalhydrazid in 0,5 ml DMSO lösen	22,5 mg
mit 0,1 M Tris (pH 8,5) auf 50 ml auffüllen; bei 4°C dunkel lagern	

Enhancer-Lösung

90 mM p-Cumarsäure (p-Hydroxycimtsäure) in DMSO	37 mg 2,5 ml
dunkel und kühl (4°C) lagern	

H₂O₂-Lösung

30 % H ₂ O ₂ in 0,1 M Tris (pH 8,5)	6,1 µl 10 ml
immer frisch herstellen	

Detektionsreagenz

Luminollösung	10 µl
Enhancerlösung	44 µl
H ₂ O ₂ -Lösung	10 ml

2.7.5 Metal-Chelating-Chromatographie**Auftragspuffer**

0,01 M KPP, pH 7,2

Nickelsulfatlösung0,2 M NiSO₄ x 6H₂O 52,57 g/l**Waschpuffer I**0,06 M Imidazol 4,08 g/l
in 0,01 M KPP
pH 7,2 mit H₃PO₄ einstellen**Waschpuffer II**0,1 M Imidazol 6,81 g/l
in 0,01 M KPP
pH 7,2 mit H₃PO₄ einstellen**Elutionspuffer**0,2 M Imidazol 13,62 g/l
in 0,01 M KPP
pH 7,2 mit H₃PO₄ einstellen**2.7.6 Stammlösungen für den Aktivitätstest****NADH**0,05 M NADH-Na₂-Salz 35,5 mg/ml
in dest. Wasser**FAD**0,05 M FAD-Na₂-Salz 41,5 mg/ml
in dest. Wasser**Substratlösung**10 mM L-Tryptophan 2 mg/ml
zum vollständigen Lösen erwärmenCofaktorstammlösungen zu je 100 µl aliquotieren,
bei -20°C unter Lichtausschluss aufbewahren

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

2.8.1 Plasmidisolierung durch alkalische Lyse

Die Isolierung von Plasmid-DNA und Cosmid-DNA aus *E. coli* in kleinen Mengen wurde durch die Methode der alkalischen Lyse, beschrieben bei BIRNBOIM & DOLY (1979), durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Zellen unter alkalischen Bedingungen lysiert. Die DNA wird dabei denaturiert. Durch nachfolgende schnelle Neutralisation kann nur Plasmid-DNA wieder renaturieren und in Lösung gehen. Chromosomale DNA bleibt denaturiert, wird bei der Fällung von Kaliumdodecylsulfat mit den ausfallenden Proteinen in den Niederschlag gerissen und bleibt unlöslich.

Die Zellen aus 2 ml Übernachtskultur (HNB) wurden in 2 ml Reaktionsgefäße (PP) überführt und 20 s mit 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung kalter alkalische-Lyse-Lösung I suspendiert. Zum Lysieren der Zellen wurden 200 µl alkalische-Lyse-Lösung II dazu gegeben, die Gefäße verschlossen und viermal umgedreht. Nach zwei Minuten wurden 150 µl gekühlte alkalische-Lyse-Lösung III zupipettiert; abermals wurde durch Umdrehen der Gefäße gemischt. Danach wurde der Niederschlag durch zehnmütiges Zentrifugieren mit 12000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde mit 80 µl Phenol-Chloroform-Mischung extrahiert und 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. Dazu wurden 350 µl Isopropanol gegeben, gemischt und zentrifugiert (10 min/12000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das weiße Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Der restliche Alkohol wurde vollständig entfernt und die DNA getrocknet (2-5 min/60°C). Das Pellet wurde in 40 µl TE-RNase-Lösung gelöst und bei 37°C 15 min inkubiert. So präparierte Plasmid- und Cosmid-DNA ist bei -20°C lagerfähig oder wurde sofort weiterverwendet.

2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA zur Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden die Klone in 5 ml LB über Nacht bei 37°C gezüchtet. Die Gewinnung von Plasmid-DNA in sehr reiner Form wurde mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II[®] der Firma peQLab realisiert. Die DNA wurde zweimal mit 70 µl dest. Wasser bei 40°C eluiert und im Vakuum getrocknet.

2.8.3 Alkalische Lyse nach KIESER

Diese Methode wurde zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Streptomyceten von KIESER (1984) beschrieben.

Die Bakterien wurden in 25 ml Medium gezüchtet. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Zellpellet einmal mit 10,3 %iger Saccharoselösung gewaschen. Etwa 1 g Zellen wurden in 5 ml Lysozymlösung resuspendiert. Diese Lösung wurde in 500 µl Aliquots aufgeteilt und 30 min bei 37°C unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Aliquot 250 µl alkalische SDS-Lösung zugegeben und sofort gemischt; 15 min bei 70°C (30 min für Plasmide \geq 20 kb) inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Dazu wurden 80 µl saures Phenol/Chloroform gegeben und 10 s kräftig gemischt. Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert und die wässrige Phase in 70 µl ungepufferte 3 M Natriumacetatlösung gegeben. Dazu wurden 700 µl Isopropanol pipettiert, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und vom Überstand vollständig befreit. Das Pellet wurde in TE-Puffer aufgelöst, mit 25 µl 100 mM Spermin-HCl versetzt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und in 300 µl 0,3 M Natriumacetat + 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Dazu wurden 700 µl 96 %iger Ethanol pipettiert und 60 min bei -20°C inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und einmal mit eisgekühltem 75 %igem Ethanol, und anschließend einmal mit 96 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet, in 50 µl TE-RNase-Puffer aufgelöst und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt. Da die Ausbeute dabei meist sehr gering ist, wurden die Plasmide zur Analyse in *E. coli* transformiert (2.11.2) und anschließend wie in 2.7.1 beschrieben isoliert.

2.9 Isolierung von Gesamt-DNA

2.9.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Streptomyces rugosporus*

Diese Methode wurde von TÖLZER (1998) beschrieben. Die Methode erlaubt die Isolierung sehr gering fragmentierter chromosomaler DNA. Das ist unbedingt notwendig für die Konstruktion einer Cosmidgenbank.

S. rugosporus wurde in NZ-Amine A Medium, wie in 2.4.5 beschrieben, gezüchtet.

Aus 100 ml Kultur wurden die Zellen nach 50-60 h geerntet. Man zentrifugiert 15 min bei 4000 rpm und wäscht das Pellet zweimal mit 10,3 % Saccharose.

Das Zellpellet wurde in 15 ml Lysozympuffer resuspendiert, 10 mg/ml Lysozym zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurde wieder zentrifugiert, die überstehende Lösung verworfen und das Pellet in 10 ml NAE-Puffer suspendiert. Dazu wurden 2 ml Proteinase K-Lösung (1 mg/ml in NAE-Puffer) und 2 ml 10 % SDS gegeben. Es wurde unter gelegentlichem Umschütteln für 3-4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die

Suspension auf 60°C erwärmt und weitere 20 min bei 60°C inkubiert. Es wurden 5 ml dest. Wasser zur Suspension zugefügt und zweimal mit Phenol-Chloroform-Mischung extrahiert. Zwischen den Extraktionsschritten wurde je 10 min zentrifugiert (4°C/4000 rpm) und der Überstand mit einer abgeschnittenen 1-ml-Pipettenspitze abgenommen. Der Überstand wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 6, versetzt, sanft gemischt und zur Fällung der DNA mit 96 %igem Ethanol überschichtet. Bei langsamem Bewegen des Gefäßes wurden an der Phasengrenze DNA-Fäden sichtbar, die durch weitere Bewegung zu einem Knäuel aufgewickelt werden konnten. Dieses Knäuel wurde mit einem Glashaken (geschmolzene Pasteurpipette) aus dem Gefäß entnommen. Die DNA wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum (speedvac) vollständig getrocknet. Das Pellet wurde in 1 ml TE-RNase Lösung gelöst und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die so isolierte DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.9.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Pseudomonas* sp.

Die Methode nach DAVIS *et al.* (1980) wurde zur Isolierung von Gesamt-DNA in kleinen Mengen aus *Pseudomonas* sp. angewandt.

Die Zellen wurden in 20 ml HNB über Nacht bei 30°C gezüchtet. Von dieser Übernachtskultur wurden je Ansatz 0,5 ml Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Lysozypuffer suspendiert, 2 mg/ml Lysozym zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Dazu wurde 1 µl DEPC und 10 µl 10 %ige SDS-Lösung pipettiert, gemischt und 5 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 5 M Kaliumacetat (pH 4,8) zugegeben und kräftig gemischt. Nach 45minütiger Inkubation auf Eis wurde der Niederschlag durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Überstand wurde dekantiert und daraus die DNA mit 96 %igem EtOH gefällt. Der Niederschlag wurde pelletiert und mit 70 %igem EtOH gewaschen, getrocknet und in TE-RNase gelöst. Zur vollständigen Entfernung der RNA wurde 30 min bei 37°C inkubiert, anschliessend mit Phenol-Chloroform extrahiert, die DNA mit Isopropanol gefällt und in dest. Wasser gelöst. Die so isolierte DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.10 Reinigung und Analyse von DNA

2.10.1 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen

Die Extraktion von DNA-Lösungen erfolgte zur Reinigung der DNA von Proteinen, zur Inaktivierung und Abtrennung von Restriktionsenzymen oder DNA-modifizierenden Enzymen.

Konzentrierte DNA-Lösungen wurden vor der Extraktion mindestens 1:10 verdünnt. Dazu wurden 80-150 µl Phenol-Chloroform-Lösung gegeben und kräftig gemischt. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei hoher Drehzahl zentrifugiert. Die obere Phase (wässrige Phase) wurde vorsichtig abpipettiert. Die DNA muss vor der weiteren Verwendung gefällt und gewaschen werden, um mögliche Störung nachfolgender Schritte durch gelöstes Phenol zu vermeiden.

2.10.2 Fällung von DNA

Die Fällung der DNA aus wässrigen Lösungen wird zur Reinigung und Konzentrierung oder zum Wechsel der Puffer angewandt.

Die Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung, pH 6,0, versetzt und gemischt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von Isopropanol. Die Menge von zugesetztem Isopropanol entsprach dem 0,8fachen des DNA-Lösungsvolumen. Es wurde gut durchmischt (nicht vortexten!) und der Niederschlag abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen, getrocknet und in dest. Wasser gelöst.

2.10.3 Bestimmung der Reinheit und der Konzentration von DNA

Die Bestimmung der Reinheit bzw. der Gehalt einer DNA-Präparation an Verunreinigung mit Phenol und Proteinen kann über den Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt werden. Bei einer reinen DNA-Lösungen ist der Quotient 260/280 nm >1,8. Phenol und Proteine absorbieren bei 280 nm. Verunreinigte DNA-Lösungen haben einen niedrigeren Quotienten.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht theoretisch 50 µg doppelsträngiger DNA/ml Probe. Um mögliche Fehler durch das Pipettieren viskoser DNA-Lösungen zu vermeiden, wurden verschiedene Verdünnungen der DNA mit *Sau3AI* vollständig verdaut und zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Die Proben wurden 1:100 verdünnt und aus den gemessenen Extinktionen $E < 1$ wurde die tatsächliche DNA-Konzentration errechnet.

2.10.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Es wurden dazu 4 mm dicke horizontale Gele mit einem Agarosegehalt von 0,7-1,0 % in 1x TAE-Puffer verwendet. Kleine DNA-Fragmente (< 1000 bp) wurden in 1,2-1,8 %igen Gelen analysiert.

Für die Herstellung der Gele wurde die Agarose in TAE-Puffer erhitzt und unter gleichmäßigem Rühren vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf 50°C wurde die

Agaroselösung in die Gelform gegossen. Nach vollständigem Erstarren des Gels wird die Gelform in eine horizontale Submers-Elektrophoreseapparatur überführt und mit 1xTAE überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 0,2fachem Volumen 5xBPB-Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen des erstarrten Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und konstanter Spannung (80V) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 15 min in ein EtBr-haltiges Färbebad gegeben. Das Färbebad enthält 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in Wasser. Ethidiumbromid fluoresziert im UV-Licht und interkaliert in Wasserstoffbrücken benachbarter Basenpaarungen doppelsträngiger DNA. Das ermöglicht die Detektion der DNA im UV-Licht. Die Gele wurden nach dem Färben mit dem BioRad Gel-Dokumentationssystem dokumentiert.

2.10.5 Extraktion von DNA aus Gelen mit Säulen

DNA-Fragmente wurden aus präparativen Gelen mit dem „Invisorb spin DNA extraction Kit“ der Firma Invitex eluiert. Diese Methode basiert auf der reversiblen Bindung von DNA an eine Säulenmatrix. Die selektive Bindung von einzel- und doppelsträngiger DNA an das Säulenmaterial ermöglicht die Abtrennung von Verunreinigungen. Bei der Elution von DNA aus Agarosegelen bindet die in der Lösung vorhandene DNA unter Hochsalzbedingungen an die Säulenmatrix und wird unter Niedrigsalzbedingungen eluiert. Die Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Extraktion wurde mit 1 % des Eluates durch Elektrophorese überprüft.

2.10.6 Elution von DNA nach der *freeze-squeeze*-Methode

Kleine DNA-Fragmente (z.B. PCR-Produkte) wurden aus präparativen Gelen mit der *freeze-squeeze*-Methode isoliert. Diese Methode nach TAUTZ & RENZ (1983) beruht darauf, dass das Agarosegelgerüst beim schnellen Einfrieren spröde wird (*freeze* engl. einfrieren) und man die enthaltene Flüssigkeit zusammen mit der DNA aus dem Gel pressen kann (*squeeze* engl. drücken).

Das DNA-Fragment wurde mit einem Scalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 500 µl-Reaktionsgefäß gegeben. Dieses besitzt am Boden ein Loch und ist mit silanisierter Glaswolle gestopft. Darin wurde das Gelklötzchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sofort danach wurde das Gefäß in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und 10 min bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, falls noch nicht alles Gel ausgepresst war. Das erhaltene Volumen an Flüssigkeit wurde gesammelt und die DNA aus der Lösung mit Isopropanol gefällt. Das Abnehmen des Überstandes der Fällung erfolgte sehr langsam mit einer kleinen Spitze.

2.11 *In vitro*-Rekombination von DNA

2.11.1 Enzymatische Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktionsenzyme zum Schneiden von genomischer und Plasmid-DNA wurden wie in den Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden die empfohlenen Puffer benutzt und bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Die Restriktion von Plasmid-DNA wurde über einen Zeitraum von 2 h durchgeführt. Genomische DNA wurde mindestens 6 h gespalten. Das eingesetzte Volumen der Restriktionsenzyme betrug niemals mehr als 10 % des Endvolumens um unspezifische Aktivitäten und Beeinflussung der Reaktion durch das in der Enzymlösung enthaltene Glycerin zu vermeiden.

2.11.2 Auffüllreaktionen

Klonierungsexperimente, bei denen DNA-Moleküle verknüpft werden sollen, deren Enden aufgrund verschiedener Restriktionsschnittstellen nicht kompatibel sind, wurden mit stumpfen Enden (engl. *blunt ends*) verknüpft. Nichtkompatible kohäsive Enden von DNA Molekülen wurden mit Nukleotiden und DNA-Polymerasen aufgefüllt, so dass stumpfe Enden gebildet wurden.

Das Auffüllen von 3'-eingerückten Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden wie vom Enzymhersteller MBI empfohlen, angewandt:

10x Reaktionspuffer	2,0 µl
2 mM dNTP-Mix	0,5 µl
DNA 0,1-4 µg in	10-15 µl
dest. Wasser	ad 20 µl
Klenow-Fragment (1U)	0,5 µl

Die Reaktionsmischung wurde bis auf das Enzym zusammenpipettiert, 5 min bei 37°C inkubiert, das Enzym zugegeben und weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen für 10 min auf 70°C gestoppt.

Zur Erzeugung von DNA mit stumpfen Enden aus DNA-Fragmenten mit 3'-überhängenden Enden wurde die DNA mit dem Klenow-Fragment, aber ohne Zusatz von Nukleotiden, inkubiert. Durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms wurden die überhängenden Enden abgebaut.

2.11.3 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um bei Klonierungen Selbstligationen des Vektors oder Konkatemerenbildung von DNA Inserts zu vermeiden, wurden die DNA-Enden modifiziert. Bei Subklonierungen wurde die Vektor-DNA, bei der Konstruktion der Cosmidgenbank Insert-DNA, dephosphoryliert. Die Abspaltung von Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA erfolgte durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm CIAP (engl. *cal*f *int*estinal *alk*aline *ph*osphatase). Die Reaktionsbedingungen wurden, wie vom Enzymhersteller angegeben, gewählt.

Vektor-DNA (20 pmol 5'-DNA-Enden)	17 μ l
10x Reaktionspuffer für CIAP	2 μ l
CIAP (1U)	1 μ l

Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung phenolisiert und die DNA gefällt.

Die Dephosphorylierung kann in geeignetem Puffer gleichzeitig mit dem Restriktionsansatz durchgeführt werden. Anschließend muss die DNA ebenfalls phenolisiert und gefällt werden.

2.11.4 Ligation

Zur Ligation wurde T4-DNA-Ligase eingesetzt. Sie 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 wurde ein molares Verhältnis von 3:1 gewählt. Die Gesamtmasse an DNA im Ligationsansatz betrug ca. 400 ng. Insert- und Vektor-DNA wurden gemischt, für 10 min bei 50°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Reaktionsmischung (Reaktionspuffer, ATP-Lösung, dest. Wasser und 1 U T4-DNA-Ligase) wurde auf Eis zur DNA pipettiert. Das Reaktionsvolumen wurde stets so gering wie möglich ($\leq 20 \mu$ l) gehalten. Stumpfe Enden wurden in Gegenwart von PEG 800 ligiert. Die Reaktion wurde 2 h bei RT für kohäsive Enden bzw. über Nacht bei 14°C für stumpfe Enden inkubiert. Zur Elektroporation wurde direkt 1 μ l des Ligationsansatzes verwendet. Für *blunt-end*-Ligationen wurde der Ligationsansatz gefällt und in 10 μ l dest. Wasser gelöst. Zur Elektroporation wurden anschließend 2 x 4 μ l eingesetzt.

2.12 Transformation von *Escherichia coli*

2.12.1 Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli*

Die Herstellung elektrokompenter Zellen erfolgte nach der Methode von TUNG & CHOW (1995). Es wurden 5 ml HNB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C/150 rpm gezüchtet. 80 ml LB-Medium wurden mit 1 ml dieser Übernachtskultur beimpft und bei 37°C im Schüttler für 4-6 h inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Kultur für 30 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Dafür wurde für 15 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 40 ml eisgekühlter 15 %iger Glycerinlösung gewaschen, und erneut bei 4°C/4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit dem Zellpellet ein weiteres Mal mit 15 %iger Glycerinlösung und noch einmal mit dest. Wasser wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl eiskaltem GYT-Medium suspendiert und in Aliquots zu je 40 µl aufgeteilt. Die Zellsuspension wurde sofort verwendet oder kann bis zur Verwendung bei -75°C einen Monat gelagert werden.

Bei der Präparation von kompetenten Zellen ist besonders darauf zu achten, dass die Zellen ständig bei 0-4°C gekühlt bleiben.

2.12.2 Elektroporation von *E. coli*

Pro Transformation wurde ein Aliquot von 40 µl auf Eis 15 min inkubiert und anschließend mit einem Volumen von 1-4 µl salzfreier DNA gemischt. Die Zellen wurden 1 min mit DNA auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Es erfolgte die Transformation durch einen elektrischen Impuls.

Die Zellen wurden sofort in vorgewärmtem SOC-Medium suspendiert und bei 37°C eine Stunde unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Von Ligationen mit kohäsiven Enden, *sticky-end*-Klonierungen, wurden 10-60 µl Aliquots auf Selektionsplatten ausgestrichen. Bei Ligationen mit stumpfen Enden, *blunt-end*-Klonierungen, wurden die Zellen 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert und in 50 µl frischem Medium resuspendiert und alles ausplattiert. Die Zellen wurden anschließend über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.12.3 Präparation von Zellen zur Transfektion mit λ - Phagen

Dieses Protokoll entspricht den Anweisungen zum Cosmidtitering des Gigapack III XL Packaging Extract[®] der Firma Stratagene.

Es wurde eine frische Agarkulturplatte vom Stamm *E. coli* XL1MRA angelegt. Eine Einzelkolonie wurde in frisches modifiziertes LB-Medium (LB+10mM MgSO₄; 0,2 % Maltose) beimpft.

Das Medium darf keinerlei Antibiotikum enthalten, da dieses an die Zellwand bindet und die Transfektionsrate deutlich vermindert. Der Zusatz von MgSO₄ und Maltose ist notwendig, um die Maltoserezeptoren an der Zellwandoberfläche der Zellen auszubilden, an welche die Phagenpartikel binden.

Die Kultur wurde 4-6 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀<0,8 wurden die Zellen geerntet (500 x g, 10 min). Sie wurden im halben Kulturvolumen mit sterilem 10 mM MgSO₄ suspendiert und auf OD₆₀₀=0,5 eingestellt. Danach wurden sie sofort zur Transfektion verwendet.

2.12.4 Transfektion von *E. coli* mit λ -Phagen (Cosmidtitering)

Verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50) der Phagenpartikel der Verpackungsreaktion wurden in SM-Puffer hergestellt. 25 μ l dieser Verdünnungen wurden mit 25 μ l der frisch präparierten Zellen vorsichtig gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Dazu wurden 200 μ l LB gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Dabei wurden die Proben alle 15 min gemischt. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert, in 50 μ l frischem LB-Medium resuspendiert und alles auf frische Selektionsplatten (LB+Apr₁₀₀) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 16 h gut sichtbare *E. coli*-Einzelkolonien wurden gepickt.

2.13 Transformation von *Pseudomonas* sp.

Die Transformation von *Pseudomonas* sp. erfolgte durch Konjugation aus *E. coli* in *Pseudomonas*. Dazu wurde das Plasmid in *E. coli* S17-1 transformiert. Dieser Stamm agiert als Donor. Er trägt auf dem Genom die *tra*-Gene, die den konjugativen Transfer von Plasmid-DNA ermöglichen.

Es wurden je eine 5 ml LB-Übernachtskultur des Donors (*E. coli* S17-1) und des Akzeptors (*Pseudomonas* sp.) hergestellt. Je 100 μ l dieser Kulturen wurden 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und zweimal mit LB ohne Antibiotikum gewaschen. Die Zellen wurden in je 100 μ l LB resuspendiert und in einem Reaktionsgefäß gemischt. Diese Mischung wurde in einem Tropfen auf eine PMM-Agarplatte gegeben und im sterilen Luftstrom angetrocknet.

Die Platte wurde zunächst 6-8 h bei 37°C und anschließend bei 30°C weitere 12 h inkubiert. Die Zellen wurden von der Kulturplatte gewaschen und in 200 µl steriler Saline suspendiert. Es wurden unterschiedliche Verdünnungen dieser Suspension auf neue PMM-Platten mit 30 µg/ml Tetracyclin ausgestrichen. Diese Platten wurden bei 30°C für 3 d inkubiert. Die Einzelkolonien wurden anschließend auf frischen Platten (HNB+Tet₃₀) ausgestrichen.

2.14 Transformation von *Streptomyces albus*

2.14.1 Präparation von Protoplasten

Die Methode, beschrieben bei KIESER *et al.* (2000) wurde angewandt, um regenerierbare Protoplasten aus *S. albus* zu bilden. Zur Präparation von Protoplasten wurde der Stamm in 25 ml TSB-Medium, welches vor Gebrauch steril mit 937 µl 20 %igem Glycin und 125 µl 1 M MgCl₂ x 6H₂O versetzt wurde, gezüchtet.

Protoplasten wurden aus Mycelium prepariert, dass sich nach 48h bei 30°C und 200 rpm gebildet hat. Das Mycel wurde durch Zentrifugieren (RT, 4000 rpm) geerntet und zweimal mit 10,3 % (w/v) Saccharoselösung gewaschen. Aus Mycelium werden Protoplasten gebildet, indem die Zellwand durch Lysozym abgebaut wird. Die Lysozymbehandlung erfolgte mit 2 mg/ml Lysozym in komplettiertem P-Puffer für 45 min. Die Suspension wurde nach jeweils 15 min vorsichtig geschwenkt. Die Bildung der Protoplasten wurde im Phasenkontrastmikroskop überwacht. Bei ausreichender Bildung von Protoplasten wurde 5 ml P-Puffer zugesetzt, gemischt, und die Lösung durch sterile Watte filtriert. Das Filtrat wurde bei max. 2500 rpm für 8 min bei RT zentrifugiert und der Überstand sofort dekantiert. Das Pellet wurde im verbleibenden Tropfen Flüssigkeit resuspendiert und mit 1 ml P-Puffer verdünnt. 50 µl Aliquots mit ca. 5x10⁹ Protoplasten wurden zur Transformation eingesetzt. Die Aliquots sind bei -70°C bis zu einem Monat lagerfähig.

P-Puffer [OKANISHI *et al.*, 1974]:

103 g	Saccharose
0,25 g	K ₂ SO ₄
2,02 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O
2 ml	Spurenelementelösung
800 ml	dest. H ₂ O

Die Lösung wird in 80 ml Aliquots sterilisiert. Nach dem Sterilisieren werden pro Aliquot folgende sterile Lösungen in angegebener Reihenfolge steril zugegeben:

1 ml	KH ₂ PO ₄ (0,5 %)
10 ml	CaCl ₂ x 2H ₂ O (3,68 %)
10 ml	TES (5,73 %, pH 7,2)

2.14.2 Transformation von Protoplasten

Die PEG-vermittelte Transformation von Protoplasten wurde von THOMPSON *et al.* (1982) entwickelt. In dieser Arbeit wurden Protoplasten aus *S. albus* nach der *rapid small-scale procedure*, beschrieben in KIESER *et al.* (2000), transformiert. Ein Aliquot Protoplasten wurde schnell aufgetaut, zentrifugiert und in 50 µl P-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 5 µl DNA pipettiert und sofort gemischt. Das Gemisch von Protoplasten und DNA wurde sofort mit 200 µl 25%iger PEG-1000-Lösung in P-Puffer, versetzt und gemischt. Der Transformationsansatz wurde auf zwei gut getrocknete R5 Platten ausgestrichen. Die Platten wurden 14-20 h bei 30°C inkubiert und anschließend mit 1 ml dest. Wasser mit Antibiotikum (1000µg/ml Apramycin) überschichtet. Die Zellen wurden weitere 3-10 d bei 30°C inkubiert, bis sichtbare Kolonien gewachsen waren.

2.15 Transformation von *Streptomyces rugosporus*

Die Transformation von *S. rugosporus* erfolgte durch intergenerische Konjugation aus *E. coli* in *Streptomyces*. Diese Methode zur Transformation von Streptomyceten wurde durch MAZODIER *et al.* (1989) beschrieben, und von FLETT *et al.* (1997) modifiziert.

Das zu transformierende Plasmid wurde in den Donorstamm *E. coli* ET12567 pUB308 eingeführt [MACNEIL *et al.*, 1992]. Eine 3 ml-Übernachtskultur des Donors wurde geerntet und die Zellen zweimal mit frischem LB-Medium gewaschen und bei 3500 rpm zentrifugiert, um Antibiotika aus dem Zellpellet zu entfernen. Die Zellen wurden in 500 µl LB-Medium suspendiert und mit frischen Sporen von *S. rugosporus* gemischt. Diese Mischung wurde auf zwei MS-Agarplatten, supplementiert mit 10 mM MgCl₂, ausgestrichen. Diese Platten wurden 16-22 h bei 30°C inkubiert. Danach wurden die *E. coli*-Zellen mit 3 ml sterilem Wasser von der Oberfläche gewaschen und die überstehende Flüssigkeit abgenommen. Die Platten wurden anschließend mit je 1 ml Wasser überschichtet, das 0,5 mg Nalidixinsäure und 1 mg Apramycin enthielt. Die Lösung wurde im sterilen Laminarkaltluftstrom angetrocknet. Die Platten wurden weitere 5-10 d bei 30°C inkubiert und auf potenzielle Transformanden kontrolliert. Um die Häufigkeit des Auftretens von Spontanresistenzen oder Mutationen zu kontrollieren, wurden die gleichen Versuche mit Donor ohne Plasmid und ohne Donor durchgeführt.

2.16 Analyse von Klonen/Screening nach positiven Klonen

2.16.1 Eckhardt-Lyse-Gele

Zur Schnellanalyse von Klonen die keine blau/weiss-Selektion erlaubten, wurden diese durch Eckhardt-Lyse-Gele untersucht. Diese Gele erlauben die schnelle Identifizierung von

Plasmid-DNA aus Kolonien auf Festmedium, wobei zusätzliches Beimpfen und Isolieren von Plasmid-DNA entfällt. Daher eignen sie sich besonders gut zur Untersuchung einer großen Zahl von Kolonien. Bei dieser Methode sind Lyse, Reinigung und Trennung der DNA im Agarosegel kombiniert. Mit ihrer Hilfe ist eine schnelle und einfache Aussage über Veränderungen der Plasmidgröße möglich. Die Anwendbarkeit dieser Methode ist auf Plasmide bis zu einer Größe von 10 kb beschränkt. Das ursprüngliche Protokoll von ECKHARDT (1978) ist zur Vereinfachung wie folgt modifiziert worden:

Es wurde eine Gellösung für ein 0,8 %iges Agarosegel in TAE-Puffer hergestellt. Dazu wurde eine 10 %ige SDS-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,2 % gegeben und anschließend das Gel gegossen. Die Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher von einer Platte gepickt und in 10 µl EL-F-Lösung suspendiert. Diese Proben wurden sofort in die Geltaschen pipettiert. Das Gel wurde zur Lyse der Zellen zunächst 10 min bei 30 V und anschließend mit 80 V bis zum Ende gefahren. Anschließend wurde im EtBr-Färbebad gefärbt und photographisch dokumentiert.

2.17 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion dient zur *in vitro*-Synthese von Nucleinsäuremolekülen. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der DNA-Replikation in der Zelle [SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS & FALOONA, 1987].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Standardprotokoll verwendet, was an die Eigenschaften der verwendeten Primer und Matrizen angepasst wurde. In Tabelle 2.5 ist das Pipettierschema für die PCR dargestellt.

Das Temperaturprogramm zur Amplifizierung besteht aus fünf Schritten. Im ersten Schritt wird die DNA bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Schritte zwei bis vier beinhalten die eigentlichen Amplifizierungszyklen: Denaturierung, Primerbindung und Extension. Diese werden 30 mal durchlaufen.

Die doppelsträngige DNA wurde 30 s bei 95°C denaturiert. In den nächsten 15 s erfolgte bei der Annealing-Temperatur (60°C, wenn nicht anders beschrieben) das Binden der Primer an die DNA (*annealing*). Anschließend wurden 30 s lang bei 72°C neue DNA-Moleküle synthetisiert (Extension 30 s pro kb).

Nach Abschluss der Amplifizierungszyklen wurde die Reaktionsmischung noch 5 min bei 72°C inkubiert, um unvollständige Amplifikate zu komplettieren. Für einen Standardansatz von 50 µl wurde wie in Tab. 2.5 pipettiert.

Tab. 2.5: Standardreaktionsmischung für die PCR

STAMMLÖSUNG	KONZENTRATION [C ₀]	ENDKONZENTRATION [C _E]	PIPETTIERSHEMA
PCR-Puffer * a) ^a /b) ^b /c) ^c	10x	1x	5 µl
MgCl ₂ /MgSO ₄ * d) ^d	25 mM	1 mM	2 µl
DMSO	100 %	5 %	2,5 µl
Primer	100 pmol	20 pmol	1 µl
Primer	100 pmol	20 pmol	1 µl
dNTP-Mix	je 10 mM	0,2 mM	1 µl
Wasser	-	-	37 µl
DNA-Lösung in H ₂ O	500 ng/µl	10 ng/µl	1 µl
DNA-Polymerase	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl

*Verwendung unterschiedlicher Puffer

(MBI Fermentas: ^{a)}10x Puffer mit (NH₄)₂SO₄, ^{b)}10x Puffer –MgCl₂, ^{c)}10x Puffer für *Pfu*-DNA-Polymerase); ^{d)} MgSO₄ nur für *Pfu*-DNA-Polymerase

Für die im Folgenden angegebenen Primersequenzen gilt:

R=A+G; Y=C+T; M=A+C; S=C+G; W=A+T; B=T+C+G.

2.17.1 PCR für dNDP-4,6-Glucosedehydratase-Gene

Degenerierte Oligonukleotide zur spezifischen Amplifizierung von dNDP-4,6-Glucosedehydratase-Genen wurden bei DECKER *et al.*, (1996) beschrieben. Diese Primer wurden anhand bekannter Sequenzen aus Actinomyceten entwickelt.

GDH1 (+): 5'- CSGGSGSSGCSGGSTTCATSGG -3'

GDH2 (-): 5'- GGGWRCTGGYRSGGSCCGTAGTTG -3'

Die Amplifizierung erfolgte unter Standardbedingungen mit Puffer^{a)}. Der Reaktionsmischung wurde 50 %iges Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 5 Vol-% zugesetzt. Die Größe des erwarteten Amplifikats beträgt ca. 500 bp.

2.17.2 PCR für Typ I-Polyketidsynthase-Gene

Aus Ketosynthasedomänen verschiedener PKS vom Typ I wurden degenerierte Oligonukleotide entwickelt. (TSANTRIZOS & SANCHEZ, persönl. Mitteilung, 2001)

CS001 (+): 5'- TA GAA TTC GAC ACV GCN TGY TCB TCV -3'

CS002 (-): 5'- TAT AAG CTT RTG SGC RTT VGT NGC RCT -3'

Diese wurden unter Standardbedingungen mit Puffer^{a)} eingesetzt. Die Größe der erwarteten Amplifikate beträgt ca. 750 bp.

2.17.3 PCR für Halogenasegene

2.17.3.1 trpst-Primer

Degenerierte Oligonukleotide zur spezifischen Amplifizierung von Genfragmenten aus Tryptophanhalogenasegenen wurden von Tölzer entwickelt [TÖLZER, persönl. Mitteilung, 1998]. Diese Primer wurden aus fünf bekannten Sequenzen von Mikroorganismen abgeleitet. Die PCR wurde unter Standardbedingungen mit Puffer^{b)}, 10mM MgCl₂ und *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Das PCR- Temperaturprogramm wurde als *touch down*-PCR durchgeführt. Die Annealing-Temperatur sank von 50°C um 1,5°C pro Zyklus über 15 Zyklen. Anschließend wurden 25 Zyklen mit 42°C als Annealing-Temperatur durchgeführt. Die Größe der erwarteten Amplifikate beträgt ca. 230 bp.

*Bam*HI

trpst+: 5'- TAT CGG ATC CGG STG GAC CTG GRA SAT YCC - 3'

trpst-: 5'- AGT TGG TAC CGS GCS GCG TAS AKG AAG TA - 3'

*Kpn*I

2.17.3.2 SZ002-SZ005-Primer

Die Primer wurden unter Standardbedingungen mit Puffer^{b)} eingesetzt. Zunächst wurde die Primerbindung in einem *touch-down-approach* mit sinkenden Annealing-Temperaturen in 15 Zyklen von 55-40°C getestet (TD-PCR). In einem Optimierungsschritt durch Gradienten-PCR wurde die optimale Annealing-Temperatur bei 63,5°C festgelegt. Die Primer wurden in vier Kombinationen eingesetzt. Die Größe der erwarteten Amplifikate beträgt ca. 720 bp (SZ002-SZ004), 540 bp (SZ002-SZ005), 900 bp (SZ003-SZ004), 720 bp (SZ003-SZ005).

SZ002 (+): 5'- TCG GYG TSG GCG ARG CGA CCR TCC C -3'

SZ003 (+): 5'- TSG GCG GCG GCA CYG CSG GMT GGA TG -3'

SZ004 (-): 5'- AGC ATS GGR ATC TTC CAG GTC CAB CC -3'

SZ005 (-): 5'- GCC GGA GCA GTC GAY GAA SAG GTC -3'

2.17.4 PCR für Glykosyltransferasegene

Degenerierte Oligonukleotide zur spezifischen Amplifizierung von Glycosyltransferasegenen wurden bei BLANCO *et al.* (2001) beschrieben. Diese Primer wurden anhand bekannter Sequenzen aus Mikroorganismen entwickelt.

GTF-up (+): 5'- CGS TWC GTS CCS TWC AAC GG -3'

GTF-rp (-): 5'- GTS CCS SCS CCS SCG TGG TG -3'

Die Amplifizierung erfolgte unter Standardbedingungen mit Puffer^{b)}. Das Amplifizierungsprogramm wurde wie folgt angepasst: nach 10 min Initialdenaturierung wurden 30 Zyklen mit den Bedingungen: 30 s Denaturierung bei 96°C, 15 s *annealing* bei

50°C und 15 s Extension bei 72°C durchlaufen. Abschließend erfolgte eine zweiminütige Inkubation bei 72°C. Die Größe des erwarteten Amplifikats beträgt ca. 300 bp.

2.17.5 PCR für das Screening von Subklonen und die Herstellung von Sonden

Die Gegenwart der M13 Bindestellen in Vektoren wie pUC18/19, pBluescript SKII oder pUK21 wurde genutzt, um Inserts ohne spezielle Primer zu amplifizieren. Dies erfolgte zur Herstellung von „sauberen Sonden“, die keine Verunreinigung mit Vektor-DNA enthalten sollten. Die Amplifizierung von Inserts mit Standard-M13-Primern wurde auch zur Suche von Subklonen, bei denen keine andere Selektionsmethode angewandt werden konnte, eingesetzt. Abweichend von den Standardbedingungen wurden 10 mM MgCl₂ und je 1,5 pmol Primer pipettiert. Die Amplifizierung erfolgte in 30 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 37°C. Die Dauer der Annealing- und Extensions-Schritte wurden abhängig von der Insertgröße variiert (30 s pro kb).

2.17.6 PCR für die Expression des Halogenase-Gens

Für die Expression wurde das Gen am Start- und Stop-Codon durch spezifische PCR-Primer mit geeigneten Restriktionsschnittstellen ergänzt. Die PCR wurde mit *Pfu*-DNA-Polymerase durchgeführt, um eine möglichst geringe Synthesefehlerrate zu erzielen [CLINE *et al.*, 1996]. Als *template* wurde der Subklon pB1G, der das gesamte Halogenasegen enthält, eingesetzt. Für die Aktivität der *Pfu*-DNA-Polymerase wurde MgSO₄ zugesetzt. Die Primer haben eine Länge von 42 bp. Es wurden zwei Startprimer synthetisiert, da der Start der Transkription anhand der Sequenz nicht eindeutig festgelegt werden konnte.

SZexM1: 5'- GCAGGGATCCGCATATGGAAAGGCGGAAGCGTGAGCGTCTTG -3'
*Bam*HI

SZexM2: 5'- ATCGGGATCCCCATATGATCCGATCTGTGGTGATCGTGGGTG -3'
*Bam*HI

SZexTGA: 5'- ATGAAAGCTTTCATTGGATGCTGGCGAGGTACTIONCGTAGCAGC -3'
*Hind*III

Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.5 dargestellt. Es wurde der empfohlene Puffer für *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Als Zusätze wurde DMSO zu 10 Vol.-% und MgSO₄ als Mg²⁺-Quelle eingesetzt. Das Temperaturprogramm für die Amplifizierung des Gens ist in Tab. 2.6 zusammengefasst.

Tab. 2.6: Temperaturprogramm für die Amplifizierung

TEMPERATUR	DAUER	PCR-SCHRITT
98°C	3 min	Initialdenaturierung
98°C	1 min	30 Zyklen
68,1°C	1 min 30 s	
72°C	1 min 30 s	
72°C	5 min	terminale Extension

2.17.7 Amplifizierung von DNA aus *Streptomyces*-Sporen

Dieses Protokoll wurde von PATALLO (persönl. Mitteilung, 2002) entwickelt. Zur Amplifizierung von DNA aus *Streptomyces*-Sporen wurden ca. 0,5 mm³ Sporen einer Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und in 20 µl dest. Wasser suspendiert (ca. 1 min vortexen). Davon werden 2 µl als *template* in den PCR-Reaktionsansatz pipettiert. Die Bedingungen für den initialen Denaturierungsschritt der PCR wurden auf 10 min bei 96°C eingestellt.

2.18 DNA-Hybridisierung

2.18.1 Transfer von DNA auf Nylonmembranen (SOUTHERN Blot)

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA-Fragmente werden in diesem Muster ortsgenau durch die von SOUTHERN (1975) entwickelte Methode auf eine Membran fixiert. Anschließend ist dadurch eine Identifizierung von DNA-Fragmenten durch Hybridisierung möglich.

Isolierte DNA wurde durch Restriktionsenzyme gespalten und in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt (2.10.4). Dabei wurden von Gesamt-DNA ca. 8-10 µg und von Plasmid/Cosmid-DNA ca. 5 µg aufgetragen. Das Gel wurde gefärbt und dokumentiert. Für die spätere Auswertung der Hybridisierung wurde ein Maßstab zusammen mit dem Gel fotografiert. Das Gel wurde anschließend zur Depurinierung 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Das erzeugt im Rückgrat der DNA Strangbrüche und ermöglicht deren Diffusion aus dem Gel. Anschließend wurden die Gele 30 min unter leichtem Schütteln in Denaturierungslösung inkubiert. Zur Neutralisierung des Gels wurde anschließend in Neutralisierungslösung inkubiert. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurde das Gel je einmal kurz mit dest. Wasser gespült.

Der Aufbau des Kapillarblots erfolgte nach der in (Abb. 2.1) dargestellten Skizze. Als Träger der DNA wurden Nylonmembranen der Firma Amersham mit positiv geladener Oberfläche (Hybond N+[®]) verwendet. Der Transfer der Nukleinsäuren war nach 3-6 h abgeschlossen.

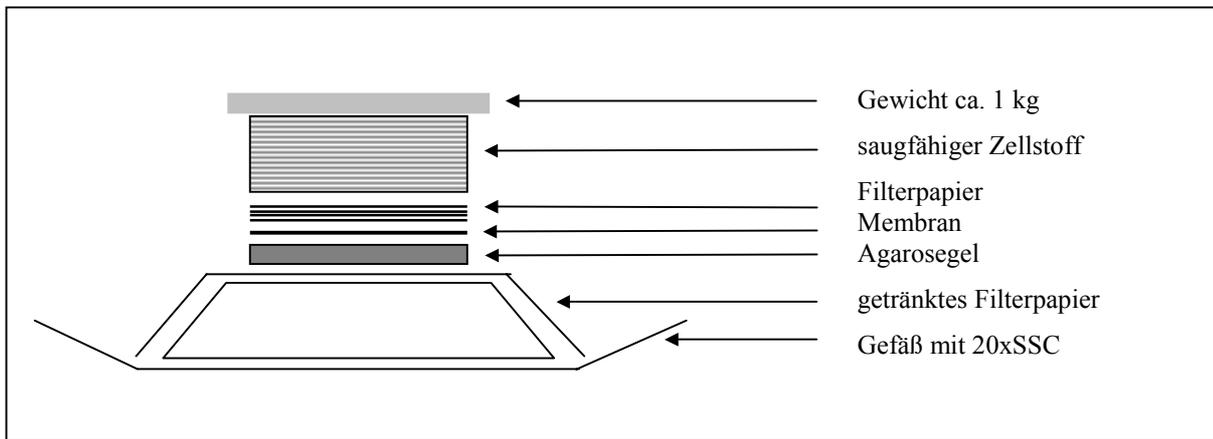


Abb. 2.1: Kapillarblot zum Transfer von DNA auf eine Membran.

Die Zellstoffschichten wurden abgenommen und die Membran in ihrer Orientierung markiert. Danach wurde die Membran vom Gel vorsichtig abgezogen und mit der DNA nach oben kurz in 2xSSC geschwenkt um anhaftende Gelreste zu entfernen. Anschließend wurde sie auf Filterpapier zum Trocknen an der Luft gelegt. Beide Seiten der Membran wurden mit dem DNA-Crosslinker 2 min mit UV-Licht bestrahlt. Dabei wurde die DNA mit dem Zuckerphosphatrückgrat irreversibel an die Membran gebunden (UV-crosslinking)

2.18.2 Transfer von Zellen auf Membranen (Kolonieblot)

Die angegebenen Transferbedingungen entsprechen dem Protokoll für Kolonie- und Plauehybridisierung der Firma Roche.

Die Zellen wurden über Nacht auf LB-Agarplatten bei 37°C gezüchtet. Danach wurden die Platten für mindestens 30 min bei 4-8°C vorgekühlt. Auf jede Platte wurde sorgfältig je eine Membranscheibe aufgelegt und nach ca. einer Minute wieder abgezogen. Mit den Zellen nach oben wurden die Membranen auf trockenes Filterpapier gelegt und an der Luft angetrocknet. Die Orientierung der Membran wurde gekennzeichnet, um später die Kolonien eindeutig identifizieren zu können. Die Membranen wurden nur mit einer Plastikpinzette oder mit Latexhandschuhen berührt, um das Zerkratzen der Membranoberfläche zu vermeiden.

Zum Zellaufschluss und der Denaturierung der DNA wurde die Membran 15 min mit Denaturierungslösung inkubiert. Dazu wurden die Membranen jeweils mit der Zellseite nach oben auf getränktes Filterpapier gelegt. Anschliessend wurden sie auf trockenem Filterpapier wiederum angetrocknet. Es folgte eine 15minütige Neutralisierung der Membranen auf mit Neutralisierungslösung getränktem Filterpapier. Anschliessend wurden die Membranscheiben auf trockenem Filterpapier wiederum angetrocknet. Die Membranen wurden 10 min auf 2xSSC getränktem Filterpapier inkubiert und danach getrocknet. Die Kontroll-DNA wurde aufgetropft und die vollständig trockenen Membranen mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA auf der Oberfläche zu fixieren.

Die Membranen wurden in einem Foliebeutel mit Proteinase K-Lösung (5 mg/ml in 2xSSC) überschichtet. Der Foliebeutel wurde verschlossen und 2–16 h bei 37°C inkubiert. Die Zellreste wurden anschliessend von den Membranen entfernt. Dazu wurde Filterpapier mit sterilem Wasser leicht angefeuchtet und die Zellseite der Membranen damit bedeckt. Mit einer Glaspipette wurde über das Filterpapier gerollt. Das Filterpapier wurde langsam abgezogen. Die Membranen wurden in 2xSSC gewaschen, und die Zellreste durch sehr sanftes Streichen (Latexhandschuhe) über die Membran entfernt. Die Membranen wurden anschliessend ohne weiteres Trocknen direkt zur Hybridisierung eingesetzt.

2.18.3 Markierung der Sonden

Das gereinigte DNA-Fragment für die Sonde wurde mit Digoxigenin markiert. Die Markierung erfolgte mit DIG-High-Prime® der Firma Roche.

Es wurde 1 µg gereinigtes DNA-Fragment in 16 µl bidest. Wasser zur Markierung eingesetzt. Die DNA-Lösung wurde durch 10 min Inkubation in einem siedenden Wasserbad und schnellem Abkühlen auf Eis denaturiert. Zu dieser DNA-Lösung wurden direkt anschließend 4 µl der Markierungslösung zugesetzt, kurz zentrifugiert und bei 37°C inkubiert. Nach 20 h wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung, pH 8,0, gestoppt. Die DNA wurde mit 4 M LiCl und 96 %igem EtOH gefällt, mit 70 %igem EtOH gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 50 µl bidest. Wasser gelöst. Unmittelbar vor der Hybridisierung mußte die Sonde nochmals 15 min bei 96°C inkubiert und rasch auf Eis abgekühlt werden, um renaturierte DNA-Doppelstränge zu dissoziieren.

2.18.4 Prähybridisierung

Die Membran wurde in die Hybridisierungsröhre eingelegt und mit 2xSSC befeuchtet. Die Prähybridisierungslösung wurde zugegeben und die Röhre dicht verschlossen. Es wurde 1 h bei der gewählten Hybridisierungstemperatur unter sanfter Bewegung inkubiert, um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen und unspezifischer Bindung der Sonden vorzubeugen.

(Prä-) Hybridisierungslösung (20 ml):

20xSSC	5000 µl
Blocking-Stammlösung	3000 µl
10 % (w/v) Natriumlaurylsarcosinat	200 µl
10 % (w/v) SDS	40 µl
bidest. Wasser	11,7 ml

2.18.5 Hybridisierungsreaktion und Stringenzwaschschritte

Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen, 10 ml Hybridisierungslösung (wie Prähybridisierung) und die markierte Sonde wurden zugegeben und $\geq 2-16$ h bei der gewählten Hybridisierungstemperatur T_H unter gleichmäßigem Benetzen der Membranen inkubiert. Im Anschluss an die Hybridisierung wurden sofort die Stringenzwaschschritte und die Detektion durchgeführt.

Durch die Stringenzwaschschritte wird überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde entfernt. Dabei werden der Salzgehalt und die Temperatur T_S so eingestellt, dass Hybride mit niedrigerer als der gewünschten Homologie wieder getrennt und ausgewaschen werden.

Die Membran wurde zweimal 10 min mit je 100 ml Stringenzlösung I (2xSSC + 0,1 % SDS) und Stringenzlösung II (1xSSC+0,1 % SDS) gewaschen.

Die Membran wurde während der gesamten Hybridisierung und anschließenden Detektion mit Flüssigkeit bedeckt gehalten.

2.18.6 Detektion

Die Detektion der DNA-Hybride erfolgte nach den Angaben des Herstellers im „DIG luminescent protocol“ der Firma Roche. Nach den Stringenzwaschschritten wurde die Membran bei RT 5 min mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran bei RT 30 min in 100 ml Blockpuffer II äquilibriert. Der Blockpuffer wurde verworfen. Der Antikörper wurde in frischem gekühltem Blockpuffer II verdünnt (0,5 μ l Anti-DIG-AP[®] in 10 ml Puffer II) und nach dem Äquilibrieren auf die Membran gegeben. Die Membran wurde zur Antikörperreaktion 30 min bei RT unter leichter Bewegung inkubiert. Danach wurde die überstehende Lösung abgegossen und überschüssige Antikörper 2 x 25 min mit je 100 ml Waschpuffer ausgewaschen. Vor der Chemolumineszenzreaktion wurde die Membran 5 min in Detektionspuffer III äquilibriert. Das Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star[®] wurde 1:100 frisch in 500 μ l Detektionspuffer III verdünnt. Die Membran wurde auf eine Plastikfolie gelegt und das verdünnte Substrat aufgetropft. Die Membran wurde sofort eingeschweißt und das Substrat gleichmäßig, mit einem Tuch über die Folie streichend, verteilt. Die Luftblasen wurden entfernt und die Membran auf einem Röntgenfilm 2-16 h exponiert.

2.18.7 Rehybridisierung

Zur Rehybridisierung wurde die Membran kurz in dest. Wasser geschwenkt, in ein Hybridisierungsrohr eingelegt und zweimal 15 min bei 37°C mit Rehybridisierungslösung inkubiert. Nach Spülen der Membran in 2xSSC konnte die Membran sofort zur Prähybridisierung eingesetzt werden.

2.19 Konstruktion einer Cosmidgenbank

2.19.1 Präparation der Cosmidarme

Für die Konstruktion der Cosmidgenbank wurde der Vektor pOJ446 eingesetzt. Dieser Vektor besitzt die *cos*-Stellen, die eine *in-vitro*-Verpackung in das Capsid des Phagen λ ermöglichen. In einem ersten Schritt wurde der Vektor mit *HpaI* linearisiert. Dieses Enzym schneidet zwischen den *cos*-Stellen. Die entstandenen Enden wurden mit CIAP dephosphoryliert, um eine spätere Religation zu vermeiden. Anschließend wurde der Vektor mit *BamHI* gespalten, wodurch die *cos*-Arme gebildet wurden (Abb. 2.2).

2.19.2 Präparation der Gesamt-DNA aus *Streptomyces rugosporus*

Eine saubere Gesamt-DNA Präparation (2.9.1) wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel untersucht und mit einem λ -*SaII* Marker bezüglich ihrer Größe und zufälligen Fragmentierung verglichen. Die DNA wurde in kleinen Mengen zum Test mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,04-0,001 U/ μ g DNA) mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* partiell verdaut (10-30 min) und das Enzym sofort inaktiviert. Die DNA wurde im 0,4 %igen Agarosegel analysiert. Es wurde eine Enzymkonzentration ausgewählt die sichtbare, aber geringe Fragmentierung der DNA erzielt. In einem Restriktionsansatz zur Präparation wurden ca. 100 μ g DNA in 1 ml mit den zuvor bestimmten Enzymeinheiten U/ μ g DNA an Restriktionsenzym *Sau3AI* verdaut. Alle 10 min wurden 100 μ l Aliquots aus dem Restriktionsansatz entnommen und sofort mit 0,1 M EDTA abgestoppt und bei 65°C für 10 min inkubiert. Die Restriktion wurde mit je 5 Vol.-% der Aliquots im Agarosegel überprüft. Aus diesen Aliquots wurden drei ausgewählt und weiterverwendet. Die DNA wurde gefällt, mit CIAP dephosphoryliert und nochmals gefällt. Die so präparierte DNA wurde für die Konstruktion der Cosmide eingesetzt.

2.19.3 Konstruktion der Cosmide

Zwischen die hergestellten Cosmidarme (2.19.1) wurden die mit *Sau3AI* partiell verdauten und dephosphorylierten DNA-Fragmente (2.19.2) in die kompatiblen *BamHI*-Schnittstellen kloniert (Abb. 2.2). Die Ligation wurde in einem Vektor: Insert-Verhältnis von 1:3 realisiert. Durch die Ligation der Fragmente wurden so lineare Moleküle gebildet, die jeweils ein DNA-Fragment genomischer DNA zwischen zwei *cos*-Stellen enthalten. Von diesen rekombinanten Molekülen wurden aber nur jene in das Capsid des Phagen verpackt, die eine Länge von 33 bis 54 kbp zwischen zwei *cos*-Stellen besitzen. Für die *in-vitro*-Verpackung der DNA wurde der Gigapack III XL Packaging Extrakt[®] der Firma Stratagene verwendet. Die Verpackung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Verpackungsreaktion wurde anschließend zur Transfektion von *E. coli* XL1 blue MRA eingesetzt.

Die Zellen wurden zur Transfektion, wie in (2.12.3) beschrieben, frisch präpariert. Die Transfektion wurde, wie in 2.12.4 beschrieben, mit verschiedenen Phagentitern durchgeführt. Zur Lagerung der Cosmidgenbank wurden die Klone in Mikrotiterplatten in 100 µl LB-Medium mit Antibiotikum überimpft, über Nacht bei 37°C inkubiert, 100 µl 50%ige Glycerinlösung zugegeben und bei -70°C eingefroren.

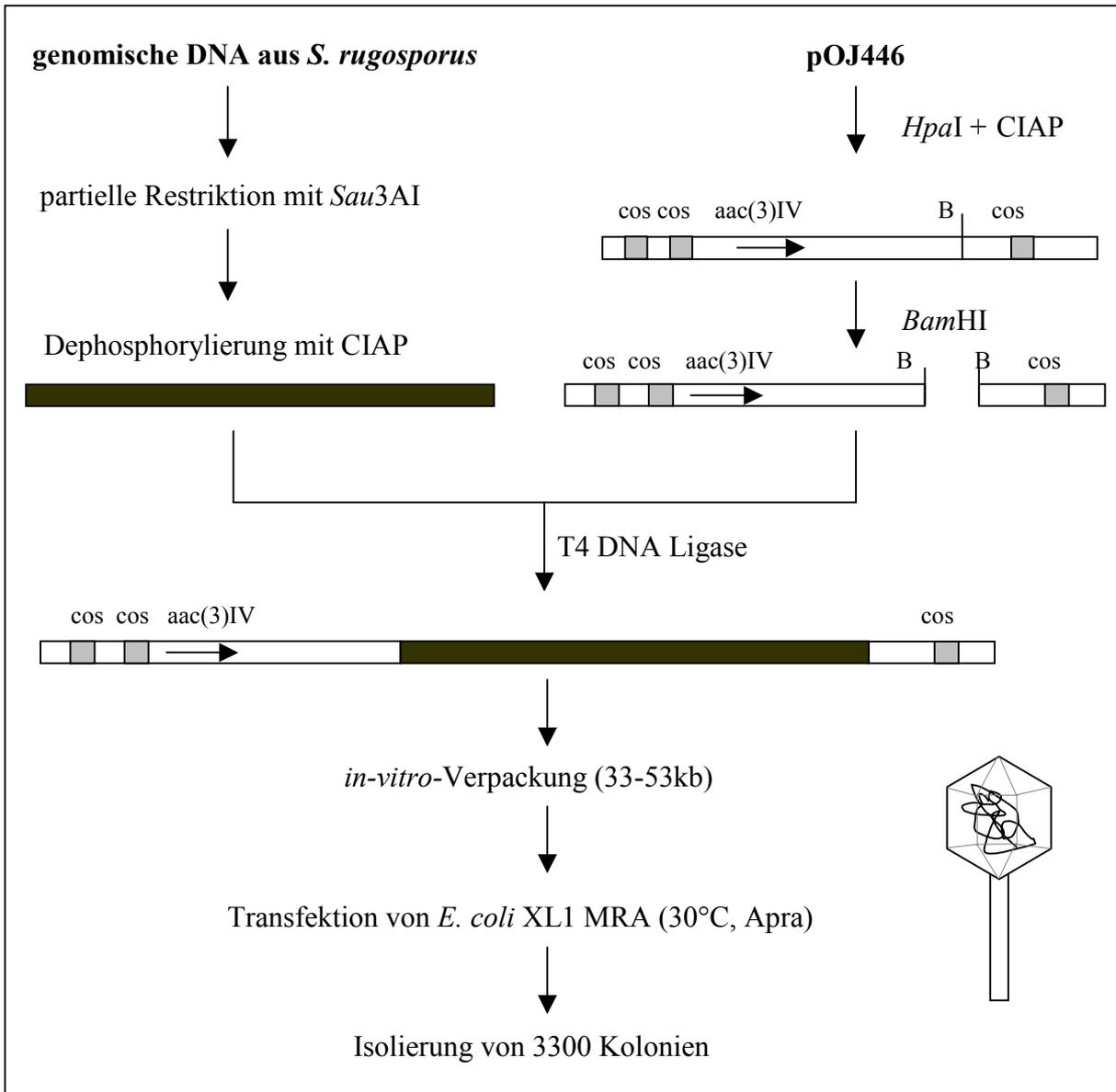


Abb. 2.2: Konstruktion der Cosmidgenbank in pOJ446

2.19.4 Screening der Cosmidgenbank

Die Kolonien der Cosmidgenbank wurden, wie in 2.18.2 beschrieben, auf Membranen geblottet. Zur Hybridisierung wurden über PCR generierte Sonden eingesetzt. Die PCR Fragmente wurden, wie in 2.18.3 beschrieben, mit Digoxigenin markiert. Als Positivkontrolle wurde Gesamt-DNA, als Negativkontrolle DNA des Cosmids pOJ446 auf die Membran getropft.

Aus den Klonen, die in Koloniehybridisierung positive Signale zeigten, wurde anschließend Cosmid-DNA (2.8.1) isoliert und nochmals durch SOUTHERN-Blot/Hybridisierung und PCR analysiert.

2.20 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden kleinere Fragmente in die Plasmide pUC18/19, pBluescript SK II und pUK21 subkloniert. PCR-Fragmente wurden kloniert oder direkt sequenziert. Es kamen sowohl M13 Standardprimer, als auch sequenzspezifische Primer zum Einsatz. PCR-Fragmente wurden durch Gelelektion gereinigt. Plasmide wurden über Säulen isoliert (2.8.2).

Die Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode im Cy5 Autocycle Sequencing Kit (Pharmacia) an einem ALF express automatic DNA sequencer (Pharmacia) realisiert. Weitere Proben wurden durch die MWG biotech AG sequenziert.

2.20.1 Sequenzanalyse

Die Qualität der Sequenzierläufe wurde mit dem Programm Chromas[®] beurteilt. Die Sequenzen wurden zunächst um Vektorsequenzen reduziert. Die Sequenzen wurden sowohl mit Nukleinsäuredatenbanken, als auch mit Proteinsequenzdatenbanken, verglichen. Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Programmpaket BLAST vom National Center for Biotechnology Information durchgeführt. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)

Die Analyse von Leserahmen und die Übersetzung in Proteinsequenzen wurden mit dem Programm „Frameplot 2.3.2“ realisiert. (<http://www.nih.gov/~jun/cgi-bin/frameplot.pl>)

Aneinanderreihung einzelner überlappender Sequenzen (*fragment assembly*), Sequenzanalysen und Sequenzvergleiche wurden mit dem Programmpaket HUSAR des „biocomputing service“ des DKFZ Heidelberg durchgeführt.

