

**Untersuchungen zur Biosynthese von Urdamycin A und  
Herstellung neuer Naturstoffe mittels  
molekularbiologischer Methoden**

Dissertation

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

**2000**

vorgelegt von

**Bettina Faust**

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 2000  
Dekan: Prof. Dr. U. Nagel  
1. Berichterstatter: PD Dr. A. Bechthold  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Was sind Antibiotika?</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Das Problem der Resistenzentwicklung</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Bedeutung von Streptomyceten als Antibiotika-Produzenten</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 Genetische Veränderung Antibiotika-produzierender Streptomyceten: Methoden und Resultate</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5 Die Gruppe der Angucyclin-Antibiotika</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6 Glycosidierte Antibiotika - Vorkommen und Bedeutung</b> .....	<b>9</b>
<b>1.7 Urdamycine und Landomycine</b> .....	<b>10</b>
<b>1.8 Zielsetzung der vorgelegten Arbeit</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Medien</b> .....	<b>16</b>
2.1.1 Kultivierungsmedien für <i>E. coli</i> und Streptomyceten .....	16
2.1.2 Anzuchtmedien für die Protoplastierung von Streptomyceten .....	16
2.1.3 Produktionsmedien für Streptomyceten .....	17
2.1.4 Regenerationsmedium für Protoplasten .....	18
2.1.5 Selektionsmedium für die Protoplastentransformation .....	19
<b>2.2 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA.....	19
2.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA .....	19
2.2.3 Plasmid-Isolierung aus Streptomyceten .....	20
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.2.5 Transformation von <i>E. coli</i> .....	21
2.2.6 Protoplastierung von Streptomyceten .....	21
2.2.7 Polyethylenglycol-vermittelte Protoplasten-Transformation .....	22
<b>2.3 Antibiotika</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4 Bakterienstämme</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5 Vektoren</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6 Plasmide und Cosmide</b> .....	<b>24</b>
<b>2.7 Kultivierung / Anzucht</b> .....	<b>25</b>
2.7.1 Kultivierung und Anzucht von Streptomyceten .....	25
2.7.2 Kultivierung und Anzucht von <i>E. coli</i> .....	27
<b>2.8 Herstellung von Dauerkulturen</b> .....	<b>27</b>
2.8.1 Streptomyceten - Sporensuspensionen.....	27
2.8.2 <i>E. coli</i> -Stämme - Glycerinkulturen.....	27
<b>2.9 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.9.1 Enzymatische Modifikation von DNA .....	28
2.9.1.1 Restriktion von DNA .....	28
2.9.1.2 Ligation .....	28
2.9.1.3 Auffüllreaktionen mit DNA-Polymerasen.....	29

2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.9.2.1 Elektrophoresebedingungen .....	30
2.9.2.2 Detektion.....	30
2.9.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	30
2.9.3 Methoden zur DNA-Isolierung .....	31
2.9.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	31
2.9.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> über Nucleobond AX-Kartuschen .....	31
2.9.3.3 Isolierung von Gesamt-DNA.....	32
2.9.3.4 Isolierung von Plasmiden aus Streptomyceten .....	33
2.9.4 PCR .....	33
2.9.5 Southern Hybridisierung.....	36
2.9.5.1 Auftrennung und Transfer der DNA .....	36
2.9.5.2 Prähybridisierung und Hybridisierung .....	36
2.9.5.3 Detektion und Nachweis .....	37
2.9.5.4 Reprobing von chemiluminiszenz-detektierten Nylonmembranen .....	37
2.9.6 DNA-Sequenzierung .....	38
2.9.6.1 PCR.....	38
2.9.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
2.9.6.3 Auswertung der erhaltenen Daten.....	40
2.9.7 <i>E. coli</i> -Transformation.....	40
2.9.7.1 Blau-Weiß-Selektion oder $\alpha$ -Komplementation .....	41
2.9.8 Streptomyceten-Transformation.....	41
2.9.8.1 Protoplastierung von Streptomyceten .....	41
2.9.8.2 Polyethylenglycol-vermittelte Streptomyceten-Protoplastentransformation mit Plasmid-bzw. Cosmid-DNA.....	42
2.9.9 Geninaktivierung.....	43
2.9.9.1 Herstellung der Geninaktivierungskonstrukte .....	43
2.9.9.2 Vorbereitung der Inaktivierungskonstrukte für die Protoplasten-Transformation .....	47
2.9.9.3 Protoplasten-Transformation und Selektion auf Einfach-Crossover .....	48
2.9.9.4 Screening auf erfolgtes Einfach-Crossover .....	49
2.9.9.5 Selektion auf Doppel-Crossover (nach DECKER & HAAG, 1995) .....	49
2.9.9.6 Überprüfung des erfolgten Doppel-Crossovers .....	50
2.9.9.7 Chemische Charakterisierung der Mutanten.....	50
2.9.10 Komplementierungsversuche .....	51
2.9.10.1 Herstellung der Komplementierungskonstrukte.....	51
2.9.10.2 Vorbereitung der Komplementierungskonstrukte für die Protoplastentransformation.....	52
2.9.10.3 Protoplastierung der Mutante BF-2-1 und BF-1-1 .....	52
2.9.10.4 Protoplastentransformation der Mutanten BF-1-1 und BF-2-1 mit den Komplementierungskonstrukten .....	52
2.9.10.5 Chemische Charakterisierung der komplementierten Mutanten .....	53
2.9.11 Heterologe Expression von Glycosyltransferase-Genen in der Mutante BF-1-1 .....	54
2.9.11.1 Herstellung der Expressionskonstrukte .....	55
2.9.11.2 Vorbereitung der Expressionskonstrukte für die Protoplastentransformation.....	55
2.9.11.3 Protoplastentransformation der Mutante BF-1-1 .....	56
2.9.11.4 Charakterisierung gebildeter Sekundärmetabolite .....	56
2.9.12 Analyse und Charakterisierung gebildeter Sekundärmetabolite.....	57
2.9.12.1 Anzucht in Produktionsmedium .....	57
2.9.12.2 Isolierung gebildeter Sekundärmetabolite .....	58
2.9.12.3 Charakterisierung isolierter Sekundärmetabolite .....	58
2.9.13 Chemikalienliste.....	60

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>62</b>
<b>3.1 Expression von Plasmiden bzw. Cosmiden in verschiedenen Streptomyces-Stämmen zur Herstellung modifizierter bzw. neuer Naturstoffe</b> .....	<b>62</b>
<b>3.2 Kartierung der Cosmide pURD 8, pURD 10, pURD 11 und pURD 12 aus <i>S. fradiae</i> Tü2717</b> .....	<b>67</b>
<b>3.3 Sequenzanalyse des Cosmides pURD12</b> .....	<b>68</b>
<b>3.4 Inaktivierungen der Gene <i>urdZ1</i>, <i>urdM</i> und <i>urdGT2</i> aus dem Urdamycin-Produzenten <i>S. fradiae</i> Tü2717 über in-frame Deletion und frame-shift Mutation</b> .....	<b>74</b>
3.4.1 Inaktivierung von <i>urdZ1</i> aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster .....	75
3.4.1.1 Herstellung einer <i>urdZ1</i> -Mutante .....	75
3.4.1.2 Chemische Charakterisierung der <i>urdZ1</i> -Mutante .....	80
3.4.2 Inaktivierung von <i>urdM</i> aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster .....	82
3.4.2.1 Herstellung einer <i>urdM</i> -Mutante .....	82
3.4.2.2 Chemische Charakterisierung der <i>urdM</i> -Mutante .....	88
3.4.2.3 Komplementierung der <i>urdM</i> -Mutante .....	90
3.4.2.4 Überexpression von <i>urdM</i> in <i>E. coli</i> .....	92
3.4.3 Inaktivierung von <i>urdGT2</i> aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster .....	93
3.4.3.1 Herstellung der <i>urdGT2</i> -Mutante .....	93
3.4.3.2 Chemische Charakterisierung der <i>urdGT2</i> -Mutante .....	101
3.4.3.3 Komplementierung der Mutante BF-1-1 .....	104
3.4.3.4 Heterologe Expression von Glycosyltransferase-Genen in der Mutante BF-1-1 .....	106
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>109</b>
<b>4.1 Expression von mehreren Genen bzw. ganzen Genclustern in verschiedenen Wirtsstämmen</b> .....	<b>110</b>
<b>4.2 Neue Gene der Urdamycin-Biosynthese</b> .....	<b>112</b>
<b>4.3 Inaktivierung verschiedener Gene aus dem Urdamycin-Produzenten <i>S. fradiae</i> Tü2717</b> .....	<b>114</b>
4.3.1 Inaktivierung von <i>urdZ1</i> .....	115
4.3.2 Inaktivierung von <i>urdM</i> .....	117
4.3.3 Inaktivierung von <i>urdGT2</i> .....	120
<b>4.4 Heterologe Expression verschiedener Glycosyltransferasen in der <i>urdGT2</i>-Mutante BF-1-1</b> .....	<b>125</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>129</b>
<b>6. Literatur</b> .....	<b>131</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>139</b>
<b>7.1 Sequenz</b> .....	<b>139</b>
<b>7.2 Vektoren</b> .....	<b>152</b>

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	micro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bla	β-Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNDP	Desoxynucleosid-5'-diphosphat
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
dTDP	Desoxythymidin-5'-diphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ermE	N-6-aminoadenin-N-methyltransferase
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinucleotid
g	Gramm
G	Guanin
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
h	Stunde
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Konzentration (Inhibition auf 50% der Ausgangsaktivität)
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
K	Kilo
LacZ	β-Galactosidase
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
m	milli
M	Molar
MS	Massenspektrometrie
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamidadenindinucleotid-phosphat
NaOH	Natronlauge
NDP	Nucleosid-5'-diphosphat
nm	Nanometer

NMR	Kern-Magnetresonanz-Spektroskopie
N	Normalität
ORF	Offener Leserahmen
ori	Replikationsursprung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RBS	Ribosomenbindungsstelle
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S.	<i>Streptomyces</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNA	Soft Nutrient Agar
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfon-säure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T	Thymin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galactosid

Aus der vorgelegten Arbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

Faust, B., Hoffmeister, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Haag, S., Schneider, P., Decker, H., Künzel, 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. Im Druck.

Künzel, E., Faust, B., Oelkers, C., Weißbach, U., Bearden, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Bechthold, A., Rohr, J. (2000). The Inactivation of the *urdGT2* Gene, Which Encodes a Glycosyltransferase Responsible for the C-Glycosyltransfer of Activated D-Olivose, Leads to the Formation of the three Novel Urdamycins I, J and K. J. Am. Chem. Soc. Im Druck.

Bechthold, A., Domann, S., Faust, B., Hoffmeister, D., Stockert, S., Trefzer, A., Weitnauer, G., Westrich, L. (1999). Glycosidierte Naturstoffe. Perspektiven für die kombinatorische Biosynthese. Chemotherapie Journal. 4: 130 – 135

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. Letters. 170: 381 - 387



# 1. Einleitung

## 1.1 Was sind Antibiotika?

Sekundärmetabolite stellen eine unerschöpfliche Quelle an biologisch aktiven Substanzen dar (DEMAIN, 1983). Sie umfassen Moleküle mit den unterschiedlichsten Aktivitäten. Die Entdeckung der Antibiotika führte zu zahlreichen potenten und pharmazeutisch nützlichen Substanzen zur Behandlung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten wie Tuberkulose und Wundfieber, von Krebs, Herzkrankheiten und immunologischen Defekten. Bekannt sind heute an die 10 000 Antibiotika oder bioaktive Wirkstoffe die von lebenden Organismen gebildet werden, sowie mehr als 100 000 partial- oder totalsynthetische Derivate. Therapeutische Verwendung finden allerdings nur etwa 100 Vertreter dieser großen Gruppen (GRÄFE, 1992).

Eine moderne Definition von Antibiotika (griech. antibios: gegen das Leben gerichtet) umfaßt strukturell verschiedene chemische Verbindungen, die schon in geringer Konzentration inhibitorische Aktivitäten gegen Mikroorganismen, Viren und eukaryotische Zellen, z.B. Tumorzellen, ausüben können. Diese Verbindungen entstammen, von Ausnahmen abgesehen, dem Sekundärstoffwechsel lebender Organismen wie Bakterien, Pilzen, Algen, höheren Pflanzen und niederen Tieren.

Geschichtlich gesehen begann das Zeitalter der Antibiotika 1928 mit einer von Fleming gemachten Entdeckung, der eine inhibitorische Wirkung von Schimmelpilzkolonien von *Penicillium notatum* gegenüber Staphylokokken beobachten konnte. Der erfolgversprechende Einsatz von Sulfonamiden und Penicillinen legte den Grundstein für die Suche nach weiteren antibiotisch aktiven Substanzen. Diese Suche führte zur Entdeckung der Aminoglycosid-Antibiotika mit Streptomycin (1944), der Tetracycline mit Chlortetracyclin (1947), der Makrolide mit Erythromycin (1952) und der Anthracycline (1950), um nur einige Beispiele zu nennen.

Durch das erste Auftreten von Bakterienstämmen, die eine Resistenz gegen viele der genannten Substanzen aufwiesen, wurde die Suche nach weiteren Wirkstoffen sowie die Entwicklung partialsynthetisch modifizierter Wirkstoffe forciert. Dies führte unter anderem zur Entdeckung der Grundkörper der Penicilline (6-Aminopenicillansäure) bzw.

Cephalosporine (7-Aminocephalosporansäure) als Basis für partialsynthetische Modifikationen.

Einen weiteren wichtigen Beitrag zur fortschreitenden Entwicklung auf dem Gebiet der Antibiotika leistete die kontinuierliche Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden, mit deren Hilfe zunehmend mehr grundlegende Erkenntnisse über Wirkprinzipien, Wirkorte, Resistenzmechanismen und Biosynthesewege gewonnen werden konnten. Diese Erkenntnisse wurden zunächst dazu eingesetzt, veränderte Screeningstrategien zu entwickeln, targetorientierte genetische Modifikation von Produzentenstämmen durchzuführen und die Produktionsleistung vorhandener Stämme durch Optimierung von Fermentationsprozessen zu steigern, um nur einige Punkte zu nennen.

## **1.2 Das Problem der Resistenzentwicklung**

17 Millionen Menschen (geschätzte Zahlen für 1995 (YOUNG, 1996)) fielen nach einem Bericht der Weltgesundheitsorganisation von 1996 (The world Health Report 1996), mehreren spezifizierten Infektionskrankheiten zum Opfer. Neben der Entdeckung neuer Infektionserreger wie z.B. Rotaviren, *Helicobacter pylori*, HI-Viren und Ebola-Viren in den letzten 25 Jahren fielen bekannte Infektionskrankheiten wie Tuberkulose oder Diphtherie auf, die eigentlich als eliminiert angesehen wurden, jetzt aber weltweit wieder stark im Zunehmen begriffen sind. Verantwortlich gemacht wird dafür vor allem die Zunahme von resistenten Erregern, aber auch Armut und Zustand der öffentlichen Gesundheitssysteme in zahlreichen Ländern.

Die Problematik der Resistenzentwicklung wurde von CHRIST (1999) am Beispiel der von *Mycobacterium tuberculosis* übertragenen Infektionskrankheit Tuberkulose deutlich gemacht, die inzwischen wieder zu den wichtigsten Todesursachen im Erwachsenenalter zählt. Heute liegt die Zahl der Inzidenzen schätzungsweise bei 9 Millionen, die Zahl der Prävalenzen bei ca. 22 Millionen (World Health Report, 1996). Die Entstehung und Verbreitung multiresistenter Tuberkuloseerreger wird auf unsachgemäße Therapie und mangelhafte Maßnahmen zur Verhütung und Bekämpfung der Tuberkulose zurückgeführt (CHAULET et al., 1996, DAVIDSON et al., 1992).

Als weiteres beunruhigendes Beispiel kann hier die Zunahme multiresistenter Entero-, Staphylo- und Streptokokken genannt werden, die gerade an nosokomialen Infektionen einen großen Anteil haben. Erschreckend ist dabei die immer weiter ansteigende Zahl an Stämmen, die nun auch Resistenz gegen das als Reserveantibiotikum eingesetzte Glycopeptid Vancomycin erworben haben. LECLERCQ berichtete 1988 in Frankreich als erster vom Auftreten klinisch relevanter Infektionen durch multiresistente Enterokokken, die auch Resistenz gegen Vancomycin aufwiesen. Bei solchen schwerwiegenden Infektionen mit Vancomycin-resistenten Enterokokken ist, laut Literaturübersicht (SPERA et al., 1994), bei mehr als der Hälfte der betroffenen Patienten mit einem tödlichen Ausgang zu rechnen.

Die beiden Beispiele - Entwicklung von multiresistenten Tuberkuloseerregern sowie multiresistenter Entero-, Staphylo- und Streptokokken, die nun auch eine Vancomycin-Resistenz aufweisen - stehen stellvertretend für eine Vielzahl an Mikroorganismen, die Resistenzen gegen vorhandene Wirkstoffe ausgebildet haben. Ihre Anzahl ist ständig im Zunehmen begriffen. So existieren heute schon viele resistente Erregerstämme, für die keine Therapiemöglichkeiten mehr zur Verfügung stehen (STONE, 1994).

Einige Erklärungsmöglichkeiten für die zunehmende Ausbildung von multiplen Resistenzen bei diversen Erregerstämmen wurden hier schon aufgeführt. Als ein gravierender Punkt ist sicherlich eine unsachgemäße Therapie anzusehen; ein verantwortungsvoller Umgang mit Antibiotika muß gefordert werden. Auch die Gefahren durch Tourismus und hohe Mobilität der Menschen, die zur Verbreitung von resistenten Stämmen führen können, dürfen nicht unterschätzt werden. Ebenso stellt die Anwendung von Antibiotika als Wachstumsförderer in der Tiermast und der Einsatz chemisch verwandter Therapeutika in Human- und Tiermedizin ein ernstzunehmendes Problem dar, das ein genaues Abwägen zwischen Gefahr und Nutzen für die Menschen erfordert.

Im Hinblick auf die schnell zunehmende Zahl an multiresistenten Erregerstämmen wird jedoch deutlich, daß der Schwerpunkt auf der Entwicklung bzw. Suche strukturell modifizierter bzw. neuer antimikrobiell wirksamer Substanzen und Substanzklassen liegen muß, wobei die Suche nach neuen Zielstrukturen und Wirkungsprinzipien sicherlich im Vordergrund stehen wird.

### 1.3 Bedeutung von Streptomyceten als Antibiotika-Produzenten

Die Gattung *Streptomyces* gehört zur Familie der Actinomyceten, die sich durch die Produktion der verschiedensten Sekundärmetabolite auszeichnet. Zwei Drittel der natürlich vorkommenden Antibiotika werden, neben einer großen Anzahl weiterer Sekundärmetabolite, von Streptomyceten produziert. Darunter befinden sich Anthelmintika und antitumorale Substanzen ebenso wie Fungizide und Herbizide.

Streptomyceten sind grampositive Bakterien, die ein myzelartiges Wachstum aufweisen, das aufgrund komplexer Differenzierungsvorgänge dem Wachstum filamentöser Pilze ähnelt. Neben dem Substratmyzel ist das Luftmyzel oft stark ausgeprägt. Es enthält Lufthyphen (Sporophoren), von denen Konidien abgeschnürt werden, die der Verbreitung dienen. Eine Unterscheidung der Vielzahl an Streptomyceten kann aufgrund der Struktur der Sporophoren, der Kolonieforn-, farbe und –größe sowie des Geruchs vorgenommen werden. Sie weisen als Bodenbewohner den typischen Geruch frischer Erde auf. Aus *S. griseus* wurde das Öl Geosmin isoliert, ein 1,10-Dimethyl-9-dacalol, das für den Geruch verantwortlich ist. Die unterschiedliche Farbe vieler Streptomyceten läßt sich dadurch erklären, daß die von ihnen gebildeten Naturstoffe stark gefärbt sein können.

Das Chromosom von Streptomyceten besitzt eine Größe von  $3-7 \times 10^3$  kDa. Interessant ist die Tatsache, daß die Gene, die für die Biosynthese eines Antibiotikums codieren, häufig geclustert auf einem kleinen Teil des Genoms lokalisiert sind (RUDD und HOPWOOD, 1979, KATZ und HUTCHINSON, 1992), zusammen mit Genen der Antibiotika-Selbstresistenz.

Die Vielzahl der von Streptomyceten produzierten Antibiotika stellt eine geeignete Quelle als Ausgangspunkt für die Modifikation von Biosynthesewegen und für die Entwicklung modifizierter bzw. hybrider Naturstoffe dar. Voraussetzung dafür ist jedoch die Aufklärung der Biosynthesewege, sowie die Bereitstellung und Entwicklung geeigneter molekular-genetischer Methoden. In den letzten Jahren konnten große Fortschritte in Bezug auf das Verständnis der genetischen und biochemischen Grundlagen der Biosynthese von Naturstoffen erzielt werden; Fortschritte in Gentechnologie und Molekularbiologie entwickelten sich parallel dazu. Es liegt nun ein Pool an molekulargenetischen Werkzeugen und Basisinformationen vor, von dem ausgehend genetische Manipulationen Naturstoff-produzierender Streptomyceten-Stämme vorgenommen werden konnten.

Die Entwicklungen in der Streptomycetengenetik hin zu modifizierten bzw. neuen Naturstoffen und auch zur Leistungssteigerung vorhandener Produzentenstämmen, sowie die erzielten Ergebnisse, sollen im nächsten Abschnitt kurz besprochen werden.

#### **1.4 Genetische Veränderung Antibiotika-produzierender Streptomyceten: Methoden und Resultate**

Wie schon erwähnt, ist die Bereitstellung geeigneter molekularbiologischer Methoden Voraussetzung für die genetische Modifikation Antibiotika-produzierender Streptomyceten-Stämme. Als eine der wichtigsten Errungenschaften ist hier sicherlich die Etablierung von Gen-Transfer-Methoden zu nennen, die es erlauben, fremde DNA in Streptomyceten einzuschleusen. Die traditionelle Methode der Transformation ist die Protoplasten-Transformation, deren Effizienz allerdings limitiert wird durch das potente Restriktions-Modifikationssystem vieler Streptomyceten und die deshalb oftmals - abhängig vom verwendeten Wirtstamm - nur zu einer geringen Transformationsrate führt. Als weitere Transformations-Methode, die für viele Stämme bessere Ergebnisse brachte, wurde die Konjugation eingeführt. Der Transfer von Plasmiden zwischen *E.coli* und Streptomyceten wurde erstmals von MAZODIER und Mitarbeitern (1989) gezeigt.

Neben der Etablierung von Gen-Transfer-Methoden war die Entwicklung geeigneter Vektorsysteme (HOPWOOD et al., 1985) ein weiterer wichtiger Schritt auf dem Weg hin zur genetischen Veränderung von Streptomyceten-Stämmen.

Generell können zwei verschiedene Methoden unterschieden werden, Gene mit Hilfe entsprechender Vektorsysteme in Wirtstämmen zu exprimieren. Zum einen können einzelne oder mehrere Gene bis hin zu Genclustern in autonom replizierende Vektoren kloniert werden. Die Plasmide werden, nach Transformation in den jeweiligen Stamm, extrachromosomal exprimiert. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, daß die eingeschleusten Plasmide oft nicht stabil erhalten bleiben und daß andererseits das Vorhandensein von Plasmiden die Synthese von Sekundärmetaboliten stören kann.

Zum anderen kann durch die Verwendung spezieller Vektoren und DNA-Fragmente, die homologe Bereiche zur genomischen DNA aufweisen, eine Integration der Plasmide in das Chromosom über Rekombination zwischen homologen DNA-Fragmenten gezielt gesteuert werden. Als Vektorsysteme kommen sogenannte «Suicide Vector Systems» in Frage. Zu

nennen sind dabei einerseits temperatursensitive Vektoren (ts plasmids), die von BIRCH und CULLUM (1985) und MUTH und Mitarbeitern (1989) beschrieben wurden. Bei diesen Vektoren bewirkt ein Temperaturshift den Abbruch der Replikation und damit den Verlust des Plasmides. Andererseits kommen nicht replikative Vektoren zum Einsatz (HILLEMANN et al., 1991), die zu autonomer Replikation nicht befähigt sind. Für beide Vektorsysteme bietet die Integration in das Genom die einzige Überlebensemöglichkeit.

Integrationstechniken, inclusive der genannten Vektorsysteme, können bei der Inaktivierung von Genen über Genunterbrechungs- bzw. Genaustauschexperimente eingesetzt werden (WOHLLEBEN und MUTH, 1993). Abhängig von dem DNA-Fragment, das in den Integrationsvektor kloniert wurde, können Genunterbrechungsexperimente zur Inaktivierung eines Gens führen, Aufschluß über funktionell wichtige Regionen eines Proteins geben, sowie einen Beitrag zur Aufklärung eines DNA-Fragmentes unbekannter Funktion leisten. Die Unterbrechung des jeweiligen Gens erfolgt über ein Crossover-Ereignis. Als nachteilig bei der Genunterbrechung hat sich das Vorhandensein der Vektorgene im Chromosom erwiesen, die oftmals die wirtseigenen Gene stören. Diese Art von Integrationstechnik verlangt außerdem das Aufrechterhalten eines permanenten Selektionsdruckes, da z.B. Mutanten, die mit ts-Plasmiden hergestellt wurden, bei Absenkung der Temperatur instabil werden können.

Genaustauschexperimente zeigen diese Nachteile nicht. Genaustausch beinhaltet 2 Crossover-Ereignisse, eines auf jeder Seite des auszutauschenden Fragmentes. Bei dem zweiten Crossover-Ereignis kommt es zum Verlust des Vektors und damit der durch den Vektor vermittelten Antibiotikaresistenz, d.h. die entstandene Mutante muß nicht mehr unter Selektionsdruck kultiviert werden. Oftmals werden Genaustauschexperimente durch Einführung einer Antibiotika-Resistenzkassette, die sich innerhalb eines klonierten DNA-Fragments befindet, vorgenommen.

Die erforderliche Aufklärung von Biosynthesewegen, d.h. der Funktion von Genen bzw. Enzymen, die an der Biosynthese von Antibiotika beteiligt sind, wird erleichtert durch das beschriebene geclusterte Vorliegen der Biosynthesegene, das Klonierungsarbeiten wesentlich erleichtert.

Die genannten Fortschritte in der Molekularbiologie machten nun erstmals die gentechnologische Veränderung vorhandener Streptomycceten-Stämme möglich. PIEPERSBERG (1994) zeigt in Zusammenhang mit den Begriffen «Pathway Engineering» bzw. «Metabolic

design» mehrere verfügbare Strategien auf, von denen einige unter dem neuen Terminus «Kombinatorische Biosynthese» zusammengefaßt werden können (ROHR, 1995). Die «Kombinatorische Biosynthese» umfaßt gentechnologische Methoden, deren Zielsetzung nicht nur die Modifikation von Sekundärmetaboliten beinhaltet, sondern auch die Generierung vollkommen neuer Strukturen.

Als eine unter den Terminus «Kombinatorische Biosynthese» fallende Strategie kann hier die Shotgun-Kombination verwandter Biosynthesewege genannt werden. Dies kann die Einführung einzelner Gene bis hin zu gesamten Genclustern in entsprechende Wirtsstämme bedeuten, mit dem Ziel, eine Neukombinationen der Biosynthesegene beider Stämme und damit modifizierte Produkte zu erhalten.

Als Beispiel sind an dieser Stelle die Experimente von HOPWOOD und Mitarbeitern zu nennen (1985), die ein Gencluster aus *S. coelicolor* A2(3), das für die Biosynthese des Actinorrhodins codiert, bzw. Subclones dieses Clusters, in den Granaticin-Produzenten *S. violaceoruber* Tü22 und den Medermycin-Produzenten *S. sp.* AM-7161 transferierten. Alle drei aufgeführten Naturstoffe sind Isochromanchinin-Antibiotika und entstammen dem Polyketidstoffwechsel. Die Transformation der genannten Rezipienten mit den *act*-Genen führte tatsächlich zu neuen Strukturen, so z.B. Mederrhodin und Dihydrogranatirrhodin; diese unterschieden sich allerdings nur geringfügig von Produkten der Wildstämme.

Ein weiteres interessantes Beispiel ist die Herstellung eines hybriden Glycopeptid-Antibiotikums, die von SOLENBERG (1997) beschrieben wurde. Eine Glycosyltransferase aus dem Vancomycin-Produzenten *Amycolatopsis orientalis*, die hinter den *ermEp\**-Promotor kloniert wurde, wurde in *S. toyocaensis*, der das Glycopeptid A47934 produziert, eingebracht. Das Einschleusen der Glycosyltransferase in *S. toyocaensis* resultierte in der Produktion von Glycosyl-A47934.

Der Austausch einzelner Gene bzw. Genabschnitte muß ebenfalls zur Kombinatorischen Biosynthese gerechnet werden. MCDANIEL und Mitarbeiter konnten 1995 die Produktion neuer Polyketide durch Austausch von Polyketidsynthasegenen demonstrieren. Dazu wurden die Gene des Stammes *S. coelicolor*, die für die Biosynthese von Actinorrhodin codieren, deletiert; es entstand der Stamm *S.coelicolor* CH999 (MCDANIEL et al., 1993), der sich besonders als Wirts-Vektor-System für die Expression von Polyketidsynthasegenen eignet.

Polyketidsynthasegene aus verschiedenen Antibiotika-produzierenden Stämmen wurden in unterschiedlichen Kombinationen kloniert und in den Wirtstamm eingebracht. Dies führte, je nach Art der vorgenommenen Kombination, zur Produktion neuer Polyketidstrukturen. Diese Methode bietet im Vergleich zur ungezielten Transformation von Genclustern in Wildtypstämme den Vorteil, daß die wirtseigene Naturstoffproduktion ausgeschaltet ist.

Die wünschenswerte Vorstellung, komplette Biosynthesewege durch Kombination entsprechender Biosynthesegene gezielt neu zu kreieren und somit ein geplantes Molekül-Design zu betreiben, liegt noch in der Zukunft. Aufgrund des permanent zunehmenden Basiswissens, sowie der ständigen Verbesserung der erforderlichen Technologien, stellt die «Kombinatorische Biosynthese» jedoch eine potente Methode auf dem Weg hin zu modifizierten und neuen Strukturen sowie zur Optimierung von Produzenten-Stämmen dar.

### **1.5 Die Gruppe der Angucyclin-Antibiotika**

Angucyclin-Antibiotika gehören der Gruppe der Polyketid-Antibiotika an. Diese Gruppe umfaßt aufgrund der sehr variablen Polyketid-Biosynthese zahlreiche Untergruppen wie Makrolide, Polyether-Antibiotika, Anthracycline und Angucycline mit sehr vielen verschiedenen Strukturen. Polyketide werden von Bakterien, Pilzen und Pflanzen gebildet.

1966 wurde erstmals ein neuer mikrobieller Naturstoff mit einem unsymmetrischen tetrazyklischen Ringsystem beschrieben. Tetrangomycin und Tetrangulol waren die ersten Mitglieder dieser neuen Klasse von Antibiotika (DANN et al., 1965, KUNSTMANN und MITSCHER, 1966) die aufgrund ihrer angulären tetracyclischen Benzanthracen-Struktur, Angucycline bzw. Angucyclinone genannt wurden. Der Name leitet sich von dem lateinischen Wort *angus* (Winkel) ab, dem charakteristischen Merkmal dieser Strukturen. Während Angucycline Substanzen mit hydrolysierbaren Zuckeranteilen beinhalten, weist der Begriff Angucyclinon auf eine zuckerlose Substanz hin. Der Terminus Aglycon ist definiert als chemische Struktur ohne hydrolysierbaren Zucker; es existieren deshalb durchaus Angucyclinone, die noch einen glycosidisch gebundenen Zuckeranteil besitzen.

Die Gruppe der Angucyclin-Antibiotika ist mit mehr als 100 Sekundärmetaboliten mikrobieller Herkunft sehr groß und beinhaltet Substanzen mit den unterschiedlichsten pharmakologischen Aktivitäten wie cytostatische, enzyminhibitorische, antibakterielle und



antivirale Aktivitäten sowie Hemmung der Thrombozytenaggregation (ROHR und THIERICKE, 1992, OMURA et al., 1988).

Eine Klassifizierung der Angucycline kann, analog den Anthracyclinen, über die biogenetische Herkunft der Sekundärmetabolite vorgenommen werden (ROHR und ZEECK, 1989). Dabei werden 3 Hauptquellen unterschieden: Zucker, Säuren und Aminosäuren. Die klassischen Angucycline und Angucyclinone werden nach ihren Aglyca in 2 Hauptgruppen aufgeteilt, je nach dem, ob die Aglyca einen Zuckeranteil besitzen oder nicht.

Angucycline sind verwandt mit den Anthracyclinen. Dies sind stark gefärbte Derivate des 7,8,9,10-Hexahydro-naphacen-5,12-chinons. Anthracycline werden von Actinomyceten produziert und weisen unter anderem antibakterielle sowie antitumorale Aktivitäten auf. Wichtige Vertreter sind Daunorubicin und Doxorubicin, die sich als Kanzerostatika in Anwendung befinden.

## **1.6 Glycosidierte Antibiotika - Vorkommen und Bedeutung**

Kohlenhydrate spielen oftmals eine wichtige Rolle bei biologisch aktiven Naturprodukten. Von besonderem Interesse sind hier Desoxyzucker, entweder als eigene Strukturelemente oder als Bestandteil von Oligosacchariden. Viele Antibiotika enthalten desoxygenierte Zucker (WEYMOUTH-WILSON, 1997), so z.B. neben der besprochenen Gruppe der Angucycline auch die Anthracycline und Macrolide. Desoxyzucker kommen in Mikroorganismen, Pilzen und Pflanzen vor. Sie sind definiert als Kohlenhydrate, bei denen ein oder mehrere Sauerstoffatome durch Wasserstoff ersetzt werden oder durch Heteroatome wie z.B. Schwefel oder Stickstoff (KIRSCHNING et al., 1997). D-Olivose, L-Rhodinose und L-Aculose sind Beispiele für Desoxyzucker, die in der Angucyclingruppe zu finden sind.

Die pharmakologische Wirksamkeit von Antibiotika wird oftmals entscheidend durch Desoxyzucker beeinflusst (WEYMOUTH-WILSON, 1997). Allerdings beginnt sich die traditionelle Sichtweise der Wirkungsweise von desoxygenierten Zuckeranteilen zu wandeln. Wurden sie früher verantwortlich gemacht für die Kontrolle der pharmakokinetischen Eigenschaften, so werden sie heute eher als Erkennungselemente für Reaktionsmechanismen angesehen (KIRSCHNING et al., 1997).

Ein Beispiel soll die Bedeutung der Desoxyzucker für die pharmakologische Wirksamkeit belegen: Daunomycin, ein Anthracyclin mit antitumoralen Aktivitäten, zeigt auch eine

antibakterielle Wirkung, die jedoch aufgrund der hohen Toxizität nicht genutzt wird. Es interkaliert in die DNA und inhibiert Replikation und Transkription. Es konnte gezeigt werden, daß das Aglycon alleine keine biologische Aktivität besitzt. Interessant war die Beobachtung, daß Anthracycline mit mehreren Zuckern weniger Nebenwirkungen zeigen als andere Antitumor-Antibiotika, so z.B. Marcellomycin oder Aclacinomycin, die im Vergleich zu Daunomycin weniger kardiotoxisch wirken (WANG, 1992).

Aufgrund der essentiellen Rolle von desoxygenierten Zuckern für die Wirksamkeit vieler Antibiotika stellen diese ein interessantes Ziel für die «Kombinatorische Biosynthese» dar. Zielsetzung wird dabei die Herstellung neuer glycosidierter Naturstoffe sein. Klonierung, Sequenzierung und Funktionsaufklärung der an der Biosynthese der desoxygenierten Zucker beteiligten Gene ist dazu allerdings Voraussetzung.

Die Biosynthese-Gencluster einiger Angucyclin-Produzenten mit TypII-PKS-Genclustern, wie z.B. *S. fradiae* Tü2717, der Urdamycine produziert, *S. cyanogenus* S136, der Landomycine produziert und *S. venezuelae*, dem Jadomycin-Produzenten, wurden bis jetzt untersucht. Neben den PKS-Genen wurden Gene analysiert, die für sogenannte «post-polyketide modifying» Enzyme codieren, wie Oxygenasen, Methyltransferasen und Glycosyltransferasen. KROHN und ROHR (1997) schlugen eine Unterteilung der Polyketid-Biosynthese in PKS-Reaktionen und (post-PKS) Tailoring Reaktionen vor.

Diese Tailoring Reaktionen sind gerade im Hinblick auf «Kombinatorische Biosynthese» besonders interessant, betrachtet man z.B. die Glycosyltransferasegene, die den Transfer des jeweiligen Desoxyzuckers auf das wachsende Molekül katalysieren. Neben der Funktionsaufklärung der beteiligten Enzyme als Voraussetzung für die Generierung neuer glycosidierter Naturstoffe stellt sich auch die Frage nach der Substratspezifität der Glycosyltransferasen, die an der Biosynthese glycosidierter Polyketide beteiligt sind.

## 1.7 Urdamycine und Landomycine

Urdamycine und Landomycine sind glycosidierte Naturstoffe die zur Gruppe der Angucyclin-Antibiotika gehören. Beide Naturstoffe setzen sich aus einem Polyketid-Aglycon und desoxygenierten Zuckern zusammen.

*S. fradiae* Tü2717, der aus einer Erdprobe aus Tansania isoliert werden konnte, produziert Urdamycine (DRAUTZ et al., 1986). Diese konnten aufgrund ihrer auffallenden Färbung im chemischen Screening detektiert werden. Die isolierten Urdamycine bestanden aus einem Polyketid-Aglycon und einer Trisaccharidseitenkette, die sich aus den Desoxyzuckern D-Olivose und L-Rhodinose zusammensetzt. Die Trisaccharidseitenkette [ D-Olivose, L-Rhodinose, D-Olivose ] ist C-C-glycosidisch mit dem C-Atom 9 des Aglycons verknüpft. Eine weitere L-Rhodinose ist an Position 12b mit dem Aglycon verknüpft.

Insgesamt wurden 8 vom Wildtyp *S. fradiae* Tü271 gebildete Urdamycine beschrieben, die Urdamycine A-H (ROHR, 1984, ROHR et al., 1988, HENKEL et al., 1989, ROHR, 1989). Hauptprodukt ist, abhängig vom gewählten Kulturmedium, Urdamycin A (Abb. 1).

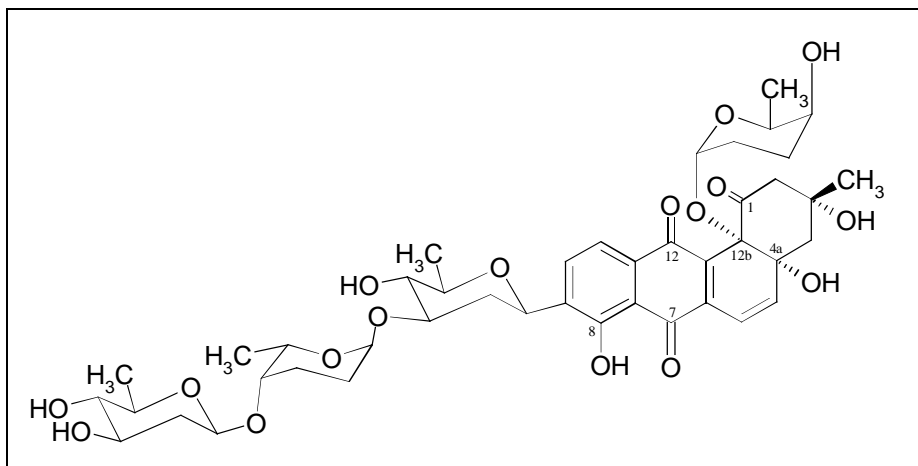


Abb. 1: Urdamycin A

Interessant ist die Tatsache, daß sich die Urdamycine A und C-F hinsichtlich ihres Aglycons unterscheiden, Zahl und Anordnung der enthaltenen Desoxyzucker ist jedoch immer die gleiche. Das unterscheidet sie von vielen anderen Glycosiden und führt zu dem vielfältigen Farbspektrum der Urdamycine. Urdamycin B fehlt die L-Rhodinose an Position 12b, Urdamycin G weist eine Disaccharidseitenkette aus D-Olivose und L-Rhodinose auf, die letzte Olivose fehlt. Urdamycin E ist das erste schwefelhaltige Angucyclin.

Tests auf antimikrobielle Aktivität der Urdamycine ergaben eine biologische Aktivität gegen grampositive und gramnegative Bakterien, jedoch keine Aktivität gegen Pilze. Assays gegen L1210-Leukämiezellen und Proliferationsassays wurden zur Feststellung der cytostatischen

Eigenschaften der Urdamycine eingesetzt. Dabei zeigten von allen getesteten Urdamycinen die Urdamycin A und E mit  $IC_{50}$ -Werten ( $\mu\text{g/ml}$ ) von 2.4 und 1.7 im Vergleich zum Zytostatikum Doxorubicin ( $0.02\mu\text{g/ml}$ ) die höchste Aktivität (DRAUTZ et al., 1986).

Landomycine konnten während eines Zytostatika-Screenings in den Behring-Werken detektiert werden. Sie werden von *S. cyanogenus* S136 gebildet. Die Struktur wurde 1990 von HENKEL und Mitarbeitern beschrieben. Im Vergleich zu den Urdamycinen zeigen die Landomycine eine variable Anordnung und Zahl der Desoxyzuckerbestandteile, während der Polyketidteil nicht variiert. Auffallend ist die lange Zuckerseitenkette der Landomycine A-C, die O-glycosidisch mit einer phenolischen OH-Gruppe des Polyketidteils verknüpft ist.

Als ein weiteres Beispiel für ein phenolisches Glycosid kann hier Elloramycin genannt werden, bei dem der Saccharidanteil allerdings nur aus einem Zucker besteht (DRAUTZ et al., 1985).

Bei Landomycin A (Abb.2) besteht die Saccharidkette aus 6 Molekülen der Desoxyzucker D-Olivose und L-Rhodinose in folgender Anordnung: [D-Olivose, D-Olivose, L-Rhodinose]<sub>2</sub>. Insgesamt konnten 5 Landomycine, A-E, beschrieben werden.

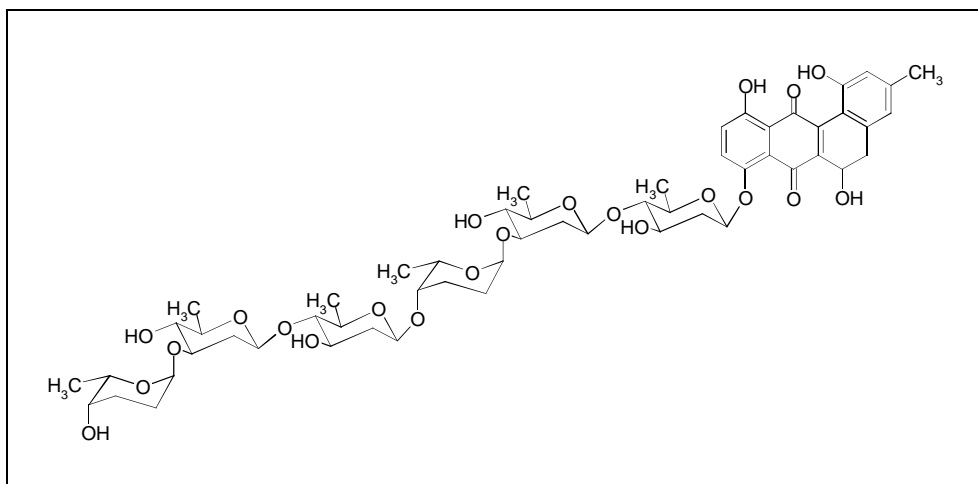


Abb. 2: Landomycin A

DECKER und HAAG konnten 1995 Gene aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 charakterisieren, die für die Biosynthese von Urdamycin A codieren. Dazu wurde von *S. fradiae* Tü2717 eine Cosmidbank hergestellt, und über Koloniehybridisierung Klone detektiert, die Homologie zu einer Sonde mit PKS-Genen aus dem Tetracenomycin C-Gencluster aus *S.*

*glaucescens* (tcmKL) aufwiesen. Für eines der 2 detektierten Cosmide, pURD8, wurde vermutet, daß es die Gene für die Urdamycin-Biosynthese trägt. Dies wurde über Sequenzanalyse verschiedener Subclones von pURD8 verifiziert. Dabei ergaben sich 6 Offene Leserahmen, *urdA-F*, deren Aminosäuresequenz hohe Homologien zu Polyketidsynthase-Genclustern ergaben: eine Ketoacylsynthase, ein Kettenlängenfaktor, ein Acylcarrier Protein, eine Ketoreduktase, eine Cyclase und eine Oxygenase. Um den Nachweis zu erbringen, daß es sich dabei tatsächlich um Gene der Urdamycin-Biosynthese handelt, wurde das vermutete PKS-Gencluster inaktiviert. Erhaltene Mutanten zeigten keine Urdamycin-Produktion mehr. Dieses Ergebnis bestätigte, daß die klonierten PKS-Gene für die Biosynthese des Urdamycins codieren, wobei die Gene *urdA-D* und *urdF* beteiligt sind an der Bildung des Polyketidteils des Urdamycins, der von der Oxygenase UrdE oxygeniert wird.

Um weitere Gene detektieren zu können, die an der Biosynthese des Urdamycins beteiligt sind, wie z.B. an der Biosynthese der Desoxyzucker und deren Transfer in das wachsende Molekül, wurde erneut eine Cosmidbank hergestellt und gescreent. Die dabei eingesetzte Sonde enthielt Teile eines dTDP-Glucose 4,6-Dehydratasegens (DECKER et al., 1996). Es konnten 3 unterschiedliche Cosmide isoliert werden (Cosmide pURD10, 11,12), die mit der genannten Sonde hybridisierten (SCHNEIDER, 1995).

Ein erstaunliches Ergebnis wurde bei der Hybridisierung der Cosmide mit Sonden aus Cosmid pURD8 erzielt, über die bestätigt werden sollte, daß die Gene, die für die Synthese der Desoxyzucker sowie den Glycosyltransfer codieren, in Nachbarschaft zu den PKS-Genen lokalisiert sind. Davon wurde aufgrund der Tatsache ausgegangen, daß die Biosynthesegene für Antibiotika meist geclustert vorliegen. Eine Hybridisierung der Cosmide pURD 10, 11 und 12 mit den Sonden konnte jedoch nicht gezeigt werden. Zwei mögliche Interpretationen wurden genannt: zum einen wurde die Möglichkeit erwogen, daß im Falle des Urdamycins die PKS-Gene und die Gene für die Zuckersynthese nicht benachbart, d.h. geclustert vorliegen könnten, zum anderen wurde überlegt, ob es sich bei der isolierten dTDP-Glucose-Dehydratase um ein Enzym handelt, das an der Desoxyzuckerbiosynthese des Urdamycins keinen Anteil hat. Beide Überlegungen waren nicht zufriedenstellend. Die Aufklärung dieser Fragen war deshalb unter anderem Gegenstand dieser Arbeit.

Mittels der beschriebenen Methode (Herstellung einer Cosmidbank, Screenen der erhaltenen Cosmide mit einer dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase-Sonde), konnten auch aus *S.cyanogenus* S136 7 überlappende Cosmide isoliert werden (WESTRICH et al., 1997). Über Sequenzanalyse

konnten zahlreiche Gene detektiert werden, die für Enzyme codieren, die sowohl die Biosynthese des Polyketidaglycons als auch die Zuckersynthese katalysieren.

### 1.8 Zielsetzung der vorgelegten Arbeit

Das übergeordnete Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die Herstellung modifizierter bzw. neuer glycosidierter Naturstoffe mittels Kombinatorischer Biosynthese. Die Arbeit erfolgte hauptsächlich mit 2 Angucyclin-produzierenden Streptomyccetenstämmen, *S. fradiae* Tü2717, der die Urdamycine produziert und *S. cyanogenus* S136, dem Landomycin-Produzenten. Voraussetzung für die geplanten Versuche war die Detektion und Charakterisierung von Genen, die an der Zuckerbiosynthese beteiligt sind und damit auch Aufklärung von sogenannten Tailoring Reaktionen. Zur Anwendung kamen dabei einerseits etablierte molekularbiologische Methoden, die für verschiedene Versuche jedoch optimiert werden mußten, andererseits mußten neue molekularbiologische Strategien erarbeitet werden. Im einzelnen gliedert sich die vorgelegte Arbeit in folgende Punkte:

- Expression von mehreren Genen bzw. ganzen Genclustern verschiedener Produzenten glycosidierter Angucyclin-Antibiotika in verschiedenen Wirtsstämmen, um modifizierte bzw. neue glycosidierte Sekundärmetabolite zu erhalten.
- Kartierung der aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 isolierten Cosmide pURD 8, 10, 11 und 12.
- Sequenzanalyse eines 8 kb großen DNA-Bereiches aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster. Zielsetzung war dabei die Detektion von Genen, die an der Biosynthese von Urdamycin A beteiligt sind.
- Inaktivierung und Komplementierung der Glycosyltransferase *urdGT2* aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 und Untersuchung des Sekundärmetabolit-spektrums erhaltener Mutanten.

- Inaktivierung und Komplementierung der Oxygenase *urdM* aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 und Untersuchung des Sekundärmetabolitspektrums erhaltener Mutanten.
- Inaktivierung der Epimerase *urdZ1* aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 und Untersuchung des Sekundärmetabolitspektrums erhaltener Mutanten.
- Heterologe Expression verschiedener Glycosyltransferase-Gene in der *urdGT2*-Mutante.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Medien

Die Herstellung von Agarmedien erfolgt durch Zusatz von 21g Agar pro Liter Medium. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Medien mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

#### 2.1.1 Kultivierungsmedien für *E. coli* und Streptomyceten

##### LB-Medium (SAMBROCK et al. 1989)

Kultivierung, Transformation und Anzucht von *E. coli*

Trypton	10 g/l
NaCl	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
pH 7.0	

##### HA-Medium

Kultivierungsmedium für Streptomyceten

Glucose	4 g/l
Hefeextrakt	4 g/l
Malzextrakt	10 g/l
pH 7.3	

HA-Medium wird mit Leitungswasser angesetzt. Vor dem Autoklavieren wird 1ml einer 1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung pro Liter Medium zugegeben.

#### 2.1.2 Anzuchtmedien für die Protoplastierung von Streptomyceten

##### CRM-Medium

Saccharose	103 g/l
Tryptic Soy Broth	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	10.12 g/l
pH 7.0	

CRM-Medium wird mit Leitungswasser angesetzt. Nach dem Autoklavieren wird 0.1ml einer sterilen 1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung pro 10ml Medium zugesetzt.

##### S-Medium

Lösung 1: ad 800ml Aqua bidest

Pepton	4 g/l
Hefeextrakt	4 g/l



K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/l
Glycin	10 g/l

Lösung 2: ad 200ml Aqua bidest

Glucose	10 g/l
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.5 g/l

Beide Lösungen werden getrennt autoklaviert und steril gemischt.

### 2.1.3 Produktionsmedien für Streptomyceten

#### YEME-Medium (Yeast extract – malt extract medium)

Hefeextrakt	3 g/l
Bactopepton	5 g/l
Malzextrakt	3 g/l
Glucose	10 g/l
Saccharose	340 g/l

YEME-Medium wird mit Leitungswasser angesetzt. Nach dem Autoklavieren werden 2ml einer 2molaren MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O-Lösung pro Liter Medium zugesetzt.

#### AM-Medium (Produktionsmedium für *S. fradiae* Tü2717)

Glucose	20 g/l
Sojamehl (Vollfett)	20 g/l
pH 7.2	

Das Medium wird mit Leitungswasser angesetzt.

#### NL 111 / V-Medium (Produktionsmedium für *S. fradiae* Tü2717)

Lab Lemco Fleischextrakt	20 g/l
Malzextrakt	100 g/l
CaCO <sub>3</sub>	10 g/l
pH 7.2	

Das Medium wird mit Leitungswasser angesetzt.

#### GAM-Medium (Glycerol-Asparagin-Medium, Produktionsmedium für *S. lividans* TK24, CONE et al., 1989)

Glycerin	3%
L-Asparagin	0.1%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1%
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.04%
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0.01%

TSB-Medium (Tryptic soy broth)

30g / l

R5-Medium (nach HOPWOOD et al., 1985)

Saccharose	103g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25g/l
MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	10.12 g/l
Glucose	10 g/l
Casaminosäuren	0.1g/l
Hefeextrakt	5g/l
TES-Pufferan	5.73g/l
Spurenelementlösung	2ml (siehe 2.2.5)

Ad 1000ml mit Aqua bidest. Nach dem Autoklavieren werden folgende Lösungen zugesetzt:

0.5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10ml
5M CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	4 ml
20% L-Prolin	15ml
1N NaOH	7 ml

**2.1.4 Regenerationsmedium für Protoplasten**R2YE-Medium (modifiziert nach HOPWOOD et. al, 1985)

Lösung 1:

Bactoagar	22 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25g
MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	10.1g
CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	2.95g
Glucose	10g
Prolin	3g
Casaminosäuren	0.1g
H <sub>2</sub> O	500ml

Lösung 2: ad 500ml Aqua bidest

TES	5.73g
Hefeextrakt	5g
Sucrose	103g
pH 7.4 mit NaOH	

Lösung 3:

0.5 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10ml
---------------------------------------	------

Lösung 4:

Spurenelemente	2ml (siehe 2.2.6)
----------------	-------------------

Alle Lösungen getrennt autoklavieren und steril vereinigen. Die R2YE-Platten müssen nach dem Gießen und vor Verwendung gut getrocknet werden.

## 2.1.5 Selektionsmedium für die Protoplastentransformation

### SNA – Soft Nutrient Agar

(Überschichten der R2YE-Platten mit SNA- / Antibiotikumgemisch)

Difco nutrient broth powder	8 g/l
Agar	3 g/l

SNA wird mit Aqua bidest angesetzt und autoklaviert. Für das Überschichten der Regenerationsplatten sollte der SNA eine Temperatur von ca. 40°C haben.

## 2.2 Puffer und Lösungen

### 2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Rezepte für die folgenden Puffer wurden dem Protokoll „working procedure for the purification of plasmids and cosmids“, der Nucleobond Kits AX20 bzw. AX100 von Macherey-Nagel entnommen.

S1 (Resuspendierungspuffer):

TRIS/HCl	50 mM	
EDTA	10 mM	pH8
100µg RNase A	/ml	

Aufbewahrung bei 4°C

S2 (Lysepuffer):

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Aufbewahrung bei RT

S3 (Neutralisierungspuffer):

Kaliumacetat	2.5 M	pH5.2
--------------	-------	-------

Aufbewahrung bei 4°C

### 2.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA

#### L1-Lösung

25 mM TRIS / HCl
25 mM EDTA, pH 8

getrennt autoklavieren:

300 mM Saccharose
-------------------

Die Lösungen werden vor dem Versuch vereinigt.

### 2.2.3 Plasmid-Isolierung aus Streptomyceten

#### Lösung I

50 mM Glucose  
25 mM TRIS / HCl  
10 mM EDTA, pH 8

#### Lösung II

0.2N NaOH  
1% SDS

Die Lösung wird für jeden Versuch frisch angesetzt.

#### Lösung III

5M Kaliumacetat	60ml
Eisessig	11.5ml
H <sub>2</sub> O	28.5ml

### 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

#### TE-Puffer zum Lösen von DNA

EDTA	1 mM
TRIS/HCl	10 mM
pH 8	

#### Laufpuffer für Gelelektrophorese (1×TAE-Puffer)

EDTA	1 mM
TRIS	40 mM
Natriumacetat	10 mM
pH 7.8 mit Eisessig	

#### Loading Buffer

Bromphenol-Blau	0.25%
Saccharose	40%

#### DNA-Marker (1kb DNA-ladder, Boehringer Mannheim)

1 µg/ µl des 1Kb DNA-Ladder werden mit 20 µl TE-Puffer pH7.6 und 90 µl Loading Buffer gemischt.

#### Ethidiumbromid-Färbung der Agarosegele

Ethidiumbromid-Stocklösung	10 mg/ml
Ethidiumbromid-Färbebad	10 µg/ml

Das Färbebad wird mit Aqua dest. angesetzt.

## 2.2.5 Transformation von *E. coli*

### Blau-Weiß-Selektion

IPTG-Stocklösung	20 mM in H <sub>2</sub> O, Lösung wird sterilfiltriert
X-Gal-Stocklösung	100mg / ml DMF

Endkonzentration pro Platte:

IPTG	400µM = 20µl
X-Gal	20 mg = 20µl

## 2.2.6 Protoplastierung von Streptomyceten

### Saccharose-Waschlösung

Saccharose 10.3%

### P-Puffer (Protoplastierungspuffer, THOMPSON et al., 1982)

Saccharose	103g	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4mM	
MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	10mM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4mM	
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	2.5mM	
TES-Pufferan	2.5mM	pH 7.2
Spurenelement-Lösung	2%	

Ad 1000ml Aqua bidest.

Die Lösungen werden einzeln angesetzt und nach dem Autoklavieren steril vereinigt. Dabei wird die CaCl<sub>2</sub>-Lösung zuletzt zugegeben. Für den Protoplastierungsvorgang an sich werden dem P-Puffer 2mg/ml Lysozym zugesetzt.

### Trace-Element-Lösung

(für R2YE-Medium, P-, T-Puffer und R5-Medium, nach HOPWOOD et al., 1985)

ZnCl <sub>2</sub>	30µM
FeCl <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O	740µM
CuCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	59µM
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> × 10H <sub>2</sub> O	26µM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> × 4H <sub>2</sub> O	8µM
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	50µM

Die Traceelement-Lösung wird mit Aqua bidest angesetzt.

## 2.2.7 Polyethylenglycol-vermittelte Protoplasten-Transformation

T-Puffer (Transformations-Puffer, THOMPSON et al., 1982)

Saccharose	2.5%	
PEG1000	50 %	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4mM	
MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	10mM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4mM	
CaCl <sub>2</sub>	10mM	
TRIS-Maleat	50mM	pH 8
Spurenelemente	0.03 %	(siehe 2.2.5)

Die Lösungen werden einzeln angesetzt und nach dem Autoklavieren steril gemischt.

## 2.3 Antibiotika

Abhängig vom verwendeten Vektor in den jeweiligen Versuchen wurden unterschiedliche Antibiotika eingesetzt, die in Tab. 1 zusammengefaßt sind. Die mit H<sub>2</sub>O angesetzten Antibiotika wurden über einen Sterilfilter (0.2µm) sterilisiert. Alle Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Antibiotikum	Konzentration der Stocklösung	Konzentration im Medium
Apramycin	100 mg/ml H <sub>2</sub> O	20 µg/ml
Carbenicillin	50 mg/ml H <sub>2</sub> O	50
Thiostrepton	50 mg/ml DMSO	50
Erythromycin	25 mg/ml EtOH	50
Tetracyclin	5 mg/ml EtOH	10
Streptomycin	10 mg/ml H <sub>2</sub> O	25
Chloramphenicol	34 mg/ml EtOH	34

Tab. 1: Verwendete Antibiotika und Angaben über die Konzentrationen der Stocklösungen sowie der eingesetzten Endkonzentrationen in den Medien

## 2.4 Bakterienstämme

Die folgende Tabelle listet alle in den im folgenden beschriebenen Versuchen eingesetzten Bakterienstämme auf. Genannt werden sowohl die *E. coli*-Stämme, die zur Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet wurden, als auch die verschiedenen Streptomyceten-Stämme, die zum einen als Rezipientenstämme für Expressionsversuche dienten, zum anderen für Geninaktivierungsversuche eingesetzt wurden.

Stamm	relevante Marker	Referenz
<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac[F'proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup>ZDM15</i> , Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]	RALEIGH et al., 1991
<i>E. coli</i> ET 12567	F-, <i>dam</i> <sup>-</sup> 13::Tn9, <i>dcm</i> <sup>-</sup> 6 <i>hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>zjj</i> <sup>-</sup> 202::Tn10, <i>recF143</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>ara</i> <sup>-</sup> 14, <i>lacY1</i> , <i>xyl15</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>his64</i> , <i>tsx78</i> , <i>mtII</i> , <i>glnV44</i>	MACNEIL et al., 1992
<i>Streptomyces fradiae</i> Tü2717	Urdamycin-Produzent	ROHR, 1984, DRAUTZ et al., 1986
<i>Streptomyces fradiae</i> Δ12	Mutante von <i>S. fradiae</i> Tü2717, Deletion der PKS-Gene	DECKER und HAAG, 1995
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	Wirtsstamm zur Vermehrung von Streptomyceten-Plasmiden	FEITELSON et al., 1983
<i>Streptomyces coelicolor</i> CH999	Mutante von <i>S. coelicolor</i> , Wirtsstamm zur Produktion von Polyketid-Derivaten	MCDANIEL et al., 1993
<i>Streptomyces cattleya</i>	Thienamycin-Produzent	KAHAN et al., 1979

Tab. 2: Verwendete *E. coli*- und Streptomyceten-Stämme mit relevanten Markern

## 2.5 Vektoren

Mit den im folgenden genannte Vektoren wurden Klonierungs- und Sequenzierungsversuche sowie Transformations- und Geninaktivierungsexperimente durchgeführt.

Vektor	Resistenzgen(e)	Beschreibung	Referenz
pBSK(-)	<i>bla</i>	Klonier- und Sequenziervektor für <i>E. coli</i>	SHORT et al., 1988, ALTING-MEES und SHORT, 1989
pUC19	<i>bla</i>	Klonier- und Sequenziervektor für <i>E. coli</i>	YANISCH-PERRON et al., 1985
pWHM3	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	<i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> Shuttlevektor	VARA et al., 1989
pKC1132	<i>aac(3)IV</i>	Geninaktivierungsvektor für Streptomyceten	BIERMANN et al., 1992
pSP1	<i>bla</i> / <i>ermE</i>	Geninaktivierungsvektor für Streptomyceten	PELZER et al., 1997
pUWL 201	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	<i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> Shuttlevektor	WEHMEIER & PIEPERSBERG, persönliche Mitteilung
pEM4	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	<i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> Shuttlevektor mit konstitutivem <i>erm</i> -Promotor	VARA et al., 1989, QUIROS et al., 1998
Litmus <sup>TM</sup> 28	<i>bla</i>	Kloniervektor für <i>E. coli</i>	New England Biolabs, USA
pBC	<i>cam</i>	Kloniervektor für <i>E. coli</i>	Stratagene, Heidelberg
pOJ446	<i>am</i>	Cosmid	BIERMAN et al., 1992

Tab. 3: Beschreibung der für die verschiedenen Versuche eingesetzten Vektoren

## 2.6 Plasmide und Cosmide

Bezeichnung der Plasmide bzw. Cosmide	Beschreibung / Verwendung	Herkunft
pURD8	Cosmid aus dem Gencluster von <i>S. fradiae</i> Tü2717 mit PKS-Genen	DECKER & HAAG, 1995
pURD11, pURD11, pURD12	Cosmide aus dem Gencluster von <i>S. fradiae</i> Tü2717	SCHNEIDER, 1995
H2-26, E2-3, H1-43, L4-61, Q3-43	Cosmide aus <i>S. cyanogenus</i> S136, Expressionsversuche	WESTRICH et al., 1999
pSH3071	Cosmid aus WP 4669, Expressionsversuche	HONG et al., 1997
1, 15, 18, Wt	Cosmide aus <i>S. violaceoruber</i> Tü22, Expressionsversuche	BECHTHOLD et al., 1995
10 kb <i>Bam</i> HI	Plasmid aus Cosmid H2-26, pWHM3, Expressionsversuche	diese Arbeit
7 kb <i>Bam</i> HI	Plasmid aus Cosmid H2-26, pWHM3, Expressionsversuche	diese Arbeit
14 kb <i>Eco</i> RI	Plasmid aus Cosmid H2-26, pWHM3, Expressionsversuche	diese Arbeit
2-10	7,5 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pURD8, in pUC19, Subklonierung für Sequenzanalyse, Konstruktherstellung für Inaktivierungs- und Komplementierungsversuche	DECKER & HAAG, 1995
18B	3,5 kb <i>Sac</i> I-Fragment aus pURD12, pBlueskript SK(-), Sequenzanalyse	diese Arbeit
2-10 Pst SL	4 kb <i>Pst</i> I-Selbstligationsfragment aus 2-10, pUC19, Sequenzanalyse	diese Arbeit
2-10 Pst SL Sall	1,9 kb <i>Sal</i> I-Fragment aus 2-10 Pst SL, pBlueskript SK(-), Sequenzanalyse	diese Arbeit
B32	5,3 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus <i>S. violaceoruber</i> Tü22, pBlueskript SK(-)	BECHTHOLD et al., 1995
pSP-urdGT2d	1,9 kb <i>Sal</i> I (2-10 Pst SL Sall) mit 327 bp großer Deletion innerhalb von <i>urdGT2</i> , pSP1, Inaktivierung von <i>urdGT2</i>	diese Arbeit
pKC-urdMd	5,5 kb <i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI-Fragment mit 498 bp großer Deletion innerhalb von <i>urdM</i> , pKC1132, Inaktivierung von <i>urdM</i>	diese Arbeit
pKC-urdZ1d	1,4 kb großes <i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI-Fragment mit frameshift Mutation innerhalb von <i>urdZ1</i> , pKC1132, Inaktivierung von <i>urdZ1</i>	diese Arbeit
pBF-EM4-1	1,5 kb <i>Eco</i> RI / <i>Xba</i> I-Fragment, pEM4, Komplementierung von BF-1-1	diese Arbeit

(Fortsetzung auf Seite 25)



Bezeichnung der Plasmide bzw. Cosmide	Beschreibung / Verwendung	Herkunft
pBF-pUWL-1	7,1 kb <i>EcoRI</i> / <i>BglII</i> -Fragment, pUWL201, Komplementierung von BF-2-1	diese Arbeit
pEM-B32	5,3 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus <i>S. violaceoruber</i> Tü22, pEM4, Heterologe Expression in BF-1-1	diese Arbeit
pUWL-B32	5,3 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus <i>S. violaceoruber</i> Tü22, pUWL201, Heterologe Expression in BF-1-1	diese Arbeit
pUWL-lanGT1-lanGT2	<i>lanGT1</i> und <i>lanGT2</i> aus <i>S. cyanogenus</i> S136 in pUWL201, Heterologe Expression in BF-1-1	diese Arbeit
pUWL-lanGT1	<i>lanGT1</i> aus <i>S. cyanogenus</i> S136 in pUWL201, Heterologe Expression in BF-1-1	A. Trefzer
pUWL-lanGT2	<i>lanGT2</i> aus <i>S. cyanogenus</i> S136 in pUWL201, Heterologe Expression in BF-1-1	A. Trefzer

Tab. 4: Für die beschriebenen Versuche eingesetzte Plasmid-Konstrukte

## 2.7 Kultivierung / Anzucht

### 2.7.1 Kultivierung und Anzucht von Streptomyceten

Die Kultivierung der genannten Streptomyceten-Stämme erfolgte bei 28°C auf HA-Agarplatten für ca. 4-6 Tage im Brutschrank, bis eine Sporulation zu beobachten war. Die Platten wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Die Anzuchtbedingungen für die verschiedenen Versuche und Stämme sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Versuch	Streptomycetenstamm	Medium	Anzuchtbedingungen
Protoplastierung	<i>S. fradiae</i> Tü2717 <i>S. fradiae</i> Δ12 <i>S. lividans</i> TK24 <i>S. coelicolor</i> CH999 <i>S. cattleya</i>	CRM-Medium, S-Medium	50 ml Medium in 300 ml Schikanekolben, Inkubation bei 28°C, 48-72h
Isolierung von Gesamt-DNA	<i>S. fradiae</i> Tü2717 hergestellte Mutanten	CRM-Medium, S-Medium	50 – 100 ml Medium in Schikanekolben, Inkubation bei 28°C, 48-72h

(Fortsetzung auf Seite 26)

Versuch	Streptomycetenstamm	Medium	Anzuchtbedingungen
Selektion auf Doppel-Crossover bei Geninaktivierung	<i>S. fradiae</i> Tü2717-Einfach-Crossover-Mutanten	TSB-Medium	50 ml in 300 ml Schikanekolben mit Metallspirale, Inkubation bei 40°C, 1 Passage ca. 4-6d
Produktion (Expressionsversuche oder Geninaktivierung)	<i>S. fradiae</i> Tü2717	AM-Medium NL 111 / V-Medium	20 – 100 ml Medium in Schikanekolben mit Wattestopfen, Inkubation bei 28°C, ca. 72h
	<i>S. lividans</i> TK24	R5-Medium YEME-Medium	50-100ml Medium in Schikanekolben, Inkubation bei 28°C, ca. 72h
		Nach HONG et al. (1997) GAM-Medium	Vorkultur 20ml R5- bzw. YEME-Medium für 4d, Hauptkultur 20ml YEME- bzw. GAM-Medium, Inkubation bei 28°C, 230rpm, 48-96h 6µg Apramycin / ml Medium
	<i>S. coelicolor</i> CH999	R5-Medium Flüssig	50-100ml Medium in Schikanekolben, Inkubation bei 28°C, ca. 72h
		Fest	Inkubation der Agarplatten bei 28°C bis Sporulation
	<i>S. fradiae</i> Δ12	AM-Medium	50-100ml Medium in Schikanekolben, Inkubation bei 28°C, ca. 72h

Tab. 5: Anzuchtmedien und Anzuchtbedingungen für die verschiedenen Streptomycetenstämme

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Schikanekolben mit Zellstoffstopfen verschlossen. Die Inkubation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei ca. 175 rpm auf dem Schüttler.

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

Die Kultivierung von *E. coli* wurde nach SAMBROCK et al. (1989) durchgeführt. Dazu erfolgte ein Ausstrich auf LB-Platten, die über Nacht bei 37°C kultiviert wurden. Aufbewahrt wurden die Platten bei 4°C im Kühlschrank. Die Anzucht in Flüssigmedium wurde bei 37°C und 170 rpm über Nacht in LB-Medium durchgeführt.

## **2.8 Herstellung von Dauerkulturen**

### **2.8.1 Streptomyceten - Sporensuspensionen**

Da die Stammhaltung von Streptomyceten auf HA-Agarplatten ein häufiges Überimpfen erforderlich macht, wurden von den verschiedenen Stämmen Dauerkulturen in Form von Sporensuspensionen angelegt, wie von HOPWOOD et al. (1985) beschrieben. Die Lagerung der Sporensuspensionen erfolgte bei -20°C.

Die Sporen einer gut sporulierten HA-Agarplatte wurden mit 9 ml sterilem H<sub>2</sub>O abgeschwemmt, in ein Falcon-Tube überführt und 1 min gevortext. Es folgte eine Filtration über sterile Baumwollwatte um Mycelstücke abzutrennen. Das Filtrat wurde bei 3000 rpm und 4°C pelletiert, das Pellet im verbleibenden Tropfen resuspendiert und, in Abhängigkeit von seiner Größe, in 800 bis 1600 µl 20% Glycerin aufgenommen. Die Sporensuspension wurde dann bei -20°C eingefroren.

### **2.8.2 *E. coli*-Stämme - Glycerinkulturen**

Zunächst wurden von den *E. coli*-Stämmen Dauerkulturen im Form einer Glycerinkultur angelegt. Dazu wurde nach Anzucht der *E. coli* in LB-Medium bei 37°C über Nacht 300 µl der Flüssigkultur mit 500 µl des Glycerin enthaltenden Dauerkulturmediums vermischt und die Probe bei -20°C und -70°C eingefroren. Diese Dauerkulturen wiesen jedoch eine nur geringe Haltbarkeit auf. Für weitere Versuche wurden Plasmide bzw. Cosmide deshalb jedesmal neu in *E. coli* transformiert.

## **2.9 Molekularbiologische Methoden**

### **2.9.1 Enzymatische Modifikation von DNA**

#### **2.9.1.1 Restriktion von DNA**

Für die Restriktion von DNA wurden die Restriktionsenzyme mit den entsprechenden Puffern und optimalen Temperaturbedingungen nach Herstellerangabe eingesetzt.

Um Gesamt-DNA für Southern Hybridisierung zu restringieren, wurde die Konzentration der DNA über Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt und folgender Ansatz (für einen Blot) pipettiert:

50µl DNA (ca. 3-5 µg)

1µl RNase

100 U Restriktionsenzym

ad 100µl H<sub>2</sub>O

Die Restriktion erfolgte über Nacht. Der Ansatz wurde dann durch Fällung aufkonzentriert und in 12 – 20µl TE-Puffer pH 8 aufgenommen.

#### **2.9.1.2 Ligation**

Die Ligation von DNA erfolgte nach SAMBROCK et al. (1989). DNA mit kohäsiven Enden wurde über Nacht bei 16°C bzw 2 h bei Raumtemperatur ligiert. Blunt End-Ligationen wurden bei 4°C über Nacht durchgeführt. Die verwendete Ligase mit Puffer wurde gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt.

### 2.9.1.3 Auffüllreaktionen mit DNA-Polymerasen

#### Auffüllreaktion mittels T4-DNA-Polymerase

Mit T4-DNA-Polymerase können 3'- bzw. 5'-Überhänge aufgefüllt werden. Folgender Ansatz wurde nach Anweisung des Herstellers pipettiert:

DNA	14 $\mu$ l ( $\cong$ 1 $\mu$ g)
10 $\times$ Puffer	2 $\mu$ l
BSA 0.1%	2 $\mu$ l
dNTP-Mix 2mM	2 $\mu$ l
T4-DNA-Polymerase	3U / $\mu$ g DNA

Tab. 6: Auffüllreaktion mit T4-DNA-Polymerase

Der Ansatz wurde 5 min bei 37°C inkubiert, mit H<sub>2</sub>O auf 50  $\mu$ l aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen phenolisiert. Die Fällung des wäßrigen Überstandes erfolgte mit Ethanol absol. (-20°C) bei 15000 rpm.

#### Auffüllreaktion mit Klenow-Enzym

Folgender Ansatz wurde nach Anweisung des Herstellers pipettiert:

DNA	16 $\mu$ l
10 $\times$ Filling-In Puffer	2 $\mu$ l
dNTP-Mix 0.5 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Klenow-Enzym	1 $\mu$ l

Tab. 7: Auffüllreaktion mit Klenow-Enzym

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig vermischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Enzyminaktivierung erfolgte für 10 min bei 75°C. Der Ansatz wurde daraufhin zur Raumtemperatur abgekühlt.

## **2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese**

### **2.9.2.1 Elektrophoresebedingungen**

DNA wurde über Agarose-Gelelektrophorese nach SAMBROCK et al. (1989) charakterisiert. Dazu wurden, je nach zu erwarteten DNA-Fragmentgrößen, Agarosegele im Bereich von 0.3% (DNA-Fragmente von 5 – 60 kb) bis 1.5% (DNA-Fragmente von 0.2 – 3 kb) hergestellt. Für den Gelelektrophoreselauf wurde die DNA mit Auftragspuffer versetzt. Der Lauf erfolgte mit 1× TAE-Puffer als Laufpuffer. Zur Ermittlung der Fragmentgrößen der aufgetrennten DNA wurde als Längenstandard 1kb Ladder (0,2 bis 12 kb) bzw. High Molecular Weight DNA Marker (8 bis 48 kb) aufgetragen.

### **2.9.2.2 Detektion**

Nach erfolgtem Gelelektrophoreselauf wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Die Dokumentation wurde mit einem UV-Transilluminator (Bachofer, Reutlingen) und einer CD-Kamera (Eagle Eye, Stratagene, Heidelberg) durchgeführt.

### **2.9.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren, wurden die entsprechenden Fragmente, nach Auftrennung über Gelelektrophorese, Färbung des Gels im Ethidiumbromidbad und Dokumentation, unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Isolierung erfolgte mit dem QIAquick-Gel Extraction Kit von QIAGEN.

## **2.9.3 Methoden zur DNA-Isolierung**

### **2.9.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

(Minipräparation nach BIRNBOIM und DOLY, 1979)

Die Minipräp-Methode nutzt das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler und Plasmid-DNA im pH-Bereich von 12-12.5, wobei bakterielle chromosomale DNA denaturiert, kovalent geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA jedoch intakt bleibt.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im Minipräp-Maßstab wurden Zellen in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C und 170 rpm geschüttelt.

Zwei ml der Übernachtskulturen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 5min pelletiert. Die Resuspendierung erfolgte durch Zusatz von 0.4 ml kaltem S1-Puffer. 0.4 ml S2-Puffer wurden zugegeben, vorsichtig vermischt und der Ansatz 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von 0.4 ml S3-Puffer erfolgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Die Zentrifugation wurde bei 14000 rpm für 20 min bei 4°C durchgeführt. Der wäßrige Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt, mit 1 ml Phenol-Chloroform gut vermischt und bei 14000 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert. Wiederum wurde der die Plasmid-DNA enthaltende wäßrige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Fällung erfolgte mit 0.8 Volumen Isopropanol bei einer Zentrifugation bei 14000 rpm, 4°C für 30 min. Das entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol (-20°C) bei 14000 rpm und 4°C für 5 min gewaschen und nach Entfernung des Überstandes bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde dann in TE-Puffer pH 8 aufgenommen und die DNA über Nacht im Kühlschrank gelöst.

### **2.9.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* über Nucleobond AX-Kartuschen**

Um konzentrierte, reine DNA z.B. für Sequenzanalyse oder Protoplastentransformation zu erhalten, wurde die Plasmid-Isolierung mit Nucleobond AX20 bzw. AX100-Kartuschen der Firma Macherey und Nagel, Düren, durchgeführt. Diese Methode stellt eine modifizierte alkalische Lyse nach BIRNBOIM und DOLY (1979) dar.

Dabei wird die nach alkalischer Lyse und Fällung über Kaliumacetat im Überstand der Probe enthaltene Plasmid-DNA auf AX-Kartuschen aufgetragen, die nach dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie arbeiten. Die Auftrennung beruht auf den Elutionseigenschaften

von Plasmid-DNA, Proteinen und anderen Nucleinsäuren bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und pH-Werten.

Die Plasmid-Isolierung wurde nach dem Protokoll "Working procedure for the purification of plasmids and cosmids" mit dem Nucleobond AX20- bzw. AX100-Kit durchgeführt.

Die Isolierung von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad erfolgte außerdem mit einem Kit der Firma Promega (Wizard<sup>TM</sup> Plus Minipreps DNA Purification Systems).

### **2.9.3.3 Isolierung von Gesamt-DNA**

Die Isolierung von Gesamt-DNA, d.h. chromosomaler und Plasmid-DNA, wurde nach einer modifizierten Methode nach ALTENBUCHNER & CULLUM (1984) durchgeführt. Die homogenisierten Zellen werden dabei durch den Zusatz von Lysozym protoplastiert. Die Gesamt-DNA wurde bei Southern-Hybridisierung und PCR eingesetzt.

Die Zellen wurden für 2-3 Tage in S- bzw. CRM-Medium angezogen. Nach Ernte der Zellen durch Zentrifugation wurde das Myzel mit L1-Puffer resuspendiert und daraufhin homogenisiert. Das Homogenisat wurde pelletiert und in 20 ml L1-Lösung resuspendiert. Nach weiterer Pelletierung erfolgte die Protoplastierung in 10 ml L1-Puffer mit 10 mg / ml Lysozym. Dafür wurden die Ansätze 45 min bei 37°C inkubiert und ab und zu invertiert. Nach Zusatz von 4 ml 5% SDS und vorsichtigem Vermischen erfolgte die weitere Inkubation bei 65°C für 10 min.

Das erhaltene Lysat wurde zweimal mit je 5 ml Phenol-Chloroform pH 8 versetzt, vorsichtig invertiert und bei 15000 rpm, 4°C für 40 min abzentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die Oberphase wurde dann mit 1 / 10 Vol. Kaliumacetat, pH 8, und 1 Vol. kaltem Isopropanol gefällt und 15 –30 min auf Eis inkubiert. Auf das Fischen der präzipitierten DNA, wie im Protokoll angegeben, wurde verzichtet. Die DNA wurde direkt durch Zentrifugation bei 15000 rpm für 30 min bei 4°C pelletiert, mit 70 % Ethanol (-20°C) gewaschen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und daraufhin in 500 µl TE-Puffer pH8 bei 4°C gelöst.



#### 2.9.3.4 Isolierung von Plasmiden aus Streptomyceten

Die Isolierung von Plasmiden aus Streptomyceten wurde im Minipräp-Maßstab nach einer modifizierten Methode von HOPWOOD (1985) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen entweder in TSB-Medium angezogen, oder aber die Isolierung erfolgte direkt aus dem Produktionsmedium NL 111 / V.

Die Zellen wurden über Zentrifugation in 2 ml Eppendorfgläsern pelletiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung I, der 4 mg / ml Lysozym zugegeben wurde, folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. 400 µl der Lösung II wurden vorsichtig mit dem Ansatz vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von 400 µl Lösung III wurde 10 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einer 10 minütigen Zentrifugation. Der Überstand wurde phenolisiert und die wässrige Oberphase mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde nach Restriktion über Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Oft konnte hier jedoch eine Detektion der Plasmide durch Überlagerung von chromosomaler DNA nicht erfolgen. Die Plasmide wurden deshalb zur Amplifikation in *E. coli* XL1Blue MRF transformiert, die Plasmid-DNA reisoliert und nach Restriktion über Elektrophorese aufgetrennt.

#### 2.9.4 PCR

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden zum einen DNA-Fragmente zur Herstellung von Inaktivierungs- bzw. Komplementierungskonstrukten amplifiziert, zum anderen diente die PCR, neben der Southern Hybridisierung, als Nachweismethode für ein erfolgtes Einfach- bzw. Doppel-Crossover bei den durchgeführten Inaktivierungsversuchen. Die für die Sequenzanalyse eingesetzte PCR-Methode wird unter Punkt 2.9.6.1 beschrieben.

Für die Amplifikation von PCR-Fragmenten für Inaktivierungs- und Komplementierungskonstrukte wurde Pfu Turbo DNA Polymerase der Firma Stratagene verwendet, der Nachweis von Crossover-Ereignissen wurde mit Taq-Polymerase, ebenfalls von Stratagene, durchgeführt. Beide Enzyme wurden gemäß Herstellervorschrift eingesetzt. Die PCR-Reaktionen

erfolgten mit einem Thermo Cycler Gene Amp System 2400 von Perkin Elmer. Die Tabellen 8 und 9 stellen Reaktionsansatz und PCR-Programm dar.

<b>PCR-Reaktionsansatz</b>	
Template-DNA	1 $\mu$ l (100 ng)
Primer	je 0,1 $\mu$ M
Glycerin 50 %	20 % (v/v)
10 $\times$ Polymerase-Puffer	10 % (v/v)
dNTP-Mix 20 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O bidest	ad 100 $\mu$ l
Taq-Polymerase	2 U
Pfu Turbo DNA Polymerase	2.5 U

Tab. 8: Pipettierschema für den PCR-Reaktionsansatz

<b>Programm zur PCR-Amplifikation</b>		
Temperatur	Zeit	
96 °C	9 min	
95 °C	1 min	35 Zyklen
68 °C	2.5 min	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	
4 °C	$\infty$	

Tab. 9: PCR - Programm

Die PCR-Amplifikate, die zur Konstruktion von Inaktivierungs- und Komplementierungsplasmiden verwendet werden sollten, wurden mit einem Kit von Amersham (nucleon QC for PCR / Oligo clean up) über Säulen gereinigt und durch Fällung aufkonzentriert.

PCR-Produkte, die dem Nachweis von Crossover-Ereignissen dienen, wurden nach Aufkonzentrierung über eine Ethanol-Fällung über Gelelektrophorese aufgetrennt. Sie wurden dazu ungeschnitten oder nach Restriktion mit entsprechenden Enzymen auf das Agarosegel aufgetragen.

Die für die jeweiligen Versuche verwendeten Primer werden im folgenden beschrieben. Die genaue Versuchsbeschreibung zur Herstellung von Inaktivierungs- bzw. Komplementierungskonstrukten über PCR ist unter den Punkten 2.9.9.1 und 2.9.10.1 aufgeführt. Die Beschreibung des Nachweises von Crossover-Ereignissen erfolgt im jeweiligen Ergebnisteil.

## Primer zur Herstellung von Inaktivierungskonstrukten

### Inaktivierung von *urdZ1*

Name des Primers	Sequenz	Länge
Epi1 <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	5'ACTGCACACGGATCCGGGCTGGAA3'	24 nt
Epi2 <i>Eco</i> RI-Schnittstelle	5'GCCGACGATGAATTCGGGACGCCA3'	24 nt

Tab. 10: Primer zur Herstellung des Konstruktes für die Inaktivierung von *urdZ1*

## Primer zur Herstellung von Komplementierungskonstrukten

### Komplementierung von BF-1-1

Name des Primers	Sequenz	Länge
UrdGT1 <i>Xba</i> I-Schnittstelle	5'ATCCGCTCTAGACGGATCTCGACCT3'	25 nt
UrdGT2 <i>Eco</i> RI-Schnittstelle	5'CACGATGACACCGAATTCGGTGACT3'	25 nt

Tab. 11: Primer zur Herstellung des Konstruktes für die Komplementierung der Mutante BF-1-1

## Primer zum Nachweis von Crossover-Ereignissen

### Nachweis eines Einfach- bzw. Doppel-Crossovers bei Herstellung der *urdM*-Mutante

Name des Primers	Sequenz	Länge
urdM1	5'TCCTTCTCGCCGGTGACGCCGCGC3'	24 nt
urdM2	5'AGCACCACCGAGACCTCCAGGGCG3'	24 nt

Tab. 12: Primer für die Überprüfung der Einfach-Crossover-Mutante BF-2 und der Doppel-Crossover-Mutante BF-2-1

### Nachweis eines Doppel-Crossovers bei Herstellung der *urdGT2*-Mutante

Name des Primers	Sequenz	Länge
UrdGT3	5'GCAGGCGAAGCTCGTCACTGCGT3'	24 nt
UrdGT4	5'GCTCCGGGACCTTGTACACGACCA3'	24 nt

Tab. 13: Primer zum Nachweis eines erfolgten Doppel-Crossovers bei Mutante BF-1-1

## **2.9.5 Southern Hybridisierung**

Die von SOUTHERN (1975) entwickelte Southern Hybridisierung zur Identifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach den Angaben des DIG-System Users Guide (Boehringer Mannheim GmbH, 1993) durchgeführt.

### **2.9.5.1 Auftrennung und Transfer der DNA**

Plasmid- oder Gesamt-DNA (genomischer Blot) wurden über Restriktion mit entsprechenden Enzymen gespalten und in einem 0.7% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid und Dokumentation wurden die erhaltenen Fragmente im Agarosegel 2 min depuriniert, was zur einer Verminderung der Wechselwirkungen zwischen großen DNA-Fragmenten und der Agarose führt, so daß diese Fragmente einfacher geblotten werden können. Die zu DNA-Einzelsträngen führende Denaturierung wurde  $2 \times 15$  min in Denaturierungslösung durchgeführt. Nach  $2 \times 15$  min Neutralisierung wurden die einzelsträngigen DNA-Fragmente mittels einer Kapillar-Blotting-Apparatur und  $20 \times$  SSC-Puffer über Nacht auf eine Trägermembran aus Nylon (Hybond N, Amersham) transferiert. Eine Fixierung der DNA auf der Nylon-Membran erfolgte über UV-Bestrahlung (60s Vorderseite, 30s Rückseite).

### **2.9.5.2 Prähybridisierung und Hybridisierung**

Für die nun folgende Prähybridisierung wurde die Nylonmembran in Rollertubes mit 15 ml Prähybridisierungspuffer bei  $68^{\circ}\text{C}$  für 4h im Hybridisierungssofen inkubiert. Die DIG-markierte Sonde (Labeling-Protokoll gemäß des DIG-DNA Labeling and Detection Kits, Boehringer Mannheim) wurde für die anschließende Hybridisierung denaturiert, in 5 ml Prähybridisierungspuffer gegeben und die Hybridisierung über Nacht bei  $68^{\circ}\text{C}$  vorgenommen.

### 2.9.5.3 Detektion und Nachweis

DIG-markierte Sonden (und damit die gesuchten DNA-Fragmente) wurden über ein Anti-Digoxigenin-AP (Alkalische Phosphatase)-Konjugat detektiert, und mit dem Chemiluminiszenz-Substrat CSPD<sup>®</sup> (Boehringer Mannheim) nachgewiesen. Dazu wurde die Membran nach Hybridisierung zunächst  $2 \times 5$  min in  $2 \times$  Waschlösung bei RT, dann  $2 \times 15$  min in  $0.1 \times$  Waschlösung bei  $68^{\circ}\text{C}$  gewaschen. Nach Äquilibrieren der Nylonmembran in Puffer 1 für 1 min, Inkubation in Puffer 2 für 30 min, wurde diese weitere 30 min in Puffer 2 mit Anti-DIG-Alkalischer Phosphatase inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 2 Waschschrte für je 15 min mit Puffer 1 + 0.3% Tween entfernt. Nach Äquilibrieren der Membran in Puffer 3 für 2 min wurde das Chemiluminiszenzsubstrat CSPD<sup>®</sup> auf die Membran geträufelt und der Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) aufgelegt. Die Exposition des Films wurde von 10min bis hin zu mehreren Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorgenommen.

Um die Größe der erhaltenen Signale bestimmen zu können, wurde Digoxigenin-gelabelter Längenstandard (DNA molecular weight marker VII, digoxigenin-labeled, Boehringer Mannheim) verwendet, der 15 Fragmente definierter Größe enthält.

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden gemäß den Angaben im DIG-System Users Guide, Boehringer Mannheim, hergestellt.

### 2.9.5.4 Reprobing von chemiluminiszenz-detektierten Nylonmembranen

Um auf Nylonmembranen geblottete DNA-Fragmente gegen weitere Sonden hybridisieren zu können, mußten zunächst die vorher verwendeten Sonden entfernt werden ("Stripping Membranes for Reprobing" aus DIG-System Users Guide, Boehringer Mannheim). Dazu wurde die Membran 1 min mit Wasser gewaschen. Es folgte eine zweimalige Inkubation mit 0.2N NaOH und 0.1% SDS für 10 min bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Dieser Inkubationsschritt entfernt die DIG-gelabelte Sonde. Nach vorsichtigem Schwenken der Membran in  $2 \times$  SSC-Puffer konnte mit der Prähybridisierung fortgefahren werden.

## 2.9.6 DNA-Sequenzierung

Um die Abfolge von Basen in DNA-Molekülen zu bestimmen, wurde die biochemische Didesoxy- oder Kettenabbruchmethode von SANGER (1977) angewendet.

Die Synthese eines neuen DNA-Stranges wurde dabei mit paralleler Amplifikation durch PCR – Cycle Sequencing – gekoppelt.

Die zu analysierenden DNA-Fragmente wurden dazu in den Vektor pBlueskript SK(-) kloniert, bzw. lagen schon im Vektor pUC19 vor. Die Reaktionen für die PCR wurden gemäß der Herstellervorschrift mit dem "Thermo Sequenase core kit RPN 2440 with 7-deaza-dGTP" (Amersham, Braunschweig) angesetzt.

### 2.9.6.1 PCR

#### Nucleotid-Mix

Die Thermo Sequenase wurde für den jeweiligen Nucleotid-Mix A, C, G oder T 1:8 mit Enzyme dilution buffer verdünnt. Das Endvolumen eines jeden Reaktionsansatzes betrug 30µl.

Nucleotid-Mix (A, C, G oder T)	20µl
Reaction buffer	5 µl
Thermo Sequenase Mix	5 µl

Tab. 14: Reaktionsansatz für den Nucleotid-Mix bei Sequenzanalyse

#### Primer- / Template-DNA-Mix

Für jede zu sequenzierende Probe wurde zunächst die DNA-Konzentration mit dem GeneQuant Photometer (Pharmacia, Freiburg) bestimmt und das für die Sequenzanalyse einzusetzende erforderliche Volumen in µl berechnet. Als Primer wurden sowohl fluoreszenzmarkierte (TexasRed<sup>TM</sup>) T3- und T7- sowie M13 forward oder reverse Primer der Firma USB (Cleveland, Ohio) eingesetzt, von denen jedem Ansatz 2 µl zugegeben wurden. Das Endvolumen von 22 µl wurde mit sterilem Wasser eingestellt.

### PCR-Mix und PCR-Bedingungen

Pro zu analysierender Probe wurden 4 PCR-Ansätze mit einem Endvolumen von 8 $\mu$ l hergestellt. Dazu wurden je 5 $\mu$ l des Primer- / Template-DNA-Mixes in die 4 MicrozentrifugengefäÙe pipettiert. Jedem Ansatz wurden 3 $\mu$ l von einem der Nucleotid-Mixe A, C, G oder T zugesetzt.

Die PCR wurde mit einem PCR-Gerät von Perkin Elmer (Weiterstadt) GeneAmp 2400 nach folgendem Programm durchgeführt:

Temperatur	Zeit	
98°C	5 min	
98°C	30 sec	25 Zyklen
60°C	30 sec	
60°C	30 sec	
4°C	$\infty$	

Tab. 15: PCR-Programm für die Sequenzanalyse

Nach erfolgter PCR wurden die Reaktionsansätze mit 2  $\mu$ l Ladepuffer (Loading dye) versetzt und mittels einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 2  $\mu$ l eingengt.

#### **2.9.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die über PCR entstandenen DNA-Moleküle wurden über Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt und die DNA-Sequenz vom Muster im Gel gelesen. Sequenziert wurde mit einem automatischen Sequenzierer Vistra 725 von Molecular Dynamics, Krefeld.

Das Polyacrylamidgel wurde mit dem DNA Sequencing Gel Mix Kit von USB (Cleveland, Ohio) hergestellt. Dazu wurden 25 ml des Gelmixes mit 21  $\mu$ l TEMED und 175  $\mu$ l 10% APS versetzt und das Gel 1-2h polymerisiert.

Als Laufpuffer wurde 1  $\times$  TBE-Puffer (USB, Cleveland, Ohio) verwendet. Nach Polymerisation des Polyacrylamidgels wurde der Kamm entfernt, das Gel in den Sequenzierer eingesetzt und die Taschen dreimal mit Laufpuffer gespült. Nach einem Vorlauf und erneutem Spülen der Taschen erfolgte der Probenauftrag. Der Lauf wurde unter folgenden Bedingungen vorgenommen:

Vorlauf	3-5 min
Laufzeit	480 min
Spannung	1400 V
Temperatur	45 °C

Tab. 16: Laufbedingungen für die Polyacrylamid-gelelektrophorese

Der Fluoreszenzfarbstoff TexasRed<sup>TM</sup>, mit dem die Primer gelabelt sind, wird bei einer Wellenlänge von 594 nm vom Helium-Neon-Laser des Sequenzierers angeregt und emittiert bei 615 nm. Die Detektion wurde über ein Diodenarray System senkrecht zur Einstrahlungsrichtung des Lasers vorgenommen.

### 2.9.6.3 Auswertung der erhaltenen Daten

Die Analyse der erhaltenen DNA-Sequenzen wurde mit dem Softwarepaket DNASIS, Version 2, 1995 (Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA) durchgeführt. Sequenzhomologien auf DNA- oder Proteinebene wurden über Datenbankrecherchen mittels BlastX-Analyse (ALTSCHUL et al., 1990), Version 2.0, ermittelt.

Neben den eigenen Sequenzierarbeiten wurden einige Sequenzdaten von der Firma 4base-Lab GmbH, Reutlingen, auf einem Sequenzierer von Applied Biosystems (Weiterstadt, Modell 377) mit internen Primern, sowie von der Firma MWG, Ebersberg, auf einem LI-COR 4200 Sequenzierer ermittelt.

### 2.9.7 *E. coli*-Transformation

Um Plasmid- bzw. Cosmid-DNA in *E. coli*-Zellen einschleusen zu können, wurden die Bakterienzellen über eine Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> für die Aufnahme von DNA-Molekülen empfänglich gemacht.

Die Transformation der oben beschriebenen *E. coli*-Stämme und die Herstellung der dafür erforderlichen Kompetenten Zellen wurden nach den von SAMBROCK et al. (1989) beschriebenen Methoden durchgeführt.



100 µl Kompetente Zellen wurden vorsichtig mit Plasmid- bzw. Cosmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2.5 minütigem Hitzeschock bei 42°C erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 5 min. Die Regeneration der Zellen wurde mittels Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation bei 37°C für 1h erreicht. Die Zellen wurden 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert, das Pellet vorsichtig in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

### **2.9.7.1 Blau-Weiß-Selektion oder $\alpha$ -Komplementation**

Die Blau-Weiß-Selektion oder  $\alpha$ -Komplementation beruht auf der Rekonstitution einer aktiven  $\beta$ -Galactosidase durch zwei enzymatisch inaktive Proteinfragmente. Sie wird als Selektionsmerkmal bei der Klonierung in bestimmte Vektoren verwendet. Dabei kann über eine Farbreaktion zwischen leeren Vektoren und Vektoren, die ein Insert tragen, unterschieden werden. Voraussetzung ist ein Wirtstamm, der eine Deletion im aminoterminalen Bereich –  $\alpha$ -Peptid - der  $\beta$ -Galactosidase aufweist, sowie ein Klonierungsvektor, der die für das  $\alpha$ -Peptid codierende DNA-Region enthält.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurden die LB-Platten ( + Antibiotikum) mit den Substraten X-Gal und IPTG (2.2.5) vorbehandelt.

### **2.9.8 Streptomyceten-Transformation**

#### **2.9.8.1 Protoplastierung von Streptomyceten**

Um DNA in Streptomycetenzellen einschleusen zu können, müssen diese zunächst über eine Lysozymbehandlung protoplastiert werden.

Die Anzucht der Streptomycetenzellen erfolgte für 2 – 3 Tage in 50 – 100 ml CRM- bzw. S-Medium in 300 ml Schikanekolben bei 28 °C und 170 rpm. Die Zellen wurden über Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C geerntet. Das Waschen des Pellets erfolgte zweimal mit 10.3 % Saccharoselösung für 10 min bei 3000 rpm und 4°C. Die Zellen wurden daraufhin für die Protoplastierung mit 5 – 10 ml P-Puffer (abhängig von der Größe des Pellets) versetzt,

dem 2 mg / ml Lysozym zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 170 rpm auf dem Schüttler. Ab diesem Schritt muß jede starke mechanische Beanspruchung der Probe vermieden werden, da die entstehenden Protoplasten sehr empfindlich sind. Alle 15 min wurde der Fortschritt der Protoplastierung unter dem Mikroskop überprüft. Die Protoplastierung wurde dann durch Zusatz von kaltem Protoplastierungspuffer gestoppt, die Protoplasten auf Eis über Glaswolle filtriert, um Mycelstücke abzutrennen und bei 2000 rpm und 4°C für 7 min pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit eisgekühltem P-Puffer gewaschen, daraufhin aliquotiert und auf Eis bei -70°C eingefroren.

### **2.9.8.2 Polyethylenglycol-vermittelte Streptomyceten-Protoplastentransformation mit Plasmid-bzw. Cosmid-DNA**

Der durch Polyethylenglycol 1000 (PEG 1000) vermittelte Transfer von Plasmid- oder Cosmid-DNA in protoplastierte Streptomycetenzellen wurde nach einer Methode von HOPWOOD et al.(1985) durchgeführt.

Die Protoplastentransformationen wurden sowohl mit frisch hergestellten, als auch mit eingefrorenen Protoplasten durchgeführt. Die eingefrorenen Protoplasten wurden dazu mit lauwarmem Wasser schnell aufgetaut. Pro Ansatz wurden 100 µl Protoplasten mit 100 µl P-Puffer verdünnt. Nach Zusatz von 5 – 20 µg DNA erfolgte die Zugabe von 500 µl T-Puffer, der PEG 1000 enthält. Nach vorsichtigem Vermischen wurde der Transformationsansatz auf 4 Regenerationsplatten (R2YE-Medium) ausplattiert. Nach 12 bis 14 h Inkubation bei 28°C im Brutschrank wurde die Selektion durch Überschichten der Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum (10fache Konzentration der unter Punkt 2.3 angegebenen Konzentrationen) durchgeführt. Das Antibiotikum wurde dazu in Wasser aufgenommen und das Antibiotikum-Wasser-Gemisch vorsichtig mit dem Drigalskispatel auf den Regenerationsplatten verteilt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 28°C im Brutschrank.

Folgende Kontrollansätze wurden neben der eigentlichen Transformation durchgeführt: zum einen wurde der Vektor an sich transformiert, da schon das Einschleusen des Vektors ein verändertes Sekundärmetabolit-Produktionsspektrum zur Folge haben kann. Zum anderen wurde ein Transformationsansatz ohne DNA pipettiert und auf R2YE-Platten ausgebracht. Ein Teil der Platten wurde unüberschichtet bei 28°C weiterinkubiert, um eine Kontrolle über

die Quantität der hergestellten Protoplasten zu erlangen. Der andere Teil wurde, wie oben beschrieben, mit einem Wasser- / Antibiotikum-Gemisch überschichtet. Hierbei dürfen keine Klone wachsen, da der entsprechende Streptomyetenstamm ohne eingeschleustes Plasmid bzw. Cosmid sensitiv gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum reagieren muß.

Die nach 3 – 5 Tagen erscheinenden Transformanten wurden auf HA-Platten mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und bei 28°C im Brutschrank inkubiert, um für weitere Untersuchungen mehr Zellmasse zu erhalten.

Einzelklone können jedoch nach ausreichendem Wachstum auch direkt in Produktionsmedium angeimpft werden, um z.B. eine Analyse gebildeter Sekundärmetabolite schneller durchführen zu können.

## **2.9.9 Geninaktivierung**

Um Aufschluß über die Funktion einzelner Gene des Biosynthesegenclusters des Urdamycinproduzenten *S. fradiae* Tü 2717 zu erlangen, wurden Geninaktivierungsexperimente durchgeführt. Die erhaltenen Mutanten können außerdem als Rezipienten für entsprechende Gene aus anderen Streptomyeten-Stämmen dienen, um so modifizierte bzw. neue Sekundärmetabolite zu erhalten.

Für die Inaktivierungsversuche wurden 3 Gene aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster ausgewählt: eine mögliche NDP-Hexose 3,5-Epimerase (*urdZ1*), eine putative Oxygenase (*urdM*) und eine putative Glycosyltransferase (*urdGT2*). Für *urdZ1* kam dabei die Methode der frame-shift Mutation zur Anwendung, *urdM* und *urdGT2* wurden über eine in-frame Deletion inaktiviert. Beide Methoden werden im folgenden beschrieben.