Für paarweise Sequenzvergleiche wurde das Programm GAP verwendet. Für multiple Sequenzalignments wurden „ClustalW“ und „PileUp“ eingesetzt.

2.21 Einführung einer Mutation in *Streptomyces rugosporus*

Zur Einführung einer Mutation in ein bestimmtes Gen wurde zunächst eine Konstruktion in einem *E. coli*-Vektor hergestellt. Die Mutation sollte durch *gene disruption/gene replacement* erfolgen. Dabei wurde der Leserahmen des Gens zerstört, indem ein anderes Gen (z.B. Resistenzgen) eingefügt wurde. Das Konstrukt für eine derartige Mutation benötigt folgende Eigenschaften. Je größer die chromosomalen DNA-Fragmente sind, die zu beiden Seiten des zur Mutation eingefügten Gens verbleiben, desto höher ist die Rekombinationswahrscheinlichkeit. Es ist notwendig, dass zwei Ereignisse homologer Rekombination („*double crossover*“) zwischen dem mutierten Gen im Plasmid und seiner

intakten Kopie im Genom stattfinden. Diese zwei Rekombinationsereignisse fügen die Mutation ein und eliminieren das intakte Gen aus dem Genom (Abb. 2.3).

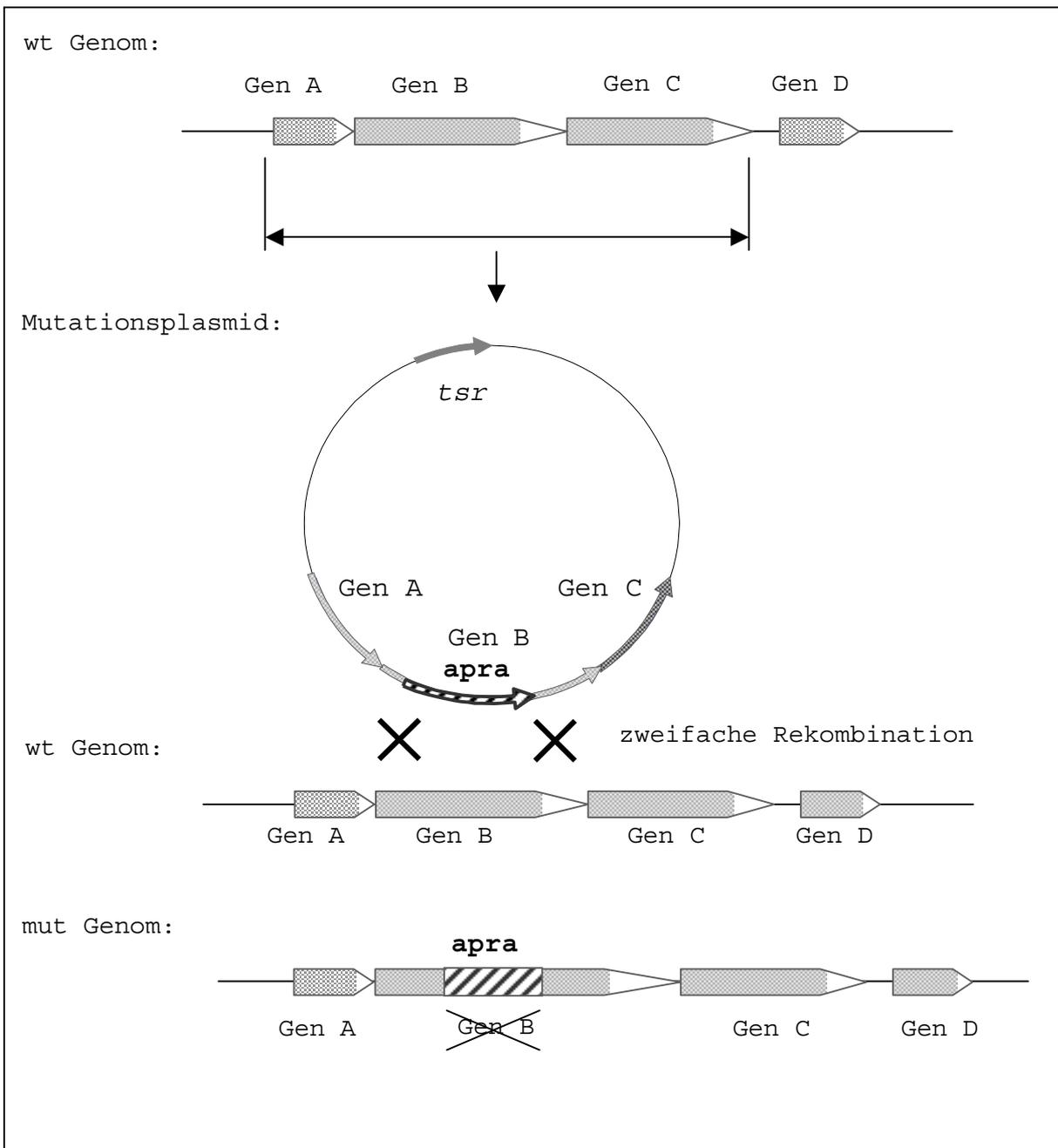


Abb. 2.3: Mutation eines Gens durch *gene replacement*

2.21.1 Konstruktion des Mutationsplasmids

Das Plasmid pB1G trägt als Insert 4300 bp genomischer DNA aus *S. rugosporus*, worauf das Gen für die potenzielle Halogenase enthalten ist. Das Plasmid (Abb. 2.4) wurde durch *PaeI* einmal geschnitten. Die Schnittstelle für *PaeI* befindet sich 411 bp hinter dem theoretischen Startcodon des Halogenasegens. Dadurch wurde der Leserahmen geöffnet. Die Enden des linearisierten Plasmids wurden mit T4 DNA Polymerase geglättet und anschließend mit CIAP dephosphoryliert.

Die Apramycinresistenzkassette wurde mit *NdeI* und *HindIII* aus dem Vektor pEFBA herausgeschnitten und aus dem Gel isoliert (2.10.6). Die Enden des ~1500 bp-Fragmentes wurden einzeln mit T4-DNA-Polymerase und mit Klenow-Enzym geglättet. Die Apramycinresistenzkassette wurde mit stumpfen Enden in das vorbereitete Plasmid pB1G ligiert. Dieses Konstrukt wurde in *E. coli* transformiert und durch Restriktion analysiert. Das Plasmid mit der Insertion des *aac3IV*-Genes in der gleichen Orientierung wie die Halogenase wurde weiter verwendet. Dieses Plasmid wurde pSZ594 benannt.

Das 5800-bp-Insert aus pSZHA1 wurde mit *BamHI* aus dem Vektor geschnitten und über ein Agarosegel von Verunreinigungen getrennt. Der konjugative Vektor pHZ1358 wurde mit *BamHI* geöffnet und dephosphoryliert. Das gereinigte Insert aus pSZHA1 wurde in den Vektor pHZ1358 ligiert. Das so generierte Plasmid pSZ614 wurde in *E. coli* transformiert und durch Restriktion und Sequenzierung analysiert. Es wurden 1476 nt in den Leserahmen der Halogenase eingefügt. Das Plasmid pSZ614 stellt das vollständige Disruptionskonstrukt dar (Abb. 2.4).

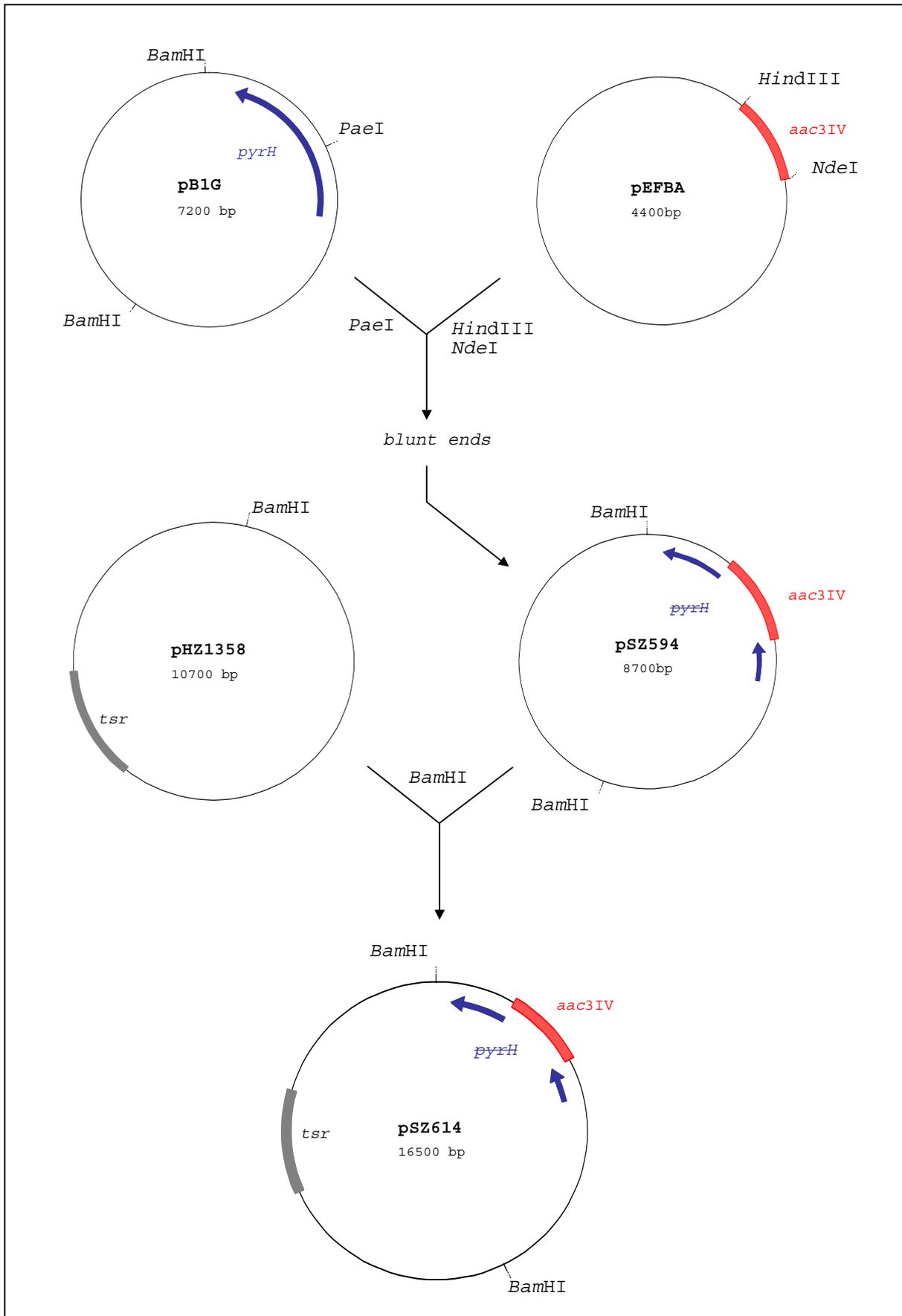


Abb. 2.4: Konstruktion des Mutationsplasmids pSZ614 zur Inaktivierung des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH*.

2.21.2 Selektion auf *double-crossover* Mutanten

Das Plasmid pSZ614 wurde durch intergenerische Konjugation von *E. coli* ET12567 und *S. rugosporus* eingeschleust und nur auf den primären Resistenzmarker (Apramycin) selektiert. Das Plasmid ist in *Streptomyces* nur instabil replizierend. Beim Wachstum der Zellen ohne Selektionsdruck auf Thiostrepton verliert die Zelle das Plasmid [MÉNDEZ, persönl. Mitteilung, 2001]. Während der Gegenwart des Plasmid in der Zelle können jedoch homologe Rekombinationsereignisse auftreten. Die erscheinenden Kolonien mit Resistenz gegen Apramycin wurden auf Agarplatten mit dem zweiten Resistenzmarker ausgestrichen, um ihr Verhalten gegen dieses Antibiotikum zu testen. Waren sie sensitiv gegen den zweiten Marker, waren diese Klone Resultat eines zweifachen Rekombinationsereignisses („*double crossover*“) an beiden Seiten des Gens. In diesen Klonen war die mutierte Kopie des Gens stabil in das Genom von *S. rugosporus* integriert.

2.21.2.1 Ermöglichung eines zweiten Rekombinationsereignisses

Waren die Kolonien jedoch resistent gegenüber beiden Resistenzmarkern, wurde das Plasmid weiterhin autonom in der Zelle repliziert oder es hat nur ein Rekombinationsereignis stattgefunden, wodurch das komplette Plasmid ins Genom integriert wurde. Das führt zur Duplizierung der Region des klonierten Gens im Genom. In diesem Fall mußte ein zweites Rekombinationsereignis herbeigeführt werden, wodurch der Verlust des autonomen Plasmids oder des integrierten Plasmids ermöglicht werden sollte. Dafür wurden Flüssigkulturen mit Sporen beimpft und für 72 h ohne Antibiotikum gezüchtet. Dabei erfolgte eine hohe Zahl von Zellteilungen und ermöglichte zufällige Rekombinationen. Die erhaltenen Kulturen wurden geerntet, Mycelknäuel mit Ultraschall aufgebrochen und auf Agarplatten mit Apr₂₅ vereinzelt [PATALLO, persönl. Mitteilung, 2001]. Die Kolonien wurden nochmals auf den Phänotyp der gewünschten Mutante untersucht, in dem sie auf Agarplatten mit dem zweiten Resistenzmarker ausplattiert wurden. Kolonien mit Sensitivität gegenüber dem zweiten Marker, wären Resultat des erwünschten zweiten Rekombinationsereignisses.

2.22 Untersuchung von Metaboliten aus *Streptomyces* sp.

2.22.1 Isolierung von Metaboliten aus *Streptomyces rugosporus*

Zur Isolierung der produzierten Metabolite aus *S. rugosporus* wurde der Stamm 8 d in 1 l Produktionsmedium (SO7) gezüchtet. Durch Zentrifugieren wurden die Zellen vom Medium getrennt. Die Zellen wurden in 1 Volumen dest. Wasser suspendiert und 2 h mit 1,5 Volumen Essigester extrahiert (bis sich der Extrakt deutlich rosa färbt). Die Extraktion wurde zweimal wiederholt. Die Extrakte wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei RT und 120 mbar

zur Trockne eingengt. Die trockenen Extrakte wurden in 100 µl Methanol aufgenommen und mittels HPLC analysiert.

2.22.2 Analyse von Metaboliten aus *Streptomyces rugosporus*

Die Analyse der Zellextrakte erfolgte mittels HPLC. Die Trennbedingungen wurden DING *et al.* (1994) entnommen und angepasst.

Die Substanzen wurden auf einer analytischen *reversed phase* Säule Lichrospher® 100, RP18 5 µm 250x4,6 mm im Acetonitril-Wasser-Gradienten unter Zusatz von 0,1 Vol.-% TFA getrennt. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min. Es wurden je 20 µl Probe injiziert. Der Gradient ist in Tab. 2.7 dargestellt:

Tab. 2.7: Gradient zur Analyse von Extrakten aus *S. rugosporus*

Zeit	Wasser+0,1 % TFA	Acetonitril+0,1 % TFA
0-10 min	100 %	0 %
10-25 min	100-0 %	0-100 %
25-35 min	0 %	100 %
35-45 min	0-100 %	100-0 %

Die Detektion erfolgte bei der Wellenlänge von 214 nm. Es wurden UV-Spektren über den Bereich von 220-400 nm während der Trennung aufgenommen. Die Zuordnung der Pyrroindomycine erfolgte über deren charakteristisches UV-Spektrum (Tab. 2.8)

Tab. 2.8: Charakteristische Wellenlängenmaxima der Pyrroindomycine

	Pyrroindomycin A	Pyrroindomycin B
UV-Spektrum	226 nm	229 nm
	273 nm	281 nm
	335 nm	335 nm

Die Chromatogramme wurden aufgezeichnet und mit der Knauer Eurochrom Chromatographie Software 2000 für Windows NT (*preparative version* 3.01) ausgewertet. Die HPLC-MS Analyse wurde freundlicherweise durch Bojan Bister aus der AG Süßmuth im Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

2.22.3 Isolierung von Metaboliten aus *Streptomyces albus*

Zur Isolierung der produzierten Metabolite aus *S. albus* SZ12D4 wurde der Stamm 5 d auf Agarplatten mit Produktionsmedium (R5A + Apra₂₅) gezüchtet. Für die Extraktion wurden pro Analyse mindestens drei dicht bewachsene Agarplatten mit vollständig differenzierten Zellen extrahiert. Die Agarplatten wurden in 1cm² Klötzchen geschnitten und in Erlenmeyerkolben gegeben. Die Extraktion erfolgte mit Aceton. Die Kolben wurden dicht verschlossen und auf Rundschüttelmaschinen bei RT geschüttelt, bis sich der Extrakt deutlich rot färbte, mindestens jedoch 30 min. Der Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt. Die Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum bei RT eingedunstet. Der konzentrierte Acetonextrakt wurde mittels HPLC analysiert. Optional kann die Extraktion auch aus Zellen, die in R5A Flüssigmedium gezüchtet wurden, erfolgen. Dazu wurden 200 ml Medium (R5A + Apra₅) 5d bei 28°C und 200 rpm mit *Streptomyces albus* SZ12D4 inkubiert und die Zellen durch Zentrifugieren geerntet. Die Extraktion der Zellen erfolgte wie oben angegeben. Als Kontrolle wurde jeweils *S. albus* in R5A gezüchtet und wie oben beschrieben extrahiert.

2.22.4 Analyse von Metaboliten aus *Streptomyces albus*

Die Analyse der Zellextrakte erfolgte mittels HPLC. Der Zellextrakt wurde zentrifugiert (10 min, 14000 rpm) und 20µl auf eine analytische *reversed phase* Säule C18 5 µm 250 x 4,6 mm gegeben. Die Elution erfolgte mit H₂O/CH₃CN (0,1%TFA) im Gradienten. Der verwendete Gradient zur Elution der Metabolite aus *S. albus* SZ12D4 ist in Tab. 2.9 dargestellt.

Tab. 2.9: Laufmittelgradient zur HPLC

Zeit	Wasser+0,1 %TFA	Acetonitril+0,1 %TFA
0- 4 min	90 %	10%
4- 30 min	90 %-12%	10%-88%

Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei der Wellenlänge von 220 nm. Es wurden UV-Spektren über den Bereich von 220-600 nm während der Trennung aufgenommen.

2.23 Expression des Halogenasegens in *Pseudomonas sp.*

2.23.1 Konstruktion der Expressionsstämme

Zur Expression wurde das Gen wie in 2.17.6 beschrieben amplifiziert. Die Amplifikate wurden aus einem Agarosegel eluiert, und anschließend mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten. Die Fragmente wurde in einen entsprechend geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pBluescript SK II ligiert. Die Konstrukte wurden in *E. coli* transformiert. Positive Klone wurden isoliert. Die Plasmide wurden mit pBSKexM1 und pBSKexM2 bezeichnet. Um eventuelle Fehler bei der Amplifizierung des Gens auszuschließen, wurden diese Klone sequenziert. Die Sequenzen wurden daraufhin überprüft, ob sie identisch mit der Originalsequenz sind. Die Inserts aus den validierten Klonen wurde zur Expression in den *E. coli*-*Pseudomonas*-shuttle-Vektor pCIBhis kloniert. Sie wurden mit *Bam*HI und *Hind*III aus pBSKexM1 und pBSKexM2 herausgeschnitten und über ein Agarosegel gereinigt. Der Expressionsvektor pCIBhis wurde mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und mit CIAP dephosphoryliert. Der Vektor wurde phenolisiert und gefällt. In diesen Vektor wurden die gereinigten Inserts ligiert und in *E. coli* S17-1 transformiert. Positive Klone wurden durch PCR-Amplifizierungen mit den Expressionsprimern nachgewiesen. Die Plasmide wurden mit pSZexM1 und pSZexM2 (siehe Anhang Abb. A.2) bezeichnet. Die Plasmide wurden in *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 konjugiert.

2.23.2 Screening auf Expression

Zum Screening nach signifikanter Überexpression wurden je 3 ml Kultur (HNB+Kan₅₀+Tet₃₀) mit den frisch gepickten Klone beimpft und bei 30°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Je 50 ml Mais-Melasse-Medium (Kan₅₀+Tet₃₀) wurden mit 500 μ l der Übernachtskulturen beimpft. Diese Kulturen wurden ca. 60 h bei 30°C in der Rundschüttelmaschine bei 150 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden geerntet, in der Kugelmühle aufgeschlossen (2.25.3) und mittels SDS-PAGE auf Expression löslichen Proteins analysiert (2.26.1).

Positive Expressionsklone wurden im Anschluss nochmals in 100 ml-Kulturen gezüchtet und die Expression der potenziellen Tryptophan-5-Halogenase in zeitlichen Abständen von 24 h, 48 h und 72 h analog untersucht.

2.24 Fütterung und und Komplementationsversuche

2.24.1 Fütterung mit L-Tryptophan

Zum Nachweis der Bildung von 5-Chlortryptophan und 5-Bromtryptophan in ganzen Zellen wurde das Kulturmedium durch HPLC untersucht. Der Expressionsstamm *Pseudomonas fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 wurde in 25 ml Medium (Kan₅₀+Tet₃₀) beimpft und bei

30°C/150 rpm inkubiert. Für den Nachweis von 5-Chlortryptophan wurde der Stamm in chloridhaltigem Medium (HNB), für den Nachweis von 5-Bromtryptophan wurde der Stamm in HNBBBr gezüchtet. Nach 24 h wurde L-Tryptophan bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Es wurde weitere 48 h inkubiert. Aus dem Kulturmedium wurden je 1 ml nach 24, 48, 72 und 96 h entnommen. Die Proben wurden 10 min scharf zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden durch HPLC analysiert. Die Analyse erfolgte wie in 2.27.3 beschrieben.

2.24.2 Komplementationsversuch

Zur Untersuchung der Komplementation der Pyrrolnitrinbiosynthese in *P. fluorescens* BL915 ΔORF1 durch die Tryptophan-5-Halogenase wurden die Metaboliten des Stammes *P. fluorescens* BL915 ΔORF1 pSZexM2 untersucht. Der Stamm wurde aus einer Übernachtskultur in 5 x 200 ml HNB (Kan₅₀+Tet₃₀) beimpft und bei 30°C/150 rpm gezüchtet. Zwischen drittem und siebtem Tag wurden im Abstand von 24 h je 200 ml aufgearbeitet.

Medium und Zellen wurden zusammen in 50 ml PP-Gefäßen zweimal mit einem Volumen Essigsäureethylester extrahiert und zur Phasentrennung zentrifugiert. Die Extrakte wurden vereinigt und unter Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst. Der Methanolextrakt wurde mittels DC untersucht. Als Laufmittel wurde Toluol:Dioxan (10:1) verwendet. Die Detektion erfolgte durch Betrachten im UV₂₅₄ und anschließendem Besprühen mit van Urk's-Reagenz. Primäre aromatische Amine, Indol- und Phenylpyrrolderivate mit mindestens einer freien α-Aminogruppe färben sich dabei charakteristisch an.

van Urk's-Reagenz [STAHL & KALDEWEY, 1961]: 1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 50 ml 36 %iger HCl lösen und anschließend 50 ml 96 % Ethanol zufügen.

2.25 Zellzüchtung, Zellaufschluss und Enzymanreicherung

2.25.1 Zellzüchtung

Die *Pseudomonas*-Zellen wurden in 20 ml HNB mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 30°C und 150 rpm gezüchtet. Die 800 ml Hauptkulturen (HNB+Antibiotikum) wurden mit 8 ml dieser Übernachtskultur beimpft und 48-60 h bei 30°C und 150 rpm inkubiert.

2.25.2 Zellernte

Die Kulturbrühe wurde in der Kühlzentrifuge bei 4°C, 5000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen im doppelten Volumen Saline gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Das Zellnassgewicht wurde bestimmt.

2.25.3 Zellaufschluss zur Analyse des löslichen Proteins (Kugelmühlenschluss)

Die *Pseudomonas*-Zellen aus 10 ml Kulturbrühe wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 500 µl 0,1 M KPP suspendiert und mit 400 mg Glasperlen versetzt. Der Aufschluss erfolgte für 15 min in der Kugelmühle bei 4°C. Die resultierende Suspension wurde 20 min bei 4°C/12000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand abgenommen. Das Pellet wurde nochmals mit 300 µl 0,1 M KPP versetzt und weitere 10 min in der Kugelmühle geschüttelt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und der klare Überstand abgenommen. Die Überstände wurden vereinigt und mittels SDS- PAGE analysiert.

2.25.4 Zellaufschluss für Enzymtests (Ultraschall)

Die frisch geernteten *Pseudomonas*-Zellen wurden im doppelten Volumen eiskaltem 0,1 M KPP in der Kälte suspendiert. Die Suspension wurde bei 0-4°C mit Ultraschall 3 min lang in Intervallen zu je 5 s beschallt. Zwischen jedem Intervall wurden 10 s Pause zur Kühlung der Suspension eingehalten. Es wurde mit einer konischen Sonotrode mit einer Amplitude von 60 % im thermostatierten Glasgefäß (Volumen 5-15 ml) aufgeschlossen.

Die Suspension wurde danach sofort bei 4°C und 19500 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde nochmals in 1,5fachem Volumen an Aufschlusspuffer (0,1 M KPP) suspendiert, dem Ultraschallaufschluss unterzogen und zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und nochmals 30 min bei 4°C/19500 rpm zentrifugiert. Der so gewonnene klare Rohextrakt wurde zur weiteren Verwendung dialysiert. Die Pellets wurden verworfen.

2.25.5 Gewinnung des Rohextraktes aus *E. coli*

Die *E. coli*-Zellen wurden in Vorkultur 16 h und Hauptkultur 1,5 d in LB-Medium mit Amp₁₀₀ bei 37°C unter ständigem Schütteln gezüchtet. Die Zellen wurden geerntet und einmal mit 10 mM KPP, pH 7,2, gewaschen. Zum Aufschluss wurden die Zellen im zweifachen Volumen 100 mM KPP, pH 7,2, suspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Beschallung erfolgte bei 70 % Amplitude der Sonotrode für 2,5 min in 5 s Intervallen mit je 10s Pause. Die Aufschlusslösung wurde zentrifugiert und der klare Rohextrakt über Nacht bei 4°C gegen 10 mM KPP (pH 7,2) + 10 % Glycerin dialysiert. Der so präparierte Rohextrakt wurde für diese Arbeit freundlicherweise von Susanne Unversucht zur Verfügung gestellt.

2.25.6 Dialyse

Der Rohextrakt der *Pseudomonas*-Zellen wurde bei 4°C über Nacht im 50fachen Volumen an 0,01 M KPP, pH 7,2, dialysiert. Angereicherte Proteinlösungen wurden gegen das 50 fache Volumen an 0,01 M KPP, pH 7,2, unter Zusatz von 20 % Glycerin dialysiert.

2.25.7 Photometrische Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach WHITAKER & GRANUM (1980) durch Extinktionsmessung bei 280 nm und 235 nm bestimmt. Die Lösungen sind dafür so zu verdünnen (20-100 fach), dass die Extinktion bei 235 nm den Wert 1,2 nicht übersteigt, um im Bereich der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes zu messen. Aus den Extinktionen der Proteinlösung wurde die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$[c]_{\text{Protein}} \text{ in mg/ml} = \frac{(E_{235} - E_{280})}{2,51} \cdot f_{\text{Verdünnung}}$$

E_{235} Extinktion bei 235 nm

E_{280} Extinktion bei 280 nm

$f_{\text{Verdünnung}}$ Verdünnungsfaktor der Proteinlösung

2.25.8 Konzentrierung von Proteinlösungen

Verdünnte Proteinlösungen wurden mittels Ultrafiltration in einer Amicon-Ultrafiltrationszelle mit einer Diaflo[®]-Membran PM30 konzentriert. Die Ausschlussgrenze liegt bei 30 kDa. Somit wurden nur höhermolekulare Bestandteile konzentriert, nicht aber kleine Proteine, Salze oder niedermolekulare Substanzen wie Cofaktoren und Glycerin.

2.25.9 Metal-Chelating-Chromatographie

Für die *metal-chelating*-Chromatographie wurde das Säulenmaterial „Chelating Sepharose FF“ der Firma Pharmacia verwendet. Zur Vorbereitung des Säulenmaterials wurde mit drei Säulenvolumen dest. Wasser gewaschen. Danach erfolgt die Beladung des Säulenmaterials mit Ni-Ionen. Es wurde mit dem zweifachen Säulenvolumen 0,2 M NiSO₄-Lösung gespült. Danach wurden überschüssige Ni-Ionen mit dem zweifachen Säulenvolumen dest. Wasser ausgespült. Die Säule (Ø 8 mm x Länge 50 mm) wurde mit dem vierfachen Säulenvolumen Auftragspuffer äquilibriert. Die Probe wurde mit einer Flussrate von 0,25 ml/min aufgetragen. Die maximale Auftragsmenge an Protein von 5 mg pro ml Säulenmaterial sollte nicht überschritten werden. Es wurde mit Auftragspuffer so lange gewaschen, bis alle nichtbindenden Proteine von der Säule gespült waren. Dies wurde über die Absorption bei 280 nm beobachtet. Diese Proteinfraction wurde als Säulendurchlauf definiert.

Im Anschluss daran wurden die schwach bindenden Proteine mit Waschpuffer I und II von der Säule eluiert. Die Säule wurde danach solange mit Waschpuffer II gespült, bis die Absorption bei 280 nm auf einen stabilen Wert abgesunken war. Die Elution erfolgte im Batchverfahren mit dem entsprechenden Elutionspuffer. Dabei wurden Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt. Die Flussrate für Waschschritte und Elution betrug 0,5 ml/min. Die

Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und sinnvoll gepoolt. Das Eluat, der Durchlauf und die Waschfraktionen wurden sofort einzeln gegen 10 mM KPP+20 % Glycerin über Nacht dialysiert, 10:1 konzentriert und jeweils auf Aktivität untersucht. Danach wurden die Proteinlösungen aliquotiert und eingefroren.

2.26 Proteinanalytik

2.26.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde zur Analyse von Proteinen eingesetzt. Dabei werden die Proteine denaturiert und durch hydrophobe Wechselwirkung mit SDS in anionische Form überführt. Alle Proteine werden durch SDS mit einer konstanten Nettoladung versehen, dadurch erfolgt deren Auftrennung nur noch aufgrund der unterschiedlichen Massen. Die Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode. Durch Markerproteine bekannter Masse kann die relative Masse eines Proteins im Gel abgeschätzt werden.

2.26.1.1 Herstellung und Zusammensetzung der Gele nach LAEMMLI (1970)

Die SDS-PAGE wurde mit 10 %igen Polyacrylamidgelen in vertikalen „*semi dry*“-Elektrophoreseapparaturen durchgeführt. Die Glasplatten, Spacer, Rahmen und der Kamm wurden mit Ethanol von Fett und Fusseln befreit und zusammengesetzt. Die Angaben beziehen sich auf 2 Gele mit den Maßen 6 cm x 14 cm x 0,1 cm.

Zusammensetzung des Trenngels (10 %):	5 ml PAGE-Lösung I
	7,5 ml PAGE-Lösung II
	2 ml dest. H ₂ O
	7,5 µl TEMED
	500 µl APS

Das Trenngel wurde gemischt und sofort in die vorbereitete Gelapparatur gegossen und mit Ethanol ca. 0,5 cm überschichtet, um eine ebene Abschlusskante zu erzielen und das Austrocknen des Gels zu verhindern. Zum Polymerisieren wurde das Gel 30 min bei RT stehengelassen.

Zusammensetzung des Sammelgels (4,5 %):	0,95 ml PAGE-Lösung I
	3,125 ml PAGE-Lösung III
	1,975 ml dest. H ₂ O
	15 µl TEMED
	210 µl APS

Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde der überstehende Alkohol abdekantiert und das Sammelgel darauf gegossen. Der Kamm wurde sofort in das noch nicht polymerisierte Sammelgel gesteckt. Zum Polymerisieren wurde das Gel wiederum 30 min bei RT stehengelassen.

2.26.1.2 Probenaufbereitung:

Pro Tasche können maximal 25 µg Protein aufgetragen werden. Das Auftragsvolumen beträgt immer 25 µl. Dazu wurde die Proteinlösung mit Auftragspuffer verdünnt. Die Probe wurde mit 5 µl DTT-Lösung gemischt und für 5 min gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Proben für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde 1 µl BPB zupipettiert und nochmals kurz zentrifugiert.

2.26.1.3 Elektrophorese

Die Gelplatten wurden ohne Rahmen in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Pufferreservoirs befüllt. Anschließend wurde der Kamm gezogen und die Probentaschen gespült. Die vorbereiteten Proben wurden mit einer Hamilton[®]-Spritze in die Taschen des Gels gefüllt. Die Spritze ist zwischen den einzelnen Proben gründlich mit dest. H₂O zu spülen.

Die beiden äußeren Taschen wurden nur mit Auftragspuffer befüllt. Die Kammer wurde an die Spannungsquelle angeschlossen und die Elektrophorese gestartet. Die Gelelektrophorese wurde mit konstanter Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Die Trennung wurde abgebrochen, wenn die BPB- Front gerade aus dem Gel herauslief. Zur Proteinfärbung wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel abgetrennt. Die obere rechte Ecke wurde schräg geschnitten um die Orientierung später nachvollziehen zu können. Anschließend wurden die Proteine entweder angefärbt oder auf eine Membran geblottet.

2.26.1.4 Coomassie- Proteinfärbung

Die Gele wurden mit Coomassie-Färber für 20 min unter leichtem Schwenken gefärbt. Danach wurde die Färbelösung abdekantiert und das Gel kurz mit dest. Wasser gespült. Anschließend wurde das Gel in Entfärberlösung geschüttelt, bis es nahezu vollständig farblos und nur noch die Proteinbanden gefärbt sind. Die Gele wurden danach mindestens 1 h gewässert und dann im Geltrockner getrocknet.

2.26.2 Western-Blot

Zum Nachweis von Proteinen in Elektropherogrammen können Antikörper eingesetzt werden. Dazu werden die aufgetrennten Proteingemische auf Membranen übertragen und immobilisiert. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde im TankBlot durchgeführt. Dafür wurde das Proteingemisch in einer SDS-PAGE, wie in 2.26.1 beschrieben, nach Massen getrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel jedoch nicht gefärbt, sondern für 15 min in Blotpuffer fixiert. Filterpapiere und Schwämme der Blotkammer wurden zuvor 15 min in Blotpuffer eingeweicht. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung der Oberfläche zunächst 15 s in Methanol gelegt, kurz mit dest. Wasser abgespült, für 2 min in dest. Wasser geschwenkt und anschließend 10 min in Blotpuffer äquilibriert. Das Gel und die Membran wurden luftblasenfrei mit Filterpapieren und Schwämmen in die Blotkammer eingespannt (Abb. 2.5) und in den mit Blotpuffer gefüllten Tank gestellt. Der Transfer erfolgte bei 300 mA für 16 h von der Kathode zur Anode unter ständiger Kühlung.

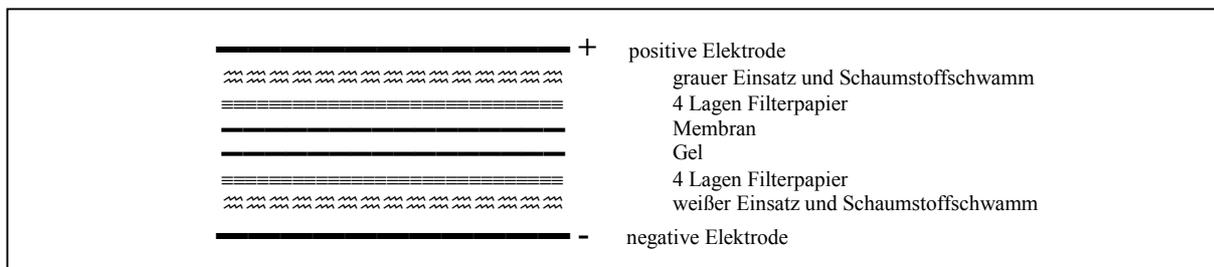


Abb. 2.5: Aufbau des Western Blot.

2.26.3 Immunodetektion

Der Nachweis der Expression der potenziellen Tryptophan-5-Halogenase erfolgte anhand der Fusion des Enzyms mit dem NH₂-terminalen Epitop des Vektor pCIBhis: -Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys- (Anhang Abb. A.1.). Dieses Epitop kann mit Anti-Xpress-HRP® Antikörper der Firma Invitrogen detektiert werden. Der Antikörper ist mit einer Merettichperoxidase konjugiert. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgt durch Chemolumineszenz. Diese Reaktion beruht auf der Umwandlung des Chemolumineszenzsubstrates durch das HRP-Konjugat am Antikörper.

2.26.3.1 Detektion des Antikörpers

Nach Beendigung des Blots wurde der Umriss des Gels auf der Membran nachgezeichnet. Die Membran wurde dreimal 10 min mit 100 ml TBS-T gewaschen und anschließend für 2 h mit TBS-Milch geblockt. Überschüssiger Blockpuffer wurde durch dreimaliges 10 minütiges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Membran wurde für 2 h bei RT mit der Antikörperlösung unter stetem Benetzen inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Antikörper dreimal 10 min mit TBS-T ausgewaschen. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgt durch die Reaktion des HRP-Konjugats mit Luminol und H₂O₂. Die Membran wurde mit

Detektionsreagenz benetzt und sofort luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt. Die Chemolumineszenzreaktion wurde durch 10-15 minütiges Exponieren eines Röntgenfilmes dokumentiert. Nach der Detektion werden die Proteine auf der Membran mit Coomassie angefärbt.

2.27 Aktivitätstests

2.27.1 Bestimmung der Enzymaktivität der Flavinreduktase Fre aus *E. coli*

Die Enzymaktivität der NAD(P)H-abhängigen Flavin-Oxidoreduktase (Fre) wurde in Anlehnung an FONTECAVE *et al.* (1987) und RUSS *et al.* (2000) bestimmt.

In eine Küvette wurden	100 μ l <i>E. coli</i> Rohextrakt (Fre)	$c_{\text{Prot}} \sim 6$ mg/ml
	10 μ l FAD	1 mM
	885 μ l KPP, pH 7,2	10 mM
pipettiert, gemischt und mit	4 μ l NADH	50 mM versetzt.

Durch die NADH-Zugabe wurde der Enzymtest gestartet. Die Abnahme der NADH-Konzentration wurde durch Extinktionsmessung bei 340 nm bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Reaktion wurde über einen Zeitraum von 5 min verfolgt. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetz.

Ein Unit Enzymaktivität wird durch die Oxidation von 1 nmol NADH pro min definiert [FONTECAVE *et al.*, 1987].

2.27.2 Enzymtest zum Nachweis der Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase

Für den Nachweis von Halogenase-Aktivität wurde das postulierte Substrat L-Tryptophan eingesetzt. In Analogie zur Tryptophan-7-Halogenase wurde die Zusammensetzung des Enzymtests von KELLER (1999), HÖLZER (2000) und UNVERSUCHT (2000) übernommen.

Dabei wurden zur enzymatischen Umsetzung von Tryptophan zu 7-Chlortryptophan Chlorid, FAD, NADH und Sauerstoff benötigt. Außerdem wurde eine NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase zugesetzt, die FAD mit NADH-Äquivalenten *in situ* zu FADH₂ umsetzt. Die hier verwendete Flavinreduktase Fre aus *E. coli* [FONTECAVE *et al.*, 1987] wurde als Rohextrakt des Expressionsklons *E. coli* JM109(DE3) pEE1001 [SPYROU *et al.*, 1991] eingesetzt. Der Rohextrakt wurde wie in 2.25.5 beschrieben, gewonnen und dessen Reduktaseaktivität bestimmt (2.27.1).

Die Enzymtests für die Tryptophan-5-Halogenase wurden im Gesamtvolumen von 200 μ l durchgeführt. Die Einhaltung der Pipettierfolge ist besonders zu beachten (Tab. 2.10). Die Inkubation erfolgte über 6 h bei 30°C in Rundschüttelmaschinen. Nach 6 h wurde der Enzymtest durch 10 min Kochen im Wasserbad abgebrochen und 15 min bei 13200 rpm

zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC analysiert. Für den Enzymtest ohne Fre wurde anstelle der Fre KPP pipettiert.

Tab. 2.10: Zusammensetzung und Pipettierfolge des Enzymtests

STAMMLÖSUNG	KONZENTRATION [c ₀]	ENDKONZENTRATION [c _E]	PIPETTIERSHEMA
Fre	3 U/ml	4,5 mU	1,5 µl
FAD-Na ₂	1 mM	10 µM	2 µl → mischen
Trp-5-Hal			100 µl → mischen
KPP	10 mM		72 µl
NaCl/NaBr	3 M	25 mM	1,7 µl
L-Tryptophan	10 mM	0,6 mM	12 µl
NADH	50 mM	2,4 mM	9,5 µl → zentrifugieren

2.27.3 Analyse der Enzymtests mittels HPLC

Die Analyse der Enzymtests für die Tryptophan-5-Halogenase erfolgte mittels HPLC. Die Zuordnung von Edukt und Produkt erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten t_R mit den Referenzsubstanzen L-Tryptophan, 7-Chlortryptophan und 5-Bromtryptophan. Für 5-Chlortryptophan stand keine Referenzsubstanz zur Verfügung.

Die Trennung der Metabolite erfolgte an einer *reversed-phase*-Säule Nucleosil[®] RP18, 5,0 µm SC (125 x 4,6 mm). Als Laufmittel wurde das Gemisch aus Wasser und Methanol im Verhältnis 60:40 unter Zusatz von 0,1 % (v/v) TFA verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption im UV bei 220 nm. Es wurden 20 µl des Enzymtests injiziert. Die Chromatogramme wurden aufgezeichnet und mit der GAT-Chrom[®] Chromatographie Software 1993-1995 ausgewertet. Es wurden ebenfalls Chromatogramme im DAD-Scanmodus aufgezeichnet. Damit wurden UV-Spektren einzelner Peaks von 200 bis 360 nm erhalten.

2.27.4 Identifizierung der Reaktionsprodukte mittels HPLC/MS

Die Identifizierung der Reaktionsprodukte der Enzymtests erfolgte mittels HPLC/MS. Dazu wurden 20 µl der Enzymtests chromatographisch auf einer C18-Säule getrennt und die einzelnen Peaks im Massenspektrometer analysiert. Dazu wurden die Substanzen positiv im Elektronensprayionisator (esi-pos) ionisiert und deren Masse ($M+H^+$) bestimmt. Die Messungen wurden freundlicherweise durch Bojan Bister aus der AG Süßmuth im Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

2.27.5 Bestimmung der Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase

Die Auswertung der Enzymtests für die Tryptophan-5-Halogenase erfolgt durch HPLC. Die Chromatogramme wurden wie in 2.27.3 beschrieben, aufgezeichnet und die Peaks anhand der Retentionszeiten identifiziert. Die Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase wurde aus der Peakfläche des Produktes bei 220 nm unter Verwendung einer Kalibriergeraden bestimmt.

In der Kalibriergeraden wurde die Peakfläche über der Stoffmenge der Referenzsubstanz aufgetragen.

Die Enzymaktivität wird international in *units* [U] angegeben. Ein *unit* ist definiert als die Enzymmenge, die 1 μMol Produkt pro min unter festgelegten Reaktionsbedingungen umsetzt. Die Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase wird anhand der gebildeten Produktmenge berechnet. Die Produktmenge wurde anhand der Peakflächen im HPLC-Chromtogramm durch eine Kalibrierung mit Referenzsubstanzen bestimmt. Die Enzymaktivität wird für 1 ml Proteinlösung angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Hybridisierung von Gesamt-DNA aus *Streptomyces rugosporus*

3.1.1 Hybridisierung mit *prnA* aus *Pseudomonas fluorescens* BL915

Aus *S. rugosporus* LL-42D005 wurde Gesamt-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und mittels SOUTHERN Blot auf Nylonmembranen fixiert.

Zur Detektion eines Halogenase-Gens in *S. rugosporus* wurde das Gen der Tryptophan-7-Halogenase (*prnA*) aus *P. fluorescens* BL915 [HAMMER *et al.*, 1997] als Gensonde zur Hybridisierung eingesetzt. Das Gen *prnA* wurde als *Bam*HI-Fragment aus pWB-FA isoliert und mit DIG markiert (2.18.3). Der theoretische Schmelzpunkt bei 100 %iger Homologie beträgt 107,2 °C (für 5xSSC). Die Bedingungen für die Hybridisierung und die Waschschrte wurden im Bereich von 55-80 % Homologie untersucht. In Abb. 3.1 sind das Agarosegel und der SOUTHERN Blot nach der Hybridisierung mit DIG-markierter *prnA* bei einer berechneten Homologie von 66 % dargestellt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C in 5xSSC. Die Stringenzwaschschrte wurden bei 62 °C mit 2xSSC und 1xSSC durchgeführt. Es konnten keine eindeutigen Hybridisierungssignale erzielt werden. Bei der Erhöhung der Homologie auf 70 % konnten keine diskreten Banden detektiert werden.

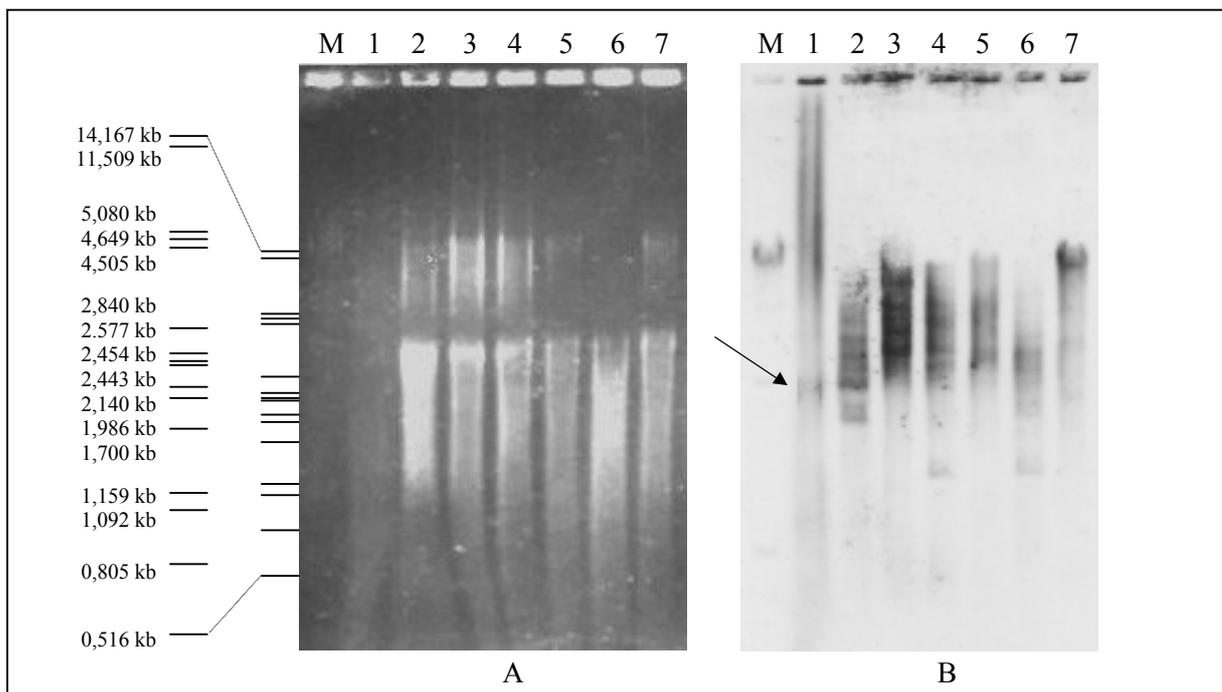


Abb. 3.1: Agarosegel (A) und der SOUTHERN Blot (B) nach der Hybridisierung von Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* mit DIG- markierter Sonde *prnA*:

M: Größenstandard λ -*Pst*I

1: *P. pyrrocinia* Gesamt-DNA verdaut mit *Bam*HI

2-8: *S. rugosporus* Gesamt-DNA verdaut mit:

2. *Xma*I, 3: *Sal*I, 4: *Sac*I, 5: *Pst*I, 6: *Pae*I, 7: *Bgl*II

(Hybridisierungssignal der Kontrolle mit Pfeil gekennzeichnet)

3.1.2 Hybridisierung mit einem Fragment des Tryptophan-6-Halogenase-Gens aus *Streptomyces albogriseolus*

Ein PCR-Fragment aus dem Tryptophan-6-Halogenase-Gen des Thienodolinproduzenten *Streptomyces albogriseolus* [SCHNERR, 1999] wurde als DNA-Sonde zur Detektion homologer Gene in *S. rugosporus* eingesetzt. Das Fragment wurde aus pHI1536 mit den Primern trpst+/trpst- amplifiziert (2.17.3.1) und mit DIG markiert (2.18.3). Der GC-Gehalt des 320 bp Fragmentes beträgt 57 %. Der theoretische Schmelzpunkt bei 100 %iger Homologie beträgt: 102,8 °C (für 5xSSC). Die Hybridisierung erfolgte bei 56 °C in 5xSSC und die Stringenzwaschschritte wurden bei 52 °C mit 1xSSC + 0,1 % SDS und 0,5xSSC + 0,1 % SDS durchgeführt. Das entspricht einer theoretischen Homologie von 65,5 %.

In Abb. 3.2 ist das Agarosegel und der SOUTHERN Blot der Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* nach der Hybridisierung mit DIG-markierter „PCR-thal“ dargestellt. Es konnten keine spezifischen Hybridisierungssignale detektiert werden.

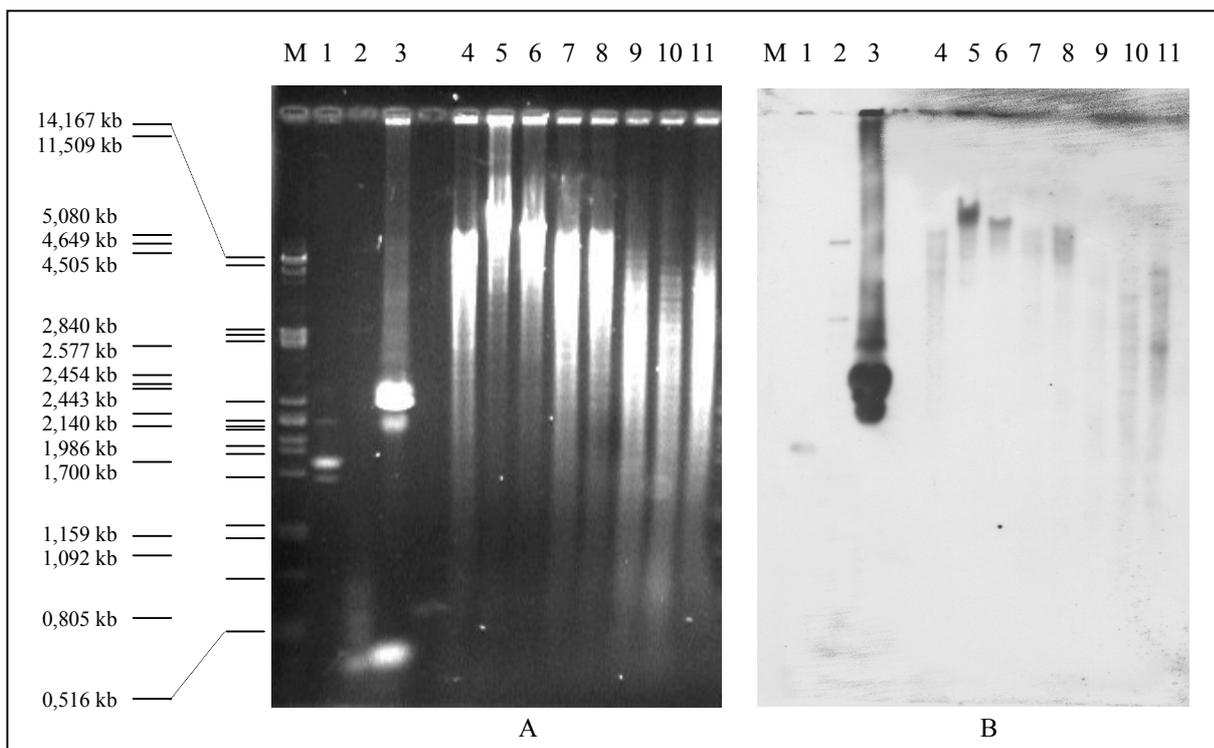


Abb. 3.2: Agarosegel (A) und SOUTHERN Blot (B) nach der Hybridisierung von Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* mit DIG- markierter Sonde „PCR-thal“:

M: Größenstandard λ -PstI

1: *prnA* aus *P. fluorescens* verdaut mit *Bam*2: Plasmid pUC18 unverdaut

3: Plasmid pHI1536 verdaut mit *KpnI/PaeI*

4- 11: Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* verdaut mit:

4: *Bam*HI, 5: *Eco*RI, 6: *Kpn*I, 7: *Pae*I, 8: *Pst*I, 9: *Sac*I, 10: *Sal*I, 11: *Sma*I

3.2 Biosynthesemodell für Pyrroindomycin B

3.2.1 Modell für die Bildung der modifizierten Kohlenhydrate

Wie in 1.6 beschrieben besitzen die Pyrroindomycine in ihrer Struktur ein modifiziertes Trisaccharid (Abb. 3.3). Aufgrund der chemischen Struktur der Kohlenhydrate und den allgemeinen Kenntnissen über die Bildung von Desoxy-(amino)-zuckern aus anderen Mikroorganismen [LIU & THORSON, 1994] wurden einzelne Schritte der Biosynthese postuliert (Abb. 3.4 und Abb. 3.5).

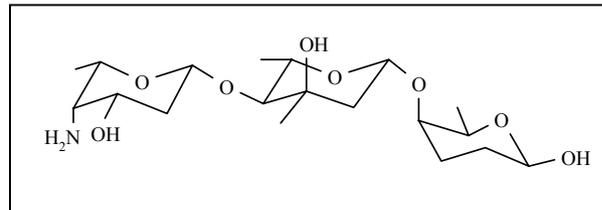


Abb. 3.3: Trisaccharid aus der Struktur der Pyrroindomycine A und B.

Glucose-1-phosphat als Produkt des Primärstoffwechsels wird durch die Übertragung eines Nukleotids durch eine dTDP-D-Glucosesynthase für die Modifikationen aktiviert. Durch eine dNDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase wird das zentrale Intermediat, die dNDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose, gebildet. Dieses Enzym wird als Schlüsselenzym für die Biosynthese von 6-Desoxyzuckern betrachtet [LIU & THORSON, 1994].

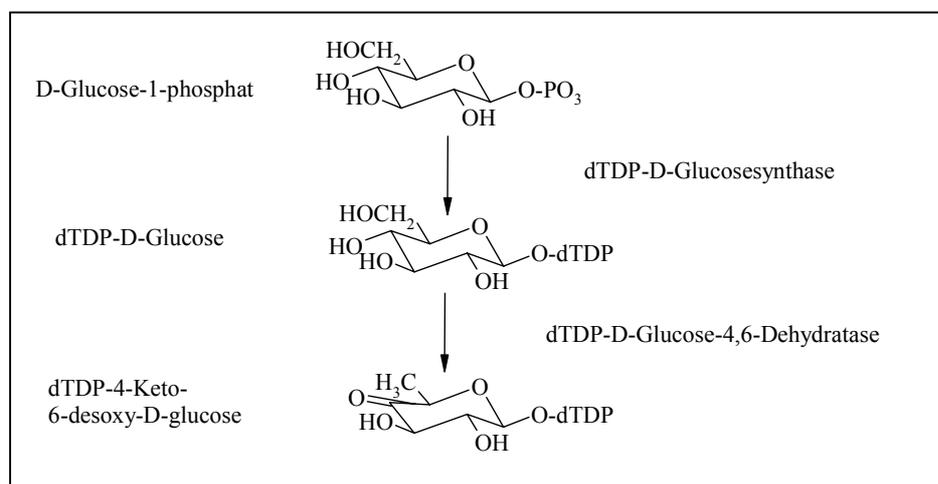


Abb. 3.4: Erste Schritte in der Kohlenhydratmodifizierung. Aktivierung von Glucose-1-phosphat und Bildung von dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-Glucose.

Ausgehend von dNDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose werden in mehreren verschiedenen Schritten die modifizierten Di- und Tridesoxyzucker gebildet (Abb. 3.5). Für die Bildung der Kohlenhydrate Mycarose und Rhodiose wurden Biosynthesemodelle beschrieben [SUMMERS *et al.*, 1997; WESTRICH *et al.*, 1999]. Das Modell für die Biosynthese des modifizierten Aminotridesoxyzuckers der Pyrroindomycine wurde hier neu entworfen. Dazu wurden

Modelle und Kenntnisse über die Bildung ähnlicher Kohlenhydrate in die Überlegungen einbezogen.

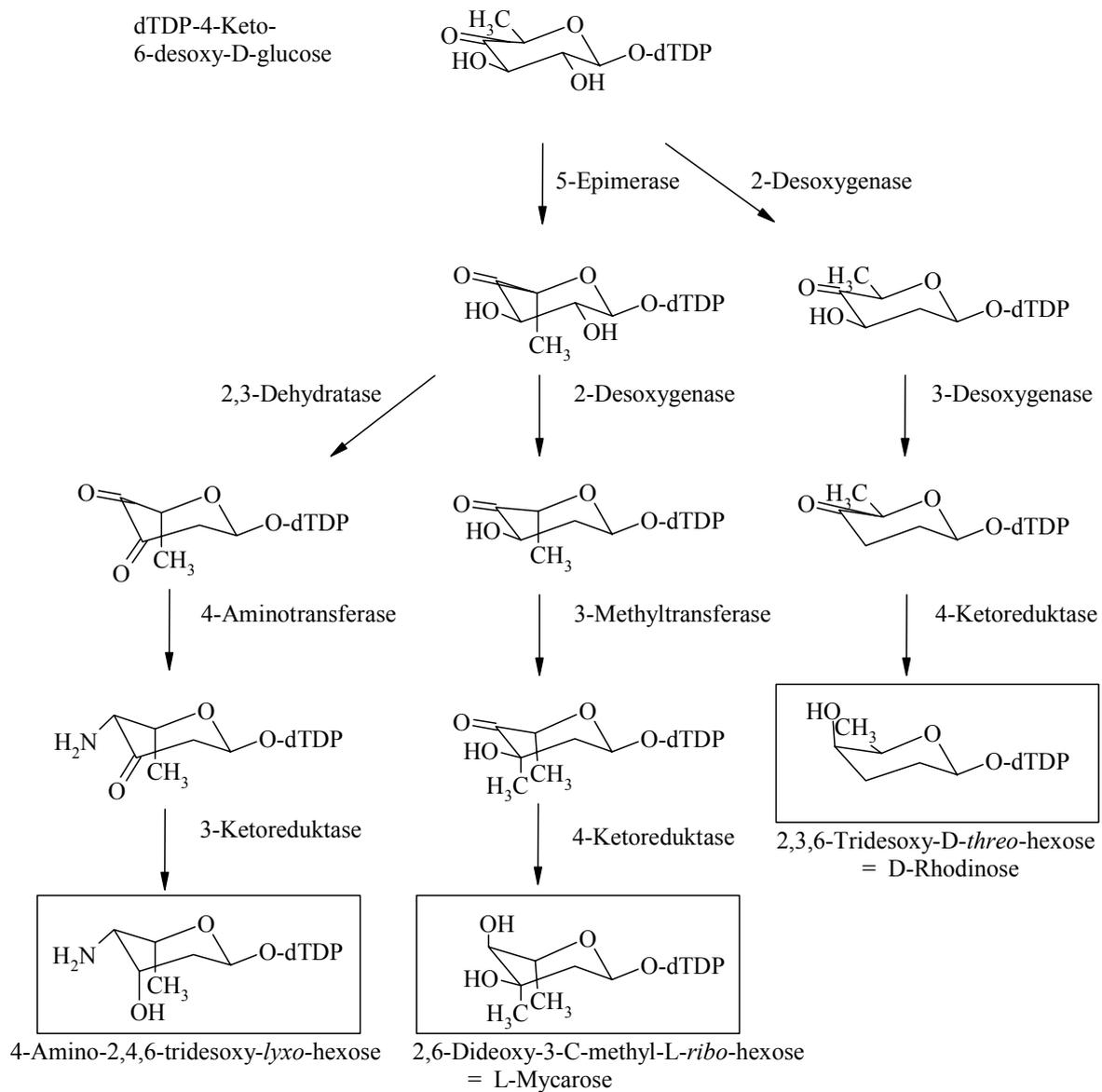


Abb. 3.5: Biosynthesemodell für die Bildung der modifizierten Di- und Trideoxyzucker der Pyrroindomycine.