### **2.9.9.1 Herstellung der Geninaktivierungskonstrukte**

#### **Inaktivierung von *urdZ1* über frame-shift Mutation**

Die Herstellung des Inaktivierungskonstruktes für die Inaktivierung von *urdZ1* erfolgte über PCR. Als Template wurde das 7,5kb große *EcoRI*-Fragment 2-10 verwendet, vorliegend im Vektor pUC19. Im Bereich von *urdZ1* befindet sich eine *SalI*-Schnittstelle, die für die frame-

shift Mutation gewählt wurde. Ausgehend von dieser Schnittstelle wurden jeweils 700 bp stromauf- und stromabwärts Primer für die Einführung einer *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstelle abgeleitet (Tab.10, Punkt 2.9.4). Primer Epi1 (*Bam*HI-Schnittstelle) bindet dabei im Bereich von *urdJ2*, Primer Epi2 (*Eco*RI-Schnittstelle) im Bereich von *urd GT2*. Abb. 9 (3.4.1.1) zeigt den Bereich der *Sal*I-Schnittstelle und der Primerbindungsstellen.

Die PCR wurde wie unter 2.9.4 beschrieben durchgeführt. Nach Überprüfung des Amplifikates über Agarose-Gelelektrophorese wurden dieses über Säulen gereinigt und aufkonzentriert, bevor eine Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI vorgenommen wurde. Das PCR-Produkt wurde daraufhin in den Vektor Litmus 28 kloniert, der ebenfalls mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI restringiert worden war.

Das nun im Vektor Litmus 28 vorliegende 1,4kb große Amplifikat wurde mit *Sal*I restringiert. Nach Überprüfung des Restriktionsverdaus erfolgte eine Auffüllreaktion der *Sal*I-Schnittstelle mit T4-DNA-Polymerase, gefolgt von einer Religation. Die *Sal*I-Schnittstelle muß durch die Auffüllreaktion zerstört werden, d. h. eine Restriktion mit *Sal*I darf nicht mehr zu einer Linearisierung des Plasmides führen. Vor der Transformation des Ansatzes in *E. coli* XL1Blue MRF wurde eine weitere *Sal*I-Restriktion vorgenommen, um eventuell vorhandene Plasmide mit noch intakten *Sal*I-Schnittstellen auszuschalten.

Das Insert eines positiven Plasmides, d.h. eines Plasmides mit zerstörter *Sal*I-Schnittstelle, wurde nach Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*RI über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel isoliert. Die DNA wurde daraufhin in den mit *Bam*HI und *Eco*RI restringierten, nicht replikativen Inaktivierungsvektor pKC1132 ligiert. Abb. 3 zeigt die Plasmidkarte des Inaktivierungskonstruktes pKC-urdZ1d.

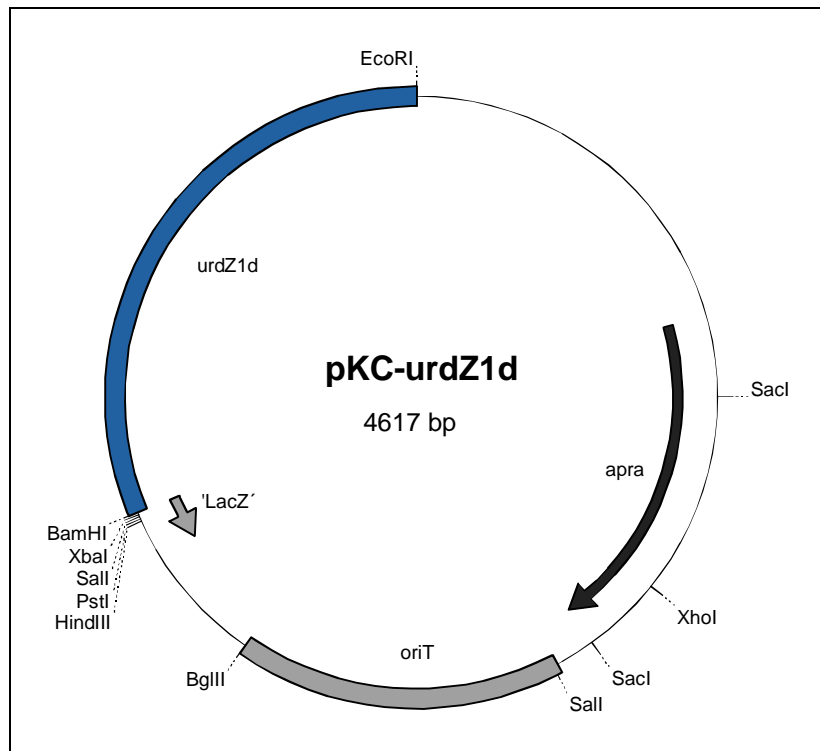


Abb. 3: Plasmidkarte des Inaktivierungskonstruktes pKC - urdZ1d

### Inaktivierung von *urdM* über in-frame Deletion

Bei einer in-frame Deletion wird innerhalb des auszuschaltenden Gens eine Anzahl von Basenpaaren eliminiert, die durch 3 teilbar sein muß, um so nachteilige Effekte auf das Ablesen der nachfolgenden Gene zu vermeiden.

Grundlage für die Herstellung des Inaktivierungskonstruktes für die Inaktivierung von *urdM* war das Plasmid 2-10 (pUC19), ein 7,5kb großes *EcoRI*-Fragment, das mit *BamHI* und *EcoRI* restringiert wurde. Das dabei entstandene 5,5 kb große Fragment, das die Oxygenase *urdM* enthält, wurde nach Auftrennung über Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert. Diese wurde in den mit *BamHI* / *EcoRI* restringierten Vektor pBlueskript SK(-) ligiert. Für die in-frame Deletion bot sich das Restriktionsenzym *NcoI* an, das auf dem genannten 5,5kb Fragment innerhalb von *urdM* 2 Schnittstellen besitzt (Abb.16, 3.4.2.1). Eine Restriktion mit *NcoI* führt zum Verlust von 498 bp, womit die Voraussetzung für die in-frame Deletion, d.h. die Deletion einer durch 3 teilbaren Zahl von Basenpaaren, erfüllt ist. Nach Restriktion des Fragmentes mit *NcoI* wurde eine Religation vorgenommen und die Eliminierung des *NcoI*-Fragmentes überprüft.

Das nun 5 kb große *Bam*HI / *Eco*RI Fragment wurde in den nicht replikativen Inaktivierungsvektor pKC1132 umkloniert, es entstand das Konstrukt pKC-urdMd (Abb. 4).

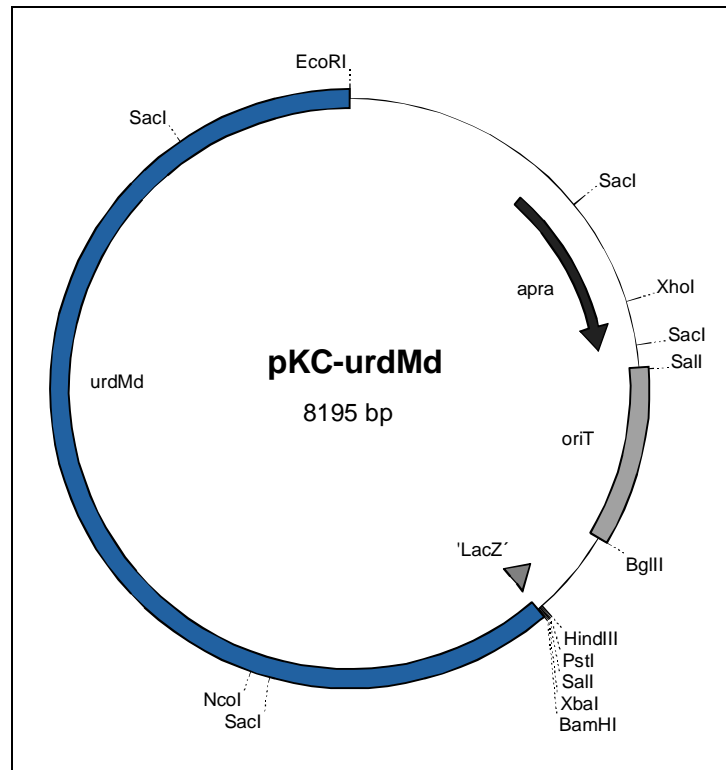


Abb. 4: Plasmidkarte des Inaktivierungskonstruktes pKC-urdMd

### Inaktivierung von *urdGT2* über in-frame Deletion

Für die in-frame Deletion des Gens *urdGT2* wurde ein 1,9kb großer *Sal*I-Subclone aus dem Urdamycincluster gewählt, der in dem Vektor pBlueskript SK(-) vorlag. Dieses *Sal*I-Fragment enthält neben dem vollständigen Glycosyltransferasegen *urdGT2* Teile der Gene *urdZ1* und *urdG*.

Als ein für die in-frame Deletion geeignetes Restriktionsenzym erwies sich *Sty*I. Dieses Enzym besitzt innerhalb der Glycosyltransferase *urdGT2* 3 Schnittstellen. Durch Restriktion mit *Sty*I konnte so eine Deletion von insgesamt 327 (120 + 207) Basenpaaren hergestellt werden. Abb. 30 und 36 zeigen den 1,9kb großen *Sal*I-Subclone mit Restriktionsschnittstellen und den Genen *urdZ1*, *urdGT2* und *urdG*.

Das verbleibende DNA-Fragment wurde religiert und die erfolgte Deletion über Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Als Inaktivierungsvektor wurde der nicht replikative Vektor pSP1 mit Erythromycin als Selektionsmarker verwendet. Das DNA-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *XbaI* in die entsprechenden Schnittstellen des Vektor pSP1 umkloniert, um das Inaktivierungskonstrukt pSP-urdGT2d (Abb. 5) herzustellen.

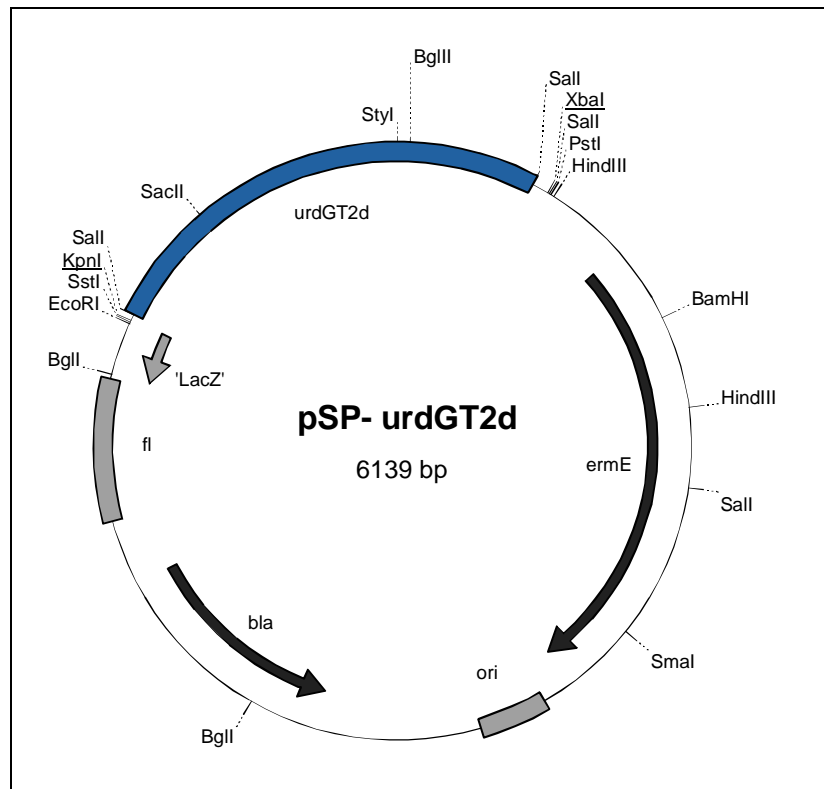


Abb. 5: Plasmidkarte des Inaktivierungskonstruktes pSP-urdGT2d

### 2.9.9.2 Vorbereitung der Inaktivierungskonstrukte für die Protoplasten-Transformation

Für die Transformation der hergestellten Inaktivierungskonstrukte pSP-urdGT2d, pKC-urdMd und pKC-urdZ1d in Protoplasten des Wildtyps *S. fradiae* Tü 2717 wurden diese zunächst in den *E. coli*-Stamm ET 12567 eingebracht und DNA über Midisäulen reisoliert.

### 2.9.9.3 Protoplasten-Transformation und Selektion auf Einfach-Crossover

Die Protoplasten-Transformation von *S. fradiae* Tü 2717 mit den Inaktivierungskonstrukten erfolgte wie unter Punkt 2.9.8.2 beschrieben. Allerdings wurden einzelne Punkte des Protokolls optimiert, um eine Erhöhung der Transformationsrate zu erzielen:

- die DNA für die Protoplastentransformation wurde nach OH und CHATER (1997) alkalisch denaturiert (nur bei Inaktivierungsversuchen).
- die Transformationsansätze wurden, ähnlich der Transformation von *E. coli*, vor Ausplattieren auf Regenerationsplatten für 10 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert.
- die Platten wurden anstatt mit einem Wasser- / Antibiotikum-Gemisch, das über die Transformationsansätze ausplattiert wurde, mit einem Soft Nutrient Agar (SNA) / Antibiotikum-Gemisch überschichtet. SNA wurde dazu auf die Platten pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken verteilt, so daß die Protoplasten einer geringeren mechanischen Belastung unterliegen.

Die Ergebnisse eines Vergleichs der beiden letztgenannten Punkte mit der herkömmlichen Transformationsmethode wurden im Rahmen eines Komplementierungsversuches (2.9.10.4) protokolliert. Tab. 19 zeigt die Anzahl der dabei erhaltenen Transformationsklone.

Als Kontrollen wurden bei beiden Transformationen jeweils der leere Vektor, sowie ein Ansatz ohne DNA transformiert, wie unter 2.9.8.2 beschrieben.

Die Selektion auf Einfach-Crossover wurde über das Überschichten der Regenerationsplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum durchgeführt. Plasmide mit nicht replizierenden Vektoren können sich nach Transformation nicht autonom vermehren. Das heißt ein "Überleben" des Plasmides kann bloß über eine Integration desselben in das Genom des entsprechenden Stammes erfolgen. Tabelle 17 faßt die für die verschiedenen Inaktivierungsversuche eingesetzten Vektoren, das daraus für die Selektion auf Einfach-Crossover resultierende Antibiotikum, sowie die Inkubationszeiten bis hin zur Überschichtung der Regenerationsplatten zusammen:



Inaktivierungsexperiment	eingesetzter Vektor	Antibiotikum	Inkubationszeit bis Überschichtung
frame-shift Mutation von <i>urdZ1</i>	pKC1132	Apramycin	14 h
in-frame Deletion von <i>urdM</i>	pKC1132	Apramycin	14 h
in-frame Deletion von <i>urdGT2</i>	pSP1	Erythromycin	14 h

Tab. 17: Für die Inaktivierungsversuche verwendete Vektoren mit entsprechenden Antibiotika und Inkubationszeiten bis zur Überschichtung

#### 2.9.9.4 Screening auf erfolgtes Einfach-Crossover

Um aus der Protoplasten-Transformation erhaltene Transformanden auf ein mögliches Einfach-Crossover hin zu überprüfen, wurden mehrere Transformanden für die Isolierung von Gesamt-DNA angezogen. Mit der isolierten Gesamt-DNA wurde eine Southern-Hybridisierung bzw. PCR durchgeführt. Als Kontrolle wurde Gesamt-DNA des Wildtyps *S. fradiae* Tü 2717 eingesetzt.

Transformanden, für die sich die bei einem Einfach-Crossover erwarteten Signale (Southern Blot) bzw. Banden (PCR – Gelelektrophorese) ergaben, wurden auf HA-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum zur Vermehrung ausgestrichen und bei 28°C bis zur Sporulation inkubiert. Ausgehend von diesen Mutanten erfolgte die Selektion auf Doppel-Crossover.

#### 2.9.9.5 Selektion auf Doppel-Crossover (nach DECKER & HAAG, 1995)

Für eine Selektion auf Doppel-Crossover, d.h. Verlust des jeweiligen Vektors und damit vollständiges Ersetzen der Wildtypkopie durch das deletierte Fragment, wurde von den Mutanten, für die ein Einfach-Crossover nachgewiesen werden konnte, Sporensuspensionen hergestellt. Diese Sporensuspensionen wurden in einer Verdünnungsreihe von  $10^{-5}$  bis  $10^{-10}$  auf HA-Platten mit und ohne Antibiotikum ausplattiert und die Platten bei 28°C inkubiert, bis Kolonien heranwachsen. Die Kolonien wurden ausgezählt und das Verhältnis der Kolonienzahl auf Platten mit und ohne Antibiotikum zueinander bestimmt. Von nicht antibiotikahaltigen Platten wurden Kolonien zur Vermehrung wiederum auf HA-Platten ohne Antibiotikum überimpft und von diesen erneut Sporensuspensionen und Verdünnungsausstriche auf Platten mit und ohne Antibiotikum hergestellt. Diese Vorgehensweise wurde

über so viele Passagen wiederholt, bis die Verdünnungsausstriche auf Platten ohne Antibiotikum ein quantitativ signifikant besseres Wachstum aufwiesen.

Kolonien dieser Passage wurden nun direkt einem Vergleichsausstrich unterzogen. Dazu wurden, nach einem Vermehrungsausstrich, bis zu 60 der jeweilige Kolonien mit dem Zahnstocher sowohl auf Platten mit als auch ohne Antibiotikum ausgestrichen und bei 28°C inkubiert. Das Wachstum wurde täglich protokolliert. Die Kolonien, bei denen ein Doppel-Crossover stattgefunden hat, dürfen auf Platten mit Antibiotikum kein Wachstum mehr zeigen, da der Verlust des Vektors, d.h. des Resistenzgens bewirkt, daß die entsprechenden Kolonien sensitiv gegen das verwendete Antibiotikum werden. Auf Platten ohne Antibiotikum muß ein normales Wachstum erfolgen.

#### **2.9.9.6 Überprüfung des erfolgten Doppel-Crossovers**

Von Kolonien, die auf HA-Platten mit Antibiotikum kein Wachstum mehr zeigten, wurden nach Vermehrungsausstrichen Gesamt-DNA isoliert und Southern Hybridisierung und / oder PCR durchgeführt um ein erfolgtes Doppel-Crossover nachzuweisen.

#### **2.9.9.7 Chemische Charakterisierung der Mutanten**

Die Doppel-Crossover-Mutanten BF-1-1, BF-2-1 und BF-3-1 wurden für die Charakterisierung gebildeter Sekundärmetabolite in Produktionsmedium NL 111 / V ohne Antibiotikum angezogen und Inhaltsstoffe wie unter Punkt 2.9.12.2 beschrieben isoliert und analysiert. Dabei wurde nur das Kulturfiltrat verarbeitet, das Myzel wurde verworfen.

Die Charakterisierung der Mutanten erfolgte über Dünnschichtchromatographie (2.9.12.3), HPLC (2.9.12.3), MS (durchgeführt von E. Künzel, AG J. Rohr, Charleston, USA und K. Ichinose, Japan) und NMR (E. Künzel, AG Rohr, Charleston, USA).

## 2.9.10 Komplementierungsversuche

Um zu überprüfen, ob die Inaktivierung der Gene *urdM* und *urdGT2* negative Effekte auf das Ablesen folgender Gene ausübte, wurden Komplementierungsversuche durchgeführt.

### 2.9.10.1 Herstellung der Komplementierungskonstrukte

#### Komplementierung der *urdM*-Mutante

Ausgehend von dem schon für das Inaktivierungskonstrukt verwendete 7,5kb große *EcoRI*-Fragment 2-10 wurde durch Restriktion mit *EcoRI* / *BglII* ein 7,1kb großes Fragment hergestellt, das die Oxygenase *urdM* enthält. Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert. Das Fragment wurde daraufhin in den mit *EcoRI* / *BamHI* restringierten Vektor pBC kloniert, der ebenfalls aus dem Agarosegel isoliert worden war. Nach Überprüfung der Ligation über Agarose-Gelelektrophorese wurde das Plasmid mit *EcoRI* / *XbaI* restringiert und das 7,1kb große Fragment in den Expressionsvektor pUWL201 kloniert. Die erfolgreiche Ligation wurde durch Restriktion mit *EcoRI* / *BamHI* verifiziert.

#### Komplementierung der *urdGT2*-Mutante

Das Konstrukt für die Komplementierung der *urdGT2*-Mutante wurde über PCR amplifiziert. Als Template wurde das 1,9 kb *SalI*-Fragment verwendet, mit dem bereits das Inaktivierungskonstrukt hergestellt worden war. Im Bereich der Epimerase wurde eine *XbaI*- und im Bereich der Pyrophosphorylase eine *EcoRI*-Schnittstelle eingeführt, um die Klonierung des DNA-Fragmentes in den Expressionsvektor pEM4 zu ermöglichen. Die abgeleiteten Primer werden unter Punkt 2.9.4 beschrieben.

Die PCR wurde nach Protokoll 2.9.4 durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über Säulen gereinigt, aufkonzentriert und in den mit *XbaI*- / *EcoRI*-restringierten Vektor pEM4 ligiert. Die Überprüfung erfolgte über Gelelektrophorese.

### 2.9.10.2 Vorbereitung der Komplementierungskonstrukte für die Protoplastentransformation

Die Komplementierungskonstrukte pBF-pUWL-1 und pBF-EM4-1 wurden für die Protoplastentransformation der Mutante BF-2-1 bzw. BF-1-1 in *E. coli* ET12567 transformiert und die DNA über Midisäulen reisoliert.

### 2.9.10.3 Protoplastierung der Mutante BF-2-1 und BF-1-1

Die Protoplastierung der Mutanten BF-1-1 und BF-2-1 wurde wie unter 2.9.8.1 beschrieben durchgeführt. In Tab. 18 sind die Inkubationszeiten der Zellen mit in P-Puffer gelöstem Lysozym dargestellt.

Mutante	Inkubationszeit mit Lysozym
BF-2-1	50 min
BF-1-1	60 min

Tab. 18: Protoplastierung der Mutanten BF-2-1 und BF-1-1, Dauer der Lysozymbehandlung

### 2.9.10.4 Protoplastentransformation der Mutanten BF-1-1 und BF-2-1 mit den Komplementierungskonstrukten

Die Polyethylenglycol-vermittelte Protoplastentransformation der Mutanten mit den Komplementierungskonstrukten wurde im Prinzip nach dem unter Punkt 2.9.8.2 beschriebenen Protokoll vorgenommen. Wie jedoch im Abschnitt Geninaktivierung (2.9.9.3) dargestellt, wurden verschiedene Parameter variiert. So erfolgte eine Inkubation der Transformationsansätze bei 40°C im Wasserbad für 10 min und die Regenerationsplatten wurden mit einem SNA-/ Antibiotikumgemisch überschichtet.

Die folgende Tabelle faßt die Zahl der erhaltenen Transformationsklone zusammen, die im Rahmen eines Komplementierungsversuches protokolliert wurden. Dabei wurden die genannten Variationen im Vergleich zum herkömmlichen Protokoll durchgeführt:

Inkubationstemperatur	Inkubation der Transformationansätze bei 40°C	Inkubation der Transformationsansätze bei RT
Überschichtungsmethode		
Überschichtung mit Wasser-/ Antibiotikumgemisch	24	2
Überschichtung mit SNA / Antibiotikum	33.5	10

Tab. 19: Komplementierung der *urdGT2*-Mutante BF-1-1 mit dem Komplementierungskonstrukt pBF-EM4-1, einem 1,5 kb großen *XbaI* / *EcoRI*-Fragment in pEM4. Vergleich von 2 verschiedenen Inkubationstemperaturen und Überschichtungsmethoden.

In Tab. 20 sind die für die Transformation der beiden Mutanten eingesetzten Selektionsmarker zur Überschichtung der Regenerationsplatten, sowie die Inkubationszeit bis Überschichtung dargestellt.

Komplementierungsversuch	Antibiotikum	Inkubationszeit bis Überschichtung
BF-2-1 × pBF-pUWL-1	Thiostrepton	14 h
BF-1-1 × pBF-EM4-1	Thiostrepton	14 h

Tab. 20: Komplementierung der Mutanten BF-2-1 und BF-1-1; für die Selektion eingesetzte Antibiotika und Inkubationsdauer bis Überschichtung

### 2.9.10.5 Chemische Charakterisierung der komplementierten Mutanten

#### Komplementierte Mutante BF-2-1

15 Transformanten wurden für die Isolierung von Sekundärmetaboliten direkt, ohne dazwischengeschalteten Vermehrungsschritt, auf HA-Platten, in 20 ml NL 111 / V-Medium mit Thiostrepton angezogen. Außerdem wurden 2 Transformanten der Kontrolle BF-2-1 × pUWL-1 mitangeimpft. Anzucht- und Isolierungsbedingungen wurden gemäß der beschriebenen Protokolle (2.9.12) gewählt.

Die dünnschichtchromatographische Analyse der Extrakte der Komplementierungsproben sowie der Kontrollen wurde nach Standardbedingungen (2.9.12.3) ausgeführt. Als Referenzen dienten die Mutante BF-2-1 und der Wildtyp.

Eine Charakterisierung der komplementierten Mutante wurde außerdem über HPLC (Punkt 2.9.12.3) vorgenommen. Als Vergleichsextrakte dienten wiederum der Wildtyp und die *urdM*-Mutante.

### **Komplementierte Mutante BF-1-1**

20 Transformationsklone wurden in jeweils 100 ml NL 111 / V-Medium mit Thiostrepton angeimpft. Die Anzucht erfolgte wie unter 2.9.12.1 beschrieben. Nach ausreichendem Wachstum wurden 50ml der Kultur für eine Plasmidisolierung eingefroren, 50 ml wurden abzentrifugiert, um Kulturfiltrat für die Naturstoffisolierung (2.9.12.2) zu erhalten.

Für die dünnschichtchromatographische Untersuchung wurden die Extrakte der Komplementierungsproben sowie der Kontrolle im Vergleich zum Wildtyp und der Mutante BF-1-1 auf Kieselgelplatten aufgetragen. Der Lauf erfolgte wie unter 2.9.12.3 beschrieben.

Als weitere Verifizierung wurde wie bei Komplementierung der Mutante BF-2-1 eine Analyse der Komplementierungsproben über HPLC unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Extrakte der Mutante BF-1-1 und des Wildtyps wurden als Kontrolle miteingespritzt. Außerdem erfolgte eine Charakterisierung über HPLC-MS, die von J. Fuchser (Analyticon, Potsdam) durchgeführt wurde.

### **2.9.11 Heterologe Expression von Glycosyltransferase-Genen in der Mutante BF-1-1**

Die über in-frame Deletion hergestellte *urdGT2*-Mutante BF-1-1 wurde als Rezipient für die Expression verschiedener Glycosyltransferase-Gene aus anderen Stämmen eingesetzt.

Neben einer Glycosyltransferase aus dem Granaticin produzierenden Stamm *S. violaceoruber* Tü22, wurden die Versuche mit den Glycosyltransferasegenen *lanGT1* und *lanGT2* aus dem Landomycin-Produzenten *S. cyanogenus* S136 durchgeführt. Außerdem wurde das Cosmid H2-26 aus *S. cyanogenus* S136, das die Gene für die Biosynthese des Landomycins trägt, in die Mutante eingebracht.

### 2.9.11.1 Herstellung der Expressionskonstrukte

#### Glycosyltransferasegen *gra*-ORF14 aus *S. violaceoruber* Tü22

Plasmid B32, ein 5,3kb großes, das Glycosyltransferasegen *gra*-ORF14 enthaltendes *Bam*HI-Fragment aus *S. violaceoruber* Tü22, vorliegend im Vektor pBlueskript SK(-), wurde zunächst in den Vektor pEM4 umkloniert. Dazu wurde die mit *Bam*HI restringierte DNA über Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Agarosegel ausgeschnitten, isoliert und in den ebenfalls mit *Bam*HI restringierten Vektor ligiert. Die richtige Orientierung des Inserts wurde über Restriktionsanalyse kontrolliert.

Die Klonierung von B32 in den Vektor pUWL201 mußte über den Vektor pBC vorgenommen werden, da eine direkte Klonierung nicht gelang. Wiederum über die *Bam*HI-Schnittstellen wurde das Insert zunächst in den Vektor pBC ligiert, und dann in pUWL201 umkloniert.

#### Glycosyltransferasegene *lanGT1* und *lanGT2* aus *S. cyanogenus* S136

Aus *S. cyanogenus* S136 wurden die Glycosyltransferasegene *lanGT1* und *lanGT2* für die Transformation von BF-1-1 vorbereitet. Von A.Trefzer wurden die Plasmide pBC-*lanGT1* und pBC-*lanGT2* zur Verfügung gestellt.

Um *lanGT1* in pUWL201 klonieren zu können, wurde das Plasmid mit *Mun*I / *Xba*I restringiert und in den mit *Eco*RI / *Xba*I geschnittenen Vektor ligiert. Ausgehend von diesem Plasmid und pBC-*lanGT2* wurde das Konstrukt pUWL-*lanGT1*-*lanGT2* hergestellt. Dazu wurde pUWL – *lanGT1* mit *Eco*RI / *Xba*I restringiert, pBC-*lanGT2* mit *Mun*I / *Xba*I. Über die darauffolgende Shotgun-Ligation konnte *lanGT2* hinter *lanGT1* ligiert werden.

### 2.9.11.2 Vorbereitung der Expressionskonstrukte für die Protoplastentransformation

Die hergestellten Konstrukte sowie das Cosmid H2-26 wurden für die Protoplastentransformation der Mutante BF-1-1 in *E. coli* ET12567 transformiert und die DNA über Midisäulen reisoliert.

### 2.9.11.3 Protoplastentransformation der Mutante BF-1-1

Die Protoplastierung der Mutante BF-1-1 wurde unter Punkt 2.9.10.3 beschrieben. In der folgenden Tabelle sind die für die Transformation von BF-1-1 eingesetzten Plasmide bzw. Cosmide nochmals aufgelistet:

pEM-B32	<i>S. violaceoruber</i> Tü22
pUWL-B32	
pUWL-lanGT1	<i>S. cyanogenus</i> S136
pUWL-lanGT2	
pUWL-lanGT1-lanGT2	
H2-26	

Tab. 21: Plasmidkonstrukte und Cosmide für die heterologe Expression von Glycosyltransferase-Genen in BF-1-1

Die Transformation wurde nach dem unter Punkt 2.9.9.3 dargestellten, modifizierten Protokoll durchgeführt. Als Kontrolle wurde jeweils der leere Vektor transformiert (ausgenommen bei der Transformation pEM-B32). Erhaltene Transformanden wurden auf HA-Platten ausgestrichen und bei 28°C inkubiert.

### 2.9.11.4 Charakterisierung gebildeter Sekundärmetabolite

Isolierung und Analyse gebildeter Sekundärmetabolite erfolgte wie beschrieben (2.9.12). Die Transformanden wurden dazu entweder direkt von Regenerationsplatten oder von HA-Agarplatten in 20 ml Produktionsmedium NL 111/V mit Thiostrepton angeimpft. Als Kontrollen wurden der Wildtyp *S. fradiae* Tü2717 und der leere Vektor pUWL201 mitangezogen. Die Anzuchtbedingungen können Tab. 5 entnommen werden.

Charakterisiert wurden die Transformanden über Dünnschichtchromatographie und HPLC wie angegeben (2.9.12.3).



## 2.9.12 Analyse und Charakterisierung gebildeter Sekundärmetabolite

### 2.9.12.1 Anzucht in Produktionsmedium

Um die über Protoplasten-Transformation erhaltenen Transformanten auf die Bildung modifizierter bzw. neuer Sekundärmetabolite hin zu untersuchen, wurden die Transformanten entweder direkt oder nach einer Passage auf HA-Agarmedium in Produktionsmedium angeimpft. Dabei wurde bei *S. fradiae* Tü 2717 bzw. den aus diesem Stamm hergestellten Mutanten zunächst mit AM-Medium als Produktionsmedium gearbeitet. Dieses wurde jedoch später durch NL 111 / V-Medium ersetzt, da vergleichende Versuche zur Urdamycinproduktion durch *S. fradiae* Tü 2717 in verschiedenen Produktionsmedien von S. Stockert und A. Trefzer (persönliche Mitteilung) zeigten, daß die Urdamycinproduktion in NL 111 / V-Medium am stärksten war. Die für die weiteren Stämme gewählten Medien sind in Tab. 5 dargestellt.

Für die Anzucht wurde mit verschiedenen Medienvolumina gearbeitet. Um viele Klone auf die Produktion bestimmter Sekundärmetabolite hin zu screenen, wurden die Transformanten in 20 ml Medium in 100 ml Kolben mit einer Schikane, die zur besseren Belüftung mit Watteanstatt Zellstoffstopfen verschlossen wurden, angeimpft. Die Inkubation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei 28°C und 175 rpm im Schüttler ca. 72 h. Tab. 5 faßt die Anzuchtbedingungen für die verschiedenen Streptomycceten-Stämme zusammen.

Bei neu generierten Mutanten, bei denen das Wachstumsverhalten noch nicht bekannt war, wurden ab dem 2. Inkubationstag täglich je 5ml Probe entnommen und wie unten beschrieben isoliert und analysiert, um den optimalen Zeitpunkt der Ernte der Kulturen bestimmen zu können.

Für die weiterführenden Versuche wurden Medienvolumina von 50 oder 100 ml verwendet, in 300ml bzw. 500 ml Kolben mit einer Schikane und Wattestopfen. Die Wachstumsbedingungen waren die gleichen wie oben beschrieben.

Neben der Anzucht von Transformanten in flüssigem Produktionsmedium wurde diese auch auf Agarplatten mit dem entsprechendem Produktionsmedium durchgeführt. Dazu wurden bis zu 20 Agarplatten beimpft und diese bei 28°C im Brutschrank inkubiert, bis sich ein gutes Wachstum bzw. Sporulation zeigte.

### 2.9.12.2 Isolierung gebildeter Sekundärmetabolite

Die Isolierung gebildeter Sekundärmetabolite erfolgte nach DRAUTZ et al. (1986). Die Kulturen wurden dazu mehrmals mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat versetzt und ausgeschüttelt. Sekundärmetabolite wie Urdamycine bzw. Urdamycinderivate gehen dabei in die organische Phase über, die mittels Zentrifugation oder über einen Scheidetrichter abgetrennt wurde. Um das Kulturfiltrat von Myzel zu trennen, wurden die Kulturen vor Zusatz von Ethylacetat zentrifugiert oder abgenutscht. Das Kulturfiltrat wurde weiterbearbeitet, das Myzel verworfen. Die organische Phase wurde über  $MgSO_4$  filtriert und mit dem Rotationsverdampfer zur Trockene einrotiert.

Erfolgte die Anzucht auf Agarplatten, wurde der Agar für die Isolierung gebildeter Naturstoffe mit dem Spatel in kleine Stückchen zerteilt und daraufhin mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie für die Flüssigkulturen beschrieben.

### 2.9.12.3 Charakterisierung isolierter Sekundärmetabolite

#### Dünnschichtchromatographie

Die erste Charakterisierung der über Ethylacetat isolierten Sekundärmetabolite erfolgte über Dünnschichtchromatographie. Dazu wurden die Extrakte in Methanol gelöst. In der folgenden Tabelle sind die Laufbedingungen aufgeführt.

Stationäre Phase	Kieselgelplatten 60 F <sub>254</sub> (Merck, Darmstadt)
Mobile Phase	Dichlormethan, Methanol im Verhältnis 9:1, Ethylacetat (Komplementierungsversuche)
Auftragsvolumen	2-50µl der aus der Isolierung von 20-1000ml Kultur erhaltenen Extrakte, aufgetüpfelt mit Mikrokapillaren
Kammersättigung	+
Detektion	Tageslicht, teilweise UV-Licht und Besprühen mit Anisaldehyd
Kontrollen	Wildtyp <i>S. fradiae</i> Tü2717, jeweiliger Vektor

Tab. 22: Laufbedingungen für die dünnschichtchromatographische Analyse von Sekundärmetaboliten

## HPLC

Konnten über Dünnschichtchromatographie zusätzliche bzw. modifizierte Spots detektiert werden, wurden die entsprechenden methanolischen Extrakte außerdem über HPLC mit einem Dioden Array Detektor analysiert. Die HPLC-Analyse erfolgte mit einem Hewlett Packard 1090 Liquid Chromatograph. Die Laufbedingungen sind in Tabelle 23 dargestellt.

Säule	HP-ODS-Hypersil 5 Mm – Säule, 200 × 2 mm
Laufmittelsystem	Laufmittel A: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : Acetonitril 0.1 : 99.9 (v/v), Laufmittel B: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : H <sub>2</sub> O 0.1 : 99.9 (v/v)
Gradient	nichtlinearen Gradienten, 0 – 100 % (A) in 43 min
Flußrate	0.3 ml / min
Detektion	254 und 420 nm

Tab. 23: Laufbedingungen für die HPLC-Analyse von Sekundärmetaboliten

## Weiterführende Analysemethoden

Um über Dünnschichtchromatographie und HPLC erhaltene Ergebnisse weiter verifizieren zu können, kamen die im folgenden aufgeführten, weiterführende Analysenmethoden zur Anwendung:

- NMR- und MS-Spektroskopie im Rahmen der Inaktivierung von *urdM* und *urdGT2*, durchgeführt von E. Künzel, AG Prof. J. Rohr, Charleston, USA
- HPLC und MS-Spektroskopie zur Analyse gebildeter Sekundärmetabolite bei Inaktivierung von *urdZI*, durchgeführt von K. Ichinose, Japan
- HPLC-MS zur Analyse der Expressionsversuche nach HONG und Mitarbeitern (1997) mit Plasmid pSH3071, durchgeführt von C. Kemper, AG Metzger, Vaihingen und zur Analyse der komplementierten Mutante BF-1-1, durchgeführt von J. Fuchser, Analyticon, Postdam

## 2.9.13 Chemikalienliste

### Medien- und Pufferbestandteile

Agar	Difco
Casaminosäuren	Difco
EDTA	Serva
Eisessig	Merck
Glucose	SHS-Pharm
Glycerin	Roth
HCl	Roth
Hefeextrakt	Difco
Lab Lemco Fleischextrakt	Oxoid
Lauroylsarcosin	Serva
L-Glycin	Roth
L-Prolin	Fluka
Malzextrakt	Difco
NaOH	Roth
Nutrient Broth	Difco
PEG1000	Roth
Pepton	Difco
Saccharose	Südzucker
Für Medien und Puffer verwendete Salze	Merck, Fluka, Roth
SDS	Roth
TES	Roth
TRIS	USB
TRIS-Maleat	Roth
Tryptic Soybroth	Difco
Trypton	Difco
Tween20	Roth

### Lösungsmittel

Acetonitril	Fisher
Dichlormethan	Fisher
Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Ethanol	Merck
Ethylacetat	Fisher
Isopropanol	Merck
Methanol	Merck

### Antibiotika

Apramycin	Fluka
Carbenicillin	Roth
Chloramphenicol	Fluka
Erythromycin	Fluka
Streptomycin	Sigma
Tetracyclin	Sigma
Thiostrepton	Fluka

### Enzyme

Klenow-Enzym	Amersham-Pharmacia
Lysozym	Serva
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonucleasen	Amersham-Pharmacia, NEB, Stratagene
RNase A	QIAGEN, Boehringer

T4-DNA-Ligase  
T4-DNA-Polymerase  
Taq-Polymerase  
Thermo Sequenase

Stratagene  
Amersham-Pharmacia  
Stratagene  
USB

Sonstiges

Agarose  
Bromphenolblau  
dNTP-Mix  
Ethidiumbromid  
IPTG  
1kb-DNA-ladder  
PCR-Primer  
Phenol/Chloroform  
X-Gal

USB  
Sigma  
Stratagene  
Sigma  
Boehringer  
Gibco-BRL, Stratagene  
PerkinElmer  
Roth  
Roth

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression von Plasmiden bzw. Cosmiden in verschiedenen Streptomycceten-Stämmen zur Herstellung modifizierter bzw. neuer Naturstoffe

In diesem Versuchsteil sollten in verschiedene Sekundärmetabolit-produzierende Streptomycceten-Stämme mehrere Gene bis hin zu ganzen Genclustern entsprechender Produzenten, vorliegend als Plasmide bzw. Cosmide, eingeschleust werden. Zielsetzung war die Produktion modifizierter bzw. neuer Naturstoffe.

Das Einbringen der fremden DNA in einen Wirtstamm verlangte zunächst die Etablierung eines geeigneten Transformationssystems. Es wurde dafür die Methode der Polyethylenglycolvermittelten Protoplastentransformation gewählt. Die Protoplastentransformation erfordert eine entsprechende Vorbereitung der Empfängerzellen, diese werden durch eine Protoplastierung für die Aufnahme von Fremd-DNA empfänglich gemacht. Die Protoplastentransformation konnte zunächst für den Wirtstamm *S. fradiae* Tü2717 erfolgreich etabliert werden. Die genaue Beschreibung beider Methoden erfolgte unter Punkt 2.9.8.

Für die Transformation weiterer Streptomycceten-Stämme mußte die Methode der Protoplastierung jeweils für jeden Stamm optimiert werden, was eine Modifikation der Vorgehensweise in einigen Punkten erforderlich machte. So wurde z.B. die für die eigentliche Protoplastierung eingesetzte Lysozymkonzentration variiert: die Inkubationsdauer der Zellen mit Lysozym mußte für jeden Stamm genau angepaßt werden. Auf den Waschschrift, der in der Regel nach Filtration der Protoplasten vorgenommen wird, mußte teilweise aufgrund der großen Empfindlichkeit der Protoplasten mancher Stämme verzichtet werden.

Nach erfolgreicher Transformation der Streptomycceten-Stämme wurde das von ihnen produzierte Sekundärmetabolitspektrum in Hinsicht auf neue bzw. modifizierte Naturstoffe hin analysiert. Dazu wurden, wie unter Punkt 2.9.12.1 (und Tab. 5, 2.7.1) beschrieben, die Transformanten in Produktionsmedium angeimpft, die Naturstoffe extrahiert und über Dünnschichtchromatographie und teilweise HPLC analysiert.

Tabelle 24 faßt die verwendeten Wirtsstämme, die eingesetzten Plasmide bzw. Cosmide und deren Herkunft, sowie die Ergebnisse der Protoplastierung, Transformation und Analyse über Dünnschichtchromatographie zusammen.

Für die Transformation von *S. fradiae* Tü2717 mit dem Cosmid H2-26 aus *S. cyanogenus* S136 konnten keine Transformanden erhalten werden. Die Transformation wurde deshalb mit einem 10kb *Bam*HI-Subclone, der die Glycosyltransferasegene *lanGT1* und *lanGT2* enthält, wiederholt. Die hierbei erhaltenen Transformanden zeigten nach Isolierung der gebildeten Naturstoffe bei der Analyse über DC zusätzliche Spots. Um dieses Ergebnis genauer eingrenzen zu können, wurde das *Bam*HI-Fragment weiter subcloniert, so daß nun die beiden Glycosyltransferasen getrennt voneinander als Plasmide (Vektor pWHM3) vorlagen. Die erneute Transformation von *S. fradiae* Tü2717 mit diesen Plasmiden und Analyse der gebildeten Sekundämetabolite zeigte, daß zusätzliche Spots nur nach Einschleusen von *lanGT2* aus *S. cyanogenus* S136 detektiert werden konnten. Die Transformation des Wildtyps mit dem Vektor pWHM3 unter gleichen Bedingungen führte nicht zu zusätzlichen Spots bei DC-Analyse. Die Strukturaufklärung der akkumulierten Substanzen wurde von E. Künzel, AG Prof. J.Rohr, Charleston, über Dünnschichtchromatographie und <sup>1</sup>H-NMR-Analyse (ROHR, persönliche Mitteilung, ROHR et.al, 1993) vorgenommen. Die akkumulierten Substanzen konnten als Aquayamycin und Substanz 100-2 identifiziert werden (Abb.6).

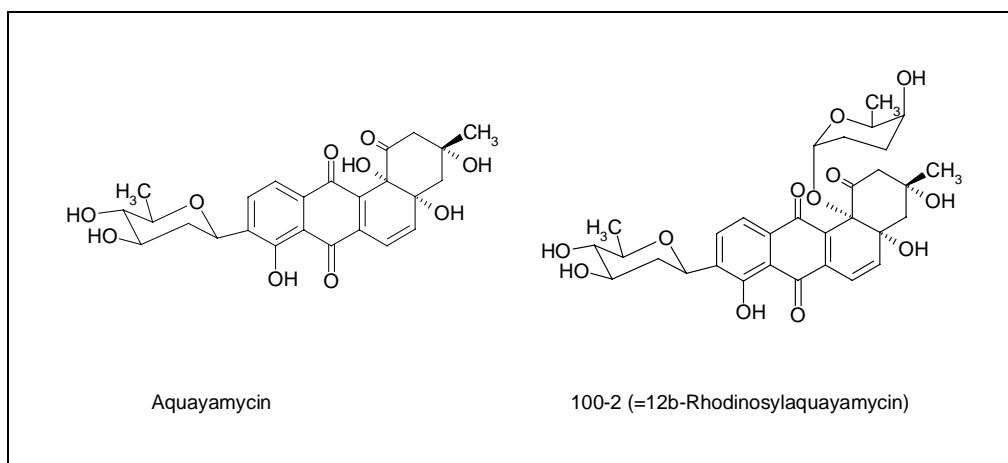


Abb. 6: Formeln von Aquayamycin und Substanz 100-2

Für *S. fradiae* Δ12, transformiert mit Cosmid H2-26 aus *S. cyanogenus* S136, konnten ebenfalls keine Transformanden erhalten werden. Die Wiederholung des Versuches mit einem

14kb *EcoRI*-Subclone aus H2-26 führte zwar zu Transformanden, jedoch konnten über DC keine neuen Spots detektiert werden.

*S. lividans* TK24 und *S. coelicolor* CH999 konnten sowohl mit ganzen Cosmiden als auch mit Subclones dieser Cosmide transformiert werden und zusätzliche Spots über Dünnschichtchromatographie detektiert werden.

Eine eindeutige Analyse der nach Transformation von *S. lividans* TK24 gebildeten Substanzen konnte aufgrund der starken Actinorhodin-Produktion nicht vorgenommen werden.

Die nach Einbringen des Cosmides H2-26 und dessen 14kb *EcoRI*-Subclone, der die PKS-Gene enthält, in *S. coelicolor* CH999 gebildete Substanz wurde von ebenfalls von E. Künzel, Charleston, analysiert. Sie zeigte sich bei erneuter Aufreinigung als extrem instabil und konnte nur in sehr geringen Mengen isoliert werden, so daß die Konzentration für eine NMR-Untersuchung nicht ausreichend war. Der Versuch sollte deshalb wiederholt werden, das Ergebnis konnte jedoch nicht reproduziert werden, da keine Transformanden mehr erhalten wurden. Auch über die Methode der Konjugation (modifiziert nach MAZODIER et al., 1989) konnte Fremd-DNA nicht in den Wirtstamm eingeschleust werden.

Unter Berücksichtigung der hier aufgeführten Ergebnisse wurden die Versuche zur Expression von Cosmiden mit *S. lividans* TK24 als Wirtstamm weitergeführt. Die Anzuchtbedingungen wurden jedoch nach HONG et al. (1997) modifiziert, die die heterologe Expression von PKS-Genclustern aus Angucyclinon-produzierenden Stämmen in *S. lividans* TK24 etablieren konnten.

Dabei wurde mit Transformanden zunächst eine Vorkultur (YEME-Medium) angelegt, die nach viertägiger Inkubationszeit bei 28°C auf dem Schüttler auf verschiedene Produktionsmedien (YEME, GAM) überimpft wurde. Die Anzucht erfolgte dabei in einer geringeren Medienmenge (20 ml Medium anstatt 100 ml), die Inkubation auf dem Schüttler wurde bei einer höheren Umdrehungszahl (230 rpm anstatt 170 rpm) vorgenommen und die Antibiotikakonzentration wurde reduziert (6µg Apramycin / ml Medium anstatt 100µg/ml). Die Analyse gebildeter Sekundärmetabolite erfolgte über DC, HPLC und HPLC-MS (durchgeführt von C. Kempter, AG Metzger, Vaihingen).

Als Vorversuch sollte die von HONG und Mitarbeitern (1997) durchgeführte heterologe Expression des Cosmides pSH3071 in *S. lividans* TK24 reproduziert werden. Das für die



Produktion des Angucyclinons PD116740 codierende Gencluster aus dem Stamm WP 4669 führt, nach Einbringung in *S. lividans* TK24, unter anderem zur Produktion von Tetrangulol und PD116740. Das Cosmid wurde dazu von der amerikanischen AG um Hong zur Verfügung gestellt und die Versuchsbedingungen wie beschrieben modifiziert. Als Kontrolle wurde der Vektor pOJ446 in *S. lividans* TK24 eingebracht. Die von C. Kemper durchgeführte HPLC-MS-Analyse ergab ein deutliches Indiz für die erfolgreiche Expression des Cosmides pSH3071 in *S. lividans*TK24. Dabei zeigte eine Substanz im Substanzgemisch bei der Retentionszeit von 20 min einen Peak, der bei der den Vektor pOJ446 enthaltenden Probe nicht zu beobachten war. Um die bei 20 min eluierte Substanz herauszufiltern, wurde der Massenbereich eingegrenzt. Dies ergab einen Peak bei der Masse von Tetrangulol, der bei der Kontrolle wiederum nicht vorkam.

Weiterführende Versuche wurden nun mit Cosmiden aus dem Landomycin-Produzenten *S. cyanogenus* S136 und dem Granaticin-Produzenten *S. violaceoruber* Tü22 vorgenommen. Dabei wurden die modifizierten Bedingungen eingehalten. Eine Expression der genannten Cosmide in *S. lividans* TK24 konnte jedoch nicht erzielt werden.

Aus Kulturen des Stammes *S. cattleya*, der das  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum Thienamycin produziert (KAHAN et al., 1979), konnten fluoridierte Sekundärmetabolite isoliert werden (SANADA et al., 1985, REID et al., 1995). Im Hinblick auf eine mögliche Generierung fluoridierter Naturstoffe über Kombinatorische Biosynthese sollte *S. cattleya* als Wirtstamm für die heterologe Expression von Genclustern bzw. Genen vorbereitet werden. Wie in den oben beschriebenen Versuchen wurde zunächst die Methode der Polyethylenglycol-vermittelten Protoplastentransformation gewählt. Die dazu erforderliche Protoplastierung von Zellen konnte nach Modifikation des unter 2.9.8.1 beschriebenen Protokolls etabliert werden, bei der folgenden Protoplastentransformation wurden jedoch, auch nach etlichen Optimierungsversuchen, keine Transformanten erhalten. Als weitere mögliche Methoden wurden Konjugation und eine von PIGAC und SCHREMPF (1995) entwickelte Elektroporationsmethode getestet, jedoch ohne Erfolg.

Streptomyceten-Stamm	Proto-plasten	Herkunft der zur Transformation eingesetzten DNA	Transfor-manden	Neue Spots auf DC	Charakterisierung der neugebildeten Substanz mittels:
<i>S. fradiae</i> Tü2717	+	Cosmid H2-26 ( <i>S. cyanogenus</i> S136)	—	—	—
		10 kb <i>Bam</i> HI ( <i>S. cyanogenus</i> S136)	+	+	—
		Subclones von 10 kb <i>Bam</i> HI mit: GT1 GT2	+ +	— +	— NMR
<i>S. fradiae</i> $\Delta$ 12	+	Cosmid H2-26	—	—	—
		14 kb <i>Eco</i> RI ( <i>S. cyanogenus</i> S136)	+	—	—
<i>S. lividans</i> TK24	+	Cosmid H2-26	+	+	—
		14 kb <i>Eco</i> RI	+	+	—
<i>S. coelicolor</i> CH999	+	Cosmid H2-26	+	+	—
		14 kb <i>Eco</i> RI	+	+	—
<i>S. lividans</i> TK24	+	Cosmid pSH3071 (WP 4669)	+	+	HPLC-MS
		Cosmide H1-43, L4-61, Q3-43 und E2-3 ( <i>S. cyanogenus</i> S136)	+	—	—
		Cosmide aus <i>S. violaceoruber</i> Tü22	+	—	—

Tab. 24: Expression von Plasmiden bzw. Cosmiden in verschiedenen Streptomyceten-Stämmen. Herkunft der eingesetzten Wirtsstämme, Plasmide und Cosmide. Darstellung der Ergebnisse bei Protoplastierung, Transformation und Dünnschichtchromatographie sowie weitere Analysemethoden.

### 3.2 Kartierung der Cosmide pURD 8, pURD 10, pURD 11 und pURD 12 aus *S. fradiae* Tü2717

DECKER und HAAG (1995) konnten die PKS-Gene, die an der Biosynthese des Polyketid-Aglycons von Urdamycin A beteiligt sind, auf Cosmid pURD8 identifizieren und charakterisieren. SCHNEIDER (1995) screenete in weiteren Versuchen eine Cosmidbank von *S. fradiae* Tü2717 mit einer NDP-Glucose 4,6-Dehydratase-Sonde, um Cosmide identifizieren zu können, die weitere Gene der Urdamycin-Biosynthese enthalten. Er erhielt drei Cosmide, pURD 10, 11 und 12. Weitere Untersuchungen von Schneider zeigten, daß diese Cosmide keine DNA enthielten, die auch in pURD 8 enthalten war. Die Vermutung, daß in diesem Falle Gene für die PKS- und Zuckerbiosynthese nicht benachbart vorliegen, widersprach der allgemein beobachteten Clusterung von Polyketid-Biosynthesegenen.

Mit den Cosmiden pURD 8, 10, 11 und 12 wurden deshalb erneut Southern Hybridisierungen durchgeführt. Als Sonden diente zum einen ein 0,6 kb großes, internes *EcoRI* / *BglIII* - Fragment aus pURD 11 ( Sonde 1), zum anderen ein 1,6 kb großes *BamHI* / *HindIII*-Fragment aus pURD 8 ( Sonde 2 ), deren Lage in Abb. 8 gezeigt wird. Die Cosmid-DNA wurde für die Southern Hybridisierung mit *EcoRI* / *BglIII* restringiert und über ein Agarosegel aufgetrennt. Abb. 7 zeigt die Ergebnisse des mit der 0,6 kb *EcoRI* / *BglIII*-Sonde durchgeführten Southern Blots.

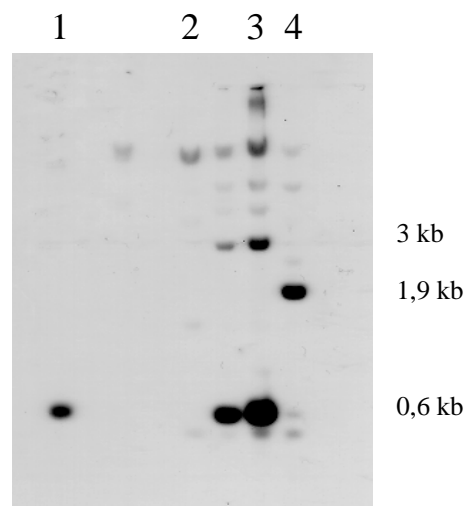


Abb. 7: Charakterisierung der Cosmide pURD 8, 10, 11 und 12 über Southern Hybridisierung. Die DNA wurde mit *EcoRI* und *BglIII* restringiert. Als Sonde diente ein 0,6 kb *EcoRI* / *BglIII*-Fragment. Spur 1: pURD 8, Spur 2: pURD 10, Spur 3: pURD 11, Spur 4: pURD 12

Für die Cosmide pURD 8, 11 und 12 wurden mit der genannten Sonde Signale erhalten. Dies zeigt, daß die Cosmide pURD 11 und 12 mit Cosmid pURD 8 überlappen. Cosmid pURD 10 zeigt keine Überlappung mit pURD 8. Aus den Ergebnissen dieses Blots, des hier nicht gezeigten Blots mit der 1,6 kb *Bam*HI / *Hind*III-Sonde und Ergebnissen von Kartierungsexperimenten resultierte die in der folgenden Abbildung gezeigte Anordnung der Cosmide pURD 8, 10, 11 und 12:

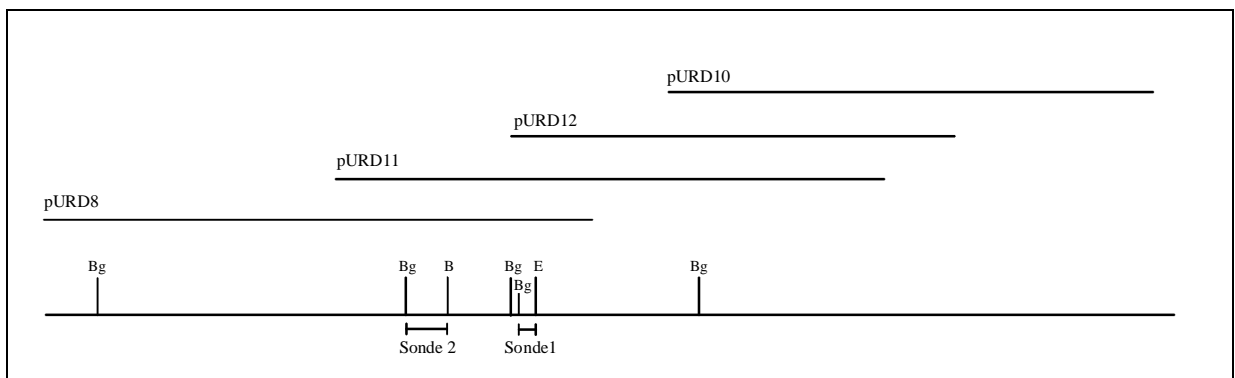


Abb. 8: Anordnung der Cosmide pURD 8, 10, 11 und 12 und Sonden, die zur Charakterisierung der Cosmide über Southern Hybridisierung eingesetzt wurden. Sonde 1: 0,6 kb *Bg*III / *Eco*RI- Fragment aus pURD 11, Sonde 2: *Bam*HI / *Hind*III- Fragment aus pURD 8.

Somit konnte eindeutig gezeigt werden, daß die von DECKER und HAAG (1995) und SCHNEIDER (1995) detektierten Gene auf dem Genom von *S. fradiae* Tü2717 in einem Abschnitt lokalisiert waren.

### 3.3 Sequenzanalyse des Cosmides pURD12

Durch die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Versuche konnte eine mögliche Clusterung der Biosynthesegene des Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 gezeigt werden. Um weitere Biosynthesegene detektieren zu können, wurde ein ca. 8 kb großes DNA-Fragment aus Cosmid pURD 12 stromabwärts der PKS-Gene sequenziert. Dazu wurden, ausgehend von pURD 12, Subclones hergestellt, die in den Vektor pBlueskript SK(-) kloniert wurden. (In Tab. 4, Punkt 2.7 sind die größeren, für die Sequenzanalyse hergestellten Plasmide aufgeführt, die daraufhin weiter subkloniert wurden). Die Methodik ist unter Punkt

2.9.6 beschrieben. Über Datenbankvergleiche mittels BlastX-Analyse wurden Sequenzhomologien auf DNA- und Proteinebene ermittelt.

Innerhalb des 8 kb großen DNA-Fragmentes konnten über Sequenzanalyse 7 neue Offene Leserahmen identifiziert werden: *urdL*, *urdM*, *urdJ2*, *urdZ1*, *urdGT2*, *urdG* und *urdH* (*urdG* und *urdH* wurden von SCHNEIDER (1995) identifiziert). Diese sind, neben den von DECKER und HAAG (1995) identifizierten PKS-Genen, in Abb. 9 dargestellt.

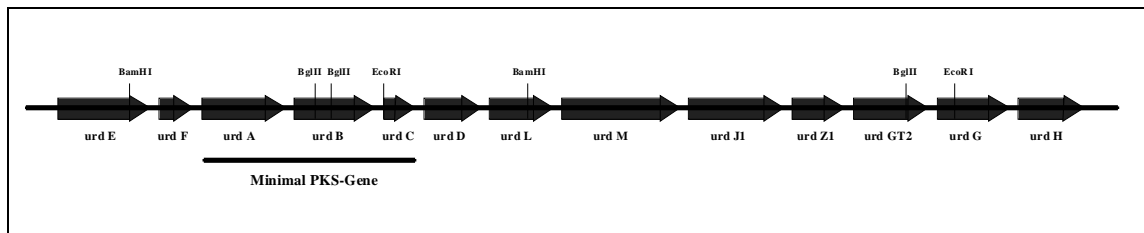


Abb. 9: Ausschnitt aus dem Gencluster von *S. fradiae* Tü2717 mit PKS-Genen und 7 neuen Offenen Leserahmen *urdL*, *urdM*, *urdJ2*, *urdZ1*, *urdGT2*, *urdG* und *urdH*, die über Sequenzanalyse identifiziert werden konnten.

UrdL ähnelt Aromatasen aus verschiedenen Stämmen. Die stärkste Ähnlichkeit trat dabei zu LanL (76% identische AS, WESTRICH et al., 1999) und zu Jad-ORF4 (76% identische AS, HAN et al., 1994) auf.

Der Datenbankvergleich des möglichen Genprodukts von *urdM* ergab eine starke Ähnlichkeit zu Oxygenasen. Der N-terminale Bereich von UrdM ähnelte dabei vor allem den Genprodukten von *lanM* (Abb. 10) und *lanE* aus *S. cyanogenus* S136 (WESTRICH et al., 1999, 58% identische AS im Vergleich von AS 1-377 von LanM, und 48% identische AS im Vergleich zu AS 1-373 von LanE). Des weiteren traten Ähnlichkeiten zu UrdE aus *S. fradiae* Tü2717 (DECKER & HAAG, 1995, 47% identische AS im Vergleich zu AS 1-376 von UrdE) und zu *orf6*, einem Oxygenasegen aus *S. venezuelae* (YANG et al., 1996, 57% identische AS im Vergleich zu AS 1-376 von ORF6) auf.

	10	20	30	40	50	
URDM.AMI	1	MVAPS-----	-----LDVDVIV	VGAGPVGLML	AGELLRTGGV	50
ORF6.AMI	1	MTEPRRAGAP	APESPDAPDT	PVLLDADVIV	IGAGPTGLML	AGEL-RLGGA
LANM.AMI	1	MAAKHT----	-----DTQVIV	VGAGPVGLML	AGEL-RLGGA	50
		60	70	80	90	100
URDM.AMI	51	RVTVLERLAE	PTTESRASMT	MLTPSYEMEL	LHERGLVERL	GPPP-DAGPG
ORF6.AMI	51	DVIIVLESRET	PTTESRAS-T	LHART--MEL	LDDRGLLTP	GTPPSEPRGG
LANM.AMI	51	DVVVVEKLS	PTTESRAS-T	LHART--MEI	LDSRGLDEL	VPVNDVMG-
		110	120	130	140	150
URDM.AMI	101	HFGGIPLDLT	EAGESRYAGQ	WKAPQIRVEA	VLSTWATELG	AEVRRGHTVI
ORF6.AMI	101	HFGGIPLDLT	LPG- RHPGQ	WKVEQTRTEA	LLQEWATGLG	ADVRRGHTLR
LANM.AMI	101	HFGGIPLDLT	LPS- AYPGQ	WKVPQTRVEE	LLQGWATGLG	AVVLRGHEL
		160	170	180	190	200
URDM.AMI	151	GLVEAPDGVS	VVATAPSGER	LRLSAAYIVG	CDGEDSAVRR	LAGFAFPGAD
ORF6.AMI	151	SLTVTETYAE	AGATGPPGRD	VRVRARYAVG	CDGERTTVRA	LAGAEFPGQE
LANM.AMI	151	GLTVGQGHVA	VDVLGPDGP-	VRMRGRYVVG	CDGEQSAVRR	LSGIAFPGED
		210	220	230	240	250
URDM.AMI	201	PTKELLRADL	AGIELRERF	ERHPNGVANA	RRGPDGTRI	MVHEFARVPG
ORF6.AMI	201	ARRELLRADV	AGIDVPPRRF	QRLPGGLAVA	ACR-NGVTRV	MVHEFGRPAV
LANM.AMI	201	ASRELLRADV	AGIDIPPRF	QRLSGLAIA	ARRPDGVTRV	MVHEFGRTAE
		260	270	280	290	300
URDM.AMI	251	ASRA-PAFAE	VRAAWARVTG	EDISGAEPVW	VNAFHNARRQ	AARYRKGRVL
ORF6.AMI	251	ARTGEPEFRE	VVDVWKRVTG	EDITAGTPLW	VNSFHDANRQ	LTRYRDGRVL
LANM.AMI	251	PRSAEPEFSE	VAEIKRVTG	EDISGGEPLW	VNAFGNASRL	AERYRDGRVL
		310	320	330	340	350
URDM.AMI	301	LAGDAAHVQL	PVGGQALNLG	LQDAMD LGGK	LAAHITGKAG	EELLDTEPA
ORF6.AMI	301	WAGDAAHQQM	PIGGQALNLG	LQDAVNLGWK	LAAVVRGTAP	DGLLDTYHDE
LANM.AMI	301	LAGDAAHQQM	PVGGQALNLG	LQDAVNLGWK	LAAQVTGRQP	DGLLD SYHTE
		360	370	380	390	400
URDM.AMI	351	TRWRPAYSAT	SKHKPSCCSA	DPMWSLRAVF	GELLGLGAAR	RHLASMSGL
ORF6.AMI	351	RH-----AV	GRQ-----	-VLGNIRA-	QALLLLGGPE	---AEPVRS
LANM.AMI	351	RH-----AV	GRR-----	-TLSNIRA-	QSLLLGGGE	---VEGVRGV

Abb. 10: Vergleich der AS-Sequenz der Genprodukte von *urdM*, *orf6* und *lanM*

Der C-terminale Bereich von UrdM mit den AS 415-672 zeigte Ähnlichkeit zu möglichen Reduktasen. Hier sind die Genprodukte von *lanV* und *lanN* aus *S. cyanogenus* S136 zu nennen (WESTRICH et al., 1999, 54% identische AS bzw. 50% identische AS), sowie eine mögliche Glucose-Dehydrogenase aus *S. venezuelae* (48% identische AS). Abb. 11 zeigt ein Alignment der Aminosäuresequenzen von UrdM, LanN, LanV und der Glucose-Dehydrogenase aus *S. venezuelae*.

		410	420	430	440	450	
URDM .AMI	401	<u>PTRQHTPHRR</u>	<u>TTMGKLTGKT</u>	<u>ALVTGSSRGI</u>	<u>GRATAIRLAR</u>	<u>EGALVAVHCS</u>	450
LANV .AMI	401	-----	--MGNLTGKT	<u>ALVTGASRGI</u>	<u>GRAIAEKLGY</u>	<u>AGALVAVHYA</u>	450
LANN .AMI	401	-----	--M---T--H	A---GG--GA	<u>GRAAAMRLAA</u>	<u>AGALVAIHHT</u>	450
JADDEHY .AMI	401	-----	--MSALAGRT	<u>AIVTGASRGI</u>	<u>GRGIAERLAT</u>	<u>DGALVAVHYG</u>	450
		460	470	480	490	500	
URDM .AMI	451	<u>RNREAADETV</u>	<u>ATIEKEGGRA</u>	<u>FSVLAEELGVP</u>	<u>GDVHELFLAL</u>	<u>ERGLKERTDA</u>	500
LANV .AMI	451	<u>TGADAAA EVA</u>	<u>ESIEKDGGRA</u>	<u>FTVKAELGVP</u>	<u>GDVDVLFEGE</u>	<u>ERGLKERTGA</u>	500
LANN .AMI	451	<u>GDEQAADDVV</u>	<u>RAIGEGGGCA</u>	<u>FALGAELGGY</u>	<u>GNVQRLFADL</u>	<u>EAEITDRTGR</u>	500
JADDEHY .AMI	451	<u>SNEKAALETV</u>	<u>EIIIEGRGGRA</u>	<u>FAFRAELGAP</u>	<u>DAVDTFYAA</u>	<u>DAGLAERGAA</u>	500
		510	520	530	540	550	
URDM .AMI	501	<u>TTLDILVNNA</u>	<u>GVMGGVAPEE</u>	<u>VTPELFDRLV</u>	<u>AVNAKAPFFI</u>	<u>VQRAVTLIPD</u>	550
LANV .AMI	501	<u>TDLILVNNA</u>	<u>GVMAMGAPEE</u>	<u>VTPEMFDRMM</u>	<u>AVNAKAPFFI</u>	<u>VQRALSVMPD</u>	550
LANN .AMI	501	<u>ADLDILVNNA</u>	<u>DDVDGVAPPEH</u>	<u>ATPEEFDRLV</u>	<u>AAGAKAPYFV</u>	<u>IQRALRSLAD</u>	550
JADDEHY .AMI	501	<u>REFDILVNNA</u>	<u>AASGSGRIHQ</u>	<u>LTTEVFDRLF</u>	<u>AINVKPR---</u>	<u>SSGPAGPRPA</u>	550
		560	570	580	590	600	
URDM .AMI	551	<u>GGRIINISSG</u>	<u>LTRF---ANP</u>	<u>QEVAYAMTKG</u>	<u>AMDQLTLHFA</u>	<u>KHLGSRNITV</u>	600
LANV .AMI	551	<u>GGRINISSG</u>	<u>LTRV---ASP</u>	<u>DQVTYGM SKG</u>	<u>ALEQIALHFS</u>	<u>RHLGSRNITV</u>	600
LANN .AMI	551	<u>GGRVINISRG</u>	<u>AVEP---VEP</u>	<u>KAVAYAMAKG</u>	<u>AVETLARHYA</u>	<u>VALAPRGITV</u>	600
JADDEHY .AMI	551	<u>AGRPRDRSTS</u>	<u>PRRPRSTPSP</u>	<u>DSVTIAMTKG</u>	<u>AVDTMTLALA</u>	<u>KELGPRGITV</u>	600
		610	620	630	640	650	
URDM .AMI	601	<u>NSVGP--IT</u>	<u>NNGTPVFDNP</u>	<u>EAVAQ MAGYS</u>	<u>VFNRVGEVTD</u>	<u>VADVVAFLAG</u>	650
LANV .AMI	601	<u>NSVAPG--ST</u>	<u>DNGSALFQIP</u>	<u>EVRETLSQLS</u>	<u>TFGEVAEPAA</u>	<u>IADVVAFLAS</u>	650
LANN .AMI	601	<u>NSVAPG--TT</u>	<u>DDGER-----</u>	-----	-----	<u>VGTVVAFLAG</u>	650
JADDEHY .AMI	601	<u>NAVAPGYIAT</u>	<u>DMNARRRATP</u>	<u>EASAALAAMS</u>	<u>VFNRIGTPAA</u>	<u>DVGRGRFPVS</u>	650
		660	670				
URDM .AMI	651	<u>DDARWITGSY</u>	<u>LDASGAPCSA</u>	<u>ESRG</u>			700
LANV .AMI	651	<u>EDARWITGAF</u>	<u>IDASGGT---</u>	<u>-LLG</u>			700
LANN .AMI	651	<u>DDAGGITGAV</u>	<u>FDADGSP---</u>	<u>-VHG</u>			700
JADDEHY .AMI	651	<u>DEARWITGQY</u>	<u>VDATGGTAL-</u>	<u>----</u>			700

Abb. 11: Vergleich der AS-Sequenz der Genprodukte von *urdM*, *lanV*, *lanN* und einer putativen Glucose-Dehydrogenase aus *S. venezuelae*

Für *urdJ2* ergaben sich im Datenbankvergleich Homologien zu Transportergenen. Zu nennen sind zum einen LanJ aus *S. cyanogenus* S136 (WESTRICH et al., 1999, 55% identische AS) und ein mögliches Exportprotein aus *S. roseofulvus* (37% identische AS).

Die Genprodukte der ORFs *urdZ1*, *urdG* und *urdH* zeigten Homologien zu Proteinen, die an der Biosynthese von Desoxyzuckern beteiligt sind.

Für UrdZ1 ergaben sich vor allem Ähnlichkeiten zu LanZ1 aus *S. cyanogenus* S136 (WESTRICH et al., 1999, 57% identische AS) und zu Gra-ORF25 aus *S. violaceoruber* Tü22 (ICHINOSE et al., 1998, 51% identische AS). Das Alignment der Aminosäuresequenz der drei genannten Proteine ist in Abb. 12 dargestellt.

		10	20	30	40	50	
URDZ1.AMI	1	MS-----IP	GAFLLITPDQL	S---DERGAF	YE-LRCDMLE	RAVGVPFPQ	50
LANZ1.AMI	1	<u>MQAVEAK-VP</u>	<u>GVHVLAP--W</u>	<u>TGSKDERGAF</u>	<u>FESLRTDLLQ</u>	<u>DVVGHPFEVK</u>	50
GRAORF25.AMI	1	<u>MDIQELREVP</u>	<u>GAYVITPRQW</u>	<u>P---DPRGTF</u>	<u>FESLRTDLVS</u>	<u>EAVGRPFVEV</u>	50
		60	70	80	90	100	
URDZ1.AMI	51	<u>QINYSVSKRH</u>	<u>TLRGIHSVSI</u>	<u>PPGQAKLVTC</u>	<u>VRGALRDIVV</u>	<u>DLRIGSPAFG</u>	100
LANZ1.AMI	51	<u>QINYSVSRRN</u>	<u>HLRGIHSVTS</u>	<u>PPGQAKYVSC</u>	<u>VRGAFRDFVV</u>	<u>DLRVGSPTFG</u>	100
GRAORF25.AMI	51	<u>QINYSTSRRN</u>	<u>TLRGVHGVLI</u>	<u>PPGQAKYVTC</u>	<u>VRGALRDMVV</u>	<u>DLRVGSPTFG</u>	100
		110	120	130	140	150	
URDZ1.AMI	101	<u>AHQVTELDV</u>	<u>SGRSVYVPEV</u>	<u>WGTDSRSPT</u>	<u>TPVSATSSPS</u>	<u>TYVPGTQIDI</u>	150
LANZ1.AMI	101	<u>QYDVNLLDAA</u>	<u>SGRALYIPEG</u>	<u>VHGFLTLTE</u>	<u>DACICYVLS</u>	<u>TYVPGTQIDI</u>	150
GRAORF25.AMI	101	<u>QSASTLLTPE</u>	<u>NGVAHVHVAEG</u>	<u>LGHGFLALTD</u>	<u>DTCISYALST</u>	<u>AHVPGTQFEI</u>	150
		160	170	180	190	200	
URDZ1.AMI	151	<u>NPLDPLDLP</u>	<u>WDCPQEPLIS</u>	<u>EKDAKASSLA</u>	<u>EALASGTLPD</u>	<u>LHCRTSDAA</u>	200
LANZ1.AMI	151	<u>DPLDPLALP</u>	<u>WGFTEPPLIS</u>	<u>EKDRTARSLA</u>	<u>ATLEAGLSE</u>	<u>W-----</u>	200
GRAORF25.AMI	151	<u>DPLDPLALP</u>	<u>WGFDEPPLLS</u>	<u>AKDAGAPSLR</u>	<u>TALERGILPR</u>	<u>W-----</u>	200
		210	220	230	240	250	
URDZ1.AMI	201	<u>RTALVRAPSE</u>	<u>RQ</u>				250
LANZ1.AMI	201	<u>-----PGG-</u>	<u>-N</u>				250
GRAORF25.AMI	201	<u>---LGRIGT-</u>	<u>-P</u>				250

Abb. 12: Vergleich der AS-Sequenz der Genprodukte von *urdZ1*, *lanZ1* und *gra-Orf25*

Das Produkt von *urdG* ähnelte am stärksten dem Protein LanG aus *S. cyanogenus* S136 (WESTRICH et al., 1999, 64% identische AS) und Gra-ORF16 aus *S. violaceoruber* Tü22 (ICHINOSE et al., 1998, 55% identische AS).

Das von *urdH* abgeleitete Protein zeigte die höchsten Ähnlichkeiten zu LanH aus *S. cyanogenus* S136 (WESTRICH et al., 1999, 72 % identische AS) und zu GrsE aus *S. griseus* ( 65% identische AS).

Das von *urdGT2* abgeleitete Protein UrdGT2 zeigte starke Ähnlichkeit zu Glycosyltransferasen. Am deutlichsten war hier die Ähnlichkeit zu LanGT2 aus *S. cyanogenus* S136 (WESTRICH et al., 1999, 49% identische AS) und zu Gra-ORF14 aus *S. violaceoruber* Tü22 (ICHINOSE et al., 1998, 41% identische AS). Abb. 13 zeigt das Alignment der Sequenz von UrdGT2, LanGT2 und Gra-ORF14.



		10	20	30	40	50	
URDGT2 .AMI	1	M-----	----FALAPL	ATAARNAGHQ	VVMAANQDMG	PVVTVGVGLPA	50
LANGT2 .AMI	1	MKILFVASGS	PATVFALAPL	ATAARNAGHD	VFMGAVEEDMV	PYIASAGIPA	50
GRAORF14 .AMI	1	MRFLFVSGGS	AGAVFPITPL	ALAARNAGHE	VIVGATENVM	PLVAATGLPG	50
		60	70	80	90	100	
URDGT2 .AMI	51	VATDLPPIRH	FITTDREGRP	EAIPSDPVAQ	ARFTGRWFAR	MAASSLRPML	100
LANGT2 .AMI	51	LSIAPSSIRL	YATMDREGNP	VRMPETPEEE	LDFAHWFGR	MAAGSMDALR	100
GRAORF14 .AMI	51	APITSRMTFD	FMQRDRHGNP	LEIPKDPHER	NLFNGRGMAR	LALGSMEGLV	100
		110	120	130	140	150	
URDGT2 .AMI	101	DFSRARWPD	IVGGTMSYVA	PLLALHLGVP	HAROTWDAVD	ADGIHPGADA	150
LANGT2 .AMI	101	EVTANWRPDL	VVGGSMSFAA	ALIAAELGVP	YVRQAWDTGD	AWRTDPAASD	150
GRAORF14 .AMI	101	PLVERWQPDV	LVAGALSAAA	PLVAHRFGLP	WVRHALNMG	PSIIDLSAAA	150
		160	170	180	190	200	
URDGT2 .AMI	151	ELRPELSELG	LERLPAPDLF	IDICPPSLRP	ANAAPARMMR	HVATSRQCPL	200
LANGT2 .AMI	151	ELRPELRALG	LDRLPDPALF	VDICPPSLRP	ATAPPAQMMR	WVPANGQRR	200
GRAORF14 .AMI	151	ELAPELEEMG	LSAIPEDMY	VEICPPGARR	PDAGPAQFMR	YVPFNTQRAL	200
		210	220	230	240	250	
URDGT2 .AMI	201	EPWMYTRDTR	QRVLVTSGSR	VAKESYDRNF	DFLRGLAKDL	VRWDVELIVA	250
LANGT2 .AMI	201	EPWMYTKGNR	PRILVTSGSR	LV---FAKKT	GFLRGLVADM	AALDAEVVIA	250
GRAORF14 .AMI	201	EPWMYAKGDR	PRVLVSAGSR	VTAD-YEADA	--LSALVEKV	AGLDVELLIA	250
		260	270	280	290	300	
URDGT2 .AMI	251	APDTVAEALR	AEVPQ-ARVG	WTPLDVVAPT	CDLLVHHAGG	VSTLTGLSAG	300
LANGT2 .AMI	251	TLDEVAEELR	TELPQ-VRAG	WVPLDVVPT	CDVVVHHAGG	VTALTAMNAG	300
GRAORF14 .AMI	251	APQEIADAL-	GDLPDNVRAG	CVPLDVVVRT	CDLLVHRAGG	NTMLHAI VCG	300
		310	320	330	340	350	
URDGT2 .AMI	301	EPQLLIPKGS	VLEAPARRVA	DYGAAILLP	G-EDSTEAI	DSCQELHAKD	350
LANGT2 .AMI	301	VPQLIVSQGG	NFVEAGLRIS	DFGAAITV--	D-ENTPEAVE	KACGELIGNP	350
GRAORF14 .AMI	301	VPQLVIPAMP	KQVGMARLA	EYGAAIMLTA	GQDDSPENVA	KACRELEDP	350
		360	370	380	390	400	
URDGT2 .AMI	351	TYARRAQDLS	REISGMPLPA	TVVTALEQLA	-----	-----	400
LANGT2 .AMI	351	SYAERARELS	AEIAALPLPA	EVVGALEGLV	-----	-----	400
GRAORF14 .AMI	351	AYKARTDELS	REIAGLPAPH	DVTVAITEMV	RARARG...	-----	400

Abb. 13: Vergleich der AS-Sequenzen der Genprodukte *urdGT2*, *lanGT2* und *gra-ORF14*

In der folgenden Tabelle sind 7 neue ORFs, die über Sequenzanalyse detektiert werden konnten und die von DECKER und HAAG (1995) identifizierten PKS-Gene mit ihren möglichen Funktionen, die über Datenbankvergleiche ermittelt werden konnten, aufgelistet.

ORF	Mögliche Funktion	ORF	Mögliche Funktion
<i>urdE</i>	Oxygenasegen	<i>urdM</i>	Oxygenase- / Reduktasegen
<i>urdF</i>	Cyclasegen	<i>urdJ2</i>	Transportergen
<i>urdA</i>	$\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthasegen	<i>urdZ1</i>	NDP-Hexose 3,5-Epimerasegen
<i>urdB</i>	Kettenlängenfaktor	<i>urd GT2</i>	Glycosyltransferasegen
<i>urdC</i>	Acyl Carrier Protein-Gen	<i>urdG</i>	NDP-Hexose-Synthetasegen
<i>urdD</i>	Reduktasegen	<i>urdH</i>	NDP-Hexose 4,6-Dehydratasegen
<i>urdL</i>	Cyclasegen		

Tab. 25: Mögliche Funktion der über Sequenzanalyse identifizierten Offenen Leserahmen des Urdamycin-Biosynthesegen-Clusters.

### 3.4 Inaktivierungen der Gene *urdZ1*, *urdM* und *urdGT2* aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 über in-frame Deletion und frame-shift Mutation

Wie schon in der Einleitung erwähnt, stellen die sogenannten Tailoring Reaktionen während der Biosynthese glycosidierter Naturstoffe interessante Ansatzpunkte für die Kombinatorische Biosynthese dar. Die vermutliche Funktion dreier Gene aus dem Urdamycin-Produzenten, die über Sequenzanalyse detektiert werden konnten, sollte nun über Geninaktivierungsexperimente nachgewiesen werden. Zielsetzung war dabei nicht nur die Aufklärung der genauen Funktion der Gene, sondern auch die Schaffung von Rezipienten, in denen nach Inaktivierung der genannten Gene entsprechende Gene aus anderen Produzentenstämmen exprimiert werden können, um so modifizierte bzw. neue Naturstoffe zu erhalten.

Die Inaktivierung der putativen NDP-Hexose 3,5-Epimerase - *urdZ1*- wurde über eine frame-shift Mutation vorgenommen, das Gen *urdM*, eine putative Oxygenase, und *urdGT2*, eine mögliche Glycosyltransferase, wurden über in-frame Deletionen inaktiviert. Beide Methoden werden zu den Genaustauschexperimenten gerechnet, da das Wildtypgen durch eine mutierte Kopie ersetzt wird. Im Gegensatz zu gängigen Genaustauschexperimenten, bei denen z.B. eine Resistenzkassette in das zu inaktivierende Gen eingefügt wird, kann durch die hier beschriebenen Methoden jedoch vollständig auf das Einführen heterologer DNA verzichtet werden. Dies hat den Vorteil, daß der Stoffwechsel der Wirtszellen nicht durch fremde DNA beeinflusst wird. Eine in-frame Deletion hat keine Verschiebung des Leserahmens zur Folge. Störende Einflüsse auf die Expression und Regulation folgender Gene können dadurch vermieden werden. Die frame-shift Mutation stellt eine zeitsparende Inaktivierungsmethode dar, die allerdings eine Verschiebung des Leserahmens mit sich bringt.

Um zu zeigen, daß das Auftreten polarer Effekte auf nachfolgende Gene durch in-frame Deletion der Gene *urdM* und *urdGT2* ausgeschlossen werden konnte, mußten die hergestellte Mutanten komplementiert werden. Dazu wurde das intakte Gen in einen Expressionsvektor kloniert und in die Mutante eingebracht. Die Expression dieses plasmidcodierten Gens muß das deletierte Gen komplementieren, das heißt, es muß zu einer Wiederherstellung des ursprünglichen Sekundärmetabolitspektrums kommen.

Für die im folgenden beschriebenen Inaktivierungsversuche wurde die Methode der Polyethylenglycol-vermittelten Protoplastentransformation optimiert. HILLEMANN und Mitarbeiter (1991) konnten zeigen, daß die Transformation von Streptomyceten deutlich

effizienter war, wenn Integrationsvektoren in der einzelsträngigen Form verwendet wurden. OH und CHATER (1997) erstellten ein Protokoll zur alkalischen Denaturierung der Donor-DNA. Auch sie konnten dadurch eine signifikante Erhöhung der Transformationsrate bei Integrationsexperimenten beobachten.

In vergleichenden Versuchen zur Optimierung der Transformationsbedingungen (Tab. 19, Punkt 2.9.10.4) konnte außerdem gezeigt werden, daß sowohl die Inkubation der Transformationsansätze bei 40°C für 10 min als auch die Verwendung eines Soft Nutrient Agar- / Antibiotikum-Gemisches anstelle des Wasser- / Antibiotikum-Gemisches zu einer Erhöhung der Transformationsrate führte.

### **3.4.1 Inaktivierung von *urdZI* aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster**

In diesem Versuchsteil stellte sich die Frage, welche genaue Funktion der putativen NDP-Hexose 3,5- Epimerase (*urdZI*) aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster bei der Biosynthese der im Urdamycin enthaltenen Desoxyzucker zugeordnet werden kann.

#### **3.4.1.1 Herstellung einer *urdZI*-Mutante**

Für die Herstellung des Inaktivierungskonstruktes wurde ein 1,4kb großes DNA-Fragment, auf dem *urdZI* lokalisiert war, verwendet. Dieses Fragment war mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in den Vektor Litmus 28 kloniert worden. Dabei waren die beiden Schnittstellen über die bei der PCR verwendeten Primer zu beiden Seiten des Fragmentes eingefügt worden (Punkt 2.9.4). In Abb. 14 ist ein Ausschnitt aus dem DNA-Bereich von *S. fradiae* Tü2717 inklusive Restriktionsschnittstellen und Primer-Bindungsstellen dargestellt, der für die Amplifikation des Inaktivierungskonstruktes und den Nachweis eines erfolgten Einfach- sowie Doppel-Crossovers eingesetzt wurde.

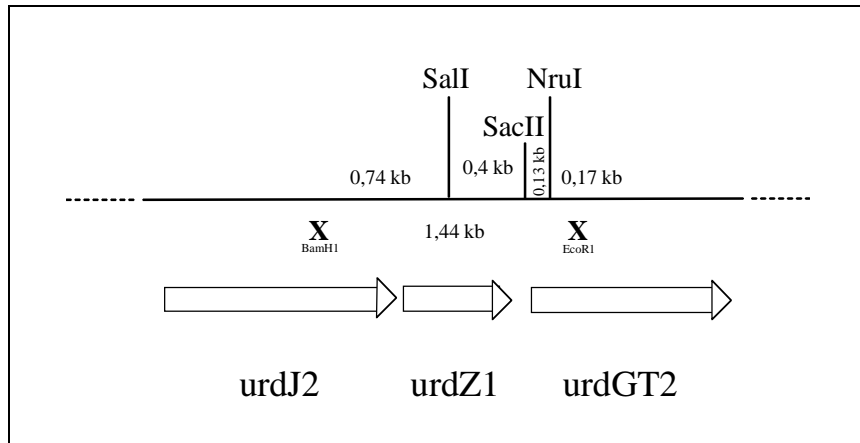


Abb. 14: Ausschnitt aus dem Gencluster von *S. fradiae* Tü2717 mit Restriktionschnittstellen und Primer-Bindungsstellen (X; Primer Epi1 und Epi2, siehe 2.9.4), der zur Herstellung des Inaktivierungskonstruktes, sowie zum Nachweis eines erfolgten Einfach- bzw. Doppel-Crossovers eingesetzt wurde. Mittels PCR wurde ein 1,44 kb großes Fragment mit einer *Bam*HI und einer *Eco*RI-Schnittstelle amplifiziert.

Die Einführung einer frame-shift Mutation erfolgte über eine in *urdZ1* gelegene *Sal*I-Schnittstelle. Diese wurde mit *Sal*I restringiert, mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und daraufhin religiert (Abb. 15). Das die Mutation enthaltende DNA-Fragment wurde anschließend in den nicht replikativen Vektor pKC1132 ligiert und mittels Protoplastentransformation in *S. fradiae* Tü2717 eingeführt, wobei durchschnittlich 83 Klone pro Platte erhalten wurden.

Um die frame-shift Mutation genau überprüfen zu können, wurde das im Vektor Litmus 28 vorliegende Plasmid von der Firma MWG, Ebersberg, sequenziert. Die erfolgreiche Mutation der *Sal*I-Schnittstelle konnte dadurch eindeutig nachgewiesen werden. Im folgenden wird die Original-*Sal*I-Schnittstelle des 1,4 kb großen DNA-Fragmentes im Vergleich zu der über frame-shift Mutation veränderten Sequenz gezeigt.

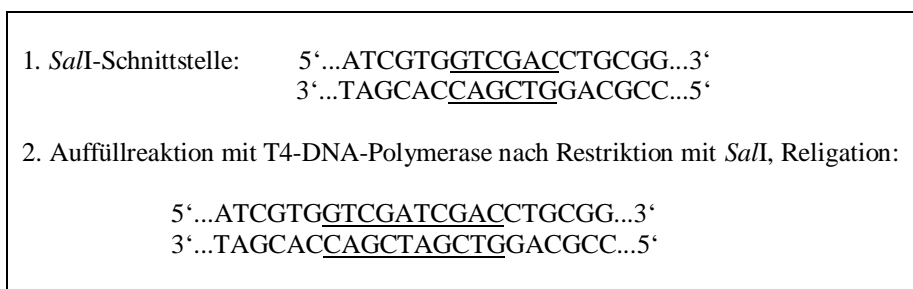


Abb. 15: Überprüfung der frame-shift Mutation innerhalb des Inaktivierungskonstruktes pKC-*urdZ1d* über Sequenzanalyse. Vergleich der Sequenz des 1,4 kb großen PCR-Produktes vor und nach Einführung der Mutation. 1.: Originalsequenz, *Sal*I-Schnittstelle unterstrichen. 2.: Durch frame-shift Mutation veränderte Sequenz, die entscheidenden Basenpaare sind unterstrichen.

Um ein erfolgtes Einfach-Crossover überprüfen zu können, wurde S-Medium direkt, ohne einen dazwischengeschalteten Ausstrich der Transformanden auf HA-Agarplatten, mit Transformationsklonen beimpft, um Zellmasse für die Isolierung von Gesamt-DNA zu erhalten.

Das Screening auf Einfach-Crossover wurde in diesem Fall über PCR durchgeführt. Als Template diente die isolierte Gesamt-DNA, als Primer wurden die für die Amplifikation des Inaktivierungskonstruktes abgeleiteten Primer Epi1 und Epi2 (Tab. 10, 2.9.4) verwendet. Gesamt-DNA des Wildtyps wurde als Kontrolle eingesetzt. Die erhaltenen Amplifikate wurden aufkonzentriert und dann mit *SalI* restringiert.

Nach Restriktion der PCR-Produkte mit *SalI* und der Auftrennung über Agarose-Gelelektrophorese muß sich für den Wildtyp, der die intakte *SalI*-Schnittstelle enthält, eine Bande bei 0,7 kb ergeben (das 1,4 kb große Amplifikat wird durch *SalI*-Restriktion in 2 Fragmente gespalten, jedes mit einer Größe von 0,7 kb). Die Einfach-Crossover-Proben müssen, da bei Integration des Inaktivierungskonstruktes sowohl eine deletierte Kopie mit zerstörter Schnittstelle, als auch eine Wildtypkopie mit intakter Schnittstelle vorhanden sein muß, 2 Banden aufweisen: eine Bande bei 0,7 kb für die Wildtypkopie, eine Bande bei 1,4 kb für die deletierte Kopie.

Abb.16 zeigt das Agarosegel der mit *SalI* restringierten Amplifikate. Auf den Spuren 1-5 wurden die zu überprüfenden Einfach-Crossover Klone aufgetragen, Spur 6 zeigt die Bande des Wildtyps, die mit 0,7 kb der erwarteten Größe entspricht. Für die Proben 1-4 zeigen sich jeweils zwei Banden, bei 0,7 und 1,4 kb - ein Einfach-Crossover hat demnach bei allen 4 Proben stattgefunden. Eine Aussage über die Art des Einfach-Crossover Ereignisses, d.h. befindet sich die deletierte Kopie stromauf- bzw. stromabwärts der Wildtypkopie, kann mit dieser PCR-Methode allerdings nicht getroffen werden.

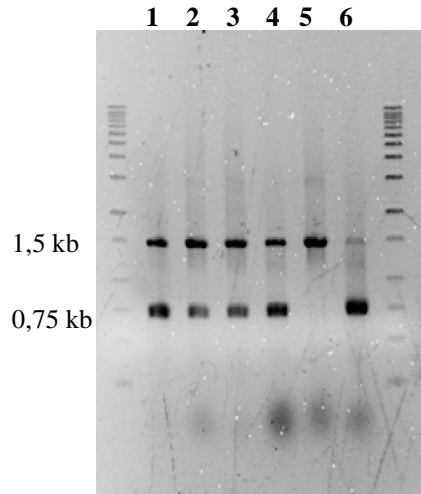


Abb. 16: Inaktivierung von *urdZ1*. Überprüfung auf Einfach-Crossover über PCR. Restriktion der Amplifikate mit *SalI*. Spur 1-5: Zu überprüfende Einfach-Crossover Proben, Spur 6: Wildtyp.

Von besonderem Interesse ist die Probe, die auf Spur 5 aufgetragen wurde. Sie zeigt eine einzelne Bande bei 1,4 kb. Dies kann auf ein bereits erfolgtes Doppel-Crossover hinweisen. Da bei einem Doppel-Crossover Ereignis die intakte Wildtypkopie durch die punktmutierte Kopie ersetzt wurde, ist nach einem *SalI*-Verdau des Amplifikats nur mit einer Bande der Größe 1,4 kb zu rechnen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist das Auftreten eines ungewöhnlichen Crossover-Ereignisses, wie es bei Inaktivierung von *urdGT2* für die Mutante BF-1 beschrieben wurde (3.4.3.1, Abb. 36). Das ungewöhnliche Crossover-Ereignis beinhaltet eine zweifache Integration des mutierten Fragmentes, mit dazwischenliegendem Vektor pKC1132 und direkter Eliminierung der Wildtypkopie.

Parallel zum Screening auf Einfach-Crossover erfolgte mit der oben genannte Probe 5 (BF-3-1) die Selektion auf Doppel-Crossover. Diese wurde, abweichend von der im Material und Methodenteil beschriebenen Vorgehensweise, in Flüssigmedium durchgeführt. Dazu wurden 50 ml TSB-Medium ohne Antibiotikum in 300 ml Schikanekolben mit Metallspirale und Zellstoffstopfen beimpft und bei 40°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Anwachsen der Kulturen (4 - 6d) wurden 1-2 ml der gebildeten Zellpellets für das Beimpfen der nächsten TSB-Flüssigpassage verwendet.

Die Selektionsmethode in Flüssigmedium bietet den Vorteil der Zeitersparnis. Dem Beimpfen von HA-Agarplatten, Herstellen von Sporensuspensionen und Verdünnungsausstrichen derselben mit den jeweils erforderlichen Inkubationszeiten für jede Passage steht nun das

einfache Überimpfen der Kulturen in eine neue Flüssigpassage gegenüber. Dieses einfache Handling ermöglicht außerdem die Bearbeitung einer größeren Probenzahl.

Die Mutante BF-3-1 wurde insgesamt drei Passagen auf TSB-Flüssigmedium ohne Apramycin unterzogen, denen zwei Passagen auf HA-Agarplatten, ebenfalls ohne Antibiotikum, folgten. Nach Herstellung einer Sporensuspension wurden, aufeinanderfolgend, zwei Vereinzelausstriche von BF-3-1 vorgenommen. Durch die mehrfache Anzucht von BF-3-1 ohne Apramycin war sicher gewährleistet, daß bei Vorliegen einer Mutante mit dem beschriebenen, ungewöhnlichen Crossover-Ereignis durch ein zweites Crossover der Vektor pKC1132 sowie eine der mutierten Kopien eliminiert werden konnte.

BF-3-1 wurde wiederum über PCR überprüft. Dazu wurden die oben beschriebenen Primer Epi1 und Epi2 eingesetzt, und das erhaltene PCR-Produkt mit den Enzymen *SacII* und *NruI* restringiert, die innerhalb des Amplifikates jeweils eine Schnittstelle besitzen. Bei erfolgtem Doppel-Crossover müssen sich nach Restriktion der Probe mit *SacII* 2 Banden der Größe 1,13kb und 0,3kb ergeben, nach Restriktion mit *NruI* 2 Banden der Größe 1,26 kb und 0,17 kb. Die erwarteten Ergebnisse werden durch Abb.17 bestätigt.

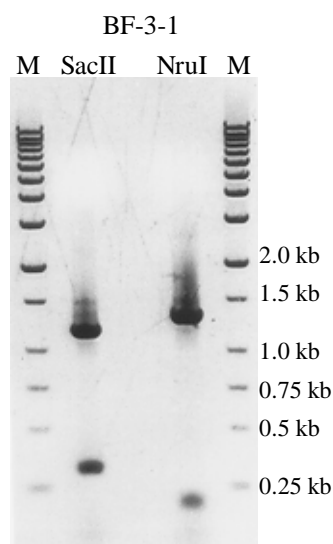


Abb. 17: Überprüfung des erfolgten Doppel-Crossovers bei Mutante BF-3-1 über PCR, Restriktion der Amplifikate mit *SacII* und *NruI*, M: Marker

### 3.4.1.2 Chemische Charakterisierung der *urdZ1*-Mutante

Um gebildete Sekundärmetabolite isolieren und analysieren zu können, wurde BF-3-1 in Produktionsmedium NL 111/V angeimpft und 72h bei 28°C inkubiert. Die Isolierung der Sekundärmetabolite wurde wie unter Punkt 2.9.9.7 angegeben durchgeführt.

Zunächst erfolgte die dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Mutante BF-3-1. Dazu wurde der in Methanol aufgenommene Extrakt von BF-3-1 mittels DC aufgetrennt. Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 9:1 wurde als mobile Phase eingesetzt. Als Vergleich diente ein Extrakt des Wildtyps und eine Mutante von A. Trefzer, Tübingen (Mutante X), die Urdamycin B und Aquayamycin produzierte ( Urdamycin B besitzt, ebenso wie Aquayamycin, nur einen Zucker an Position C-9, eine D-Olivoose. Beide Substanzen lassen sich anhand von dünnschichtchromatographischen Analysen nicht unterscheiden, da sie gleiches Laufverhalten, d.h. gleiche Retentionszeiten und gleiche Farbe aufweisen ).

Wie in Abb. 18 zu sehen ist, zeigt BF-3-1 ein anderes Naturstoffspektrum als *S. fradiae* Tü 2717. Spots mit gleichen  $R_f$ -Werten bzw. gleicher Farbe wie z.B. Urdamycin A konnten nicht detektiert werden. Dahingegen zeigten sich im Vergleich zu Mutante X übereinstimmende Spots.

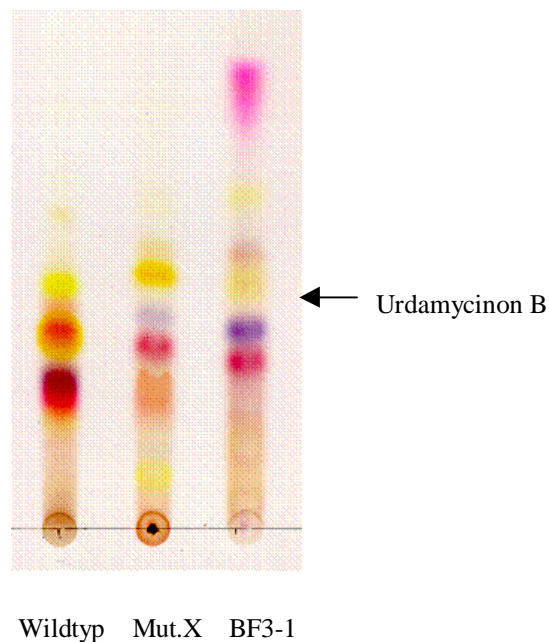


Abb. 18: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Mutante BF-3-1 im Vergleich zum Wildtyp und zur Mutante X. Laufmittel Dichlormethan, Methanol, 9:1



Ein Extrakt der Mutante BF3-1 wurde daraufhin von D. Hoffmeister, Tübingen, und K. Ichinose, Japan, über HPLC-UV-VIS und anschließend HPLC-MS analysiert. Das über HPLC-UV-VIS erhaltene Chromatogramm zeigte bei einer Retentionszeit von 9,1 min einen Peak (Peak 2, Abb. 19), der mit Urdamycinon B kochromatographierte. Dieser Peak zeigte ein für Urdamycinon B typisches UV-Spektrum ( Abb. 19). Alle weiteren Peaks wiesen keine für Urdamycine typischen UV-Spektren auf.

Die weitere Verifizierung der Mutante BF-3-1 über HPLC-MS ergab eine Masse von 453,1 u, die mit der Masse von Urdamycinon B übereinstimmt. Somit konnte über die beschriebenen Analysemethoden gezeigt werden, daß die Mutante BF-3-1 Urdamycinon B (Abb. 20) produziert.

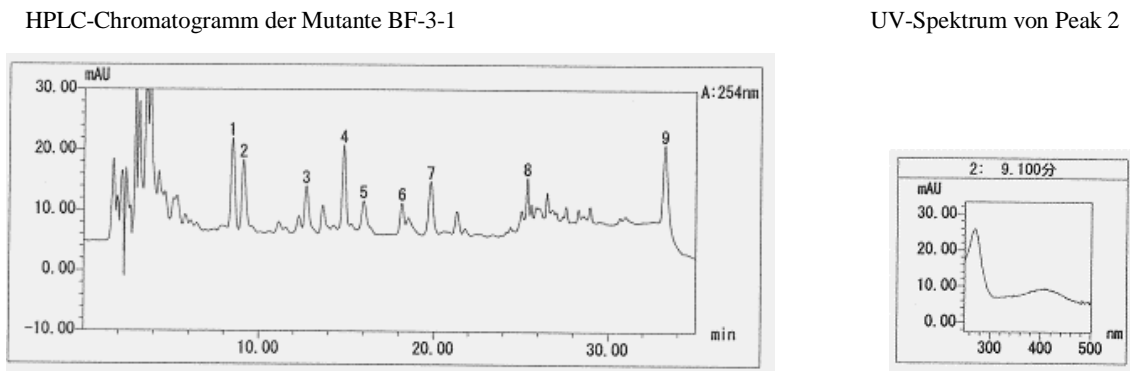


Abb. 19: HPLC-Analyse der von Mutante BF-3-1 gebildeten Sekundärmetabolite. Das HPLC-Chromatogramm zeigt bei einer Retentionszeit von 9,1 min einen Peak (Peak2) der mit Urdamycinon B kochromatographiert. Peak 2 zeigt ein für Urdamycinon B typisches UV-Spektrum.