3.2.2 Modell für die Biosynthese des chlorierten Indolpyrrolringes

Über die Bildung von Indolpyrrolringssystemen ist bisher wenig bekannt. Als Substrat für die Bildung des Indolpyrrolringes und die Chlorierung wird Tryptophan postuliert. Die regioselektive enzymatische Chlorierung von Tryptophan durch eine FADH₂-abhängige Halogenase wurde von HOHAUS *et al.* (1997) und HÖLZER *et al.* (2001) beschrieben. In Abb. 3.6 ist das Modell für die Biosynthese des chlorierten Indolpyrrolringes von Pyrroindomycin B dargestellt. Im ersten Schritt wird Tryptophan regioselektiv in Position 5 durch eine FADH₂-abhängige Tryptophan-5-Halogenase chloriert um nachfolgend durch Zyklisierung zum Indolpyrrolringssystem umgewandelt zu werden. Die dargestellte Reihenfolge der Chlorierung und Zyklisierung ist nicht zwingend.

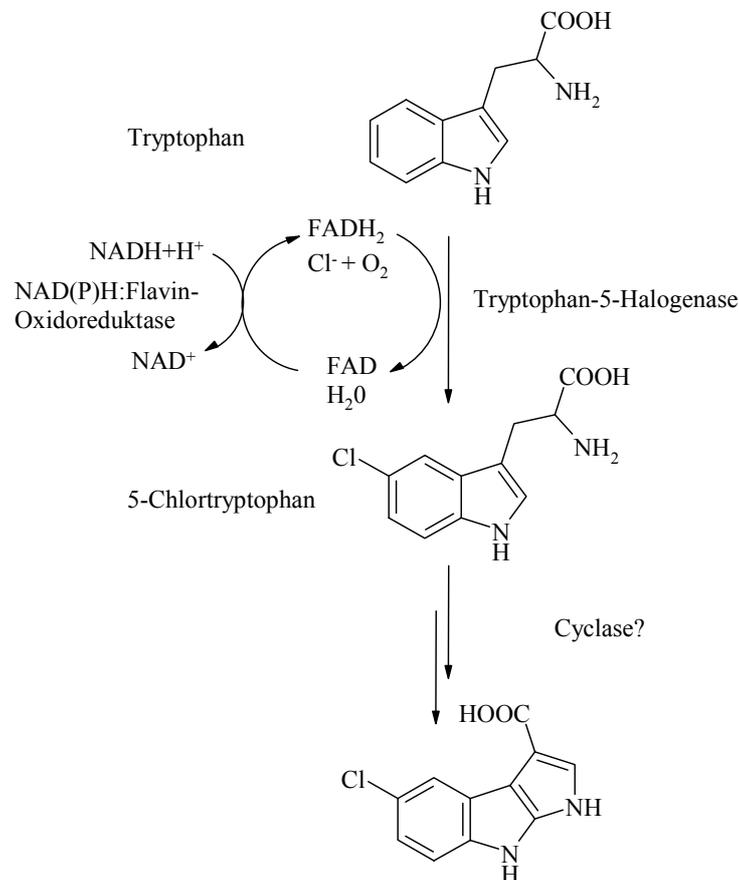


Abb. 3.6: Biosynthesemodell für die Bildung des chlorierten Indolpyrrolrestes.

Darstellung der Chlorierung von Tryptophan durch eine Tryptophan-5-Halogenase zu 5-Chlortryptophan und Zyklisierung zu 5-Chloro-1,8-dihydro-pyrrolo-[2,3-b]-indol-3-carbonsäure.

3.2.3 Modell für die Biosynthese des polyketidischen Makrozyklus

Die Biosynthese von Makrozyklen durch Polyketidsynthasen wurde für verschiedene Makrolide eingehend beschrieben. Der Makrozyklus der Pyrroindomycine weist einige strukturelle Besonderheiten auf. In diesem Modell werden neben einer außergewöhnlichen Startereinheit auch mehrere ungewöhnliche *extender units* vermutet. Für die Kettenverlängerung des Polyketids werden neben mehreren Malonyl-CoA-Einheiten eine Methylmalonyl-CoA-Einheit, eine Ethylmalonyl-CoA-Einheit, und eine Malyl-CoA-Einheit postuliert. Verschiedene post-PKS-Modifizierungen und der Ringschluss zum Makrozyklus müssen folgen, um zur Struktur des polyketidischen Makrozyklus der Pyrroindomycine zu gelangen (Abb. 3.7). Für die Bildung der Spiroverbindung existiert bisher keine plausible Modellvorstellung.

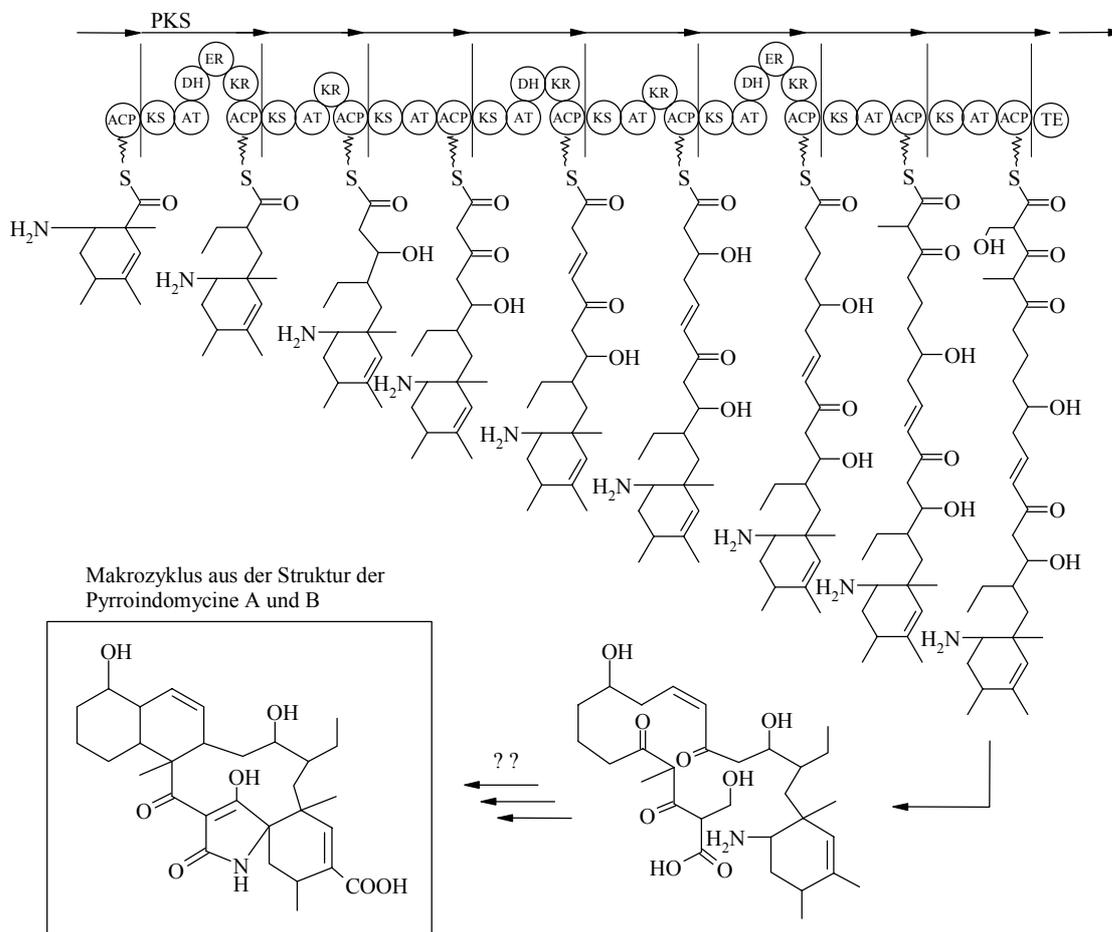


Abb. 3.7: Biosynthesemodell für den polyketidischen Makrozyklus der Pyrroindomycine. Bildung durch eine modulare Polyketidsynthese mit ungewöhnlichen Starter- und Extendereinheiten.

Ein anderes Modell für die Biosynthese des Makrozyklus wäre die Kopplung einer nichtribosomalen Peptidsynthase (NRPS) mit einer modularen PKS. Dabei würde der Makrozyklus sukzessive aus verschiedenen Acylresten und einer Aminosäure aufgebaut. Die Kopplung von NRPS/PKS setzt die Übertragung einer enzymgebundenen Aminosäure von einem Peptidylcarrierprotein auf ein Acylcarrierprotein oder *vice versa* voraus. Es ist denkbar, dass eine enzymgebundene Aminosäure als Startereinheit fungiert und daran die wachsende Polyketidkette kondensiert wird. Eine weitere Möglichkeit für die PKS/NRPS-Kopplung ist die Übertragung einer Aminosäure als finale Extendereinheit auf das vollständige Polyketidgerüst.

Es wurde ein Biosynthesemodell für die Bildung der Pyrroindomycine in *S. rugosporus* erarbeitet. Anhand dieses Modells sollten in Gesamt-DNA von *S. rugosporus* einzelne postulierte Gene detektiert werden. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurden durch PCR-Amplifizierungen ein Genfragment für ein Enzym aus der Biosynthese der Didesoxysaccharide, Fragmente von Polyketidsynthase-Genen, ein Tryptophanhalogenase-Gen und Gene für potenzielle Glycosyltransferasen gesucht.

3.3 PCR mit degenerierten Primern mit Gesamt-DNA aus *S. rugosporus*

3.3.1 Amplifizierung mit degenerierten Primern für dNTP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gene

Zur Detektion von dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Genen in *S. rugosporus* wurden degenerierte Oligonukleotide [DECKER *et al.*, 1996] als Primer zur PCR-Amplifizierung eingesetzt. Unter den in 2.17.1 angegebenen Bedingungen wurde ein DNA-Fragment mit einer Größe von 500 bp amplifiziert (Abb. 3.8).

Das PCR-Fragment wurde mit DIG markiert und als Sonde zur Hybridisierung von Gesamt-DNA (2.18) eingesetzt. Die Hybridisierung mit der Sonde „PCR-GDH“ erfolgte unter den Bedingungen T_H : 64 °C 2xSSC, T_S : 62 °C Waschlösung I: 0,5xSSC + 0,1 % SDS; Waschlösung II: 0,2xSSC + 0,1 % SDS. Es wurden deutliche Hybridisierungssignale detektiert (Tab. 3.1).

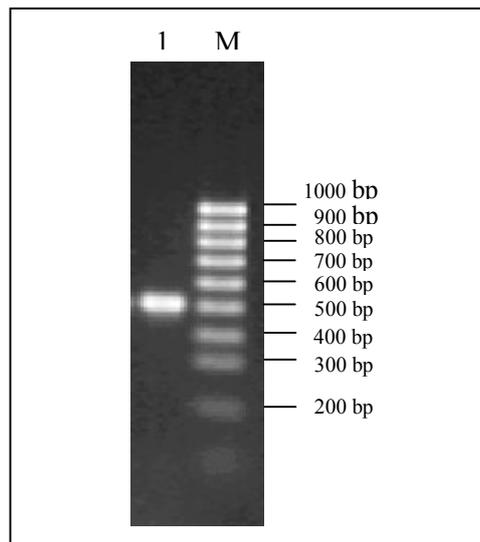


Abb. 3.8: Agarosegel für die PCR mit degenerierten Primern für dNTP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gene:

- 1: Amplifikat für dNDP-4,6-Glucosedehydratase-Gene aus Gesamt-DNA (500 bp)
M: Größenstandard 100bp-Ladder

Tab. 3.1: Detektierte Banden für die Hybridisierung mit „PCR-GDH“

<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Kpn</i> I	<i>Pae</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sac</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Sma</i> I
>14000 bp	>*14000 bp	>*14000 bp	>14000 bp	>14000 bp	4500 bp	*2500 bp	*3000 bp
2600 bp		13000 bp	6000 bp	11000 bp	*1800 bp	1700 bp	2500 bp
*1700 bp		4100 bp	*3400 bp	4300 bp	1000 bp		
				*1700 bp			

*detektierte Banden bei hoher Stringenz

3.3.2 Amplifizierung mit degenerierten Primern für Polyketidsynthase-Gene

Von TSANTRIZOS [SANCHÉZ, persönl. Mitteilung, 2001] wurden degenerierte Primer aus Ketosynthasedomänen verschiedener Polyketidsynthasen des Typ I entwickelt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR-Amplifizierung sind in 2.17.2 beschrieben. Es konnte ein Fragment mit einer Größe von 750 bp amplifiziert werden (Abb. 3.9). Das Amplifikat wurde mit DIG markiert (2.18.3) und zur Hybridisierung von Gesamt-DNA (2.18) eingesetzt. Es konnten Hybridisierungssignale detektiert werden. Die Hybridisierung mit der Sonde „PCR-PKS“ erfolgte unter den Bedingungen T_H : 68 °C mit 5 x SSC, T_S : 68 °C Waschlösung I: 2 x SSC + 0,1 % SDS, Waschlösung II: 0,2 x SSC + 0,1 % SDS. Die detektierten Banden sind in Tab. 3.2 dargestellt.

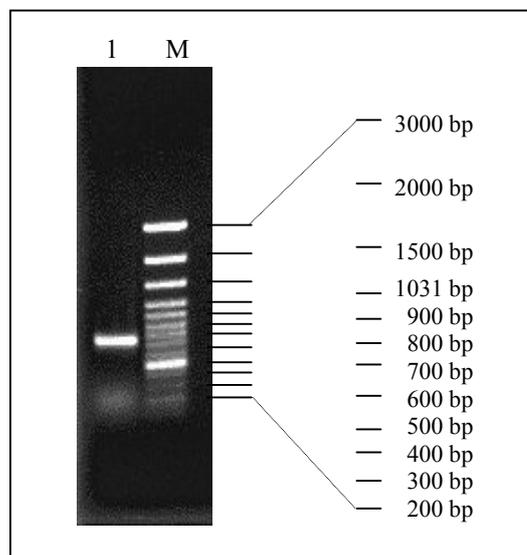


Abb. 3.9: Agarosegel für die PCR mit degenerierten Primern für PKS-Gene:

- 1: Amplifikat für PKS-Gene aus Gesamt-DNA (750 bp)
 M: Größenstandard 100 bp-Ladder Plus

Tab. 3.2: Detektierte Banden für die Hybridisierung von Gesamt-DNA mit „PCR-PKS“

<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	<i>Pvu</i> I	<i>Sph</i> I
7000 bp	>14000 bp	12000 bp	11000 bp
6000 bp			8000 bp
5000 bp			4200 bp
3400 bp			

3.3.3 Amplifizierung mit degenerierten Primern für Glycosyltransferase-Gene

Von BLANCO *et al.* (2001) wurden degenerierte Oligonukleotide zur Detektion von Glycosyltransferase-Genen beschrieben. Diese Oligonukleotide wurden unter den in 2.17.4 beschriebenen Bedingungen zur PCR-Amplifizierung von Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* eingesetzt. Es konnte ein DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von 350 bp nachgewiesen werden (Abb. 3.10).

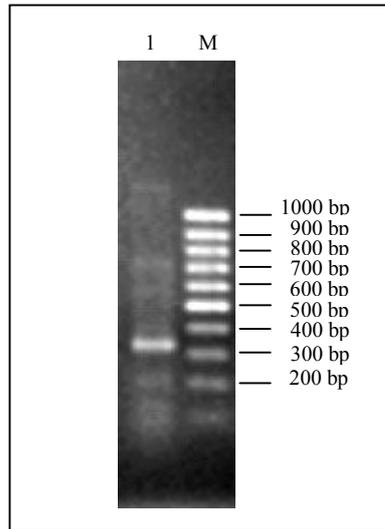


Abb. 3.10: Agarosegel für die PCR mit degenerierten Primern für GTF-Gene:

- 1: Amplifikat für Glycosyltransferase-Gene aus Gesamt-DNA (320 bp)
 M: Größenstandard 100 bp Ladder

3.3.4 PCR zur Detektion eines Tryptophanhalogenase-Gens

3.3.4.1 Amplifizierung mit den Oligonukleotiden *trpst+*/*trpst-*

Von TÖLZER (1998) wurden aus Sequenzvergleichen bekannter Tryptophan-7-Halogenasen der Pyrrolnitrinbiosynthese degenerierte Oligonukleotide entwickelt [TÖLZER, persönl. Mitteilung, 1998]. Diese Oligonukleotide *trpst+*/*trpst-* wurden zur PCR-Amplifizierung eines Halogenase-Genfragmentes aus Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* eingesetzt. In den Experimenten konnten unter verschiedenen Bedingungen keine Amplifikat erhalten werden (ohne Abb.).

3.3.4.2 Design von degenerierten Oligonukleotiden für Tryptophanhalogenase-Gene

Es wurden neue degenerierte PCR-Primer für die Detektion von Tryptophanhalogenase-Genen entwickelt. Sechs bekannte Sequenzen verschiedener Tryptophanhalogenasen wurden verglichen. Aus dem Alignment der Aminosäuresequenzen von vier PrnAs [HAMMER *et al.*, 1999], Thal [SCHMID, persönl. Mitteilung, 2000] und RebH [SANCHEZ *et al.*, 2002] wurden vier konservierte Bereiche ausgewählt (Abb. 3.11).

PrnA-A 1 ~~~~~M~~NKPI~~K~~NI~~VI~~VGGGTAGWMAASYL~~V~~RALQ~~.QANITLIES~~EAI~~PRIGVGEATI
 PrnA-B 1 ~~~~~M~~SNPI~~K~~NI~~VI~~VGGGTAGWMAASYL~~V~~RALQ~~.QTNITLIES~~SAA~~IPRIGVGEATI
 PrnA-F 1 ~~~~~M~~NKPI~~K~~NI~~VI~~VGGGTAGWMAASYL~~V~~RALQ~~.QVNITLIES~~SAA~~IPRIGVGEATI
 RebH 1 ~~~~~M~~SGKIDKI~~LI~~VGGGTAGWMAASYL~~G~~KALQ~~.TADITLLOAPDI~~PTL~~GVGEATI
 Thal 1 ~~~KENN~~VDNRIK~~TV~~VILGGGTAGWMTAA~~YL~~GKALQ~~N.TVKI~~VVLEAPT~~IPRIGVGEATV
 PrnA-M 1 MDQSSVENDNR~~VRKI~~I~~IVGGSSGWMAAAYL~~SKALNF.NADITLIES~~P~~TIPRIGVGEATI
 consensus 1 m ir iviv**GGGTAGWM**aa~~sy~~l ralq itlies ipri**GVGEATI**

MOTIV II

MOTIV I

PrnA-A 53 PSLQK~~VFFDFLGI~~PERE~~WMPQVNGAFKAAIKFVNWRKSPGS~~SRD.....DHFYHLF
 PrnA-B 53 PSLQK~~VFFDFLGI~~PERE~~WMPQVNGAFKAAIKFVNWRKSPDRS~~RD.....DHFYHLF
 PrnA-F 53 PSLQK~~VFFDFLGI~~PERE~~WMPQVNGAFKAAIKFVNWRKSPDPS~~RE.....DYFYHLF
 RebH 53 PNLQ~~TAFDFLGI~~PEDE~~WMRECNASYKVAIKFINWRTAGEG~~TSEARELDGG.PDHFYHSF
 Thal 57 PNLQ~~RAFFDYLGI~~PEE~~WMRECNASYKMAVKFINWRT~~PGE~~SPDPRT~~LD~~DGHTDT~~TFHH~~HPF~~
 PrnA-M 60 PTLKEEL~~FDLEI~~PEE~~WMS~~E~~CKATYKLGIRFONWKKPAS~~Q.....GGDHY~~YHNF~~
 consensus 61 Ptlqr ffdflgipe ewm natfklai~~kfvnr~~ s d drfyh f

PrnA-A 104 GNV.PNCDGVPLTHYWL~~RKREQ~~.FOQPMEYACYPQAGALD~~GKLAPCLP~~DGT...RQMSH
 PrnA-B 104 GSV.PNCDGVPLTHYWL~~RKREQ~~.FOQPMEYACYPQPGALD~~GKLAPCLS~~DGT...RQMSH
 PrnA-F 104 GSV.PNCDGVPLTHYWL~~RKREQ~~.FOQPMA~~YACYPQPGALD~~G~~KLAPCLAD~~GT...RQMSH
 RebH 112 GLL.KYHEQIPLSHYWF~~DRSYR~~GKTVE~~PFDYAC~~YKEP~~VILDANRSP~~RRLDGS...KVTNY
 Thal 117 GLL.PSADQIPLSHYWA~~KRLQ~~GETDEN~~FDEACFADTA~~IMNA~~KKAPRFL~~DMR...RATNY
 PrnA-M 110 GEM.PQVKG~~VPLSHLWYKH~~QLOG~~FAEP~~MA~~YSCYPT~~SPIC~~DAQKSPRYM~~DGT...KAVHY
 consensus 121 g v p dglplthywl kr g f pieyacyp agldgk ap dgt r l y

PrnA-A 159 AWHFDAHLVAD~~FLKRWAVER~~.GVKRV~~VDEVVDVHLNER~~.GYISSLFTKEGRTLEAD~~LFID~~
 PrnA-B 159 AWHFDAHLVAD~~FLKRWAVER~~.GVKRV~~VDEVVEVRLNDR~~.GYISSLSTKEGRTLEAD~~LFID~~
 PrnA-F 159 AWHFDAHLVAD~~FLKRWAVER~~.GVNRV~~VDEVVEVQLNDR~~.GYISTLLTKEGRTLEAD~~LFID~~
 RebH 168 AWHFDAHLVAD~~FLRRFATEKLGVRHVEDRVEHVQ~~DAN.GNIESV~~RTATGRVFDAD~~LFVD
 Thal 173 AWHF~~DASKVA~~AFL~~RNF~~AVTKQAVEH~~VEDEMTEVLT~~DER.GFITAL~~RTKSGRI~~LOG~~DLFVD~~
 PrnA-M 166 AWHFDAL~~LVA~~NFL~~KKW~~STER.GLTFIS~~DDIVDTQLDDG~~.GSIKHL~~R~~GASGR~~SYAADLYID~~
 consensus 181 awhfda lva flrryaver gv rv dei dv e gfit l t gr vea**DLFID**

MOTIV IV

PrnA-A 217 CSCMRG~~LLINQALKEPFIDMSDYLLCDSAVASAVPNDDARE~~GVPEPYTSAIAMNSGWTW~~KI~~
 PrnA-B 217 CSCMRG~~LLINQALKEPFIDMSDYLLCDSAVASAVPNADARV~~GVPEPYTSAIAMNSGWTW~~KI~~
 PrnA-F 217 CSCMRG~~LLINQALKEPFIDMSDYLLCDSAVASAVPNDDARE~~GVPEPYTSAIAMNSGWTW~~KI~~
 RebH 227 CSGFRG~~LLINKAMEE~~PFIDMS~~DHLLCNSAVATAVPHD~~DEKNGVEPYTSSIAI~~MEAG~~WTW~~KI~~
 Thal 232 CSGFRG~~LLINKAMEE~~PFIDMS~~DHLLCNSAVATAVPHD~~DEKNGVEPYTSSIAI~~MEAG~~WTW~~KI~~
 PrnA-M 224 CTGFAG~~LLIEQALGEPKVT~~FH~~DSL~~LTDR~~AVAINIPSDPA~~TEGIRPYTTASAFSSGWTW~~EI~~
 consensus 241 **CSGFR**gllinqal epfidmsd~~ll~~cdsavas vp dda gvpepytsaiam s**GWTWKI**

MOTIV III

PrnA-A 277 PMLGRFGSGYV~~FSSKFTSRDQATADFLNLWGLS~~.DNQ.PLNQIKFRVGRN~~KRAWV~~NCVS
 PrnA-B 277 PMLGRFGSGYV~~FSSKFTSRDQATADFLNLWGLS~~.DNQ.PLNQIKFRVGRN~~KRAWV~~NCVA
 PrnA-F 277 PMLGRFGSGYV~~FSTKFTSRDQATADFLKLWGLS~~.DNQ.QLNQINFRVGRN~~KRAWV~~NCVS
 RebH 287 PMLGRFGTGYV~~YSSRFATEDEAVREFCEMWHLD~~PETQ.PLNRI~~RFRVGRNRR~~RAWV~~NCVS~~
 Thal 292 PMLGRFGSGHYV~~SDHEATQDEATLAFSKLWGLDP~~DNT.EFNH~~VFRVGRNRR~~RAWV~~NCVS~~
 PrnA-M 284 PLYGRAGNGYV~~YSSAFQTPEDAERE~~VRAW~~F~~GK~~KADAL~~.DVRHI~~KFVSGRRRR~~RSWV~~KNCVS~~
 consensus 301 Pmlgrfgsgyvysskf s dea df lwgl d q ln irfrvgrnkrawv ncvs

PrnA-A 335 IGLSSCFLEPLESTGIYFIYAALYQLVKH~~FPDTSFDPRLSDAFNAEIVYMFDD~~CRDFVQA
 PrnA-B 335 IGLSSCFLEPLESTGIYFIYAALYQLVKH~~FPDTSFDPRLTDAFNAEIVYMFDD~~CRDFVQA
 PrnA-F 335 IGLSSCFLEPLESTGIYFIYAALYQLVKH~~FPDTSFDPRLRDAFNAEIVYMFDD~~CRDFVQA
 RebH 346 IGTSSCFV~~E~~PLESTGIYFIYAALYQLVKH~~FPDKSLNPVLTARFNREIETMFD~~DDTRDFIQA
 Thal 351 VGLASCFV~~E~~PLESSGIYFIYAA~~HLAKHFPDKTFDKV~~L~~VDRFNREI~~E...EDTRDFLQA
 PrnA-M 343 IGLAS~~S~~FLEPLESTGIYFIYAALYQL~~VACFP~~SKHIE~~PVLRDKFNERSY~~M~~VDDVR~~DFIVL
 consensus 361 iglsscfleplestgiyfiyaalyqlvkhfpd sfdp l d fn ei mfd~~d~~ rdflqa

PrnA-A	395	HYFTASREDTPFWLANRHDLRLSDAIKEKVQRYKAGLPLTTTTFDSDS.TYYETFDYEFKN
PrnA-B	395	HYFATSRDDTPFWLANRHDLRLSDAIKEKVQRYKAGLPLTTTTFDSDS.TYYETFDYEFKN
PrnA-F	395	HYFTTSREDTPFWLANRHELRLSDAIQEKVERYKAGLPLTTTTFDSDS.TYYETFDYEFKN
RebH	406	HFYFSPRTDTPFWRANK.ELRLADGMQEKIDMYRAGMAINAPASDDAQLYYGNFEEEEFRN
Thal	408	HYFSPRVDTTPFWRANK.ELKLADSIKDKVETYRAGLPVNLPTVDEG.TYYGNFEEAEFRN
PrnA-M	403	HECTSPRTDTPYWKANQNELKLPDTLKEVLELQRAGIPIRR.SYHTNDALYSSFEAGEDR
consensus	421	hyf t r dtpfw anr elrl d l ekm yraglpl de yy fd efkn
PrnA-A	454	FWLNGNYCYIFAGLGMPLDRSLPLLQHRPESIEKAEAMFASIRRETERLRTSLPTNYDYL
PrnA-B	454	FWLNGNYCYIFAGLGMPLDRSLPLLHRPESIDKAEAMFARIRREAERLRTSLPTNYDYL
PrnA-F	454	FWLNGNYCYIFAGLGMPLDRSLPLLQHRPESIQKAEAMFASIRREAERLRTSLPTNYDYL
RebH	465	FWNNSNYCYVLAGLGLVPDAPSPRLAHMPQATESVDEVFGAVKDRQRNLLLETLP SLHEFL
Thal	466	FWTNGSYCYIFAGLGLMPRNPLPALAYKQOSTAEAEELLFADVKKRGDTLVESLPSTYDLL
PrnA-M	462	FWTNSNFQSI FAGVGYLPRQPMPLLSRDPDILAEAEERTFDDLQKTAQMMSRLPSQYDYL
consensus	481	fw n nyycifaglgilp lpll rp i ae ifa lkr lvsslpt ydfl

Abb. 3.11: Sequenzvergleich bekannter Tryptophanhalogenasen: Schwarze Boxen markieren konservierte Aminosäuren im Vergleich. Graue Boxen markieren Aminosäuren mit ähnlichem Eigenschaften an dieser Position. Ausgewählte konservierte Bereiche für Primerdesign sind gelb unterlegt.

PrnA aus *Pseudomonas aureofaciens* (PrnA-A), *Burkholderia cepacia* (PrnA-B), *Pseudomonas fluorescens* (PrnA-F), RebH aus *Lechevalieria aerocolonigenes*, Thal aus *Streptomyces albogriseolus* und PrnA aus *Myxococcus fulvus* (PrnA-M)

Die konservierten Motive wurden in Nucleotidsequenzen übersetzt. Für die Entwicklung der Primer wurde die *codon usage* von Streptomyceten [WRIGHT & BIBB, 1992] berücksichtigt. Die Primersequenzen wurden mit den Nukleotidsequenzen der in Abb. 3.11 aufgeführten Enzyme verglichen und in ihrer Länge und *codon usage* angepasst. Im dritten Nukleotid der Aminosäurecodons wurden nur die Nukleotide G und C zugelassen. Dadurch wurde die Komplexität so gering wie möglich gehalten (Tab. 3.3). Aus den vier Konsensussequenzen wurden zwei Primer in *sense*-Richtung und zwei Primer in *antisense*-Richtung entwickelt. Die Primer wurden in vier Kombinationen eingesetzt.

Tab. 3.3: Konsensussequenzen und Primerdesign

Motiv I (aa 45)		G	V	G	E	A	T	I/V	P	
Nt	5' -	GGN	GTN	GGN	GAR	GCN	ACN	RTN	CCN	-3'
Primer SZ002	5' - TC	GGY	GTS	GGC	GAR	GCG	ACC	RTC	CC	-3'
Motiv II (aa 12)		G	G	G	T	A	G	W	M	
Nt	5' -	GGN	GGN	GGN	ACN	GCN	GGN	TGG	ATG	-3'
Primer SZ003	5' - TS	GGC	GGC	GGC	ACY	GCS	GGM	TGG	ATG	-3'

Motiv III (aa 270)	G	W	T	W	K	I	P	M	
Nt	5' - GGN	TGG	ACN	TGG	AAR	ATN	CCN	ATG	-3'
Primer SZ004	3' - CCB	ACC	TGG	ACC	TTC	TAR	GGG	TAC	GA -5'
	5' - AG	CAT	SGG	RAT	CTT	CCA	GGT	CCA	BCC -3'
Motiv IV (aa 215)	D	L	F	I/V	D	C	S	G	
Nt	5' - GGY	YTN	TTY	RTN	GAY	TGY	TCN	GGN	-3'
Primer SZ005	3' - CTG	SAG	AAG	YAG	CTG	ACG	AGG	CCG	-5'
	5' - GCC	GGA	GCA	GTC	GAY	GAA	GAS	GTC	-3'

für Nukleotide : $B = T + C + G$ $N = A + C + T + G$ $M = A + C$
 $R = A + G$ $S = C + G$ $Y = C + T$

3.3.4.3 Amplifizierung mit degenerierten Primern für Tryptophanhalogenase-Gene

Die Amplifizierung mit degenerierten Primern für FADH₂-abhängige Tryptophanhalogenase-Gene ist in 2.17.3.2 beschrieben. Als *template* wurde Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* eingesetzt. Die Primer wurden in vier Kombinationen verwendet (Abb. 3.12).

Im *touch down*-PCR-Experiment wurde für die Kombination der Primer SZ003 + SZ005 ein spezifisches Amplifikat mit einer Größe von ~700 bp erhalten (Abb. 3.13). Bei der Änderung der Annealingtemperaturen konnten auch für die anderen Primerkombinationen Amplifikate erhalten werden.

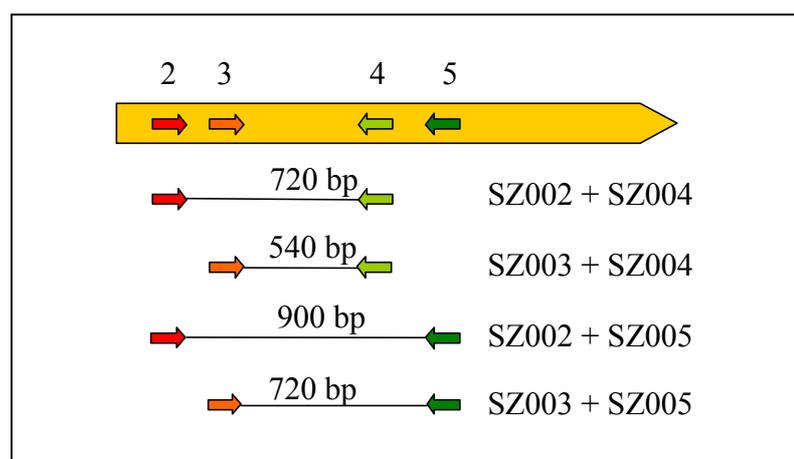


Abb. 3.12: Kombination der vier PCR-Primer SZ002-SZ005.

Der gelbe Pfeil stellt ein Sequenzalignment bekannter Tryptophanhalogenasen dar. Kleine farbige Pfeile markieren konservierte Motive und die abgeleiteten Primersequenzen. Die Abstände zwischen den Primern wurden anhand bekannter Sequenzen berechnet.

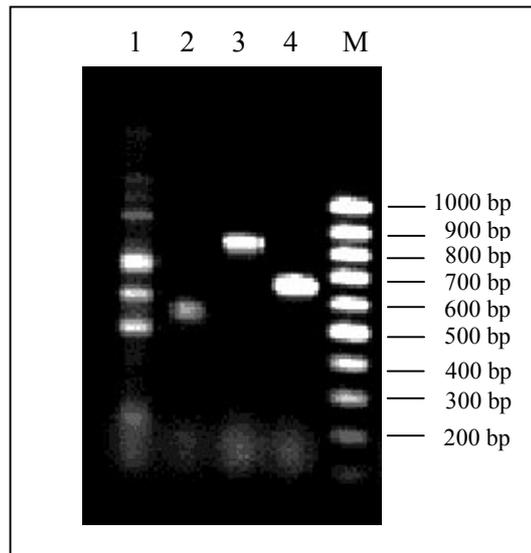


Abb. 3.13: Agarosegel für die PCR mit degenerierten Primern für Tryptophanhalogenase-Gene. Amplifikate für Tryptophanhalogenase-Gene aus Gesamt-DNA:

- 1 Primerpaar SZ002 + SZ004
- 2 Primerpaar SZ003 + SZ004
- 3 Primerpaar SZ002 + SZ005
- 4 Primerpaar SZ003 + SZ005
- M Größenstandard 100 bp Ladder

Zur Absicherung, dass das 700 bp Amplifikat aus DNA von *S. rugosporus* stammt, wurde das Amplifikat der Primer SZ003 + SZ005 mit DIG markiert und zur Hybridisierung von Gesamt-DNA (2.18) eingesetzt. Die Hybridisierung mit diesem DIG-markierten Fragment „PCR-Hal“ erfolgte unter den Bedingungen T_H : 68 °C mit 5xSSC, T_S : 68 °C Waschlösung I: 1xSSC + 0,1 % SDS und Waschlösung II: 0,5xSSC + 0,1 % SDS. Die Größe der hybridisierenden Banden ist in Tab. 3.4 dargestellt.

Tab. 3.4: Detektierte Banden für die Hybridisierung von Gesamt-DNA mit „PCR-Hal“

<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	<i>Pae</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Xba</i> I
4300 bp	» 10000 bp	» 10000 bp	> 10000 bp	3400 bp	» 10000 bp

3.4 Sequenzen der PCR-Amplifikate

3.4.1 Amplifikat für ein dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Genfragment

Das Reaktionsgemisch der PCR zur Detektion von dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Genen (3.3.1) wurde im Agarosegel analysiert und das Amplifikat „PCR-GDH“ eluiert. Die direkte Sequenzierung des PCR-Produktes mit dem PCR-Primer GDH+ ergab die in Abb. 3.14 dargestellte Sequenz. Diese Sequenz wurde mittels BlastX gegen Proteindatenbanken verglichen. Es wurden signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen festgestellt. In Tab. 3.5 sind die vier Sequenzen mit der höchsten Übereinstimmung aufgeführt.

```
>PCR-GDH_GDH1 (+) 06/10/99 ..
```

```
CTCACCTACGCCGGAACCGGGCCAACCTCGAAGGGGTGCGGCACGAGTTCGTCCACGGCGACATCTGCGACGC
CGATCTGCTGCGCGAGGTCGTGCCCGGTACGACCTGGTGGTGAACCTCGCCGCCGAGTCGCACGTCGACCGG
TCGATCGAGGGCGCCGCCGAGTTCGTGCGCACGAACGTGCTCGGCACCCAGACGCTGCTGCAGGCGTGCCTGG
AGGCGGGCAGCCGAAGGTCGTCCAGGTGTCGACGGACGAGGTCTACGGGTCGATCGACATCGGCTCGTGGGA
CGAGTCCGCGCCGTCGCGCCCCGGTCGCCGTACGCGGCGAGCAAGGCGGGCGGCGACATGATCGCCCCGCTCG
TACGCGATCAGTACGGGCTGAACGTGTCGATCACCAGGTGCGGCAACAACACTACGGGCCCCACCA
```

Abb. 3.14: Originalsequenz des PCR-Fragmentes „PCR-GDH“.

Tab. 3.5: Sequenzvergleich von PCR-GDH mit Datenbanken (BlastX)

ENZYM	STAMM	BIOSYNTHESE	IDENTITÄT (aa) ²	ÄHNLICHKEIT (aa) ²	REFERENZ
AviE	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Avilamycin	75 % (106/140)	83 % (118/140)	GAISSER <i>et al.</i> , 1997b
JadT	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Jadomycin B	65 % (92/140)	77 % (109/140)	WANG <i>et al.</i> , 2002
MtmE	<i>Streptomyces argillaceus</i>	Mithramycin	63 % (98/130)	75 % (82/130)	LOMBO <i>et al.</i> , 1997
UrdH	<i>Streptomyces fradiae</i>	Urdamycin	65 % (91/140)	77 % (108/140)	FAUST <i>et al.</i> , 2000

² übereinstimmende Aminosäuren, z.B. 106 aa von 140 verglichenen aa

3.4.2 Amplifikate für Polyketidsynthase-Genfragmente

Das erhaltene 750-bp-Amplifikat für Polyketidsynthase-Gene wurde in pUC19 kloniert (pSZ-PKS-Familie). Zehn Klone wurden mit M13 Primern sequenziert. Aus diesen Klonen mit gleicher Insertgröße wurden drei unterschiedliche Sequenzen erhalten (Abb. 3.15). Diese Sequenzen zeigen in Datenbankvergleichen signifikante Homologien zu bekannten PKS-Genen. In Tab. 3.6 sind die ähnlichsten Sequenzen aus Datenbanken aufgeführt.

```
>PCR-PKS16 12/06/2001 ..
AGCGCGCAATKAACCCCTCACKAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCGTCCGCDACAACCBGGTCTGTGGACCGC
GGGGAACGTCTCCGGCCGGATCCCCGGCGAGGACCTGTTTCGTTCATCAAGCCGTCCGGCGTCTCCTACGACGAG
CTGACCCCGGAGAACATGGTTCGTCTGCGACCTCGACGGCAACCTCGTCAAGGCGSCCAGCCCCCTYCAGCGA
CAMCGSCGCCAAGSCTAACGTCTACCGCAACATGCCCCGAGGTCGGC

>PCR-PKS4 12/06/2001 ..
GACGGCCAGTGTARTTCGACACGGCATGKCKGTSCTCGCTGGTCGCGATCCATCTGGCGAGCAGGGCGCTCAGG
CAGGGCGAATGKCGCTGGCGCTCGCGGGCGGCGTGGCGGTTCATGGCGTCGCCGGGGATGTTTCGTGGAGTTCAG
CAGGCAGCGCGGGCTGGCGCCGGACGGGCGTTCCAAGGCGTTCTCGGCGGCGGGCCGACGGCACCTCCTGGTTCG
GAGGGGgCCGGGATGCTCGTCTCGAACGGCTCTCCGACGCGCGGGCTCGGCCATCCGGTGTCTCGCCGTGC
TGCGCGGGTTCGGCGGTCAACCAGGACGGCGCGVCAAASGGGCTCACCGCGCCCAGCGGGCCGGCCAGGAGA
ACGTTCATCAGGCAGGCGCTCGTTCGACGSGGAVTTCGTCCGGACCASGGTGGACGCCGTTCGAGGCGCACGGCAC
CGGACCCGGCTSTGSGAXCCCATCGAGGgCGAGGCCTGATCGCGGTCTACGGCGGGGAGCGGGCGRVCTSCTG
TCGC

>PCR_PKS15 06/04/2001 ..
GTAARASGACGGCCAGTGCCAAGCTTGTGGGCGTTGGTGCCGCTGATGCCGAACGACGAGACCGCGGGCGCGGC
GCGGCCGGTCCACCTGCGGCCAGTCCGTGAGCCGGTTCGAGCAGGCGGACCGCGCCGGACGACCAGTTCGACGTG
CGGGTGGGCGTGTTCGACGTGGAGGGAGGCGGGGAGCTGCCCTCGCGCAGCGCCTGGACCATCTTGATCACG
CCGCGATCCCGCGGCGCGCCTGGGTGTGGCCGATGTTTCGACTTGATCGAGCCAGGAGCAGGGGGTGGCCGG
ATCGCCTGCCGTACGTGGCGAGCAGGGCCTGGGCTCGATCGGGTTCGCCGAGCGTGGTGCCGGTGGCCGTGGCC
CTCGACCGCGTTCGACGTCTCGACGGTTCGACCGGCGTTCGGTTCAGCGCCGCCCTGATTACGCGCTGCTGGGAG
GGGCCGTTKGGGGCGGTCAAGCCGTTKCTGGCGCCGTCCTKGTTCGAGCGGCGTCCCGCGCAGCACMCGCGAAA
GACGTGGTG
```

Abb. 3.15: Originalsequenzen der PCR-Fragmente („PCR-PKS“).

Tab. 3.6: Sequenzvergleich der PCR-PKS-Fragmente mit Datenbanken (BlastX)

ENZYM	STAMM	BIOSYNTHESE	IDENTITÄT (aa) ³	ÄHNLICHKEIT (aa) ³	REFERENZ
AVES1- AVES4	<i>Streptomyces</i> <i>avermitilis</i>	Avermectin	73-77 % (126/167)	79-82 % (137/167)	IKEDA <i>et al.</i> , 1999
Module 1-10	<i>Saccharopolyspora</i> <i>spinosa</i>	Spinosine A/D	73-79 % (125/165)	78-82 % (136/165)	WALDRON <i>et al.</i> , 2001
RAPS 2	<i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i>	Rapamycin	73-74 % (118/159)	81-84 % (134/159)	APARICIO <i>et al.</i> , 1996
Module 7-10	<i>Amycolatopsis</i> <i>mediterranei</i>	Rifamycin	73-75 % (121/163)	79-81 % (130/163)	SCHUPP <i>et al.</i> , 1998
FkbA	<i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i>	FK520	72-77 % (118/159)	78-84 % (135/159)	WU <i>et al.</i> , 2000

³ übereinstimmende Aminosäuren, z.B. 126 aa von 167 verglichenen aa

3.4.3 Amplifikat für ein Glycosyltransferase-Genfragment

Das 350-bp-Amplifikat der PCR zur Detektion von Glycosyltransferase-Genen wurde gereinigt und direkt mit dem Primer gtf-up sequenziert (Abb. 3.16). In Datenbankvergleichen weist die Sequenz deutliche Ähnlichkeiten zu bekannten Glycosyltransferasen aus Antibiotikabiosynthesen auf. Die fünf Sequenzen mit den höchsten Ähnlichkeiten sind in Tab. 3.7 aufgeführt.

```
>PCR-GTF_GTFup (+) 06/08/02 ..
GACCACCACGCAGCTCGTCGGCGAGGAGGGCTTCCTGGTGCCGCGCATCCTCAAGAGCCTGTCCGCGCTGGAC
GTCGAGGTCGTCACCACGATCACCAGGGCGGAACGCGAGCTGATCGGCGACGTGCCGACAAACGTCCGCGTGG
TCGAGCGGCTGCCGCTCCACCTCTGCTCCCGAGCTGCGCGGCGATCGTCCACCAGAGCGGCAGCGGCTACGA
TGCTCACCACGC
```

Abb. 3.16: Originalsequenz des PCR-Fragmentes „PCR-GTF“.

Tab. 3.7: Sequenzvergleich von PCR-GTF mit Datenbanken (BlastX)

ENZYM	STAMM	BIOSYNTHESE	IDENTITÄT (aa) ⁴	ÄHNLICHKEIT (aa) ⁴	REFERENZ
MtmGIII	<i>Streptomyces argillaceus</i>	Mithramycin	50 % (35/69)	71 % (50/69)	BLANCO <i>et al.</i> , 2000
AknS	<i>Streptomyces galilaeus</i>	Aclarubicin	55 % (33/59)	73 % (44/59)	RATY <i>et al.</i> , 2000
OleG2	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Oleandomycin	46 % (29/63)	74 % (47/63)	OLANO <i>et al.</i> , 1998
DnrS	<i>Streptomyces peucetius</i>	Doxorubicin	53 % (30/56)	72 % (41/56)	OTTEN <i>et al.</i> , 1995
LanGT1	<i>Streptomyces cyanogenus</i>	Landomycin	54 % (33/61)	72 % (44/61)	WESTRICH <i>et al.</i> , 1999

⁴ übereinstimmende Aminosäuren, z.B. 35 aa von 69 verglichenen aa

3.4.4 Amplifikat für ein Tryptophanhalogenase-Genfragment

Das Amplifikat der PCR zur Detektion eines Tryptophanhalogenase-Gens (3.3.1) mit den Primern SZ003 + SZ005 wurde im Agarosegel analysiert. Das 700-bp-Amplifikat wurde eluiert und mit dem PCR-Primer SZ003 direkt sequenziert (Abb. 3.17). In BLASTX-Recherchen zeigte diese Sequenz signifikante Ähnlichkeiten zu Aminosäuresequenzen bekannter Tryptophanhalogenasen (Tab. 3.8).

```
>PCR-Hal_SZ003 24/10/2001 ..
GTCAGGGAACGTCAGGCGGATCGGGGTCGGCGAAGCGACCTTCAGCACGGTCCGCCACTTCTTCAACTACCTG
GGCCTCAACAAGCGCGAGTGGCTGCCCCGCTGCGCCGGCGGCTACAAGCTCGGCATCCGCTTCGAGAAGTGGGA
GCGAGCCGGGCGAGTACTTCTACCACCCGTTTCGAGCGCCTGCGCGTCGTCGACGGCTTCAACATGGCCGAGTG
GTGGCTCGCGGTTCGGCGACCGCAGGACGTCCTTCAGCGAGGCTGCTATCTCACGCACCCGGCTGTGCGAGGCC
AAGCGGGCGCCCCGCATGCTCGACGGCTCGCTCTTCGCTCCCAGGTGGACGAGTCGCTCGGCCGCTCGACCC
TGGCCGAGCAGCGCGCCAGTTCCCGTACGCCTACCACTTCGACGCCGACGAGGTGCGCCGCTACCTGTGCGGA
GTACGCCATCGCCCGCGGCGTCCGCCACGTGG
```

Abb. 3.17: Originalsequenz des PCR-Fragmentes „PCR-Hal“.

Tab. 3.8: Sequenzvergleiche von PCR-Hal mit Datenbanken (BlastX)

ENZYM	STAMM	BIOSYNTHESE	IDENTITÄT (aa) ⁵	ÄHNLICHKEIT (aa) ⁵	REFERENZ
PrnA	<i>Myxococcus fulvus</i>	Pyrrolnitrin	33 % (56/165)	53 % (89/165)	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
PrnA	<i>Burkholderia cepacia</i>	Pyrrolnitrin	33 % (54/161)	51 % (83/161)	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
PrnA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pyrrolnitrin	32 % (54/164)	49 % (83/164)	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
PrnA	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Pyrrolnitrin	33 % (54/161)	51 % (83/161)	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
PrnA	<i>Pseudomonas pyrrocinia</i>	Pyrrolnitrin	32 % (53/164)	50 % (83/164)	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
RebH	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	Rebeccamycin	31 % (55/172)	46 % (82/172)	SANCHEZ <i>et al.</i> , 2002

⁵ übereinstimmende Aminosäuren, z.B. 56 aa von 165 verglichenen aa

3.5 Anlage einer Cosmidgenbank von *Streptomyces rugosporus*

Es wurde eine Genbank im *E. coli*-*Streptomyces* shuttle Vektor pOJ446 angelegt (2.19). Der verwendete Verpackungskit Gigapack III XL der Firma Stratagene verpackt bevorzugt große DNA-Fragmente in Phagenhüllen des Bakteriophagen λ . Dadurch wurden rekombinante DNA-Moleküle von ca. 47-51 kb in *E. coli* transfiziert. Die Zahl der Klone die benötigt werden, um eine repräsentative Genbank zu vertreten, kann statistisch berechnet werden [SEED *et al.*, 1982]. Bei einer Insertlänge von mindestens 30 kb ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % von jedem Abschnitt des Genom mindestens eine Kopie in 3065 Klonen enthalten [HOPWOOD *et al.*, 1985]. Es wurden 3300 Klone als einzelne Kolonien in Mikrotiterplatten gepickt und bei -80 °C gelagert.

3.5.1 Screening der Cosmidgenbank

Die Cosmidgenbank wurde mit den homologen Sonden „PCR-GDH“, „PCR-PKS“ und „PCR-Hal“, die durch PCR generiert wurden, untersucht.

3.5.1.1 Analyse der Cosmidgenbank mit der homologen Sonde „PCR-GDH“

Zur Detektion von Klonen mit potenziellen dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Genen wurde die Cosmidgenbank mit dem DIG-markierten Fragment „PCR-GDH“ aus *S. rugosporus* (3.3.1, 3.4.1) hybridisiert. Die Kolonien der Genbank wurden mittels Koloniehybridisierung untersucht. Die Hybridisierung erfolgte unter den Bedingungen T_H : 64 °C 2xSSC, T_S : 62 °C Waschlösung I: 0,5xSSC + 0,1 % SDS; Waschlösung II: 0,2xSSC + 0,1 % SDS.

Die Klone **26D4** und **40E5** zeigten ein eindeutig positives Signal. Zur Analyse der Cosmidklone wurden SOUTHERN Hybridisierungen unter den o.g. Bedingungen durchgeführt (Abb. 3.18). In Tab. 3.9 sind die Größen der hybridisierenden Banden aus den Cosmiden für die Restriktionen mit BamHI, KpnI und PstI dargestellt.

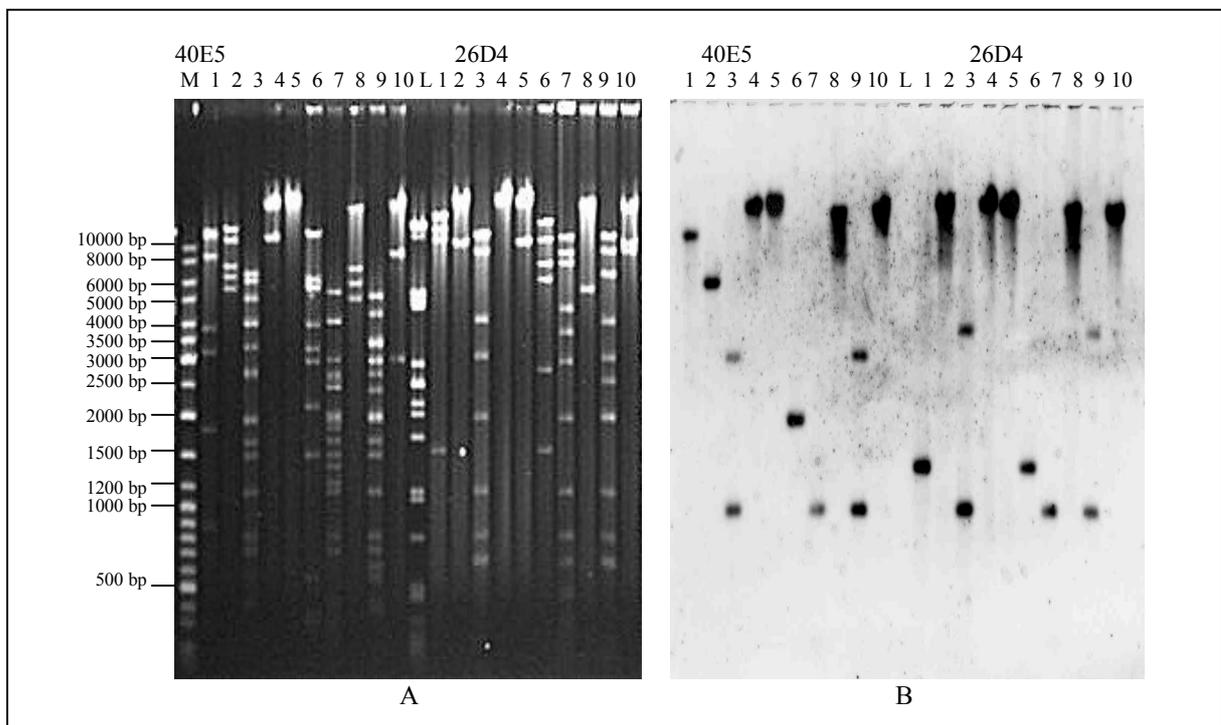


Abb. 3.18: Agarosegel (A) von Cosmid-DNA (40E5 und 26D4) und SOUTHERN Blot (B) nach der Hybridisierung mit DIG-markierter „PCR-GDH“:

L: Größenstandard λ -*PstI*

M: Größenstandard Gene Ruler Ladder Mix

1-10: Cosmid-DNA verdaut mit :

1: *Bam*HI,

4: *Spe*I,

7: *Bam*HI/ *Pst*I

2: *Kpn*I

5: *Xba*I

8: *Eco*RI/ *Spe*I

3: *Pst*I

6: *Bam*HI/ *Kpn*I

9: *Kpn*I/ *Pst*I

10: *Xba*I/ *Spe*I

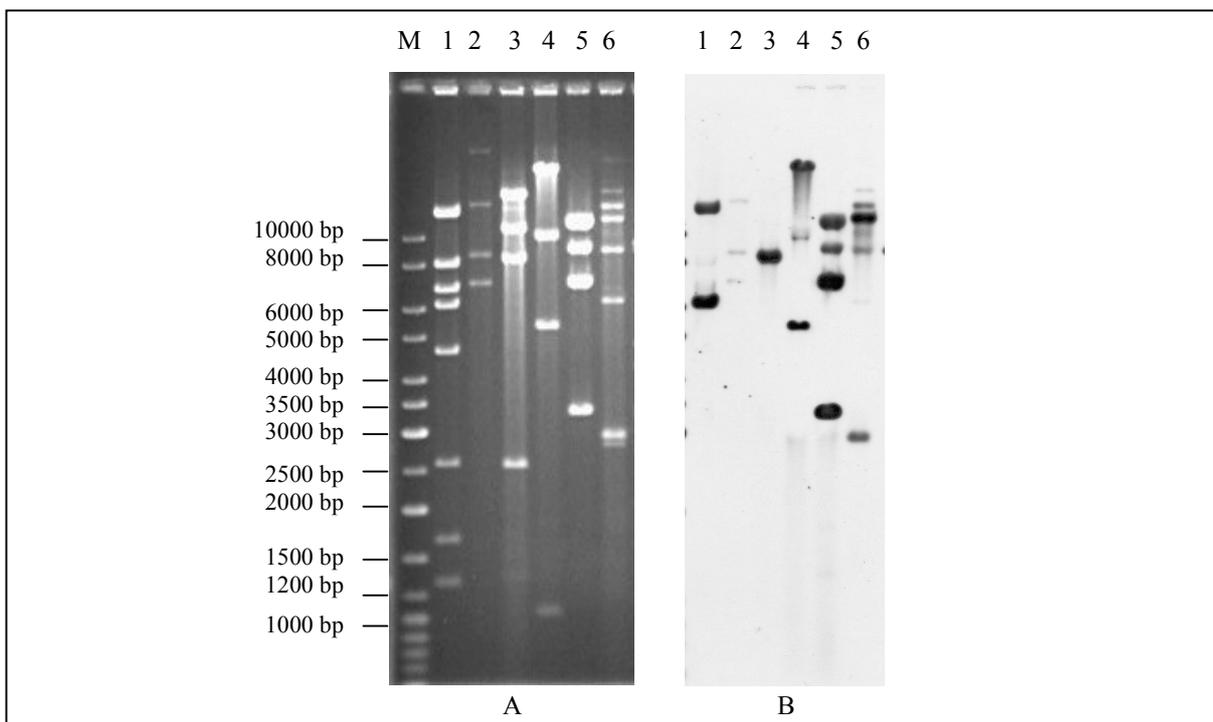
Tab. 3.9: Detektierte Banden der Cosmide 26D4 und 40E5 mit der Sonde „PCR-GDH“

	40E5	26D4
<i>Bam</i> HI	11000 bp	1700 bp
<i>Kpn</i> I	6500 bp	> 14 000 bp
<i>Pst</i> I	3400 bp	4300 bp
	1000 bp	1000 bp

3.5.1.2 Analyse der Cosmidgenbank mit der homologen Sonde „PCR-PKS“

Zum Nachweis von Klonen mit potenziellen Polyketidsynthase-Genen wurde die Genbank mit DIG-markierten Amplifikaten „PCR-PKS“ aus *S. rugosporus* analysiert (3.3.2 und 3.4.2). Die Kolonien der Genbank wurden auf Membranscheiben geblottet und hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte unter den Bedingungen: T_H : 68 °C mit 5xSSC, T_S : 68 °C Waschlösung I: 2xSSC + 0,1 % SDS, Waschlösung II: 0,2xSSC + 0,1 % SDS.

Mit der homologen Sonde „PCR-PKS“ konnten fünf Cosmide (**7E3**, **8G2**, **ID2**, **29H5**, **63A1**) detektiert werden. Zur Analyse der Cosmidklone wurden SOUTHERN Hybridisierungen unter den o.g. Bedingungen durchgeführt (Abb. 3.19). Die genannten Cosmide wurden positiv bestätigt. Die Größe der detektierten Banden ist in Tab. 3.10 dargestellt.

**Abb. 3.19: Agarosegel (A) von Cosmid-DNA und SOUTHERN Blot (B) nach der Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde „PCR-PKS“:**

M: Größenstandard Gene Ruler Ladder Mix

1-6: Cosmid-DNA verdaut mit *Bam*HI

1: **ID2**, 2: **7D3**, 3: **7E3**, 4: **8G2**, 5: **29H5**, 6: **63A1**

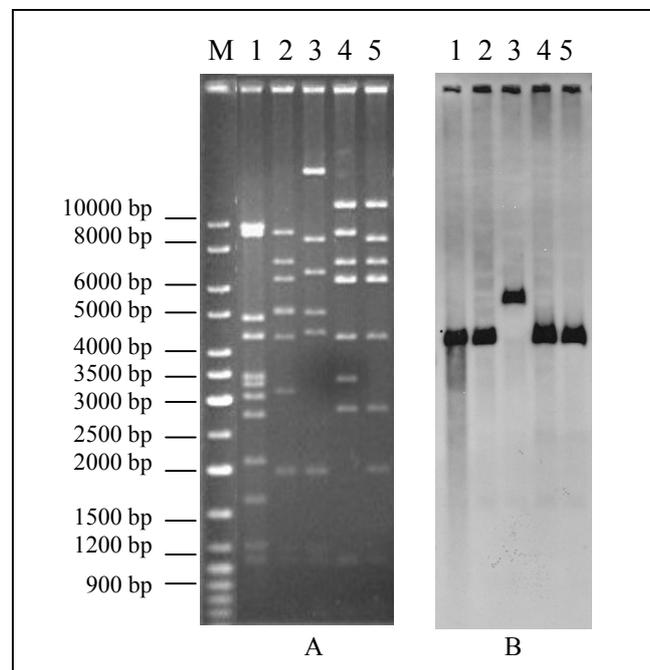
Tab. 3.10: Detektierte Banden für die PKS-Cosmide mit der Sonde „PCR-PKS“

	ID2	7E3	8G2	29H5	63A1
<i>Bam</i> HI	14000 bp 6100 bp	8000 bp	20000 bp 10000 bp 5400 bp	11000 bp 9000 bp 7000 bp 3400 bp	11000 bp 9000 bp 3000 bp

3.5.1.3 Analyse der Cosmidgenbank mit der homologen Sonde „PCR-Hal“

Zum Nachweis von Klonen in der Cosmidgenbank, die ein potenzielles Tryptophanhalogenase-Gen enthalten, wurde die Genbank mit dem „PCR-Hal“-Fragment (3.3.4.3 und 3.4.4) hybridisiert. Die Kolonien der Genbank wurden auf Membranscheiben gebロットet und hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte unter den Bedingungen T_H : 68 °C mit 5xSSC, T_S : 68 °C Waschlösung I: 1xSSC + 0,1 % SDS und Waschlösung II: 0,5xSSC + 0,1 % SDS. Mit der homologen Sonde „PCR-Hal“ konnten fünf Klone (**6C1**, **12D4**, **25F5**, **31G3**, **48E6**) detektiert werden, die positive Signale zeigten.