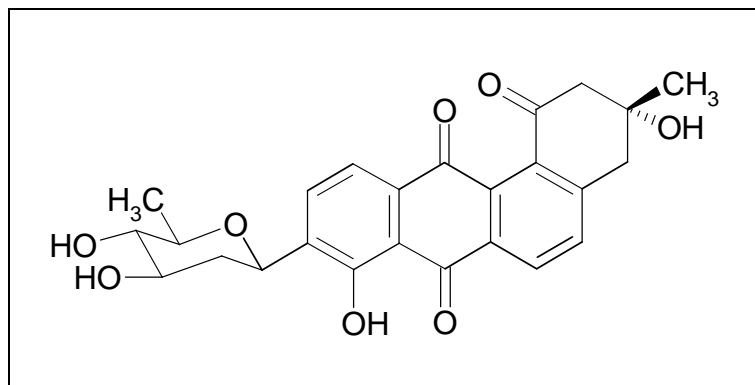


Abb. 20: Urdamycinon B

### 3.4.2 Inaktivierung von *urdM* aus dem Urdamycin-Biosynthesecluster

Wie bereits beschrieben, wiesen die über Sequenzanalyse erhaltenen Sequenzdaten darauf hin, daß es sich bei *urdM* um ein ungewöhnliches Protein mit möglicher Doppelfunktion handelt. Um die genaue Funktion von *urdM* zu ermitteln, wurde das Gen über eine in-frame Deletion inaktiviert.

#### 3.4.2.1 Herstellung einer *urdM*-Mutante

Die Herstellung des Inaktivierungskonstruktes für die Inaktivierung von *urdM* erfolgte über ein 7,3 kb großes *EcoRI*-Fragment, das das Gen *urdM* enthält. Ausgehend von diesem Fragment wurde über Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* ein 5,5 kb großes DNA-Fragment hergestellt, das in den Vektor pBlueskript SK(-) ligiert wurde. Über Restriktion mit *NcoI* wurden innerhalb von *urdM* 498 bp eliminiert. Nach folgender Religation wurde die in-frame Deletion enthaltende DNA in den nicht replikativen Vektor pKC1132 umklontiert. Das dabei entstandene Inaktivierungskonstrukt pKC-*urdM*d wurde über Protoplastentransformation in *S. fradiae* Tü2717 eingebracht. Abb. 21 zeigt eine Restriktionskarte mit den für die Herstellung des Inaktivierungskonstruktes und die Überprüfung auf Einfach- sowie Doppel-Crossover relevanten Restriktionsschnittstellen.

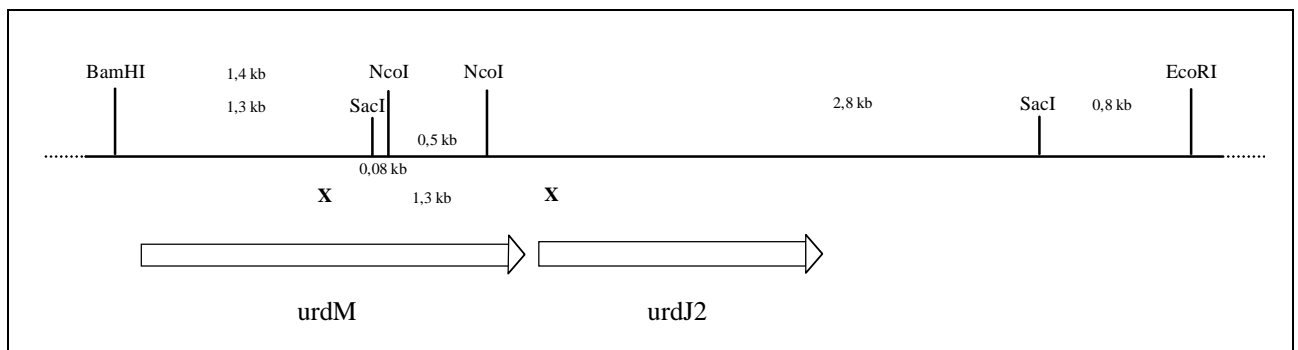


Abb. 21: Restriktionskarte mit relevanten Restriktionsschnittstellen für die Inaktivierung von *urdM*, d.h. Herstellung des Inaktivierungskonstruktes sowie Überprüfung eines Einfach- und Doppel-Crossovers. Neben den Restriktionsschnittstellen sind die jeweiligen Größen der DNA-Abschnitte angezeigt. X bezeichnet die Primer-Bindungsstellen (Primer *urdM*1 und *urdM*2, siehe Punkt 2.9.4) für den Nachweis eines erfolgten Doppel-Crossovers.

Die Überprüfung der Transformanten auf ein erfolgreiches Einfach-Crossover wurde über Southern Hybridisierung vorgenommen. Dazu wurden Transformationsklone ohne

Zwischenpassage auf HA-Agarmedium direkt in S-Medium mit Apramycin angeimpft und Gesamt-DNA isoliert.

Als Sonde für die Southern Hybridisierung wurde ein internes 3,4 kb großes *SacI*-Fragment des Plasmides 2-10 DIG-markiert, das den Bereich der *NcoI*-Schnittstellen abdeckt, über die die in-frame Deletion vorgenommen wurde.

Die Gesamt-DNA der Transformanden sowie des Wildtyps wurde mit *SacI* restringiert. Für den Wildtyp wird mit der 3,4 kb *SacI*-Sonde ein Signal bei 3,4 kb erwartet, für die zu prüfenden Einfach-Crossover Mutanten müssen sich zwei Signale ergeben: ein Signal bei 3,4 kb für die vorhandene Wildtypkopie, ein Signal bei 2,9 kb für die um 498bp verkürzte deletierte Kopie. Der durchgeführte Southern Blot ergab wie erwartet ein Signal bei 3,4 kb für den Wildtyp, eine der zu überprüfenden Proben zeigte 2 Signale, bei 2,9 kb und 3,4 kb, d.h. ein Einfach-Crossover hatte stattgefunden. Bei 6 weiteren Proben zeigten sich keine oder nur sehr schlecht erkennbare Signale.

Wiederum wurde - wie bei der Inaktivierung der NDP-Hexose 3,5 Epimerase *urdZ1* - die Selektion auf Doppel-Crossover parallel zum Screening auf Einfach-Crossover vorgenommen. Eingesetzt wurden die Transformanden, die auf Einfach-Crossover geprüft wurden, sowie zusätzliche Transformationsklone. Wie unter 3.4.1.1 beschrieben, wurden die Klone direkt von den Regenerationsplatten in TSB-Medium ohne Antibiotikum überimpft und bei 40°C inkubiert, bis ein ausreichendes Wachstum für die folgende Passage erreicht wurde.

Die bei Screening auf Einfach-Crossover erhaltene positive Mutante befand sich zu diesem Zeitpunkt in der 5. Flüssigpassage zur Selektion auf Doppel-Crossover. Sie wurde nun, nach Homogenisieren der Zellpellets, auf HA-Agarplatten ohne Apramycin ausgestrichen. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie unter 2.9.9.5 geschildert. Nach Herstellung einer Sporensuspension wurden von dieser Verdünnungsausstriche ( $10^{-5}$  -  $10^{-9}$ ) auf Agarplatten mit und ohne Apramycin angelegt, um die Anzahl der auf Platten mit und ohne Antibiotikum gewachsenen Klone vergleichen zu können.

Zusätzlich wurde ein Transformationsklon (Klon 32), der nicht auf Einfach-Crossover getestet worden war und sich ebenfalls in der 5. Flüssigpassage befand, in das Screening auf Doppel-Crossover mittels Festmedium übernommen.

Für die erste Passage von Klon 1 auf Festmedium ergab sich nach Auszählen der aus den Verdünnungsausstrichen erhaltenen Kolonien kaum ein Unterschied zwischen der Anzahl der

Kolonien, die auf antibiotikumhaltigen Agarplatten wuchsen und der Kolonienzahl, die auf reinen HA-Platten ohne Apramycin erschien. Für Klon 32 war der ermittelte Faktor mit 2.5 für die Verdünnung  $10^{-6}$  zwar etwas besser, aber nicht ausreichend. Beide Kulturen wurden deshalb weiteren Passagen auf Festmedium unterzogen.

Auch nach der 5. Passage auf Festmedium (10. Passage insgesamt) ergab sich für Klon 1 kein besseres Ergebnis. Nach wie vor wuchsen auf Platten mit und ohne Antibiotikum etwa gleich viele Kolonien heran.

Für Klon 32 (BF-2) konnte nach der 4. Passage auf Festmedium, d.h. der 9. Passage der Doppel-Crossover Selektion, ein Faktor von 3.7 für die Verdünnungsstufe  $10^{-6}$ , bzw. 2.6 für die Verdünnungsstufe  $10^{-7}$  ermittelt werden. Tabelle 26 zeigt die Anzahl der für die verschiedenen Verdünnungsstufen erhaltenen Kolonien.

Klon 32	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Agarplatten mit Apramycin	dichter Zellrasen	38	3	—
Agarplatten ohne Apramycin	dichter Zellrasen	142	8	2

Tab. 26: Selektion auf Doppel-Crossover bei Mutante BF-2. Anzahl der erhaltenen Kolonien bei Verdünnungsaustriechen der Sporensuspension auf apramycinhaltigen Platten und Platten ohne Apramycin

BF-2 wurde daraufhin für die Vergleichsausstriche auf Agarplatten eingesetzt. 50 Kolonien der Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  wurden mit dem Zahnstocher sowohl auf HA-Platten mit als auch auf Platten ohne Antibiotikum ausgestrichen. Diese wurden bei 28°C inkubiert und das Wachstum täglich protokolliert.

Nach 24 stündiger Inkubation zeigte sich auf den Platten ohne Apramycin für alle Kolonien ein deutliches Wachstum. Auf Platten mit Antibiotikum konnte bei 40 der ausgestrichenen Kolonien kein Wachstum mehr beobachtet werden. Dieses Bild veränderte sich auch in den folgenden 48h nicht. In Abb. 22 ist der Vergleichsausstrich der Mutante BF-2 auf Platten mit und ohne Apramycin dargestellt.

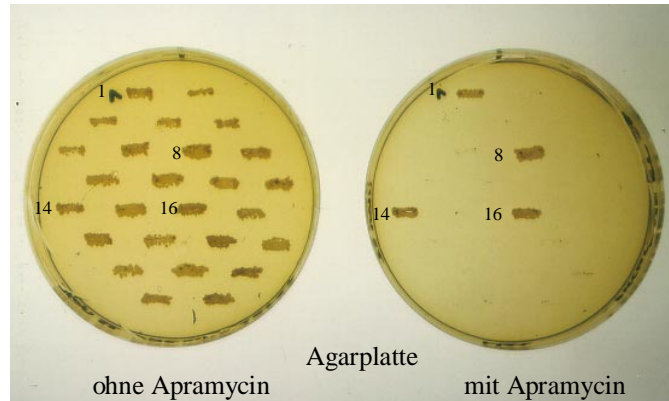


Abb. 22: Vergleichsausstrich der Mutante BF-2 bei Selektion auf Doppel-Crossover. Positive Kolonien der Verdünnungsausstriche werden sowohl auf apramycinhaltigen Platten als auch auf Platten ohne Apramycin ausgestrichen. Auf Platten mit Apramycin darf bei erfolgtem Doppel-Crossover kein Wachstum mehr erfolgen, da durch den Verlust des Vektors keine Resistenz gegen Apramycin mehr vermittelt werden kann.

Die Überprüfung des erfolgten Doppel-Crossover wurde zunächst mit Southern Hybridisierung vorgenommen. 6 der im Vergleichsausstrich positiven Kolonien wurden in S-Medium ohne Apramycin für die Isolierung von Gesamt-DNA angeimpft.

Als Sonde wurde wiederum das oben beschriebene 3,4 kb große *SacI*-Fragment eingesetzt. Die Gesamt-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI restringiert. Für Proben mit erfolgtem Doppel-Crossover müssen sich dabei Signale mit einer Größe von 5 kb ergeben.

Eine Probe zeigte nach durchgeführtem Southern Blot das erwartete Signal von 5 kb (Probe 48). 3 weitere Proben wiesen ein Signal von 5,5 kb Größe auf, was auf ein Vorliegen des Wildtyps hinweist. Die Signale der restlichen Proben entsprachen nicht den erwarteten Größen.

Eine weitere Verifizierung der vermutlichen Doppel-Crossover Mutante 48 (BF-2-1) wurde mit *SacI* restringierter Gesamt-DNA und der gleichen Sonde durchgeführt. Als Vergleich wurde Gesamt-DNA des Wildtyps mit *SacI* restringiert. Außerdem wurde ein Southern Blot mit der Einfach-Crossover Mutante BF-2 im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt, ebenfalls mit der 3,4 kb *SacI*-Sonde und mit *SacI* restringierter Gesamt-DNA. Tab. 27 faßt die für diese Versuche erwarteten Signale zusammen. Die in Abb. 21 gezeigte Genkarte zeigt die entsprechenden *SacI*-Schnittstellen und verdeutlicht somit die erwarteten Signale.

	Wildtyp	Mutante BF-2	Mutante BF-2-1
Größe der erwarteten Signale	3,4 kb	3,4 kb 2,9 kb	2,9 kb

Tab. 27: Größe der erwarteten Signale bei Überprüfung der Doppel-Crossover-Mutante BF-2-1 durch Southern Hybridisierung. Restriktion der Gesamt-DNA mit *SacI*. Sonde: 3,4kb *SacI*. Kontrollen: Wildtyp *S. fradiae* Tü 2717 und Einfach-Crossover Mutante BF-2.

In beiden Versuchen ergaben sich für den Wildtyp Signale bei 3,4 kb. Die Einfach-Crossover Mutante BF-2 zeigte die erwarteten Signale bei 2,9 und 3,4 kb; der Blot konnte aufgrund des starken Hintergrundes nicht gescannt werden, weshalb eine weitere Überprüfung über PCR vorgenommen wurde. Die Doppel-Crossover Mutante BF-2-1 zeigte das erwartete Signal bei 2,9 kb (Abb.23).

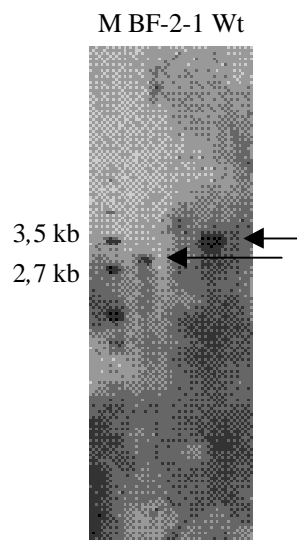


Abb. 23 : Charakterisierung der Mutante BF-2-1 über Southern Hybridisierung. Aufgetragen wurden ca. 5 µg Gesamt-DNA pro Spur. Die DNA wurde mit *SacI* restringiert. Als Sonde diente das 3,4 kb große *SacI*-Fragment. Die Hybridisierungssignale sind mit Pfeilen gekennzeichnet. M: Marker, BF-2-1: Mutante BF-2-1 mit 498 bp großer Deletion in *urdM*, Wt: Wildtyp (*S. fradiae* Tü2717)

Sowohl BF-2 als auch BF-2-1 wurden im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich mittels PCR verifiziert. Als Template diente die isolierte Gesamt-DNA. Primer *urdM1* bindet im Bereich des Oxygenasegens *urdM*, Primer *urdM2* im Bereich des Transportergens *urdJ2*, d.h. jeweils stromauf- und stromabwärts der *NcoI*-Schnittstellen, die für die in-frame Deletion gewählt wurden (Tab. 12, Punkt 2.9.4 und Abb. 21).

Die PCR wurde wie beschrieben (2.9.4) durchgeführt, die PCR-Konstrukte konzentriert und über Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert. Erwartete Größen der Amplifikate sind in Tabelle 28 zusammengefaßt:

	<b>Wildtyp</b>	<b>Mutante BF-2</b>	<b>Mutante BF-2-1</b>
Größe der Amplifikate	1,3 kb	0,8 kb 1,3 kb	0,8 kb

Tab. 28: Charakterisierung der Mutanten BF-2 und BF-2-1 mittels PCR. Erwartete Größen der Amplifikate nach Agarose-Gelelektrophorese.

Abb. 24 zeigt das Ergebnis der Charakterisierung der PCR-Produkte über Gelelektrophorese. Die PCR-Produkte der Mutanten BF-2 und BF-2-1 weisen mit 0,8 kb und 1,3 kb, bzw. 0,8 kb die erwarteten Größen auf, ebenso wie das Amplifikat des Wildtyps mit einer Größe von 1,3 kb. Die zusätzliche Bande bei Mutante BF-2 bei einer Größe von ca. 1,2 kb wurde als unspezifische Amplifikation gedeutet.

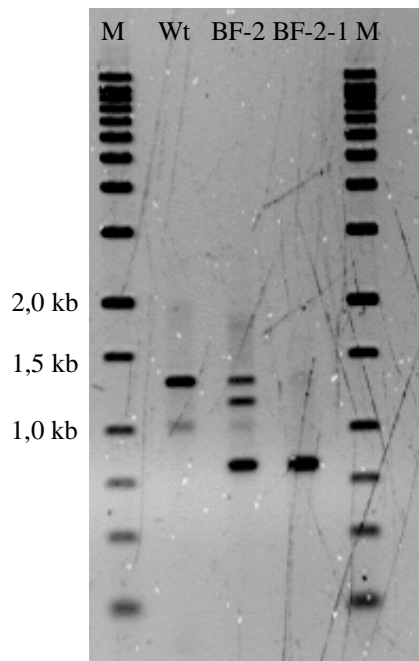


Abb. 24: Charakterisierung der Mutanten BF-2 und BF-2-1 über PCR. Die PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung und Konzentrierung über Gelelektrophorese aufgetrennt. Die erwarteten Banden sind in Tab. 28 zusammengefasst. M: Marker, Wt: Wildtyp, BF-2: Einfach-Crossover Mutante, BF-2-1: Doppel-Crossover Mutante.

Eine Integration des Inaktivierungskonstruktes pKC-urdMd (allerdings ohne Nachweis der Orientierung der deletierten Kopie), sowie ein eindeutiges Ersetzen des Wildtypallels durch das deletierte Allel mittels Doppel-Crossover konnte somit durch Southern Hybridisierung und PCR eindeutig nachgewiesen werden. Abb. 25 zeigt nochmals zusammenfassend

Ausschnitte aus dem Gencluster des Wildtyps *S. fradiae* Tü2717, der Mutante BF-2-1 und das Inaktivierungskonstrukt pKC-urdM.

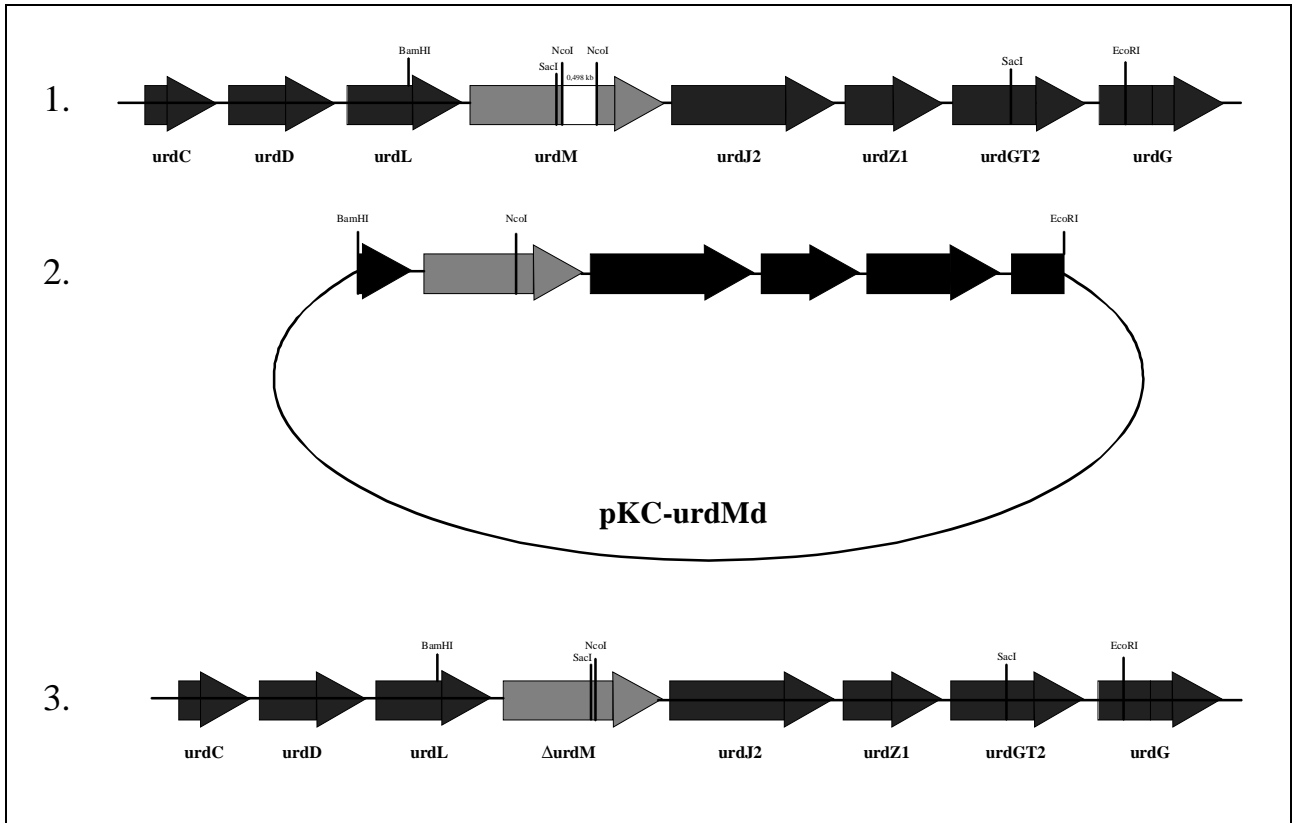


Abb. 25: Inaktivierung der Oxygenase *urdM* aus *S. fradiae* Tü2717 über in-frame Deletion. Das Inaktivierungskonstrukt wurde über ein 5,5 kb großes *Bam*HI / *Eco*RI-Fragment hergestellt, das mit *Nco*I restringiert und dann religiert wurde. Das durch die Deletion von 498 bp innerhalb von *urdM* resultierende 5 kb große Fragment wurde in den nicht replikativen Vektor pKC1132 kloniert. 1.: Ausschnitt aus dem Gencluster des Wildtyps *S. fradiae* Tü2717. Der über die *Nco*I-Schnittstellen zu deletierende Bereich von *urdM* ist farblich abgesetzt. 2.: Inaktivierungskonstrukt pKC-urdM. 3.: Ausschnitt aus dem Gencluster der Doppel-Crossover Mutante BF-2-1 mit in-frame Deletion innerhalb von *urdM*.

### 3.4.2.2 Chemische Charakterisierung der *urdM*-Mutante

Um überprüfen zu können, welche Sekundärmetabolite von *S. fradiae* Tü2717 nach Inaktivierung des Gens *urdM* produziert werden, wurde die Mutante BF-2-1 in Produktionsmedium NL111 / V angezogen und die Inhaltsstoffe isoliert (siehe 2.9.9.7 und 2.9.12) und analysiert.



Die Charakterisierung gebildeter Sekundärmetabolite erfolgte zunächst über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten. Die Laufbedingungen sind unter Punkt 2.9.12.3 beschrieben. Als Vergleich diente ein Extrakt des Wildtyps *S. fradiae* Tü2717. Es zeigte sich dabei, daß die Mutante BF-2-1 im Vergleich zum Wildtyp kein Urdamycin mehr produziert, wie in Abb. 26 zu sehen ist.

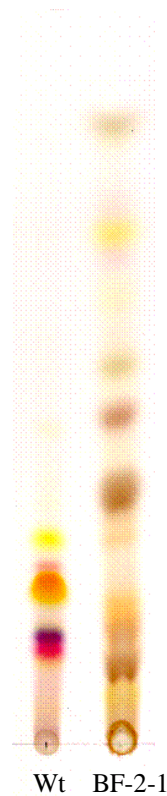


Abb. 26: Dünnschichtchromatographische Charakterisierung der von Mutante BF-2-1 produzierten Sekundärmetabolite im Vergleich zum Wildtyp. Laufmittel Dichlormethan, Methanol, 9:1. Wt: Wildtyp, BF-2-1: Mutante BF-2-1 mit einer 498 bp großen Deletion in *urDM*.

Die Extrakte der Mutante BF-2-1 wurden daraufhin über HPLC nach den beschriebenen Bedingungen analysiert (2.9.12.3). Die entsprechenden HPLC-Chromatogramme sowie zugehörige Spektren sind in Abb. 29 dargestellt. Auch hier ist bei Mutante BF-2-1 im Vergleich zu *S. fradiae* Tü2717 ein deutlich anderes Peak-Muster zu erkennen; so fehlt z.B. der typische Urdamycin A-Peak bei einer Retentionszeit von ca. 32.3 min.

Um die von Mutante BF-2-1 produzierten Sekundärmetabolite genau charakterisieren zu können, wurde BF-2-1 von E. Künzel (AG Prof. J. Rohr, Charleston, USA) über NMR- und

MS-Spektroskopie analysiert. Es stellte sich dabei heraus, daß die Mutante BF-2-1 hauptsächlich Rabelomycin (Abb. 27) akkumuliert. Im Vergleich zu Urdamycin A ist Rabelomycin an Position C-9 nicht glycosidiert, es fehlen außerdem die tertiären Alkoholgruppen an den Positionen 4a und 12b. Somit kann auch die L-Rhodinose nicht mit dem Aglycon verknüpft werden.

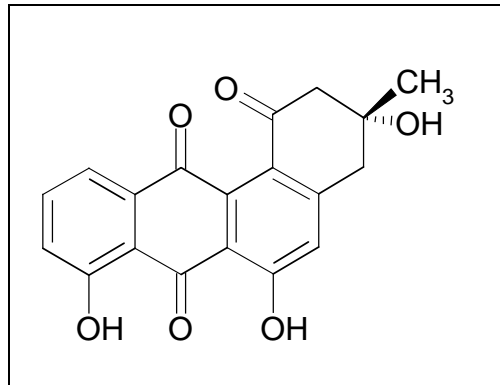


Abb. 27: Rabelomycin

### 3.4.2.3 Komplementierung der *urdM*-Mutante

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, daß die Inaktivierung der Oxygenase *urdM* zu einer Mutante führte, die kein Urdamycin A sondern Rabelomycin produziert. Für die Komplementierung von BF-2-1 wurde ein DNA-Fragment, das die Oxygenase *urdM* enthält, in den Expressionsvektor pUWL201 kloniert und dieses Plasmid in Protoplasten der Mutante BF-2-1 eingebracht. Die detaillierte Vorgehensweise ist unter Punkt 2.9.10 beschrieben.

15 Transformanten wurden für die Isolierung von Sekundärmetaboliten in Produktionsmedium NL111 / V angezogen und chemisch charakterisiert. Die Isolierung und Charakterisierung erfolgte wie unter 2.9.10.5 beschrieben.

Es zeigte sich dabei, daß die Komplementierung von BF-2-1 zu einer Wiederaufnahme der Urdamycin A-Produktion führte und somit die Inaktivierung von *urdM* keine nachteiligen Effekte auf das Ablesen folgender Gene ausübte.

In Abb. 28 ist die dünnschichtchromatographische Überprüfung der komplementierten Mutante BF-2-1 im Vergleich zum Wildtyp und zu Mutante BF-2-1 dargestellt. Für die komplementierte Mutante zeigen sich dabei Spots in gleicher Höhe und gleicher Farbe wie Urdamycin A, verglichen mit dem Wildtyp.

Die Charakterisierung der komplementierten Mutante über HPLC ist in Abb. 29 im Vergleich zum Wildtyp und zur Mutante BF-2-1 dargestellt. Das HPLC-Chromatogramm zeigt bei einer Retentionszeit von 32, 5 min einen Peak, der auch beim Wildtyp auftritt (32, 2 min). Das entsprechende UV-Spektrum des genannten Peaks der komplementierten Mutante ist typisch für Urdamycin A.

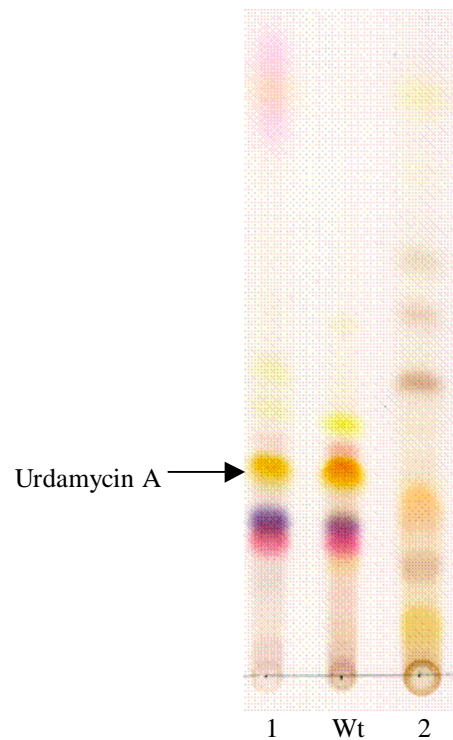


Abb. 28: Komplementierung der Mutante BF-2-1, Charakterisierung produzierter Sekundärmetabolite über Dünnschichtchromatographie. Laufmittel Dichlormethan, Methanol, 9:1. 1: Komplementierte Mutante BF-2-1  $\times$  pBF-pUWL-1, Wt: Wildtyp. 2: Mutante BF-2-1 mit 498 bp großer Deletion in *urdM*. Die Urdamycin A-Spots sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

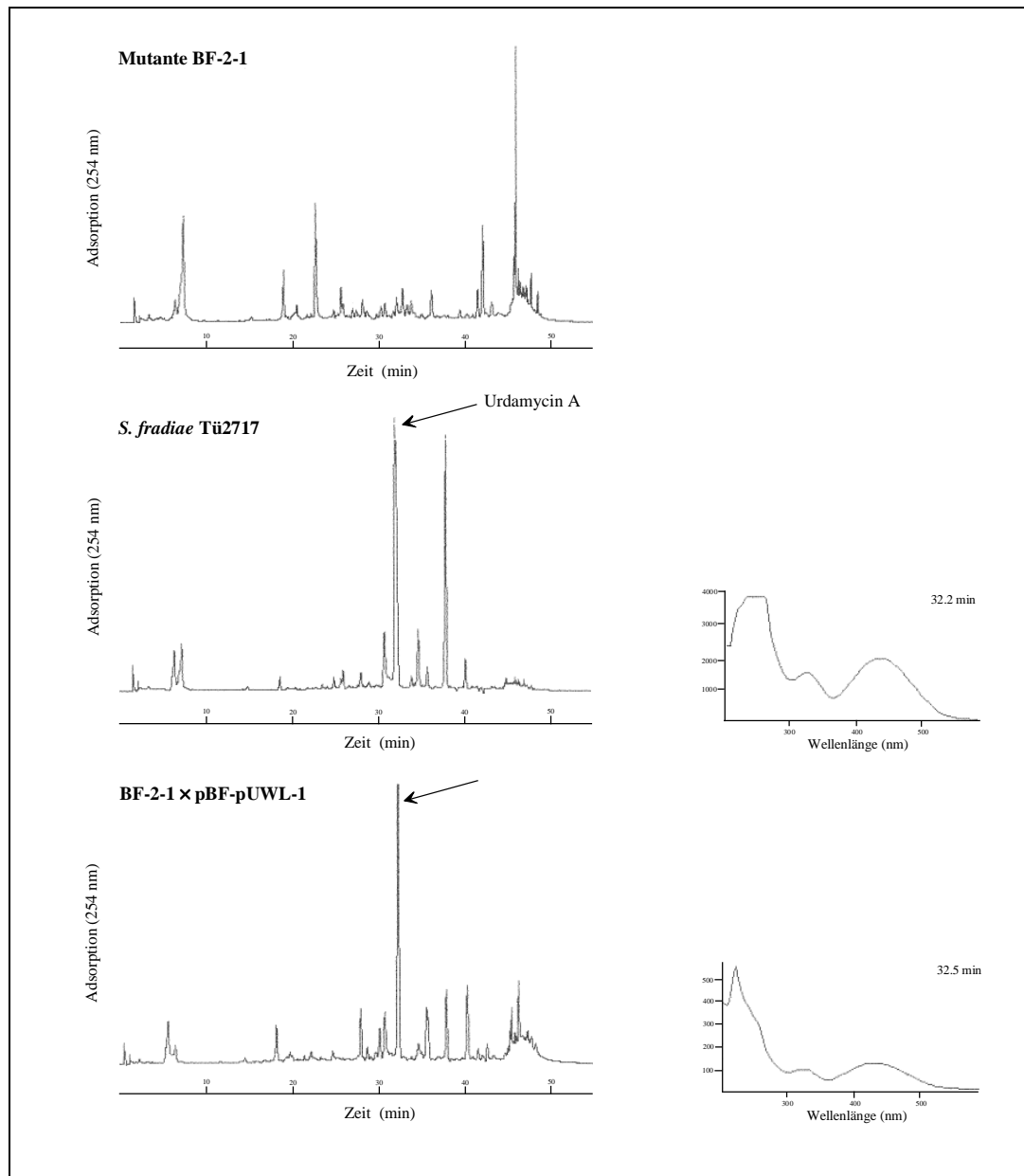


Abb. 29: Charakterisierung der Mutante BF-1-1 und der komplementierten Mutante BF-2-1  $\times$  pBF-pUWL-1 über HPLC im Vergleich zum Wildtyp. Die entscheidenden Peaks der HPLC-Chromatogramme (linke Seite) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Rechterhand werden die den markierten Peaks zugehörigen UV-Spektren gezeigt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm. Mutante B-2-1: *urdM*-Mutante mit 498 bp großer Deletion innerhalb von *urdM*. BF-2-1  $\times$  pBF-pUWL-1: Mutante BF-2-1, komplementiert mit dem intakten Gen *urdM*.

#### 3.4.2.4 Überexpression von *urdM* in *E.coli*

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Gens *urdM* zeigt bei Homologievergleichen sowohl Ähnlichkeiten mit Oxygenasen im N-terminalen Bereich als auch mit Reduktasen im C-terminalen Bereich. Um zu überprüfen, ob es sich um ein Gen mit zwei verschiedenen

Funktionen handelt, oder ob hier, verdeckt durch einen Sequenzierfehler, zwei Gene vorliegen, wurde *urdM* in *E.coli* überexprimiert. Dieser Versuch wurde von D. Hoffmeister, Universität Tübingen, durchgeführt.

Die Bildung eines Proteins mit einer Größe von 70,5 kDa zeigt, daß es sich bei *urdM* tatsächlich um ein neuartiges Protein handelt, das sowohl eine Oxygenase- als auch eine Reduktasedomäne besitzt.

### **3.4.3 Inaktivierung von *urdGT2* aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster**

Für die Inaktivierung der Glycosyltransferase *urdGT2* aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü 2717 wurde, wie bei Inaktivierung der Oxygenase *urdM*, die Methode der in-frame Deletion angewendet. Zielsetzung war wiederum die Aufklärung der genauen Funktion des Gens *urdGT2*.

#### **3.4.3.1 Herstellung der *urdGT2*-Mutante**

Ausgehend von einem 1,9 kb großen *SalI*-Fragment, auf dem neben der vollständigen Glycosyltransferase *urdGT2* auch Teile des NDP-Hexose 3,5-Epimerasegens (*urdZI*) und des NDP-Hexose Synthetasegens (*urdG*) lokalisiert sind, wurde über eine Restriktion mit *StyI*, die eine Eliminierung von insgesamt 327 bp zur Folge hatte, eine in-frame Deletion in *urdGT2* eingeführt. Nach erfolgter Religation wurde das verkürzte DNA-Fragment in den nicht replizierenden Inaktivierungsvektor pSP1 kloniert (2.9.9.1).

Eine Restriktionskarte des das 1,9 kb *SalI*-Fragment enthaltenden DNA-Bereichs aus dem Gencluster von *S. fradiae* Tü2717 mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen für die Konstruktherstellung sowie die Überprüfung der hergestellten Mutanten ist in Abb. 30 dargestellt.

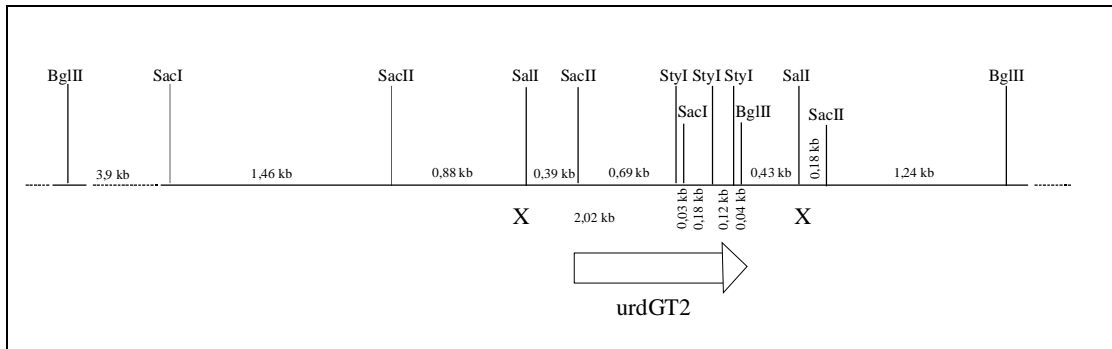


Abb. 30: Restriktionskarte eines DNA-Bereichs aus dem Gencluster von *S. fradiae* Tü2717 mit den relevanten Restriktionsschnittstellen für die Herstellung des Inaktivierungskonstruktes und die Überprüfung der hergestellten *urdGT2*-Mutanten über Southern Hybridisierung und PCR. X steht für die Primer-Bindungsstellen der Primer *urdGT3* und *urdGT4* (Tab. 13).

Mit dem Konstrukt pSP-*urdGT2d* wurden Protoplasten von *S. fradiae* Tü2717 transformiert. Die Transformation ergab durchschnittlich 90 Klone. Diese wurden auf HA-Agarplatten mit Erythromycin ausgestrichen und bis zur Sporulation bei 28°C inkubiert. Mit 16 dieser Klone wurde je 50 ml S-Medium mit Erythromycin für die Isolierung von Gesamt-DNA angeimpft, um die Transformanden auf ein erfolgreiches Einfach-Crossover mittels Southern Hybridisierung zu überprüfen. Als Kontrolle wurde der Wildtyp *S. fradiae* Tü 2717 angezogen. 7 Kulturen zeigten nach 3 Tagen ein gutes Wachstum und wurden für die Isolierung von Gesamt-DNA verwendet.

Die Charakterisierung der Transformanden durch Southern Hybridisierung wurde mit 3 verschiedenen Sonden durchgeführt. Ein 1,68 kb großes internes Fragment des *ermE*-Resistenzgens des Vektors pSP1, das gesamte 1,9 kb große *SalI*-Fragment und das 207bp große *StyI*-Fragment, das bei Herstellung der Deletion des 1,9 kb *SalI*-Fragmentes durch Restriktion mit *StyI* entstand, wurden für die Southern Hybridisierung DIG gelabelt. Restriktion der Gesamt-DNA und die Durchführung der Southern Hybridisierung erfolgten wie unter Punkt 2.9.1.1 und 2.9.5 beschrieben.

Zunächst wurde die Southern Hybridisierung der Gesamt-DNA mit der 1,9 kb *SalI*-Sonde durchgeführt. Die Gesamt-DNA wurde dazu mit *SalI* restringiert. Erwartet wird für den Wildtyp ein Signal bei 1,9 kb. Für Transformanden mit erfolgreichem Einfach-Crossover werden 2 Signale erwartet, da bei Integration des Inaktivierungskonstruktes pSP-*urdGT2d* in das Chromosom sowohl das intakte 1,9 kb große *SalI*-Fragment des Wildtyps als auch das um 327 bp verkürzte Fragment des Konstruktes pSP-*urdGT2d* vorhanden sein sollten. Es ist also mit Signalen bei 1,9 kb und 1,5 kb zu rechnen.

Für den Wildtyp zeigte sich wie erwartet ein Signal in Höhe von 1,9 kb. Sechs der zu untersuchenden Transformanden wiesen das Wildtyp-Signal auf – ein Einfach-Crossover hatte nicht stattgefunden. Bei Klon 1 zeigte sich dahingegen das für ein Einfach-Crossover erwartete, um 327 bp verkürzte Signal bei 1,5 kb. Auffallend war jedoch ein Fehlen des Wildtyp-Signals, wie Abb.31 zeigt.

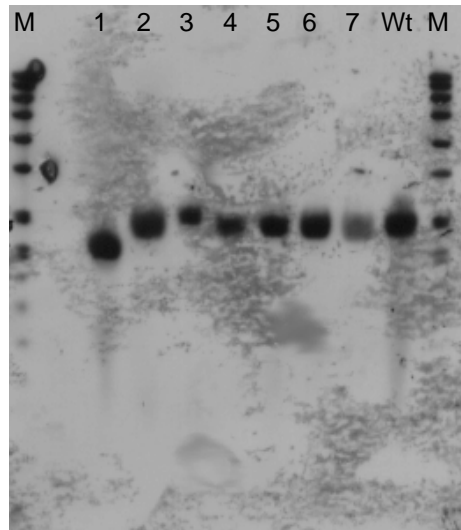


Abb. 31: Inaktivierung von *urdGT2* durch Eliminierung eines 327 bp großen Fragmentes innerhalb des Gens. Screening der Proben auf Einfach-Crossover über Southern Hybridisierung. Die Gesamt-DNA wurde mit *SalI* restringiert. Es wurden ca. 4 µg DNA aufgetragen. Als Sonde wurde ein 1,9 kb großes *SalI*-Fragment eingesetzt. M: Marker, Spuren 1-7: zu überprüfende Proben, Wt: Wildtyp.

Um zu prüfen, ob bei Klon 1 ein Integrationsereignis stattgefunden hat und um bei positivem Ergebnis die Art des Integrationsereignisses charakterisieren zu können, wurden weitere Southern Hybridisierungen sowohl mit der *ermE*-Sonde aus dem Vektor pSP1 als auch erneut mit der 1,9 kb *SalI*-Sonde durchgeführt.

Zunächst wurde die mit den Restriktionsenzymen *SacI*, *SacII* und *BglIII* / *XbaI* restringierte Gesamt-DNA mit der *ermE*-Sonde hybridisiert.

Dabei wurden für den Wildtyp bei allen 3 Ansätzen wie erwartet keine Signale erhalten. Für Klon 1 zeigte sich jedoch für jeden Ansatz ein Signal, was auf eine Integration von pSP-*urdGT2d* hinweist. Zu klären war nun die Art des Integrationsereignisses.

Dazu wurde folgende Hypothese aufgestellt: eine zweifache Integration der um 327 bp verkürzten Fragmente, die den Vektor pSP1 flankieren, und damit eine direkte Eliminierung der Wildtypkopie, könnte das Fehlen des erwarteten ,1,9 kb großen Signals für den Wildtyp erklären. Dieses vermutete, ungewöhnliche Crossover-Ereignis ist in Abb. 36 dargestellt.

Ausgehend von dieser Hypothese wurden die Größen der mit der *ermE*-Sonde erhaltenen Signale überprüft. Es stellte sich dabei heraus, daß die erhaltenen Signale genau mit den erwarteten Signalen (Tab. 29, Abb.32) übereinstimmen.

Restriktion der Gesamt-DNA	Erwartete Signale für Klon 1	Erwartete Signale für <i>S. fradiae</i> Tü 2717
<i>SacI</i>	8,8 kb	—
<i>SacII</i>	3,1 kb	—
<i>BglIII / XbaI</i>	5,8 kb	—

Tab. 29: Erwartete Signale bei der Überprüfung des ungewöhnlichen Crossover-Ereignisses von Klon 1 über Southern Hybridisierung mit der *ermE*-Sonde.

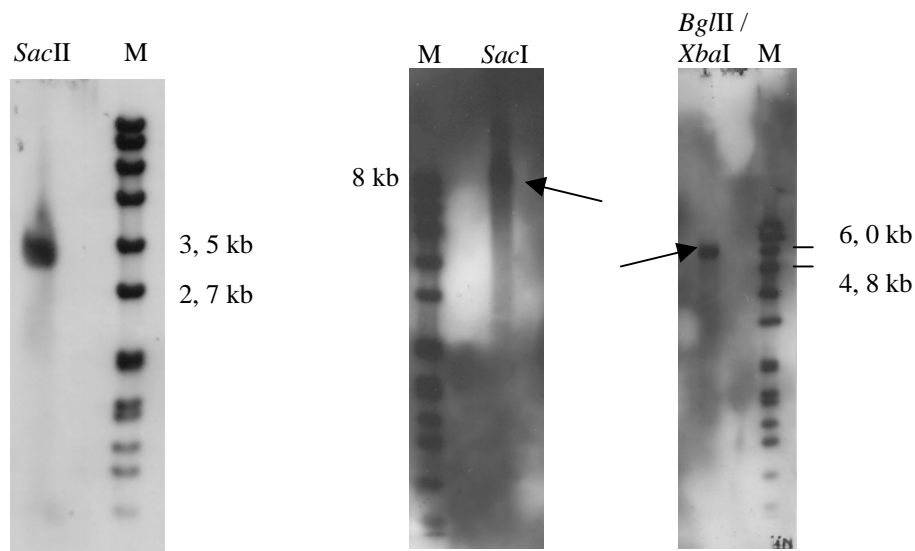


Abb. 32: Überprüfung des ungewöhnlichen Crossover-Ereignisses bei Klon 1 über Southern Hybridisierung. Restriktion der Gesamt-DNA mit *SacI*, *SacII* und *BglIII / XbaI*. Jeweils 4 µg der Gesamt-DNA wurden für den Southern Blot eingesetzt. Als Sonde wurde ein 1,68 kb großes internes Fragment des *ermE*-Resistenzgens des Vektors pSP1 DIG-markiert. Die entsprechenden Hybridisierungssignale sind mit Pfeilen markiert. M: Marker.

Um die aufgestellte Hypothese weiter zu verifizieren, wurde Gesamt-DNA des Klones 1 (BF-1) wiederum mit verschiedenen Enzymen restringiert und Southern Blots mit der 1,9 kb *SalI*-Sonde durchgeführt. Die erhaltenen Signale stimmten mit den erwarteten Signalen überein. Abb. 34 zeigt unter anderem die Überprüfung der Mutante BF-1 über Southern



Hybridisierung. Die Gesamt-DNA wurde mit *SacII* restringiert, als Sonde diente das 1,9 kb *SalI*-Fragment. Die Southern Hybridisierung von BF-1 mit der Sonde 1,9 kb *SalI* nach *SalI*-Restriktion ist in Abb. 33 zu sehen.

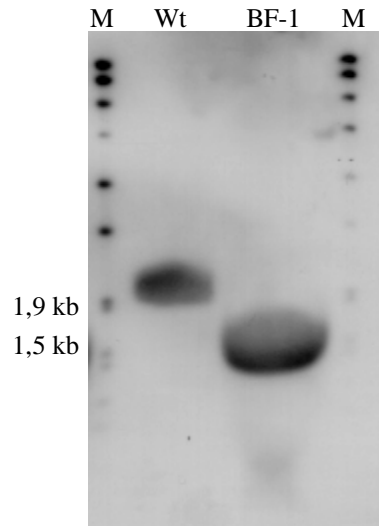


Abb. 33: Charakterisierung der Mutante BF-1 über Southern Hybridisierung. 5 µg Gesamt-DNA, restringiert mit *SalI*, wurden aufgetragen. Als Sonde diente das 1,9 kb große *SalI*-Fragment. M: Marker, Wt: Wildtyp, BF-1: Mutante BF-1 mit ungewöhnlichem Crossover-Ereignis.

Eine weitere Southern Hybridisierung wurde mit der mit *SalI* restringierten Gesamt-DNA von BF-1 und der 207 bp *StyI*-Sonde vorgenommen. Für den Wildtyp wird dabei ein Signal bei 1,9 kb erwartet, für BF-1 darf bei erfolgtem Cross over kein Signal erscheinen, da das 207 bp große *StyI*-Fragment bei Herstellung des Inaktivierungskonstruktes eliminiert wurde. Dies konnte über Southern Hybridisierung bestätigt werden. Aufgrund des starken Hintergrundes konnte der Blot jedoch nicht gescannt werden.

Betrachtet man die aus den verschiedenen Southern Hybridisierungen erhaltenen Ergebnisse, kann die Hypothese, daß es sich bei dem Integrationsereignis um das beschriebene und in Abb. 36 gezeigte, ungewöhnliche Crossover-Ereignis handelt, eindeutig bestätigt werden.

Die Selektion auf Doppel-Crossover bei Mutante BF-1 wurde durch das ungewöhnliche Crossover-Ereignis vereinfacht. Da anstatt der Wildtypkopie eine zweite, deletierte Kopie vorlag, bestand das Problem der Wiederherstellung des Wildtyps nicht mehr. Die Selektion auf Doppel-Crossover und damit auch Vektorverlust, d.h. Verlust der Resistenz gegen

Erythromycin, erfolgte wie schon beschrieben durch Ausstriche der Mutante BF-1 über mehrerer Passagen auf Platten ohne Antibiotikum.

Ausgehend von Mutante BF-1 wurde eine Sporensuspension hergestellt und diese in einer Verdünnungsreihe auf Agarplatten mit und ohne Erythromycin ausgestrichen. Da auf Platten ohne Antibiotikum nur wenig mehr Klone als auf Platten mit Antibiotikum gezählt werden konnten, erfolgte eine zweite Passage. Tab. 30 zeigt die erzielte Kolonienzahl auf Platten mit und ohne Erythromycin.

Verdünnungsstufe		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
Kolonienzahl auf Platten mit Erythromycin	Dichter Zellrasen		234	30	—	—	—
Kolonienzahl auf Platten ohne Erythromycin	Dichter Zellrasen		600	107	12	1	1

Tab. 30: Selektion auf Doppel-Crossover bei Mutante BF-1-1. Die Tabelle zeigt die erhaltene Kolonienzahl bei Verdünnungsausstrichen auf Platten mit und ohne Erythromycin

Von den Verdünnungsstufen 10<sup>-6</sup> und 10<sup>-7</sup> wurde das Verhältnis zueinander bestimmt. Bei Verdünnung 10<sup>-6</sup> ergab sich ein Faktor von 2,6, bei Verdünnung 10<sup>-7</sup> ein Faktor von 3,6.

60 Kolonien beider Verdünnungsstufen wurden nun dem Vergleichsausstrich unterzogen. Dazu wurden die Kolonien, die zunächst auf Platten ohne Antibiotikum zur Vermehrung ausgestrichen wurden, mit dem Zahnstocher auf Platten mit und ohne Erythromycin überimpft und bei 28°C inkubiert. Nach 20 h zeigten auf Platten ohne Erythromycin alle Kolonien ein gutes Wachstum bis hin zur Sporulation. Auf Platten mit Erythromycin wurden jedoch 28 Kolonien gezählt, die kein Wachstum aufwiesen. Diese Kolonien wurden für weitere 48h beobachtet und 6 Kolonien gewählt, die auch nach 72 h kein Wachstum auf Platten mit Erythromycin aufwiesen.

Die 6 gewählten Kolonien wurden in S-Medium für die Isolierung von Gesamt-DNA angezogen, um eine Charakterisierung der vermutlichen Doppel-Crossover Mutanten über Southern Hybridisierung vornehmen zu können. Als Sonde wurde die *ermE*-Sonde eingesetzt, die Gesamt-DNA wurde mit *SacII* restringiert. Als Kontrolle wurde die Mutante BF-1 eingesetzt, für die sich mit der *ermE*-Sonde ein Signal bei 3,1 kb ergeben muß. Da ein Doppel-Crossover den Verlust des Vektors zur Folge hat, dürfen für die zu überprüfenden Klone mit der *ermE*-Sonde keine Signale erhalten werden.

Für alle 6 getesteten Klone zeigten sich im Southern Blot tatsächlich keine Signale, für BF-1 konnte wie erwartet ein Signal bei 3,1 kb erzielt werden. Die Überprüfung wurde außerdem von L. Westrich, Tübingen, mit *SacII* restringierter Gesamt-DNA und der 1,9 kb *SalI*-Sonde durchgeführt. Als Kontrolle diente der Wildtyp. Die erwarteten Signale für BF-1 und eine Doppel-Crossover Mutante (BF-1-1) sind in Tab.31 zusammengefaßt. Abb.34 zeigt den entsprechenden Blot. Da jeweils zwei der Signale größengleich sind, konnten sie im Southern Blot nicht aufgetrennt werden. Eine weitere Verifizierung wurde deshalb über PCR vorgenommen.

Erwartete Signale nach Restriktion der Gesamt-DNA mit <i>SacII</i>		
Wildtyp	BF-1	BF-1-1
1,3 kb	1,3 kb	1,3 kb
1,7 kb	1,3 kb	1,3 kb
	3,1 kb	
	3,1 kb	

Tab. 31: Erwartete Signale bei Charakterisierung der Mutanten BF-1 und BF-1-1 über Southern Hybridisierung. Restriktion der Gesamt-DNA mit *SacII*. Als Sonde wurde das 1,9 kb *SalI*-Fragment eingesetzt.

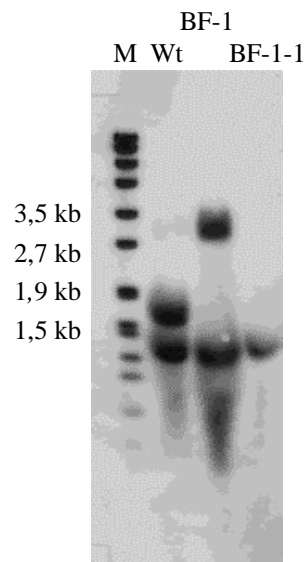


Abb. 34: Southern Hybridisierung zur Überprüfung der Mutanten BF-1 und BF-1-1, Restriktion der Gesamt-DNA mit *SacII*. 5 µg DNA wurden aufgetragen. Als Sonde wurde das 1,9 kb große *SalI*-Fragment verwendet. M: Marker, BF-1: Mutante BF-1 mit ungewöhnlichem Crossover-Ereignis, BF-1-1: Doppel-Crossover Mutante mit einer 327 bp großen Deletion innerhalb von *urdGT2*.

Als Template für die PCR wurde die isolierte Gesamt-DNA der 6 Klone verwendet, wobei wiederum der Wildtyp als Kontrolle diente. Die für den Nachweis des Doppel-Crossover abgeleiteten Primer UrdGT3 und urdGT4 sind in Tab. 13 unter Punkt 2.9.4 aufgelistet. Primer UrdGT3 bindet dabei an DNA im Bereich der NDP-Hexose 3,5- Epimerase, stromaufwärts des 1,9 kb *SalI*-Fragmentes, urdGT4 bindet im Bereich der NDP-Hexose Synthetase, stromabwärts des genannten *SalI*-Fragmentes. Die PCR wurde wie unter 2.9.4 beschrieben ausgeführt.

Im Falle eines erfolgten Doppel-Crossovers muß sich für die Mutanten ein Amplifikat der Größe 1,7 kb ergeben, im Fall des Wildtyps ist ein Amplifikat von 2 kb ( $1,7 + 0,327$  kb) zu erwarten. In Abb. 35 ist das Agarosegel für eine der getesteten Mutanten (BF1-1) dargestellt. In Spur 5 wurde das Wildtyp-Amplifikat aufgetragen, das, wie erwartet, eine Größe von 2 kb aufweist. Spur 4 zeigt das Amplifikat für die Doppel-Crossover Mutante, das mit 1,7 kb ebenfalls der erwarteten Größe entspricht. Als weitere Überprüfung wurden die Amplifikate mit *Bgl*III restringiert. Für den Wildtyp müssen sich dabei Banden bei 0,5 kb und 1,5 kb ergeben, für die Mutante Banden bei 0,5 und 1,2 kb. Wie aus Abb. 35 ersichtlich ist, konnten auch hier die erwarteten Ergebnisse erzielt werden. Für die hier nicht dargestellten Mutanten ergab sich das gleiche Bild. Ein Doppel-Crossover konnte somit für 6 Mutanten nachgewiesen werden.

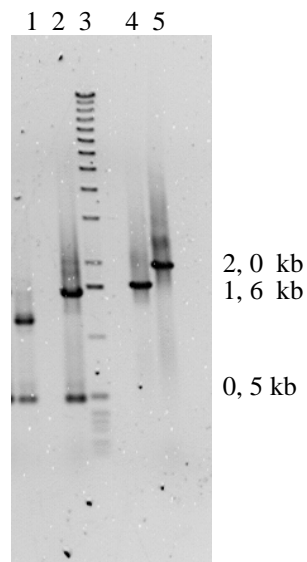


Abb. 35: Charakterisierung der Mutante BF-1-1 über PCR im Vergleich zum Wildtyp. In den Spuren 4 und 5 wurden die Amplifikate ohne vorherige Restriktion auf das Agarosegel aufgetragen, die Spuren 1 und 2 zeigen die Amplifikate nach Restriktion mit *Bgl*III. Spur 1: Mutante BF-1-1, Spur 2: Wildtyp, Spur 3: Marker, Spur 4: Mutante BF-1-1, Spur 5: Wildtyp.

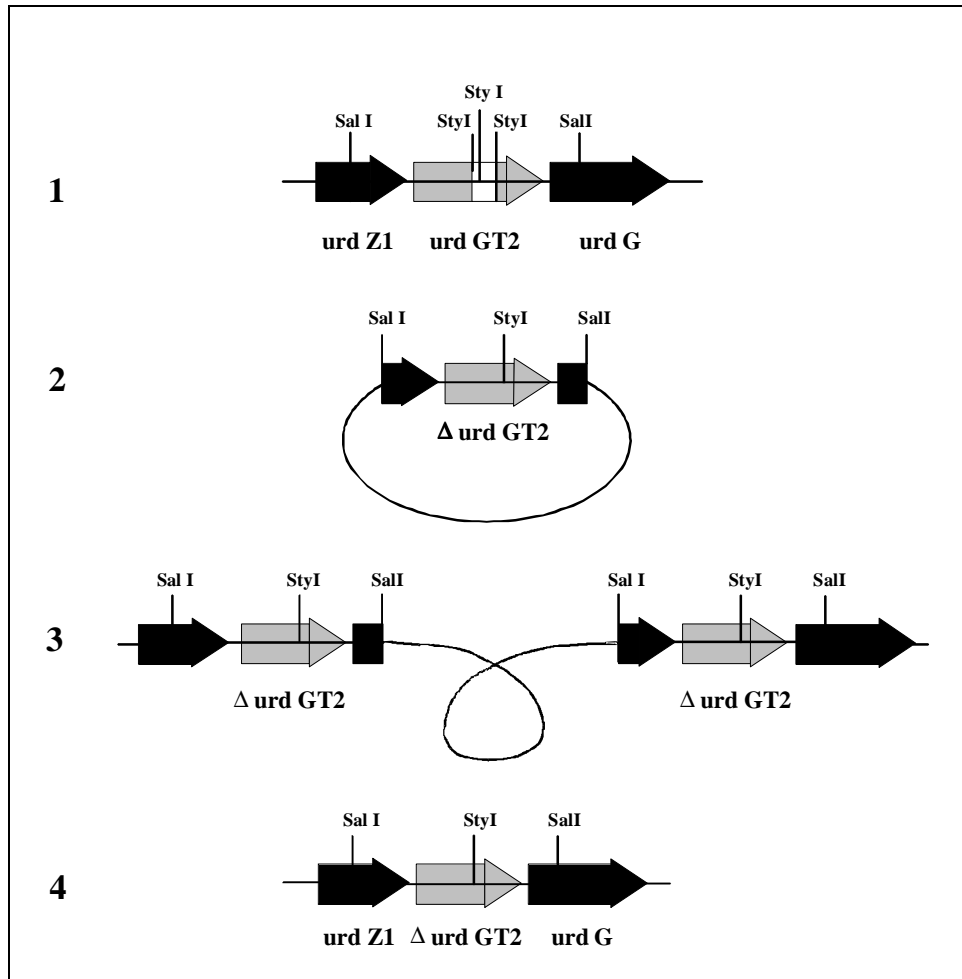


Abb. 36: Inaktivierung von *urdGT2* aus *S. fradiae* Tü2717 über in-frame Deletion. Für die Herstellung des Inaktivierungskonstruktes wurde ein 1,9 kb großes *SalI*-Fragment gewählt. Innerhalb von *urdGT2* wurden 327 bp durch Restriktion mit *StyI* und nachfolgender Religation eliminiert. Das resultierende DNA-Fragment wurde in den nicht replikativen Vektor pSP1 kloniert. 1: Ausschnitt aus dem Gencluster des Wildtyps *S. fradiae* Tü2717 mit den Genen *urdZ1*, *urdGT2* und *urdG*, sowie *StyI*- und *SalI*-Schnittstellen. 2: Inaktivierungskonstrukt pSP-*urdGT2d*. 3: Ungewöhnliches Crossover-Ereignis bei Mutante BF-1 nach Transformation von Protoplasten von *S. fradiae* Tü2717 mit pSP-*urdGT2d* und Selektion auf Integration des Konstruktes. 4: Ausschnitt aus dem Gencluster der Doppel-Crossover Mutante BF-1-1 mit in-frame Deletion innerhalb von *urdGT2*.

### 3.4.3.2 Chemische Charakterisierung der *urdGT2*-Mutante

Die Doppel-Crossover Mutante BF-1-1 wurde auf die Produktion von Sekundärmetaboliten mittels Dünnschichtchromatographie, HPLC, und in Kooperation mit Prof. J. Rohr und E. Künzel (Charleston, USA) über MS und NMR untersucht.

Dazu wurde die Mutante BF-1-1 in NL111/V-Medium angezogen und Sekundärmetabolite wie beschrieben isoliert (2.9.12.2). BF-1-1 zeigte in der dünnschichtchromatographischen Analyse im Vergleich zum Wildtyp keine Urdamycin A-Produktion mehr, wie in Abb. 37 zu sehen ist.

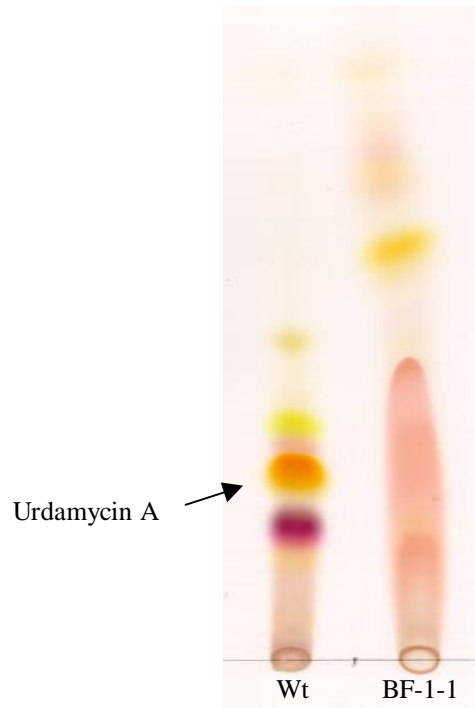


Abb. 37: Dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Mutante BF-1-1 im Vergleich zum Wildtyp. Laufmittel Dichlormethan, Methanol, 9:1. Wt: Wildtyp, BF-1-1: Mutante BF-1-1 mit in-frame Deletion innerhalb von *urdGT2*.

Die fehlende Urdamycin A-Produktion konnte auch über HPLC bestätigt werden. Abb. 38 zeigt die HPLC-Chromatogramme des Wildtyps und der Mutante BF-1-1. Bei einer Retentionszeit von 32,6 min wird beim Wildtyp Urdamycin A eluiert (Peak 1). Bei Mutante BF-1-1 konnte bei gleicher Retentionszeit keine entsprechende Substanz detektiert werden.

Bei der von E. Künzel durchgeführten Charakterisierung der Mutante über NMR- und Massenspektroskopie ließ sich die Akkumulation von 3 neuen Angucyclinonen beobachten. Als Hauptprodukte akkumulierten die Urdamycine I und J, als Nebenprodukt Urdamycin K (KÜNZEL et al., 1999). Die Urdamycine I und J (Abb. 39) weisen keine Desoxyzuckeranteile auf. Sie enthalten die tertiären OH-Gruppen an den Positionen C-4a und C-12b und eine OH-Gruppe an Position C-12a. Die bei Urdamycin A vorkommende 5,6-Doppelbindung ist ersetzt durch eine gesättigte C-C-Bindung.

Urdamycin K (Abb. 39) besitzt eine an Position 12b gebundene L-Rhodinose. Es ähnelt damit der Substanz 100-2 (ROHR et al., 1993), allerdings ohne dessen an C-9 verknüpfte D-Olivose.

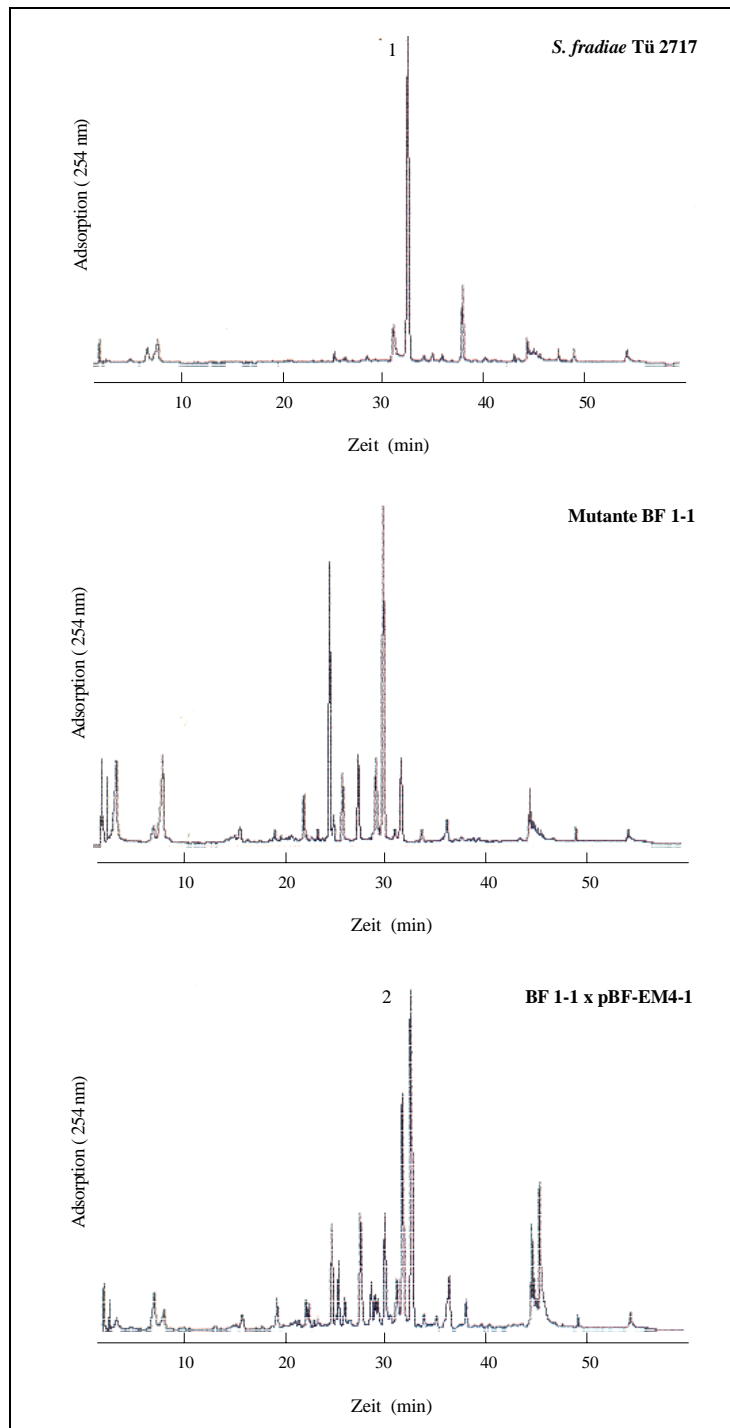


Abb. 38: Charakterisierung der Mutante BF-1-1 und der komplementierten Mutante BF-1-1  $\times$  pBF-EM4-1 über HPLC im Vergleich zum Wildtyp. Peak 1: Urdamycin A, Peak 2: Urdamycin A. Bei Mutante BF-1-1 konnte ein entsprechender Peak nicht detektiert werden.

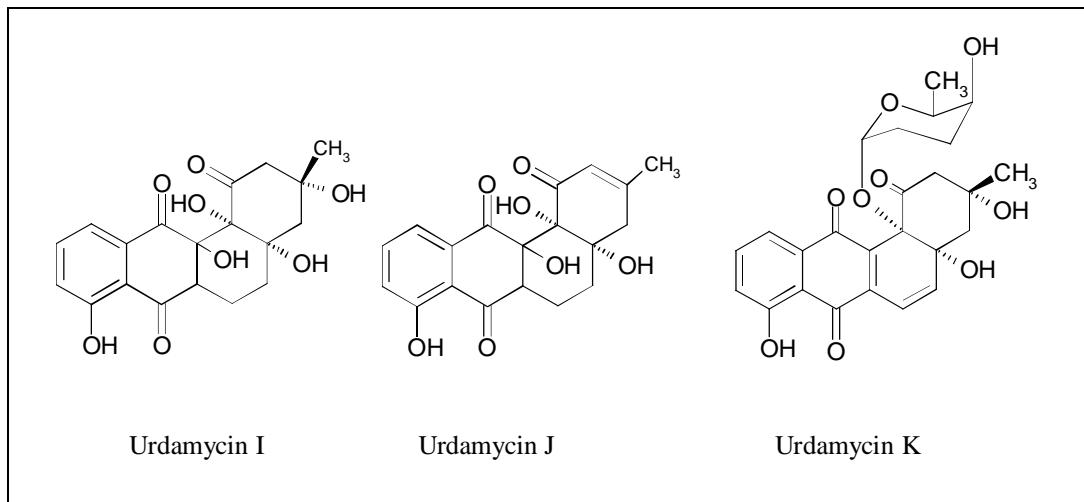


Abb. 39: Formeln von Urdamycin I, Urdamycin J und Urdamycin K

### 3.4.3.3 Komplementierung der Mutante BF-1-1

Das DNA-Fragment für die Komplementierung der *urdGT2*-Mutante BF-1-1 wurde über PCR amplifiziert. Die für die PCR abgeleiteten Primer sind unter Punkt 2.9.4, Tab.11, beschrieben. Das Amplifikat wurde in den Expressionsvektor pEM4 ligiert. Mit dem Konstrukt pBF-EM4-1 wurden Protoplasten der Mutante BF-1-1 transformiert.

Die Sekundärmetabolitanalyse der komplementierten Mutante BF-1-1 × pBF-EM4-1 wurde über Dünnschichtchromatographie, HPLC und in Kooperation mit J. Fuchser (Analyticon, Postdam) über HPLC-MS vorgenommen.

6 Proben wiesen auf DC im Vergleich zum Wildtyp einen Spot in Höhe und Farbe von Urdamycin A auf, der bei BF-1-1 fehlte. In Abb. 40 sind 2 der Komplementierungs-Extrakte im Vergleich zu BF-1-1 und dem Wildtyp dargestellt.



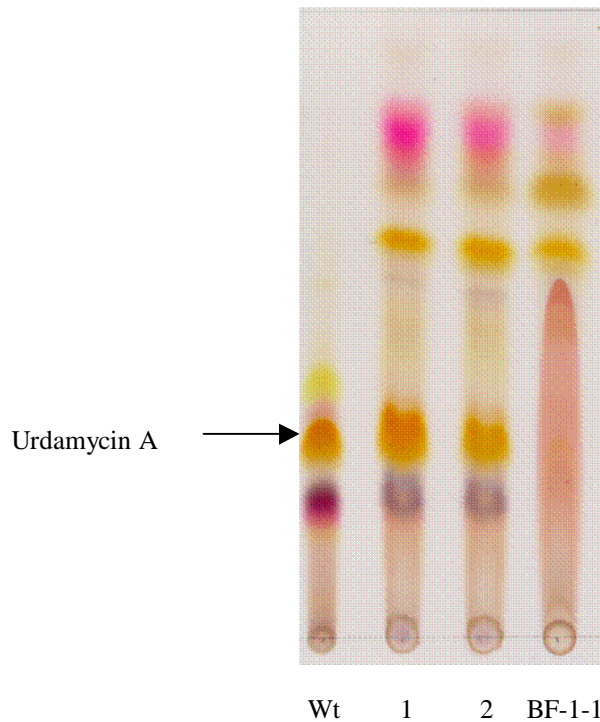


Abb. 40: Charakterisierung der komplementierten Mutante BF-1-1  $\times$  pBF-EM4-1 über Dünnschichtchromatographie im Vergleich zum Wildtyp und der Mutante BF-1-1. Laufmittel Dichlormethan, Methanol, 9:1. Wt: Wildtyp, 1 und 2: auf Komplementierung zu prüfende Proben BF-1-1  $\times$  pBF-EM4-1, BF-1-1: Mutante BF-1-1 mit 327 bp großer Deletion im Bereich von *urdGT2*.

Die HPLC-Analyse der Proben bestätigte das durch DC erhaltene Ergebnis. Deutlich ist der Urdamycin A-Peak, der beim Wildtyp erscheint, auch bei den auf Komplementierung getesteten Extrakten bei einer Retentionszeit von 32,6 min zu erkennen (Abb. 38). Die HPLC-MS-Analyse der Komplementierungsprobe ergab eine Molekularmasse, die der des Urdamycin A entspricht (persönliche Mitteilung von J. Fuchser). Somit konnte durch Komplementierung der *urdGT2*-Mutante BF-1-1 die Wiederaufnahme der Urdamycin-Produktion eindeutig gezeigt werden.

Mittels der unter Punkt 2.9.3.4 beschriebenen Methode der Isolierung von Plasmiden aus Streptomyceten konnte das Komplementierungskonstrukt pBF-pEM4-1 aus der komplementierten Mutante reisoliert und durch Restriktion und folgende Agarose-Gelelektrophorese eindeutig nachgewiesen werden.

### 3.4.3.4 Heterologe Expression von Glycosyltransferase-Genen in der Mutante BF-1-1

Die Deletionsmutante BF-1-1 sollte nun als Rezipient für die Expression von Glycosyltransferase-Genen aus verschiedenen Stämmen dienen. Zielsetzung war die Herstellung neuer glycosidierter Antibiotika durch Expression fremder Glycosyltransferasen anstelle der stammeigenen Glycosyltransferase *urdGT2* aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717.

Für diese Expressionsversuche wurden Glycosyltransferasen aus den Stämmen *S. cyanogenus* S136 und *S. violaceoruber* Tü22 gewählt.

Das auf dem 5,3 kb großen Plasmid B32 vorliegende Glycosyltransferasegen *gra*-ORF14 aus *S. violaceoruber* Tü22 wurde in die Vektoren pEM4 und pUWL201, die Glycosyltransferasegene *lanGT1* und *lanGT2* aus *S. cyanogenus* S136 hintereinander in pUWL201 ligiert. Die genaue Herstellung der Expressionskonstrukte ist unter Punkt 2.9.11 beschrieben.

Die Transformation der Mutante BF-1-1 wurde mit den drei genannten Konstrukten, mit den einzeln im Vektor pUWL201 vorliegenden Genen *lanGT1* und *lanGT2*, sowie dem Cosmid H2-26 aus *S. cyanogenus* S136 vorgenommen. Protoplastierung und Transformation der Mutante BF-1-1 wurden nach der beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt (2.9.10.3 und 2.9.9.3).

Die Charakterisierung der nach Protokoll (2.9.12) in NL 111 / V angezogenen Transformanten erfolgte über Dünnschichtchromatographie und HPLC. Als Vergleich dienten der Wildtyp und die Mutante BF-1-1.

Die Transformation von BF-1-1 mit pEM-B32 führte zu Mutanten, die bei dünnschichtchromatographischer Überprüfung neue Spots zeigten. Über HPLC-Analyse konnte ein zusätzlicher Peak bei einer Retentionszeit von 35,7 min detektiert werden. Weder die Mutante BF-1-1 noch der Wildtyp zeigten bei dieser Retentionszeit einen Peak. Abb. 41 zeigt das HPLC-Chromatogramm mit dem UV-Spektrum des entsprechenden Peaks. Das UV-Spektrum zeigt große Ähnlichkeit zu dem Spektrum von Urdamycin B, ein Urdamycin, das die aus Olivose und Rhodinose bestehende Trisaccharidseitenkette an Position C-9 besitzt, jedoch keine Rhodinose an Position C-12b.

Um dieses Ergebnis verifizieren zu können, wurden die entsprechenden Mutanten erneut in Produktionsmedium angezogen und Sekundärmetabolite isoliert. Über HPLC-Analyse konnte der zusätzliche Peak jedoch nicht mehr detektiert werden. Die Transformation von BF-1-1 wurde deshalb mit dem Expressionskonstrukten pEM-B32 und pUWL-B32 erneut durchgeführt, doch konnte auch mit diesen Ansätzen das erwartete Ergebnis nicht reproduziert werden.

Auffallend war die Tatsache, daß Transformanden, die bei der ersten chemischen Charakterisierung über DC neue Spots, bzw. über HPLC neue Peaks aufwiesen, bei erneuter Anzucht in Produktionsmedium, ausgehend von Agarplatten, ein anderes Bild ergaben: Das Ergebnis konnte nicht mehr reproduziert werden.

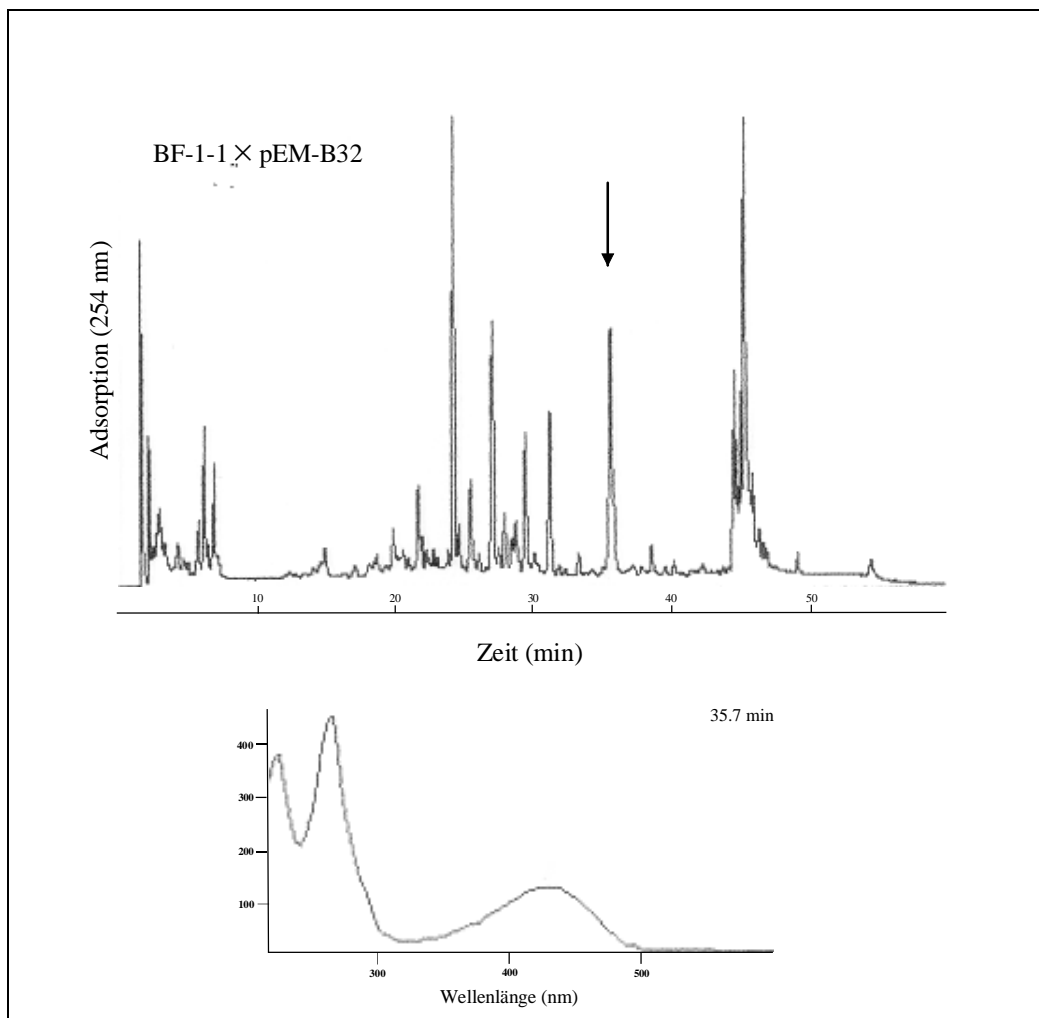


Abb. 41: Charakterisierung der Mutante BF-1-1  $\times$  pEM-B32 über HPLC. Der entscheidende Peak des HPLC-Chromatogramms bei einer Retentionszeit von 35,7 min ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die zweite Abbildung zeigt das UV-Spektrum dieses Peaks. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm. BF-1-1  $\times$  pEM-B32: Expression des Plasmides B32 aus *S. violaceoruber* Tü22, vorliegend im Vektor pEM4, in der Mutante BF-1-1.

In den weiteren Ansätzen – pUWL-lanGT1, pUWL-lanGT2, pUWL-lanGT1-lanGT2 und Cosmid H2-26 – konnten, im Vergleich zu BF-1-1 und *S. fradiae* Tü2717, neue Spots detektiert werden, diese traten jedoch auch jeweils für die leeren Vektoren auf.

## 4. Diskussion

Die zunehmende Resistenz von Mikroorganismen gegenüber vorhandenen Wirkstoffen, wie z.B. die Zunahme multiresistenter Entero-, Staphylo- und Streptokokken, bei denen nun auch eine Resistenzentwicklung gegen das als Reserveantibiotikum eingesetzte Vancomycin zu beobachten ist, macht ein «schnelles» Eingreifen an verschiedenen Ansatzpunkten erforderlich. Neben einem veränderten, sprich verantwortungsvolleren Umgang mit Antibiotika müssen auch die Einsatzgebiete solcher Wirkstoffe im Hinblick auf eine mögliche Resistenzentwicklung oder -verbreitung genau durchdacht werden, wie z.B. der Einsatz von Antibiotika als Wachstumsförderer bei der Tiermast oder auch der Einsatz chemisch verwandter Strukturen in Human- und Tiermedizin. Betrachtet man jedoch die Geschwindigkeit der Entwicklung multiresistenter Erregerstämme, wird deutlich, daß die genannten Maßnahmen nicht ausreichend sind, um mit der rasanten Entwicklung Schritt halten zu können. Die Suche und Entwicklung strukturell modifizierter bzw. neuer antimikrobiell wirksamer Substanzen und Substanzklassen durch gentechnologische oder chemische Methoden gewinnt immer mehr an Bedeutung.

Eine Strategie, die dabei besonders erfolgsversprechend zu sein scheint, ist die Kombinatorische Biosynthese. Diese Strategie umfaßt die Produktion hybrider und neuer Wirkstoffe durch eine zufällige oder gezielte Modifikation von Biosynthesewegen bzw. Biosynthesegenen entsprechender Wirkstoffe. Das wünschenswerte Ziel ist dabei das Design geplanter Moleküle durch Kombination entsprechender Biosynthesegene.

Im Hinblick auf die Kombinatorische Biosynthese spielt die Gruppe der Polyketide eine wesentliche Rolle. Polyketide werden von den verschiedensten Organismen gebildet. Ihre Biosynthesewege zeigen einen großen Reichtum an Variationen. Viele pharmazeutisch relevanten Naturstoffe entstammen dem Polyketidstoffwechsel. Von besonderer Wichtigkeit sind daher die von vielen Actinomyceten gebildeten Polyketid-Antibiotika.

Voraussetzung für die Kombinatorische Biosynthese ist die Aufklärung von Biosynthesewegen, damit auch die Identifikation beteiligter Gene und Enzyme sowie die ständige Weiterentwicklung molekularbiologischer und gentechnologischer Methoden.

In den Anfängen der Kombinatorischen Biosynthese konzentrierten sich die Bemühungen zur Generierung neuer oder modifizierter Sekundärmetabolite auf PKS-Gene, die für die Synthese

des Polyketidaglycons codieren (MCDANIEL et al., 1993). In zunehmendem Maße gewinnen jedoch auch die Post-Polyketid-Biosynthese-Gene im Bezug auf Kombinatorische Biosynthese an Wichtigkeit. Tailoring Reaktionen wie Oxygenierungen und Glycosidierungen können sowohl die chemische Struktur wie auch die biologische Aktivität eines Naturstoffes drastisch verändern. So sind desoxygenierte Zucker, die in vielen Antibiotika enthalten sind (WEYMOUTH-WILSON, 1997), nach neuesten Erkenntnissen beteiligt an Reaktionsmechanismen der entsprechenden Substanzen (KIRSCHNING et al., 1997). Da viele Actinomyceten glycosidierte Naturstoffe produzieren, erschließt sich hier ein ganz neues Teilgebiet der Kombinatorischen Biosynthese, und zwar die gezielte Herstellung neuer glycosidierter Naturstoffe.

Die Aufklärung von Tailoring Reaktionen mit den beteiligten Genen und Enzymen war auch Thema der hier vorgelegten Arbeit. Im hauptsächlichen wurden die Arbeiten mit zwei verschiedenen Streptomyccetenstämmen durchgeführt: *S. fradiae* Tü2717, der Urdamycine produziert, und *S. cyanogenus* S136, der Landomycine produziert, beides Angucyclin-Antibiotika, bestehend aus einem Polyketid-Aglycon und Desoxyzuckerseitenketten der Zucker D-Olivose und L-Rhodinose.

#### **4.1 Expression von mehreren Genen bzw. ganzen Genclustern in verschiedenen Wirtsstämmen**

Die Expression von Genen bzw. gesamten Genclustern verschiedener Herkunft in unterschiedlichen Wirtsstämmen wurde mit der Zielsetzung durchgeführt, durch eine Neukombination der Gene der Donor- und Rezipientenstämmen modifizierte oder neue glycosidierte Naturstoffe zu erhalten.

Die ersten Versuche erfolgten mit *S. fradiae* Tü2717 als Wirtsstamm, in dem mehrere Gene bzw. Genclustern aus *S. cyanogenus* S136 exprimiert werden sollten. Zunächst mußte für die erstrebte Expression fremder Gene in *S. fradiae* Tü2717 ein geeignetes Transformationssystem getestet werden. Für das Einbringen der DNA wurde die Methode der Polyethylenglycol-vermittelten Protoplastentransformation gewählt. Die dafür erforderliche Protoplastierung der Empfängerzellen und die eigentliche Protoplasten-Transformation konnten für *S. fradiae* Tü2717 erfolgreich etabliert werden.

Das Einbringen eines Cosmides aus *S. cyanogenus* S136, das das Gencluster für die Biosynthese des Landomycin A enthält, führte nicht zu Transformanden. Weitere Versuche wurden deshalb mit Subclones dieses Cosmides vorgenommen. Die Expression eines 10kb großen *Bam*HI-Fragmentes, das sowohl die Glycosyltransferasegene 1 als auch 2 des Landomycin-Produzenten enthält, resultierte bei dünnschichtchromatographischer Analyse in neuen Spots. Durch weitere Subklonierung und erneute Transformation der Subclones in *S. fradiae* Tü2717 konnte die Glycosyltransferase *lanGT2* aus *S. cyanogenus* S136 für die neuen Spots verantwortlich gemacht werden. Eine Analyse der zusätzlich gebildeten Spots durch die AG Rohr, Charleston, ergab, daß es sich dabei um 2 Substanzen – Aquayamycin und Substanz 100-2 handelte, die Intermediate der Urdamycin A-Biosynthese darstellen, die jedoch im Wildtyp unter gleichen Bedingungen nicht vorkamen. Diskutiert wird in diesem Fall eine Konkurrenz der Glycosyltransferasen aus Wirts- und Donorstamm um die vorhandenen Substrate, die in einer Hemmung oder Verzögerung der Urdamycin-Biosynthese resultiert. HOPWOOD et al. konnten 1985 erstmals die Herstellung von gentechnologisch veränderten Naturstoffen durch Expression von Genclustern in verschiedenen Wirtsstämmen zeigen. Allerdings wurden auch dabei Substanzen produziert, die sich nur geringfügig von den Produkten des Wildtyps unterschieden.

Weitere Expressionsversuche mit verschiedenen Wirtsstämmen – *S. fradiae* ΔPKS, *S. lividans* TK24 und *S. coelicolor* CH999 – in die Cosmide bzw. Plasmide aus den Stämmen *S. cyanogenus* S136 und *S. violaceoruber* Tü22, dem Granaticin-Produzenten, eingebracht werden sollten, führten nicht zur Produktion modifizierter bzw. neuer Naturstoffe.

Erst mit der Entwicklung eines speziellen Streptomyceten-Wirt- / Vektorsystems durch MCDANIEL und Mitarbeiter (1993), konnten diese (1995) einen gezielten Austausch von Polyketid-Synthasegenen durchführen, was zur Produktion neuer Substanzen führte. Eigene Versuche mit dem Stamm *S. coelicolor* CH999 führten zwar zur Detektion zusätzlicher Spots in der dünnschichtchromatographischen Analyse, jedoch konnten keine neuen bzw. modifizierten Substanzen isoliert werden. Eine Reproduktion der Ergebnisse scheiterte am Wirtsstamm selber, der nicht mehr transformiert werden konnte.

Betrachtet man die hier erzielten Ergebnisse, zeigt sich deutlich, daß die ungezielte Expression von Genclustern wenig sinnvoll ist, da die Möglichkeiten der Neukombination

von Genen innerhalb eines Wirtsstammes durch verschiedenste Faktoren, wie z.B. die Konkurrenz von Gensets um vorhandene Substrate, limitiert werden können.

#### 4.2 Neue Gene der Urdamycin-Biosynthese

Die an der Biosynthese des Polyketid-Aglycons des Urdamycin A beteiligten Gene wurden von DECKER und HAAG (1995) bereits identifiziert und charakterisiert. Gene, die an der Zuckersynthese und an Tailoring Reaktionen beteiligt sind, sollten von SCHNEIDER (1995) im Rahmen einer Diplomarbeit identifiziert werden. Dazu wurde eine Cosmidbank mit einer NDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Sonde gescreent, um Cosmide zu detektieren, die für die Zuckersynthese codierende Gene enthalten. Drei erhaltene Cosmide wurden weiter überprüft. Sie wiesen jedoch keine DNA auf, die auch in Cosmid pURD 8 enthalten war, das Gene für die PKS-Synthese enthält. Es wurde die Vermutung aufgestellt, daß in diesem Falle PKS- und Post-PKS-Gene nicht geclustert vorliegen könnten. Da dies jedoch den bisher gemachten Beobachtungen zur Clusterung von Polyketid-Biosynthesegenen widerspricht, wurden weitere Versuche durchgeführt, um die angenommene Clusterung nachweisen zu können.

Mit den Cosmiden pURD 8, 10, 11 und 12 wurden Southern Hybridisierungen durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse zeigen, daß die Cosmide pURD 11 und 12 mit Cosmid pURD 8 überlappen, da für alle 3 Cosmide mit den verschiedenen Sonden Signale erhalten werden konnten. Cosmid pURD 10 zeigt keine Überlappung mit pURD 8 aber mit pURD 11.

Eindeutig kann durch diese Ergebnisse nachgewiesen werden, daß die Gene, die für die Polyketidsynthese codieren, in Nachbarschaft zu den Genen liegen, die für die Zuckersynthese codieren, d.h. die Gene liegen in einem Cluster vor, wie es im allgemeinen für die Biosynthesegene von Polyketiden angenommen wird. Die Ergebnisse führten außerdem zu einer Anordnung der Cosmide zueinander und bildeten die Basis für die folgenden Versuche.

Für die Sequenzanalyse des Cosmides pURD 12 aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 wurde ein 8 kb großes DNA-Fragment sequenziert. Die Sequenzanalyse führte zur Detektion von 7 neuen ORFs: *urdL*, *urdM*, *urdJ2*, *urdZ1*, *urdGT2*, *urdG* und *urdH*.



UrdL zeigte Homologien zu verschiedenen Cyclasen, so z.B. LanL aus *S. cyanogenus* S136 und JadORF4 aus dem Jadomycin-Biosynthesegencluster. UrdM zeigte interessanterweise Homologien zu zwei verschiedenen Enzymen. Der N-terminale Teil des Gens wies Homologien zu Oxygenasen wie LanM und LanE aus *S. cyanogenus* S136 auf, bzw. zu UrdE aus dem Urdamycin-Produzenten. Der C-terminale Anteil des Gens ähnelte Reduktasen wie z.B. LanV. Die Vermutung, daß es sich bei UrdM um ein Protein handelt, das zwei Funktionen in sich vereinigt, wurde mittels Überexpression in *E.coli* verifiziert.

Für UrdJ2 wurde die Funktion eines Transporters vermutet, da die Proteinsequenz Homologien zu einem möglichen Exportprotein aus *S. roseofulvus* zeigt.

Die Genprodukte von *urdG*, *H* und *urdZ1* zeigten Homologien zu Enzymen, die die Synthese von Desoxyzucker katalysieren. UrdG könnte die Funktion einer dNDP-D-Glucose-Synthase besitzen, die stärkste Ähnlichkeit trat auf zu LanG aus *S. cyanogenus* S136. Die höchste Homologie für das Genprodukt von *urdG* trat für *LanH* aus *S.cyanogenus* S136 auf, es könnte die Funktion einer dNDP-Glucose 4,6-Dehydratase besitzen. Die Proteinsequenz von *urdZ1* zeigte die höchste Homologie zu LanZ aus *S. cyanogenus* S136. *urdZ1* könnte somit für eine dNDP-Hexose 3,5-Epimerase codieren, die an der Biosynthese des Desoxyzuckers L-Rhodinose beteiligt ist.

Die Detektion einer möglichen Glycosyltransferase war besonders im Hinblick auf Kombinatorische Biosynthese sehr interessant. UrdGT2 ähnelt Glycosyltransferasen aus dem Landomycin-Produzenten *S.cyanogenus* S136 – LanGT2 (49% identische AS) und *S. violaceoruber* Tü 22, dem Granaticin-Produzenten – Gra-ORF14 (41% identische AS).

Die Funktion von drei dieser über Sequenzanalyse detektierten Gene sollte über Inaktivierungsversuche nachgewiesen werden. *urdGT2* und *urdM*, vermutlich beteiligt an Tailoring Reaktionen, und *urdZ1* als ein Gen, dessen Genprodukt an der Synthese von L-Rhodinose beteiligt sein könnte, wurden für diese Genaustauschexperimente gewählt.

### **4.3 Inaktivierung verschiedener Gene aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717**

Da die ungezielte Expression von Genen oder Genclustern in verschiedenen Stämmen nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde nun eine neue Strategie zur Herstellung neuer Substanzen etabliert. Dabei sollen durch Inaktivierung einzelner oder mehrerer Post-Polyketid-Biosynthese-Gene deren Funktion geklärt und Mutanten generiert werden, mittels derer dann gezielt entsprechende Gene aus anderen Stämmen exprimiert werden können. Neben der Herstellung neuer glycosidierter Naturstoffe ist die gezielte Veränderung der biologischen Aktivität durch Neukombination von Tailoring Genen als Zielsetzung anzusehen.

Genunterbrechungs- und Genaustauschexperimente mit Antibiotikakassetten können durch das Vorhandensein heterologer DNA im Wirtstamm oftmals zu einer Störung des korrekten Ablesens weiterer Gene führen. Für die durchgeführten Versuche wurde deshalb die Methode der in-frame Deletion eingesetzt. Auch diese Methode stellt einen Genaustausch dar, allerdings ohne fremde DNA - wie z.B. eine Antibiotikaresistenzkassette - einzuführen. Bei der in-frame Deletion wird eine Deletion in ein gewünschtes Gen eingeführt, deren Basenzahl durch 3 teilbar sein muß. Diese Deletion ruft somit keine Verschiebung des Leserahmens hervor, polare Effekte auf nachfolgende Gene können vermieden werden.

Neben der in-frame Deletion wurde außerdem mit der Methode der frame-shift Mutation gearbeitet. Diese Methode hat zwar eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge, sie verzichtet jedoch ebenfalls auf die Einführung fremder DNA und bietet den Vorteil, daß die Herstellung der Inaktivierungskonstrukte sehr schnell durchgeführt werden kann.

Voraussetzung für die nun im folgenden diskutierten Inaktivierungsexperimente war die Sequenzanalyse des Cosmides pURD12 aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 und die Detektion von Genen, deren vermutete Funktion einerseits die Desoxyzuckerbiosynthese beinhaltet, andererseits Tailoring Reaktionen wie Glycosyltransfers und Oxygenierungen.

### 4.3.1 Inaktivierung von *urdZ1*

Gene, die für Epimerasen codieren, konnten in verschiedenen Genclustern detektiert werden. Ihre Aufgabe wurde in der Epimerisierung einer 4-Keto-6-Desoxy-D-Hexose zur entsprechenden L-Hexose innerhalb der Biosynthese von Desoxyzuckern vermutet. Im Falle des Urdamycin A und Landomycin A sind an deren Biosynthese die Desoxyzucker D-Olivose und L-Rhodinose beteiligt.

Für Landomycin A konnte aus Fütterungsexperimenten geschlossen werden, daß die D-Olivose keine biosynthetische Vorstufe der L-Rhodinose sein kann, sondern sich der Biosyntheseweg sehr früh, auf Stufe der NDP-4-Keto-2,6-Didesoxy-D-Glucose oder schon bei der NDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Glucose verzweigen könnte (KIRSCHNING et al., 1997). Dieser Verzweigungspunkt wurde ebenfalls für die Biosynthese der Desoxyzucker D-Desosamin und L-Mycarose in Erythromycin A diskutiert (VARA et al., 1989).

Ausgehend von dem vermuteten gemeinsamen Intermediat, könnte der mögliche Biosyntheseweg zu L-Rhodinose bei Landomycin A über eine 3,5-Epimerisierung durch LanZ1, eine Dehydroxylierung an C-3 (LanQ) und eine Reduktion an C-4 (LanZ3) führen (BECHTHOLD, 1999). Andererseits ergaben sich Hinweise auf einen alternativen Biosyntheseweg (Short activation pathway) der zur Synthese von L-Rhodinose führen könnte, da der Einbau von markierter Rhodinose in Landomycin A beobachtet werden konnte (ROHR et al., 1997).

ICHINOSE und Mitarbeiter (1998) klonierten und sequenzierten das Gencluster aus *S. violaceoruber* Tü22, das für die Biosynthese des Granaticins codiert. 37 Offene Leserahmen konnten detektiert werden, von denen 9 an der Biosynthese der beiden im Granaticin enthaltenen Desoxyzucker beteiligt zu sein scheinen. *gra*-Orf25 zeigte dabei Homologien zu *strM* aus *S. griseus*, das für eine dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose-3,5-Epimerase codiert, die an der Streptomycinbiosynthese beteiligt ist (PISSOWOTZKI et al., 1991). *strM* wird dabei die Epimerisierung der C-5-Methylgruppe zugeschrieben.

Auch für die Granaticin-Biosynthese wurde ein Biosyntheseweg postuliert, der sich ebenfalls auf der Stufe der dTDP-4-Keto-2,6-Didesoxyglucose verzweigt. Ausgehend vom genannten Intermediat kann zum einen über eine C-3-Desoxygenierung, Epimerisierung – Gra-ORF25? - und Ketoreduktion L-Rhodinose gebildet werden, zum anderen kann die 4-Keto-2,6-Didesoxyglucose mit dem Aglyon verknüpft werden, was dann zur Synthese von Granaticin bzw. bei Transfer der Rhodinose an Dihydrogranaticin zu Granaticin B führt.

Da UrdZ1 stärkste Homologie zu LanZ1 aus dem Landomycin-Biosynthesegencluster zeigt, wird eine entsprechende Funktion bei der Biosynthese des 2,3,6-Tridesoxyzuckers L-Rhodinose bei der Urdamycin-Biosynthese vermutet.

Um diese Hypothese zu verifizieren, sollte das Gen über eine frame-shift Mutation inaktiviert werden. Die frame-shift Mutation wurde über eine *SalI*-Schnittstelle eingeführt und das erhaltene Konstrukt mittels Protoplastentransformation in *S. fradiae* Tü2717 eingebracht. Durch homologe Rekombination erfolgte der Austausch des Wildtypallels gegen die mutierte Kopie, was über PCR gezeigt werden konnte.

Sollte die Vermutung zutreffend sein, daß das Genprodukt von *urdZ1* die Epimerisierung der 4-Keto-2,6-Didesoxyglucose auf dem Weg hin zur L-Rhodinose katalysiert, würde ein Ausschalten des Gens zu einem Abbruch der L-Rhodinose-Biosynthese führen. Resultat müßte dann ein Molekül sein, das an Position 12b keine Rhodinose mehr besitzt und dessen Zuckerseitenkette, die an Position C-9 mit dem Aglycon verknüpft ist, ebenfalls keine Rhodinose mehr aufweist, wie beispielsweise Aquayamycin, das an Position C-9 nur eine Olivose besitzt.

Diese Hypothese konnte durch die Inaktivierung von *urdZ1* bestätigt werden. Die Mutante BF-3-1 akkumulierte Urdamycinon B. Im Vergleich zu Aquayamycin fehlen im Urdamycinon B die tertiären OH-Gruppen an Position C-4a und C-12b, die Olivose an C-9 ist vorhanden. Angenommen wurde als nächster Schritt in diesem Shunt-Biosyntheseweg, der zu Urdamycin B führt, der Transfer einer Rhodinose auf Urdamycinon B, der in der Produktion des Shunt-Produktes 100-1 resultiert (ROHR et al., 1993). Die Blockade der Rhodinose-Biosynthese durch Inaktivierung von *urdZ1* führt nun dazu, daß ein Transfer des 2,3,6-Tridesoxyzuckers nicht mehr erfolgen kann.

Die Inaktivierung von *urdZ1* führte zu einer Mutante, die Urdamycinon B akkumuliert. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte auf die Funktion des Gens als eine dNDP-Hexose-3,5-Epimerase geschlossen werden, die an der Biosynthese des 2,3,6-Tridesoxyzuckers L-Rhodinose beteiligt ist. Zu neuen Naturstoffen führte diese Inaktivierung allerdings nicht.