Zur Analyse der Cosmidklone wurden SOUTHERN Hybridisierungen unter den o.g. Bedingungen durchgeführt (Abb. 3.20). Die genannten Cosmide zeigten eindeutig positive Signale. Die hybridisierenden Banden der Cosmide sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

**Abb. 3.20: Agarosegel (A) von Cosmid-DNA und SOUTHERN Blot (B) nach der Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde „PCR-Hal“:**

M: Größenstandard Gene Ruler Ladder Mix

1-6: Cosmid-DNA verdaut mit *Bam*HI

1: **6C1**, 2: **12D4**, 3: **25F5**, 4: **31G3**, 5: **48E6**

Tab. 3.11: Detektierte Banden für die Hal-Cosmide mit der Sonde „PCR-Hal“

	6C1	12D4	25F5	31G3	48E6
<i>Bam</i> HI	4300 bp	4300 bp	5000 bp	4300 bp	4300 bp

3.5.2 Analyse der positiven Cosmide

3.5.2.1 Hybridisierungsanalysen und PCR

Alle Cosmide wurden mit den Sonden „PCR-GDH“, „PCR-PKS“ und „PCR-Hal“ (analog 3.5.1) und DIG-markiertem Vektor pOJ446 hybridisiert. Die Agarosegele und SOUTHERN Blots der Hybridisierungen mit den Sonden „PCR-PKS“ und „PCR-Hal“ sind in (Abb. 3.21) dargestellt. Zur Analyse wurde ebenfalls mit DIG-markiertem Cosmidvektor pOJ446 hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte unter den Bedingungen T_H : 68 °C mit 5xSSC, T_S : 68 °C Waschlösung I: 1xSSC + 0,1 % SDS und Waschlösung II: 0,5xSSC + 0,1 % SDS.

Die Cosmide **12D4**, **25F5**, **31G3**, **48E6** zeigten deutliche Hybridisierungssignale mit den Sonden „PCR-Hal“ und „PCR-PKS“. Alle weiteren Cosmide hybridisierten jeweils nur mit einer Sonde.

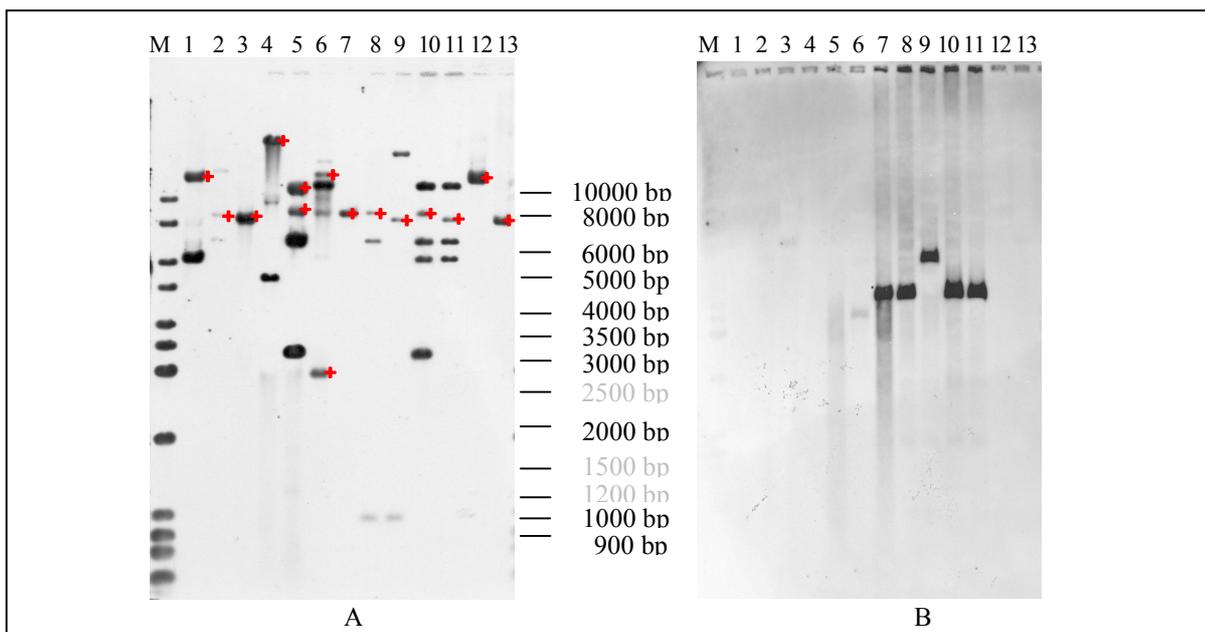


Abb. 3.21: Hybridisierung aller positiven Cosmide verdaut mit *Bam*HI:

A) mit der Sonde „PCR-PKS“; B) mit der Sonde „PCR-Hal“

M Größenstandard Gene Ruler Ladder Mix

+ Hybridisierung mit Vektor pOJ446

1: **ID2** 5: **29H5** 9: **25F5**

2: **7D3** 6: **63A1** 10: **31G3**

3: **7E3** 7: **6C1** 11: **48E6**

4: **8G2** 8: **12D4** 12: **26D4**

13: **40E5**

Für alle Cosmide wurden PCR-Amplifizierungen (2.17) mit den Primern für GDH, GTF, PKS und Hal (SZ003 + SZ005) durchgeführt. Für das Cosmid **25F5** wurden Amplifikate für Tryptophanhalogenase-Gene (700 bp), dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gene (500 bp) und für Glycosyltransferase-Gene (320 bp) erhalten. Die Amplifikate für GDH und GTF wurden sequenziert und zeigten signifikante Ähnlichkeiten zu dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen und Glycosyltransferasen (Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Sequenzähnlichkeiten der PCR-Fragmente aus dem Cosmid 25F5

	ÄHNLICHKEIT	ENZYM AUS MIKROORGANISMUS	REFERENZ
GDH:	58 % aa	GrsE <i>Streptomyces griseus</i>	[HYUN <i>et al.</i> , 1999]
	64 % aa	NbmH <i>Streptomyces narbonensis</i>	[BATE & CUNDLIFFE, 2002]
	69 % aa	SfrE <i>Streptomyces fradiae</i>	[DECKER <i>et al.</i> , 1996]
GTF:	50 % aa	MtmGI <i>Streptomyces argillaceus</i>	[BLANCO <i>et al.</i> , 2001]
	46 % aa	OleG2 <i>Streptomyces antibioticus</i>	[OLANO <i>et al.</i> , 1998]

3.5.2.2 Restriktionsanalyse

Zur Analyse, ob die detektierten Cosmide überlappen, wurden Restriktionen durchgeführt. Die DNA der Cosmide wurde isoliert und mit Restriktionsenzymen verdaut. Die Fragmente wurden in Agarosegelen analysiert (Abb. 3.22). Die Halogenase-Cosmide **6C1**, **12D4**, **25F5**, **31G3**, **48E6** können einer überlappenden Region des Genoms von *S. rugosporus* zugeordnet werden.

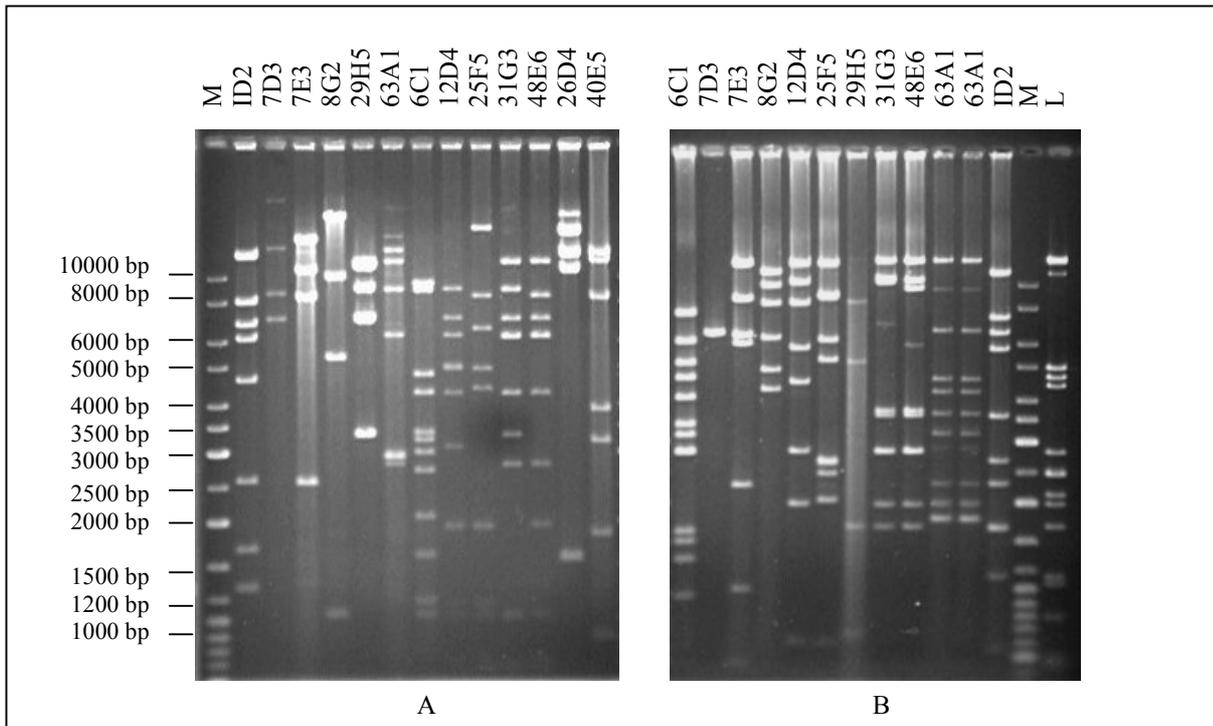


Abb. 3.22: Agarosegele von Cosmid-DNA der PKS-positiven und Hal-positiven Cosmide mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut:

M: Größenstandard Gene Ruler Ladder mix

L: Größenstandard λ -*Pst*I

A: Gel der Cosmide, verdaut mit *Bam*HI

B: Gel der Cosmide, verdaut mit *Kpn*I/*Pae*I

3.5.2.3 Partielle Restriktionskarte und Überlappung der Cosmide

Zur Erstellung einer partiellen Restriktionskarte wurden alle Cosmide mit Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente in Agarosegelen getrennt. Die Gele wurden gebロットet. Die Cosmid-DNA wurde mit den DIG-markierten Inserts der Cosmide **6C1**, **12D4** und **31G3** hybridisiert. Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in Abb. 3.23 abgebildet. Die Hybridisierungen erfolgten unter den Bedingungen T_H : 68 °C mit 5xSSC, T_S : 68 °C Waschlösung I: 1xSSC + 0,1 % SDS und Waschlösung II: 0,5xSSC + 0,1 % SDS. Die partielle Restriktionskarte der überlappenden Cosmide ist in Abb. 3.24 dargestellt.

3.6 Subklonierungen und Sequenzierungen

3.6.1 Subklone aus PKS-positiven Cosmiden

Aus den Cosmiden **7E3**, **29H5** und **63A1** wurden verschiedene *Bgl*II-Fragmente in *Bam*HI-linearisierten pUC19 kloniert (pSP11-14, pSP41-45, pSP50-51). Die Klone wurden durch Restriktionsanalyse untersucht und mit M13-Primern sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit M13-Primern. Die Sequenzen hatten eine durchschnittliche Länge von 600 bp (siehe Abb. A.3 im Anhang) Die Sequenzen wurden mit BLASTX gegen Datenbanken verglichen. Sie zeigten signifikante Identitäten zu bekannten modularen Polyketidsynthasen (75 % zu PimS2 aus *S. natalensis* [APARICIO *et al.*, 1999] und 70% zu AVES2 aus *S. avermitilis* [IKEDA *et al.*, 1999]).

3.6.2 Subklone aus dem GDH-positiven Cosmid 26D4

Vom Cosmid **26D4** wurden zwei Fragmente, die mit „PCR-GDH“ hybridisieren, zur Sequenzierung verwendet. Ein *Bam*HI-Fragment (1600 bp) und ein *Pst*I-Fragment (4000 bp) wurden in pUC18 kloniert und mit pSZ26B und pSZ26P bezeichnet. Die Plasmide wurden kartiert und mittels weiterer Subklone einfach sequenziert. Die Sequenz aus dem Cosmid **26D4** umfasst insgesamt 5200 bp der „GDH“-Region.

Diese Sequenz wurde mit dem Programm Frameplot 2.3.2 [ISHIKAWA *et al.*, 1999] auf offene Leserahmen untersucht. Es wurden vier offene Leserahmen identifiziert. Der GC-Gehalt in diesen ORFs liegt in der dritten Base der Aminosäurecodons (*wobble position*) über 90%.

ORF1

Das Gen hat eine Länge von ca. 1070 bp und einen GC-Gehalt von 96 % im dritten Nukleotid der Aminosäurecodons und einen Gesamt-GC-Gehalt von 70 %. Das Startcodon dieses Leserahmens liegt vermutlich ca. 10 bis 20 Basen außerhalb der sequenzierten Region. Die Aminosäuresequenz des ORF1 ist etwa 350 aa lang. Im Vergleich mit Sequenzdatenbanken weist die Aminosäuresequenz hohe Identitäten zu bekannten Glucose-1-phosphat-thymidyltransferasen bzw. dTDP-Glucosesynthasen auf (63 % zu BlmD aus *S. bluensis* [HYUN & SUH, 1999] und 68 % zu StrD aus *S. griseus* [DISTLER *et al.*, 1987]).

ORF2

Dieser Leserahmen beginnt bei nt 1060 und endet bei nt 2020. Er hat eine Länge von 960 bp, einen GC-Gehalt von 92 % im dritten Nukleotid der Aminosäurecodons und einen Gesamt-GC-Gehalt von 69 %. Die postulierte Aminosäuresequenz besteht aus 320 aa und zeigt in Datenbankvergleichen deutliche Identitäten zu bekannten dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase (66 % zu AprE aus *S. tenebrarius*, [LI *et al.*, 2001], 63 % zu AviE aus *S. viridochromogenes*, [WEITNAUER *et al.*, 2001] und 61 % zu UrdH aus *S. fradiae* [FAUST *et al.*, 2000]).

ORF3

Dieser Leserahmen hat eine Länge von 819 bp (2027-2846 nt). Der Gesamt-GC-Gehalt dieses Gens beträgt 76 %, und für das dritte Nukleotid der Aminosäurecodons 98 %. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des codierten Proteins ist 273 aa lang und weist im Vergleich mit Sequenzdatenbanken hohe Übereinstimmung mit bekannten 4-Ketoreduktasen der Desoxyzuckerbiosynthese auf (50 % mit StrL aus *S. glaucescens* [BEYER *et al.*, 1996], 49 % zu NovS aus *S. spheroides* [STEFFENSKY *et al.*, 2000] und 46 % zu einer 4-Ketoreduktase aus *S. antibioticus* [QUIROS *et al.*, 1999]).

ORF4

Dieser Leserahmen befindet sich ca. 1000 Basen stromabwärts vom Stopcodon des ORF3. und hat eine Länge von 753 Basen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist 251 aa lang und zeigt im Datenbankvergleich nur geringe Sequenzähnlichkeiten mit UDP-N-Acetyl-D-mannosamin-Transferasen aus *Vibrio cholerae* (43 %) [HEIDELBERG *et al.*, 2000], aus *Streptococcus pneumoniae* (44%) [MORONA *et al.*, 1997] und aus *Bacillus subtilis* (39 %) [LAZAREVIC *et al.*, 2002].

3.6.3 Subklone aus dem Halogenase-positiven Cosmid 12D4

Aus dem Cosmid **12D4** wurden *SalI*-Subklone durch Zufallsklonierungen in pBluescript SKII+ hergestellt (pSZ12Sal-Familie) und mit M13-Primern sequenziert (Anhang Abb. A.4). Die Analyse der Sequenzen mit BlastX ergab drei Klone mit Ähnlichkeiten zu Polyketidsynthasen (Typ I) und zwei Klone mit Sequenzähnlichkeiten zu dNDP-3,4-Hexosedehydratase.

Tab. 3.13: Sequenzähnlichkeiten der pSZ12Sal-Klone

	ÄHNLICHKEIT	ENZYM AUS MIKROORGANISMUS	REFERENZ
PKS-I:	63 %	FkbA <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	[WU <i>et al.</i> , 2000]
	60 %	RifA <i>Amycolatopsis mediterranei</i>	[AUGUST <i>et al.</i> , 1998]
Hexose-DH:	69 %	UrdQ <i>Streptomyces fradiae</i>	[HOFFMEISTER <i>et al.</i> , 2000]
	68 %	AknP <i>Streptomyces galilaeus</i>	[RATY <i>et al.</i> , 2000]

3.6.4 Subklone aus dem Halogenase-positiven Cosmid 6C1

Aus dem Cosmid 6C1 wurde das mit „PCR-Hal“-hybridisierende *Bam*HI-Fragment mit einer Größe von 4300 bp (Abb. 3.20) in pBluescript SKII+ subkloniert. Das Plasmid wurde pB1G benannt. Auf diesem Plasmid wurden 2564 bp mehrfach doppelsträngig durch primer walking (Publikationsqualität) sequenziert. Die Sequenzanalyse ist ausführlich in Kapitel 3.7 behandelt.

3.7 Sequenzanalyse

3.7.1 Nukleotidsequenz des potenziellen Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH*

Die Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz aus dem Klon pB1G sind in Abb. 3.25 dargestellt. Durch Leserahmenanalyse wurde ein offener Leserahmen (nt 700 – nt 2299) mit einer Länge von 1599 bp detektiert. Im Abstand von 60 nt besitzt dieser Leserahmen zwei Startcodons. Es ist jeweils eine potenzielle Ribosomenbindestelle 4 nt (AGGAG) bzw. 6 nt (AAAGGAG) stromaufwärts der beiden Startcodons vorhanden. Die Ribosomenbindestellen wurden anhand ihrer Ähnlichkeit zur SHINE-DALGARNO-Sequenz [SHINE & DALGARNO, 1974] postuliert. Es konnten keine typischen Promotorsequenzen (-10 und -35 Region) identifiziert werden. Anhand von Sequenzvergleichen wurde das ATG-Codon bei Nukleotid 763 als Startcodon festgelegt. Das Stopcodon ist translationell mit einem Startcodon für einen potenziellen nachfolgenden Leserahmen verknüpft (ATGA).

1	GAGCTTTCCGAGCTACTTGAGTCAAGAGACCCCGCATCGTCCTGAGAGCCGCCGGAGCG	60
61	CTGAATAGGCTGGCGCATCGGGTGGAGCGTGTTCATCCGTCTGGCCCGTTGTCATGGA	120
121	TTCAGCTGGGAACAGATCGGCGACGCGCTCGGCAGCTCGTTGCAGGAGATTCAGCCAGG	180
181	CACGGAGAATGAGACGGTGGAGATGGCAGGGCGGTTACGCGGGATTCCCGGGCCGTCCT	240
241	GGCCGCCGCGGCGACGGAGGCCGGCCGGCGCGCGACCGGCGTCTTGGCACGGAACACCT	300
301	GCTCCTCGGCCTGCTCCACGGCCCTGACCTGCTCCCATCAGAGCGCTCGGCATCAATCT	360
361	GGAGTTGGCGAGGCGTGCCTCGACGAACTCGACCGCATTGCGCTCGCCGAGATTATGGT	420
421	GCACATCTCGGAATAAGATTGACCCCTTACCCGCGACCCGCAGAAGGCTCCCTTGGAC	480
481	GTACGGGGCCAGGCCGTCGTCAAACGTGCGTCCGGCCTGTGCGACTGCTCCGCGCAACT	540
541	GACGCCGAAACACCTTCTGCTCGCCATTCTCACCGTCGAAAGACCCGATCTCACCTCGTC	600
601	GCTGCTCGATCACCTGCAAATTGACCGCGCGCTGGTCCGCGCCAGGCTGACCATCTCCGA	660
661	TTAGCACTGGGTTAGCCGTACTTAAGCAGCAGGAGAACC <u>ATG</u> GAAAGGCGGAAGCGTGAG	720
	M E R R K R E	
721	CGTCTTGGCTCACTCGGCCGACCGACCAAAAAGGAGCTCCGC <u>ATG</u> ATCCGATCTGTGGTG	780
	R L G S L G R P T K K E L R M I R S V V	
	(PyrH)	
781	ATCGTGGGTGGTGGCACGGCGGGCTGG <u>ATG</u> ACCGCCTCCTACCTCAAGGCCGCTTCGAC	840
	I V G G G T A G W M T A S Y L K A A F D	

841	GACCGCATCGACGTAACGCTCGTGGAGTCAGGGAACGTCAGGCGGATCGGGTTCGGCGAA D R I D V T L V E S G N V R R I G V G E	900
901	GCGACCTTCAGCACGGTCCGCCACTTCTTCGACTACCTGGGCCTCGACGAGCGGAGTGG A T F S T V R H F F D Y L G L D E R E W	960
961	CTGCCCCGCTGCGCCGGCGGTACAAGCTCGGCATCCGCTTCGAGAACTGGAGCGAGCCG L P R C A G G Y K L G I R F E N W S E P	1020
1021	GGCGAGTACTTCTACCACCCGTTTCGAGCGCCTGCGCGTTCGTCGACGGCTTCAACATGGCC G E Y F Y H P F E R L R V V D G F N M A	1080
1081	GAGTGGTGGCTCGCGGTCGGCGACCGCAGGACGTCCTTCAGCGAGGCCTGCATCTCACG E W W L A V G D R R T S F S E A C Y L T	1140
1141	CACCGGCTGTGCGAGGCCAAGCGGGCGCCCGCATGCTCGACGGCTCGCTCTTCGCTCC H R L C E A K R A P R M L D G S L F A S	1200
1201	CAGGTGGACGAGTCGCTCGGCCGCTCGACCCTGGCCGAGCAGCGCGCCCAGTTCCCGTAC Q V D E S L G R S T L A E Q R A Q F P Y	1260
1261	GCCTACCACTTCGACGCCGACGAGGTCGCCCGTACCTGTTCGGAGTACGCCATCGCCCGC A Y H F D A D E V A R Y L S E Y A I A R	1320
1321	GGCGTCCGCCACGTGGTTCGACGACGTGCAGCACGTCGGCCAGGACGAGCGCGGCTGGATC G V R H V V D D V Q H V G Q D E R G W I	1380
1381	AGCGGCGTCCACACCAAGCAGCACGGCGAGATCAGCGGCGACCTGTTCGTCGACTGCACC S G V H T K Q H G E I S G D L F V D C T	1440
1441	GGCTTCGCGGCCTGCTCATCAACCAGACGCTGGGCGGCAGGTTCCAGTCCCTTCTCCGAC G F R G L L I N Q T L G G R F Q S F S D	1500
1501	GTGCTGCCCAACAACCGGGCGGTCGCGCTGCGCGTCCCGCGGAGGAGACGAGGACATG V L P N N R A V A L R V P R E N D E D M	1560
1561	CGGCCGTACACGACGGCGACCGGATGAGCGCCGGCTGGATGTGGACGATCCCCTGTTC R P Y T T A T A M S A G W M W T I P L F	1620
1621	AAGCGCGACGGCAACGGCTACGTCTACTCCGACGAGTTCATCTCGCCGGAGGAGGCCGAG K R D G N G Y V Y S D E F I S P E E A E	1680
1681	CGCGAGCTGCGGTCCACCGTCCGCCCCGCGCGACGACCTGGAGGCCAACCACATCCAG R E L R S T V A P G R D D L E A N H I Q	1740

1741	ATGCGGATCGGCAGGAACGAGCGCACCTGGATCAACAACCTGCGTCGCCGTCCGGCCTGTCC	1800
	M R I G R N E R T W I N N C V A V G L S	
1801	GCCGCCTTCGTCGAGCCGCTGGAGTCGACCGGCATCTTCTTCATCCAGCACGCCATCGAG	1860
	A A F V E P L E S T G I F F I Q H A I E	
1861	CAGCTCGTGAAGCACTTCCCCGGCGAGCGCTGGGACCCGGTGCTGATCAGCGCGTACAAC	1920
	Q L V K H F P G E R W D P V L I S A Y N	
1921	GAGCGCATGGCGCACATGGTCGACGGGGTCAAGGAGTTCCTCGTCCTCCACTACAAGGGC	1980
	E R M A H M V D G V K E F L V L H Y K G	
1981	GCCCAGCGCGAGGACACCCCTACTGGAAGCCGCAAGACCAGGGCCATGCCCGACGGC	2040
	A Q R E D T P Y W K A A K T R A M P D G	
2041	CTCGCCCGCAAGCTGGAGCTGTCCGCCTCCACCTGCTGGACGAGCAGACGATCTACCCC	2100
	L A R K L E L S A S H L L D E Q T I Y P	
2101	TACTACCACGGCTTCGAGACCTATTTCGTGGATCACCATGAACCTCGGTCTCGGCATCGTG	2160
	Y Y H G F E T Y S W I T M N L G L G I V	
2161	CCCGAGCGGCCGCGTCCCGCCTCCTGCACATGGACCCGGCGCCCGCGCTGGCCGAGTTC	2220
	P E R P R P A L L H M D P A P A L A E F	
2221	GAACGGCTCAGGCGGAGGGCGACGAGCTGATCGCCGCCCTGCCAGCTGCTACGAGTAC	2280
	E R L R R E G D E L I A A L P S C Y E Y	
2281	CTCGCCAGCATCCAATGACCGCGATCAAACCGGAGATCCGGCCGGCCGCTCGACCCGGT	2340
	L A S I Q *	
2341	GGCCGGCCGTCGCTCTCGGCCTGGTCGTCTCGCCGGCGCGGGCGCGCTCTGGGGCAACG	2400
2401	GGCTGTTCCCGCGGGAAGGCCGACCCGCTCGCCAGGTTCTGCTCTCGCCGCCGCTGA	2460
2461	TCCTGCTGGTCTGCCACCTGTTTCGGGTGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCG	2520
2521	GTGGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTAAGTGCGCG	2564

Abb. 3.25: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz für die potenzielle Tryptophan-5-Halogenase und benachbarte Regionen aus *S. rugosporus*.

3.7.1.1 GC-Gehalt und *codon usage*

Der Leserahmen für das potenzielle Tryptophan-5-Halogenase-Gen *pyrH* zeigt einen GC-Gehalt von 68,3 %. Das entspricht dem typischen GC-Gehalt von *Streptomyces* Genen [WRIGHT & BIBB, 1992]. Die Basenzusammensetzung im Leserahmen ist in Tab. 3.14 dargestellt.

TTT (Phe)	0	TCT (Ser)	1	TAT (Tyr)	2	TGT (Cys)	0
TTC (Phe)	25	TCC (Ser)	10	TAC (Tyr)	20	TGC (Cys)	6
TTA (Leu)	0	TCA (Ser)	2	TAA (*)	0	TGA (*)	1
TTG (Leu)	0	TCG (Ser)	7	TAG (*)	0	TGG (Trp)	12
CTT (Leu)	1	CCT (Pro)	0	CAT (His)	0	CGT (Arg)	3
CTC (Leu)	21	CCC (Pro)	12	CAC (His)	16	CGC (Arg)	27
CTA (Leu)	0	CCA (Pro)	0	CAA (Gln)	1	CGA (Arg)	2
CTG (Leu)	25	CCG (Pro)	12	CAG (Gln)	13	CGG (Arg)	11
ATT (Ile)	0	ACT (Thr)	0	AAT (Asn)	0	AGT (Ser)	0
ATC (Ile)	23	ACC (Thr)	14	AAC (Asn)	14	AGC (Ser)	9
ATA (Ile)	0	ACA (Thr)	0	AAA (Lys)	1	AGA (Arg)	0
ATG (Met)	14	ACG (Thr)	10	AAG (Lys)	13	AGG (Arg)	7
GTT (Val)	0	GCT (Ala)	0	GAT (Asp)	0	GGT (Gly)	3
GTC (Val)	22	GCC (Ala)	33	GAC (Asp)	30	GGC (Gly)	37
GTA (Val)	1	GCA (Ala)	0	GAA (Glu)	3	GGA (Gly)	0
GTG (Val)	11	GCG (Ala)	13	GAG (Glu)	42	GGG (Gly)	3

Abb. 3.27: Codon-usage-Tafel für *pyrH* aus *S. rugosporus*.

3.7.2 Aminosäuresequenz der potenziellen Tryptophan-5-Halogenase PyrH

Der Leserahmen codiert für ein Protein mit einer Primärstruktur aus 511 aa und einem theoretischen Molekulargewicht M_w von 58147. Die Zusammensetzung des Proteins aus Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften ist nachfolgend angegeben.

Tab. 3.15: Aminosäurezusammensetzung von PyrH

AMINOSÄUREN NACH EIGENSCHAFTEN	ZAHL	GEHALT	
kleine Aminosäuren	A+G	87	17 %
saure Aminosäuren	D+E	72	14 %
basische Aminosäuren	H+K+R	71	14 %
geladene Aminosäuren	D+E+H+K+R	143	28 %
kleine hydrophobe Aminosäuren	I+L+M+V	114	22 %
aromatische Aminosäuren	F+W+Y	59	12 %

3.7.3 Sequenzvergleiche der potenziellen Tryptophan-5-Halogenase

Die Nukleotidsequenz und die daraus ermittelte Aminosäuresequenz der potenziellen Tryptophan-5-Halogenase (PyrH) aus *S. rugosporus* wurde mit Sequenzdatenbanken verglichen. Es wurden signifikante Homologien mit bekannten Tryptophanhalogenasen festgestellt. Mit dem Programm GAP wurden die Ähnlichkeiten der Sequenzen mit der Tryptophan-5-Halogenase im paarweisen Vergleich berechnet (Tab. 3.16).

Tab. 3.16: Sequenzvergleiche bekannter Tryptophanhalogenasen mit der Tryptophan-5-Halogenase aus *S. rugosporus*

STAMM	ENZYM	NUKLEOTIDSEQUENZ	AMINOSÄURESEQUENZ		REFERENZ
		IDENTITÄT	IDENTITÄT	ÄHNLICHKEIT	
<i>Streptomyces albogriseolus</i>	Thal	59%	54%	44%	SCHMID, persönl. Mitteilung, 2002
<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	RebH	57%	52%	42%	SANCHEZ <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PrnA	58%	56%	44%	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
<i>Myxococcus fulvus</i>	PrnA	57%	56%	43%	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
<i>Burkholderia cepacia</i>	PrnA	59%	55%	43%	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas pyrrocinia</i>	PrnA	59%	54%	42%	HAMMER <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	PrnA	59%	56%	44%	HAMMER <i>et al.</i> , 1999

Die Sequenz des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH* zeigt 57-59% Identität mit bekannten Tryptophanhalogenase-Genen aus Mikroorganismen. Die postulierte Aminosäuresequenz von PyrH besitzt 42-44% Identität und 52-56% Ähnlichkeit mit den Sequenzen von bekannten und potenziellen FADH₂-abhängigen Halogenasen.

In Abb. 3.28 ist ein Alignment der Tryptophan-5-Halogenase PyrH aus *S. rugosporus* mit bekannten Tryptophanhalogenasen dargestellt.

GXGXXG- MOTIV

PyrH 1 ~~~~~~MIRSVVIVGGGTAGWMTASYLKAAFDDRIDVTLVESGNV
 PRNA-P 1 ~~~~~~MSNPIKNIIVIVGGGTAGWMAASYLVRLQQTNITLIESAAI
 PRNA-B 1 ~~~~~~MSNPIKNIIVIVGGGTAGWMAASYLVRLQQTNITLIESAAI
 PRNA-A 1 ~~~~~~MNKPIKNIIVIVGGGTAGWMAASYLVRLQQTNITLIESAAI
 PRNA-F 1 ~~~~~~MNKPIKNIIVIVGGGTAGWMAASYLVRLQQTNITLIESAAI
 PRNA-M 1 ~~~~~~MDQSSVENDNRVKKIIVGGGSSGWMAAAYLSKALNFNADITLIESPTI
 Thal 1 ~~~~~~KENNVNDRIKTIVVILGGGTAGWMTAAYLGKALQNTVKIIVLIEPTI
 RebH 1 ~~~~~~MSGKIDKIIIVGGGTAGWMAASYLGKALQGTADITLLOAPDI

PyrH 41 PRIGVGEATFSIVRHFFDYLGIDEREWLPFCAGGYKLGIRFENWSEPG.....
 PRNA-P 43 PRIGVGEATIPSLQKVFDFDLGIPEREWMPQVNGAFKAAIKFVNWR.....KSPDR
 PRNA-B 43 PRIGVGEATIPSLQKVFDFDLGIPEREWMPQVNGAFKAAIKFVNWR.....KSPDR
 PRNA-A 43 PRIGVGEATIPSLQKVFDFDLGIPEREWMPQVNGAFKAAIKFVNWR.....KSPGS
 PRNA-F 43 PRIGVGEATIPSLQKVFDFDLGIPEREWMPQVNGAFKAAIKFVNWR.....KSPDP
 PRNA-M 50 PRIGVGEATIPIKEELDFLEIPBEWMSSECKATYKLGIRFQNW.....KKEPAS
 Thal 47 PRIGVGEATVPLQRAFFDYLGIPBEWMSRECNASYKMAVKFINWRTPGEGSPDPRITLDD
 RebH 43 PRIGVGEATIPNLQTAFFDYLGIPBEWMSRECNASYKVAIKFINWRTPAGEGTSEARELDG

PyrH 89 ...BYFYHHPFERIRVVDGFMMAEWWLA...VCDRRTSFSEACYLTHRLCEAKRAPRMLD
 PRNA-P 94 SRDDHIFYHLFGSVPCDGVPLTHYWLKREQGFQQPMEYACYPOPCALDGKLAFCISD
 PRNA-B 94 SRDDHIFYHLFGSVPCDGVPLTHYWLKREQGFQQPMEYACYPOPCALDGKLAFCISD
 PRNA-A 94 SRDDHIFYHLFGSVPCDGVPLTHYWLKREQGFQQPMEYACYPOPCALDGKLAFCISD
 PRNA-F 94 SRDDHIFYHLFGSVPCDGVPLTHYWLKREQGFQQPMEYACYPOPCALDGKLAFCISD
 PRNA-M 100 QGGDHYHNFGEVMPQVKGVPLSHLWVYKHLQCGFAEPMAYSCTPTSPICDAQKSPRYMD
 Thal 107 GHTDTHFHHFGLLPSADQIPLSHYWAARKLQGETDENFDEACFADTAIMNAKKAPRFLD
 RebH 103 GPDHFYHSFGLKYHEQIPLSHYWFDRSYRCKTVEEFDYACYKEPVILDANRSPRRID

PyrH 142 GSLFASQVDES LGRSTLAEQRAQFPYAYHFDADAVARYLSEYATAR . GVRHVVDVQHVVG
 PRNA-P 152 GT.....ROMSHAWHFD AHLVADFLKRWAVER . GVKRVVDEVVEVR
 PRNA-B 152 GT.....ROMSHAWHFD AHLVADFLKRWAVER . GVKRVVDEVVEVR
 PRNA-A 152 GT.....ROMSHAWHFD AHLVADFLKRWAVER . GVKRVVDEVVDVH
 PRNA-F 152 GT.....ROMSHAWHFD AHLVADFLKRWAVER . GVNRRVDEVVEVQ
 PRNA-M 159 GT.....KAVHYAYHFDALLVANFLKKS TER . GLTFTISDDIVDTQ
 Thal 166 MR.....RATNYAWHFDASKVA AFLRNFVATKQAVEHVEDEMTFVL
 RebH 161 GS.....KVTNYAWHFD AHLVADFLRRFATEKLGVRHVDEDRVEHVQ

PyrH 201 QD . ERGWISGVHTKOHGEISGD LFDVCTGFRG LLINQTLGGRFQSFSDVLPNNRAVALRV
 PRNA-P 192 LN . DRGYISSLS TKEGRTLEADLFIDCSGMRG LLINQALKEPFDMSDYLLCDSAVASAV
 PRNA-B 192 LN . DRGYISSLS TKEGRTLEADLFIDCSGMRG LLINQALKEPFDMSDYLLCDSAVASAV
 PRNA-A 192 LN . ERGYISSLFTKEGRTLEADLFIDCSGMRG LLINQALKEPFDMSDYLLCDSAVASAV
 PRNA-F 192 LN . DRGYISTLFTKEGRTLEADLFIDCSGMRG LLINQALKEPFDMSDYLLCDSAVASAV
 PRNA-M 199 LD . DGGSIKHLRGASGRSYAADLYIDCTGFAGLLIEQALGEPKVTFHDSLTLDRAVAINI
 Thal 207 TD . ERGFITALRTKSGRILQD LFDVDCSGFRG LLINKAMEEPFDMSDHLLCNSAVATAV
 RebH 202 RD . ANGNIESVRIATGRVFDAD LFDVDCSGFRG LLINKAMEEPFDMSDHLLNDSAVATQV

GWXWXP- MOTIV

PyrH 260 PREND . EDMRPYTTATAMSGWMTIPLFKRDGNVYVSDEFISPEEAERELRSTVAPGR
 PRNA-P 251 PNADARVGVPEPYTSAIAMNSGWTWKIPMLGRFGSGYVFSKFTSRDQATADFLNLWGLS .
 PRNA-B 251 PNADARVGVPEPYTSAIAMNSGWTWKIPMLGRFGSGYVFSKFTSRDQATADFLNLWGLS .
 PRNA-A 251 PNDDAREGVPEPYTSAIAMNSGWTWKIPMLGRFGSGYVFSKFTSRDQATADFLNLWGLS .
 PRNA-F 251 PNDDAREGVPEPYTSAIAMNSGWTWKIPMLGRFGSGYVFSKFTSRDQATADFLNLWGLS .
 PRNA-M 258 PSDPATEGIRPYTTASAFSSGWTWBIPLYGRAGNVYSSAFQTPEDAEREVRAWFKKA
 Thal 266 PHDDEKNGVEPYTSSIAMAGWTWKIPMLGRFGSGYVSDHFATQDEATLAFSKLWGLDIP
 RebH 261 PHDDANGVEPYTSAIAMKSGWTWKIPMLGRFGSGYVSSRFATEDEAVREFCEMWHLDIP

PyrH 319 DDLEANHIQMRIGRNER TWINNCVAVGLSAAFVEPLESTGIFFIQHAI EQLVKHFGGERW
 PRNA-P 310 DNQPLNQIKFRVGRNGRAWVNNCVAIGLSSCFLEPLESTGIYFYIYAALYQLVKHFPDTSF
 PRNA-B 310 DNQPLNQIKFRVGRNGRAWVNNCVAIGLSSCFLEPLESTGIYFYIYAALYQLVKHFPDTSF
 PRNA-A 310 DNQPLNQIKFRVGRNKRAWVNNCVS IGLSSCFLEPLESTGIYFYIYAALYQLVKHFPDTSF
 PRNA-F 310 DNQQLNQINFRVGRNKRAWVNNCVS IGLSSCFLEPLESTGIYFYIYAALYQLVKHFPDTSF
 PRNA-M 318 DALDVRHIK FVSGRRRSWKNCVSI GLASSFLEPLESTGIYFYIYAALYQLVACFPKHI
 Thal 326 DNTEFNHVRFRVGRNRRRAWVNCVSI GLASCFVEPLESSGIYFYIYAALHMLAKHFPDKTF
 RebH 321 ETQPLNRIRFRVGRNRRRAWVNCVSI GTS SCFVEPLESTGIYFYIYAALYQLVKHFPDKSL

PyrH	379	DPVLIISAYNERMAHMVDGVKEFTVLHYKGAQREDTPYWKAAATR.AMPDGLARKLE....
PRNA-P	370	DPRLTDAFNAEIVYMFDDCRDFVQAHYFATSRRDDTPFWLANRHDLRLSDAIKEKVQRYKA
PRNA-B	370	DPRLTDAFNAEIVYMFDDCRDFVQAHYFATSRRDDTPFWLANRHDLRLSDAIKEKVQRYKA
PRNA-A	370	DPRLSDAFNAEIVYMFDDCRDFVQAHYFTASREDTPFWLANRHDLRLSDAIKEKVQRYKA
PRNA-F	370	DPRLRDAFNAEIVYMFDDCRDFVQAHYFTTSREDTPFWLANRHDLRLSDAIQEKVERYKA
PRNA-M	378	EPVLRDKFNERVSYMVDDVDFITVLHFCTSPRTDTPYWKANQNLKLPDTLKEVLELQRA
Thal	386	DKVLVDRFNREIE...EDTRDFLQAHYYFSPRVDTPFWRANK.ELKLDASIKDKVETYRA
RebH	381	NPVLTARFNREIETMFDDTRDFIQAHFYFSPRTDTPFWWRANK.ELRLADGMQEKIDMYRA
PyrH	434	...LSASHLLDEQTIYPY.YHGFETYSWITMNL....GLGLVPERPRPALLHMDPAPAL
PRNA-P	430	GLPLTTTSFDDS.TYYETFDYEFKNF.WLNGNYCIFAGLGMPLDRSLPLLRHRPESIDK
PRNA-B	430	GLPLTTTSFDDS.TYYETFDYEFKNF.WLNGNYCIFAGLGMPLDRSLPLLRHRPESIDK
PRNA-A	430	GLPLTTTSFDDS.TYYETFDYEFKNF.WLNGNYCIFAGLGMPLDRSLPLLQHRPESIEK
PRNA-F	430	GLPLTTTSFDDS.TYYETFDYEFKNF.WLNGNYCIFAGLGMPLDRSLPLLQHRPESIQK
PRNA-M	438	GTPIRR.SVHTNDALYSSFEAGFDRF.WTNSNFQSI FAGVGYLPRQPMPLLSRPDILAE
Thal	442	GLEVNLPVTDEG.TYYGNFEEFRNF.WTNGSYCIFAGLGMPLRNPLPALAYKPSIAE
RebH	440	GMAINAPASDDAQLYYGNFEEFRNF.WNNSNYCVLAGLGLVDPAPSRPLAHPQATES
PyrH	485	AE..FERLRREGDELIAALPSCYEYLASIQ*~~~~~
PRNA-P	488	AEAMFARIRREAERLRTSLPTNYDYLRSL..RDCDAGLSRSQPCSTLAAPEIL*
PRNA-B	488	AEAMFARIRREAERLRTSLPTNYDYLRSL..RDCDAGLSRSQPCSTLAAPEIL*
PRNA-A	488	AEAMFASIRRETERLRTSLPTNYDYLRSL..RDCDTGLSHSSCPNVEAQETL*
PRNA-F	488	AEAMFASIRREAERLRTSLPTNYDYLRSL..RDCDAQLSRNHGPTLAAQERQ*
PRNA-M	496	AERTFDDLRQKTAQMMSRLPSQYDYLTSLYARGSRAREEERQAG*~~~~~
Thal	500	AELLFADVKKGDTLVEESLPSTYDLLRQL..HGAS*~~~~~
RebH	499	VDEVFCVAVKDRQRNLLLETLPSELHEFLRQQ..HGR*~~~~~

Abb. 3.28: Sequenzalignment der Tryptophan-5-Halogenase PyrH aus *S. rugosporus* mit bekannten Tryptophanhalogenasen:

Schwarze Boxen markieren konservierte Aminosäuren im Vergleich. Graue Boxen markieren Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an dieser Position. Ausgewählte konservierte Motive sind rot wiedergegeben unterlegt.

PyrH aus *Streptomyces rugosporus*, PrnA-P aus *Pseudomonas pyrocinia*, PrnA-B aus *Burkholderia cepacia*, PrnA-A aus *Pseudomonas aureofaciens*, PrnA-F aus *Pseudomonas fluorescens*, PrnA-M aus *Myxococcus fulvus*, Thal aus *Streptomyces albogriseolus*, RebH aus *Lechevalieria aerocolonigenes*

Die Sequenzen der bisher bekannten FADH₂-abhängigen Halogenasen weisen zwei konservierte Motive auf, ein Adenin-Dinukleotid-Bindemotiv (GXGXXG) und ein konserviertes Tryptophanmotiv (GWXWXIP) (siehe 1.4). Die potenzielle Tryptophan-5-Halogenase PyrH zeigt beide konservierten Sequenzmotive (Abb. 3.28). Der Konsensus für das Tryptophanmotiv der bisher bekannten Tryptophanhalogenasen wurde mit GWTW(K/E)IP beschrieben. Die Sequenz von PyrH weicht jedoch von diesem konkreten Motiv ab. Das Motiv für PyrH lautet GWMWTIP. Es stimmt darin mit dem allgemeinen Konsensus für FADH₂-abhängige Halogenasen (WXWXIP) [VAN PÉE & ZEHNER, 2003] überein.

Am NH₂-Terminus besitzt die Sequenz über eine Länge von 130 Aminosäuren Ähnlichkeit zu Flavin-bindenden Proteinen (z.B. 31 % Flavocytochrom C, Flavinuntereinheit aus *Chromatium vinosum* [DOLATA *et al.*, 1993]. Zur Untersuchung auf bekannte Struktur motive wurde die Proteinsequenz mittels PsiBlast analysiert (Abb. 3.29).

CDD2034 pfam01494, FAD_binding_3, FAD binding domain.	
This domain is involved in FAD binding in a number of enzymes.	
CD-Length = 133 residues, only 43.6% aligned	
Score = 31.0 bits (70), Expect = 0.11	
PyrH: 5	VVIVGGGTAGWMTASYLKAAFDDRIDVTLVE-----SGNVRRIGVGEATFSTVRRHFFDYL 59
pfam: 1	VVIVGGGPAGLMLALLLARA---GVDVVVVERHAETSPTPRAGGLNORTMELIRQ----A 53
PyrH: 60	GLDER 64
pfam: 54	GLEDR 58

Abb. 3.29: Partielles Alignment der Tryptophan-5-Halogenase PyrH mit dem Konsensus pfam01494 aus Strukturen bekannter FAD-bindender Proteine.

Die Tryptophan-5-Halogenase zeigt den *core-fingerprint* GXGXXG für eine Bindestelle von Nukleotid-Cofaktoren [WIERENGA *et al.*, 1986]. In der Umgebung dieses Motivs wurden in der Sequenz der Tryptophan-5-Halogenase weitere Aminosäuren mit den erwarteten Eigenschaften des *fingerprint*-Motivs für die Cofaktorbindung gefunden (Abb. 3.30a) [WIERENGA *et al.*, 1986; VALLON, 2000].

Die Kalkulation der Proteinstruktur über diesen Bereich mit PsiPred (Abb. 3.30b) [JONES, 1999] ergab eine $\beta\alpha\beta$ -Struktur, wie von ROSSMANN *et al.* (1974) für Nukleotidbindestellen beschrieben.

a)	fingerprint	ohxhxGxGxxGxxxhxxhxxxx...hxhxE/D
	PyrH (26)	SVVIVGGGTAGWMTASYLKAAFDDRIDVTLVE
b)	PyrH (<i>PsiPred</i>)	EEEECCCHHHHHHHHHHHHHHCCCEEEEEEE
	$\beta\alpha\beta$ -fold	EEEEEE HHHHHHHHHHHHHH EEEEE

Abb. 3.30: a) Sequenzvergleich der *fingerprint*-Region für „ADP-bindende“ Proteine mit der Sequenz der Tryptophan-5-Halogenase PyrH

o steht für polare oder geladene Aminosäuren (K, R, H, S, T, Q, N)

h steht für kleine hydrophobe Aminosäuren (A, I, L, V, M, C)

Abb. 3.30: b) Vergleich der kalkulierten Sekundärstruktur (*PsiPred*) der Tryptophan-5-Halogenase mit der $\beta\alpha\beta$ -Faltung einer Dinukleotidbindestelle [ROSSMAN *et al.*, 1974; WIERENGA *et al.*, 1986; VALLON, 2000].

E steht für β -Faltblatt; *H* für α -Helix und *C* für *random-coil*-Struktur

Ein zweites konserviertes Motiv FAD-bindender Proteine, das sogenannte “GD-Motiv“ [EGGINK *et al.*, 1990] kann in der Sequenz der Tryptophan-5-Halogenase mit geringer Ähnlichkeit (aa 287-297) vermutet werden (Abb. 3.31). Ausschlaggebend für die Zuordnung ist eine konservierte Asparaginsäure im Umbruch eines β -Faltblattes ca. 300 Aminosäuren vom *core fingerprint* entfernt [EGGINK *et al.*, 1990; VALLON, 2000].

fingerprint	TxxxxhΦhhGD
PyrH (287)	KRDGNG YVYSD
<i>PsiPred</i>	<i>CCEEEEEEEEC</i>

Abb. 3.31: “GD-Motiv“ aus FAD-bindenden Proteinen:

h steht für hydrophobe Aminosäuren

Φ steht für aromatische Aminosäuren

Aminosäuren mit den erwarteten Eigenschaften sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Die Zahl gibt die Position der ersten Aminosäure in der Sequenz an.

3.8 Expression des Cosmids 12D4 in *Streptomyces albus*

Das Cosmid **12D4** wurde durch Protoplastentransformation in *S. albus* transformiert. Der rekombinante Stamm wurde *S. albus* SZ12D4 genannt. Dieser Stamm zeigt im Gegensatz zum Wildtyp keine hellgraue Färbung, sondern bildet ein rotviolett-pigment. Dieses Pigment ist mit Aceton und Essigester extrahierbar. Durch Analyse des Acetonextraktes mittels HPLC konnten mehrere Peaks detektiert werden (Abb. 3.32). Es eluieren zwei UV-absorbierende Substanzen mit typischen Tryptophanspektren. Nach 11,4 min eluiert eine Verbindung mit Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 218 nm und 278 nm. Nach 27,2 min eluiert die chromophore Substanz (Abb. 3.33). Diese zeigt Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 221 nm, 273 nm, 358 nm und 533 nm. Bei diesen Substanzen könnte es sich um Intermediate der Pyrroindomycinbiosynthese handeln. Für den Extrakt wurden Massenspektren (HPLC/MS) aufgenommen. Im Extrakt konnten chlorierte organische Verbindungen anhand des Isotopenmusters für ^{35}Cl und für ^{37}Cl identifiziert werden.

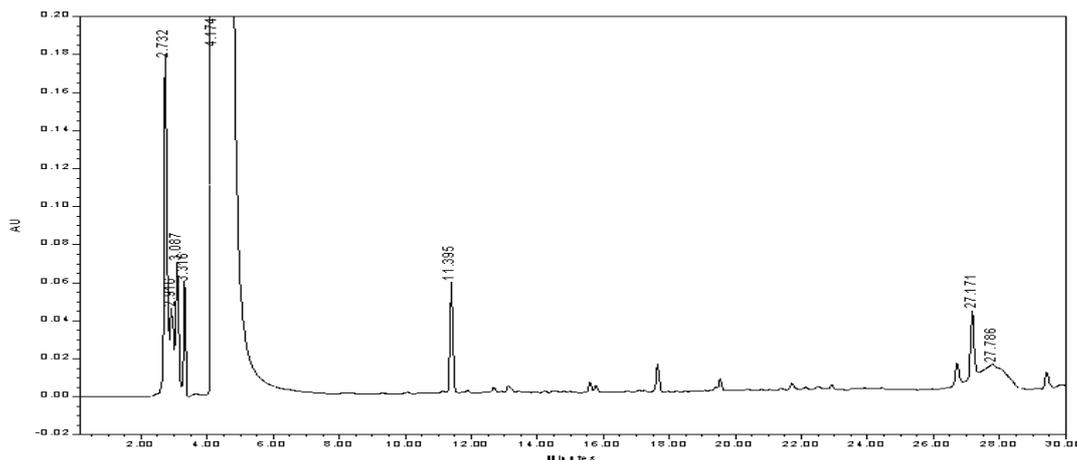


Abb. 3.32: HPLC-Chromatogramme für den Extrakt aus *Streptomyces albus* SZ12D4.

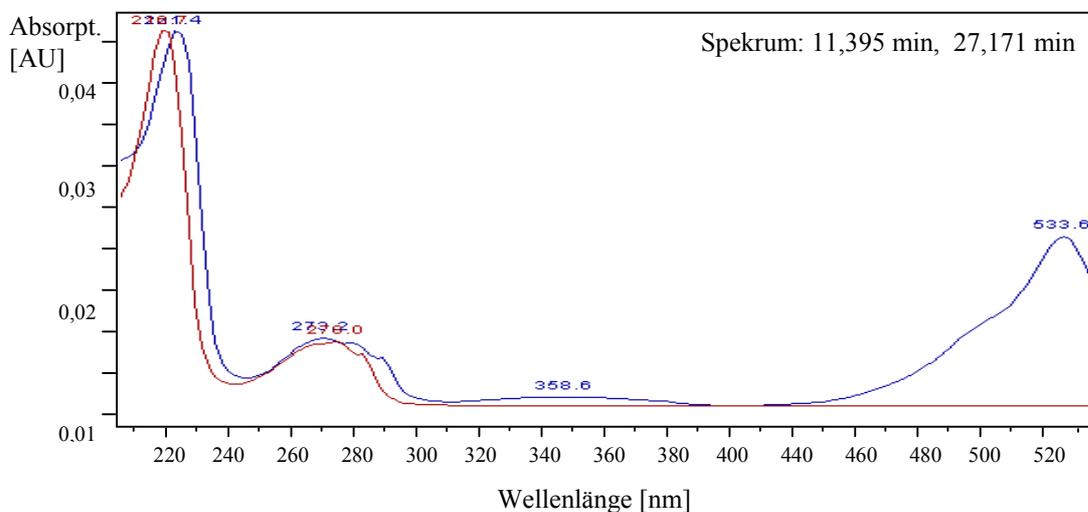


Abb. 3.33: UV-Spektren der Peaks bei 11,395 min und 27,171 min.

3.9 Genetische Inaktivierung der Tryptophan-5-Halogenase

3.9.1 Untersuchungen zur genetischen Modifizierbarkeit von *Streptomyces rugosporus*

In Vorversuchen wurde die Transformierbarkeit von *Streptomyces rugosporus* untersucht. Der Stamm bildet unter einer Vielzahl von getesteten Bedingungen nur in ungenügendem Maße Protoplasten. Eine PEG-vermittelte Protoplastentransformation erwies sich nicht als erfolgreich. Durch intergenerische Konjugation war der Stamm *S. rugosporus* gut genetisch modifizierbar. Der konjugative Transfer des Vektors pSET152, und dessen Integration ins Genom konnte für den gebildeten Stamm *S. rugosporus* pSET152 durch Hybridisierung nachgewiesen werden (ohne Abb.).

3.9.2 *Gene-replacement* des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH*

Zum Nachweis der Beteiligung der Halogenase an der Biosynthese von Pyrroindomycin B wurde das Gen der Tryptophan-5-Halogenase im Genom von *S. rugosporus* inaktiviert. Das Mutationskonstrukt wurde wie in 2.21.1 beschrieben, hergestellt. Der Leserahmen des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH* wurde durch das Einfügen einer Apramycin-resistenzkassette, die das Apramycinacetyltransferase-Gen (*aac3IV*) enthält, unterbrochen. Das Mutationskonstrukt wurde in den Vektor pHZ1358 kloniert. Das Mutationsplasmid wurde durch Konjugation in *S. rugosporus* transformiert. Die *gene-replacement*-Mutation wurde durch homologe Rekombination zwischen dem Genom und dem Mutationskonstrukt erzeugt.

3.9.3 Genetischer Nachweis der Mutation

Die Transkonjuganten wurden nur auf Apramycinresistenz selektiert. Die erscheinenden Kolonien wurden zum Sporulieren auf frische Agarplatten mit Apr₅₀ übertragen. Die Kolonien wurden anschließend auf Sensitivität gegenüber Thiostrepton untersucht. Da die Selektion von *S. rugosporus* auf Thiostrepton sehr schlecht durchführbar ist, wurden die Sporen der apramycinresistenten Klone durch PCR untersucht. Zur Amplifizierung wurden die Primer SZ003 + SZ005 eingesetzt. Die Amplifizierung des mutierten Genes ergab eine Vergrößerung des Amplifikats um 1500 bp (Abb. 3.34).

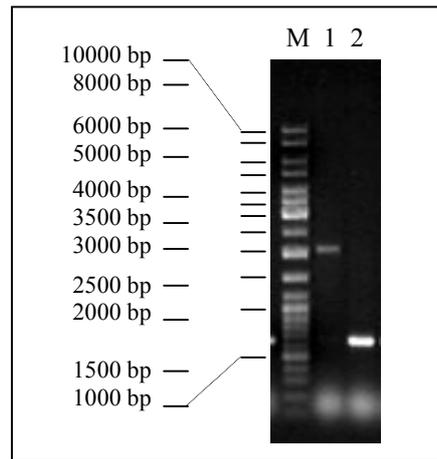


Abb. 3.34: PCR-Amplifizierung mit SZ003+SZ005:

M: Größenstandard Gene Ruler Ladder Mix

1: Amplifikat aus Sporen von *S. rugosporus* SZTF1Hal (*pyrH*)

2: Amplifikat aus Sporen von *S. rugosporus* NRRL 21084 (wt)

Die Mutante und der Wildstamm wurden in Flüssigkultur (NZ-Amin A Medium) gezüchtet und aus dem Mycel Gesamt-DNA isoliert. Die Gesamt-DNA des Wildtyps und der Mutanten wurden vergleichend durch Hybridisierung untersucht. Als Sonden wurden das Tryptophan-5-Halogenase-Gen *pyrH* und der DIG-markierte Vektor pHZ1358 eingesetzt (Abb. 3.35).