### 4.3.2 Inaktivierung von *urdM*

Auch die Inaktivierung des Gens *urdM* aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster sollte Aufschluß über dessen Funktion bei vermuteten Tailoring Reaktionen geben. Über Sequenzanalyse und folgende Homologievergleiche konnten in der N-terminalen Sequenz von UrdM Ähnlichkeiten zu Oxygenasen, z.B. LanM und LanE aus dem Landomycin-Biosynthesegencluster oder zu UrdE aus *S. fradiae* Tü2717 gezeigt werden. Auffallend war jedoch, daß im C-terminale Teil ebenfalls hohe Homologien zu möglichen Reduktasen (LanV und LanN) auftraten.

Um zu überprüfen, ob *urdM* 2 Funktionen in sich vereinigt, oder ob in diesem Fall 2 Gene vorliegen, was z.B. durch einen Sequenzierfehler „überdeckt“ werden könnte, der sich im Bereich eines möglichen Stopcodons befindet, wurde *urdM* in *E.coli* überexprimiert. Dieses Experiment wurde von D.Hoffmeister, Tübingen, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß *urdM* für ein 70,5 kDa Protein codiert, das zwei Domänen aufweist, eine Oxygenase- und eine Reduktase-Domäne. SUMMERS und Mitarbeiter (1992) als auch SHEN und Mitarbeiter (1995) konnten dies für ein Gen aus dem Biosynthesegencluster von *S. glaucescens* nachweisen, der Tetracenomycin C produziert. Das Gen *tcmN* codiert dabei für eine multifunktionale Cyclase-Dehydratase-3-O-Methyltransferase.

Urdamycin A besitzt 2 Sauerstoffatome an Position 12 und 12b, die aus molekularem Sauerstoff stammen (UDVARNOCKI et al., 1992). Dies konnte über Experimente mit markiertem Sauerstoff und markiertem Acetat geklärt werden. Anhand der erzielten Resultate konnte von drei hypothetischen Biosynthesewegen, die zur Produktion von Aquayamycin führen, einer dieser Wege favorisiert werden. Die Aquayamycin-Synthese verläuft dabei über ein postuliertes Intermediat, das Ähnlichkeit zu der Substanz SF-2315 A (SASAKI et al., 1988, Abb. 42) zeigt, der Sauerstoff an C-4a stammt aus der Polyketid-Biosynthese. Das Intermediat wird über Einführung eines Sauerstoffatoms an C-12b mittels einer Monooxygenase zu Urdamycinon F umgewandelt, die folgende Dehydrierung ergibt Aquayamycin.

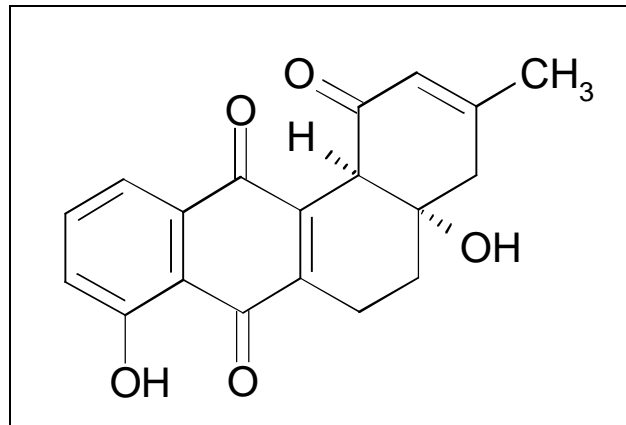


Abb. 42: Substanz SF-2315 A

Aquayamycin ist neben Viridicatumtoxin, einem Mycotoxin aus *Penicillium expansum* (DE JESUS et al., 1982, Abb. 43), das zweite Beispiel für das Vorhandensein eines angulären Sauerstoffs, der aus dem Acetat-Stoffwechsel stammt.

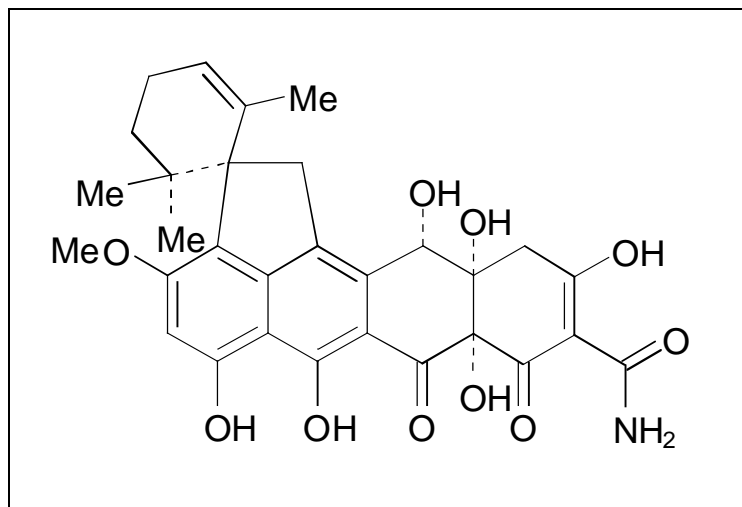


Abb. 43: Viridicatumtoxin

DECKER und HAAG publizierten 1995 die Klonierung und Charakterisierung der PKS-Gene von *S. fradiae* Tü2717, die für die Produktion von Urdamycin A codieren. Im Zuge der beschriebenen Sequenzierarbeiten wurde außerdem ein Gen - *urde* - detektiert, dessen Genprodukt vermutlich eine Oxygenierung katalysiert. UrDE zeigte Ähnlichkeiten zu Hydroxylasen aus anderen Typ II-PKS-Genclustern wie z.B. TcmG aus *S. glaucescens*

(DECKER et al., 1993). UrdE wurde von DECKER und HAAG (1995) die Oxygenierung an Position C-12b zugeschrieben.

Durch die Detektion eines zweiten vermutlichen Oxygenasegens - *urdM* – stellte sich nun die Frage nach dessen Funktion. Um diese aufzuklären, wurde *urdM* durch eine in-frame Deletion inaktiviert. Dies führte zu Mutante BF-2-1, die kein Urdamycin A mehr produzierte. Statt dessen konnte die Akkumulation von Rabelomycin beobachtet werden. Um ausschließen zu können, daß die Deletion polare Effekte auf das Ablesen folgender Gene ausübt, wurde die Mutante komplementiert. Dies führte zur Wiederaufnahme der Urdamycin A-Produktion.

Rabelomycin wurde in Kulturen von *S. olivaceus* entdeckt (LIU et al., 1970), und konnte auch als Nebenprodukt bei anderen Produzenten von Aquayamycin-enthaltenden Angucyclinen detektiert werden (IMAMURA et al., 1982). Es konnte allerdings nicht im Wildtyp *S. fradiae* Tü2717 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Urdamycin A ist Rabelomycin nicht glycosidiert und die tertiären OH-Gruppen an Position 4a und 12b fehlen.

Die Produktion von Rabelomycin konnte auch von YANG und Mitarbeitern (1996) nach Inaktivierung eines Oxygenasegens aus dem Jadomycin B-Biosynthesegencluster von *S. venezuelae* beobachtet werden. Das Genprodukt von *orf6* zeigte bei Homologievergleichen Ähnlichkeit mit 2 Gruppen von Oxygenasen. Eine dieser Gruppen katalysiert die Einführung von Hydroxylgruppen in Polyketidantibiotika, die andere ist am Katabolismus aromatischer Substanzen beteiligt. Besonders große Ähnlichkeiten konnten für 2 Motive detektiert werden, die in FAD- und NADPH-abhängigen Hydroxylasen zu finden sind. Das eine Motiv im N-terminalen Bereich des Enzyms stellt eine ADP-bindende Domäne dar, das zweite Motiv eine Ribityl-bindende Domäne. Es wurde vermutet, daß ORF6 die Hydroxylierung eines aromatischen Polyketid-Intermediates katalysiert, was zur Spaltung des Angucyclin-Rings B führt. Die Inaktivierung von ORF6 würde damit zur Blockade der Ringöffnung führen und eine Akkumulation früherer Intermediate oder ihrer Shunt-Produkte verursachen. Dies konnte durch die Akkumulation von Rabelomycin tatsächlich gezeigt werden und führte zu der Annahme, daß die Jadomycin B-Biosynthese über ein anguläres Polyketid-Intermediat verläuft.

Die Akkumulation von Rabelomycin in der Mutante BF-2-1 läßt vermuten, daß UrdM die Oxygenierung an Position C-12b katalysiert, während UrdE, entgegen der Vermutungen von

DECKER und HAAG (1995), für die Oxygenierung an Position C-12 verantwortlich sein muß. Außerdem weist die Produktion von Rabelomycin in ORF6-deletierten Mutanten daraufhin, daß sowohl Urdamycin A als auch Jadomycin B über gleiche, frühe Vorstufen synthetisiert werden müssen und Rabelomycin ein Intermediat beider Biosynthesewege darstellt (ROHR et al., 1993, KÜNZEL et al., 1999).

### 4.3.3 Inaktivierung von *urdGT2*

Glycosyltransferasen katalysieren den Transfer aktivierter Desoxyzucker an das jeweilige Aglycon. Betrachtet man Urdamycin A, das 4 Desoxyzucker enthält, stellt sich die Frage nach der Anzahl der an diesen Tailoring Reaktionen beteiligten Glycosyltransferasen. Von besonderem Interesse ist dabei die C-C-glycosidische Verknüpfung der Trisaccharidseitenkette an das Aglycon. Im Hinblick auf die Herstellung glycosidierter Naturstoffe durch Kombinatorische Biosynthese ist z.B. der Transfer verschiedenartiger Desoxyzuckerseitenketten an verschiedene Aglyca sinnvoll, ein Ansatz, der auch für Urdamycin A und Landomycin A geplant ist, deren Desoxyzuckerseitenketten C-C-glycosidisch bzw. C-O-glycosidisch mit dem Aglycon verknüpft sind.

Neben der Anzahl der beteiligten Glycosyltransferasen an der Biosynthese verschiedener Polyketidantibiotika stellt sich z.B. auch die Frage nach dem exakten Zeitpunkt des Glycosyltransfers während der Biosynthese eines glycosidierten Naturstoffes. Erfolgt der Transfer der Desoxyzucker nach vollständiger Synthese des Polyketid-Aglycons, wie es für das Anthracyclin Aclacinomycin A gezeigt werden konnte (TSUKAMOTO et al., 1992), oder erfolgt er wesentlich früher, bevor der Aglyconanteil vollkommen synthetisiert ist, wie es bei Adriamycin (GRIMM et al., 1994) zu beobachten ist? Eine weitere wichtige Frage ist in Hinblick auf Kombinatorische Biosynthese die Substratspezifität der beteiligten Glycosyltransferasen.

Ein Beispiel für die Produktion neuer glycosidierter Naturstoffe über gentechnologische Methoden wurde von DECKER und Mitarbeitern (1995) beschrieben. Sie brachten das Cosmid 16F4, das Gene für die Biosynthese des Elloramycins aus *S. olivaceus* Tü2353 enthält, in *S. fradiae* Tü2717 ein und erhielten unter anderem folgende neue Verbindung: 8- $\beta$ -D-Olivosyl-8-Desmethyltetracenomycin C, das aus 8-Demethyltetracenomycin C aus der Elloramycin-



Biosynthese und einem D-Olivoseanteil aus der Urdamycin-Biosynthese besteht. Die Verbindung stellt ein echtes Hybridmolekül dar, da die Olivose normalerweise nur für die Urdamycin-Biosynthese gebraucht wird. Ungeklärt war zu diesem Zeitpunkt allerdings noch die Herkunft der Glycosyltransferase, die die Verknüpfung der Olivose mit dem Aglycon katalysiert.

Über Sequenzanalyse des Cosmides pURD12 aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 konnte eine mögliche Glycosyltransferase UrdGT2 detektiert werden, die Homologien zu den Glycosyltransferasen Gra-ORF14 aus dem Granaticin-Produzenten *S. violaceoruber* Tü22 und zu LanGT2 aus *S. cyanogenus* S136 aufwies. Die Inaktivierung von *urdGT2*, die wie bei *urdM* über eine in-frame Deletion vorgenommen wurde, diente dabei mehreren Zwecken. Erstens sollte die vermutete Glycosyltransfer-Funktion von UrdGT2 nachgewiesen werden, was auch zu Informationen über die Abfolge des Aufbaus der Trisaccharidseitenkette und deren Verknüpfung führen sollte. Außerdem sollte durch Deletion von *urdGT2* eine Mutante generiert werden, in der die heterologe Expression verschiedener Glycosyltransferasen durchgeführt werden sollte.

Nach Herstellung des Inaktivierungskonstruktes, bei dem eine in-frame Deletion von 327bp eingeführt wurde, wurde das deletierte Gen durch homologe Rekombination gegen die Wildtypkopie ausgetauscht. Interessanterweise konnte bei der Selektion auf Einfach-Crossover ein außergewöhnliches Integrationsereignis beobachtet werden. Die deletierte Kopie wurde zweimal in das Chromosom integriert, dazwischen lag der Vektor pSP1. Das Wildtypallel war nicht mehr vorhanden. Nach Selektion auf Doppel-Crossover konnte die Mutante BF-1-1 hergestellt werden, die über Southern Hybridisierung und PCR überprüft wurde.

Um auszuschließen, daß durch die Inaktivierung die Gene stromabwärts von *urdGT2* beeinträchtigt wurden, mußte mit Mutante BF-1-1 eine Komplementation vorgenommen werden. Es konnte dabei deutlich gezeigt werden, daß die Urdamycin A-Produktion wiederaufgenommen wurde, also die der *urdGT2* folgenden Gene nicht beeinflußt wurden.

Isolierung und Charakterisierung der von BF-1-1 gebildeten Sekundärmetabolite über NMR- und Massenspektroskopie ergab die Akkumulation von drei neuen, tetracyclischen Angucyclinonen, Urdamycin I, J und K, die keine C-C-verknüpfte Zuckerseitenkette

aufweisen. Urdamycin I und J sind dabei die Hauptprodukte. Sowohl Urdamycin I als auch J besitzen die tertiären OH-Gruppen an den Positionen C-4a und 12b und überraschenderweise eine OH-Gruppe an Position 12a. Die im Urdamycin A vorkommende Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 ist ersetzt durch eine gesättigte C-C-Bindung.

An Position C-12b ist bei Urdamycin K eine Rhodiose gebunden. Es ähnelt der Substanz 100-2, einem Intermediat der Urdamycin-Biosynthese, das direkt auf Aquayamycin folgt und bei der Untersuchung von Blockmutanten des Stammes *S. fradiae* Tü2717 detektiert werden konnte (ROHR et al., 1993). Allerdings fehlt Urdamycin K die Olivose an Position C-9.

An das Aglycon von Urdamycin A müssen im Laufe der Urdamycin-Biosynthese 4 Desoxyzucker – eine Trisaccharidseitenkette, bestehend aus Olivose, Rhodiose und Olivose an Position C-9, und Rhodiose an Position C-12b - transferiert werden. Aquayamycin, das an Position C-9 eine Olivose enthält, stellt dabei ein zentrales Intermediat dar. Der Transfer der aktivierten D-Olivose auf Aquayamycin wurde deshalb als erster Glycosidierungsschritt in der Biosynthese von Urdamycin A angenommen (ROHR et al., 1993).

Dies konnte durch die hier erzielten Ergebnisse bestätigt werden. Die Produktion der Urdamycine I und J in Mutante BF-1-1 weist darauf hin, daß *urdGT2* für den Transfer der aktivierten D-Olivose an das Aglycon verantwortlich ist. Als Substrat für UrdGT2 wird dabei ein Intermediat vermutet, das in der Wildtyp-Urdamycin-Biosynthese über Urdamycinon F und Aquayamycin in Urdamycin A umgewandelt wird. In Mutante BF-1-1 werden aus diesem Intermediat, vermutlich über substratflexible Oxidoreduktasen, die Shunt-Produkte Urdamycin I und J gebildet.

Da sowohl Urdamycin I als auch Urdamycin J die OH-Gruppe an Position 12b schon besitzen, kann angenommen werden, daß diese schon vor dem ersten Glycosidierungsschritt eingebaut wird.

Glycosyltransferasen, die aus höheren Organismen beschrieben wurden und verantwortlich sind für Reaktionen im Primärmetabolismus, zeigen eine hohe Substratspezifität (PIEPERSBERG, 1994). Dahingegen weisen Glycosyltransferasen aus dem Sekundärmetabolismus eine geringere Substratspezifität auf, wodurch sie für Ansätze in der Kombinatorischen Biosynthese besser geeignet sind.

Ein Beispiel dafür ist eine Glycosyltransferase aus dem Elloramycin-Produzenten *S. olivaceus* Tü2353. Bei der oben beschriebenen Herstellung des Hybridmoleküls 8-β-D-Olivosyl-8-

Desmethyltetracenomycin C (DECKER et al., 1995) war die Herkunft der dabei beteiligten Glycosyltransferase noch nicht aufgeklärt. WOHLERT und Mitarbeiter (1998) führten das Cosmid 16F4 aus dem Elloramycin-Produzenten in *S. fradiae* Tü2717/ $\Delta$ PKS und *S. argillaceus* ATCC12956 ein und erhielten mehrere neue, glycosidierte Tetracenomycine. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde die Glycosyltransferase aus Cosmid 16F4 für den erfolgten Glycosyltransfer verantwortlich gemacht. Sie scheint, das Aglycon-Substrat betreffend, recht selektiv zu sein. In Bezug auf die Zuckersubstrate zeigt sie jedoch eine hohe Flexibilität, da sie sowohl D-Zucker als auch L-Zucker und sogar Disaccharide auf das Aglycon übertragen kann.

C-Glycosyltransferasen bevorzugen in der Regel Angucyclinone, die die angulären OH-Gruppen schon besitzen. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, daß die meisten Angucycline mit einer Zuckerkette an C-9 auch die OH-Gruppen an Position 4a und 12b tragen (KROHN & ROHR, 1997, ROHR & THIERICKE, 1992). Die Glycosyltransferase aus *S. fradiae* Tü2717 macht dabei eine Ausnahme und scheint eine geringere Substratspezifität aufzuweisen als entsprechende andere Enzyme. Der Stamm ist in der Lage, Substanzen zu produzieren, die eine an C-9 verknüpfte Olivose aufweisen, denen die angulären OH-Gruppen jedoch fehlen, wie z.B. die Synthese von Urdamycin B zeigt. Ein weiterer Hinweis ergab sich aus Fütterungsexperimenten mit *S. fradiae* Tü2717. Die Zufuhr von Methylnaphtazarin führte zur C-Glycosidierung der Substanz (Abb. 44), es entstand Olivosylnaphtalinon (KÜNZEL et al., 1999).

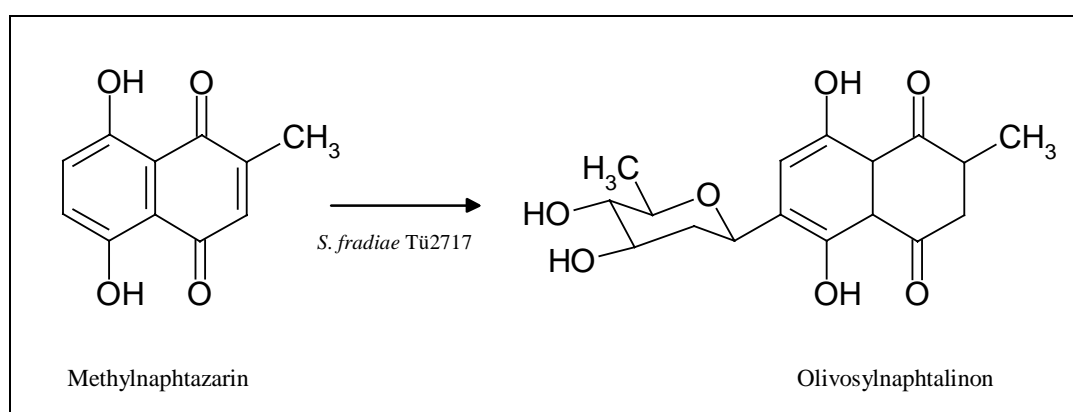


Abb. 44: Fütterungsexperimente von *S. fradiae* Tü2717 mit Methylnaphtazarin führten zur C-Glycosidierung der Substanz

Wie schon beschrieben, zeigte die Glycosyltransferase UrdGT2 große Ähnlichkeit zu einer Glycosyltransferase aus dem Granaticin-Produzenten *S. violaceoruber* Tü22, Gra-ORF14.

Granaticin B enthält 2 Desoxyzucker. Eine Olivose ist an den Positionen C-9 und C-10 über zwei C-C-Bindungen an das Aglycon gebunden, eine L-Rhodinose ist über eine glycosidische Bindung mit dem ersten Zucker verknüpft. Auch hier stellte sich die Frage nach den am Glycosyltransfer beteiligten Enzymen. Über Sequenzanalyse konnte nur eine Glycosyltransferase detektiert werden. Ihre Funktion wurde im Transfer der L-Rhodinose an den ersten Zucker angenommen (ICHINOSE et al., 1998). Geht man jedoch davon aus, daß sehr ähnliche Enzyme auch ähnliche Funktionen besitzen, könnte spekuliert werden, ob Gra-ORF14 nicht doch am Transfer des ersten Zuckers an das Aglycon oder bei beiden Transferreaktionen beteiligt ist .

Bei der Biosynthese von Naturstoffen mit mehreren Zuckeranteilen stellt sich die Frage nach der Abfolge der Glycosyltransferschritte. Werden zunächst die einzelnen Zucker miteinander verknüpft und dann auf das Aglycon transferiert, oder erfolgt die Biosynthese über einen sequentiellen Transfer der einzelnen Zucker? Für z.B. Mithramycin werden beide Möglichkeiten vermutet. Das Mithramycin-Aglycon ist sowohl mit einer Disaccharidkette (D-Olivose, D-Olivose) als auch einer Trisaccharidkette (D-Olivose, D-Oliose, D-Mycarose) glycosidiert. Für die Disaccharidkette wird angenommen, daß zunächst beide Olivosemoleküle verknüpft und diese dann auf das Aglycon übertragen werden (FERNANDEZ et al., 1998). Dahingegen wird die Trisaccharidkette vermutlich durch einen sequentiellen Transfer der einzelnen, aktivierten Zucker auf das Aglycon gebildet.

Für das 4 Desoxyzucker enthaltende Urdamycin A konnte der sequentielle Transfer der einzelnen Zucker gezeigt werden. Der C-Glycosyltransfer einer aktivierten D-Olivose auf das Aglycon konnte über die hier beschriebenen Versuche aufgeklärt werden. Für die verbleibenden drei Transferreaktionen wurde das Vorhandensein von drei weiteren Glycosyltransferasen vermutet. Dies konnte über Sequenzanalyse und Inaktivierungsexperimente bestätigt werden. Die Glycosyltransferasegene *urdGT1a*, *urdGT1b* und *urdGT1c* wurden über Sequenzanalyse detektiert, deren vermutete Funktion über Geninaktivierungs- und Expressionsexperimente nachgewiesen (TREFZER et al., 2000). Der Transfer der verschiedenen Zucker erfolgt Schritt für Schritt hintereinander. Nach der Synthese von Aquayamycin durch UrdGT2 wird an Position C-12b, katalysiert durch UrdGT1a, die L-Rhodinose auf Aquayamycin übertragen, es entsteht die Substanz 100-2. Im dritten Glycosyltransferschritt wird durch UrdGT1c eine Rhodinose an die C-glycosidisch gebundene Olivose angehängt. Es

entsteht Urdamycin G, an dessen Disaccharidkette, katalysiert durch UrdGT1b, der letzte Zucker, eine Olivose, gebunden wird, was zu Urdamycin A führt.

Die für UrdGT2 gezeigte hohe Homologie zu Glycosyltransferasen aus anderen Stämmen ergab einen ersten Hinweis auf die mögliche Funktion des Gens. Um diese Funktion genauer bestimmen zu können, wurde *urdGT2* über in-frame Deletion inaktiviert. Die erzielten Ergebnisse lassen vermuten, daß UrdGT2 verantwortlich ist für den ersten Glycosyltransferschritt in der Urdamycin-Biosynthese, d.h. dem Transfer der D-Olivose an das Aglycon. Mit Mutante BF-1-1 konnte außerdem eine sogenannte Toolbox für die Expression entsprechender Glycosyltransferasen aus anderen Stämmen generiert werden. Ein drittes, unerwartetes Ergebnis war die Produktion von drei neuen Substanzen, Urdamycin I, J und K über gezielte Deletion eines Gens.

#### **4.4 Heterologe Expression verschiedener Glycosyltransferasen in der *urdGT2*-Mutante BF-1-1**

Die heterologe Expression von Glycosyltransferasegenen aus den Stämmen *S. cyanogenus* S136 und *S. violaceoruber* Tü22 in Mutante BF-1-1, die eine in-frame Deletion der Glycosyltransferase *urdGT2* aufweist, führte nicht zu den erwarteten Ergebnissen.

Bei Expression von *gra-ORF14*, vorliegend auf dem Plasmid B32, konnte über HPLC im Vergleich zum Wildtyp und Mutante BF-1-1 ein zusätzlicher Peak detektiert werden, dessen UV-Spektrum dem Spektrum von Urdamycin B ähnelt. Urdamycin B weist die Trisaccharidseitenkette an Position C-9 auf, die Rhodinose an Position C-12b fehlt jedoch. Dies könnte einen weiteren Hinweis auf die unter Punkt 4.7 aufgestellte Hypothese darstellen, daß die mögliche Funktion von *Gra-ORF14* den Transfer der Olivose an das Granaticin-Aglycon beinhaltet.

Eine Verifizierung des erhaltenen Ergebnisses konnte jedoch nicht vorgenommen werden, da der zusätzliche Peak nach erneuter Anzucht der Mutanten BF-1-1 × pEM-B32 nicht mehr detektiert werden konnte. Das Problem der Instabilität der auf Agarplatten kultivierten Mutanten könnte durch Verwendung von Integrationsplasmiden umgangen werden.

Auch die Wiederholung dieses Versuchs durch erneute Transformation von BF-1-1 mit den Konstrukten pEM-B32 und pUWL-B32 führte nicht zur Reproduktion des erwarteten Ergebnisses.

Bei Expression der Glycosyltransferasen *lanGT1* und *lanGT2* sowie des Cosmides H2-26 in Mutante BF-1-1, konnten bei dünnschichtchromatographischer Überprüfung im Vergleich zu BF-1-1 und *S. fradiae* Tü2717 teilweise neue Spots detektiert werden. Diese traten jedoch auch für den in die Mutante eingebrachten leeren Vektor auf.

Möglicherweise stellen die von Mutante BF-1-1 produzierten Urdamycine I und J nicht das adäquate Substrat für die Glycosyltransferasen der genannten Stämme dar, so daß eine Glycosidierung nicht erfolgen kann.

Die Frage nach dem geeigneten Substrat wirft gleichzeitig auch die Frage nach einem möglichen Mechanismus auf, über den eine C-Glycosidierung erfolgen kann.

In diesem Zusammenhang sind die Versuche von Suzuki und Mitarbeitern von Interesse, die sich mit der totalen Synthese von Gilvocarcinen beschäftigten. Gilvocarcine sind Aryl-C-Glycoside und zeigen teilweise eine bemerkenswerte antitumorale Aktivität ohne die oft damit einhergehende starke Toxizität aufzuweisen. Die Arbeitsgruppe um Suzuki konnte die totale Synthese von (+)- Gilvocarcin M, einem Enantiomer des natürlich vorkommenden (-)- Gilvocarcin M etablieren (MATSUMOTO et al., 1992), und später die totale Synthese von Gilvocarcin M und V in ihrer natürlichen stereochemischen Form. Ausgehend von zwei Startersubstraten, D-Fucofuranosylacetat und einem Iodiresorcinol Derivat muß im Zuge der Synthese zunächst eine C-glycosidische Verknüpfung beider Substrate erfolgen. Es konnte gezeigt werden, daß bei  $-78^{\circ}\text{C}$  zuerst eine freie, phenolische Hydroxylgruppe glycosidiert wird, ein Temperaturshift auf  $-20^{\circ}\text{C}$  resultiert in einer O $\rightarrow$ C-Glycosid-Umlagerung, es entsteht das  $\alpha$ -Aryl-C-Glycosid. Abb. 45 zeigt eine vereinfachte Darstellung dieser Reaktion.

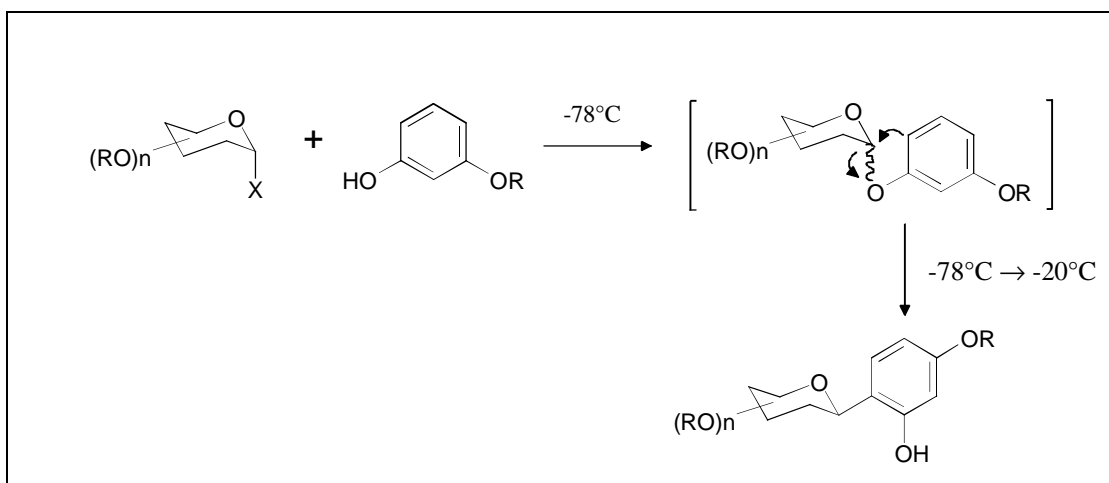


Abb. 45: Suzuki's O → C-Glycosid Umlagerungsstrategie (vereinfachte Darstellung)

Ein O→C-Umlagerungsmechanismus wird auch für die C-Glycosidierung der Urdamycine in Erwägung gezogen. Die erforderliche phenolische OH-Gruppen an Position C-9 ist hier vorhanden, betrachtet man z.B. die Urdamycine A, I und J.

Viele von Bakterien produzierten Antibiotika wie Makrolide – Chlorothricin – Polyether-Antibiotika oder  $\beta$ -Lactam-Antibiotika enthalten chlorinierte Phenylringe (VAN PÉE, 1996). Auch bei diesen Halogenierungsreaktionen scheinen teilweise phenolische OH-Gruppen eine Rolle zu spielen, so z.B. bei der Biosynthese des von *S. aureofaciens* produzierten 7-Chlortetracyclins. MCCORMICK und JENSEN (1965) konnten aus einer im Chlorinierungsschritt blockierten Mutante 4-Hydroxy-6-Methylpretetramid isolieren. Über Kreuzfütterungsexperimente konnte gezeigt werden, daß die phenolische OH-Gruppe an Position C-4 entscheidend ist für die Einführung des Chlors an Position C-7. Das Substrat für das die Chlorinierung katalysierende Enzym ist 4-Ketoanhydrotetracyclin (MCCORMICK et al., 1965). Nach Transaminierung zu 4-Aminoanhydrotetracyclin konnte die Chlorinierung an Position C-7 nicht mehr erfolgen (MCCORMICK, 1967).

Ein Teil der hier beschriebenen Expressionsversuche wurde mit Glycosyltransferasegenen aus dem Landomycin-Produzenten *S. cyanogenus* S136 durchgeführt. Betrachtet man die Struktur von z.B. Landomycin A, fällt die phenolische OH-Gruppe an Position C-11 auf. Möglicherweise ist diese OH-Gruppe Voraussetzung für die O-glycosidische Verknüpfung der D-Olivose mit dem Aglycon. Da die Urdamycine I und J an dieser Position keine OH-Gruppe besitzen, stellen sie möglicherweise für die Glycosyltransferasen aus *S. cyanogenus* S136 nicht das richtige Substrat dar.

Als ein möglicher Ansatz bzw. eine weiterführende „Expressions-Strategie“, um über Kombinatorische Biosynthese neue Substanzen zu erhalten, könnte die Einführung von *urdGT2* in entsprechende Streptomycetenstämme überlegt werden, die Sekundärmetabolite mit phenolischen OH-Gruppe produzieren.



## 5. Zusammenfassung

Faßt man die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Charakterisierung von Genen, die an der Desoxyzuckerbiosynthese und an Tailoring Reaktionen von Angucyclin-Antibiotika beteiligt sind und zur Herstellung neuer, glycosiderter Naturstoffe über Kombinatorische Biosynthese zusammen, können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- Über Sequenzanalyse eines 8 kb großen Bereichs aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster konnten 7 Gene, *urdL*, *urdM*, *urdJ2*, *urdZ1*, *urdGT2*, *urdG* und *urdH* detektiert werden. Homologien dieser Gene zu bekannten Sequenzen, die über Datenbankvergleiche erhalten wurden, ergaben einen ersten Hinweis auf deren mögliche Funktion.
- 3 Gene des Urdamycin-Biosynthesegenclusters, *urdZ1*, *urdM* und *urdGT2*, wurden für Inaktivierungsexperimente eingesetzt. Über die Strukturen der von den Mutanten gebildeten Substanzen konnte auf die Funktion der Gene geschlossen werden.

*urdZ1*: Das Gen *urdZ1* wurde über frame-shift Mutation inaktiviert. Die entstandene Mutante BF-3-1 akkumuliert Urdamycinon B. Dies läßt vermuten, daß UrdZ1 die Funktion einer dNDP-Hexose-3,5-Epimerase ausübt und an der Biosynthese des 2,3,6-Tridesoxyzuckers L-Rhodinose beteiligt ist.

*urdM*: die durch in-frame Deletion hergestellte Mutante BF-2-1 akkumulierte die Substanz Rabelomycin. Daraus folgert, daß UrdM die Funktion einer Oxygenase besitzt, die die Oxygenierung an Position C-12b im Zuge der Urdamycin-Biosynthese katalysiert.

*urdGT2*: *urdGT2* wurde ebenfalls über in-frame Deletion inaktiviert. Dadurch wurde eine Mutante hergestellt, die 3 neue Urdamycine akkumuliert, die Urdamycine I, J und K. Aufgrund dieses Ergebnisses kann angenommen werden, daß UrdGT2 für den C-Glycosyltransfer der aktivierten D-Olivoose an das Aglycon verantwortlich ist.

- Nach heterologer Expression ganzer Gencluster oder einzelner Gene in verschiedenen Wirtstämmen bzw. Expression verschiedener Glycosyltransferasegene in der in dieser

Arbeit hergestellten Mutante BF-1-1 konnte die Bildung neuer Naturstoffe beobachtet werden.

Da diese neugebildeten Sekundärmetabolite nur in sehr geringen Mengen produziert wurden, bzw. die Versuche nicht reproduziert werden konnten, war eine chemische Charakterisierung jedoch nicht möglich.

## 6. Literatur

ALTENBUCHNER, J., Cullum, J. (1984). DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. Mol. Gen. Genet. 195 (1-2): 134 – 138

ALTING-MEES, M.A., Short, J.M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. Nuc. Acids Res. 17: 9494

ALTSCHUL, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403 - 410

BECHTHOLD, A., Salas, J.A. (1999). Combinatorial biosynthesis of microbial metabolites in combinatorial organic chemistry. Editor E. Jung. Wiley VCH, Weinheim. 381 – 407

BECHTHOLD, A., Sohng, J.K., Smith, T.M., Chu, X., Floss, H.G. (1995). Identification of *Streptomyces violaceoruber* Tü22 genes involved in the biosynthesis of granaticin. Mol. Gen. Genet. 248: 610 - 620

BIERMAN, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagajara Rao, R., Schoner, B.E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Echerichia coli* to *streptomyces spp.* Gene. 116: 43 - 49

BIRCH, A. W., Cullum, J. (1985). Temperature-sensitive mutants of the *Streptomyces* plasmid pIJ702. J. Gen. Microbiol. 131: 1299 - 1303

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

CHAULET, P., Raviglione, M., Bustreo, F. (1996). Epidemiology, control and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Drugs. 52: 103 - 108

CHRIST, W.(1999). Antibiotika – Entwicklungen und Trends. Ausgewählte Aspekte der Resistenz. MMP. 3: 72 - 80

CONE, M.C., Seaton, P.J., Halley, K.A., Gould, S.J. (1989).New products related to kinamycin from *Streptomyces murayamaensis*: 1. Taxonomy, production and biological properties. J. Antibiot. 42: 179 - 188

DANN, M., Lefemine, D. V., Barbatschi, F., Shu, P., Kunstmann, M. P., Mitscher L. A., Bohonos, N. (1965). Tetrangomycin, a new quinone antibiotic. Antimicrob. Agents Chemother. 5:832 - 835

DAVIDSON, P.T., Le, H.Q. (1992). Drug treatment of tuberculosis. Drugs. 43: 651 – 673

DECKER, H., Gaisser, S., Pelzer, S., Schneider, P., et al. (1996). A general approach for cloning and characterizing dNDP-glucose dehydratase genes from actinomycetes. FEMS Microbiol. Lett. 141: 195 - 201

- DECKER, H., Haag, S. (1995). Cloning and Characterization of a Polyketide Synthase Gene from *Streptomyces fradiae* Tü2717, Which Carries the Genes for Biosynthesis of the Angucycline antibiotic Urdamycin A and a Gene Probably Involved in Its Oxygenation. *J. Bact.* 21: 6126 - 6136
- DECKER, H., Haag, S., Udvarnoki, G., Rohr, J. (1995). Neue, gentechnisch hergestellte Tetracenomycine. *Angew. Chem.* 107 (10): 1214 - 1217
- DECKER, H., Motamedi, H., Hutchinson, C.R. (1993). Nucleotide sequence and heterologous expression of tcmG and tcmP, biosynthetic genes for tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens*. *J. Bacteriol.* 175: 3876 - 3886
- DE JESUS, A.E., Hull, W.E., Steyn, P.S., van Heerden, F.R., Vlegaar, R. (1982). Biosynthesis of Viridicatumtoxin, a Mycotoxin from *Penicillium expansum*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 902 - 904
- DEMAIN, A.L. (1983). New applications of microbial products. *Science.* 219: 709 - 714
- DRAUTZ, H., Reuschenbach, P., Zähler, H., Rohr, J., Zeeck, A. (1985). Metabolic products of microorganisms. 225. Elloramycin, a new anthracycline-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus*. Isolation, characterization, structure and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo).* 38: 1291 - 1301
- DRAUTZ, H., Zähler, H., Rohr, J., Zeeck, A. (1986). Metabolic Products Of Microorganisms. Urdamycins, New Angucycline Antibiotics From *Streptomyces Fradiae*. I. Isolation, Characterization and biological properties. *J. Antibiot.* 39: 1657 - 1669
- FEITELSON, J.S., Hopwood, D.A. (1983). Cloning of a *streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 190 (3): 394 - 398
- FERNANDEZ, E., Weißbach, U., Reillo, C.S., Brana, A.F., Mendez, 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
- GRÄFE, U. (1992): *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, New York, Berlin.
- GRIMM, A., Madduri, K., Ali, A., Hutchinson, C.R. (1994). Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene.* 151: 1 - 10
- HAN, L., Yang, K., Ramalingam, E., Mosher, R.H., Vining, L.C. (1994). Cloning and characterization of polyketide synthase genes for jadomycin B biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *Microbiology.* 140: 3379 - 3389
- HENKEL, T., Ciesiolka, T., Rohr, J., Zeeck, A. (1989). Urdamycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*. V. Derivatives of Urdamycin A. *J. Antibiot. (Tokyo).* 42: 299 - 311

HENKEL, T., Rohr, J., Beale, J.M., Schwenen, L. (1990). Landomycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces* sp. I. Structural studies on Landomycins A-D. J. Antibiot. (Tokyo). 43: 492 - 503

HILLEMANN, D., Pühler, A., Wohlleben, W. (1991). Gene disruption and gene replacement in *Streptomyces* via single stranded DNA transformation of integration vectors. Nucleic Acid Research. 19: 727 - 731

HONG, S-T., Carney, J.R., Gould, S.J. (1997). Cloning and Heterologous Expression of the Entire Gene Clusters for PD116740 from *Streptomyces* Strain WP4669 and Tetrangulol and Tetrangomycin from *Streptomyces rimosus* NRRL3016. J. Bacteriol. 179: 470 - 476

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.

HOPWOOD, D. A., Malpartida, F., Kieser, H. M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B. A. M., Floss, H. G., Omura, S. (1985). Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. Nature. 314: 642 - 644

ICHINOSE, K., Bedford, D. J., Tornus, D., Bechthold, A., Bibb, M., Reville, P., Floss, H.G., Hopwood, D.A. (1998): The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22: sequence analysis and expression in a heterologous host. Chem. Biol. 5: 647 - 659

IMAMURA, N., Kakinuma, K., Ikekawa, N., Tanaka, H., Omura, S. (1982). Biosynthesis of vineomycins A1 and B2. J. Antibiot. 35: 602 - 608

KAHAN, J.S., Kahan, F.M., Goegelman, R., Currie, S.A., Jackson, M., Stapley, E.O., Miller, T.W., Miller, A.K., Hendlin, D., Mochales, S., Hernandez, S., Woodruff, H.D., Birnbaum, J. (1979). Thienamycin, a new  $\beta$ -lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. J. Antibiot. 32: 1 - 12

KATZ, L., Hutchinson, R. (1992). Genetic Engineering of antibiotic producing organisms. Annual reports in medicinal chemistry. 27: 129 - 138

KIRSCHNING, A., Bechthold, A., Rohr, J. (1997). Chemical and Biochemical Aspects of Deoxysugars and Deoxysugar Oligosaccharides. Topics in Curr. Chemistry. 188: 1 - 84

KROHN, K., Rohr, J. (1997). Angucyclines: Total Syntheses, New Structures, and Biosynthetic Studies of an Emerging New Class of Antibiotics. Topics in Curr. Chem. 188: 127 - 195

KUNSTMANN, M. P., Mitscher, L. A. (1966). The structural characterization of tetrangomycin and tetrangulol. J. Org. Chem. 31: 2920 - 2925

KÜNZEL, E., Faust, B., Oelkers, C., Weißbach, U., Bearden, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Bechthold, A., Rohr, J. (2000). The inactivation of the *urdGT2* gene, which encodes a glycosyltransferase responsible for the C-glycosyltransfer of activated D-olivose, leads to the formation of the three novel urdamycins I, J and K. J. Am. Chem. Soc. Im Druck.

- LECLERCQ, R., Derlot, E., Duval, J., Courvalin, P. (1988). Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *Engl. J. Med.* 319: 157 - 161
- LIU, W-C., Parker, W.L., Slusarchyk, D.S., Greenwood, D.L., Graham, S.F., Meyers, E. (1970). Isolation, characterization and structure of rabelomycin, a new antibiotic. *J. Antibiot.* 23: 437 - 441
- MATSUMOTO, T., Hosoya, T., Suzuki, K. (1992). Total Synthesis and Absolute Stereochemical Assignment of Gilvocarcin M. *Am. Chem. Soc.* 114: 3568 - 3569
- MAZODIER, P., Petter, R., Thompson, C. (1989). Intergeneric Conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* Species. *J. Bacteriol.* 171: 3583 - 3585
- MCCORMICK, J.R.D. (1967). Tetracyclines. In *Antibiotics*, ed. D. Gottlieb, P.D. Shaw, 2: 113-122. Berlin / Heidelberg / New York: Springer
- MCCORMICK, J.R.D., Hirsch, U., Jensen, E.R., Johnson, S., Sjolander, N.O. (1965). Biosynthesis of the tetracyclines. VII. 4-Hydroxy-6-methylpretetramid, an intermediate accumulated by a blocked mutant. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 1793 - 1794
- MCCORMICK, J.R.D., Jensen, E.R. (1965). Biosynthesis of the tetracyclines. VIII. Characterization of 4-Hydroxy-6-methylpretetramid. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 1794 - 1795
- MCDANIEL R., Ebert-Koshla, S., Hopwood, D. A., Koshla, C. (1993). Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science.* 262: 1546 – 1550
- MCDANIEL R., Ebert-Koshla, S., Hopwood, D. A., Koshla, C. (1995). Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature.* 375: 549 – 554
- MCNEIL, D.J., Gevaine, K.M., Ruby, C.L., Deceny, G., Gibbons, P.H., McNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis using a novel integration vector. *Gene.* 111: 61 - 68
- MUTH, G., Nußbaumer, B., Wohlleben, W., Pühler, A. (1989). A vector system with temperatur-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. *Mol. Gen. Genet.* 219: 341
- OH, S-H., Chater, K. F. (1997). Denaturation of Circular or Linera DNA Facilitates Targeted Integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): Possible Relevance to Other Organisms. *J. Bacteriol.* 179: 122 - 127
- OMURA, S., Nakagawa, A., Fukamachi, N., Miura, S., Takahashi, Y., Komiyama, K., Kobayashi, B. (1988). OM-4842, a new platelet aggregation inhibitor from *Streptomyces*. *J. Antibiot. Tokyo.* 41(6): 812 - 13
- 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. Biotech.* 56: 115 - 128

PIEPERSBERG, W. (1994). Pathway Engineering in Secondary Metabolite-Producing Actinomycetes. *Critical Reviews in Biotechnology*. 14 (3): 251 - 285

PIGAC, J., Schrempf, H. (1995). A Simple and Rapid Method of Transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other Streptomyces by Electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 352 - 356

PISSOWOTZKI, K., Mansouri, K., Piepersberg, W. (1991): Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes strELMB2N. *Mol. Gen. Genet.* 231: 113 - 123

QUIROS, L.M., Aguirrezabalaga, I., Olano, C., Mendez, C., Salas, J.A. (1998). Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* 28 (6): 1177 - 1185

RALEIGH, E.A., Benner, J., Bloom, F., Braymer, H.D., De Cruz, E., Dharamalingam, K., Heitman, J., Noyer-Weidner, M., Piekarowicz, A., Kretz, P.L. (1991). Nomenclature relating to restriction of modified DNA in *Echerichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 2707 - 2709

REID, K.A., Hamilton, J.T., Bowden, R.D., O'Hagan, D., Dasaradhi, L., Amin, M.R., Harper, D.B. (1995). Biosynthesis of fluorinated secondary metabolites by *Streptomyces cattleya*. *Microbiology.* 141: 1385 – 1393

ROHR, J. (1984). Dissertation. Georg-August-Universität, Göttingen

ROHR, J. (1989). Urdamycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*. VI. Structure elucidation and biosynthetic investigations on Urdamycin H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 42: 1482 – 1488

ROHR, J.(1995). Kombinatorische Biosynthese – eine Zukunftsstrategie. *Angew. Chemie.* 107: 963 – 966

ROHR, J., Schönewolf, M., Udvarnoki, G., Eckardt, K., Schumann, G., Wagner, C., Beale, J.M., Sorey, S.D. (1993): Investigations on the Biosynthesis of the Angucycline Group Antibiotics Aquayamycin and the Urdamycins A and B. Results from the Structural Analysis of Novel Blocked Mutant Products. *J. Org. Chem.* 58: 2547 – 2551

ROHR, J., Thiericke, R. (1992). Angucycline Group Antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 9 (2): 103 – 137

ROHR, J., Wohler, S-E., Oelkers, C., Kirschning, A., Ries, M. (1997). Biosynthetic short activation of the 2,3,6-trideoxysugar L-rhodinose. *Chem. Commun.* 10: 973 - 974

ROHR, J., Zeeck, A. (1989). Biogenetic – Chemical Classification of Secondary Metabolites Produced by Fermentation. In: RK Finn, P. Präve (eds) *Biotechnology Focus 2*. Hanser Publishers, Munich, Vienna, New York, p251

ROHR, J., Zeeck, A., Floss, H.G. (1988). Urdamycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*. III. The structures of Urdamycins C and D. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 126 – 129

- RUDD, B. A. M., Hopwood, D. A. (1979). Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 114: 35 - 43
- SAMBROCK, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning – a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press
- SANADA, M., Miyano, T., Iwadare, S., Williamson, J.M., Arison, B.H., Smith, J.L., Douglas, A.W., Liesch, J.M., Inamine, E. (1985). Biosynthesis of fluorothreonine and fluoroacetic acid by the thienamycin producer, *Streptomyces cattleya*. J. Antibiot. 39: 259 - 265
- SANGER, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74: 5463 - 5467
- SASAKI, T., Gomi, S., Sezaki, M., Takeuchi, Y., Kodama, Y., Kawamura, K. (1988). New antibiotics SF2315A and B produced by an *Excelspora* sp. II. The structural elucidation. J. Antibiot. 41: 843 - 848
- SCHNEIDER, P. (1995). Klonierung einer dTDP-Glucose Synthetase und einer dTDP-Glucose Dehydratase aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 sowie Untersuchungen zur Herstellung hybrider Naturstoffe. (Diplomarbeit). Universität Tübingen.
- SHEN, B., Summers, R.G., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C.R. (1995): The *Streptomyces glaucescens* tcmKL polyketide synthase and tcmN polyketide cyclase genes govern the size and shape of aromatic polyketides. J. Am. Chem. Soc. 117: 6811-6821
- SHORT, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988).  $\lambda$  ZAP: a bacteriophage  $\lambda$  expression vector with in vivo excision properties. Nuc. Acids Res. 16: 7583 - 7600
- SOLENBERG, P. J., Matsushima, P., Stack, D.R., Wilkie, S.C., Thompson, R.C., Baltz, R.H. (1997). Production of hybrid glycopeptide antibiotics in vitro and in *Streptomyces toyocaensis*. Chem. Biol. 4: 195 – 202
- SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503 - 517
- SPERA, R.V. jr, Faber, B. (1994). Multidrug resistant *Enterococcus faecium*. An untreatable nosocomial pathogen. Drugs. 48: 687 - 688
- STONE, R. (1994). Search for sepsis drugs goes on despite past failures. Science. 264: 365 - 367
- SUMMERS, R.G., Wendt-Pienkowski, E., Motamedi, H., Hutchinson, C.R. (1992). Nucleotide sequence of the tcmII-tcmIV region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* and evidence that the tcmN gene encodes a multifunctional cyclase – dehydratase- O- methyltransferase. J. Bacteriol. 174: 1810 - 1820
- THOMPSON, C.J., Ward, J.M., Hopwood, D.A. (1982). Cloning in antibiotic resistance genes in *Streptomyces*. J. Bacteriol. 151: 668 - 677



TREFZER, A., Hoffmeister, D., Künzel, E., Stockert, S., Weitnauer, G., Westrich, L., Rix, U., Fuchser, J., Bindseil, K.U., Rohr, J., Bechthold, A. (2000). Function of glycosyl transferase genes involved in the biosynthesis of urdamycin A. *Chem. Biol.* Im Druck.

TSUKAMOTO, N., Fujii, I., Ebizuka, Y., Sankawa, U. (1992). Cloning of aklavinone biosynthesis genes from *Streptomyces galilaeus*. *J. Antibiot.* 45: 1286 - 1294

UDVARNOKI, G., Henkel, T., Machinek, R., Rohr, J. (1992). Biosynthetic Origin of the Oxygen Atoms of Aquayamycin: Aspects for the Biosynthesis of the Urdamycin Family and for Aquayamycin-Containing Angucycline Antibiotics in General. *J. Org. Chem.* 57: 1274 - 1276

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

VARA, J., Lewandowska-Skarbek, M., Wang, Y-G., Donadio, S., Hutchinson, C.R. (1989). Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J. Bact.* 171: 5872 - 5881

WANG, A.H.-J. (1992): Intercalative drug binding to DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 361 - 368

WESTRICH, L., Domann, S., Faust, B., Bedford, D., Hopwood, D.A., Bechthold, A. (1999). Cloning and characterization of a gene from *Streptomyces cyanogenus* S136 probably involved in landomycin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 381 - 387

WESTRICH, L., Gaisser, S., Reichenstein B., Bechthold, A. (1997). Preparation and screening of cosmid libraries from a streptomyces strains using the rapid DNA ligation kit from Boehringer Mannheim. *Biochemica.* 101: 30 - 32

WEYMOUTH-WILSON, A.C. (1997). The role of carbohydrates in biologically active natural products. *Nat. Prod. Rep.* 14 (2): 99 - 110

WOHLERT, S-E., Blanco, G., Lombo, F., Fernandez, E., Brana, A.F., Reich, S., Udvarnoki, G., Mendez, C., Decker, H., Frevert, J., Salas, J.A., Rohr, J. (1998). Novel Hybrid Tetracenomycins through Combinatorial Biosynthesis Using a Glycosyltransferase Encoded by the *elm* Genes in Cosmid 16F4 and Which Shows a Broad Sugar Substrate Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 10596 - 10601

WOHLLEBEN, W., Muth, G. (1993). *Streptomyces* plasmid vectors. In: Hardy, K.G. (Ed). *Plasmids – a practical approach*, second edition, 147 - 175

YANG, K., Han, L., Ayer, S.W., Vining, L.C. (1996). Accumulation of the angucycline antibiotic rabelomycin after disruption of an oxygenase gene in the jadomycin B biosynthetic gene cluster of *Streptomyces venezuelae*. *Microbiology.* 142: 123 - 132

YANNISH-PERRON, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33: 103 - 119

YOUNG, P. (1996): White house to expand response to infectious diseases. ASM (American Society for Microbiology) News. 62: 450 - 451

## 7. Anhang

### 7.1 Sequenz

Sequenz des 8 kb großen DNA-Fragmentes aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster mit den Genen *urdL*, *urdM*, *urdJ2*, *urdZ1*, *urdGT2*, *urdG* und *urdH*. Dargestellt ist die Nucleotid- und die entsprechende Aminosäuresequenz. Startcodons sind fettgedruckt, Stopcodons mit \* gekennzeichnet, mögliche Ribosomenbindestellen (RBS) sind unterstrichen.

#### *urdL*

		9		18		27		36		45		54					
<b>ATG</b>	ACG	ACC	CGG	TCA	GTC	GAG	CAC	GAG	ATC	ACC	GTC	GAG	GCC	CCG	GCC	GCC	GCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M	T	T	R	S	V	E	H	E	I	T	V	E	A	P	A	A	A
		63		72		81		90		99		108					
GTC	TAC	CGG	CTC	ATC	GCC	GAG	GTG	GAG	AAC	TGG	CCG	CGG	ATT	TTC	CCG	CCC	ACC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	Y	R	L	I	A	E	V	E	N	W	P	R	I	F	P	P	T
		117		126		135		144		153		162					
ATC	TAC	GTC	GAA	CAC	CTG	GAG	CGC	GGT	GAA	GGC	GAA	GAA	CGG	ATA	CGG	ATC	TGG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	Y	V	E	H	L	E	R	G	E	G	E	E	R	I	R	I	W
		171		180		189		198		207		216					
GCC	ACC	GCA	AAC	GGC	AAG	GCA	AAG	AAC	TGG	ACC	TCC	CGC	CGC	ACC	CTC	GAC	GCG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	T	A	N	G	K	A	K	N	W	T	S	R	R	T	L	D	A
		225		234		243		252		261		270					
GAC	AAC	CTG	CGG	ATC	ACC	TTC	CGG	CAG	GAG	GTC	TCC	ACC	CCG	CCC	GTC	GCC	GCG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	N	L	R	I	T	F	R	Q	E	V	S	T	P	P	V	A	A
		279		288		297		306		315		324					
ATG	GGC	GGC	ACC	TGG	ATC	ATC	GAA	CCG	CTG	TCC	GGC	GAC	TCC	CGG	ATC	AGG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
M	G	G	T	W	I	I	E	P	L	S	G	D	S	S	R	I	R
		333		342		351		360		369		378					
CTG	CTG	CAC	GAC	TAC	CGG	GCG	GTC	GAC	GAC	GAC	CCC	CAG	GGC	CTG	AAG	TGG	ATC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	L	H	D	Y	R	A	V	D	D	D	P	Q	G	L	K	W	I
		387		396		405		414		423		432					
GAC	GAG	GCC	GTC	GAC	CGC	AAC	TCG	CGC	TCG	GAG	CTG	GCC	GCG	CTG	AAG	ACC	AAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	E	A	V	D	R	N	S	R	S	E	L	A	A	L	K	T	N
		441		450		459		468		477		486					
GTC	GAA	CTC	GCC	CAC	GCC	TCC	GAG	GAG	ATC	ACC	TTC	TCC	TTC	GAG	GAC	ACC	GTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	E	L	A	H	A	S	E	E	I	T	F	S	F	E	D	T	V

```

          495          504          513          522          531          540
TGG ATC GAC GGC TCC GCC AAG GAC GCG TAC GAC TTC GTC AAC GAG GCC GGG CTG
-----
W   I   D   G   S   A   K   D   A   Y   D   F   V   N   E   A   G   L

          549          558          567          576          585          594
TGG GTG GAG CGG CTG TCA CAC GTG GCC TCC GTG CGC TTC AGC GAG GAC ACC CCG
-----
W   V   E   R   L   S   H   V   A   S   V   R   F   S   E   D   T   P

          603          612          621          630          639          648
GGC CTG CAG TCG CTG GAG ATG GAC ACC CTC GCC AAG GAC GGC TCG ACG CAC ACC
-----
G   L   Q   S   L   E   M   D   T   L   A   K   D   G   S   T   H   T

          657          666          675          684          693          702
ACG AAG TCG TAC CGG GTG ACG TTC CCG CAC CAC AGG ATC GCC TAC AAG CAG GTC
-----
T   K   S   Y   R   V   T   F   P   H   H   R   I   A   Y   K   Q   V

          711          720          729          738          747          756
ACC CTG CCC GCG CTG ATG ACC CTG CAC ACC GGC TAC TGG ACC TTC ACC GAG AAC
-----
T   L   P   A   L   M   T   L   H   T   G   Y   W   T   F   T   E   N

          765          774          783          792          801          810
GAG TCG GGC ACC GCC GCC TCC TCG CAG CAC ACC GTG GTC CTC AAC ACG GAG AAC
-----
E   S   G   T   A   A   S   S   Q   H   T   V   V   L   N   T   E   N

          819          828          837          846          855          864
ATC GCC GGG ATC CTG GGC CCG GAG GCC ACC GTT GCG GAC GCC CGG GAG TTC ATC
-----
I   A   G   I   L   G   P   E   A   T   V   A   D   A   R   E   F   I

          873          882          891          900          909          918
CGC GGC GCG CTC AGC ACC AAC AGT CGT GCC ACC CTG GGC CAC GCC AAG GAC TAC
-----
R   G   A   L   S   T   N   S   R   A   T   L   G   H   A   K   D   Y

          927          936
GCC GAG AAC AAG CGC TGA
-----
A   E   N   K   R   *

                                945          954          963          972
                                urdm CGA TGG TCG CGC CCT CTC TGG ACG TGG ACG TGA TCG
                                -----
                                    M   V   A   P   S   L   D   V   D   V   I   V

          981          990          999          1008          1017          1026
TCG TCG GCG CCG GGC CGG TCG GGC TGA TGC TCG CAG GGG AAC TGC TGC GCA CCG
-----
V   G   A   G   P   V   G   L   M   L   A   G   E   L   L   R   T   G

          1035          1044          1053          1062          1071          1080
GCG GAG TAC GGG TGA CCG TAC TGG AGC GGC TCG CAG AAC CCA CCA CCG AGT CGC
-----
G   V   R   V   T   V   L   E   R   L   A   E   P   T   T   E   S   R

```

1089            1098            1107            1116            1125            1134  
 GGG CGT CCA TGA CCA TGC TTA CGC CCA GCT ACG AAA TGG AAC TGC TGC ACG AGC  
 -----  
   A    S    M    T    M    L    T    P    S    Y    E    M    E    L    L    H    E    R  
 1143            1152            1161            1170            1179            1188  
 GGG GCC TGG TGG AAC GGC TCG GGC CGC CCC CCG ACG CGG GCC CCG GCC ACT TCG  
 -----  
   G    L    V    E    R    L    G    P    P    P    D    A    G    P    G    H    F    G  
  
 1197            1206            1215            1224            1233            1242  
 GCG GCA TCC CAC TCG ATC TGA CCG AGG CCG GCG AGA GCC GGT ACG CCG GCC AGT  
 -----  
   G    I    P    L    D    L    T    E    A    G    E    S    R    Y    A    G    Q    W  
  
 1251            1260            1269            1278            1287            1296  
 GGA AGG CGC CGC AGA TCC GCG TCG AAG CCG TAC TGT CCA CCT GGG CCA CGG AAC  
 -----  
   K    A    P    Q    I    R    V    E    A    V    L    S    T    W    A    T    E    L  
  
 1305            1314            1323            1332            1341            1350  
 TCG GTG CCG AGG TTC GGC GGG GCC ACA CCG TGA TCG GCC TCG TCG AGG CGC CGG  
 -----  
   G    A    E    V    R    R    G    H    T    V    I    G    L    V    E    A    P    D  
  
 1359            1368            1377            1386            1395            1404  
 ACG GCG TGT CCG TCG TGG CCA CCG CGC CGA GTG GCG AAC GGC TAC GAC TGA GCG  
 -----  
   G    V    S    V    V    A    T    A    P    S    G    E    R    L    R    L    S    A  
  
 1413            1422            1431            1440            1449            1458  
 CCG CGT ACA TCG TCG GAT GCG ACG GCG AGG ACA GCG CCG TGC GGC GGC TGG CGG  
 -----  
   A    Y    I    V    G    C    D    G    E    D    S    A    V    R    R    L    A    G  
  
 1467            1476            1485            1494            1503            1512  
 GCT TCG CGT TCC CCG GGG CCG ACC CCA CCA AAG AGC TGC TGC GTG CCG ACC TGG  
 -----  
   F    A    F    P    G    A    D    P    T    K    E    L    L    R    A    D    L    A  
  
 1521            1530            1539            1548            1557            1566  
 CGG GAA TCG AAC TGC GGG AGC GGC GTT TCG AGC GGC ACC CGA ACG GGG TGG CCA  
 -----  
   G    I    E    L    R    E    R    R    F    E    R    H    P    N    G    V    A    N  
  
 1575            1584            1593            1602            1611            1620  
 ACG CCC GGC GTG GAC CGG ACG GCA TCA CCC GGA TCA TGG TGC ACG AGT TCG CCC  
 -----  
   A    R    R    G    P    D    G    I    T    R    I    M    V    H    E    F    A    R  
  
 1629            1638            1647            1656            1665            1674  
 GTG TCC CCG GTG CAT CAC GCG CCC CCG CCT TCG CGG AAG TCC GCG CCG CCT GGG  
 -----  
   V    P    G    A    S    R    A    P    A    F    A    E    V    R    A    A    W    A  
  
 1683            1692            1701            1710            1719            1728  
 CCC GGG TCA CCG GCG AGG ACA TCA GCG GTG CGG AAC CGG TCT GGG TCA ACG CCT  
 -----  
   R    V    T    G    E    D    I    S    G    A    E    P    V    W    V    N    A    F  
  
 1737            1746            1755            1764            1773            1782  
 TTC ACA ACG CCC GTC GGC AAG CGG CCC GTT ACC GCA AGG GCC GGG TCC TTC TCG  
 -----  
   H    N    A    R    R    Q    A    A    R    Y    R    K    G    R    V    L    L    A

1791            1800            1809            1818            1827            1836  
 CCG GTG ACG CCG CGC ATG TCC AGC TGC CGG TCG GCG GAC AGG CCC TCA ACC TCG  
 -----  
 G   D   A   A   H   V   Q   L   P   V   G   G   Q   A   L   N   L   G

1845            1854            1863            1872            1881            1890  
 GCC TGC AGG ACG CGA TGG ATC TCG GCG GGA AAC TCG CCG CGC ACA TCA CGG GCA  
 -----  
 L   Q   D   A   M   D   L   G   G   K   L   A   A   H   I   T   G   K

1899            1908            1917            1926            1935            1944  
 AGG CCG GCG AGG AAC TGC TCG ACA CCT ACC ACG CGG GCC GCC ACC CGG TGG CGG  
 -----  
 A   G   E   E   L   L   D   T   Y   H   A   G   R   H   P   V   A   A

1953            1962            1971            1980            1989            1998  
 CCC GCG TAC TCG GCA ACA TCG AAG CAC AAG CCC AGC TGC TGT TCG GCG GAC CCG  
 -----  
 R   V   L   G   N   I   E   A   Q   A   Q   L   L   F   G   G   P   D

2007            2016            2025            2034            2043            2052  
 ATG TGG ACG CCC TGC GGG CGG TGT TCG GGG AAC TCC TCG GCC TCG GCG CGG CGC  
 -----  
 V   D   A   L   R   A   V   F   G   E   L   L   G   L   G   A   A   R

2061            2070            2079            2088            2097            2106  
 GCC GCC ACC TCG CCT CGA TGA TCA GCG GGC TCG ACG GCG GAG CTC CGA CGT CCG  
 -----  
 R   H   L   A   S   M   I   S   G   L   D   G   G   A   P   T   S   V

2115            2124            2133            2142            2151            2160  
 TCC CCC GGA CCG GCC CCG ATG CCA CGG CTC ACC CCG GAC CAA CTC GTC AGC ACA  
 -----  
 P   R   T   G   P   D   A   T   A   H   P   G   P   T   R   Q   H   T

2169            2178            2187            2196            2205            2214  
 CCC CGC ACA GGA GGA CCA CCA TGG GCA AGC TCA CCG GAA AGA CCG CGC TCG TCA  
 -----  
 P   H   R   R   T   T   M   G   K   L   T   G   K   T   A   L   V   T

2223            2232            2241            2250            2259            2268  
 CGG GCT CCA GCC GTG GCA TCG GCC GGG CCA CGG CGA TCC GTC TGG CCC GCG AGG  
 -----  
 G   S   S   R   G   I   G   R   A   T   A   I   R   L   A   R   E   G

2277            2286            2295            2304            2313            2322  
 GAG CGC TTG TCG CAG TGC ACT GCT CCC GCA ACC GGG AGG CTG CCG ACG AGA CCG  
 -----  
 A   L   V   A   V   H   C   S   R   N   R   E   A   A   D   E   T   V

2331            2340            2349            2358            2367            2376  
 TCG CCA CCA TCG AGA AGG AGG GCG GCC GGG CCT TCT CCG TCC TGG CCG AGC TGG  
 -----  
 A   T   I   E   K   E   G   G   R   A   F   S   V   L   A   E   L   G

2385            2394            2403            2412            2421            2430  
 GCG TCC CCG GCG ACG TCC ACG AAC TCT TCC TGG CCC TGG AAC GGG GGC TGA AGG  
 -----  
 V   P   G   D   V   H   E   L   F   L   A   L   E   R   G   L   K   E

2439            2448            2457            2466            2475            2484  
 AGC GCA CCG ACG CCA CCA CCC TCG ACA TCC TCG TGA ACA ACG CCG GGG TCA TGG  
 -----  
 R T D A T T L D I L V N N A G V M G

2493            2502            2511            2520            2529            2538  
 GCG GAG TGG CCC CCG AGG AGG TCA CGC CCG AGC TGT TCG ACC GGC TCG TCG CGG  
 -----  
 G V A P E E V T P E L F D R L V A V

2547            2556            2565            2574            2583            2592  
 TCA ACG CCA AGG CAC CGT TCT TCA TAG TGC AGC GGG CCG TGA CGC TGA TCC CCG  
 -----  
 N A K A P F F I V Q R A V T L I P D

2601            2610            2619            2628            2637            2646  
 ATG GCG GCC GCA TCA TCA ACA TCT CTT CCG GGC TCA CCC GGT TCG CCA ACC CAC  
 -----  
 G G R I I N I S S G L T R F A N P Q

2655            2664            2673            2682            2691            2700  
 AGG AGG TGG CGT ACG CGA TGA CCA AGG GCG CCA TGG ACC AGC TCA CCC TCC ATT  
 -----  
 E V A Y A M T K G A M D Q L T L H F

2709            2718            2727            2736            2745            2754  
 TCG CCA AGC ATC TCG GCT CGC GCA ACA TCA CCG TGA ACA GTG TGG GCC CAG GTA  
 -----  
 A K H L G S R N I T V N S V G P G I

2763            2772            2781            2790            2799            2808  
 TCA CCA ACA ACG GGA CAC CGG TCT TCG ACA ACC CGG AGG CGG TGG CGC AGA TGG  
 -----  
 T N N G T P V F D N P E A V A Q M A

2817            2826            2835            2844            2853            2862  
 CGG GCT ACT CCG TGT TCA ACA GGG TCG GAG AGG TCA CGG ACG TCG CCG ATG TCG  
 -----  
 G Y S V F N R V G E V T D V A D V V

2871            2880            2889            2898            2907            2916  
 TGG CCT TCC TCG CCG GCG ACG ACG CAC GCT GGA TCA CCG GCT CCT ACC TGG ACG  
 -----  
 A F L A G D D A R W I T G S Y L D A

2925            2934            2943            2952  
 CCA GCG GGG CAC CCT GCT CGG CTG AGT CAC GCG GAT GAC  
 -----  
 S G A P C S A E S R G \*

*urdJ2*            2961            2970  
 GAT GAC GAC TCT TTC CCC GCG  
 -----  
 M T T L S P R

2979            2988            2997            3006            3015            3024  
 CTT CGA TCC GCA CGG CCG CGC CTC GGC GGG ACC GGT CGC ACG GCC GCG GGC ACT  
 -----  
 F D P H G R A S A G P V A R P R A L

3033	3042	3051	3060	3069	3078
GCT GTT CGT	GCT CGC GGC	GAA CAT GCT	CAT CGA CGC	CCT GGA GGT	CTC GGT GGT
---	---	---	---	---	---
L F V	L A A	N M L	I D A	L E V	S V V
3087	3096	3105	3114	3123	3132
GCT GGT CGC	GCT GCC GGC	CAT CGG CGG	CGA TCT CGG	CCT GTC ACC	CCA GGA CGC
---	---	---	---	---	---
L V A	L P A	I G G	D L G	L S P	Q D A
3141	3150	3159	3168	3177	3186
CCA GTG GAT	GAT GAG CGG	CTT CGC ACT	CGG CTT CGC	GGC ACT GCT	CCT GTC CGG
---	---	---	---	---	---
Q W M	M S G	F A L	G F A	A L L	L S G
3195	3204	3213	3222	3231	3240
CCC GCG CAT	CAC GGC ACG	GTG GGG GCG	ACG CCG TGC	CTA CCT GGT	GGC GCT CCT
---	---	---	---	---	---
P R I	T A R	W G R	R R A	Y L V	A L L
3249	3258	3267	3276	3285	3294
CGT CTT CGC	TGT CGC ATC	CTC GGC AGG	CGG ATT GGT	GCA CAG CGG	GGA GCT GCT
---	---	---	---	---	---
V F A	V A S	S A G	G L V	H S G	E L L
3303	3312	3321	3330	3339	3348
CGT GCT CAC	CCG CGT CAT	CAA GGG CAT	GTG CGC CGC	GCT CAC CGC	TCC GAC CGG
---	---	---	---	---	---
V L T	R V I	K G M	C A A	L T A	P T G
3357	3366	3375	3384	3393	3402
CCT CGC GAT	CAT CGC CAC	CGC CTA CCG	GCA GGG CGA	CGA GCA GCG	CAG GGC GGT
---	---	---	---	---	---
L A I	I A T	A Y R	Q G D	E Q R	R A V
3411	3420	3429	3438	3447	3456
GGC GGT GTA	CTC GTT CTT	CGG GGC CGC	CGG TTT CAC	CGT CGG TCT	GCT GGC CTC
---	---	---	---	---	---
A V Y	S F F	G A A	G F T	V G L	L A S
3465	3474	3483	3492	3501	3510
GGG CGC ACT	CAC CGT GCT	GAG CTG GCG	TTG GGA CCT	CGT CCT CCC	GGC CCC GAT
---	---	---	---	---	---
G A L	T V L	S W R	W D L	V L P	A P I
3519	3528	3537	3546	3555	3564
CGC CCT GGG	GCT GAT GGT	TCT GGG CTT	CTG TCT CAT	CCC CGA CGA	CCG CGG GCC
---	---	---	---	---	---
A L G	L M V	L G F	C L I	P D D	R G P
3573	3582	3591	3600	3609	3618
GGC GCC GAC	GGC TTC CCC	CGG TAC GGG	GGT GAC TCG	ATT CCT GCG	GCA CGG CCC
---	---	---	---	---	---
A P T	A S P	G T G	V T R	F L R	H G P
3627	3636	3645	3654	3663	3672
ACT CGT GCG	GTC GGC TCT	GTG CGC GGC	CAG CCT CAA	CGG TGC CTA	TCT CGG GCT
---	---	---	---	---	---
L V R	S A L	C A A	S L N	G A Y	L G L



```

      3681      3690      3699      3708      3717      3726
TCT CCT GCT GGT CAC CTA CCA ACT GCA CAC GGG ACC GGG CTG GAA CTC CTG GCA
----
L L L V T Y Q L H T G P G W N S W Q

      3735      3744      3753      3762      3771      3780
GAC GGC GGT GGC TCT GCT GCC GGC CTG CGT GCC GCT GAT GGT CTC GCT GCC CTT
----
T A V A L L P A C V P L M V S L P F

      3789      3798      3807      3816      3825      3834
CGC CGG ACG CAT GGT GGG GCG CCT GGG CGC CGC CCG GCT GAT CGT CTC GGG CAC
----
A G R M V G R L G A A R L I V S G T

      3843      3852      3861      3870      3879      3888
CCT CGC GGC CAC GCT CGG CTG CGC GGG CTG TGC CGT ATG GGG TGT GTC CGG GTC
----
L A A T L G C A G C A V W G V S G S

      3897      3906      3915      3924      3933      3942
GTA CGC CAC CGG TGC GCT GCC GGC CCT GTT GCT CGT CGA GGC GGG ATT CGT GCT
----
Y A T G A L P A L L L V E A G F V L

      3951      3960      3969      3978      3987      3996
GTC CTT CGC CGC TCT GAA CAT GCA GGC CGT CGC CGG GAT CGC ACC GGA GTC ACG
----
S F A A L N M Q A V A G I A P E S R

      4005      4014      4023      4032      4041      4050
GCA GAC GGC GGT GTC CCT CTA CCA GAC GGC GGT GCA ACT CGG CGC CGC GCT GAC
----
Q T A V S L Y Q T A V Q L G A A L T

      4059      4068      4077      4086      4095      4104
GCT GCC GGC GGT CGC TCT GCT GCT GGG CAG CGG CGG CGA GGG CCC CTA CCG GAC
----
L P A V A L L L G S G G E G P Y R T

      4113      4122      4131      4140      4149      4158
CGC CCT GCT CCT CAT CAC CGC CGT CGC CGC CGT CGG CGC CGC AGT CGC CTG CAC
----
A L L L I T A V A A V G A A V A C T

      4167      4176      4185      4194 RBS 4203
CGG GAC GAG AAG AAA GGC GGA ACA GCC ATG CGT ATC GAG GAG ATG A
----
G T R R K A E Q P C V S R R *

                                                    4212
                                                    urdZ1 ATG AGC ATC CCC
                                                    ----
                                                    M S I P

      4221      4230      4239      4248      4257      4266
GGT GCC TTC CTG ATC ACG CCG GAT CAA CTG TCC GAC GAG CGG GGT GCG TTC TAC
----
G A F L I T P D Q L S D E R G A F Y

```

	4275		4284		4293		4302		4311		4320						
GAA	GCG	CTG	CGC	TGC	GAC	ATG	CTG	GAG	CGG	GCC	GTC	GGC	GTT	CCC	TTC	CAG	CCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	A	L	R	C	D	M	L	E	R	A	V	G	V	P	F	Q	P
	4329		4338		4347		4356		4365		4374						
CAG	CAG	ATC	AAC	TAC	TCG	GTC	TCC	AAG	CGG	CAC	ACC	CTG	CGC	GGC	ATC	CAC	AGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	Q	I	N	Y	S	V	S	K	R	H	T	L	R	G	I	H	S
	4383		4392		4401		4410		4419		4428						
GTC	AGC	ATC	CCG	CCC	GGG	CAG	GCG	AAG	CTC	GTC	ACC	TGC	GTG	CGG	GGA	GCG	CTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	S	I	P	P	G	Q	A	K	L	V	T	C	V	R	G	A	L
	4437		4446		4455		4464		4473		4482						
CGC	GAC	ATC	GTG	GTC	GAC	CTG	CGG	ATC	GGC	TCT	CCG	GCC	TTC	GGC	CGC	CAC	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	D	I	V	V	D	L	R	I	G	S	P	A	F	G	R	H	Q
	4491		4500		4509		4518		4527		4536						
GTG	ACC	GAG	CTG	GAC	GCC	GTC	TCC	GGT	CGG	TCC	GTC	TAC	GTA	CCC	GAA	GGT	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	T	E	L	D	A	V	S	G	R	S	V	Y	V	P	E	G	V
	4545		4554		4563		4572		4581		4590						
GGG	CAC	GGA	TTC	CTC	GCG	CTC	ACC	GAC	GAC	GCC	TGT	ATC	TGC	TAC	GTC	GTC	TCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	H	G	F	L	A	L	T	D	D	A	C	I	C	Y	V	V	S
	4599		4608		4617		4626		4635		4644						
AGC	ACC	TAC	GTG	CCA	GGA	ACC	CAG	ATC	GAC	ATC	AAT	CCG	CTC	GAT	CCG	GAT	CTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	T	Y	V	P	G	T	Q	I	D	I	N	P	L	D	P	D	L
	4653		4662		4671		4680		4689		4698						
GAC	CTG	CCC	TGG	GAC	TGT	CCG	CAG	GAA	CCG	CTC	ATA	TCG	GAG	AAG	GAC	GCG	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	L	P	W	D	C	P	Q	E	P	L	I	S	E	K	D	A	K
	4707		4716		4725		4734		4743		4752						
GCG	TCC	AGC	CTG	GCC	GAG	GCA	CTG	GCA	TCC	GGC	ACT	CTG	CCC	GAC	CTG	CAC	GAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	S	S	L	A	E	A	L	A	S	G	T	L	P	D	L	H	D
	4761		4770		4779		4788		4797		4806						
TGC	CGA	ACC	AGC	GAC	GCC	GCG	CGC	ACA	GCA	CTC	GTC	CGT	GCG	CCA	TCC	GAA	AGG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	R	T	S	D	A	A	R	T	A	L	V	R	A	P	S	E	R
	4815		4824		4833		4842		4851		4860						
CAA	TGA	GAC	GTG	AGA	ATC	CTC	TTC	GTC	GCC	GCG	GGA	AGT	CCG	GCG	ACC	<b>GTG</b>	TTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	*	D	V	R	I	L	F	V	A	A	G	S	P	A	T	V	F
	4869		4878		4887		4896		4905		4914						
GCG	CTG	GCC	CCG	CTG	GCC	ACC	GCC	GCC	CGC	AAC	GCC	GGC	CAC	CAG	GTC	GTC	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	L	A	P	L	A	T	A	A	R	N	A	G	H	Q	V	V	M

**urdGT2**

	4923		4932		4941		4950		4959		4968
GCG	GCC AAC	CAG	GAC ATG	GGA	CCG GTC	GTT	ACC GGA	GTG	GGC CTG	CCG	GCG GTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	A N	Q	D M	G	P V	V	T G	V	G L	P	A V
	4977		4986		4995		5004		5013		5022
GCG	ACC ACC	GAC	CTG CCG	ATC	CGC CAC	TTC	ATC ACC	ACG	GAC CGG	GAG	GGC CGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	T T	D	L P	I	R H	F	I T	T	D R	E	G R
	5031		5040		5049		5058		5067		5076
CCC	GAG GCC	ATC	CCT TCC	GAT	CCC GTG	GCA	CAG GCA	CGT	TTC ACC	GGC	CGC TGG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	E A	I	P S	D	P V	A	Q A	R	F T	G	R W
	5085		5094		5103		5112		5121		5130
TTC	GCC CGC	ATG	GCC GCC	TCC	AGC CTG	CCG	CGC ATG	CTG	GAC TTC	AGC	CGT GCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	A R	M	A A	S	S L	P	R M	L	D F	S	R A
	5139		5148		5157		5166		5175		5184
TGG	CGT CCC	GAC	CTC ATC	GTC	GGC GGC	ACG	ATG AGC	TAC	GTC GCG	CCC	CTG CTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
W	R P	D	L I	V	G G	T	M S	Y	V A	P	L L
	5193		5202		5211		5220		5229		5238
GCC	CTG CAT	CTG	GGC GTG	CCG	CAC GCC	CGC	CAG ACA	TGG	GAT GCT	GTC	GAT GCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	L H	L	G V	P	H A	R	Q T	W	D A	V	D A
	5247		5256		5265		5274		5283		5292
GAC	GGC ATC	CAC	CCC GGT	GCC	GAT GCC	GAA	CTT CGG	CCC	GAG CTG	AGT	GAA CTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	G I	H	P G	A	D A	E	L R	P	E L	S	E L
	5301		5310		5319		5328		5337		5346
GGT	CTG GAA	CGG	CTG CCC	GCC	CCG GAT	CTG	TTC ATC	GAC	ATC TGC	CCG	CCG AGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	L E	R	L P	A	P D	L	F I	D	I C	P	P S
	5355		5364		5373		5382		5391		5400
CTG	CGC CCC	GCG	AAC GCC	GCG	CCC GCC	CGG	ATG ATG	CGG	CAC GTC	GCG	ACG AGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	R P	A	N A	A	P A	R	M M	R	H V	A	T S
	5409		5418		5427		5436		5445		5454
CGA	CAG TGC	CCG	CTG GAA	CCG	TGG ATG	TAC	ACC CGC	GAC	ACC CGT	CAG	CGT GTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	Q C	P	L E	P	W M	Y	T R	D	T R	Q	R V
	5463		5472		5481		5490		5499		5508
CTC	GTA ACC	TCC	GGC AGC	AGG	GTC GCG	AAG	GAG AGC	TAC	GAC AGG	AAC	TTC GAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	V T	S	G S	R	V A	K	E S	Y	D R	N	F D
	5517		5526		5535		5544		5553		5562
TTC	CTG CGC	GGC	CTG GCC	AAG	GAT CTC	GTC	CGC TGG	GAT	GTC GAG	CTC	ATC GTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	L R	G	L A	K	D L	V	R W	D	V E	L	I V

5571            5580            5589            5598            5607            5616  
 GCC GCC CCT GAC ACC GTC GCC GAG GCC CTC CGC GCC GAG GTG CCG CAG GCA CGG  
 ---  
 A    A    P    D    T    V    A    E    A    L    R    A    E    V    P    Q    A    R

5625            5634            5643            5652            5661            5670  
 GTC GGC TGG ACA CCC CTG GAT GTC GTG GCG CCC ACC TGC GAC CTG CTG GTC CAC  
 ---  
 V    G    W    T    P    L    D    V    V    A    P    T    C    D    L    L    V    H

5679            5688            5697            5706            5715            5724  
 CAT GCG GGC GGT GTC AGC ACA CTG ACC GGC CTG AGC GCG GGT GAG CCG CAA CTG  
 ---  
 H    A    G    G    V    S    T    L    T    G    L    S    A    G    E    P    Q    L

5733            5742            5751            5760            5769            5778  
 CTC ATC CCC AAG GGC TCC GTC CTG GAG GCG CCG GCT CGC CGC GTC GCC GAC TAC  
 ---  
 L    I    P    K    G    S    V    L    E    A    P    A    R    R    V    A    D    Y

5787            5796            5805            5814            5823            5832  
 GGA GCG GCC ATC GCC CTG CTG CCG GGT GAG GAC TCG ACC GAG GCG ATC GCG GAC  
 ---  
 G    A    A    I    A    L    L    P    G    E    D    S    T    E    A    I    A    D

5841            5850            5859            5868            5877            5886  
 TCC TGC CAG GAG CTG CAC GCC AAG GAC ACC TAT GCC CGG CGA GCC CAG GAC CTC  
 ---  
 S    C    Q    E    L    H    A    K    D    T    Y    A    R    R    A    Q    D    L

5895            5904            5913            5922            5931            5940  
 TCC CGG GAG ATC TCC GGA ATG CCC CTG CCC GCG ACC GTC GTC ACA GCG CTC GAA  
 ---  
 S    R    E    I    S    G    M    P    L    P    A    T    V    V    T    A    L    E

*urdG*

5949            5958            5967 **RBS**            5976            5985            5994  
 CAG CTG GCG TGA CCC CAT GAA TCG AGA GGA CCT CCG **ATG** AAG GCA CTT GTG CTG  
 ---  
 Q    L    A    \*    P    H    E    S    R    G    P    P    M    K    A    L    V    L

6003            6012            6021            6030            6039            6048  
 GCG GGC GGA TCT GGC ACC CGC CTG CGG CCC TTC AGC TAT TCG ATG CCC AAA CAA  
 ---  
 A    G    G    S    G    T    R    L    R    P    F    S    Y    S    M    P    K    Q

6057            6066            6075            6084            6093            6102  
 CTC ATC CCC ATC GCC AAC ACG CCC GTG CTG GTG CAC GTG CTG CGG AAC CTC CGC  
 ---  
 L    I    P    I    A    N    T    P    V    L    V    H    V    L    R    N    L    R

6111            6120            6129            6138            6147            6156  
 GAG CTG GGA GTC ACC GAG GCC GGT GTC ATC GTC GGC AAC CGG GGC CCG GAG ATC  
 ---  
 E    L    G    V    T    E    A    G    V    I    V    G    N    R    G    P    E    I

6165            6174            6183            6192            6201            6210  
 AGC GCC GTC CTC GGC GAC GGA GCG GAG TTC GGC ATG CGC GTC ACC TAC ATA CCC  
 ---  
 S    A    V    L    G    D    G    A    E    F    G    M    R    V    T    Y    I    P

	6219		6228		6237		6246		6255		6264						
CAG	GAT	GCG	CCG	CGT	GGT	CTG	GCC	CAT	ACC	GTG	GCC	ATC	ACC	CGC	GAC	TTC	CTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	D	A	P	R	G	L	A	H	T	V	A	I	T	R	D	F	L
	6273		6282		6291		6300		6309		6318						
TGC	GAC	GAC	GAT	TTC	GTG	ATG	TAC	CTC	GGC	GAC	AAC	ATG	CTG	CCG	GAC	GGT	GTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	D	D	D	F	V	M	Y	L	G	D	N	M	L	P	D	G	V
	6327		6336		6345		6354		6363		6372						
GTC	GAC	ATG	CGC	GGA	GGA	ATT	CAC	CGC	CCA	TCG	GCC	GGC	GGC	CAG	GTG	GTC	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	D	M	R	G	G	I	H	R	P	S	A	G	G	Q	V	V	V
	6381		6390		6399		6408		6417		6426						
TAC	AAG	GTC	CCG	GAC	CCG	CGC	TCC	TTC	GGC	GTC	GCC	GAA	CTG	GGG	CCG	CAG	GGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y	K	V	P	D	P	R	S	F	G	V	A	E	L	G	P	Q	G
	6435		6444		6453		6462		6471		6480						
GAG	GTG	CTT	CGC	CTG	GTG	GAG	AAG	CCC	CGC	GAC	CCG	CGC	AGC	GAC	ATG	GCG	CTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	V	L	R	L	V	E	K	P	R	D	P	R	S	D	M	A	L
	6489		6498		6507		6516		6525		6534						
GTC	GGC	GTG	TAC	TTC	TTC	ACC	GCG	GCC	ATC	CAC	GAC	GCC	GTC	GCC	GCG	ATC	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	G	V	Y	F	F	T	A	A	I	H	D	A	V	A	A	I	E
	6543		6552		6561		6570		6579		6588						
CCC	AGC	GCC	CGG	GGC	GAA	CTG	GAG	ATC	ACC	GAC	GCC	ATC	CAG	TGG	CTG	GTC	TCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	S	A	R	G	E	L	E	I	T	D	A	I	Q	W	L	V	S
	6597		6606		6615		6624		6633		6642						
TCC	GGC	GCG	GAC	GTG	CGC	GCC	AGC	CAG	TAC	GAC	GGC	TAC	TGG	AAG	GAC	ACC	GGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	G	A	D	V	R	A	S	Q	Y	D	G	Y	W	K	D	T	G
	6651		6660		6669		6678		6687		6696						
AAC	GTC	GAG	GAC	GTC	CTG	GAG	TGC	AAT	CGG	CAC	CTC	CTC	GAC	GGG	CTG	GGG	GCG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	V	E	D	V	L	E	C	N	R	H	L	L	D	G	L	G	A
	6705		6714		6723		6732		6741		6750						
CGC	ATG	GAC	GGC	ACC	GTC	GAC	GCC	GCC	AGT	GTG	CTG	ACC	GGT	GAG	GTG	GTG	ATC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	M	D	G	T	V	D	A	A	S	V	L	T	G	E	V	V	I
	6759		6768		6777		6786		6795		6804						
GAA	CCC	GGG	GCG	AAG	GTC	GTG	CGC	TCC	CGC	ATC	ATG	GGG	GCG	GCC	ATC	ATC	GGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	P	G	A	K	V	V	R	S	R	I	M	G	A	A	I	I	G
	6813		6822		6831		6840		6849		6858						
GCG	GGC	ACC	GTC	GTG	CAG	GAC	AGC	CAC	GTG	GGT	CCG	CAC	GCC	TCC	ATC	GGA	CGA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	G	T	V	V	Q	D	S	H	V	G	P	H	A	S	I	G	R

```

        6867         6876         6885         6894         6903         6912
CGC TGC ACG GTC ACG GAC AGC CGG GTG GAG AAC TCC ATA GCC CTC GAC GAG GCG
-----
R   C   T   V   T   D   S   R   V   E   N   S   I   A   L   D   E   A

        6921         6930         6939         6948         6957         6966
TCG GTC ACT GGC GTC CGA GGA CTG CGC AAC TCG CTC ATC GGG CGC TCG GCG TCC
-----
S   V   T   G   V   R   G   L   R   N   S   L   I   G   R   S   A   S

        6975         6984         6993         7002         7011         7020
GTC GGC GGC ACC GGC CAG GAG AAC GAG CGT TAC CGC CTG GTC GTC GGA GAC CAC
-----
V   G   G   T   G   Q   E   N   E   R   Y   R   L   V   V   G   D   H

        7029 RBS         7038
ACC CGA GTG GAG GTC GCA GCA TGA
-----
T   R   V   E   V   A   A   *

                                7047         7056         7065         7074
                                urdH         A TGA ACA TCC TGG TCA CCG GCG CGG CCG GTT TCA
-----
                                M   N   I   L   V   T   G   A   A   G   F   I

        7083         7092         7101         7110         7119         7128
TCG GCT CGC ACT TCG TCC GCA GCC TGC TGG CCG ACA CCT ACT CCG GCT GGG AGG
-----
G   S   H   F   V   R   S   L   L   A   D   T   Y   S   G   W   E   G

        7137         7146         7155         7164         7173         7182
GAG CCC GGG TCA CTG CCC TGG ACA AAC TGA CCT ACG CGG GCA ACC GGA ACA ACC
-----
A   R   V   T   A   L   D   K   L   T   Y   A   G   N   R   N   N   L

        7191         7200         7209         7218         7227         7236
TGC CGC CCT CAA ACC CGC GCC TGG AGT TCG TGC GGG GCG ACG TGT GCG ACC GCG
-----
P   P   S   N   P   R   L   E   F   V   R   G   D   V   C   D   R   A

        7245         7254         7263         7272         7281         7290
CCC TGC TCC GCG AGC TGC TGC CCG GGC ACC ACG CCG TGG TCC ATT TCG CGG CGG
-----
L   L   R   E   L   L   P   G   H   H   A   V   V   H   F   A   A   E

        7299         7308         7317         7326         7335         7344
AAT CCC ACG TGG ACC GCT CCC TCG AAG GCG CGG GCG AGT TCT TCC GCA CGA ACG
-----
S   H   V   D   R   S   L   E   G   A   G   E   F   F   R   T   N   V

        7353         7362         7371         7380         7389         7398
TCC TCG GTA CGC AGA CAC TCC TCG ACG CCG TAC TGG ACA GCG GAG TCG AGC GGG
-----
L   G   T   Q   T   L   L   D   A   V   L   D   S   G   V   E   R   V

        7407         7416         7425         7434         7443         7452
TCG TTC ACG TCT CCA CCG ACG AGG TGT ACG GCT CGA TCG AGC AAG GCT CCT GGA
-----
V   H   V   S   T   D   E   V   Y   G   S   I   E   Q   G   S   W   T

```

7461            7470            7479            7488            7497            7506  
 CCG AGG ACT GGC CGC TGC AGC CCA ATT CTC CGT ACG CCG CCT CGA AGG CAT GCT  
 -----  
 E D W P L Q P N S P Y A A S K A C S

7515            7524            7533            7542            7551            7560  
 CGG ACC TGG TCG CGC GAG CCT ACT GCG CAC CCA CGG AGG TGG ACC TCT CCA TCA  
 -----  
 D L V A R A Y C A P T E V D L S I T

7569            7578            7587            7596            7605            7614  
 CCC GCT GCT CCA ACA ACT ACG GCC CGC ACC AGC ACC CTG AGA AGG TCA TTC CCA  
 -----  
 R C S N N Y G P H Q H P E K V I P R

7623            7632            7641            7650            7659            7668  
 GGT TCG TCA CGA ACC TCC TCG AAG GAC GCC AGG TCC CGC TGT ACG GCG ACG GCC  
 -----  
 F V T N L L E G R Q V P L Y G D G R

7677            7686            7695            7704            7713            7722  
 GCA ATG TGC GCG AGT GGC TCC ACG TGG AGG ACC ACT GCC GCG GTA TCC ACC TGG  
 -----  
 N V R E W L H V E D H C R G I H L V

7731            7740            7749            7758            7767            7776  
 TGC TCA ACA AGG GGC AGG CCG GCG AGA TCT ACA ACA TCG GCG GGG GCA ACG AGT  
 -----  
 L N K G Q A G E I Y N I G G G N E Y

7785            7794            7803            7812            7821            7830  
 ACA CCA ACC TCG CCC TCA CCG AGA AAC TGC TCG AAC TGA CGG GTG CCG GCC CGG  
 -----  
 T N L A L T E K L L E L T G A G P E

7839            7848            7857            7866            7875            7884  
 AGA TGA TCC GCC GCG TCC CCG ACC GCA AGG CGC ACG ACC TGC GGT ACT CGA TCG  
 -----  
 M I R R V P D R K A H D L R Y S I D

7893            7902            7911            7920            7929            7938  
 ACG AGT CCA AGA TCC GCG AGA AGC TCG GCT ACG CCC CGC GGA TCA GCT TCG AAC  
 -----  
 E S K I R E K L G Y A P R I S F E Q

7947            7956            7965            7974            7983            7992  
 AGG GCC TGT CCG ACA CCG TCG CCT GGT ACC GCG ACA ACC CGG ACT GGT GGA AGA  
 -----  
 G L S D T V A W Y R D N P D W W K S

8001            8010            8019  
 GCA TCG AGC ATG GCG GGG ACA GTG CGG CGG CCT GA  
 -----  
 I E H G G D S A A A \*

## 7.2 Vektoren

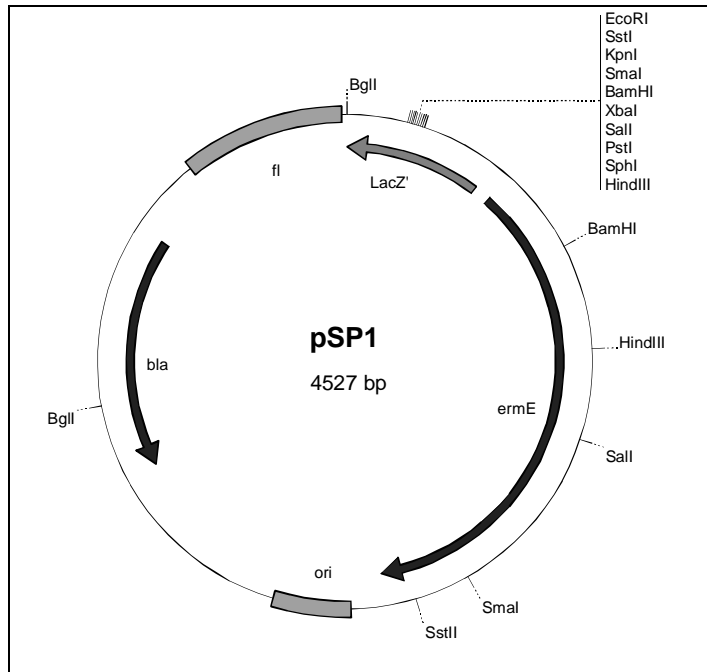


Abb. 46: Nicht replizierender Vektor pSP1, der für die Inaktivierung von *urdGT2* eingesetzt wurde

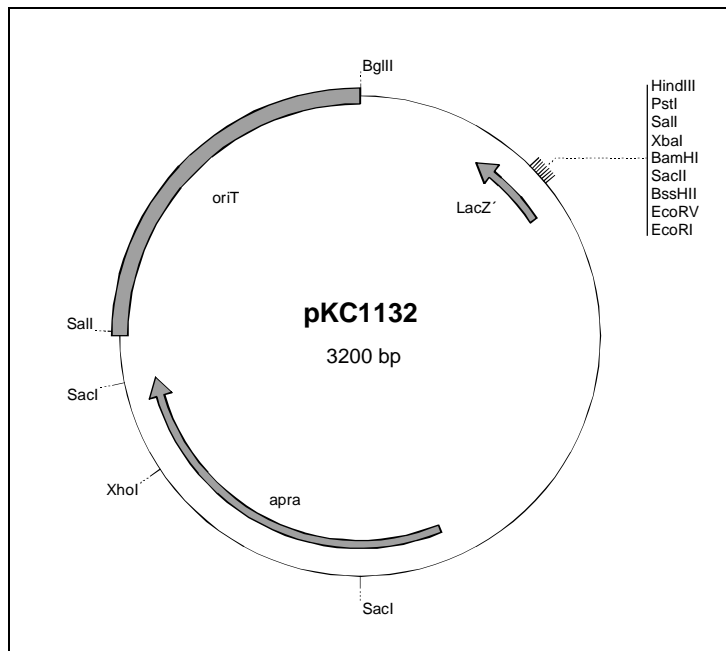


Abb. 47: Nicht replizierender Vektor pKC1132, der für die Inaktivierung von *urdM* und *urdZ1* eingesetzt wurde.



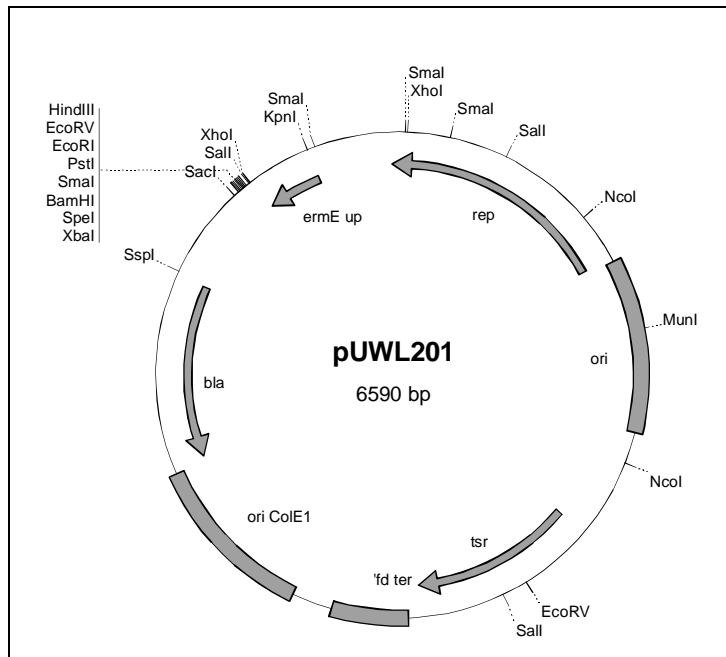


Abb. 48: Expressionsvektor pUWL201, der bei der heterologen Expression von Glycosyltransferasen in der *urdGT2*-Mutante BF-1-1 eingesetzt wurde.

Meine akademischen Lehrer waren:

M. Albinus, R. Apfelbach, A. Bechthold, V. Braun, D. Bunke, H. Erkert, F. Götz, J. Grunewald, L. Heide, A. Honold, G. Jung, D. Kloor, P. Krauß, W. Kreis, W. Maier, E.-L. Mechler, C. Meier-Brook, H. Oßwald, K. Poralla, W. Rähle, E. Reinhard, W. J. Schmidt, H.-U. Schnitzler, H. Schulz-Key, G. Winkelmann, A. Wörz, H. Zähler

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt. Mein besonderer Dank gilt PD Dr. A. Bechthold für die Übertragung des interessanten Themas und seine stete Diskussionsbereitschaft in allen Phasen der Arbeit. Er ermöglichte mir den Einstieg in ein neues, hochinteressantes Arbeitsgebiet.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Prof. Dr. L. Heide für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis, die Zuverfügungstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Koreferates bedanken.

Der AG Prof. Dr. J. Rohr, Charleston, USA, und hier vor allem E. Künzel, J. Fuchser, Analyticon, Potsdam und C. Kempter, AG Prof. Dr. J. Metzger, Vaihingen, möchte ich für die Durchführung weiterführender chemischer Analysenmethoden im Rahmen dieser Arbeit danken.

Lucy Westrich und Sigrid Stockert möchte ich für die Hilfestellung und Einführung in Methoden der Molekularbiologie sowie der Naturstoffisolierung, Gabriele Weitnauer für die Unterstützung bei Durchführung der HPLC-Analysen und D. Hoffmeister besonders für die Unterstützung in der Endphase meiner Arbeit danken.

Meinen Labor- und Arbeitskollegen Anne, Agnes, Axel, Bernhard, Claudia, Dieter, Dirk, Elisabeth, Emmanuel, Felix, Gabriele, Lucy, Marion, Robert, Sibylle, Silvie, Shuming, Sigrid, Susanne, Susanne, Ute und Zhaoxin danke ich für die angenehme Laboratmosphäre.

Herzlich möchte ich mich auch bei Frau R. Bauer und Frau W. Lörcher für die Hilfestellung und fürsorgliche Begleitung während der Zeit der Erstellung der Arbeit bedanken.

Meinen Eltern, Sigrid Faust und vor allem Armin danke ich sehr herzlich für ihre Unterstützung und Hilfe während der letzten Jahre.

Die Arbeit wurde von der Europäischen Gemeinschaft im Rahmen des Projektes „Novel Antitumor Drugs“ und vom SFB 323 „Mikrobiologische Grundlagen der Biotechnologie“ gefördert.