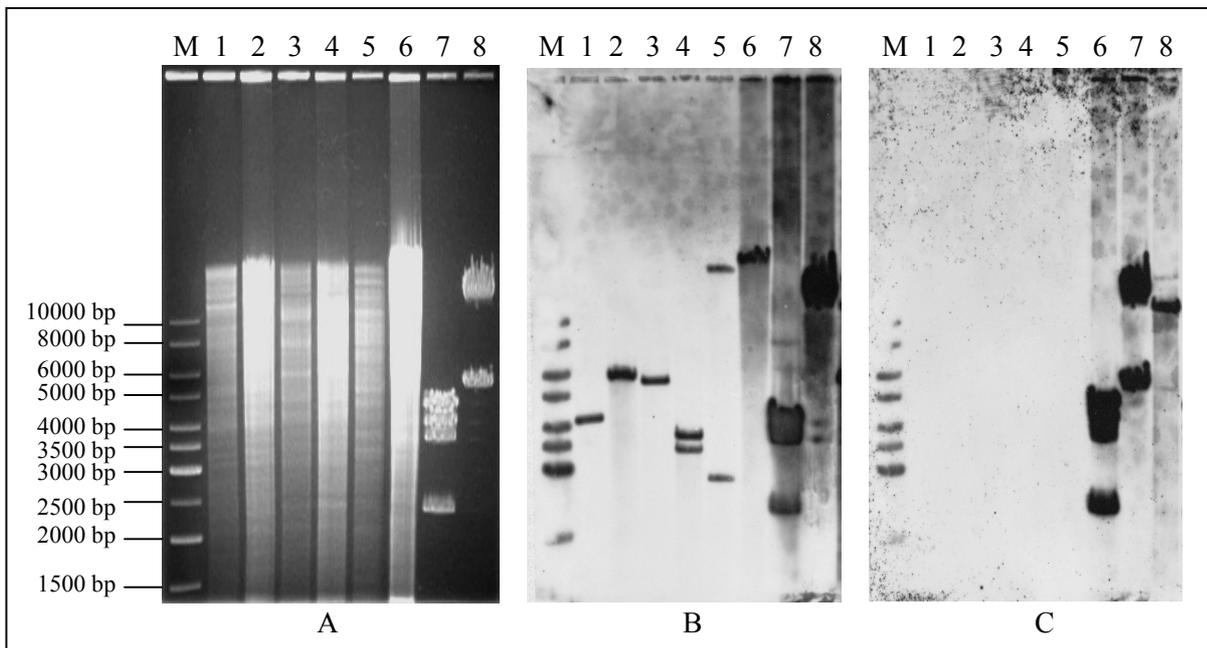


Abb. 3.35: Hybridisierung von Gesamt-DNA aus Wildtyp *S. rugosporus* (NRRL 21084) und Mutante *S. rugosporus* SZTF1Hal (*pyrH*): Agarosegel (A) und SOUTHERN Blots, Hybridisierungen mit den DIG-markierten Sonden „*pyrH*“ (B) und Vektor pHZ1358 (C)

M: Größenstandard Gene Ruler Ladder Mix

1: wt *Bam*HI

2: SZTF1Hal *Bam*HI

3: wt *Pst*I

4: SZTF1Hal *Pst*I

5: wt *Pae*I

6: SZTF1Hal *Pae*I

7: Plasmid pSZ614 *Pst*I

8: Plasmid pSZ614 *Pae*I

In Abb. 3.35 ist sichtbar, dass sich durch die Mutation im Genom ein verändertes Hybridisierungsmuster im mutierten Stamm ergibt. Bei der Hybridisierung mit DIG-markiertem *pyrH* erscheint bei Gesamt-DNA des Wildtyps eine 4300 bp *Bam*HI-Bande, hingegen ist mit Gesamt-DNA des mutierten Stammes eine um 1500 bp größere Bande zu erkennen. Die 5600 bp *Pst*I-Bande des Wildtyps ist für Gesamt-DNA der Mutante nicht nachweisbar. Das Hybridisierungsmuster der Mutante zeigt zwei kleinere *Pst*I-Banden (3800 bp; 3300 bp). Im Wildtyp wurden zwei Banden für *Pae*I-verdaute Gesamt-DNA detektiert (> 10000 bp; 2800 bp). Gesamt-DNA der Mutante zeigte nur eine größere *Pae*I-Bande (> 14000bp). In Abb. 3.36 ist eine Restriktionskarte der *pyrH*-Region im Wildstamm und der Mutation dargestellt.

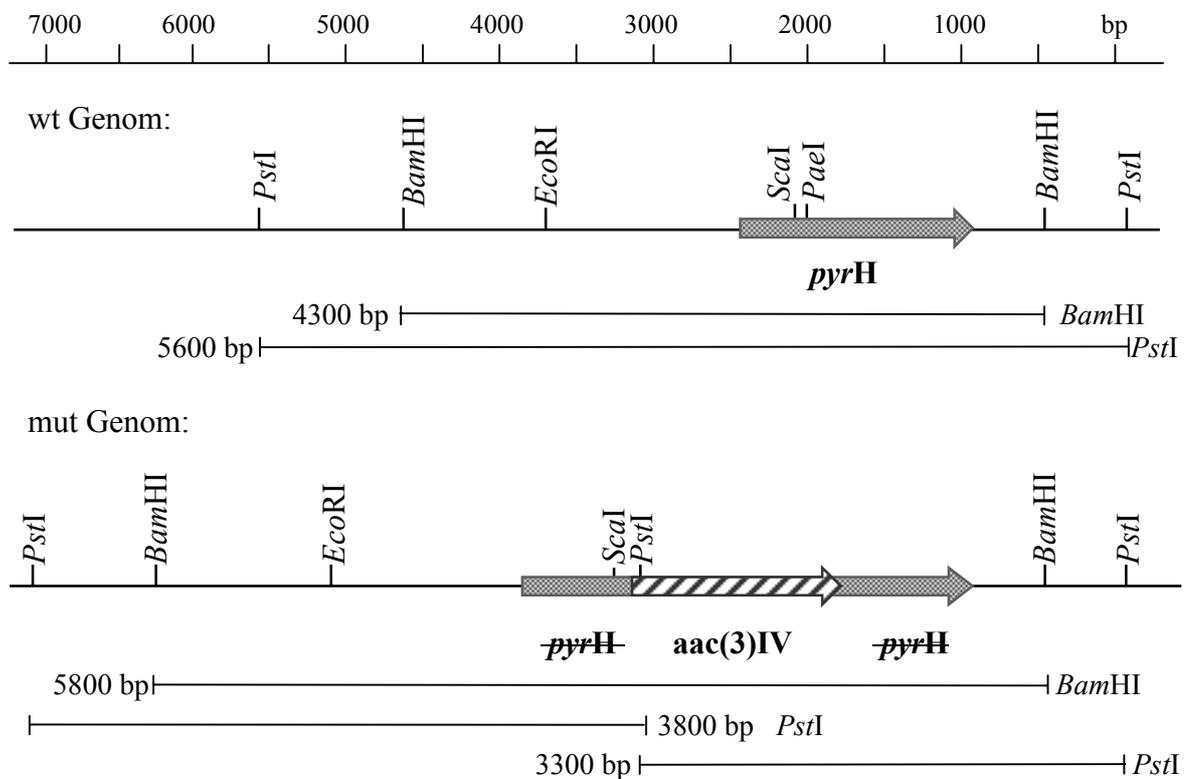


Abb. 3.36: Restriktionskarte der Halogenase-Region:

Darstellung des Genomabschnitts des Wildtyp und der Mutante mit Restriktionschnittstellen; Abbildung der Größe der hybridisierenden Banden mit der Sonde *pyrH*.

Mit DIG-markiertem Vektor pHZ1358 wurde weder für Gesamt-DNA des Wildtyps noch der Mutante ein Hybridisierungssignal erhalten.

Der Nachweis für die korrekte Integration des Mutationskonstruktes durch *double crossover* ins Genom von *S. rugosporus* wurde somit erbracht. Die Mutante wurde *S. rugosporus* SZTF1Hal genannt. Die korrekte Mutation wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.9.4 Auswirkung der Inaktivierung auf die Sekundärstoffproduktion

Die Auswirkung der Inaktivierung des Halogenase-Gens im Organismus wurde anhand der Veränderung des Metabolitenmusters untersucht. Die Stämme *S. rugosporus* SZTF1Hal und der Wildtyp wurden unter gleichen Bedingungen in Flüssigkulturen (SO7-Medium) gezüchtet. Die Zellen wurden geerntet und extrahiert (2.22.1). Die Extrakte wurden mittels HPLC und HPLC/MS analysiert (2.22.2). Die Chromatogramme der Extrakte aus dem Wildtyp und der Mutante sowie die entsprechenden Massenspektren sind in Abb. 3.37 und Abb. 3.38 dargestellt. Im Chromatogramm für den Wildtypextrakt aus *S. rugosporus* eluieren zwischen 6,6 min und 6,7 min UV-absorbierende Substanzen mit den Massenpeaks für Pyrroindomycin A $[M+H]^+$ 1097,6 und Pyrroindomycin B $[M+H]^+$ 1131,6/1133,4 und $[M+CH_3+H]^+$ 1145,5/1147,3.

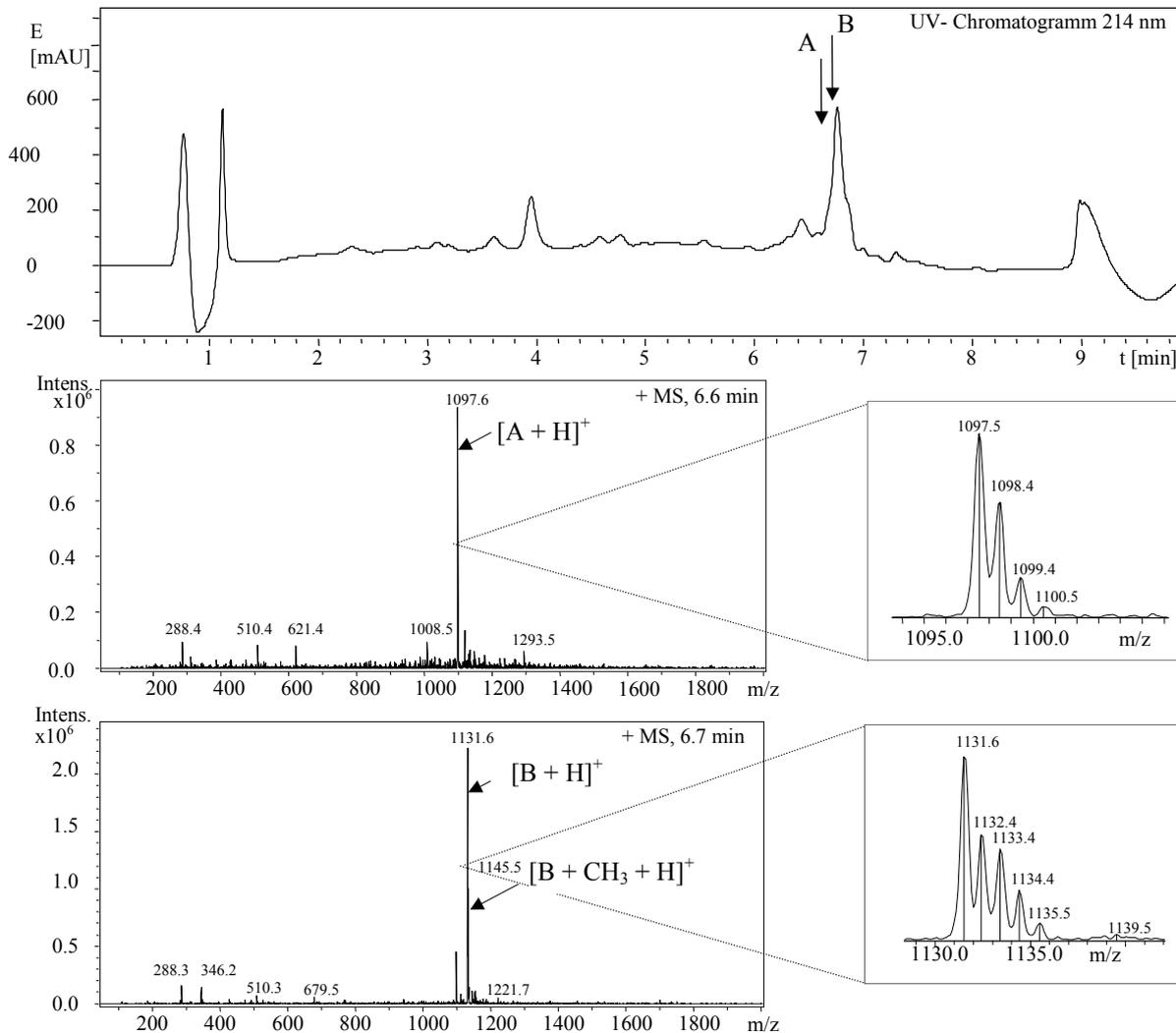


Abb. 3.37: Analyse der Extrakte des Wildtyps *S. rugosporus*.

Chromatogramme und Massenspektren:

A: Pyrroindomycin A; M_w : 1096,6

B: Pyrroindomycin B; M_w : 1130,5

$[B + CH_3]$: M_w : 1144,4

Im Chromatogramm für den Extrakt der Mutante *S. rugosporus* SZTF1Hal eluieren zwischen 6,6 min und 6,8 min UV-absorbierende Substanzen mit den Massenpeaks für Pyrroindomycin A von $[M+H]^+$ 1097,6 und $[M+CH_3+H]^+$ 1111,6. Die chlorierte Verbindung Pyrroindomycin B konnte in der Mutante nicht nachgewiesen werden.

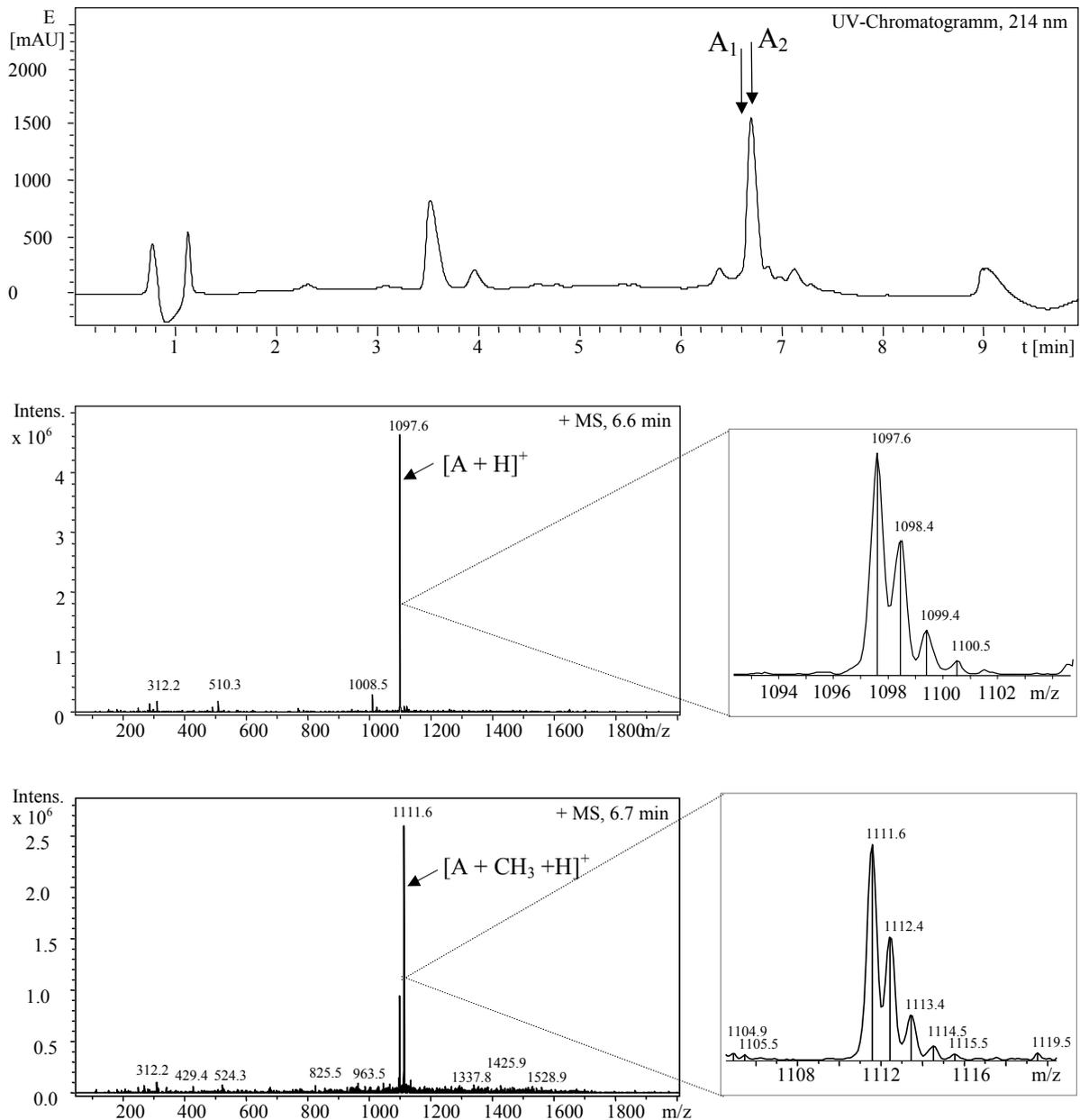


Abb. 3.38: Analyse der Extrakte der Mutante *S. rugosporus* SZTF1Hal.

Chromatogramme und Massenspektren:

A₁: Pyrroindomycin A; M_w: 1096,6

A₂: [A+CH₃]; M_w: 1110,5

3.10 Expression des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH*

3.10.1 Klonierung in den Expressionsvektor pCIBhis

Zur Expression wurde das Gen der Tryptophan-5-Halogenase (*pyrH*) mit synthetischen Primern amplifiziert (2.17.6). Um eventuelle Fehler bei der Amplifizierung des Gens durch die *Pfu*-DNA-Polymerase auszuschließen, wurden die DNA-Moleküle sequenziert. Zur Expression wurde das Gen in den *E. coli*-*Pseudomonas* shuttle Vektor pCIBhis kloniert. Dieser Expressionsvektor enthält hinter dem P_{tac} -Promotor das Expressionsepitop aus pRSETB (siehe Anhang Abb. A.1). Das Gen wurde so kloniert, dass die Expression mit einem (His)₆-tag am NH₂-Terminus erfolgt. Das Expressionsplasmid pSZexM2 (siehe Anhang Abb. A.2) wurde durch Konjugation in den Stamm *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 transformiert. Dieser Stamm enthält das Biosynthesegencluster für das chlorierte Antifungikum Pyrrolnitrin. Der Leserahmen für das Halogenase-Gen der Pyrrolnitrinbiosynthese ist in diesem Stamm deletiert (Δ ORF1). Dieser Stamm sollte gut geeignet sein als Wirt für die Expression des Halogenase-Gens *pyrH* aufgrund seiner Ähnlichkeit zu ORF1 (*prnA*) und für kombinatorische Biosynthesen.

3.10.2 Überexpression des Tryptophan-5-Halogenase-Gens in

Pseudomonas fluorescens BL915 Δ ORF1

Zur Untersuchung der Expression des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *PyrH* wurde der Stamm *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 und als Kontrolle der Stamm *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pCIBhis gezüchtet. Die Expression des klonierten Gens erfolgte in HNB-Medium ohne Induktion. Nach 24 h, 48 h und 72 h Kultivierung wurden Proben entnommen. Die Rohextrakte wurden durch SDS-PAGE analysiert (2.26.1). Die Rohextrakte des Kontrollstammes und des Expressionsstammes wurden verglichen. Im Rohextrakt des Expressionsstammes wurde ein neues Protein mit einer Größe von ca. 61 kDa detektiert (Abb. 3.39). Das theoretische Molekulargewicht für das Expressionskonstrukt beträgt 61800. Der Kontrollstamm zeigt diese Proteinbande nicht.

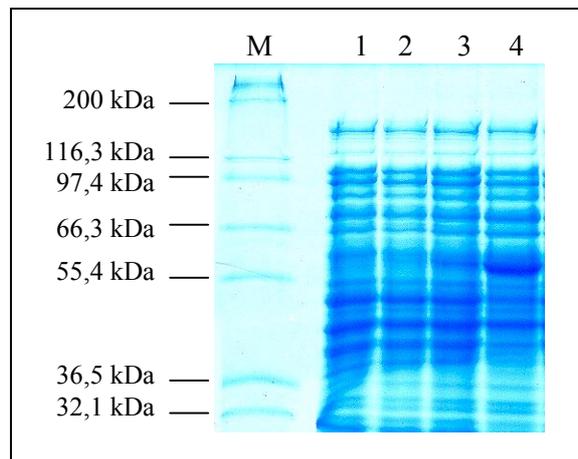


Abb. 3.39: SDS-PAGE der Expression der Tryptophan-5-Halogenase PyrH in *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2:

M: Größenstandard Mark12[®] unstained standard

1: Rohextrakt des Kontrollstammes *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pCIBhis

2-3: Rohextrakte aus positiven Klonen *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2

4: Rohextrakt des Expressionsklons *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 (*pyrH*)

3.10.3 Nachweis der Expression durch Western Blot

Die Expression des Gens kann anhand eines klonierten Xpress[®]-Epitopes (2.26.2; Anhang Abb. A.1; A.2) durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die Rohextrakte von Wirtsstamm und Expressionsstamm wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot auf einer PVDF-Membran fixiert. Der Nachweis von PyrH erfolgte durch immunologische Reaktion des Antikörpers mit dem Xpress Epitop am NH₂-Terminus von PyrH. In Abb. 3.40 sind das Polyacrylamidgel und der geschwärzte Röntgenfilm dargestellt. Im Rohextrakt von *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 (*pyrH*) wurde eine Proteinbande mit einer Größe von ~ 61 kDa detektiert.

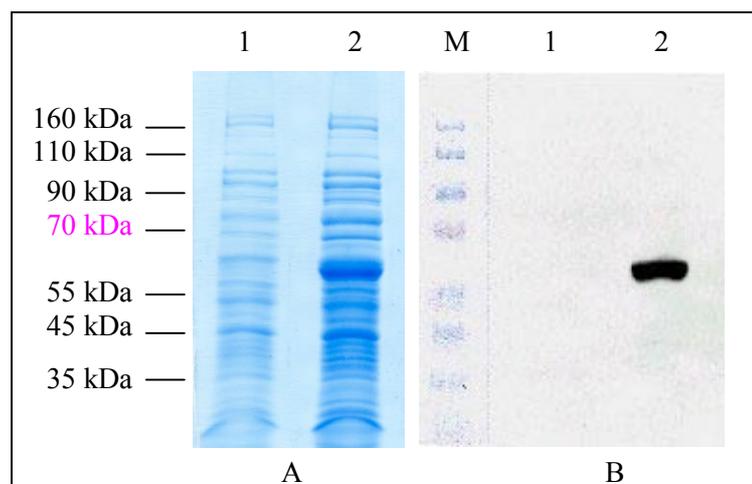


Abb. 3.40: SDS-Polyacrylamid-Gel (A) und Western Blot (B):

M: Größenstandard: Prestained Protein Ladder

1: Rohextrakt aus *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pCIBhis, Kontrollstamm

2: Rohextrakt aus *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 (*pyrH*), Expressionsstamm.

3.11 Nachweis der Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase

3.11.1 Nachweis der halogenierenden Aktivität *in vivo*

Für den Nachweis der *in vivo* Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase PyrH in *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 wurde der Stamm in Flüssigkultur (HNB; HNBB_r) gezüchtet, mit L-Tryptophan gefüttert (2.24.1) und der Kulturüberstand mittels HPLC analysiert (2.27.3). Der Nachweis der gebildeten Produkte erfolgte anhand von Referenzsubstanzen. In Abb. 3.41 sind die Chromatogramme der Kulturüberstände dargestellt. Wie in Abb. 3.41 zu sehen, erscheint im HPLC-Chromatogramm vom Kulturüberstand des Expressionsstammes bei der Kultivierung mit Chlorid ein neuer Peak bei 6,98 min. Die Referenzsubstanzen L-Tryptophan und 7-Cl-Tryptophan werden nach 3,15 min und 6,52 min eluiert. Der neue Peak wurde im UV untersucht und zeigt Absorptionsmaxima bei 223 nm und 282 nm. Die Referenzsubstanz 7-Cl-Tryptophan zeigt im HPLC/UV-Spektrum gleiche Absorptionsmaxima bei 223 nm und 283 nm.

In Abb. 3.43 ist das Chromatogramm des Kulturüberstandes bei der Kultivierung mit Bromid dargestellt. Der Expressionstamm produziert in Gegenwart von Bromid eine neue Substanz, die in der HPLC als ein Peak bei 8,38 min eluiert wird. Die Referenzsubstanz 5-Br-Tryptophan besitzt eine Retentionszeit von ebenfalls 8,38 min. Der neue Peak zeigte im UV-Spektrum Absorptionsmaxima bei 220 nm und 282 nm. Die Referenzsubstanz 5-Br-Tryptophan besitzt identische Absorptionsmaxima im UV-Spektrum des Diodenarraydetektors. Der neue Peak korrespondiert in seinen Eigenschaften mit der Referenzsubstanz 5-Br-Tryptophan.

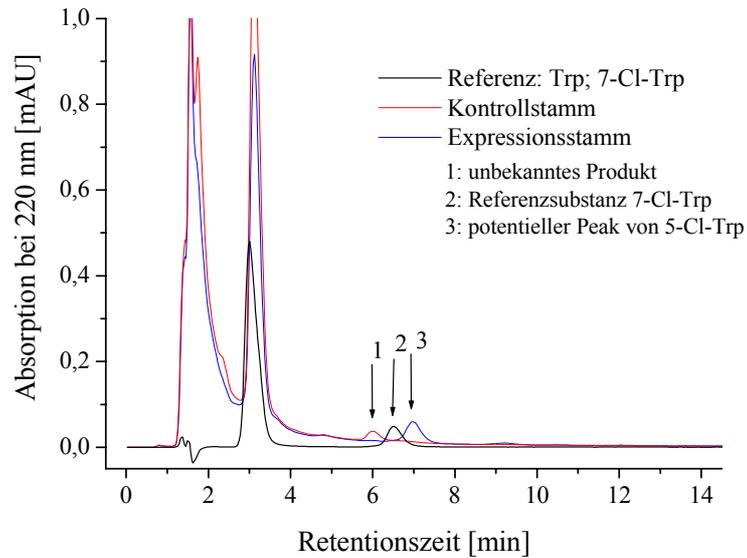


Abb. 3.41: Chromatogramme der Kulturüberstände aus Fütterungsversuchen von *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 in HNB-Medium.

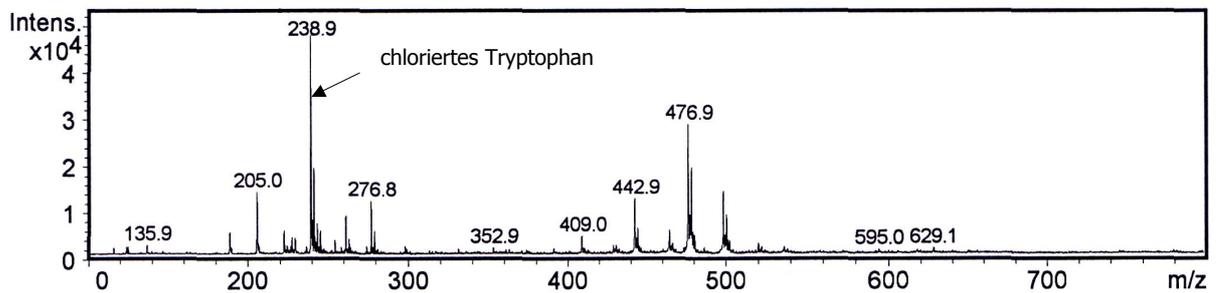


Abb. 3.42: Massenspektrum des Kulturüberstandes aus Fütterungsversuchen von *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 in HNB-Medium (HPLC/MS 6,5-7,0 min).

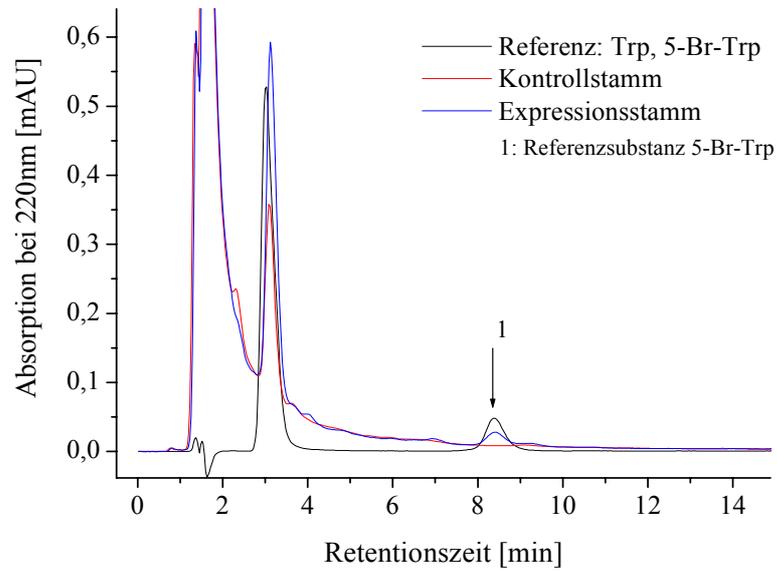


Abb. 3.43: Chromatogramme der Kulturüberstände aus Fütterungsversuchen von *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 in HNBBBr-Medium.

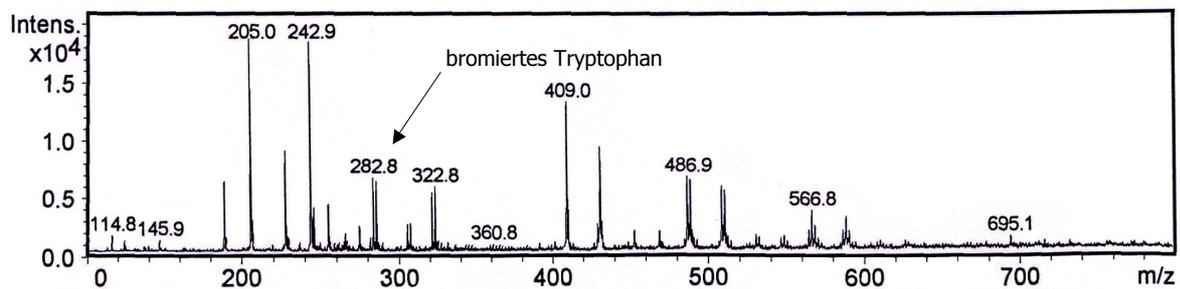


Abb. 3.44: Massenspektrum des Kulturüberstandes aus Fütterungsversuchen von *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 in HNBBBr-Medium (HPLC/MS 8,0-8,5 min).

3.11.2 Komplementationsversuche mit der Pyrrolnitrinbiosynthese

Durch *P. fluorescens* BL915 wird 7-Chlortryptophan zu Pyrrolnitrin metabolisiert. Die Mutante *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 bildet kein 7-Chlortryptophan. Die Bildung eines chlorierten Tryptophans (vermutlich 5-Cl-Tryptophan) durch *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 wurde *in vivo* nachgewiesen (3.11.1). Die weitere Metabolisierung des chlorierten Tryptophans durch *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 wurde untersucht. Der Stamm wurde 7 d gezüchtet. Ab dem dritten Tag wurden täglich 60 ml Kultur extrahiert und durch DC analysiert (Abb. 3.45). Es konnte kein chloriertes Phenylpyrrol nachgewiesen werden. Die Extrakte wurden ebenfalls durch HPLC/DAD analysiert. Dabei wurde kein Peak mit charakteristischem Phenylpyrrolspektrum detektiert.

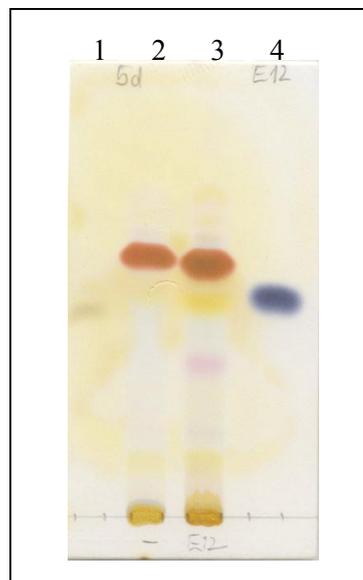


Abb. 3.45: DC des Kulturextraktes aus *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 (*pyrH*) Detektion mit „van Urk’s“-Reagenz:

- 1: Monodechloraminopyrrolnitrin (Referenzsubstanz)
- 2: *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 (Kontrollstamm)
- 3: *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 (Expressionsstamm)
- 4: Pyrrolnitrin (Referenzsubstanz)

3.11.3 Nachweis der halogenierenden Aktivität *in vitro*

Das Ziel der Überexpression des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH* bestand darin, ausreichende Menge an Protein zu erhalten, um die *in-vitro*-Aktivität zu analysieren. Das Protein wurde in *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 überexprimiert. Es wurde die Umsetzung von Tryptophan zu 5-Cl- bzw. 5-Br-Tryptophan durch PyrH untersucht. In den Enzymtests zur Detektion von Halogenaseaktivität wurde der zellfreie Rohextrakt aus *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 eingesetzt.

Zur Gewinnung des Rohextraktes wurden die Zellen wie in 2.25.1 beschrieben in 800 ml Flüssigkultur (HNB) gezüchtet. Die Zellausbeute betrug 5 g/l. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (2.25.4) aufgeschlossen. Die Konzentration des Rohextraktes wurde mit 9,2 mg/ml nach WHITAKER & GRANUM (1980), wie in 2.25.7 beschrieben, bestimmt.

Der Enzymtest auf halogenierende Aktivität des Proteins wurde lt. 2.27.2 durchgeführt. Im Enzymtest wurden Fre, FAD, L-Trp, NaCl bzw. NaBr und NADH mit Rohextrakt aus dem Stamm *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 inkubiert. Als Kontrolle wurde Rohextrakt aus dem Stamm *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pCIBhis analog behandelt.

Die Reaktionsansätze wurden mittels HPLC auf die Bildung von 5-Chlortryptophan bzw. 5-Bromtryptophan untersucht. Als Referenzsubstanzen standen 7-Chlortryptophan und 5-Bromtryptophan zur Verfügung. Die Chromatogramme sind in Abb. 3.46 und Abb. 3.47 dargestellt. Im Enzymtest mit Chlorid wurde bei 6,41 min ein neuer Peak detektiert (Abb. 3.46). Dieser wies im UV-Spektrum Absorptionsmaxima bei 223 nm, 279 nm auf. Die Referenzsubstanz 7-Chlortryptophan eluiert nach 6,03 min und zeigt die gleichen Absorptionsmaxima.

Im Enzymtest mit Bromid konnte bei 7,53 min ein neuer Peak detektiert werden (Abb. 3.47). Dieser wies im UV-Spektrum Absorptionsmaxima bei 223 nm, 283 nm auf und eluierte mit der gleichen Retentionszeit wie die Referenzsubstanz 5-Bromtryptophan. Die Referenzsubstanz 5-Bromtryptophan zeigt das gleiche UV-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 223 nm und 283 nm.

Für den Rohextrakt des Kontrollstammes konnte keine Umwandlung von Tryptophan nachgewiesen werden.

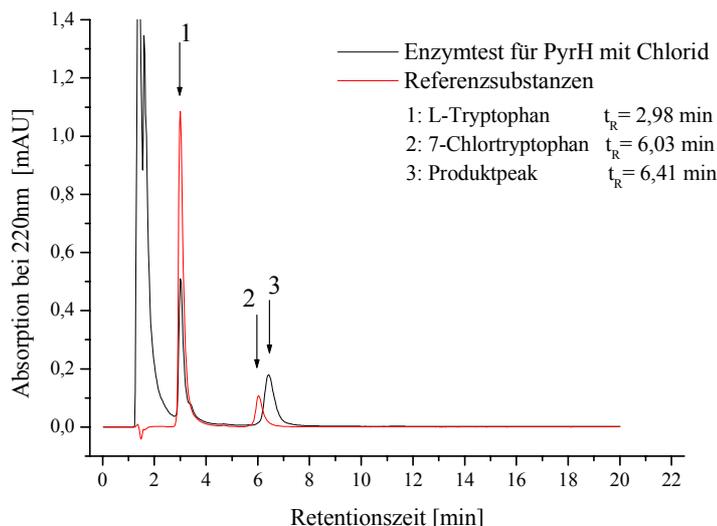


Abb. 3.46: Chromatogramme des Enzymtest der Tryptophan-5-Halogenase PyrH mit Chlorid.

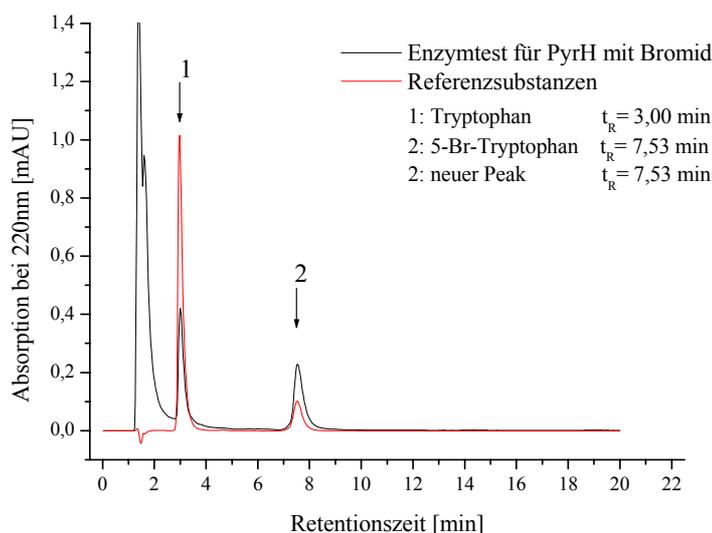


Abb. 3.47: Chromatogramme des Enzymtest der Tryptophan-5-Halogenase PyrH mit Bromid.

3.11.3.1 Identifizierung der Reaktionsprodukte mittels HPLC/MS

Durch HPLC/MS-Analysen wurden die Massen dieser Reaktionsprodukte bestimmt. Im Massenspektrum für den Enzymtest mit Chlorid wurden bei der Elution der neuen Substanz nach 3,8 min folgende Massenpeaks detektiert: 239, 261, 277 (Abb. 3.48). Diese Peaks entsprechen $[M+H]^+$ 239/241, $[M+Na]^+$ 261/263, $[M+K]^+$ 277/279 für chloriertes Tryptophan. Diese Massen stimmen mit der Masse der Referenzsubstanz 7-Cl-Tryptophan überein. Die für chlorierte Verbindungen typischen Isotopenmuster von ^{35}Cl und ^{37}Cl im Verhältnis wie 3:1 sind für die genannten Peaks deutlich zu erkennen.

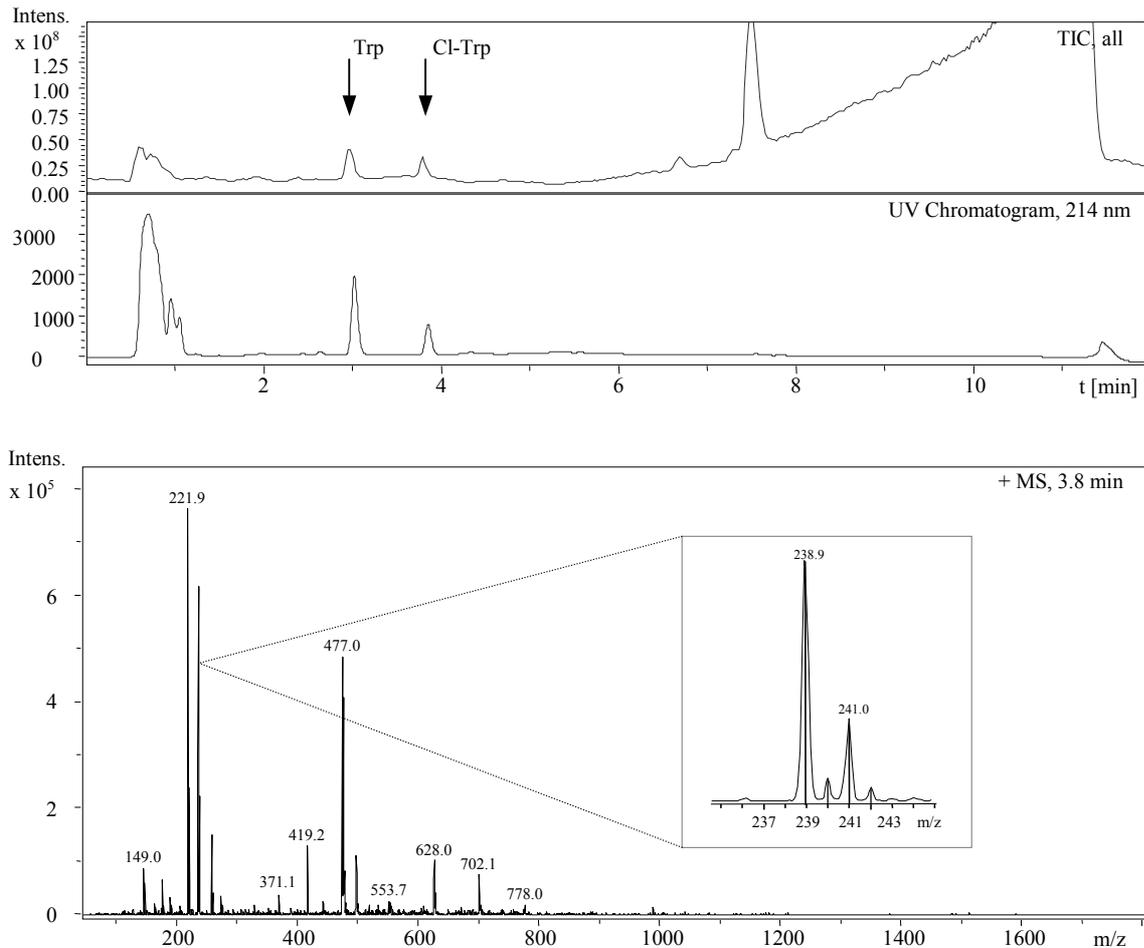


Abb. 3.48: Chromatogramme und Massenspektren für den Enzymtest der Tryptophan-5-Halogenase mit Chlorid.

Im Massenspektrum für den Enzymtest mit Bromid wurden bei der Elution der neuen Substanz nach 4,0 min folgende Massenpeaks detektiert: 283, 305, 321 (Abb. 3.49). Diese Peaks stimmen mit $[M+H]^+$ 283/285, $[M+Na]^+$ 305/307, $[M+K]^+$ 321/323 für bromiertes Tryptophan überein. Diese Massenpeaks entsprechen der Masse der Referenzsubstanz 5-Br-Tryptophan. Die für bromierte Verbindungen typischen Isotopenmuster von ^{79}Br und ^{81}Br im Verhältnis wie 1:1 sind für die genannten Peaks deutlich zu erkennen.

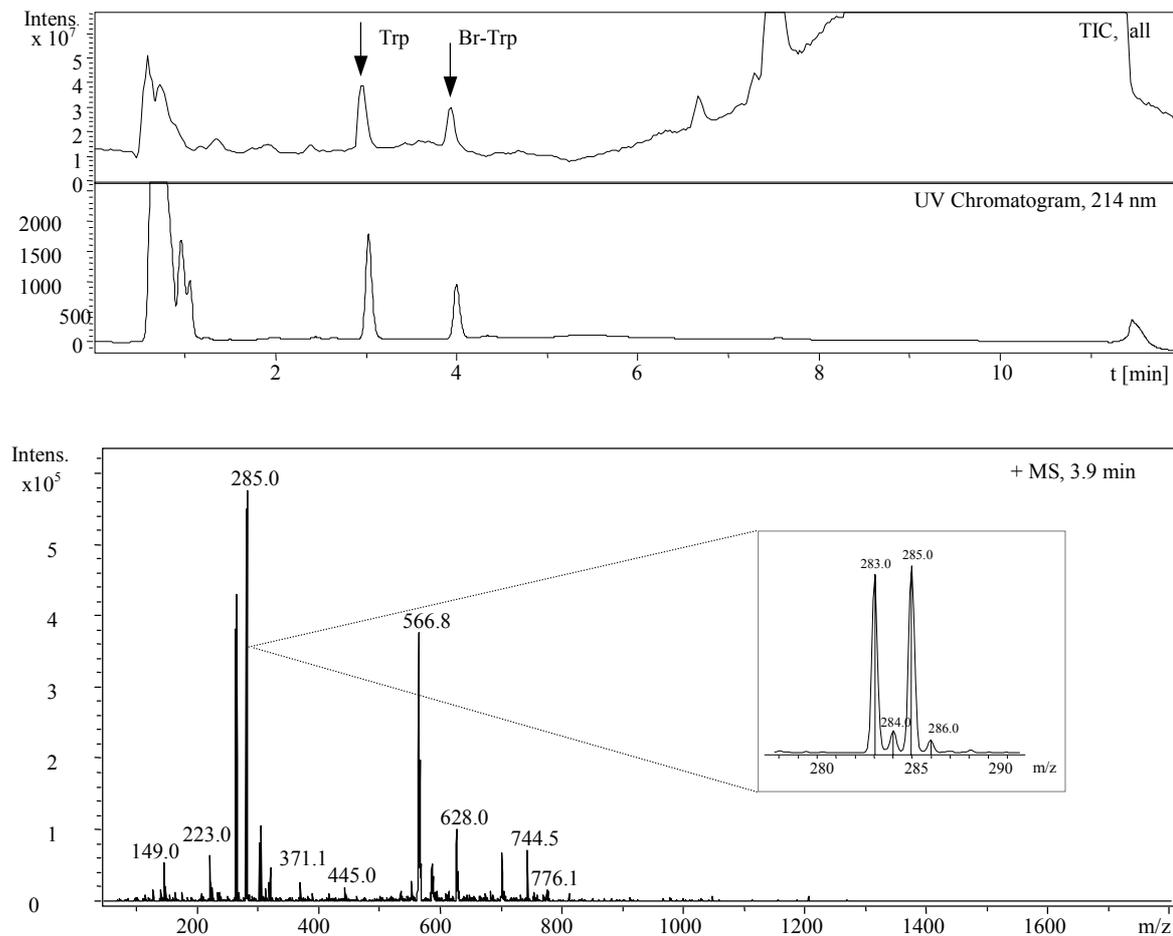


Abb. 3.49: Chromatogramme und Massenspektren für den Enzymtest der Tryptophan-5-Halogenase mit Bromid.

3.11.3.2 Bestimmung der Enzymaktivität im Rohextrakt

Die Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase im Rohextrakt für die Chlorierung von Tryptophan ist 100,0 $\mu\text{U/ml}$. Die Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase im Rohextrakt für die Bromierung von Tryptophan ist 75,7 $\mu\text{U/ml}$.

Die spezifische Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase im Rohextrakt für die Chlorierung beträgt 108,7 $\mu\text{U/mg}$ und für die Bromierungsreaktion $\sim 82,3 \mu\text{U/mg}$.

3.11.3.3 Einfluss der NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase (Fre) auf die Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase

Die Untersuchungen zum Einfluss der NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase auf die Enzymaktivität sind wie in 2.27 beschrieben, durchgeführt worden. Die spezifische Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase im Rohextrakt ohne Zusatz der Fre beträgt 23,9 $\mu\text{U/ml}$ für die Chlorierungsreaktion und 13 $\mu\text{U/ml}$ für die Bromierungsreaktion. Durch den Zusatz von 4,5 mU der NAD(P)H-Flavin-Oxidoreduktase Fre aus *E.coli* wird die Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase bis zu sechsfach verstärkt. In Abb. 3.50 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

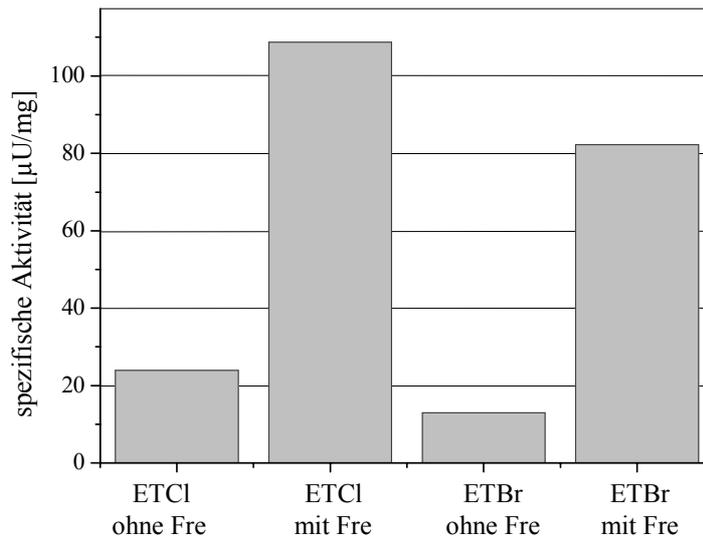


Abb. 3.50: Enzymaktivität der Tryptophan-5-Halogenase PyrH und der Einfluss des Fre-Rohextraktes im Enzymtest.

3.12 Anreicherung der Tryptophan-5-Halogenase

3.12.1 *Metal-Chelating-Chromatographie*

Die *metal-chelating*-Chromatographie wurde an einer mit Nickelsulfat aktivierten Chelating-Sepharose[®] FF, wie in 2.25.9 beschrieben, durchgeführt. Durch die Bindung des NH₂-terminalen (His)₆-tag an Ni²⁺-Ionen konnte die Tryptophan-5-Halogenase durch diesen Chromatographieschritt hoch angereichert werden. Die Elution erfolgte im Batchverfahren mit den angegebenen Elutionspuffern. Die Elution wurde durch Absorptionsmessung bei 254 nm verfolgt. In Abb. 3.51 ist das Chromatogramm dargestellt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen mit der Tryptophan-5-Halogenase wurden sinnvoll gepoolt. Die Konzentration des Proteinpools betrug 0,03 mg/ml. Die Anreicherung der Tryptophan-5-Halogenase aus dem Rohextrakt durch eine *metal-chelating*-Chromatographie ist in Abb. 3.52 dargestellt.

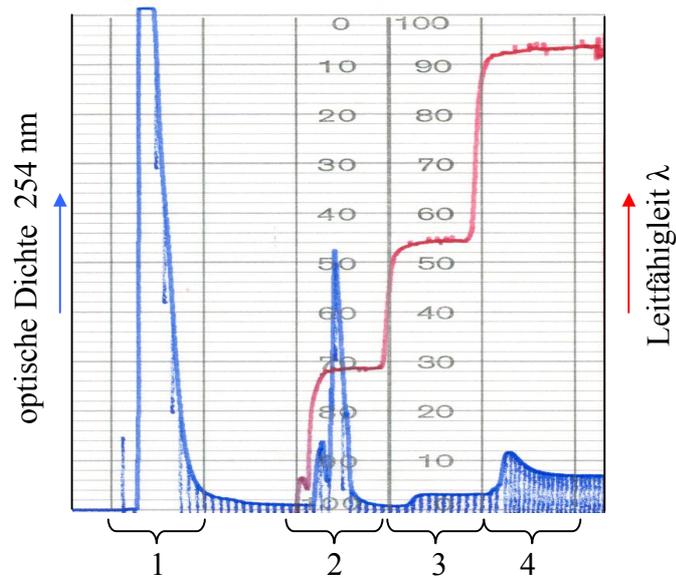


Abb. 3.51: Chromatogramm der *metal-chelating*-Chromatographie:

- Fractionen
- 1: Beladung der Säule/Durchlauf
 - 2: erste Waschfraktion
 - 3: zweite Waschfraktion
 - 4: Eluat (PyrH)

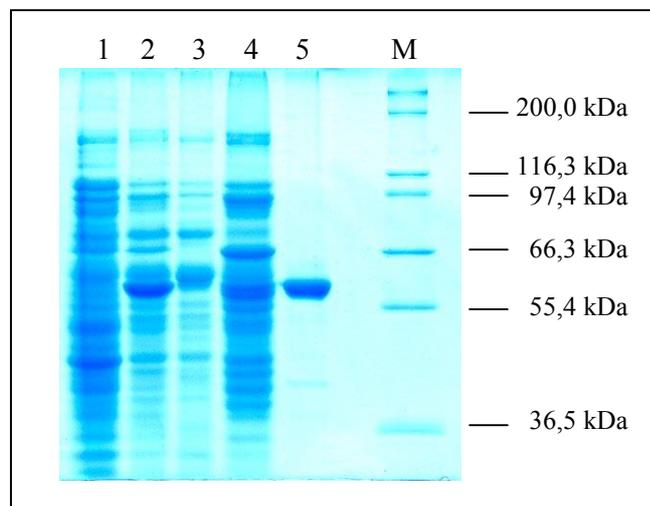


Abb. 3.52: SDS-PAGE der Fraktionen der *metal-chelating*-Chromatographie:

- 1: Rohextrakt aus *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pCIBhis (25 μ g)
- 2: Rohextrakt aus *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2(*pyrH*) (20 μ g)
- 3: Säulendurchlauf (15 μ g)
- 4: Waschfraktionen der Säule (22 μ g)
- 5: Eluat der Säule (PyrH) (7 μ g)
- M: Größenstandard Mark12[®] unstained standard

3.12.2 Aktivitätstest mit angereicherter Tryptophan-5-Halogenase

Die Proteinlösungen (Durchlauf, Waschfraktionen, Eluat) wurde sofort gegen 20 % Glycerin in 0,01 M KPP, pH7,2, über Nacht dialysiert und anschließend über Vivaspins[®] konzentriert (Zentrifugation 4 °C, 2500 rpm, 40 min). Die Konzentrate wurden zum Enzymtest eingesetzt. In diesen Konzentraten konnte keine Halogenaseaktivität nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde aktivem Rohextrakt Imidazolpuffer (Elutionspuffer I) zugesetzt, anschließend dialysiert und ein Enzymtest durchgeführt. Auch hier konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Es wurde weiterhin untersucht, ob der Zusatz von Metallionen zu einer Reaktivierung des Enzyms führt. Zu den Enzymtests wurden Mg^{2+} (25 mM), Ca^{2+} (25 mM) und Fe^{3+} (0,02 mM) zugesetzt. Durch den Zusatz von Metallionen konnte keine Reaktivierung nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Nachweis eines Tryptophan-5-Halogenase-Gens aus

Streptomyces rugosporus

Für die Biosynthese von Pyrroindomycin B wurde eine Halogenierungsreaktion postuliert, bei der aus Tryptophan in einem Schritt 5-Chlortryptophan gebildet wird. Es wurde angenommen, dass diese Reaktion durch eine spezifische Tryptophan-5-Halogenase katalysiert wird. Das Gen dieser postulierten Tryptophan-5-Halogenase sollte im Genom des Pyrroindomycinproduzenten *S. rugosporus* nachgewiesen werden.

Zur Detektion von Genen können verschiedene Methoden eingesetzt werden, z.B. SOUTHERN Hybridisierung oder die Polymerasekettenreaktion mit degenerierten Primern. Aufgrund der wachsenden Kenntnisse über Gene des Sekundärmetabolismus, wurden in den letzten Jahren viele neue Biosynthesegene durch Hybridisierungen mit DNA-Sonden detektiert, z.B. Biosynthesegene von Rifamycin aus *Amycolatopsis mediterranei* [SCHUPP *et al.*, 1998] und Simocyclinon D8 aus *Streptomyces antibioticus* [TREFZER *et al.*, 2002, GALM *et al.*, 2002].

In dieser Arbeit wurde zur Detektion des postulierten Tryptophan-5-Halogenase-Gens in *S. rugosporus* Gesamt-DNA mit dem Gen *prnA* der Tryptophan-7-Halogenase aus *P. fluorescens* BL915 als heterologe DNA-Sonde hybridisiert. Diese Strategie führte schon zur Detektion ähnlicher Halogenasegene in anderen Spezies [HAMMER *et al.*, 1999; SCHNERR, 1999].

In Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* konnte jedoch keine ähnliche Sequenz mit dieser heterologen Sonde detektiert werden. Die Variation der Hybridisierungsbedingungen (55-80% Homologie) führte nicht zur Detektion diskreter Banden im SOUTHERN Blot. Auf das Gel wurde nur eine sehr geringe Menge Kontroll-DNA aus *P. pyrrocinia* aufgetragen. Trotzdem ist im Blot noch ein schwaches Signal zu erkennen. Die DNA-Konzentration der DNA aus *S. rugosporus* war deutlich höher als in der Kontrolle. Trotzdem konnte in DNA aus *S. rugosporus* kein eindeutiges Signal mit dieser Sonde detektiert werden (Abb. 3.1).

Es wurde vermutet, dass die Ähnlichkeit der gesuchten Gensequenz in *S. rugosporus* und der DNA-Sonde zu gering ist. Das als Sonde eingesetzte Gen der Tryptophan-7-Halogenase PrnA aus *P. fluorescens* BL915 zeigt im Sequenzvergleich mit anderen Tryptophan-7-Halogenase-Genen aus ähnlichen Organismen wie *P. aureofaciens*, *B. cepacia* und *P. pyrrocinia* hohe Sequenzidentität (~89-95%) [HAMMER *et al.*, 1999]. Gegenüber einer funktionell identischen Tryptophan-7-Halogenase aus *M. fulvus* weist die Nukleotidsequenz der Sonde jedoch nur noch eine Sequenzidentität von 45% auf [HAMMER *et al.*, 1999]. Eine weitere potenzielle Tryptophan-7-Halogenase aus dem Gram-positiven Rebeccamycinproduzenten *L. aerocolonigenes* zeigt 66% Übereinstimmung der Nukleotidsequenz zur Tryptophan-7-Halogenase aus *P. fluorescens* BL915 [SÁNCHEZ *et al.*, 2002]. Beim Vergleich der

Gensequenzen dieser Enzyme mit gleicher Funktion aus Gram-negativen und Gram-positiven Organismen kann man deutliche Unterschiede feststellen. Die Tryptophan-6-Halogenase *Thal* aus dem Gram-positiven Organismus *Streptomyces albogriseolus* besitzt 68% Identität der Nukleotidsequenz mit der Tryptophan-7-Halogenase aus *P. fluorescens* BL915 [SCHMID, persönl. Mitteilung, 1999]. Die bekannten Sequenzen von Tryptophanhalogenasen besitzen einen internen Abschnitt mit deutlich höheren Sequenzidentitäten untereinander. Ein Fragment von 320 bp aus dieser Region des Tryptophan-6-Halogenase-Gens *thal* aus *S. albogriseolus* wurden ebenfalls als DNA-Sonde eingesetzt. Die Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* wurde mit dieser DNA-Sonde (PCR-*thal*) hybridisiert. Auch hier konnte unter verschiedenen Stringenzbedingungen kein klares Hybridisierungssignal mit der heterologen Sonde erzielt werden. In späteren Untersuchungen konnte die Nukleotidsequenz des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH* aus *S. rugosporus* bestimmt werden. Die Sequenzvergleiche bestätigen die Ergebnisse der Hybridisierungen. Die Sequenz von *pyrH* besitzt 57% Sequenzidentität mit dem Tryptophan-7-Halogenase-Gen *prnA* aus *P. fluorescens* BL915 und 59% mit dem Tryptophan-6-Halogenase-Gen *thal* aus *S. albogriseolus*. In den Hybridisierungsexperimenten hätte bei den niedrigsten Stringenzbedingungen (55% Homologie) ein Hybridisierungssignal detektierbar sein müssen. Diese Bedingungen sind jedoch für die verwendeten Sonden zu niedrig, so dass mögliche spezifische Signale durch unspezifische Bindungen der Sonde überlagert werden. Bereits bei den dargestellten Hybridisierungen (Abb. 3.1 und 3.2) mit den Stringenzbedingungen von 65-66% Homologie ist die unspezifische Bindung der Sonden deutlich sichtbar.

Da die Detektion eines postulierten Tryptophan-5-Halogenase-Gens in *S. rugosporus* nicht durch Hybridisierung mit heterologen Sonden gelang, wurde ein anderer Zugang gewählt.

In unserer Arbeitsgruppe wurden von TÖLZER (1998) aus vier Sequenzen bekannter Tryptophan-7-Halogenasen degenerierte Primer (*trpst+*/*trpst-*) entwickelt [TÖLZER, persönl. Mitteilung, 1998]. Die Primer wurden von den in Abb. 4.1 dargestellten Konsensusmotiven abgeleitet.

(270)	M/F S S G W T W E/K I P	(<i>trpst+</i>)
(350)	Y F I/V Y A A L Y Q	(<i>trpst-</i>)

Abb. 4.1: Konsensussequenzen für Tryptophanhalogenase-Primer *trpst+*/*trpst-*.

Die Zahlen in Klammern geben die Position des Sequenzmotivs in der Aminosäuresequenz an.

Dieses Primerpaar wurde u.a. erfolgreich bei der Detektion des Halogenasegens im Biosynthesegencluster von Rebeccamycin aus *L. aerocolonigenes* eingesetzt [SANCHÉZ *et al.*, 2002]. Aus Gesamt-DNA von *S. rugosporus* konnte mit diesen degenerierten Primern

(trpst+/trpst-) durch PCR-Experimente kein Amplifikat erhalten werden. Die Ursache dafür könnte eine Abweichung der Sequenz vom Konsensus sein, was eine ungenügende bzw. keine Primerbindung zuließe. Das konnte durch Sequenzvergleiche der Tryptophan-5-Halogenase mit den Konsensusmotiven bestätigt werden (siehe 4.3.4).

Da der Nachweis eines Tryptophan-5-Halogenase-Gens aus dem Pyrroindomycin-Produzenten *S. rugosporus* durch DNA-Hybridisierung mit heterologen Sonden, und auch die Amplifizierung mit degenerierten Primern nicht gelang, sollte versucht werden das Gen durch die Identifizierung des Biosyntheseclusters nachzuweisen.

4.2 Nachweis des Biosyntheseclusters der Pyrroindomycine in

Streptomyces rugosporus

Allgemein wird angenommen, dass die Gene für die Biosynthese von Antibiotika und Sekundärmetaboliten in *Streptomyces* in einer begrenzten Region des Genoms codiert sind. Die Biosynthese der Sekundärmetabolite erfolgt in mehreren Schritten aus Produkten des Primärstoffwechsels. Alle dafür notwendigen Enzyme sind in Strukturgenen eines Biosyntheseclusters codiert [FERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 1992].

In dieser Arbeit wurde versucht, durch Hybridisierung mit mehreren DNA-Sonden das Biosynthesecluster der Pyrroindomycine in *S. rugosporus* zu lokalisieren. Es wurde anhand der chemischen Struktur der Pyrroindomycine ein Biosynthesemodell entwickelt und daran einzelne Enzyme postuliert, die an der Biosynthese beteiligt sein könnten.

Die Pyrroindomycine bestehen aus drei Teilstrukturen, einem Indolpyrrolrest, einem Trisaccharid aus Desoxyzuckern und einem komplexen Makrozyklus (Abb. 4.2). Die Vorstufen für die Biosynthese der Pyrroindomycine stammen vermutlich aus drei verschiedenen Quellen des Primärstoffwechsels.

Für den Indolpyrrolrest der Pyrroindomycine wurde Tryptophan als Vorstufe postuliert [ABBANAT *et al.*, 1999]. Tryptophan stellt auch ein potenzielles Substrat für die Halogenierungsreaktion während der Bildung von Pyrroindomycin B dar.

In der Biosynthese von Pyrrolnitrin konnte Tryptophan als Vorstufe identifiziert werden [HAMILL *et al.*, 1967]. Im ersten Biosyntheseschritt wird Tryptophan durch eine FADH₂-abhängige Tryptophan-7-Halogenase chloriert [KIRNER *et al.*, 1998; KELLER *et al.*, 2000].

Für die Biosynthese von Rebecamycin in *L. aerocolonigenes* wird ebenfalls Tryptophan als Vorstufe und Substrat der Halogenierungsreaktion postuliert [SANCHEZ *et al.*, 2002].

Die Bestandteile des Trisaccharids in der Struktur der Pyrroindomycine sind 2,6-Didesoxyhexosen. Als Ausgangsverbindung für 6-Desoxyhexosen wird das im Primärstoffwechsel gebildete D-Glucose-1-phosphat betrachtet. Initiale Schritte der Biosynthese für 6-Desoxyhexosen sind in den verschiedenen Mikroorganismen scheinbar

identisch [LIU & THORSON 1994]. Im ersten Schritt wird D-Glucose-1-phosphat durch dNDP-D-Glucosesynthasen in dNDP-D-Glucose umgewandelt. Von der Mehrheit der Gram-positiven Mikroorganismen wird dTDP-D-Glucose für die Biosynthese verschiedener 6-Desoxyzuckern verwendet. In einer irreversiblen Redoxreaktion wird durch dNDP-D-Glucose-4,6-Dehydratasen aus dem Nukleotidylglucosid dNDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose gebildet [LIU & THORSON, 1994; TREFZER *et al.*, 1999]. Dieses Intermediat stellt die Schlüsselverbindung für die Biosynthese vieler ungewöhnlicher Kohlenhydrate dar [LIU & THORSON, 1994]. Die Epimerisierung der dNDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose durch 5-Epimerasen führt zur Bildung von 6-Desoxyzuckern der L-Form.

Für die Bildung der Zuckerbausteine der Pyrroindomycine in *S. rugosporus*, die 2,3,6-Tridesoxy-D-hexose, L-Mycarose und 4-Amino-2,4,6-tridesoxy-L-hexose, wurden analoge Biosyntheseschritte vermutet.

Das Modell für die Bildung der 2,3,6-Tridesoxy-D-hexose stützt sich auf den von WESTRICH *et al.* (1999) postulierten Biosyntheseweg für L-Rhodinose. Diese 2,3,6-Tridesoxyhexose wird von *S. cyanogenus* in der Biosynthese von Landomycin gebildet [WESTRICH *et al.*, 1999]. Die Bildung von L-Mycarose wurde in mehreren Arbeiten beschrieben [SUMMERS *et al.*, 1997; GAISSER *et al.*, 1998; BATE *et al.*, 2000]. Die C-Methylierung der Desoxyhexose wird durch eine SAM-abhängige C-Methyltransferase katalysiert [GAISSER *et al.*, 1998].

An der Bildung von Aminozuckern ist die Beteiligung von PMP/PLP-abhängigen Transaminasen vermutet worden [LIU & THORSON 1994]. Für verschiedene Aminozucker wurden Biosynthesemodelle entwickelt, z. B. für Desosamin (in Erythromycin, Oleandomycin), Forosamin (in Spinosin), Vancosamin (in Vancomycin) und Mycaminose (in Tylosin). In den Biosynthesegenclustern wurden Gene identifiziert, deren Genprodukte für die Bildung der Aminodesoxyzucker verantwortlich sein könnten [GAISSER *et al.*, 1998; AGUIRREZABALAGA *et al.*, 2000; WALDRON *et al.*, 2001; VAN WAGENINGEN *et al.*, 1998; GANDECHA *et al.*, 1997; TREFZER *et al.*, 1999]. Die Gene der Kohlenhydratbiosynthese aus den verschiedenen Clustern weisen hohe Übereinstimmungen auf. Vermutlich werden die Kohlenhydratbausteine in verschiedenen Mikroorganismen durch sehr ähnliche Biosynthesewege aufgebaut [AGUIRREZABALAGA *et al.*, 2000].

Der Makrozyklus der Pyrroindomycine besitzt Strukturanalogien zu außergewöhnlichen Polyketiden, wie den Avermectinen, Ascomycin (FK520) und den Spinosinen [IKEDA *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2000; WALDRON *et al.*, 2001] (Abb. 4.2).

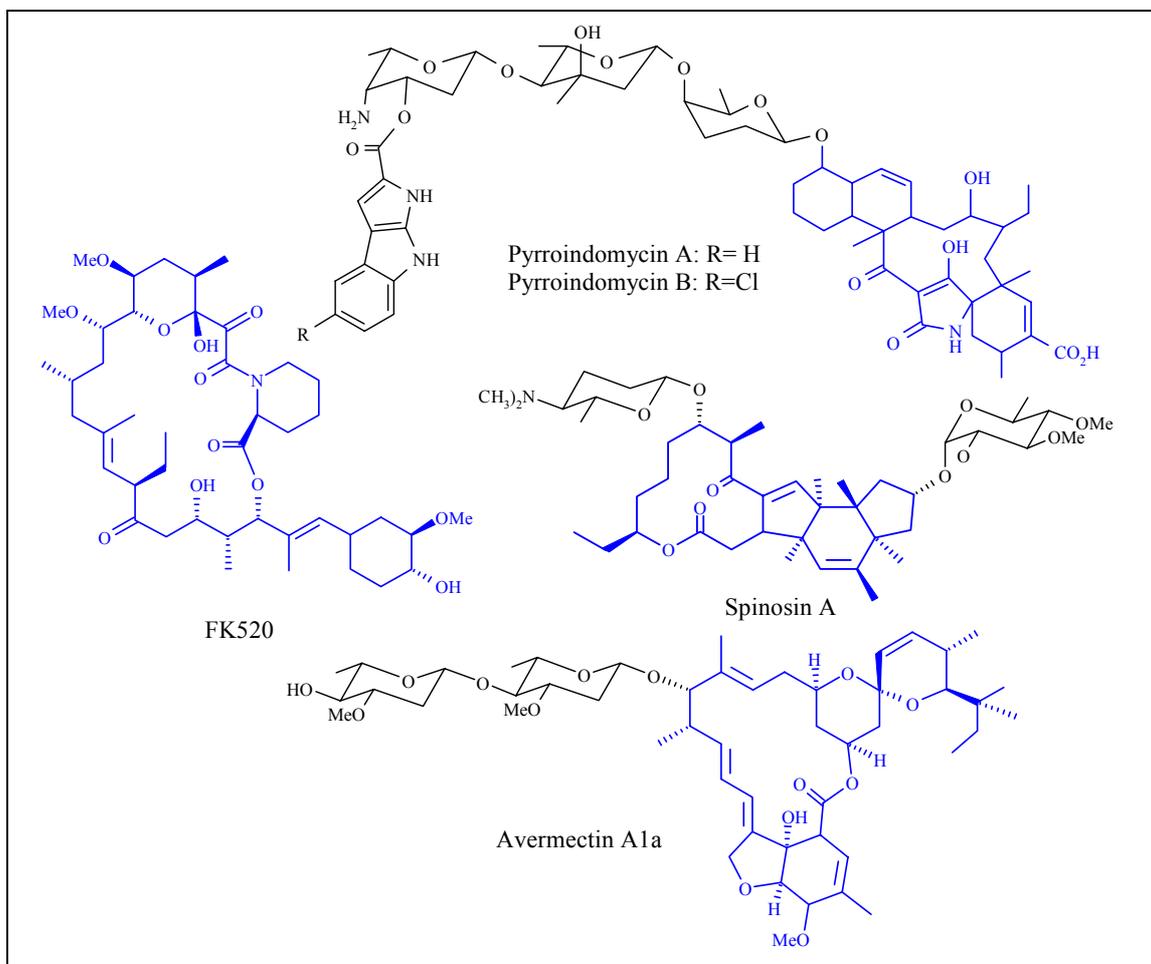


Abb. 4.2: Außergewöhnliche zyklische Polyketide.

Diese Strukturen werden durch Polyketidsynthasen (PKS-I) gebildet. Die Polyketidsynthasen vom Typ I sind modulare Multienzymkomplexe, in denen jedes Modul für die Übertragung einer Acyl-Einheit (*extender unit*) auf eine Startereinheit bzw. auf eine wachsende Acylkette verantwortlich ist [RAWLINGS, 2001]. Je nach Anzahl und Spezifität der Module werden unterschiedliche Polyketide gebildet. Die Polyketidsynthese des Typ I kann in jedem Schritt der Kettenverlängerung eine andere *extender unit* aus verzweigten und unverzweigten Acyl-Einheiten wählen, z.B. Malonyl-CoA (Rapamycin), Methylmalonyl-CoA (Erythromycin) und Ethylmalonyl-CoA (Tylosin). Die Auswahl der Startereinheit aus einer Reihe von Strukturen, wie z. B. Acetyl-CoA (Oleandomycin), Propionyl-CoA (Erythromycin) und Isobutyryl-CoA (Avermectin) führt zu weiteren Strukturvarianten [RUAN *et al.*, 1997a].

In dieser Arbeit wurde für die Biosynthese des Makrozyklus der Pyrroindomycine eine außergewöhnliche Startereinheit, in Analogie zur mC₇N-Startereinheit aus der Biosynthese von Rifamycin und Ansamitocin [AUGUST *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1998] postuliert. Desweiteren wurden Methyl- und Ethylmalonyleinheiten, sowie ein Malyleinheit als *extender unit* vermutet. Ein anderes Modell für die Biosynthese des Makrozyklus der Pyrroindomycine könnte die Kopplung einer PKS-I mit einer nichttribosomalen Peptidsynthetase beschreiben. Dadurch könnte in die Polyketidstruktur eine Aminacyl-CoA-Einheit eingebaut werden. Diese

Hybridenzyme wurden z. B. für die Biosynthese von Phenylamid und Myxalamid beschrieben [TROWITZSCH-KIENAST *et al.*, 1992; SILAKOWSKI *et al.*, 2001].

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in Actinomyceten mehrere Biosynthesegencluster für Sekundärmetaboliten existieren können [CHEN *et al.*, 1999; ZOTCHEV *et al.*, 2000]. In der Genomsequenz von *S. coelicolor* wurden mehr als 20 Biosynthesegencluster entdeckt. Darunter wurden mehrere PKS- und NRPS-Cluster identifiziert [BENTLEY *et al.*, 2002]. In *S. avermitilis* wurden durch die Sequenzierung des Genoms insgesamt 25 Biosynthesegencluster, darunter mehrere PKS-I-, PKS-II- und NRPS-Cluster, entdeckt [OMURA *et al.*, 2001].

Diese Erkenntnisse zeigen einen wichtigen Aspekt für die Suche nach einem „bestimmten“ Biosynthesegencluster. Durch eine Sonde könnten mehrere verschiedene Gencluster im Genom detektiert werden. Die Identifizierung des „richtigen“ Clusters wird dadurch erschwert. Deshalb sollten für die Detektion des gesuchten Clusters mehrere Sonden eingesetzt werden. Durch die Verwendung verschiedener Sonden zum Screening können innerhalb einer begrenzten Region des Genoms mehrere postulierte Strukturgene oder weitere Sequenzen des Biosynthesegencluster, wie z.B. ein Resistenzgen, nachgewiesen werden. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit, das gesuchte Gencluster zu identifizieren.

Zur Detektion des Biosynthesegenclusters von Simocyclinon D8 setzten TREFZER *et al.* (2002) drei verschiedene Sonden (PKS-I, GTF, GDH) zum ersten Screening einer Cosmidgenbank ein. Das Biosynthesegencluster von Rebeccamycin wurde durch Hybridisierung einer Genbank mit zwei homologen Sonden, einem N-Glycosyltransferase-Gen und einem Halogenase-Genfragment detektiert [SANCHÉZ *et al.*, 2002].

In dieser Arbeit wurde das Genom von *S. rugosporus* auf postulierte Biosynthesegene für die Pyrroindomycine untersucht. In PCR-Experimenten wurden Fragmente aus Gesamt-DNA mit Primern von dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Genen (GDH), Polyketidsynthase-Genen (PKS), Tryptophanhalogenase-Genen (Hal) und Glycosyltransferase-Genen (GTF) amplifiziert.

DECKER *et al.* (1996) stellten fest, dass in Mikroorganismen die notwendigen Gene für die Bildung von 6-Desoxyhexosen meist in Biosynthesegenclustern lokalisiert, und die Sequenzen von dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Genen aus verschiedenen Clustern sich sehr ähnlich sind. Mit den von DECKER *et al.* (1996) beschriebenen Oligonukleotiden für dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gene konnte ein Amplifikat aus Gesamt-DNA von *S. rugosporus* erhalten werden. Durch die direkte Sequenzierung des PCR-Produktes wurde eine Sequenz mit signifikanten Ähnlichkeiten (77-83%) zu bekannten dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Genen erhalten. Im Genom können mehrere solcher Gene vorliegen. Mit den verwendeten Primern

ist es aufgrund der Konservierung der Sequenzen möglich, dass Genfragmente mehrerer ähnlicher dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gene aus DNA von *S. rugosporus* amplifiziert wurden. Um die verschiedenen amplifizierten Genfragmente zu identifizieren, müsste man die PCR-Produkte klonieren und eine Reihe unabhängiger Klone sequenzieren.

Die Hybridisierung von Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* mit dem PCR-Fragment als Sonde („PCR-GDH“) zeigt mehrere Banden pro Restriktion. Das bedeutet, dass tatsächlich mehrere homologe Sequenzen, die für dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen codieren, im Genom von *S. rugosporus* vorhanden sind.

MALPARTIDA *et al.* (1987) beschreiben die Homologie von Polyketidsynthasen aus verschiedenen *Streptomyces*-Arten und zeigten die Nutzbarkeit dieser Gene für die Detektion und Klonierung von neuen Biosynthesegenclustern [MALPARTIDA *et al.*, 1987]. In den folgenden Jahren wurden mehrere degenerierte Oligonukleotide zur Detektion von PKS-Genen durch PCR beschrieben [KUCZEK *et al.*, 1997; METSÄ-KETELÄ *et al.*, 1999].

Spezifische Primer für PKS-I-Gene wurden aus den konservierten Motiven der Ketosynthase-Domänen (DTACSS und HANTGS) verschiedener PKS-Gene entwickelt [TSANTRIZOS, persönl. Mitteilung von SANCHEZ, 2001]. Mit diesen Oligonukleotiden konnte ein Amplifikat von Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* erhalten werden. In einem PKS-Gencluster sind mehrere Module mit jeweils einer Ketosynthase-Domäne enthalten. Die Länge der Ketosynthase-Domänen ist annähernd gleich. Darum ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem Amplifikat um mehrere Fragmente gleicher Länge aus verschiedenen Modulen handelt. Die Klonierung des Amplifikats und die Sequenzierung der erhaltenen Klone bestätigte diese Vermutung. Es wurden drei verschiedene Sequenzen aus zehn Klonen erhalten. Alle Sequenzen weisen signifikanten Ähnlichkeiten (79-84%) zu bekannten Sequenzen von Typ-I-Polyketidsynthasen auf. Die Hybridisierung von Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* mit den PCR-Fragmenten „PCR-PKS“ als Sonde zeigte mehrere Hybridisierungssignale. Im Genom von *S. rugosporus* sind vermutlich mehrere homologe Sequenzen vorhanden.

Zur Klonierung der vollständigen Gene und zur Detektion des Biosynthesegenclusters für die Pyrroindomycine wurde eine Cosmidgenbank von *S. rugosporus* im Vektor pOJ446 angelegt. Dieser Vektor ist bifunktionell replikativ für *E. coli* und *Streptomyces*. Zur Lokalisierung des Biosynthesegenclusters auf den Genomfragmenten wurden 3300 Cosmide untersucht. Die PCR-Fragmente „PCR-GDH“ und „PCR-PKS“ wurden als homologe DNA-Sonden verwendet.

Es wurden mehrere Cosmide detektiert, wobei kein Cosmid mit beiden Sonden („PCR-GDH“ und „PCR-PKS“) hybridisierte. Die Cosmide wurden durch Restriktion analysiert. Es wurde keine Überlappung der Cosmide festgestellt. Die Cosmide wurden für die weiteren Arbeiten

in zwei Gruppen eingeteilt, die PKS-positiven Cosmide (**ID2**, **7E3**, **8G2**, **29H5**, **63A1**) (3.5.1.2) und die GDH-positiven Cosmide (**26D4**, **40E5**) (3.5.1.1).

Die Beobachtung, dass sich die Gene für dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen und PKS nicht auf einem Cosmid, oder auf benachbarten Cosmiden, befinden, ist nicht außergewöhnlich. Häufig ist ein Cluster größer als das Insert eines Cosmides. Für das Biosynthesegencluster von Simocyclinon D8 wurden 51 kb überlappend sequenziert, und nicht alle Gene des Clusters sind in dieser Region enthalten [GALM *et al.*, 2002]. Das Cluster für Simocyclinon D8 wurde erst in einer 80 kb Sequenz vollständig detektiert [TREFZER *et al.*, 2002].

In Abhängigkeit von der Komplexität der Struktur einer Verbindung wird die Größe des Genclusters vermutet. Das Cluster für Pyrrolnitrin ist innerhalb einer 6,2 kb Region codiert [HAMMER *et al.*, 1997], während das Biosynthesegencluster für Chloreremomycin ca. 38 kb groß ist [VAN WAGENINGEN *et al.*, 1998].

Aus dem GDH-positiven Cosmid **26D4** wurden zwei benachbarte Fragmente, die einen Bereich von 5,2 kb überspannen, subkloniert und sequenziert. In diesem Bereich wurden vier potenzielle offene Leserahmen (ORF1-4) identifiziert (3.6.2).

Die Genprodukte von ORF1, ORF2 und ORF3 zeigen signifikante Ähnlichkeiten zu Enzymen die an primären Schritten der Biosynthese von 6-Desoxyzuckern beteiligt sind.

Die Genprodukte von ORF1 und ORF2 weisen hohe Sequenzidentität zu bekannten dNDP-Glucosesynthasen und dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen auf. Diese Enzyme sind in den Biosynthesen von 6-Desoxyzucker konserviert [AGUIRREZABALAGA *et al.*, 2000].

Die Proteinsequenz von ORF3 weist deutliche Ähnlichkeiten mit Sequenzen potenzieller 4-Ketoreduktasen auf. In mehreren Arbeiten wurde durch Inaktivierungsexperimente gezeigt, dass die Gene von dNDP-Glucosesynthasen, dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen und 4-Ketoreduktasen verantwortlich für die Biosynthese verschiedener 6-Desoxyhexosen sind [z.B. GAISSER *et al.*, 1997b; LOMBÓ *et al.*, 1997]. Ein eindeutiger Nachweis für die Funktion solcher Genprodukte gelang AGUIRREZABALAGA *et al.* (2000) für die dNDP-Glucosesynthase (*oleS*), dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase (*oleE*), 3,5-Epimerase (*oleL*), 2,3-Dehydratase (*oleV*), 3-Ketoreduktase (*oleW*), 3-O-Methyltransferase (*oleY*) und die 4-Ketoreduktase (*oleU*). Die Proteine wurden gemeinsam heterolog exprimiert, und die Bildung der Desoxyzucker, D-Oleandrose und D-Olivose, nachgewiesen [AGUIRREZABALAGA *et al.*, 2000].

Aufgrund der deutlichen Sequenzhomologien und der hohen Konservierung solcher Gene in verschiedenen Organismen wird vermutet, dass die Genprodukte für ORF1, ORF2 und ORF3 für die ersten Schritte der Biosynthese von 6-Desoxyhexosen in *S. rugosporus* verantwortlich sind. Die 6-Desoxyhexosen wurden als Vorstufen des Trisaccharids im Rückgrat der Pyrroindomycine vermutet. Die Genprodukte von ORF1, ORF2, und ORF3 könnten also an der Biosynthese der Pyrroindomycine beteiligt sein.

Das Startcodon für den ORF4 befindet sich ca. 1000 bp entfernt vom Stopcodon des ORF3. Das Produkt des vierten offenen Leserahmens weist Ähnlichkeiten zu UDP-N-Acetyl-D-Mannosamintransferasen aus sehr unterschiedlichen Mikroorganismen auf. Solche Proteine können auch an der Biosynthese von Zellwandbestandteilen beteiligt sein. Anhand dieser Sequenzähnlichkeiten kann dem Genprodukt des ORF4 keine Funktion in der Biosynthese der Pyrroindomycine zugeordnet werden. Der Abstand von ca. 1000 bp zwischen ORF4 und den ORFs1-3 könnte ein Hinweis sein, dass ORF4 nicht in einem funktionellen Zusammenhang mit den Genen der ORFs 1-3 steht. Die Beteiligung der detektierten ORFs an der Biosynthese der Pyrroindomycine oder an der Bildung der Zellwand kann nicht ausgeschlossen werden. Eine eindeutige Zuordnung zu Primär- oder Sekundärstoffwechsel könnte durch eine gezielte Mutation in dieser Region erbracht werden.

Für die Biosynthesegencluster von Erythromycin und Spinosyn wurde berichtet, dass weder das Gen für das Glucose-1-phosphat-aktivierende Enzym, die dNDP-Glucosesynthase, noch das Gen einer dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase, im Cluster nachgewiesen werden konnten [GAISSER *et al.* 1997a; SUMMERS *et al.*, 1997; WALDRON *et al.*, 2001]. Beide Enzyme werden aber für die vollständige Biosynthese von Erythromycin und Spinosyn benötigt. Im Biosynthesegencluster von Daunorubicin ist das potenzielle Gen für die dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase sogar durch eine *frameshift* Mutation inaktiviert [GALLO *et al.*, 1996].

Für *S. spinosa* wie für *S. erythraea* wurde jeweils nur eine Region im Genom detektiert, die Gene für die fundamentalen Schritte der Desoxyzuckerbiosynthese enthalten [LINTON *et al.*, 1995; MADDURI *et al.*, 2001b]. Für die Mutation des dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gens in *S. erythraea* konnten keine Mutanten erhalten werden [LINTON *et al.*, 1995]. Es wurde vermutet, dass diese Mutation lebenswichtige Funktionen der Zellen beeinflusst. Die Mutation des gleichen Gens in *S. spinosa* führte zu einer deutlichen Veränderung der Zellmorphologie [MADDURI *et al.*, 2001b]. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass die Intermediate für die Bildung modifizierter Kohlenhydrate aus einem zellulären Pool stammen könnten. Die Enzyme für die Biosynthese der 6-Desoxyzucker hätten die zentrale Funktion, die Zelle mit Intermediaten für den Primär- und den Sekundärstoffwechsel zu versorgen [MADDURI *et al.*, 2001b; LINTON *et al.*, 1995]. Die Annahme, dass die Biosynthesegene für 6-Desoxyzucker in den Clustern für Sekundärmetabolite konserviert sind, ist deshalb nur eingeschränkt gültig.

In *S. rugosporus* existieren vermutlich mehrere homologe Gene für dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen, da bei der Hybridisierung von Gesamt-DNA mit der Sonde „PCR-GDH“ mehrere Banden detektiert wurden. Die Detektion dieser Gene ist somit kein ausreichender Hinweis für die Lokalisierung des Biosynthesegenclusters.

Mit der homologen PCR-Sonde „PCR-PKS“ wurden mehrere Cosmide in der Genbank von *S. rugosporus* detektiert. Die Sequenzen aus diesen Cosmiden besitzen hohe Identität (>70 %) mit bekannten modularen Polyketidsynthasen, wie z.B. mit der Avermectin-Polyketidsynthase (AVES) aus *S. avermitilis* [IKEDA *et al.*, 1999]. Aufgrund der deutlichen Ähnlichkeit dieser Sequenzen mit bekannten PKS-I-Genen aus Datenbanken wurde vermutet, dass auf den detektierten Cosmiden die Gene für die Bildung von Polyketiden codiert sind. Es ist möglich, dass sich auch Teile des Genclusters für die Pyrroindomycine auf diesen Cosmiden befinden (da PKS-I-Gene für die Biosynthese postuliert wurden, siehe 4.2).

Die Restriktionsanalyse der PKS-positiven Cosmide zeigte, dass diese aus unterschiedlichen Regionen des Genoms von *S. rugosporus* stammen. Das Vorkommen mehrerer verschiedener PKS-Cluster in einer Spezies kann nicht ausgeschlossen werden. So sind für den Rapamycinproduzenten *S. hygroscopicus* ATCC 29253 zwei PKS-I-Gencluster beschrieben [SCHWECKE *et al.*, 1995; RUAN *et al.* 1997b]. In *S. noursei* ATCC 11455 wurden ebenfalls zwei unabhängige PKS-I-Gencluster detektiert [ZOTCHEV *et al.*, 2000; BRAUTASET *et al.*, 2000]. Im Genom von *S. avermitilis* wurden durch Sequenzierung sogar acht Gencluster für Typ-I-Polyketide entdeckt [OMURA *et al.*, 2001]. Die PKS-Cosmide könnten also für mehr als ein PKS-I-Gencluster codieren. Durch eine Mutation in den einzelnen PKS-Cosmiden könnte man die gesuchte PKS-I-Region für die Biosynthese der Pyrroindomycine aus dem Genom von *S. rugosporus* identifizieren.

Da die Detektion des Biosynthesegenclusters für die Pyrroindomycine noch zweifelhaft war, wurde nochmals ein direkter Ansatz für die Detektion des postulierten Tryptophan-5-Halogenase-Gens gewählt.

Inzwischen waren eine Reihe weiterer Tryptophanhalogenase-Sequenzen bekannt. Das ermöglichte die Entwicklung neuer Primer für die PCR. Es wurden Sequenzalignments erstellt und daraus vier konservierte Motive zum Primerdesign verwendet (Abb. 4.3).

(45)	G V G E A T I / V P	(SZ002)
(12)	G G G T A G W M	(SZ003)
(270)	G W T W K I P M	(SZ004)
(215)	D L F I / V D C S G	(SZ005)

Abb. 4.3: Konsensussequenzen für die Tryptophanhalogenase-Primer SZ002-SZ005. Die Zahlen in Klammern geben die Position des Sequenzmotivs in der Aminosäuresequenz an.

Die speziell für GC-reiche Sequenzen entwickelten Primer wurden zur Amplifizierung auf Gesamt-DNA aus *S. rugosporus* in vier Kombinationen eingesetzt. Für die Primerkombinationen mit dem Primer SZ004 ist die Amplifizierung behindert. Dieses

Konsensusmotiv wurde vormals auch für die Entwicklung des Primers trpst+ verwendet. Dieses Motiv ist in der Sequenz der Tryptophan-5-Halogenase nicht streng konserviert (siehe 4.3.4). Aufgrund der Abweichung vom Konsensusmotiv, war die PCR mit den Primern trpst+/trpst- nicht möglich und mit den Primerkombinationen mit SZ004 deutlich eingeschränkt. Zwei Primerkombinationen (SZ002/SZ005 und SZ003/SZ005) führten zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus *S.rugosporus*. Ein Amplifikat (SZ002-SZ005) wurde sequenziert. Die postulierte Aminosäuresequenz zeigt im Vergleich mit Sequenzdatenbanken signifikante Ähnlichkeiten (46-53%) zu bekannten Tryptophanhalogenasen.

Damit ist es gelungen, ein neues Gen vom Typ der Tryptophanhalogenasegene mittels PCR nachzuweisen. Die dafür entwickelten Primer stellen ein geeignetes Werkzeug zur Detektion weiterer Tryptophanhalogenase-Gene dar. Bei der Anwendung auf Organismen mit niedrigem GC-Gehalt und abweichender *codon usage* müssten diese Primer jedoch überarbeitet werden. Kürzlich wurde von PIRAE & VINING (2002) ebenfalls die Detektion von Halogenasegenen mittels PCR in verschiedenen *Streptomyces* sp. beschrieben [PIRAEE & VINING, 2002]. Die von PIRAEE verwendeten Primer wurden aus dem zweiten Typ der Halogenasesequenzen, den sogenannten Phenyl/ Pyrrol-halogenierenden Halogenasen, abgeleitet.

In „touch-down“-PCR-Experimenten wurde die Alkylhalidase aus der Biosynthese des Chloramphenicols in *S. venezuelae* detektiert [PIRAEE & VINING, 2002]. Frühere Versuche, das Halogenase-Gen im Chloramphenicolproduzenten *S. venezuelae* durch DNA-Hybridisierungen zu detektieren, waren fehlgeschlagen [GROB, 1998].

Die PCR stellt auch für Halogenasegene eine geeignete Methode zum Nachweis von homologen Sequenzen in unterschiedlichen Spezies dar.

Das Tryptophanhalogenase-PCR-Fragment wurde als homologe DNA-Sonde für das Screening der Cosmidgenbank aus *S. rugosporus* eingesetzt. In der Cosmidgenbank wurden fünf positive Cosmide detektiert. Durch Restriktions- und Hybridisierungsanalysen wurde das potenzielle Tryptophanhalogenase-Gen auf dem Cosmid **6C1** in einem 4,3 kb *Bam*HI-Fragment lokalisiert.

Dieses *Bam*HI-Fragment ist in den Cosmiden **6C1**, **12D4**, **31G3** und **48E6** enthalten. Auf dem Cosmid **25F5** wurde ein größeres Fragment detektiert (siehe 3.5.1.3). Dieses Cosmid weist ein verändertes Hybridisierungsmuster gegenüber Gesamt-DNA von *S. rugosporus* auf. Es wird vermutet, dass während der Konstruktion der Cosmidgenbank eine Rekombination zwischen zwei Fragmenten stattgefunden hat, die im Genom von *S. rugosporus* nicht benachbart sind. Aus diesem Grund wurde das Cosmid **25F5** nicht weiter untersucht.

Die Cosmide **12D4**, **31G3** und **48E6** zeigen im SOUTHERN Blot zusätzlich deutliche Hybridisierungssignale mit der Sonde „PCR-PKS“. Diese Sonde war durch die Präparation mit Vektor-DNA verunreinigt, deshalb zeigen Restriktionsfragmente, die eindeutig dem Vektor zugeordnet werden können ebenfalls Hybridisierungssignale. Das wurde mittels Hybridisierung des gleichen Blots mit markierter Vektor-DNA verifiziert. Die detektierten Banden für potenzielle PKS-Gene und das potenzielle Tryptophanhalogenase-Gen konnten in einer Restriktionskarte der Cosmide benachbarten *Bam*HI-Fragmenten zugeordnet werden. Die Sequenzierung mehrerer Zufallssubklone (pSZ12Sal) aus dem Cosmid **12D4** ergab DNA-Sequenzen für postulierte Strukturgene des Biosynthesegenclusters. Auf dem Cosmid **12D4** wurden Sequenzen für potenzielle PKS-Gene und ein potenzielles dNDP-Hexose-3,4-Dehydratase-Gen identifiziert. Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich auf den detektierten Cosmiden weitere Gene des Biosynthesegenclusters der Pyrroindomycine befinden.

Die ~2,5 kb Region des Tryptophan-5-Halogenase-Gens wurde mehrfach doppelsträngig sequenziert (Diskussion der Sequenz in 4.3).

In einem Versuch wurde das Cosmid **12D4** in *S. albus* transformiert. Es sollte untersucht werden, ob durch die Expression der auf dem Cosmid enthaltenen Gene in *S. albus* neue Metaboliten gebildet werden. SANCHEZ *et al.* (2002) konnten durch die Expression der Biosynthesegene für Rebeccamycin aus *L. aerocolonigenes* die Bildung von Rebeccamycin in *S. albus* nachweisen.

Durch die Transformation mit dem Cosmid **12D4** wurde *S. albus* offenbar befähigt eine neue Verbindung zu produzieren. Die Transformanden hatten nicht wie der Wildtyp eine hellgraue Färbung, sondern zeigten eine rotviolette Färbung. Im Zellextrakt von *S. albus* SZ12D4 konnten zwei neue Verbindungen durch HPLC-Analyse nachgewiesen werden (3.8). Im Chromatogramm wurden zwei Peaks detektiert, die ein typisches UV-Spektrum von Indolderivaten aufweisen. Die im HPLC-Chromatogramm später eluierende Verbindung zeigt neben der Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 220 nm und 278 nm für Indolderivate Absorptionsmaxima bei 358 nm und 533 nm. Die Absorption im sichtbaren Wellenlängenbereich bei 533 nm (grünes Licht) ist verantwortlich für die Färbung der Verbindung (sichtbare Komplementärfarbe: Purpur). Bei den detektierten Verbindungen könnte es sich um Intermediate der Pyrroindomycinbiosynthese handeln. Die Absorptionen bei 358 nm und 533 nm sind Hinweise auf ein konjugiertes System in der Struktur der Verbindung. Ein Intermediat des Makrozyklus der Pyrroindomycine könnte diese Eigenschaft besitzen. Die Isolierung der Produkte aus dem Zellextrakt von *S. albus* SZ12D4 und die Strukturaufklärung könnten diese Vermutung bestätigen.

Diese Ergebnisse sind Hinweise, dass auf diesen Cosmiden mindestens ein Teil des Biosynthesegenclusters codiert ist. Die Detektion eines Biosynthesegenclusters wird aber erst durch den funktionellen Nachweis belegt. Meist wird dieser Nachweis durch die Einführung einer zielgerichtete Mutation in einen DNA-Abschnitt des postulierten Clusters erbracht [GALM *et al.*, 2002; PELZER *et al.*, 1999]. Die Methode der *site-directed*-Mutagenese wurde von RUVKKUN & AUSUBEL (1981) für Gram-negative Bakterien entwickelt. Sie konstruierten Insertionsmutationen in den Genen der Stickstofffixierung (*nif*) aus *Rhizobium meliloti* [RUVKKUN & AUSUBEL, 1981]. In Hefezellen konnte diese Methode zur *gene disruption* des Actin-Gens eingesetzt werden [SHORTLE *et al.*, 1982]. Erstmals wurden spezifische Mutationen durch *gene replacement* in Streptomyceten für den Nachweis der Biosynthese von Methylenomycin A hergestellt [CHATER & BRUTON, 1983].

Die spezifische Mutation soll die Biosynthese des Sekundärmetaboliten beeinflussen. Durch die Analyse des Metabolitenmusters der Mutante wird der Einfluss der Mutation untersucht. Wenn essentielle oder frühe Schritte der Biosynthese durch die Mutation ausgeschaltet werden, führt das zum vollständigen Abbruch der Produktion des Sekundärmetaboliten [z.B. GAISSER *et al.*, 1997a]. Betrifft die Mutation die Gene für die Modifikation eines Grundgerüsts, u.a. Glykosyltransferasen, Methyltransferasen und Halogenasen, werden meist neue Produkte bzw. Intermediate gebildet [OLANO *et al.*, 1998; WEITNAUER *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2002].

In dieser Arbeit wurde eine Mutation im postulierten Tryptophanhalogenase-Gen erzeugt. In der Biosynthese von Balhimycin, Ansamitocin und Avilamycin führte das Ausschalten der Aktivität durch genetische Inaktivierung des Halogenase-Gens zur Produktion des unhalogenierten Metaboliten [PUK *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2002; WEITNAUER *et al.*, 2001].

Es wurde eine Transformationsmethode erarbeitet, welche die Einführung von Mutationen in das Genom von *S. rugosporus* ermöglicht. Der Stamm bildet nur eine geringe Zahl Protoplasten. Die Effektivität der Protoplastentransformation für *S. rugosporus* ist zu niedrig, um sie für die Erzeugung von *gene replacement* Mutationen einsetzen zu können. Durch intergenerische Konjugation zwischen *E. coli* und *S. rugosporus* konnte der Stamm mit konjugierbaren Vektoren gut genetisch modifiziert werden. Als Beweis für die Aufnahme von DNA in die Zellen wurde in den Stamm *S. rugosporus* der Vektor pSET152 eingebracht. Dieser Vektor ist konjugierbar und integriert spezifisch in die *attachment site* attP des Phagen Φ C31. Es konnte eine stabile Integration des Vektors pSET152 in *S. rugosporus* nachgewiesen werden (*S. rugosporus* pSET152).

Zum Nachweis der Beteiligung an der Biosynthese von Pyrroindomycin B wurde das Gen der Tryptophan-5-Halogenase durch eine *gene-replacement*-Mutation inaktiviert. In den Leserahmen des Tryptophanhalogenase-Gens wurde eine Apramycinresistenzkassette kloniert

und durch homologe Rekombination ins Genom von *S. rugosporus* integriert. Es wurden 24 Klone, die den Phänotyp Tsr^R, Apr^R aufwiesen, erhalten. Nach der Züchtung der Klone ohne Selektion auf Thiostrepton wurde eine Mutante mit dem Phänotyp Tsr^S, Apr^R isoliert. Dieser Phänotyp wurde für Mutanten mit der gewünschten Integration des Konstruktes ins Genom von *S. rugosporus* erwartet. Der Genotyp in dieser Mutante wurde durch PCR und DNA-Hybridisierung analysiert. Die Mutante *S. rugosporus* SZTF1Hal (*pyrH*) trägt eine korrekt integrierte *gene-replacement*-Mutation im Tryptophan-5-Halogenase-Gen *pyrH*. Sie ist Ergebnis eines *double-crossover*-Ereignisses durch homologe Rekombination zwischen Genom und Mutationsplasmid.

Anhand der gebildeten Metaboliten wurde der Einfluss der Mutation in *pyrH* auf die Biosynthese der Pyrroindomycine bestätigt. Im Wildstamm wird hauptsächlich das chlorierte Produkt Pyrroindomycin B produziert. Pyrroindomycin A wird vom Wildtyp nur als Nebenprodukt in geringer Menge gebildet. Von der *pyrH*-Mutante wird nur die unchlorierte Verbindung Pyrroindomycin A gebildet. Durch HPLC/MS konnten kein Pyrroindomycin B oder ähnliche chlorierte Verbindungen nachgewiesen werden. Durch die Mutation konnte die Funktion des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *in vivo* gezeigt werden. Das Gen codiert für ein halogenierendes Enzym in der Biosynthese der Pyrroindomycine. Die Bildung von Pyrroindomycin A durch die Mutante ist ein Hinweis, dass die Mutation keinen Einfluss auf weitere Gene der Biosynthese hatte. Mögliche polare Effekte durch die Insertion des Apramycinresistenzgenes in das Tryptophan-5-Halogenase-Gen können ausgeschlossen werden. Die Halogenierungsreaktion ist scheinbar kein essentieller Schritt zur Bildung der Grundstruktur der Pyrroindomycine. Ähnliche Beobachtungen beschrieben PUK *et al.* (2002) in Untersuchungen zur Biosynthese von Balhimycin. Die Mutation im Halogenase-Gen (*bhaA*) führte zur Bildung der unhalogenierten Verbindung PH1377 durch die entsprechenden Mutante [PUK *et al.*, 2002].

In der unmittelbaren Umgebung des Tryptophan-5-Halogenase-Gens kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere Gene des Biosynthesegenclusters der Pyrroindomycine auffinden. Die in der Literatur beschriebenen Biosynthesegencluster von Halometaboliten enthielten stets die entsprechenden Halogenasegene für die Biosynthese. Beispiele dafür sind die Halogenasen von Balhimycin, Rebeccamycin und Clorobiocin [PELZER *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2002; POJER *et al.*, 2002].

4.3 Sequenzanalyse des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH*

4.3.1 Ribosomenbindestelle, Translationsstart und Translationsstop

Das Gen der Tryptophan-5-Halogenase aus *S. rugosporus* wurde in einem 4,3 kb-*Bam*HI-Fragment nachgewiesen. Die Sequenzierung einer 2,5 kb-Region aus diesem *Bam*HI-Fragment ergab die Detektion eines vollständigen ORFs.

Die Zuordnung des Start- und Stopcodons für diesen offenen Leserahmen erfolgte anhand von vier Beobachtungen:

- Die Analyse der Sequenz auf potenzielle Startcodons (ATG, GTG), Stopcodons und offene Leserahmen mit dem Programm Frameplot V. 2.3.2. (Abb. 3.26)
- Die Berechnung des GC-Gehalts in der *wobble position* der möglichen Leserrahmen mit dem Programm Frameplot V. 2.3.2. (Abb. 3.26)
- Die Identifizierung einer potenziellen Ribosomenbindestelle vor dem Startcodon des Tryptophan-5-Halogenase-Gens.
- Der Sequenzvergleich mit bekannten Tryptophanhalogenasen aus Datenbanken. Die Betrachtung der Sequenzlänge und Abstände der konservierten Motive von Start und Stopcodon (Abb. 3.28).

In der Sequenzanalyse mit dem Programm Frameplot (Abb. 3.26) wurde im ersten Leserahmen ein ORF mit potenziellem Startcodon (ATG) bei nt 700 und Stopcodon (TGA) bei nt 2299 detektiert. Wenige Nukleotide nach dem ersten potenziellen Startcodon (nt 700) sind zwei weitere potenzielle Startcodons (nt 763; nt 809) vorhanden.

Der GC-Gehalt in der dritten Base des Aminosäurecodons ist im Leserahmen über 95 %. Vor Beginn und nach Ende des Leserahmens liegt der GC-Gehalt der DNA deutlich niedriger als 70 %. Diese Eigenschaft zur Identifizierung codierender Sequenzabschnitte wurde von BIBB *et al.* (1984) beschrieben.

Von SHINE & DALGARNO (1974) wurde vermutet, dass die Sequenz 5'-G-G-A-G-G-U-3', für die Bindung des Ribosoms und die Initiierung der Translation einer mRNA in *E. coli* benötigt wird. Sie entspricht der komplementären Sequenz 5'-A-C-C-U-C-C-3' am 3'-Terminus der 16S rRNA [SHINE & DALGARNO, 1974]. Am 3'-Terminus der 16S rRNA aus *S. lividans* wurde von BIBB & COHEN (1982) die Sequenz 5'-A-C-C-U-C-C-U-U-U-C-U-3' gefunden. Es wurde vermutet, dass diese Sequenz in *Streptomyces* für die Bindung der Ribosomen an die mRNA verantwortlich ist.

Vor den möglichen Startcodons des Tryptophan-5-Halogenase-Gens wurde nach homologen Sequenzen, die als Ribosomenbindestellen agieren könnten, gesucht (Abb. 4.4).

661	TTAGCACTGGGTTAGCCGTACTTAAGCAGCAGGAGAACC ATG GAAAGGCCGAAGCGTGAG	720
721	CGTCTTGGCTCACTCGGCCGACCGACCAAAAAGGAGCTCCGC ATG ATCCGATCTGTGGTG	780
781	ATCGTGGGTGGTGGCACGGCGGGCTGG ATG ACCGCCTCTACCTCAAGGCCGCCTTCGAC	840

Abb. 4.4: Sequenzanalyse der Region mit möglichen Startcodons.

Sechs Nukleotide vor dem zweiten Startcodon (nt 763) wurde eine Sequenz identifiziert, die hohen Anteil an Basenpaarung mit der Sequenz der 16S rRNA aus *S. lividans* zulässt (Abb. 4.5).

<i>pyrH</i> aus <i>S. rugosporus</i> : (nt 749)	5'	A-a-A-A-A-G-G-A-G-c-T	3'
16S rRNA aus <i>S. lividans</i> :	3'	-U-C-U-U-U-C-C-U-C-C-A-	5'
SHINE-DALGARNO-Sequenz aus <i>E. coli</i> :	3'	-C-C-U-C-C-A-	5'

Abb. 4.5: Potenzielle Ribosomenbindestelle des detektierten Leserahmens.

Darstellung möglicher Basenpaarungen mit 16S rRNA aus *S. lividans*.

Für die potenzielle Ribosomenbindestelle des Tryptophan-5-Halogenase-Gens aus *S. rugosporus* ist eine Abweichung von der 16S rRNA-Sequenz aus *S. lividans* in zwei Nukleotiden festzustellen. Solche Sequenzabweichungen wurden auch bei anderen Genen aus *Streptomyces* sp. festgestellt [STROHL, 1992].

Die potenzielle Sequenz von PyrH wurde mit bekannten Tryptophanhalogenase-Sequenzen verglichen (Abb. 3.22). Die Sequenzähnlichkeiten der PyrH mit der Tryptophan-7-Halogenase aus *P. fluorescens* begannen beim zweiten Startcodon (nt 763). Für die Tryptophan-7-Halogenase aus *P. fluorescens* wurde durch die Expression unterschiedlich großer Konstrukte der minimale funktionelle Leserahmen identifiziert [HAMMER *et al.*, 1997]. Anhand der Beobachtungen wurde für den ORF der Tryptophan-5-Halogenase der Start bei nt 763 festgelegt.

Der Leserahmen besitzt ein TGA als Stopcodon nach 1533 Nukleotiden. Der Leserahmen beginnt bei nt 763 und endet bei nt 2299 und codiert für ein Protein mit einer Länge von 511 Aminosäuren. Mit dieser Länge liegt die Proteinsequenz gut im Bereich der Länge bekannter FADH₂-abhängiger Halogenasen [HAMMER *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2002; PIRAE, 2002].

4.3.2 GC-Gehalt und *codon usage*

In *Streptomyces* sp. wird allgemein ein GC-Gehalt der DNA zwischen 70-73 % beobachtet [WRIGHT & BIBB, 1992]. Der GC-Gehalt der Sequenz von *pyrH* liegt bei 68,3 %.

BIBB *et al.* (1984) zeigten, dass die Basenzusammensetzung einer Sequenz und die *codon usage* in *Streptomyces* sp. korreliert. Sie zeigten, dass codierende Sequenzen eine typische Basenverteilung in den einzelnen Positionen der Basentriplets aufweisen. Anhand des GC-Gehaltes einer DNA-Sequenz kann man so codierende Abschnitte identifizieren [BIBB *et al.*, 1984]. Im Leserahmen für *pyrH* liegt der GC-Gehalt in der ersten Position bei 64,3 % , in der zweiten Position bei 44,1 % und in der dritten Position des Aminosäurecodons bei 96,4 %. Diese Basenverteilung entspricht den Beobachtungen von BIBB *et al.* (1984) für codierende Sequenzen in Streptomyceten.

In der Sequenz von *pyrH* wurden nicht alle möglichen Basentriplets synonym für die Codierung der Aminosäuren verwendet. Von den 64 Codons wurden 22 nicht verwendet und 13 nur selten (ein- bis dreimal). Es wurde vermutet, dass die Einschränkung der *codon usage* Einfluss auf die Genexpression haben könnte [BIBB *et al.*, 1984; WRIGHT & BIBB, 1992]. Die Expression eines Proteins könnte so auch durch die relative Verfügbarkeit von tRNA-Spezies in der Zelle reguliert werden [WRIGHT & BIBB, 1992].

4.3.3 Aminosäuresequenz der Tryptophan-5-Halogenase PyrH

Die Nukleotidsequenz des identifizierten Leserahmens wurde in eine theoretische Proteinsequenz übersetzt. Die postulierte Proteinsequenz hat eine Länge von 511 Aminosäuren und das Protein ein theoretisches Molekulargewicht von M_W : 58147.

Durch Strukturanalysen zum Nachweis konservierter Domänen wurden im Protein PyrH am NH_2 -Terminus deutliche Übereinstimmungen mit charakterisierten Flavin-bindenden Proteinen [WIERENGA *et al.*, 1986] festgestellt. In diesem Bereich weisen die Proteine den „ADP-binding $\beta\beta$ -fold“ auf, an dem die Bindung des Flavin-Cofaktors an das Protein erfolgt [ROSSMANN *et al.*, 1974; WIERENGA *et al.*, 1985; WIERENGA *et al.*, 1986]. Für PyrH wurde anhand der Aminosäuresequenz eine typische $\beta\beta$ -Faltung berechnet.

Ein weiteres Motiv wurde von EGGINK *et al.* (1990) beschrieben. Das „GD-Motiv“ wird für die Bindung des Cofaktors über Wasserstoffbrücken zwischen einem Asparaginsäurerest und der 3'-OH-Gruppe des Ribosylrestes im Nukleotidcofaktor verantwortlich gemacht. Bei Aminosäure 298 enthält die Sequenz der Tryptophan-5-Halogenase eine Asparaginsäure, die ebenfalls an der Bindung eines Flavin-Cofaktoren beteiligt sein könnte. Dieser Asparaginsäurerest könnte Teil des von EGGINK *et al.* (1990) beschriebenen konservierten „GD-Motiv“ sein. In der Proteinsequenz der Balhimycinhalogenase BhaA wurde eine konservierte Asparaginsäure bei Aminosäure 304 diesem „GD-Motiv“ zugeordnet [PELZER *et*

al., 1999]. In der Sequenz der Chloramphenicolhalogenase CmlS befindet sich das vermutete „GD-Motiv“ bei Asparaginsäure 259 [PIRAEE, 2002].

Weitere Sequenzmotive, die auf die Bindung von zwei Nukleotidcofaktoren (NADH/FAD) [EPPINK *et al.*, 1997; EGGINK *et al.*, 1990] hinweisen, wurden in der Sequenz von PyrH nicht gefunden. Anhand der Sequenzanalyse kann man für die Tryptophan-5-Halogenase die Abhängigkeit von einem Flavin-Cofaktor vermuten.

4.3.4 Sequenzvergleiche mit der Tryptophan-5-Halogenase PyrH

Beim Vergleich der Sequenz von *pyrH* mit Gendatenbanken wurden signifikante Homologien mit bekannten Tryptophanhalogenase-Genen festgestellt. Im paarweisen Vergleich weist die Nukleotidsequenz von *pyrH* Übereinstimmungen zwischen 56-59% mit diesen Tryptophanhalogenase-Genen auf. Diese Sequenzidentitäten liegen deutlich unter den bisher beschriebenen Identitäten für bekannte Tryptophanhalogenase-Gene (siehe 4.1). Nur für das Tryptophan-7-Halogenase-Gen aus *M. fulvus* wurden ähnlich niedrige Sequenzidentitäten festgestellt [HAMMER *et al.*, 1999]. Das Fehlschlagen der Hybridisierungsexperimente zur Detektion des Tryptophan-5-Halogenase-Gens in *S. rugosporus* (3.1 und 4.1) kann auf die geringe Sequenzübereinstimmungen zwischen Sonde und Zielsequenz zurückgeführt werden. Die Tryptophan-5-Halogenase PyrH ist mit 42-44% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit bekannten Tryptophanhalogenasen das Enzym mit der niedrigsten Sequenzidentität in der Gruppe der FADH₂-abhängigen Tryptophanhalogenasen. Die Ähnlichkeiten der verglichenen Sequenzen sind in Abb. 4.6 graphisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Tryptophan-5-Halogenase PyrH aus *S. rugosporus* keine signifikant höhere Übereinstimmung mit einer Sequenz der dargestellten Halogenasen zeigt. Damit besitzt PyrH die am stärksten divergente Sequenz in der Gruppe der FADH₂-abhängigen Tryptophanhalogenasen.

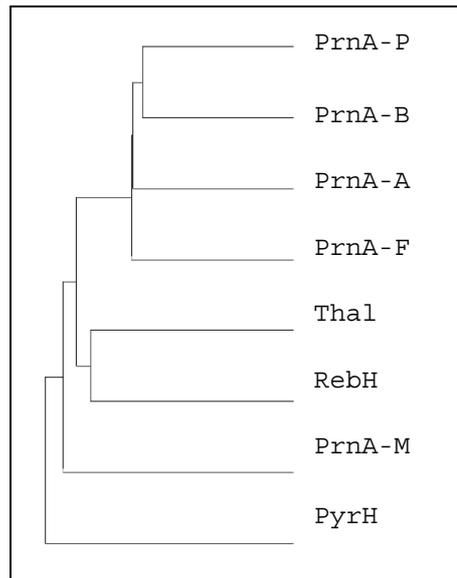


Abb. 4.6: Graphische Darstellung der Sequenzähnlichkeiten bekannter FADH₂-abhängiger Tryptophanhalogenasen.

PrnA-P aus *Pseudomonas pyrocinia*, PrnA-B aus *Burkholderia cepacia*, PrnA-A aus *Pseudomonas aureofaciens*, PrnA-F aus *Pseudomonas fluorescens*, Thal aus *Streptomyces albogriseolus*, RebH aus *Lechevalieria aerocolonigenes*, PrnA-M aus *Myxococcus fulvus*, PyrH aus *Streptomyces rugosporus*.

Zur Gruppe der Phenyl-/Pyrrol-halogenierenden FADH₂-abhängigen Halogenasen wurde keine signifikante Sequenzähnlichkeit festgestellt.

Zwei konservierte Motive, die bisher in allen FADH₂-abhängigen Halogenasen nachgewiesen werden konnten [VAN PÉE & ZEHNER 2003], sind auch in der Sequenz der Tryptophan-5-Halogenase PyrH vorhanden (Abb. 3.28).

Das erste konservierte Motiv ist eine potenzielle Nukleotidbindestelle, die anhand des von WIERENGA *et al.* (1986) beschriebenen *core fingerprint* (GXGXXG) identifiziert werden kann. In der Sequenz von PyrH befindet sich das Motiv des *core fingerprint* am NH₂-Terminus. Erstmals für Halogenasen wurde dieses Motiv von HAMMER *et al.* (1997) in der Sequenz der Tryptophan-7-Halogenase und der Monodechloraminopyrrolnitrit-3-Halogenase aus *P. fluorescens* BL915 identifiziert. Diese Nukleotidbindestelle kann in allen Sequenzen bisher bekannter FADH₂-abhängiger Halogenasen gefunden werden [VAN PÉE & ZEHNER, 2003].

Das zweite konservierte Motiv für FADH₂-abhängige Halogenasen ist das sogenannte Tryptophanmotiv (siehe 1.4).

In Untersuchungen an Haloalkan-Dehalogenasen wurden durch Kristallstrukturanalysen zwei essentielle Tryptophane (W₁₂₅;W₁₇₅) identifiziert, die an der Bindung von Cl⁻ beteiligt sind [VERSCHUEREN *et al.*, 1993]. TÖLZER identifizierte durch Sequenzanalyse einen Sequenzabschnitt in FADH₂-abhängigen Halogenasen, der zwei Tryptophanreste enthält [TÖLZER, persönl. Mitteilung, 1998]. Das Sequenzmotiv wurde als Tryptophanmotiv mit

GWTWE/KIP beschrieben und ist scheinbar in allen FADH₂-abhängigen Halogenasen konserviert. Das Tryptophanmotiv wurde auch zur Entwicklung degenerierter PCR-Primer (trpst+) verwendet [TÖLZER, persönl. Mitteilung, 1998]. In PyrH ist ein Tryptophanmotiv mit der Sequenz GWMWTIP enthalten. Es weicht vom beschriebenen Konsensus für Tryptophanhalogenasen (GWTWE/KIP) [TÖLZER, persönl. Mitteilung, 1998] ab. Im allgemeinen Tryptophanmotiv für alle bisher bekannten FADH₂-abhängigen Halogenasen (GWXWXIP) [VAN PÉE & ZEHNER, 2003] wird die konservierte Sequenz der Tryptophan-5-Halogenase PyrH repräsentiert.

4.4 Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase PyrH

4.4.1 Expression der Tryptophan-5-Halogenase PyrH

Die Funktion des Proteins PyrH in *S. rugosporus* wurde durch Mutation nachgewiesen. Durch die Expression des Cosmids **12D4** in *S. albus* konnten mögliche halogenierte Zwischenprodukte der Biosynthese von Pyrroindomycin B detektiert werden. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Tryptophan-5-Halogenase PyrH an der Biosynthese von Pyrroindomycin B beteiligt ist, und vermutlich die Chlorierung eines Precursors katalysiert. Anhand der Sequenzdaten wurde vermutet, dass PyrH eine FADH₂-abhängige Tryptophan-5-Halogenase ist, die für die Chlorierung von Tryptophan in der Biosynthese von Pyrroindomycin B verantwortlich ist.

Eine Möglichkeit zur Überprüfung dieser Behauptung ist die Isolierung des nativen Proteins aus *S. rugosporus*. Bisher sind jedoch keine Kenntnisse über die Regulation und den Zeitpunkt der Expression des Halogenasegens in *S. rugosporus* vorhanden. Der Nachweis der Aktivität des Enzyms im Wildstamm ist auch aufgrund einer vermutlich niedrigen Expressionsrate schwierig. Von der Isolierung des originären Proteins wurde deshalb abgesehen.

Durch die heterologe Expression des rekombinanten Proteins in einem geeigneten Wirt kann hingegen die Regulation der Genexpression und die Expressionsrate beeinflusst werden.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass *E. coli* nicht gut für die Expression von Halogenasegenen aus Actinomyceten geeignet ist [WYNANDS & SCHMID, persönl. Mitteilung, 2000; KLING, 2001; FLECKS, 2002]. Von *E. coli* wurden die rekombinanten Proteine nur in unlöslicher Form gebildet. Es wird vermutet, dass der hohe GC-Gehalt und die außergewöhnliche *codon usage* von Genen aus *Streptomyces* eine Ursache dafür sein könnten. Die heterologe Expression verschiedener Halogenase-Gene in *Pseudomonas* sp. führte zu guten Expressionsraten und der Isolierung aktiven Enzyms [KELLER *et al.* 2001; WYNANDS & SCHMID, persönl. Mitteilung, 2001]. Für die Expression der Tryptophan-7-Halogenase PrnA aus *P. fluorescens* BL915 wurde der bifunktionelle Expressionsvektor pPEH14 verwendet

[KIRNER *et al.*, 1998]. Mit dem Vektor pPEH14 in *Pseudomonas* sp. steht ein geeignetes Expressionssystem (Vektor/Wirt) für das Tryptophan-5-Halogenase-Gen *pyrH* zur Verfügung. Der Ausgangsvektor pPEH14 wurde so modifiziert, dass die Expression eines Gens mit einem (His)₆-tag am NH₂-Terminus möglich ist [WYNANDS & SCHMID, persönl. Mitteilung, 2001]. Der modifizierte Vektor wurde pCIBhis benannt.

Das Tryptophan-5-Halogenase-Gen *pyrH* wurde im Expressionsstamm *P. fluorescens* BL915 ΔORF1 pSZexM2 deutlich überexprimiert. Die rekombinante Tryptophan-5-Halogenase PyrH besitzt mit der NH₂-terminalen (His)₆-tag-Fusion ein theoretisches Molekulargewicht von 61800. In der SDS-PAGE und im Western Blot konnte ein Protein mit der Größe von ca. 61000 nachgewiesen werden. Das native Molekulargewicht des Proteins PyrH müsste durch eine Gelfiltration bestimmt werden.

Die Aktivität des rekombinanten Proteins PyrH wurde *in vivo* durch Fütterungs- und Komplementationsexperimente, und *in vitro* durch Aktivitätstests untersucht. Als Wirtsstamm für die Expression der Tryptophan-5-Halogenase wurde *P. fluorescens* BL915 ΔORF1 gewählt. Dieser Stamm trägt eine Mutation im Tryptophan-7-Halogenase-Gen *prnA* [HAMMER *et al.*, 1997]. Alle weiteren Gene für die Biosynthese von Pyrrolnitrin sind intakt. Durch die Expression der Tryptophan-5-Halogenase in diesem Stamm kann die mögliche Komplementation der Pyrrolnitrinbiosynthese durch PyrH untersucht werden.

Aus einer Mutante des Stammes, in der alle Gene des Clusters der Pyrrolnitrinbiosynthese inaktiviert sind, wurden zwei NAD(P)H:Flavin-Oxidoreduktasen partiell gereinigt [WAGE, persönl. Mitteilung, 2001]. Die Aktivität einer NAD(P)H:Flavin-Oxidoreduktase ist für die Aktivität der FADH₂-abhängigen Tryptophan-7-Halogenase notwendig [KELLER *et al.*, 2001]. Im Rohextrakt des Wirtsstammes *P. fluorescens* BL915 ΔORF1 ist ohne Expression der PyrH keine Aktivität für eine Tryptophanhalogenase nachweisbar.

Der Wirtsstamm ist in der Lage FADH₂ zu bilden, kann aber selbst Tryptophan nicht halogenieren. Damit sind die Voraussetzungen für den Nachweis der Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase PyrH im Expressionsstamm *P. fluorescens* BL915 ΔORF1 pSZexM2 *in vivo* und *in vitro* gegeben.

4.4.2 Fütterungsversuch

In einem ersten Versuch wurde durch Fütterung des Expressionsstammes *P. fluorescens* BL915 ΔORF1 pSZexM2 mit L-Tryptophan die *in vivo* Aktivität des Proteins untersucht. Im Kulturüberstand konnte eine Umsetzung von L-Tryptophan nachgewiesen werden. Im HPLC-Chromatogramm konnte in chloridhaltiger Kultur von *Pseudomonas fluorescens* BL915 ΔORF1 pSZexM2 eine neue Verbindung nachgewiesen werden. Bei der gebildeten Verbindung könnte es sich um chloriertes Tryptophan handeln. Die Verbindung eluiert mit

einer ähnlichen Retentionszeit wie 7-Chlortryptophan. Das UV-Spektrum dieser Verbindung entspricht dem eines typischen Indolderivates. Das Massenspektrum des Kulturüberstandes zeigt den Massenpeak 239/241 für chloriertes Tryptophan.

In bromidhaltiger Kultur von *Pseudomonas fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 wurde durch HPLC-Analyse ebenfalls eine neue Verbindung detektiert. Diese Verbindung besitzt eine identische Retentionszeit wie die Referenzsubstanz 5-Bromtryptophan in der HPLC. Die Verbindung zeigt das typische UV-Spektrum eines Indolderivates. Das Massenspektrum des Kulturüberstandes zeigt den Massenpeak 283/285 für bromiertes Tryptophan.

In den Kontrollversuchen mit dem Wirtstamm ohne Tryptophan-5-Halogenase konnten diese Verbindungen nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse sind ein erster Hinweis auf die Aktivität des Proteins PyrH. Es wird vermutet, dass Tryptophan von PyrH als Substrat akzeptiert und in 5-Position halogeniert wird.

4.4.3 Metabolisierung von 5-substituierten Tryptophanen

Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob das von *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 *in vivo* gebildete Produkt durch den Stamm weiter umgesetzt werden kann. KIRNER *et al.* (1998) konnten bei der Fütterung der Mutante *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 mit 7-Chlortryptophan die Bildung von Pyrrolnitrin feststellen. HAMILL *et al.* (1970) führten Untersuchungen zum Metabolismus von substituierten Tryptophanen im Pyrrolnitrinproduzenten *P. aureofaciens* durch. Es wird vermutet, dass die Biosynthese von Pyrrolnitrin in beiden Stämmen, *P. fluorescens* und *P. aureofaciens*, konserviert ist. Bei der Fütterung von *P. aureofaciens* mit 5-substituierten Chlor- und Bromtryptophan konnten HAMILL *et al.* (1970) die Bildung von Aminopyrrolnitrinderivaten nachweisen.

Durch die Expression der Tryptophan-5-Halogenase PyrH in *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1, wird die Bildung von 5-Chlortryptophan *in vivo* erwartet. Diese Verbindung sollte laut HAMILL *et al.* (1970) weiter zum Aminopyrrolnitrinderivat metabolisiert werden (Abb. 4.7).

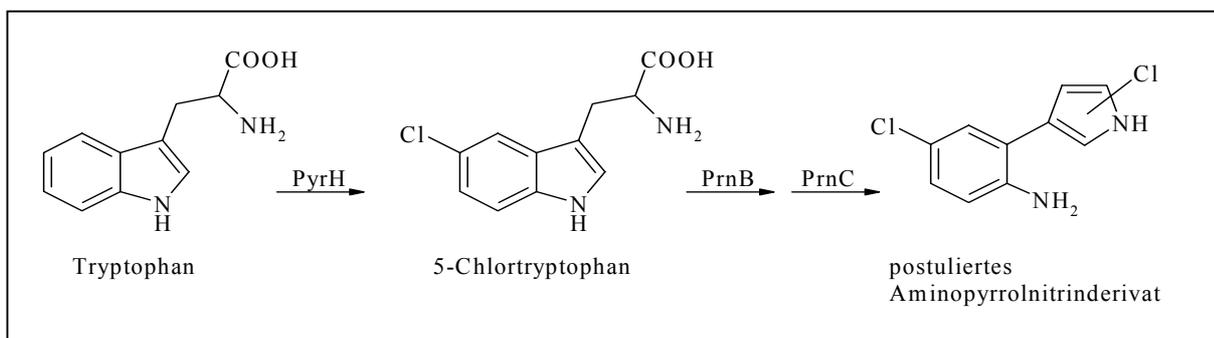


Abb. 4.7: Metabolisierung von 5-Chlortryptophan zum Aminopyrrolnitrinderivat.

Für *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 konnte die Bildung eines chlorierten Tryptophans nachgewiesen werden (4.4.2; 4.4.4). Die Bildung eines Aminopyrrolnitrinderivates durch den Stamm *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Eine Ursache dafür könnte eine Blockierung des Metabolismus in einem nachfolgenden Schritt in *P. fluorescens* Δ ORF1 sein. Als nichtoriginäre Substrate würden 5-substituierte Tryptophane langsamer von nachfolgenden Enzymen umgesetzt. Um die Versuchsbedingungen auf die geringere Umsetzung einzustellen, wurde die Extraktion der Metaboliten aus einem 3,5fach größerem Kulturvolumen als bei HAMILL *et al.* (1970) und aus 4fach größerem Kulturvolumen als bei KIRNER *et al.* (1998) angegeben, durchgeführt (2.24.2). Der Zeitraum der Beobachtung für die Metabolisierung wurde im Vergleich zu den Versuchen von HAMILL *et al.* (1970) und KIRNER *et al.* (1998) deutlich verlängert (bis zum 7. Tag). Es konnte auch dann kein Aminopyrrolnitrinderivat isoliert werden.

Eine weitere Ursache, dass das Aminopyrrolnitrinderivat nicht gebildet wird, könnte die eingeschränkte Substratflexibilität eines Enzyms sein. Es ist denkbar, dass 5-substituierte Tryptophanderivate nicht als Substrate akzeptiert werden. Dagegen sprechen jedoch die Beobachtungen von HAMILL *et al.* (1970).

In den Untersuchungen von HAMILL *et al.* (1970) wurde der Stamm *P. aureofaciens* verwendet. Dieser Stamm exprimiert alle Enzyme der Pyrrolnitrinbiosynthese. Die 5-substituierten Tryptophane könnten, durch die stammeigene Tryptophan-7-Halogenase PrnA der Pyrrolnitrinbiosynthese, zusätzlich in Position 7 chloriert werden. Das würde zu 5,7-dichlorierten Tryptophanderivaten führen (Abb. 4.8).

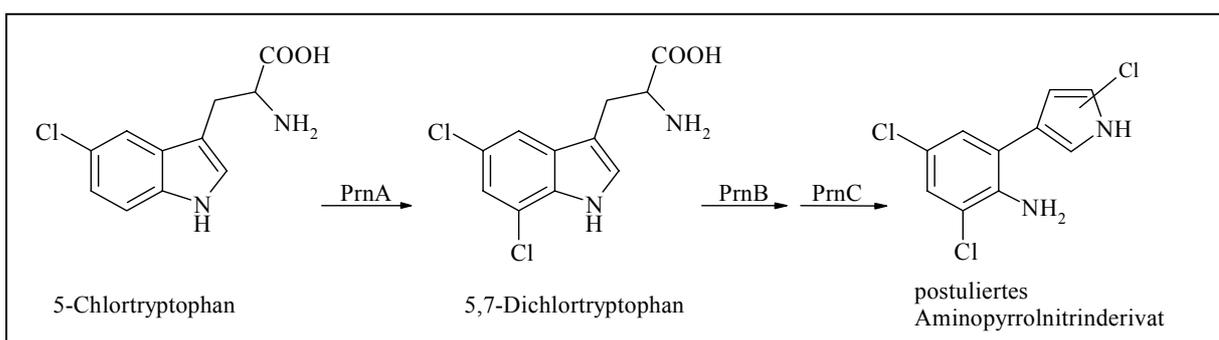


Abb. 4.8: Mögliche Metabolisierung von 5-substituiertem Tryptophan in *P. aureofaciens*.

Wenn ein Chlorsubstituent in Position 7 am Tryptophan essentiell für die Substraterkennung der im Metabolismus anschließenden Enzyme ist, könnten die 5,7-dichlorierten Tryptophanderivate zu Aminopyrrolnitrinderivaten metabolisiert werden. Ein Hinweis auf die enge Substratflexibilität der Enzyme wurde durch die Mutante *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 erhalten. Die Mutante kann kein 7-Chlortryptophan bilden, und damit ist die Biosynthese von

Pyrrolnitrin vollständig ausgeschaltet [KIRNER *et al.*, 1998]. Die Bildung eines dichlorierten Tryptophanderivates ist in *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 nicht möglich.

Eine weitere Ursache, weshalb die Bildung 5-substituierter Aminopyrrolnitrinderivate durch die Expression von *pyrH* in *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 nicht nachweisbar war, kann man auch im verwendeten Wirtstamm suchen. Es ist denkbar, dass durch die Mutation im Stamm *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 genetische Umordnungen (*rearrangements*) stattgefunden haben, und die Gene der Pyrrolnitrinbiosynthese nicht funktionell erhalten geblieben sind. Auch können durch die Mutation von *prnA* (ORF1) polare Effekte auf die nachfolgenden Biosynthesegene nicht ausgeschlossen werden.

4.4.4 Nachweis der Aktivität *in vitro*

Aus Untersuchungen zur Pyrrolnitrinbiosynthese sind zwei halogenierende Enzyme bekannt. Die spezifische Halogenierung organischer Substrate durch diese Enzyme wurde aus zellfreien Extrakten nachgewiesen [HOHAUS *et al.*, 1997]. Durch die Reinigung der Tryptophan-7-Halogenase aus *P. fluorescens* und die Enzymcharakterisierung konnten KELLER *et al.* (2000) den von HOHAUS *et al.* (1997) postulierten Reaktionsmechanismus für die Tryptophan-7-Halogenase konkretisieren. Es wurde eine Abhängigkeit der Tryptophan-7-Halogenase aus *P. fluorescens* von der Aktivität einer Flavinreduktase beobachtet [KELLER *et al.*, 2000]. Diese Flavinreduktase reduziert FAD zu FADH₂ unter Verbrauch von NADH. UNVERSUCHT zeigte, dass die Flavinreduktase und die Halogenase nicht als Enzymkomplex vorliegen [UNVERSUCHT, 2000]. Die Tryptophan-7-Halogenase PrnA benötigt für die Aktivität FADH₂, Sauerstoff, Chlorid und Substrat [KELLER *et al.*, 2000]. Als Substrat der Tryptophan-7-Halogenase wurde L-Tryptophan identifiziert [HÖLZER *et al.*, 2001; KELLER *et al.*, 2000; KIRNER *et al.*, 1998; HOHAUS *et al.*, 1997]. Es wurde angenommen, dass aufgrund der Sequenzhomologie die Tryptophan-5-Halogenase PyrH aus *S. rugosporus* ähnliche Eigenschaften wie die Tryptophan-7-Halogenase PrnA aus *P. fluorescens* besitzt. Angelehnt an die Kenntnisse von KELLER *et al.* (2000) und UNVERSUCHT (2000) wurden die Aktivitätstests für die Tryptophan-5-Halogenase PyrH mit zellfreien Rohextrakten des Expressionsstammes *P. fluorescens* BL915 Δ ORF1 pSZexM2 durchgeführt. Dabei wurden die Parameter des Aktivitätstests von UNVERSUCHT (2000) übernommen. Als Flavinreduktase wurde jedoch nicht SsuE aus *E. coli* [EICHORN *et al.*, 1999], sondern Fre aus *E. coli* [FONTECAVE *et al.*, 1987] im Enzymtest eingesetzt. Der Aktivitätstest wurde als diskontinuierlicher Test durchgeführt und durch Hitzedenaturierung des Enzyms nach 6 h abgestoppt.

Im Aktivitätstest für die Tryptophan-5-Halogenase PyrH mit L-Tryptophan und Bromid wurde durch HPLC-Analyse die Abnahme der Tryptophankonzentration und die Bildung

einer neuen Verbindung beobachtet. Die neue Substanz eluiert in der HPLC an einer *reversed-phase*-Säule mit identischer Retentionszeit wie die Referenzsubstanz 5-Bromtryptophan. Auch das UV-Spektrum der Substanz stimmt mit dem der Referenzsubstanz 5-Bromtryptophan überein. In der Analyse durch HPLC/MS-Kopplung wurde für die gebildete Substanz ein Massenpeak von 283/285 (1:1) detektiert. Diese Masse entspricht Bromtryptophan. Die Bromierung der Verbindung kann aufgrund des typischen Isotopenverhältnis von $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ wie 1:1 belegt werden. Durch den Vergleich der Retentionszeit, des UV-Spektrums und der Masse der detektierten Substanz mit der Referenzsubstanz 5-Bromtryptophan konnte als Produkt im Enzymtest der Tryptophan-5-Halogenase 5-Bromtryptophan identifiziert werden.

Im Aktivitätstest mit den Substraten L-Tryptophan und Chlorid wurde ebenfalls Aktivität nachgewiesen. Es wurde eine deutliche Abnahme von L-Tryptophan im Enzymtest beobachtet. Gleichzeitig war die Bildung einer neuen Verbindung durch HPLC-Analyse festzustellen. Diese neue Substanz eluiert von einer *reversed-phase*-Säule mit einer ähnlichen Retentionszeit wie 7-Chlortryptophan. Es wurde vermutet, dass es sich bei der gebildeten Substanz um 5-Chlortryptophan handelt. In der Analyse des Enzymtests mittels HPLC/MS-Kopplung konnte dieses Produkt näher charakterisiert werden. Es wurde ein Massenpeak $[\text{M}+\text{H}]^+$ von 239/241 (3:1) detektiert. Diese Masse entspricht einem monochlorierten Tryptophan. Die chlorierte Verbindung kann anhand des Isotopenmusters für $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ wie 3:1 identifiziert werden. Es konnte nur ein chloriertes Produkt detektiert werden. Die genaue Position des Chlorsubstituenten am L-Tryptophan könnte durch eine ^1H -NMR-Analyse endgültig bewiesen werden.

Die Tryptophan-5-Halogenase PyrH aus *S. rugosporus* katalysiert eine Halogenierungsreaktion und akzeptiert L-Tryptophan als Substrat. Die enzymatische Bromierung von L-Tryptophan wird durch die Tryptophan-5-Halogenase PyrH mit Regioselektivität für die Position 5 katalysiert. Es kann vermutet werden, dass die enzymatische Chlorierung durch die Tryptophan-5-Halogenase wie die Bromierung regioselektiv in Position 5 am Tryptophan erfolgen wird.

HÖLZER (2000) untersuchte die Substratspezifität und Regioselektivität der Tryptophan-7-Halogenase PrnA aus *P. fluorescens* BL915. Durch die Tryptophan-7-Halogenase PrnA werden u. a. verschiedene Tryptophan- und Indolderivate halogeniert. Die regioselektive Halogenierung in Position 7 des Indolsystems wurde jedoch nur für das natürliche Substrat Tryptophan festgestellt [HÖLZER *et al.*, 2001].

Substratspezifität und hohe Regioselektivität der Halogenierungsreaktion wurde bisher nur für FADH₂-abhängige Halogenasen beobachtet. Diese Eigenschaften sind notwendig für die

Biosynthese halogener Verbindungen in Organismen [VAN PÉE, 1996]. Nur so können die Organismen die Bildung von Nebenprodukten oder zellschädigende Reaktionen vermeiden.

Die quantitative Auswertung der Enzymtests mit der Tryptophan-5-Halogenase erfolgte am HPLC-Chromatogramm anhand der Produktpeakflächen der Absorptionsmessung bei 220 nm. Es wurde eine Kalibriergerade erstellt, wodurch die Produktpeakflächen im HPLC-Chromatogramm mit der Stoffmenge der Kalibriersubstanzen korreliert wurden. Als Kalibriersubstanzen wurden 7-Chlortryptophan und 5-Bromtryptophan verwendet. Es war kein 5-Chlortryptophan als Referenzsubstanz verfügbar. Da die Extinktionskoeffizienten ϵ_{220} von 5-Chlortryptophan und 7-Chlortryptophan gleich sind, sollte die Verwendung von 7-Chlortryptophan als Kalibriersubstanz anstelle von 5-Chlortryptophan keinen Einfluss auf die quantitative Auswertung haben.

Bei der Umsetzung mit Chlorid wurde im Enzymtest eine Aktivität von 100 μU in 1 ml Rohextrakt festgestellt. Das entspricht einer spezifischen Aktivität von 109 $\mu\text{U}/\text{mg}$. Für die Umsetzung mit Bromid wurde in 1 ml Rohextrakt eine um 25% niedrigere Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase festgestellt. Die spezifische Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase für die Bromierungsreaktion beträgt 82 U/mg . Diese Aktivitäten wurden in einem Standardenzymtest gemessen (siehe 2.27.2).

Dieser Standardenzymtest wurde von KELLER (1999) und UNVERSUCHT (2000) optimiert. Sie untersuchten den Einfluss der Komponenten im Enzymtest auf die Aktivität der Tryptophan-7-Halogenase PrnA [KELLER, 1999; HÖLZER, 2000; UNVERSUCHT, 2000]. Besonders durch das gewählte Puffersystem, das Verhältnis Halogenase/Flavinreduktase, die Konzentration von FAD und Chlorid wurde die Aktivität der Tryptophan-7-Halogenase PrnA beeinflusst [KELLER, 1999; UNVERSUCHT, 2000].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Flavinreduktase auf die Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase PyrH untersucht. In Enzymtests mit Rohextrakten konnte für die Tryptophan-5-Halogenase Aktivität ohne Zusatz einer Flavinreduktase festgestellt werden. Die Aktivität im Rohextrakt wurde auch von KELLER *et al.* (2001) und HOHAUS *et al.* (1997) für die Tryptophan-7-Halogenase PrnA beobachtet. Das kann man auf die Gegenwart einer unspezifischen NAD(P)H:Flavin-Oxidoreduktase in *P. fluorescens* BL915 zurückführen [KELLER *et al.*, 2001; WAGE, persönl. Mitteilung, 2003]. KELLER *et al.* (2001) zeigten, dass man die Reduktasekomponente im Enzymtest durch Flavinreduktasen aus anderen Stämmen, z.B. SsuE aus *E. coli*, ersetzen kann. Der Zusatz verschiedener NAD(P)H:Flavin-Oxidoreduktasen zum Enzymtest der Tryptophan-7-Halogenase PrnA führte zu einer deutlichen Steigerung der Halogenaseaktivität [KELLER *et al.*, 2000; UNVERSUCHT, 2000].

In dieser Arbeit stand die NAD(P)H:Flavin-Oxidoreduktase Fre aus *E. coli* [FONTECAVE *et al.*, 1987] als rekombinantes Protein im Rohextrakt eines Expressionsklons zur Verfügung

[SPYROU *et al.*, 1991]. Es wurde untersucht, ob die Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase durch die Zugabe dieses Enzyms beeinflusst werden kann. Die Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase PyrH wurde durch Zugabe der Flavinreduktase Fre aus *E. coli* [FONTECAVE *et al.*, 1987] zum Enzymtest bis auf das 6fache gesteigert. Es wird vermutet, dass die Tryptophan-5-Halogenase PyrH in Analogie zur Tryptophan-7-Halogenase PrnA nur von FADH₂ abhängig ist. Durch den Zusatz der NAD(P)H:Flavin-Oxidoreduktasen zum Enzymtest kann FADH₂ aus NADH und FAD *in situ* gebildet werden. Dadurch steht reduziertes FAD im Enzymtest für die Aktivität der Halogenasen zur Verfügung. Die Abhängigkeit der Tryptophanhalogenasen von reduziertem FAD und nicht von einer zweiten Enzymkomponente erklärt, warum verschiedene Flavinreduktasen die Halogenasen aktivieren können.

Durch die Klonierung zur Expression wurde ein His-tag an das NH₂-terminale Ende der Tryptophan-5-Halogenase PyrH fusioniert. Die Expression des Enzyms mit diesem Epitop wurde mittels Western Blot nachgewiesen (3.11.3). Anhand dieses tags kann das Protein über eine Affinitätschromatographie angereichert werden. Das Enzym konnte nahezu vollständig von den Proteinen des Rohextraktes getrennt werden. Nach der Elution von der Säule wurde das Protein sofort dialysiert um das Imidazol aus dem Elutionspuffer und gelöste Nickelionen zu entfernen. Nach der Dialyse wurden Enzymtests durchgeführt und die Aktivität untersucht. In den Fraktionen konnte keine Aktivität für die Tryptophan-5-Halogenase nachgewiesen werden. Der Verlust der Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase nach der Anreicherung durch *metal-chelating*-Chromatographie kann mehrere Ursachen haben. Durch die Reinigung kann die Stabilität des Proteins in Lösung stark beeinträchtigt werden. Eine solche Beobachtung machte KELLER (1999) bei der Reinigung der Tryptophan-7-Halogenase PrnA. Die Stabilität der PrnA war extrem von dem verwendeten Puffersystem abhängig. Der in dieser Arbeit verwendete Puffer (0,01 M KPP) könnte in Ionenstärke und Pufferkapazität nicht ausreichen, um gereinigte PyrH zu stabilisieren. Eine weitere Ursache für den Aktivitätsverlust könnte eine Komplexierung von essentiellen Kationen durch Imidazol sein. Über die Abhängigkeit der Tryptophan-5-Halogenase PyrH von komplexierbaren Kationen ist bisher nichts bekannt. Zur Untersuchung dieser Vermutung wurden Aktivitätstests unter Zusatz ausgewählter Kationen durchgeführt. Auch dadurch konnte keine Reaktivierung des Enzyms erzielt werden. Während der Chromatographie könnte das Protein auch aufgrund der Gegenwart von Nickelionen oder der Wasch- und Elutionspuffer denaturieren. Die Bedingungen für die Reinigung müssen überarbeitet werden, um aktives Enzym zu erhalten. Optimierungsspielraum besteht in der Verwendung anderer Puffersysteme, in der Änderung der Wasch- und Elutionspuffer, evtl. mit höherem Salzgehalt, in der Elution, z.B. durch pH-shifts, die Verwendung von Zinkionen anstelle von Nickelionen zur Chelatisierung, die

schnelle Abtrennung störender Moleküle durch Dialyse oder Gelfiltration nach der Chromatographie oder der Zusatz von enzymstabilisierenden Substanzen.

4.5 Ausblick

Durch die Klonierung, Expression und den Nachweis der Aktivität *in vitro* sind die Voraussetzungen für die Enzymreinigung und Charakterisierung der Tryptophan-5-Halogenase PyrH aus *S. rugosporus* geschaffen. Mit der *metal-chelating*-Chromatographie ist eine Möglichkeit gegeben, das Enzym zu reinigen. Um aktives Protein zu erhalten, muss diese Methode noch überarbeitet werden. Mögliche Ansatzpunkte wurden beschrieben. Die Stabilität des Enzyms in verschiedenen Puffersystemen sollte untersucht werden. Mit gereinigtem Enzym kann die Charakterisierung durchgeführt werden. Dabei sind sowohl physikalische Daten, wie das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt interessant, als auch biochemische Charakteristika, wie die Abhängigkeit der Enzymaktivität von Cofaktoren, Substraten, Sauerstoff und Metallen. Die Kristallisierung des Enzyms würde genaueren Aufschluss über die Bindung der Substrate geben.

Die optimale Zusammensetzung des Enzymtests für die Tryptophan-5-Halogenase PyrH aus *S. rugosporus* sollte bestimmt werden. Mit dem optimalen Enzymtest können die Untersuchungen zur Enzymkinetik durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der enzymatischen Halogenierung durch FADH₂-abhängige Halogenasen wäre wünschenswert.

Auf genetischer Seite könnte man durch die Einführung gezielter Mutationen in das Gen der Tryptophan-5-Halogenase die Konservierung von Sequenzmotiven beurteilen und deren Bedeutung für die Aktivität abschätzen.

Um die Eigenschaften der Tryptophanhalogenasen zu verändern oder zu optimieren, kann man Zufallsmutagenese- oder *gene-shuffling*-Experimente [STEMMER *et al.*, 1994] durchführen.

Auf dem Gebiet der Untersuchungen zur Biosynthese der Pyrroindomycine sind erste Ergebnisse dargestellt. Ausgehend davon eröffnet sich eine Vielzahl von Möglichkeiten, die Kenntnisse über Enzyme des Sekundärstoffwechsel zu erweitern und neue Verbindungen herzustellen.

Die Sequenzierung weiterer Gene aus dem Cluster wäre eine der nächsten Aufgaben. Durch Fütterungsexperimente mit markierten Verbindungen könnte man mehr über die Bildung des ungewöhnlichen Makrozyklus der Pyrroindomycine zu erfahren.

Die gezielte Mutation von Genen des Biosynthesegenclusters würde die Funktion der Enzyme in der Biosynthese und Aufschluss über den Biosyntheseweg der Pyrroindomycine geben. Auch die heterologe Expression von Abschnitten mehrerer Gene und die Identifizierung der Metaboliten wäre eine interessante Aufgabe. Die Biotransformation unnatürlicher Substrate

mit Enzymen aus der Biosynthese der Pyrroindomycine stellt eine weitere Möglichkeit dar, neue Verbindungen herzustellen.

Durch die Kombination bekannter Biosynthesegene mit Genen anderer Organismen, könnte man Substanzen mit besonderen Strukturmerkmalen bilden. Die Kombination der Tryptophan-5-Halogenase *pyrH* mit Teilen des Biosynthesegenclusters von Rebeccamycin ist eine Möglichkeit neue halogenierte Indolcarbazole herzustellen.

Ebenso könnte man die Mutante *S. rugosporus* SZTF1Hal mit Genen anderer Halogenasen rekombinieren. Damit wäre die Bildung neuer Pyrroindomycinderivate möglich.

5 Zusammenfassung

Halogenierte Metaboliten werden von einer Vielzahl verschiedener Organismen produziert. Mikroorganismen und Pilze stellen die größte Gruppe der Produzenten dar. Über die Bildung der strukturell verschiedenen Halometaboliten, insbesondere über die Biohalogenierung, ist wenig bekannt. Aus unterschiedlichsten Organismen wurden Enzyme isoliert, die organische Substrate halogenieren können. Nur für die FADH₂-abhängigen Halogenasen konnte bisher der Nachweis für die Beteiligung an der Biosynthese halogener Naturstoffe erbracht werden. Diese Enzyme besitzen im Gegensatz zu anderen halogenierenden Enzymen Substratspezifität und Regioselektivität.

Pyroindomycin B ist ein halogener Sekundärmetabolit aus *Streptomyces rugosporus*. Die Struktur ist aus einem polyketidischen Makrozyklus, einem Trisaccharid und einem halogenierten Indolpyrrol aufgebaut. Für die Biosynthese dieses halogenierten Naturstoffes wurde eine FADH₂-abhängige Tryptophan-5-Halogenase postuliert. Die Aufgabe dieser Arbeit war die Detektion des postulierten Tryptophan-5-Halogenase-Gens und die Untersuchung des Enzyms.

Durch DNA-Hybridisierungen mit Genen bekannter Tryptophanhalogenasen als heterologe DNA-Sonden gelang die Identifizierung eines potenziellen Tryptophan-5-Halogenase-Gens aus *Streptomyces rugosporus* nicht. Die Sequenzähnlichkeit der bekannten Sequenzen zum Tryptophan-5-Halogenase-Gen war zu gering um das Gen durch DNA-Hybridisierung nachzuweisen.

Anhand der chemischen Struktur von Pyroindomycin B wurde ein Modell für die Biosynthese postuliert. Genfragmente von postulierten Enzymen, einer dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase (GDH), mehrerer Typ-I-Polyketidsynthasen (PKS), einer Glycosyltransferase (GTF) und einer Tryptophanhalogenase (Hal) wurden durch PCR mit degenerierten Primern in Gesamt-DNA von *Streptomyces rugosporus* nachgewiesen. Aus einer repräsentativen Genbank von *Streptomyces rugosporus* wurden mehrere Cosmide isoliert, die mindestens eines der genannten Fragmente enthalten. Durch Restriktionsanalyse wurden die isolierten Cosmide untereinander verglichen und überlappend angeordnet. Durch Hybridisierungsanalysen konnten auf direkt benachbarten *Bam*HI-Fragmenten (zusammen ~10 kb) ein Tryptophanhalogenasegen und potenzielle Gene für eine modulare Polyketidsynthase identifiziert werden.

Subklonierungen und Sequenzierungen aus dieser Region des Genoms von *Streptomyces rugosporus* führte zur Detektion eines Tryptophanhalogenasegens, potenzieller Gene einer dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase und einer modularen Polyketidsynthase.

Der gesamte Leserahmen des Tryptophan-5-Halogenase-Gens wurde mehrfach doppelsträngig sequenziert. Sequenzvergleiche des Tryptophan-5-Halogenase-Gens ergaben deutliche Ähnlichkeiten (57-59 %) zu bekannten Gensequenzen von FADH₂-abhängigen

Halogenasen anderer Mikroorganismen. Die postulierte Aminosäuresequenz der Tryptophan-5-Halogenase besitzt 42-44% Sequenzidentität mit FADH₂-abhängigen Tryptophanhalogenasen aus *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas pyrrocinia*, *Burkholderia cepacia*, *Myxococcus fulvus*, *Lechevalieria aerocolonigenes* und *Streptomyces albogriseolus*. Die Primärstruktur weist die erwarteten konservierten Sequenzmotive für FADH₂-abhängige Halogenasen, eine Nukleotidbindestelle und ein Tryptophanmotiv, auf. Die Sequenzanalyse der Tryptophan-5-Halogenase legt nahe, dass das Protein zur Gruppe der FADH₂-abhängigen Halogenasen gehört.

Durch eine *gene-replacement*-Mutation des Tryptophan-5-Halogenase-Gens wurde die Funktion des Genproduktes in *Streptomyces rugosporus* untersucht. Dazu wurde ein geeignetes System zur genetischen Modifizierung von *Streptomyces rugosporus* erarbeitet. Durch die Analyse des Metabolitenmusters wurde die Auswirkung der Mutation auf die Biosynthese von Pyrroindomycin B betrachtet. Durch die Inaktivierung des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH* wurde vom mutierten Stamm nur die unhalogenierte Verbindung Pyrroindomycin A gebildet. Das wurde als Nachweis für die Beteiligung des Genproduktes des Tryptophanhalogenase-Gens an der Biosynthese von Pyrroindomycin B betrachtet. Durch den Nachweis der unhalogenierten Verbindung in der Mutante konnte dem Genprodukt auch die Funktion eines halogenierenden Enzyms zugeordnet werden. Polare Effekte, die durch die Mutation hervorgerufen werden könnten, wurden nicht beobachtet.

Das Tryptophan-5-Halogenase-Gen aus *Streptomyces rugosporus* wurde heterolog in *Pseudomonas fluorescens* BL915 Δ ORF1 exprimiert. Die deutliche Überexpression des Enzyms stellte ausreichende Mengen Protein in löslicher Form für die Proteinreinigung und Enzymcharakterisierung zur Verfügung. Im heterologen Wirt konnte bei der Fütterung von Tryptophan bereits *in vivo* die Bildung von halogenierten Tryptophanderivaten beobachtet werden. Im Rohextrakt des Expressionsstammes wurde durch einen spezifischen Enzymtest die *in-vitro*-Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase untersucht. Es wurde die enzymabhängige Umsetzung von Tryptophan und Chlorid bzw. Bromid zu Chlortryptophan bzw. Bromtryptophan durch die Tryptophan-5-Halogenase aus *Streptomyces rugosporus* in Gegenwart der Cofaktoren NADH und FAD sowie der Flavinreduktase Fre aus *E. coli* betrachtet. Die festgestellte Aktivität konnte eindeutig der Tryptophan-5-Halogenase zugeordnet werden. Die Reaktionsprodukte der Enzymtests wurden mittels HPLC/MS analysiert und die Bildung der monohalogenierten Tryptophanderivate nachgewiesen. Der Vergleich des authentischen 5-Bromtryptophan mit dem Reaktionsprodukt des Enzymtests mit Bromid durch HPLC und UV-Spektroskopie bestätigte, dass die Bromierung von Tryptophan durch die Tryptophan-5-Halogenase in Position 5 erfolgt war. Daraus wurde

geschlussfolgert, dass die Tryptophan-5-Halogenase Regioselektivität für die Halogenierung in Position 5 am Tryptophan besitzt.

Die Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase PyrH wird durch die Aktivität einer Flavinreduktase deutlich verstärkt. Durch den Zusatz der Flavinreduktase Fre aus *E. coli* zum Enzymtest wurde die Aktivität der Tryptophan-5-Halogenase PyrH bis auf das 6fache gesteigert.

In einem Reinigungsschritt konnte die rekombinante Tryptophan-5-Halogenase PyrH durch *metal-chelating*-Chromatographie an immobilisierten Nickelionen aus dem Rohextrakt des Expressionsstammes *Pseudomonas fluorescens* BL915 Δ ORF1 hoch angereichert werden.

6 Literatur

- Abbanat, D., Maiese, W. & Greenstein, M. (1999).** Biosynthesis of the pyrroindomycins by *Streptomyces rugosporus* LL-42D005; characterization of nutrient requirements. *J. Antibiotics* **52**, 117-126.
- Aguirrezabalaga, I., Olano, C., Allende, N., Rodriguez, L., Brana, A. F., Méndez, C. & Salas, J. A. (2000).** Identification and expression of genes involved in biosynthesis of L-oleandrose and its intermediate L-olivose in the oleandomycin producer *Streptomyces antibioticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1266-1275.
- Alksne, L. E., Burgio, P., Hu, W., Feld, B., Singh, M. P., Tuckman, M., Petersen, P. J., Labthavikul, P., McGlynn, M., Barbieri, L., McDonald, L., Bradford, P., Dushin, R. G., Rothstein, D. & Projan, S. J. (2000).** Identification and analysis of bacterial protein secretion inhibitors utilizing a SecA-LacZ reporter fusion system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1418-1427.
- Aparicio, J. F., Colina, A. J., Ceballos, E. & Martin, J. F. (1999).** The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. A new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10133-10139.
- Aparicio, J. F., Molnar, I., Schwecke, T., Konig, A., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Staunton, J. & Leadlay, P. F. (1996).** Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* **169**, 9-16.
- Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuda, A. & Tamura, G. (1964).** Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance produced by *Pseudomonas*. *Agr. Biol. Chem.* **28**, 575-576.
- Asai, M., Mizuta, E., Izawa, M., Haibara, K. & Kishi, T. (1979).** Isolation, chemical characterization and structure of ansamitocin, a new antitumor ansamycin antibiotic. *Tetrahedron* **35**, 1079-1085.
- August, P. R., Tang, L., Yoon, Y. J., Ning, S., Muller, R., Yu, T. W., Taylor, M., Hoffmann, D., Kim, C. G., Zhang, X., Hutchinson, C. R. & Floss, H. G. (1998).** Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.* **5**, 69-79.
- Baker, B. J. & Scheuer, P. J. (1994).** The punaglandins: 10-chloroprostanoids from the octocoral *Telesto riisei*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1346-1353.
- Bao, W. & Deng** in Kieser *et al.*, (2000): A laboratory manual of streptomycetes genetics., S.542.
- Bate, N., Butler, A. R., Smith, I. P. & Cundliffe, E. (2000).** The mycarose-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin. *Microbiology* **146**, 139-146.
- Bate, N. & Cundliffe, E. (2002).** The desosamine biosynthetic cluster of *Streptomyces narbonensis*, producer of narbomycin. NbmH aus *Streptomyces narbonensis*. *unpublished AF521878*.
- Belitz & Grosch (1992).** Lehrbuch der Lebensmittelchemie., Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 4.Aufl. ISBN 3-540-55449-1 4.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.

Berger, J. & Batcho, A. D. (1978). Coumarin-glycoside antibiotics. *J. chrom. library* **15**, 101-158.

Beyer, S., Distler, J. & Piepersberg, W. (1996). The *str* gene cluster for the biosynthesis of 5'-hydroxystreptomycin in *Streptomyces glaucescens* GLA.0 (ETH 22794): new operons and evidence for pathway-specific regulation by StrR. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 775-784.

Bibb, M. J. & Cohen, S. N. (1982). Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **187**, 265-277.

Bibb, M. J., Findlay, P. R. & Johnson, M. W. (1984). The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30**, 157-166.

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.

Blanco, G., Patallo, E. P., Brana, A. F., Trefzer, A., Bechthold, A., Rohr, J., Méndez, C. & Salas, J. A. (2001). Identification of a sugar flexible glycosyltransferase from *Streptomyces olivaceus*, the producer of the antitumor polyketide elloramycin. *Chem. Biol.* **8**, 253-263.

Brautaset, T., Sekurova, O. N., Sletta, H., Ellingsen, T. E., Strom, A. R., Valla, S. & Zotchev, S. B. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* **7**, 395-403.

Bullock, W. O., Fernández, J. M. & Short, J. M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376.

Burd, W. (1998). Molekulargenetische Untersuchungen zu neuartigen halogenierenden Enzymen. Arbeitsbericht, Institut für Biochemie, TU Dresden.

Bush, J. A., Long, B. H., Catino, J. J., Bradner, W. T. & Tomita, K. (1987). Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. *J. Antibiotics* **40**, 668-678.

- Buzzetti, F., Eisenberg, F., Grant, H. N., Keller-Schierlein, W., Voser, W. & Zähler, H. (1968).** Avilamycin. *Experientia* **24**, 320-323.
- Chalet, L., Arison, B. H., Monaghan, R. L., Springer, J. P., Smith, J. L. & Zimmerman, S. B. (1984).** [R-(Z)]-4-amino-3-chloro-2-pentenedioic acid, a new antibiotic. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiotics* **37**, 207-210.
- Chan, J. A., Shultis, E. A., Dingerdissen, J. J., DeBrosse, C. W., Roberts, G. D. & Snader, K. M. (1985).** Chlorocardicin, a monocyclic beta-lactam from a *Streptomyces* sp. II. Isolation, physico-chemical properties and structure determination. *J. Antibiotics* **38**, 139-144.
- Chang, C. J., Floss, H. G., Hook, D. J., Mabe, J. A., Manni, P. E., Martin, L. L., Schröder, K. & Shieh, T. L. (1981).** The biosynthesis of the antibiotic pyrrolnitrin by *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Antibiotics* **34**, 555-566.
- Chang, Z., Flatt, P., Gerwick, W., Nguyen, V., Willis, C. & Sherman, D. (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. (1990).** The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing streptomycetes. *Bio/Technol.* **8**, 115-121.
- Chater, K. F. & Bruton, C. J. (1983).** Mutational cloning in *Streptomyces* and the isolation of antibiotic production genes. *Gene* **26**, 67-78.
- Chater, K. F. & Wilde, L. C. (1980).** *Streptomyces albus* G mutants defective in the SalGI restriction-modification system. *J. Gen. Microbiol.* **116**, 323-334.
- Chen, J. L., Moore, R. E. & Patterson, G. M. L. (1991).** Structures of nostocyclophanes A-D. *J. Org. Chem.* **56**, 4360-4364.
- Chen, S., von Bamberg, D., Hale, V., Breuer, M., Hardt, B., Müller, R., Floss, H. G., Reynolds, K. A. & Leistner, E. (1999).** Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin. *Eur. J. Biochem.* **261**, 98-107.
- Chernin, L., Brandis, A., Ismailov, Z. & Chet, I. (1996).** Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Curr. Microbiol.* **32**, 208-212.
- 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.
- Clifton, S., Johnson, S. L., Blumberg, B., Song, J., Hillier, L., Pape, D., Martin, J., Wylie, T., Underwood, K., Theising, B., Bowers, Y., Person, B., Gibbons, M., Harvey, N., Ritter, E., Jackson, Y., McCann, R., Waterston, R. & Wilson, R. (1999).** *Xenopus leavis* gastrula non normalized. WashU *Xenopus* EST project. *accession* [BF614668](#).
- Cline, J., Braman, J. C. & Hogrefe, H. H. (1996).** PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551.

- Cullen, W. P., Celmer, W. D., Chappel, L. R., Huang, L. H. & Maeda, H. (1987).** CP-54,883 a novel chlorine containing polyether antibiotic produced by a new species of *Actinomadura*: taxonomy of the producing culture, fermentation, physico-chemical and biological properties of the antibiotic. *J. Antibiotics* **40**, 1490-1495.
- Dairi, T., Nakano, T., Aisaka, K., Katsumata, R. & Hasegawa, M. (1995).** Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1099-1106.
- Davis, R. W., Botstein, D. & Roth, J. R. (1980).** A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Decker, H., Gaisser, S., Pelzer, S., Schneider, P., Westrich, L., Wohlleben, W. & Bechthold, A. (1996).** A general approach for cloning and characterizing dNDP-glucose dehydratase genes from actinomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 195-201.
- Demain, A. L. (1999).** Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455-463.
- Ding, W., Williams, D. R., Northcote, P., Siegel, M. M., Tsao, R., Ashcroft, J., Morton, G. O., Alluri, M., Abbanat, D., Maiese, W. M. & Ellestad, G. A. (1994).** Pyrroindomycins, novel antibiotics produced by *Streptomyces rugosporus* sp. LL-42D005. I. Isolation and structure determination. *J. Antibiotics* **47**, 1250-1257.
- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M. & Piepersberg, W. (1987).** Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8041-8056.
- Dolata, M. M., Van Beeumen, J. J., Ambler, R. P., Meyer, T. E. & Cusanovich, M. A. (1993).** Nucleotide sequence of the heme subunit of flavocytochrome c from the purple phototrophic bacterium, *Chromatium vinosum*. A 2.6-kilobase pair DNA fragment contains two multiheme cytochromes, a flavoprotein, and a homolog of human ankyrin. *J. Biol. Chem.* **268**, 14426-14431.
- Drechsel (1896).** Contribution to the chemistry of a sea animal. *Z. Biol.* **33**, 85-107.
- Duggar, B. M. (1948).** Aureomycin, a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 177-181.
- Eckhardt, T. (1978).** A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**, 584-588.
- Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P. & Witholt, B. (1990).** Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*: structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J. Mol. Biol.* **212**, 135-142.
- Ehrlich, J., Bartz, Q. R., Smith, R. M., Joslyn, D. A. & Burkholder, P. R. (1947).** Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science* **106**, 417.
- Eichhorn, E., van der Ploeg, J. R. & Leisinger, T. (1999).** Characterization of a two-component alkanesulfonate monooxygenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 26639-26646.

- Eppink, M. H., Schreuder, H. A. & van Berkel, W. J. (1997).** Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding. *Prot. Sci.* **6**, 2454-2458.
- Eustáquio, A. S., Gust, B., Luft, T., Li, S. M., Chater, K. F. & Heide, L. (2003).** Clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces*: identification of the halogenase and generation of structural analogs. *Chem. Biol.* **10**, 279-288.
- Facey, S. J., Groß, F., Vining, L. C., Yang, K. & van Pée, K. H. (1996).** Cloning, sequencing, and disruption of a bromoperoxidase-catalase gene in *Streptomyces venezuelae*: evidence that it is not required for chlorination in chloramphenicol biosynthesis. *Microbiology* **142**, 657-665.
- Falch, B. S., König, G. M., Wright, A. D., Sticher, O., Rügger, H. & Bernardelli, G. (1993).** Ambigol A and B: new biologically active polychlorinated aromatic compounds from the terrestrial blue-green alga *Fischerella ambigua*. *J. Org. Chem* **58**, 6570-6575.
- Falke, K. (2001).** Untersuchungen zur Expression des Halogenasegens *pltM* aus der Pyoluteorinbiosynthese und der Aktivität des Enzyms. Diplomarbeit, Institut für Biochemie, TU Dresden.
- Faust, B., Hoffmeister, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Haag, S., Schneider, P., Decker, H., Kunzel, E., Rohr, J. & Bechthold, A. (2000).** Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tü2717. *Microbiology* **146**, 147-154.
- Fernández, E., Weißbach, U., Sánchez Reillo, C., Brana, A. F., Méndez, C., Rohr, J. & Salas, J. A. (1998).** Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J. Bacteriol.* **180**, 4929- 4937.
- Fernández-Moreno, M. A., Martínez, E., Boto, L., Hopwood, D. A. & Malpartida, F. (1992).** Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *J. Biol. Chem.* **267**, 19278-19290.
- Flecks, S. (2002).** Untersuchungen zu den Halogenierungsschritten der Balhimycin- und Clorobiocin-Biosynthese. Diplomarbeit, Institut für Biochemie, TU Dresden.
- 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.
- Fontecave, M., Eliasson, R. & Reichard, P. (1987).** NAD(P)H:flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*. A ferric iron reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **262**, 12325-12331.
- Friedländer, P. (1909).** Über den Farbstoff des antiken Purpurs aus *Murex brandaris*. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **62**, 765-770.
- Gaisser, S., Böhm, G. A., Cortés, J. & Leadlay, P. F. (1997a).** Analysis of seven genes from the *eryAI-eryK* region of the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* **256**, 239-251.

- Gaisser, S., Trefzer, A., Stockert, S., Kirschning, A. & Bechthold, A. (1997b).** Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. *J. Bacteriol.* **179**, 6271-6278.
- Gaisser, S., Böhm, G. A., Doumith, M., Raynal, M. C., Dhillon, N., Cortes, J. & Leadlay, P. F. (1998).** Analysis of eryBI, eryBIII and eryBVII from the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 78-88.
- Gallo, M. A., Ward, J. & Hutchinson, C. R. (1996).** The *dnrM* gene in *Streptomyces peuceitius* contains a naturally occurring frameshift mutation that is suppressed by another locus outside of the daunorubicin-production gene cluster. *Microbiology* **142**, 269-275.
- 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.
- Gandecha, A. R., Large, S. L. & Cundliffe, E. (1997).** Analysis of four tylosin biosynthetic genes from the tyllM region of the *Streptomyces fradiae* genome. *Gene* **184**, 197-203.
- Gerth, K., Trowitzsch, W., Wray, V., Höfle, G., Irschik, H. & Reichenbach, H. (1982).** Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus* (myxobacterales). *J. Antibiotics* **35**, 1101-1103.
- Gibson, T. J. (1984).** Studies on the Eppstein-Barr virus genome. Ph. D. thesis, Cambridge University, England.
- Goel, A. K., Rajagopal, L., Nagesh, N. & Sonti, R. V. (2002).** Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* **184**, 3539-3548.
- Green, A. A. (1933).** The preparation of acetate and phosphate buffer solutions of known pH and ionic strength. *J. Am. Chem. Soc.* **55**, 2331-2336.
- Gribble, G. W. (1994).** The natural production of chlorinated compounds. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 311-319.
- Gribble, G. W. (1998).** Naturally occurring organohalogen compounds. *Acc. Chem. Res.* **31**, 141-152.
- Groß, F. (1998).** Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen zur Chloramphenicol-Biosynthese in *Streptomyces venezuelae*. Dissertation, TU Dresden.
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C. & Grandi, G. (1998).** Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* **273**, 32857-32863.
- Hamill, R., Elander, R., Mabe, J. & Gorman, M. (1967).** Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*. V. Conversion of tryptophan to pyrrolnitrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**, 388-396.
- Hamill, R. L., Elander, R. P., Mabe, J. A. & Gorman, M. (1970).** Metabolism of tryptophan by *Pseudomonas aureofaciens*. III. Production of substituted pyrrolnitrins from tryptophan analogues. *Appl. Microbiol.* **19**, 721-725.

- Hammer, P. E., Burd, W., Hill, D. S., Ligon, J. M. & van Pee, K. (1999).** Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 39-44.
- Hammer, P. E., Hill, D. S., Lam, S. T., van Pee, K. H. & Ligon, J. M. (1997).** Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2147-2154.
- Harper, D. B. (1985).** Halomethane from halide ion - a highly efficient fungal conversion of environmental significance. *Nature* **315**, 55-57.
- Harper, D. B. & Hamilton, J. T. G. (1988).** Biosynthesis of chloromethane in *Phellinus pomaceus*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2831-2839.
- Harper, D. B., Kennedy, J. T. & Hamilton, J. T. G. (1988).** Chloromethane biosynthesis in poroid fungi. *Phytochemistry* **27**, 3147-3153.
- Harris, C. M., Kopecka, H. & Harris, T. M. (1983).** Vancomycin: structure and transformation to CDP-I. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 6915-6922.
- Hartung, J. (1999).** Die Biosynthese von Barbamid - ein Radikalweg zur "Biohalogenierung"? *Angew. Chem.* **111**, 1287-1289.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Umayam, L., Gill, S. R., Nelson, K. E., Read, T. D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M. D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R. D., Nierman, W. C. & White, O. (2000).** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, 477-483.
- Hill, D. S., Stein, J. I., Torkewitz, N. R., Morse, A. M., Howell, C. R., Pachlatko, J. P., Becker, J. O. & Ligon, J. M. (1994).** Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 78-85.
- Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C. J., Cullum, J. A. & Oliver, S. G. (1989).** Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 272-277.
- Hoffmeister, D., Ichinose, K., Domann, S., Faust, B., Trefzer, A., Dräger, G., Kirschning, A., Fischer, C., Kunzel, E., Bearden, D., Rohr, J. & Bechthold, A. (2000).** The NDP-sugar co-substrate concentration and the enzyme expression level influence the substrate specificity of glycosyltransferases: cloning and characterization of deoxysugar biosynthetic genes of the urdamycin biosynthetic gene cluster. *Chem. Biol.* **7**, 821-831.
- Hohaus, K., Altmann, A., Burd, W., Fischer, I., Hammer, P. E., Hill, D. S., Ligon, J. M. & van Pée, K. H. (1997).** NADH-dependent halogenases are more likely to be involved in halometabolite biosynthesis than haloperoxidases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 2012-2013.
- Hölzer, M. (2000).** Untersuchungen zur Substratspezifität und Regioselektivität der Tryptophan-7-Halogenase und deren Zusammenhang mit der Pyrrolnitrin-Biosynthese. Dissertation, Institut für Biochemie, TU Dresden.

- 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.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M. & Schrempf, H. (1985).** Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Howell, C. R. & Stepanovic, R. D. (1980).** Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* **70**, 712-715.
- Hyun, C., Kim, S. S., Sohng, J. K., Hahn, J., Kim, J. & Suh, J. (2000).** An efficient approach for cloning the dNDP-glucose synthase gene from actinomycetes and its application in *Streptomyces spectabilis*, a spectinomycin producer. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**, 183-189.
- Hyun, C. G., Bang, J. H., Kim, J. W., Han, J. J., Choi, Y. N. & Suh, J. W. (1999a).** Molecular cloning of the genes for deoxyhexose biosynthesis from *Streptomyces griseus*, GrsE. *unpublished AF128273*.
- Hyun, C. G. & Suh, J. W. (1999b).** Isolation of the bluensomycin biosynthetic genes from *Streptomyces bluensis*. *unpublished AF126354*.
- Iguchi, K., Kaneta, S., Mori, K., Yamada, Y., Honda, A. & Mori, Y. (1985).** Chlorovulones, new halogenated marine prostanoids with an antitumor activity from the stolonifer *Clavularia viridis* QUOY and GAIMARD. *Tetrahedron Lett.* **26**, 5787-5790.
- Ikeda, H., Nonomiya, T., Usami, M., Ohta, T. & Omura, S. (1999).** Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9509-9514.
- Imanaka, H., Kousaka, M., Tamura, G. & Arima, K. (1965).** Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. II. Taxonomic studies on pyrrolnitrin-producing strain. *J. Antibiotics (A)* **18**, 205-206.
- Ishikawa, J. & Hotta, K. (1999).** FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 251-253.
- Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., Kempler, C., Jung, G., Berg, G. & Bahl, H. (1996).** Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J. Antibiotics* **49**, 1101-1104.
- Jomon, K., Kuroda, Y., Ajisaka, M. & Sakai, H. (1972).** A new antibiotic, ikarugamycin. *J. Antibiotics* **25**, 271-280.
- Jones, D. T. (1999).** Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**, 195-202.
- Kalbe, C., Marten, P. & Berg, G. (1996).** Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiol. Res.* **151**, 433-439.

- Kanbe, K., Naganawa, H., Nakamura, K. T., Okami, Y. & Takeuchi, T. (1993a).** Thienodolin, a new plant growth-regulating substance produced by a *Streptomyces* strain: II. Structure of thienodolin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 636-637.
- Kanbe, K., Okamura, M., Hattori, S., Naganawa, H., Hamada, M., Okami, Y. & Takeuchi, T. (1993b).** Thienodolin, a new plant growth-regulating substance produced by a streptomycete strain: I. Taxonomy and fermentation of the producing strain, and the isolation and characterization of thienodolin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 632-635.
- Karwowski, J. P., Jackson, M., Theriault, R. J., Barlow, G. J., Coen, L., Hensey, D. M. & Humphrey, P. E. (1992).** Tirandalydigin, a novel tetramic acid of the tirandamycin-streptolydigin type. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and biological activity. *J. Antibiotics* **45**, 1125-1132.
- Katayama, M. (2000).** Synthesis and biological activities of 4-chloroindole-3-acetic acid and its esters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 808-815.
- Kay, R. R. (1998).** The biosynthesis of differentiation-inducing factor, a chlorinated signal molecule regulating *Dictyostelium* development. *J. Biol. Chem.* **273**, 2669-2675.
- Keller, S. (1999).** Reinigung und Charakterisierung der NADH-abhängigen Tryptophan-7-Halogenase aus *Pseudomonas fluorescens*. Diplomarbeit, TU Dresden.
- Keller, S., Wage, T., Hohaus, K., Eichhorn, E. & van Pée, K. H. (2001).** Purification and partial characterization of the tryptophan 7-halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 2300-2303.
- Keller-Schierlein, W., Muntwyler, R., Pache, W. & Zähler, H. (1969).** Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Chlorothricin und Deschlorothricin. *Helv. Chim. Acta* **52**, 127-142.
- Kieser, T. (1984).** Factors effecting the isolation of ccc-DNA from *Streptomyces lividans* and *E.coli*. *Plasmid* **12**, 19-36.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000).** Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Center, Norwich, England.
- Kim, C. G., Yu, T. W., Fryhle, C. B., Handa, S. & Floss, H. G. (1998).** 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC7N units in rifamycin and related antibiotics. *J. Biol. Chem.* **273**, 6030-40.
- 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.
- 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.
- Kling, E. (2001).** Untersuchungen zur Expression eines, dem Monodechloraminopyrrolnitrin-3-Halogenase ähnlichen potentiellen Halogenasegen aus *Actinoplanes* sp. ATCC 33002. Diplomarbeit, Insitut für Biochemie, TU Dresden.

- König, W. A., Krauss, C. & Zähler, H. (1977).** Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen: 6-Chloringenstein und 6,3'-Dichloringenstein. *Helv. Chim. Acta* **60**, 2071-2078.
- Kuczek, K., Pawlik, K., Kotowska, M. & Mordarski, M. (1997).** *Streptomyces coelicolor* DNA homologous with acyltransferase domains of type I polyketide synthase gene complex. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 195-200.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, K. S., Schroeder, D., Veitch, J. M., Matson, J. A. & Forenza, S. (1991).** Isolation of a bromo analog of rebeccamycin from *Saccharothrix aerocolonigenes*. *J. Antibiotics* **44**, 934-939.
- Lam, K. S., Schroeder, D. R., Veitch, J. M., Colson, K. L., Matson, J. A., Rose, W. C., Doyle, T. W. & Forenza, S. (2001).** Production, isolation and structure determination of novel fluorindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *J. Antibiotics* **54**, 1-9.
- Lazarevic, V., Abellan, F. X., Moller, S. B., Karamata, D. & Mael, C. (2002).** Comparison of ribitol and glycerol teichoic acid genes in *Bacillus subtilis* W23 and 168: identical function, similar divergent organization, but different regulation. *Microbiology* **148**, 815-824.
- Lee, S.-C., Williams, G. A. & Brown, G. D. (1999).** Maculalactone L and three halogenated carbazole alkaloids from *Kyrtuthrix maculans*. *Phytochemistry* **52**, 537-540.
- Li, T. B., Shang, G. D., Xia, H. Z. & Wang, Y. G. (2001).** Cloning of the sugar related biosynthesis gene cluster from *Streptomyces tenebrarius* H6. accession AF306787, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **17**, 329-331.
- Linton, K. J., Jarvis, B. W. & Hutchinson, C. R. (1995).** Cloning of the genes encoding thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydratase and thymidine diphospho-4-keto-6-deoxyglucose 3,5-epimerase from the erythromycin-producing *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* **153**, 33-40.
- Liu, H. W. & Thorson, J. S. (1994).** Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 223-256.
- Lombó, F., Siems, K., Brana, A. F., Méndez, C., Bindseil, K. & Salas, J. A. (1997).** Cloning and insertional inactivation of *Streptomyces argillaceus* genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin. *J. Bacteriol.* **179**, 3354-3357.
- 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.
- Madduri, K., Waldron, C. & Merlo, D. J. (2001b).** Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 5632-5638.

- Malpartida, F., Hallam, S. E., Kieser, H. M., Motamedi, H., Hutchinson, C. R., Butler, M. J., Sugden, D. A., Warren, M., McKillop, C., Bailey, C. R., Humphreys, G. O. & Hopwood, D. A. (1987).** Homology between *Streptomyces* genes coding for synthesis of different polyketides used to clone antibiotic biosynthetic genes. *Nature* **325**, 818-821.
- Marminon, C., Facompré, M., Bailly, C., Hickman, J., Pierré, A., Pfeiffer, B., Renard, P. & Prudhomme, M. (2002).** Dimers from dechlorinated rebeccamycin: synthesis, interaction with DNA, and antiproliferative activities. *Eur. J. Med. Chem.* **37**, 435-440.
- Marra, M., Hillier, L., Kucaba, T., Martin, J., Beck, C., Wylie, T., Underwood, K., Steptoe, M., Theising, B., Allen, M., Bowers, Y., Swaller, T., Gibbons, M., Pape, D., Harvey, N., Schurk, R., Ritter, E., Kohn, S., Shin, T., Jackson, Y., Cardenas, M., McCann, R., Waterston, R. & Wilson, R. (1999).** The washU-NCI Mouse EST project. accession [AI426004](#).
- 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.
- Marumo, S., Hattori, H., Abe, H. & Munakata, K. (1968).** Isolation of 4-chloroindolyl-3-acetic acid from immature seeds of *Pisum sativum*. *Nature* **219**, 959-960.
- Maskey, R. P., Grün-Wollny, I., Fiebig, H. H. & Laatsch, H. (2002).** Akashine A, B und C: Neuartige chlorierte Indigoglycoside aus *Streptomyces* sp. GW 48/1497. *Angew. Chem.* **114**, 623-625.
- Mazodier, P., Petter, R. & Thompson, C. (1989).** Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* **171**, 3583-3585.
- McCulloch, N. B. (1949).** Laboratory tests in the diagnosis of brucellosis. *Amer. J. of Public Health* **39**, 866-869.
- Méndez, C. & Salas, J. A. (2001).** Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends Biotechnol.* **19**, 449-456.
- Metsä-Ketelä, M., Salo, V., Halo, L., Hautala, A., Hakala, J., Mantsala, P. & Ylihonko, K. (1999).** An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 1-6.
- Moreau, P., Anizon, F., Sancelme, M., Prudhomme, M., Severe, D., Riou, J.-F., Goossens, J.-F., Hénichart, J.-P., Bailly, C., Labourier, E., Tazzi, J., Fabbro, D., Meyer, T. & Aubertin, A. M. (1999).** Synthesis, mode of action, and biological activities of rebeccamycin bromo derivatives. *J. Med. Chem.* **42**, 1816-1822.
- Morona, J. K., Morona, R. & Paton, J. C. (1997).** Molecular and genetic characterization of the capsule biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* type 19B. *J. Bacteriol.* **179**, 4953-4958.
- Morris, D. R. & Hager, L. P. (1966).** Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **241**, 1763-1768.
- Morrison, M. & Schonbaum, G. R. (1976).** Peroxidase-catalyzed halogenation. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 861-888.

- Morton, G. O., Lancaster, J. E., van Lear, G. E., Fulmor, W. & Meyer, W. E. (1969).** The structure of nucleocidin. III (a new structure). *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 1535-1537.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Nadkarni, S. R., Patel, M. V., Chaterjee, S., Vijayakumar, E. K. S., Desikan, K. R., Blumbach, J. & Ganguli, B. N. (1994).** Balhimycin, a new glycopeptide antibiotic produced by *Amycolytopsis* sp. Y-86.21022. *J. Antibiotics* **47**, 334-341.
- Narayanan, S., Iyengar, M. R., Ganju, P. L., Rengaraju, S., Shomura, T., Tsuruoka, T., Inouye, S. & Niida, T. (1980).** γ -Chloronorvaline, a leucine analog from *Streptomyces*. *J. Antibiotics* **33**, 1249-1255.
- Narkowicz, C. K., Blackman, A. J., Lacey, E., Gill, J. H. & Heiland, K. (2002).** Convolutindole A and convolutamine H, new nematocidal brominated alkaloids from the marine bryozoan *Amathia convoluta*. *J. Nat. Prod.* **65**, 938-941.
- Nashiru, O., Zechel, D., Stoll, D., Mahammadzadeh, T., Warren, R. A. & Withers, S. G. (2001).** β -Mannosynthase: synthesis of β -mannosides with a mutant β -mannosidase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 417-420.
- Naumann, K. (1999).** Influence of chlorine substituents on biological activity of chemicals. *J. Prakt. Chem.* **341**, 417-435.
- Nettelton, D. E., Doyle, T. W., Krishnan, B., Matsumoto, G. K. & Clardy, J. (1985).** Isolation and structure of rebeccamycin: a new antibiotic from *Nocardia aerocolonigenes*. *Tetrahedron Lett.* **26**, 4011-4014.
- 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.
- Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Alley, M. R., Ohta, N., Maddock, J. R., Potocka, I., Nelson, W. C., Newton, A., Stephens, C., Phadke, N. D., Ely, B., DeBoy, R. T., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M. L., Haft, D. H., Kolonay, J. F., Smit, J., Craven, M. B., Khouri, H., Shetty, J., Berry, K., Utterback, T., Tran, K., Wolf, A., Vamathevan, J., Ermolaeva, M., White, O., Salzberg, S. L., Venter, J. C., Shapiro, L., Fraser, C. M. & Eisen, J. (2001).** Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4136-4141.
- 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. G. & Murphy, C. D. (2002).** Biosynthesis of an organofluorine molecule. *Nature* **416**, 279.
- Okanishi, M., Suzuki, K. & Umezawa, H. (1974).** Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80**, 389-400.

- Olano, C., Rodriguez, A. M., Michel, J. M., Méndez, C., Raynal, M. C. & Salas, J. A. (1998).** Analysis of a *Streptomyces antibioticus* chromosomal region involved in oleandomycin biosynthesis, which encodes two glycosyltransferases responsible for glycosylation of the macrolactone ring. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 299-308.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y. & Hattori, M. (2001).** Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12215-12220.
- Orjala, J. & Gerwick, W. H. (1996).** Barbamide, a chlorinated metabolite with molluscicidal activity from the caribbean cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.* **59**, 427-430.
- Otten, S. L., Liu, X., Ferguson, J. & Hutchinson, C. R. (1995).** Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius* *dnrQS* genes encoding a daunosamine biosynthesis enzyme and a glycosyl transferase involved in daunorubicin biosynthesis: Regulation of daunorubicin production in *Streptomyces peucetius* by the *dnrR2* locus. *J. Bacteriol.* **177**, 6688-6692.
- Oxford, A. E., Raistrick, H. & Simonart, P. (1939).** Studies in the biochemistry of microorganisms. LX. Griseofulvin, C₁₇H₁₇O₆Cl, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Biochem. J.* **33**, 240-248.
- Pelzer, S., Reichert, W., Huppert, M., Heckmann, D. & Wohlleben, W. (1997).** Cloning and analysis of a peptide synthetase gene of the balhimycin producer *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908 and development of a gene disruption/replacement system. *J. Biotechnol.* **56**, 115-128.
- Pelzer, S., Süßmuth, R., Heckmann, D., Recktenwald, J., Huber, P., Jung, G. & Wohlleben, W. (1999).** Identification and analysis of the balhimycin biosynthetic gene cluster and its use for manipulating glycopeptide biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1565-1573.
- Peters, A. R. & Shorthouse, M. (1972).** Fluorocitrate in plants and food stuffs. *Phytochemistry* **11**, 1337-1338.
- Pettit, G. R. (1994).** Marine animal and terrestrial plant anticancer constituents. *Pure & Appl. Chem.* **66**, 2271-2281.
- Pettit, G. R., Cichacz, Z. A., Herald, C. L., Gao, F., Boyd, M. R., Schmidt, J. M., Hamel, E. & Bai, R. (1994).** Antineoplastic Agents 300. Isolation and structure of the rare human cancer inhibitory macrocyclic lactones spongistatins 8 and 9. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1605-1606.
- Petty, M. A. (1961).** An introduction to the origin and biochemistry of microbial halometabolites. *Bacteriol. Rev.* **25**, 111-130.
- Pirae, M. (2002).** Chlorination genes of chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. Ph.D. thesis, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada.

Pirae, M. & Vining, L. C. (2002). Use of degenerate primers and *touch down* PCR to amplify a halogenase gene fragment from *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1-5.

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

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* NRRL 15009. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8962-8967.

Prudhomme, M. (2000). Recent developments of rebeccamycin analogues as topoisomerase I inhibitors and antitumor agents. *Curr. Med. Chem.* **7**, 1189-1212.

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.

Quiros, L. M., Aguirrezabalaga, I., Olano, C., Méndez, C. & Salas, J. A. (1998). Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* **28**, 1177-1185.

Rahbæk, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P. H. & Petersen, B. O. (1996). Marine alkaloids. 18. Securamines and securines, halogenated indole-imidazole alkaloids from the marine bryozoan *Securiflustra securifrons*. *J. Org. Chem.* **61**, 887-889.

Rahbæk, L. & Christophersen, C. (1997). Marine alkaloids. 19. Three new alkaloids, securamines E-G, from the marine bryozoan *Securiflustra securifrons*. *J. Nat. Prod.* **60**, 175-177.

Raty, K., Kunnari, T., Hakala, J., Mantsala, P. & Ylihonko, K. (2000). A gene cluster from *Streptomyces galilaeus* involved in glycosylation of aclarubicin. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 164-172.

Rawlings, B. J. (2001). Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A--erythromycin biosynthesis). *Nat. Prod. Rep.* **18**, 190-227.

Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Hopwood, D. A. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**, 77-96.

Reid, K. A., Hamilton, J. T. G., Bowden, R. D., O'Hagan, D. & Dasardi, L. (1995). Biosynthesis of fluorinated secondary metabolites by *Streptomyces cattleya*. *Microbiology* **141**, 1385-1393.

Rossmann, M. G., Moras, D. & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194-199.

- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R. & Sivonen, K. (2000).** Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol. Microbiol.* **37**, 156-167.
- Ruan, X., Pereda, A., Stassi, D. L., Zeidner, D., Summers, R. G., Jackson, M., Shivakumar, A., Kakavas, S., Staver, M. J., Donadio, S. & Katz, L. (1997a).** Acyltransferase domain substitutions in erythromycin polyketide synthase yield novel erythromycin derivatives. *J. Bacteriol.* **179**, 6416-6425.
- Ruan, X., Stassi, D., Lax, S. A. & Katz, L. (1997b).** A second type-I PKS gene cluster isolated from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, a rapamycin-producing strain. *Gene* **203**, 1-9.
- Russ, R., Rau, J. & Stolz, A. (2000).** The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1429-1434.
- Ruvkun, G. B. & Ausubel, F. M. (1981).** A general method for site directed mutagenesis in procaryotes. *Nature* **289**, 85-88.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sakuma, M. & Fukami, H. (1993).** Novel steroid glycosides as aggregation pheromone of the german cockroach. *Tetrahedron Lett.* **34**, 6059-6062.
- Salcher, O. & Lingens, F. (1978).** Biosynthese von Pyrrolnitrin. Nachweis von 3-Chloranthranilsäure und 7-Chlorindolessigsäure im Kulturmedium von *Pseudomonas aureofaciens*. *Tetrahedron Lett.* **34**, 3101-3102.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanada, M., Miyano, T., Iwadare, S., Williamson, J. M. & Arison, B. H. (1986).** Biosynthesis of fluorothreonine and fluoroacetic acid by the thienamycin producer, *Streptomyces cattleya*. *J. Antibiotics* **39**, 259-265.
- Sánchez, C., Butovich, I. A., Brana, A. F., Rohr, J., Méndez, C. & Salas, J. A. (2002).** The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin. Characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem. Biol.* **9**, 519-531.
- Sand, P., Kavvadias, D., Feineis, D., Riederer, P., Schreier, P., Kleinschnitz, M., Czygan, F.-C., Abou-Mandour, A., Bringmann, G. & Beckmann, H. (2000).** Naturally occurring benzodiazepines: current status of research and clinical implications. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **250**, 1-9.
- Sangameswaran, L. & de Blas, A. L. (1985).** Demonstration of benzodiazepine-like molecules in the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5560-5564.
- Sangameswaran, L., Fales, H. M., Friedrich, P. & De Blas, A. L. (1986).** Purification of a benzodiazepine from bovine brain and detection of benzodiazepine-like immunoreactivity in human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9236-9240.

- Schaffrath, C., Cobb, S. L. & O'Hagan, D. (2002).** Cell-free biosynthesis of fluoroacetate and 4-fluorothreonine in *Streptomyces cattleya*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **114**, 4069-4071.
- Schimana, J., Fiedler, G., Groth, I., Süßmuth, R., Beil, W., Walker, M. & Zeeck, A. (2000).** Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiotics* **53**, 779-787.
- Schnerr, H. (1999).** Klonierung und Sequenzierung eines potentiellen Halogenasegens der Thienodolinbiosynthese aus *Streptomyces albogriseolus*. Diplomarbeit, Institut für Biochemie, TU Dresden.
- Schupp, T., Toupet, C., Engel, N. & Goff, S. (1998).** Cloning and sequence analysis of the putative rifamycin polyketide synthase gene cluster from *Amycolatopsis mediterranei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **159**, 201-207.
- Schwecke, T., Aparicio, J. F., Molnár, I., König, A., Khaw, L. E., Haydock, S. F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortés, J., Lester, J. B., Böhm, G. A., Staunton, J. & Leadlay, P. F. (1995).** The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7839-7843.
- Seed, B., Parker, R. C. & Davidson, N. (1982).** Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion. *Gene* **19**, 201-209.
- Shaw, P. D. & Hager, L. P. (1959).** An enzymatic chlorination reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1011-1012.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1974).** The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1342-1346.
- Shortle, D., Haber, J. E. & Botstein, D. (1982).** Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. *Science* **217**, 371-373.
- Silakowski, B., Nordsiek, G., Kunze, B., Blocker, H. & Müller, R. (2001).** Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: the myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sga15. *Chem. Biol.* **8**, 59-69.
- Simon, R., Prierer, U. & Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technol.* **1**, 784-790.
- Sims, J. J. (1974).** Marine natural products: Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. *Tetrahedron Lett.* **39**, 3487-3490.
- Singh, M. P., Petersen, P. J., Jacobus, N. V., Mroczenski-Wildey, M. J., Maiese, W. M., Greenstein, M. & Steinberg, D. A. (1994).** Pyrroindomycins, novel antibiotics produced by *Streptomyces rugosporus* LL-42D005. II. Biological activities. *J. Antibiotics* **47**, 1258-1265.

- Sitachitta, N., Márquez, B. L., Williamson, R. T., Rossi, J., Roberts, M. A., Gerwick, W. H., Nguyen, V. & Willis, C. L. (2000).** Biosynthetic pathway and origin of the chlorinated methyl group in barbamide and dechlorobarbamide, metabolites from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Tetrahedron* **56**, 9103-9113.
- Sitachitta, N., Rossi, J., Roberts, M. A., Gerwick, W. H., Fletcher, M. D. & Willis, C. L. (1998).** Biosynthesis of the marine cyanobacterial metabolite barbamide. I. Origin of the trichloromethyl group. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7131-7132.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spande, T. F., Garraffo, H. M., Edwards, M. W., Yeh, H. J. C., Pannell, L. & Daly, J. W. (1992).** Epibatidine: a novel (chloropyridyl)azabicycloheptane with potent analgesic activity from an ecuadorian poison frog. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3475-3478.
- 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.
- Stahl, E. & Kaldewey, H. (1961).** Spurenanalyse physiologisch aktiver, einfacher Indolderivate. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **323**, 182-191.
- Steffensky, M., Mühlenweg, A., Wang, Z. X., Li, S. M. & Heide, L. (2000).** Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1214-1222.
- Stemmer, W. P. (1994).** DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10747-10751.
- Strohl, W. R. (1992).** Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* **20**, 961-974.
- Summers, R. G., Donadio, S., Staver, M. J., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C. R. & Katz, L. (1997).** Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiology* **143**, 3251-3262.
- Suzuki, T., Honda, H. & Katsumata, R. (1972).** Production of antibacterial compounds analogous to chloramphenicol by *n*-paraffin-grown bacterium. *Agr. Biol. Chem.* **36**, 2223-2228.
- Tautz, D. & Renz, M. (1983).** An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* **132**, 14-19.
- Theobald, U., Schimana, J. & Fiedler, H. P. (2000).** Microbial growth and production kinetics of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**, 307-313.
- Thompson, C. J., Ward, J. M. & Hopwood, D. A. (1982).** Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. *J. Bacteriol.* **151**, 668-677.

Tölzer, S. (1998). Biochemische und molekulargenetische Untersuchungen an bakteriellen Nicht-Häm-Haloperoxidasen und einer strukturverwandten Arylesterase. Dissertation, TU Dresden.

Trefzer, A., Pelzer, S., Schimana, J., Stockert, S., Bihlmaier, C., Fiedler, H. P., Welzel, K., Vente, A. & Bechthold, A. (2002). Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1174-1182.

Trefzer, A., Salas, J. A. & Bechthold, A. (1999). Genes and enzymes involved in deoxysugar biosynthesis in bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 283-299.

Trowitzsch-Kienast, W., Forche, E., Wray, V., Reichenbach, H., Jurkiewicz, E., Hunsmann, G. & Höfle, G. (1992). Phenalamide, neue HIV-1-Inhibitoren aus *Myxococcus stipitatus* Mx s40. *Liebigs Ann. Chem.* **16**, 659-664.

Tung, W. L. & Chow, K. C. (1995). A modified medium for efficient electrotransformation of *E.coli*. *Trends Genet.* **11**, 128-129.

Unversucht, S. (2000). Die biochemische Charakterisierung der Tryptophan-7-Halogenase aus *Pseudomonas fluorescens*. Diplomarbeit, TU Dresden.

Vairappan, C. S., Daitoh, M., Suzuki, M., Abe, T. & Masuda, M. (2001). Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry* **58**, 291-297.

Vallon, O. (2000). New sequence motifs in flavoproteins: evidence for common ancestry and tools to predict structure. *Proteins* **38**, 95-114.

van der Merwe, K. J., Steyn, P. S. & Fourie, L. (1965). Mycotoxins. II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.* **168**, 7083-7088.

van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B. & Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* **205**, 1112-1113.

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

van Pée, K. H. & Ligon, J. M. (2000). Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenylpyrrole derivatives by bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **17**, 157-164.

van Pée, K. H. (2001). Microbial biosynthesis of halometabolites. *Arch. Microbiol.* **175**, 250-258.

van Pée, K. H., Ludwig-Müller, J. (2002). Halogenated indole derivatives. *Curr. Topics Phytochemistry*, **5**, 1-21.

van Pée, K. H., Salcher, O., Fischer, P., Bokel, M. & Lingens, F. (1983). The biosynthesis of brominated pyrrolnitrin derivatives by *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Antibiotics* **36**, 1735-1742.

- van Pée, K. H. & Zehner, S. (2003). Enzymology and molecular genetics of biological halogenation. in: *The Handbook of environmental chemistry vol.3, part P. Natural production of organohalogen compounds*.ed. by G. Gribble. Springer- Verlag Berlin Heidelberg.
- van Wageningen, A. M. A., Kirkpatrick, P. N., Williams, D. H., Harris, B. R., Kershaw, J. K., Lennard, N. J., Jones, M., Jones, S. J. M. & Solenberg, P. J. (1998). Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* **5**, 155-162.
- Verschueren, K. H., Kingma, J., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Janssen, D. B. & Dijkstra, B. W. (1993). Crystallographic and fluorescence studies of the interaction of haloalkane dehalogenase with halide ions. Studies with halide compounds reveal a halide binding site in the active site. *Biochemistry* **32**, 9031-9037.
- Verschueren, K. H., Seljee, F., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H. & Dijkstra, B. W. (1993). Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* **363**, 693-698.
- Viera, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
- Waldron, C., Madduri, K., Crawford, K., Merlo, D. J., Treadway, P., Broughton, M. C. & Baltz, R. H. (2000). A cluster of genes for the biosynthesis of spinosyns, novel macrolide insect control agents produced by *Saccharopolyspora spinosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**, 385-390.
- Waldron, C., Matsushima, P., Rosteck, P. R., Jr., Broughton, M. C., Turner, J., Madduri, K., Crawford, K. P., Merlo, D. J. & Baltz, R. H. (2001). Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. *Chem. Biol.* **8**, 487-499.
- Wang, L., White, R. L. & Vining, L. C. (2002). Biosynthesis of the dideoxysugar component of jadomycin B: genes in the *jad* cluster of *Streptomyces venezuelae* ISP5230 for L-digitoxose assembly and transfer to the angucycline aglycone. *Microbiology* **148**, 1091-1103.
- Weitnauer, G., Mühlenweg, A., Trefzer, A., Hoffmeister, D., Süßmuth, R. D., Jung, G., Welzel, K., Vente, A., Girreser, U. & Bechthold, A. (2001). Biosynthesis of the orthosomycin antibiotic avilamycin A: deductions from the molecular analysis of the *avi* biosynthetic gene cluster of *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 and production of new antibiotics. *Chem. Biol.* **8**, 569-581.
- Westrich, L., Domann, S., Faust, B., Bedford, D., Hopwood, D. A. & Bechthold, A. (1999). Cloning and characterization of a gene cluster from *Streptomyces cyanogenus* S136 probably involved in landomycin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**, 381-387.
- Whitaker, J. R. & Granum, P. E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* **109**, 156-159.
- Wierenga, R. K., De Maeyer, M. C. H. & Hol, W. G. J. (1985). Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* **24**, 1346-1357.

Wierenga, R. K., Terpstra, P. & Hol, W. G. J. (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**, 101-107.

Williams, D. H., Rajananda, V., Williamson, M. P. & Bojesen, G. (1980). The vancomycin and ristocetin group of antibiotics. *Top. Antibiot. Chem.* **5**, 119-158.

Wright, F. & Bibb, M. J. (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**, 55-65.

Wu, K., Chung, L., Revill, W. P., Katz, L. & Reeves, C. D. (2000). The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene* **251**, 81-90.

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

Yanish-Perron, C., Viera, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-109.

Yu, T. W., Bai, L., Clade, D., Hoffmann, D., Tölzer, S., Trinh, K. Q., Xu, J., Moss, S. J., Leistner, E. & Floss, H. G. (2002). The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7968-7973.

Zechel, D., 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.

Zhang, J.-H., Quigley, N. B. & Gross, D. C. (1995). Analysis of the *syrB* and *syrC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. *J. Bacteriol.* **177**, 4009-4020.

Zotchev, S., Haugan, K., Sekurova, O., Sletta, H., Ellingsen, T. E. & Valla, S. (2000). Identification of a gene cluster for antibacterial polyketide-derived antibiotic biosynthesis in the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Microbiology* **146**, 611-619.

7 Anhang

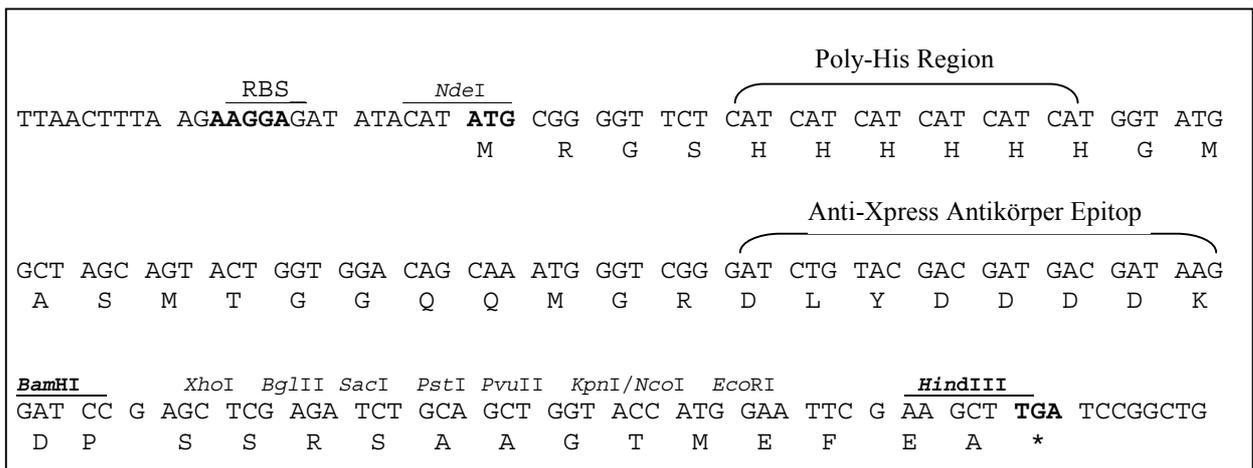


Abb. A.1: Expressionsregion des Vektors pCIBhis:

RBS: Ribosomenbindestelle, Poly-His-Region, Anti-Xpress[®]-Antikörper-Epitop
Klonierung des Halogenasegens *pyrH* in pCIBhis mit *Bam*HI und *Hind*III

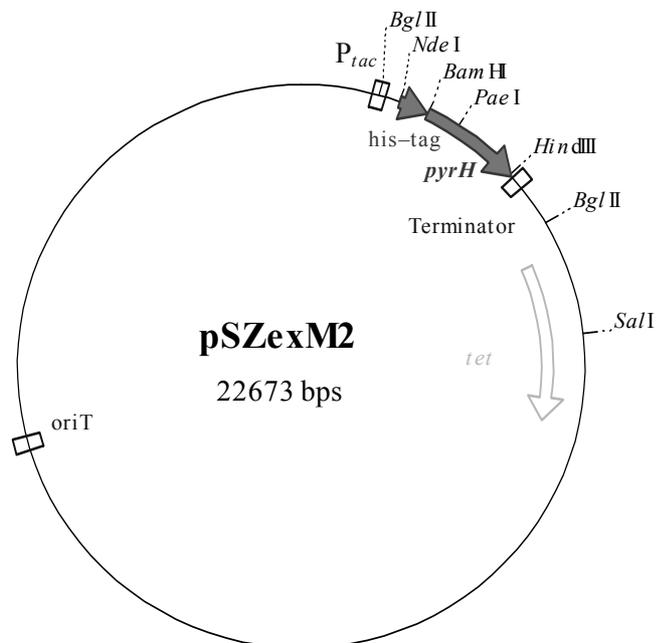


Abb. A.2: Restriktionskarte des Expressionsvektors pSZexM2:

Vektor zur Expression des Tryptophan-5-Halogenase-Gens *pyrH* in *Pseudomonas* sp.

Abb. A.3: Originalsequenzen der pSP-Familie: Subklone aus PKS-positiven Cosmiden.

```
>008-M13un 12_761 of trace file
GGGGATCTTCGACTTCATCGACAACGAGCTCTGAGACGACAGGACGGACGCCCGATGGCC
GACGAGCAGAACTCCGCGACTACCTCAAGCGGGTACCACCACCGCTGCACCAGGCCCGG
CAGCAGGTACGCGACCTGGAGTCCCGCGCCGGGAGCCGATCGCGATCGTCCGCACGGCC
TGCCGGTTCCTCCGGCGGGGTGCGCTCGCCCGGCGACCTGTGGCGGCTGCTCGTCCGACCAG
GGTGACGCCGTACCCGGGTTCCTCCGCAACCGCGGCTGGGACGTGCCCGACGAGCCCGGA
TACGCGGCCGTGCGCGGGTTCCTGCACGACGCGGACGGGTTCGACGCGGAGTTCCTCGGG
ATCTCGCCCGCGAGCGTGGGGATGGACCCGACGAGCGGTTGCTGCTGGAGGTGGCG
TGGGAGACGTTTCGAGCGGGCCGGGATCGACCCGTCGTCGCTGGTGGGGAGCTCGACCGGG
GTGTTCCGCGGGTTCATCGGGCAGGAGTACGCGTCGCTGAGCCGGCCCGGGAACAGCGGG
GCCGAAGGGTACCTGCTGACCGGGGTGGCGACCAGCGTGGCGTCGGGGCGGATCTCGTAC
ACGTTCCGGGCTGGAGGGGCGGGCGGTACCGTGGACACCGCTTGCTCGTCCCTCGCTGGTC
GCCCTGCACCTCGCCGCGCAGGCCCTGCGCAACGGGGACTGCGACCTGGCGCTCGCTGGT
GGGCGACCGTGATGGCGACCCGTCGCCG
```

```
>009-M13un 33_814 of trace file
GGCGGTGCAGTTTGTCACTGAAAAACGCAAAGCGTCAATTTCTGGCGTACAGCGTCAGTT
CCGCATTTGGTTATAACCGTGCAGCGCGTATTATCGAACAGATGGAAGCGCAGGGGATTGT
CAGCGAACAGGGGCACAACGGTAATCGTGAAGTGTGGCCCCACCGCCGTTTGACTAACT
AATGCATCGTATGCCGGATAAGGCGCGGTAGCGTCGCATCCGGCACTCTATCAACTGAAA
ATTAGTATTTTCTTCTTCTCAAGCTGATTATTAGCCTGGAATAGAGAGTAGAGGGAA
CTCCCGATCGGGAGTGACGTAATTTGAGGAATAATGATGAAAAAAATGCCATCACCTGT
GCATTACTCTCAAGCTTAGTAGCAAGCAGCGTTTGGGCTGATGCCGCAAGCGATCTGAAA
AGCCGCTTGATAAAGTCAAGCTCAGCAGCTTCCACGCCAGCTTACACAAAAAGTGACTGACGGT
AGCGGCGCGCGGTGCAGGAAGTCAAGGCGATCTGTGGGTGAAACGTCCAAACCTTATTC
AACTGGCATATGACACAACCTGATGAAAGCATTCTGGTTTCTGACGGTAAAACACTGTGG
TTCTATAACCCGTTTCGTTGAGCAAGCTACGGCAACCTGGCTGAAAGATGCCACCGGTAAT
ACGCCGTTTATGCTGATTGCCCGCAACCAGTCCAGCGACTGGCAGCAGTACAATATCAAA
CAGAAATGGCGATGACTTTGTCTGACGCCGAAAGCCAGCAATGGCAATCTGAAGCAGTTC
AC
```

```
>010-M13un 15_650 of trace file
GGGAGAGACAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTCGGGGAATTCCAA
TTCCACATTTTCAAGAAATAAGGAGGCCAAAAATGTTTCATATATGAATTGGAATTATTTGT
TTTCTTATTAGGCCATCCTGAAGCCAAAGGAAATGAGATCGGAATTCCTCGGGGAATTC
CAATTCACATTTTCAAGAAATAAGGAGGCCAAAAATGTTTCATATATGAATTGGAATTATT
TGTTTTCTTATTAGGCCATCCTGAAGCCAAAGGAAATGAGATCGGAATTCCTCGGGGAA
TTCCAATTCACATTTTCAAGAAATAAGGAGGCCAAAAATGTTTCATATATGAATTGGAATT
ATTTGTTTTCTTATTAGGCCATCCTGAAGCCAAAGGAAATGAGATCGGAATTCCTCGGG
GAATTCCAAATTCACATTTTCAAGAAATAAGGAGGCCAAAAATGTTTCATATATGAATTGGA
ATTATTTGTTTTCTTATTAGGCCATCCTGAAGCCAAAGGAAATGAGATCGGAATTCCTC
GGGGGTACCGAGCTCGAATTCCTTATAGTGTGATCGTATTAATTCGTAATCATGTCATAG
CTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT
```

```
>011-M13un 13_820 of trace file
CCGGGATCCGGTCATATCGGCATCGTTGAACAGCCGATGACCGCCGTCGTCCGTTGCG
GTTTCAGCAATCCGTAACGCTCTGCCACGCGCGTAACGTGACAGGATTAATATCACAAA
GCAACGCCACTTCACCAATTGTGTAAAGCGCCATCGTCTCACCCCTTGCTCGCGAGGTCCC
GGTTTAACTTTAGACGCAGTTTTGCGAACCAGGTAGTTTTGCCCCGTTTTTTGTGCATCTA
TAGGGTGATTTTATTTTGGCCAGGCGATTTGAGTGATCGTACTCACGAATTCCTATTTT
TCTGCAAGAGTTCAAAGAAAGTTAAACGCAGGCAATGTATGTTACGCGTTTTAAAGGGAA
GTGTGGTTTTGCGGGTATGTACGATTTTAAATCTGGTGTGCTGCTGCTTCAGCAGATGTGC
GTTTTTTTAGTCATTGCATGGTTAATGAGTAAACGCCATTAATTCATACCGTTAATGCAG
GTCACGGTTCGTCGCCGATAAAATTTCTCTGCTACATCGTCTTTTCCATCTTCTGCATC
ATGGGCACCTGGTTTTGGGTTGCACATTTGACGATTTCTATTGCCAATACCCGTGCGATAGGC
GCGGTAATGGGCGGCTTACTCGGCGTCCGGTCGTCGGTGGGCTGGTTGGGCTGACCGGC
GGCTTACATCGATATTCGATGGGGGCATGACCGCGTTAAGTTGCATGATCTCGACCATC
GTTGAAGGATTACTCGGTGGCTGGTACACAGCATCCTGATCCGCCGCGGGCGCACTGAT
AAAGTCTTTAACCCCATACCGCCGGTG
```

>012-M13un 12_814 of trace file
CCGGGGATCTATCGACGACGGTGGGGAAGAGCGATGGCGCAGAACGATGAGAACTGCTC
GCGTACCTCAAGAAGGTGACGACCGACCTGCGCCAGACGAGCGGCGTCTCCAGCAGGTG
GAGGGCGCGCCACGAGCCGATCGCGATCGTTCGGCATGGCCCGCGGTTCCCCGGCGGG
GTGCGGTGCGCCGGCGACCTGTGGCGGTGCTCGTTCGACAGGGTGACGCCATCTCCGAC
TTCCCCGGCAACCGCGGCTGGGACGTTCGACCGCATCTACGACCCCGAGCCGGGCTTCCC
GGCAAGACGTATGTCCGGCACGGCGGTTTCTTGCACGACGCGGACGGGTTTCGACGCGGAG
TTCTTCGGGATCTCGCCGCGGAGGCGTTGGGGATGGATCCGCAGCAGCGGTTGCTGCTG
GAGGTGGCGTGGGAGACGTTTCGAGCGGGCGGGGATCGACCCGGCGTTCGCTGGTGGGGAGC
TCGACCGGGGTGTTTCGCCGGGCTGGGCGGGCAGGAGTACGTCTCGCTGCGCGGCCCATG
CCGGAGAGCGCCGAGGGCTACCTCATGGCGAGCGGTCACCTGAGCATCGCGTCCGGGCGG
ATCTCGTACACGTTTCGGCTTCGAGGGGCTTCGGGTGAGCATCGACACGGCGTTCGCTCG
TCGCTGGTGGCCCTGCACCTCGCCGCGCAGGCCCTGCGCAACGGCGAGTGCACCTGGCG
CTGGCGGGCGGCGTACCGTGATGGCGACGCTTCGGGTTTCGTGGAGTTCACCGGCAGC
GCGGGCTTCGATCCGACGGCCG

>013-M13un 14_347 of trace file
CCGGGGAATCATCCCCAACGCTTCGCGCGGCGAGATCCCGAAGAACTCCGCGTCGAACCC
GTCCGCGTTCGTGACGAAACCGCCGTGCGGACATACTCTTGCCGGGAAGGCCCGGCTC
GGGGTCGTAGATCGCGTCGACGTCCAGCCGCGGTTGCGGGGAAGTCGGAGATGGCGTC
ACCCTGGTCGACGAGCAGCCGCCACAGGTTCGCGGGCGACCGCACCCCGCGGGGAACCG
GCAGGCCATGCCGACGATCGGATCGGCTCGTGGCGCGGCCCTCACCTGCTGGAGACG
CCGCTGCGTTCGGCGCAGGTTCGCTCGTACCTTC

>014-M13un 11_747 of trace file
CGGGGATCTTCGACTTCATCGACAACGAGCTCTGAGACGACAGGACGGACGCCCGATGGC
CGACGAGCAGAACTCCGCGACTACCTCAAGCGGGTCACCACCGACCTGCACCAGGCCCG
GCAGCAGGTACGCGACCTGGAGTCCCGCGCCGGGAGCCGATCGCGATCGTTCGGCACGGC
CTGCCGGTTCGCCGGCGGGTTCGCTCGCCGCGACCTGTGGCGGCTGCTCGTTCGACCA
GGGTGACGCCGTCACCGGTTCCCGCGAACCGCGGCTGGGACGTGCCCGACGAGCCCGG
ATACCGGCCCGTTCGGCGGTTCTTGCACGACGCGGACGGGTTTCGACGCGGAGTTCCTTCGG
GATCTCGCCGCGCGAGGCGTTGGGGATGGACCCCGCAGCAGCGGTTGCTGCTGGAGGTGGC
GTGGGAGACGTTTCGAGCGGGCCGGGATCGACCCGTCGTCGCTGGTGGGGAGCTCGACCGG
GGTGTTCGCCGGGGTTCATCGGGCAGGAGTACGCGTTCGCTGAGCCGGCCCGGGAACAGCGG
GGCCGAAGGGTACCTGCTGACCGGGGTGGCGACCGAGCGTGGCGTTCGGGGCGGATCTCGTA
CACGTTTCGGGCTGGAGGGGCGGCGGTCACCGTGGACACCGCTTGTCTCGTCCCTCGTGGT
CGCCCTGCACCTCGCCGCGCAGGCCCTGCGCAACGGGGACTGCGACCTGGCGCTCGCTGG
TGGGGCGACCGTGATGG

>015-M13un 12_770 of trace file
CGGGGATCGCAGCAGCGGTTGCTGCTGGAGGTGGCGTGGGAGACGTTTCGAGCGGGCGGGG
ATCGACCCGGCGTTCGTTGGTGGGAGCTCGACCGGGGTGTTTCGCCGGGCTGGGCGGGCAG
GAGTACGTCTCGCTGCGCGGCCATGCCGGAGAGCGCCGAGGGCTACCTCATGGCGAGC
GCGTCACTGAGCATCGCGTCCGGGCGGATCTCGTACACGTTTCGGCTTCGAGGGGCTTCG
GTGAGCATCGACACGGCGTTCGTCGTCGCTGGTGGCCCTGCACCTCGCCGCGCAGGCC
CTGCGCAACGGCGAGTGCAGCTGGCGCTGGCGGGCGGCGTGACCGTGATGGCGACGCT
GCCGGGTTTCGTGGAGTTCAGCAGGCAGCGGGGTTGCATCCGACGCGCGGTGCAAGCCG
TTCGCCCGCCCGCCGACGGCGTTCGGTGGGGCGAGGGCATCGGGCTCCTGCTGGTTCGAA
CGGCTCTCGGACGCCCCCGCAACGGGCACCGGCTACTGGCGGTGCTGCGCGGCAGCGCG
ATCAACCAGGACGGCGCCAGCAACGGCCTCACCGCCCCGAACGGGGCCCTCCAGCAGCGG
GTCATCCGGGCGCTCTCGCCAACGCCCCGCTGACCGTGGACGACGTGGACGTCGTCGAA
GCCCACGGCACCGGAACACATTGGGCGACCCGATCGAGGCCCAAGCCCTGCTCGCCACC
TACGGCCAGAGGTTCGGGACACCCGCTGCTCCTGGGCTCG

>016-M13un 11_674 of trace file
CGGGGATCTTCGACTTCATCGACAACGAGCTCTGAGACGACAGGACGGACGCCCGATGGC
CGACGAGCAGAACTCCGCGACTACCTCAAGCGGGTCACCACCGACCTGCACCAGGCCCG
GCAGCAGGTACGCGACCTGGAGTCCCGCGCCGGGAGCCGATCGCGATCGTTCGGCACGGC
CTGCCGGTTCGCCGGCGGGTTCGCTCGCCGCGACCTGTGGCGGCTGCTCGTTCGACCA
GGGTGACGCCGTCACCGGTTCCCGCGAACCGCGGCTGGGACGTGCCCGACGAGCCCGG
ATACCGGCCCGTTCGGCGGTTCTTGCACGACGCGGACGGGTTTCGACGCGGAGTTCCTTCGG

```
GATCTCGCCGCGCGAGGCGTTGGGGATGGACCCGACGAGCGGTTGCTGCTGGAGGTGGC
GTGGGAGACGTTTCGAGCGGGCCGGGATCGACCCGTCGTCGCTGGTGGGAGCTCGACCCG
GGTGTTCGCCGGGTTCATCGGGCAGGAGTACGCGTCGCTGAGCCGGCCCGGAACAGCGG
GGCCGAAGGGTACCTGCTGACCGGGGTGGCGACCAGCGTGGCGTCGGGGCGGATCTCGTA
CACGTTTCGGGCTGGAGGGGCCGGCGGTACCCTGGACACCGCTTGCTCGTCCTCGCTGGT
CGCC
```

```
>017-M13un 10_822 of trace file
CCCCGGGATCCGCATCAACAAGCGCGTGCCCCGACTGGTGAGCGTACTGCCTAATGGCCC
GGTTTATCATCCAACGGTCAATGCCTTTATGGCAGGTGGTGTGCCGGAAGTCATGTTGCA
TCTGCGCAGCCTCGGATTTGTTGCATGAAGACGTTATGACGGTTACCGGCAGCACGCTGAA
AGAAAACCTCGACTGGTGGGAGCACCTCCGAACGGCGTCAGCGGTTCAAGCAACTCCTGCT
CGATCAGGAACAAATCAACGCTGACGAAGTGATCATGTCTCCGCAGCAAGCAAAAGCGCG
CGGATTAACCTCAACTATCACCTTCCCGGTGGGCAATATTGCGCCAGAAGGTTTCGGTGAT
CAAATCCACCGCCATTGACCCCTCGATGATTGATGAGCAAGGTATCTATTACCATAAAGG
TGTGGCGAAGGTTTATCTGTCCGAGAAAAGTGCGATTTACGATATCAAACATGACAAGAT
CAAGGCGGGCGATATTTCTGGTCATTATTGGCGTTGGACCTTCAGGTACAGGGCATGGAAG
AAACCTACCAGGTTACCAGTGCCCTGAAGCATCTGTCTATACGGTAAGCATGTTTCGTTAA
TCACCGATGCACGTTTCTCGGGCGTTTCTACTGGCGCGTGCATCGGCCATGTGGGGCCAG
AAGCGCTGGCCGAGGCCCCATCGGTAAATTACGCACCGGGGATTTAATTGAAATTAATA
TTGATTGTGCGGAGCTTACGGCGAAGTCAATTTCTCGGAACCCGTAGCGATGAACAAT
TACCTTCACAGGAGGAGGCAACTGCAATATTA
```

```
>018-M13re 15_535 of trace file
CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCTGCGGGACCGCTGAGTTCGCGGTCGATCAGGGCGAAG
ACCTCCTCGGCCGAGGCGTCTTCCAGCCCTTCGTCGGGTTTCGTCGGATTTCGGCTCTGAGC
TTCCAGAGCAGGGCTTCCAGCCGGGCGACGAGCGCCGGTTCGGTCGCCAGCTCGTCGACC
CCCTGCTCCAGGGCGGCCAGCCCGTCACGCGTCGGCGACGCTGCGCGGGTGCGAACTCC
GCCCTGAGCGCTCGGCCAGCGCCAGCGGCGTTCGGTGGTTCGTAGATCAGGCTCGCGGGC
AGGCGCAGCCCGTTCGCCGCGTTGAGCCGGTTCGCGCAGCTCGACGGCGGTCATCGAGTCG
AACCCGAGCTCCTTGAAGGGCCGCCGTCGGGCACCTCGCCGCCCGACCGGAGGTGCAGG
ACGTTTCGCGGCTTCGGCCCGTACCAGGTCAGCAGCGTCCGTGCTCGCTCCTCGGACGTC
AGTACGGCCATCCGCTCCCCGAACCGGTCGCCGGTCTCCCC
```

```
>019-M13re 13_753 of trace file
GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCATACTTCCAGGTCGTAAGTTTTGCAAGCGCCAAA
GCCCATGTGCGCCAGTCAAAGGATGATTTTACGGTACGGCAGGCCAGCAACTGCAGGAC
TTTTTCTGCATGACCAGTTCATCTTCCAGCGCCGCCATTGAGTCTTCTGGGCGCACGAT
CTGCACCATTTCAACTTTGTGCGAAGTGGTGCATACGGATCAGACCACGGGTGTCACGACC
ATATGAACCGGCTTCAGAACGGAAGCATGGGGTGTGGGCGGTCATCTTAATTGGCAGATC
ATCTTCATCGATGATTTACCGCGCACAGGTTAGTCAGCGGAACCTTCTGCCGTTGGGAT
CAGCGCATAGTTACTGGTGTCTGCTTCTTCCAGCGGACGAGTATGGAACAGATCGCC
AGCAAATTTCCGGCAGTTGACCCGTACCGTACAGCGTGTCTGGTTAACCAGGTACGGAAC
ATAGTTCTCACTGTAGCCATGCTGTTCCGGTATGCAGATCCAGCATAAACTGCGACAGTGC
GCGGTGCATGCGAGCAATCTGCCCTTTCATTACCACAAAGCGGGAACAGTCAGCTTAAC
TGCAGCTGCAAAGTCGAGGCCAGAGTGCATTTACCCAGCGTCACGTGGTCACGAACCTT
AAAGTCAAACCTACGCGGGGTACCCAGCGGCTGACTTCAACGTTGTCAATTTTCGTCCTT
ACCTACCGGCACTTCATCTGC
```

```
>021-M13re 17_808 of trace file
CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGGCAATCTGGCTGGAAGAACTGGCTACCCTTCCCGA
TGCTACCCGCAAACGCGCACAGGCGCTGGTCGCTAAAGGCATCACCATTGAGTTGTTCTG
TGCGCCGGGTGAAATTCCTCTGCCCGCTTACCAGTACGCGATGTGCGTTTTTTATTCCCG
CAGCAGTATTGTTTTGCCCCGTTGTGATTTGATTGATTTGAAGGCACACTTTGCGAACATGTCGT
ACTGGCGGTACAGGCCCTTCGTCGAGGCCAAAGCGCAGCAAGCAGAATTTAACCATTTAAT
CTGGCAGATGCGCAGCGAACACGTCACATCATCTGACGATCCGTTTGGCAGCGAAGAAGG
CAACGCGTGTGTCATATGTTTCAGCAATTAAGCCAGACATTTATGGCTTGGCGGCATCAG
CCAGCCGCTCATCCATTACGAGGCAGCATTTCAACCGCGCATTTGCAGGCGGCAGAGACCTG
CAACTGGCGCTGGGTGAGTGAATCGCTACGGCAACTGCGCGCCAGCGTTGATGCCTTCCA
CGCCCGCGCCAGCCACTATAATGCCGGAGAATGCTTACATCAGCTTGGCGCATTAACAG
TCGATTAATTTGCGCACAAAGAGATGGCCCCGGCGCAGAGTATTGGTGAAGTTCTCTCTGT
```

GCCGTGGCGCACGGTTCGTTGGCTCTGGCATTGCCGGAGAAGCAAAGCTTGATCATCTGCG
GCTGGTGTCTTTAGGTATGCGTTGCTGGCAGGATATTGAGCATTATGGTTTACGCATCTG
GTTTACCGATCC

>022-M13re 16_814 of trace file

CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCCGACGACACCGGCGGCGACTCGCACGGCAGCAGG
ATCGTCACCGGCGGCTGCGCGCCGTTCTCCAGCGCGTGCAGCGAGCGCCGCGAGGGAGGGA
TAGGCGGTGACCGACACCTGCGGGGTGTCCGAGACGGACAGATCGTCCAGGATCGCGATC
GGGCCCCGCCCGCAGGCGGGTGGGGTGGCAGCGCCGTCCACGCCACCTGGAACAGCGCG
TCGGTTCGTGGAGAGCCCGCCAGGCGTGACCGGCCGGGTCCGCGAGCGCGCCGACCGTTCGCG
ACCGGAACCCCCGCGTCCGTCCGCGAGCGCCACCGCGCCCTCCGGCTCCAACCGCACCCGC
AGCACCGGCGTGGCCGGCCCGTGCACGCTGACCGCCGACCACGAGAACGGCAGCCGCAAC
TCGGCCGACTCCACCGCCGACGCGTGCAGCGCGCCGTCCAGCAGGGCCGGATGTACGGCG
AAGCCGCCCCGCGTCCGCCACCTCGACCTCGGCGAACAGCACCCCTCGGATCGCCAGACC
GCCCCGAGCGTGCAGAACCGCGGGCGTACTCGTAGCCGCGCAGCGACAGCAGCTCGTAG
AAGTCGGCGAGGTCCAGCCGTTCCGCCCTGGCGGCGGCCATGCCGTTCAGCGCCACGGGC
TCGCCTCCGTTCGCGCTCGGCGACGCCCTCGGCGTGTGGACCCACTCGGCGGACTCCTCG
CGTTCGCGAGTGGATCGCGATCGTCCCTCGCCGTCCACGGTACCCGTACTGGACGGCGT
TGTCCAGGACCAGCGGGGT

>023-M13re 13_816 of trace file

GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCTGCGGGACCGCTGAGTTCGCGGTTCGATCAGGGCGA
AGACCTCCTCGGCCGAGGCGTCTTCCAGCCCTTCGTTCGGTTCGTTCGATTCGGCTCTGA
GCTTCCAGAGCAGGGCTTCCAGCCGGGCGAGAGCGCCGGTTCGTCGCCAGCTCGTCGA
CCCCCTGCTCCAGGGCGGCCAGCCGTCACGCGTCCGGCGACGCCCTGCGCGGGTGCAGACT
CCGCCCTGAGCGCTCGGCCAGCGCCAGCGGCGTCCGGTGGTTCGTAGATCAGGCTCGCGG
GCAGGCGCAGCCGGTTCGCCGCTTTCGAGCCGGTTCGCGAGCTCGACGGCGGTTCATCGAGT
CGAACCCGAGCTCCTTGAAGGGCCGCCGTCGCCGACCTCGCCGCCGACCGGAGGTGCA
GGACGTTTCGCGGCTCGGCCGTTACCAGGTCCAGCAGCGTCCGTGCTCGCTCCTCGGACG
TCAGTACGGCCATCCGCTCCCGAACCGGTTCGCCGCTCCTCCCGCGTTCAGGCTCCCGCA
CCCCGCGCGCCGGGATCTCCGCCAGCAGCGGGTTCGGCCTGGCCGAGGTGAAGCCGAGCG
CGAACCGTTCCCACTCCATGTCGGCGACGGCGACGAACGTCTCGTTCGCGTTCAGGGCC
TGAGCATCCCGGTGACCGCCGTGTCGGGTCCATCGCCCGGATGCCGCGTTCGCTCCAGGA
AGTTCGCCGGCGCCGTTCGGCCGCGCCATCCCGTTCGCCGTCCAGACACCCAGGCGATCGA
GGTTCGCCGTTCTGCCCTGGCGCG

>024-M13re 16_774 of trace file

CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCTGCGGGACCGCTGAGTTCGCGGTTCGATCAGGGCGAAG
ACCTCCTCGGCCGAGGCGTCTTCCAGCCCTTCGTTCGGTTCGTTCGATTCGGCTCTGAGC
TTCCAGAGCAGGGCTTCCAGCCGGGCGAGAGCGCCGGTTCGTCGCCAGCTCGTCGACC
CCCTGCTCCAGGGCGGCCAGCCGTCACGCGTCCGGCGACGCCCTGCGCGGGTGCAGACTCC
GCCCTGAGCGCTCGGCCAGCGCCAGCGGCGTCCGGTGGTTCGTAGATCAGGCTCGCGGGC
AGGCGCAGCCGGTTCGCCGCTTTCGAGCCGGTTCGCGAGCTCGACGGCGGTTCATCGAGTTC
AACCCGAGCTCCTTGAAGGGCCGCCGTCGCCGACCTCGCCGCCGACCGGAGGTGCAAG
ACGTTTCGCGGCTCGGCCGTTACCAGGTCCAGCAGCGTCCGTGCTCGCTCCTCGGACGTC
AGTACGGCCATCCGCTCCCGAACCGGTTCGCCGCTCCTCCCGCGTTCAGGCTCCCGCACC
CGCGCGCCGGGATCTCCGCCAGCAGCGGGTTCGGCCTGGCCGAGGTGAAGCCGAGCGCG
AACCGTTCCCACTCCATGTCGGCGACGGCGACGAACGTCTCGTTCGCGTTCAGGGCCCTG
AGCATCCCGGTGACCGCCGTGTCGGGTCCATCGCCCGGATGCCGCGTTCGCTCCAGGAAG
TCGCCGGCGCCGTTCGGCCGCGCCATCCCGTTCGCCGTCC

>025-M13re 15_724 of trace file

GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCCGACGACACCGGCGGCGACTCGCACGGCAGCA
GGATCGTCACCGGCGGCTGCGCGCCGTTCTCCAGCGCGTGCAGCGAGCGCCGCGAGGGAGG
GATAGGCGGTGACCGACACCTGCGGGGTGTCCGAGACGGACAGATCGTCCAGGATCGCGA
TCGGGCCCCGCCCGCAGGCGGGTGGGGTGGCAGCGCCGTCCACGCCACCTGGAACAGCG
CGTTCGGTTCGTGGAGAGCCCGCCAGGCGTGACCGGCCGGGTCCGCGAGCGCGCCGACCGTTC
CGACCGGAACCCCCGCGTCCGTTCGCCAGCGCCACCGCGCCCTCCGGCTCCAACCGCACCC
GCAGCACCGGCGTGGCCGGCCCGTGCACGCTGACCGCCGACCACGAGAACGGCAGCCGCA
ACTCGGCCGACTCCACCGCCGACGCGTGCAGCGCGCCGTCCAGCAGGGCCGGATGTACGG
CGAAGCCGCCCCGCGTCCGCCACCTCGACCTCGGCGAACAGCACCCCTCGGATCGCCAGA

```
CCGCCCGGAGCGTGCAGAACGCCGGGCCGTACTCGTAGCCGCGCAGCGACAGCAGCTCGT
AGAAGTCGGCGAGGTCCAGCCGTTCCGCCCTGGCGGGCCATGCCGTCAGCGCCACGG
GCTCGCCTCCGTCGCGCTCGGCGACGCCCTCGGCGTGCTGGACCCACTCG
```

```
>026-M13re 14_771 of trace file
GCCTGCAGTCTGACTCTAGAGGATCTGCGGGACCGCTGAGTTCGCGGTTCGATCAGGGCGA
AGACCTCCTCGGCCGAGGCTCTTCCAGCCCTTCGTCGGGTTTCGTCGGATTTCGGCTCTGA
GCTTCCAGAGCAGGGCTTCCAGCCGGGCGACGAGCGCCGGTTCGTCGCCAGCTCGTCGA
CCCCCTGCTCCAGGGCGGCCAGCCCGTACGCGTTCGGCGACGCCCTGCGCGGGTGCAGACT
CCGCCCTGAGCGCTTCGGCCAGCGCCAGCGGCGTTCGGGTGGTTCGTCAGATCAGGCTCGCGG
GCAGGCGCAGCCCGTTCGCCGCTTGAGCCGGTTCGCGCAGCTCGACGGCGGTTCATCGAGT
CGAACCCGAGCTCCTTGAAGGGCCGCCGTCGCCGACCTCGCCGCCGACCGGAGGTGCA
GGACGTTTCGCGCCTTCGGCCGTTACCAGGTCCAGCAGCGTCCGTGCTCGTCTCCGACG
TCAGTACGGCCATCCGCTCCCCGAACCGGTTCGCCGCTTCGCCCGGTTCAGGCTCCCGCA
CCCGCGCGCCGGGATCTCCGCCAGCAGCGGGCTCGGCCGAGGTGAAGCCGAGCG
CGAACCGTTCCACTCCATGTCGGCGACGGCGACGAACGTCCTCGTCGCGTTCCAGGGCCC
TGAGCATCCCGGTGACCGCGTGTCCGGGTCCATCGCCCGGATGCCGCGTTCGCTCCAGGA
AGTCGCCGGCGCCGTCGGCCGCGCCATCCCGTTCGCCG
```

Abb. A.4: Originalsequenzen der pSZ12Sal-Familie: Subklone aus Cosmid 12D4.

```
>bsk12sal5-M13rev-29 5..737 of trace file
GCGCGCATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGGTGGCGGCCGC
TCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAACCGTC
GACGGTGAACCCAGAGCAGGATCCACTAGTTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAAC
CCAGTCAGTCTCCTCCGGTGGGCGCGGGGATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTC
TTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGCGAGCGCTTCGGGTCATTTTCGGCGAG
GACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCCTGTCGCTTTCGGGTATTTCGGAATCTTG
CACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAG
GCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGTGGGCTACGTCCTTGCTGGCGTTTCGCGACG
CGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCC
GCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGA
TCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCATTTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATT
TATGCCGCTTCGGCGAGCACATGGAACGGGTGGCATGGATTGTAAGCGCCGCCCTATAC
CTTGTCTGCCTC
```

```
>bsk12sal6-M13rev-29 25..311 of trace file
AAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGCTGCAG
GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAACCGTCGACCGGCAGCACCTGGCCGTCAAGGGCGCG
AAGGTCACGATCGCCCTGCCGGCCGGGCGCACCACGACCGCCGCGTCACCGCCGTTCGGC
ACCACGGCAAGGCCGCGTCGACGGGGCTCCGCTCACGGGCATCGCCCCACGTCATCGGG
CCGTTCTGGCTACCTCCTGCTCAACTCCGGCCGGGTGATCAGCAT
```

```
>bsk12sal7-M13rev-29 8..205 of trace file
CGCGCAATTACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCT
CTAGAACTAGTGGATCCCCCGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAACCGTCG
ACGACGCGCAGGCGCTCGAACGGGTGGTAGAAGTACTCGCCCGGCTCGCTCCAGTTCTCG
AAGCGGATGCCGAGCTT
```

```
>bsk12sal8-M13rev-29 6..769 of trace file
CGCGCAATTACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCT
CTAGAACTAGTGGATCCCCCGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATAACCGTCG
ACGGTGGAGCCACGAGAGCAGGATCCACTAGTTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACC
CAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCT
TCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGCGAGCGCTTCGGGTCATTTTCGGCGAGG
ACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCGTCGCTTTCGGGTATTTCGGAATCTTGC
ACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGG
CCATTATCGCCGCGCATGGCGGCCGACGCGTGGGCTACGTCCTTGCTGGCGTTTCGCGACGC
GAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCG
CGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGAT
CGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCATTTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATT
```

ATGCCGCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATAACC
TTGTCTGCCTCCCGGTTGCGTCCGGTGCATGGAGCCGGGCCA

>bsk12sal1-M13rev-29 12..382 of trace file
CCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGT
GGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACGGGGCTCCG
CTCACGGGCATCGCCCCACGTACATCGGGCCGTTCTGGCCTACCTCCTGCTCAACTCCGGC
CGGGTGATCAGCATCGAGCGGCTGATCCGCAGCAGCGGGTGCTCCTGGAGAACTCGTGGG
AGCTCTTCGAACCGCGCCGACCTCGACCCCGCGCACGCTGCGCGGCGCCCGCTCGGCCT
TCGTGCGCACCAACGGGCAGGACTACCTCAACCGGACCATGCCCTGCCGGCCGAGGTGCG
AGGGCTATCT

>bsk12sal9-M13rev-29 30..315 of trace file
AAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAG
GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACTGGGCGTCGGGCGACCTCGAAGTGCCTC
ACCTCGTCCCGTCCCTGGCCGGAGACGGGCCGCGTACGCCGCGCCGGCGTCTCGTCCCTC
GGCCTGAGCGGGACCAACGCCACCTCATCCTGGAGGCCCGGACGCGACGGACGAGCAT
CCCCGCTCCCCCGCGGCGACGGGCGTGCGGTGCCGCTGGTGGTG

>bsk12sal10-M13rev-29 29..229 of trace file
CCACCGCGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATAT
CAAGCTTATCGATACCGTCGACATGATCGTGACGCCCGCGGCGAGCGCGAGCGCGACTC
GCCCCGTGCGCAGCGCGGCCCGCGAGGTGGACGGCGACGAGCGAGGAGGAGCAGGCGGT
GTCGACCTGCTGTGGGGCCT

>bsk12sal11-M13rev-29 8..480 of trace file
CGCGCACTTAAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCCGC
TCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTC
GACTTCCCTGGAGAGCCGGGCGATCGGCACCCGCGCTTCTTCGCGGGGAACCTGACCCGC
CACCCGGCCTACCTGGGCCGCCCGCACCGGCTGGCCGGCGACCTCAGCAACAGCGACATC
GTCACCGAGCGCACGCTGTGGATCGGGGTGCACCCCGGCTCACCGAGGAGATGGTGCAC
CATGTGCGCCATGCGCTCGTTGTACGCGCTGATCAGCACCGGGTCCCAGCGCTCGCCGGG
GAAGTGCTTACGAGCTGCTCGATGGCGTGCTGGATGAAGAAGATGCCGTCGACCAGGT
TGCCACCAGCTGGGCGAGGAGCACCGGTCGCCGGGGATCGTGGTGGGCCG

>bsk12sal4-M13rev-29 22..504 of trace file
GGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGG
GCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCACGTGGCGGACGCCCGGG
CGATGGCGTACTCCGACAGGTAGCGGGCGACCTCGTCGGCGTCGAAGTGGTAGGCGTACG
GGAAGTGGGCGCGCTGCTCGGCCAGGGTCGAGCGGCCGAGCGACTCGTCCACCTGGGAGG
CGAAGAGCGAGCCGTCGAGCATGCGGGGCGCCCGCTTGGCCTCGCACAGCCGGTGCCTGA
GATAGCAGGCCTCGCTGAAGGACGTCCTGCGGTGCCGACCGCGAGCCACCCTCGGCCA
TGTTGAAGCCGTCGACATCGAGCCTCGGCACGTACAACACCACGCCGGAACGCATCGAGC
GGGCGATCGGGCCGCTACCAAGGCCATCATGGTCGCGCACGCCCTCGGCAACCCCTTCG
CC

>bsk12sal112-M13rev-29 7..365 of trace file
CGCGCACTTACCCTCACTAAAGGGATAAAAAGCTGGGGCTCCACCGCGTGGCGGCCGCTC
TAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGA
CATGACCGAGGTGCGCAGGCACCGGGCGGCCGGCGACGGGTACTCCACGGTCGCCCTACGT
CCTGCACGCCCGCGCGGGTGCTGGCCAGGCACCCCGAGGCCAACCGGCCCTCCAGGG
GCGCCGCCGTCCCCGGTCCGCTGGTATCCGACGGTCAACGCCAAGCTCACCTCGACAA
GATCATCAGGGAGCACCGGTTGGTCTCGACCGTCTTCCCGACGCCACCTCGCC

Versicherung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Technischen Universität Dresden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. van Pée angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 20.03.2000 (in der geänderten Fassung vom 16.04.2003) an.

Dresden, 21. August 2003