



Bergische Universität Wuppertal  
Fachbereich C-Mathematik und Naturwissenschaften  
Chemische Mikrobiologie

**Analyse von ausgewählten modifizierenden Enzymen  
aus den Aminoglycosidantibiotika-Biosynthesewegen  
von Neomycin, Lividomycin und Nebramycin**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Diana Clausnitzer

Wuppertal, im Februar 2010

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20100198

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20100198>]

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Summary .....</b>	<b>2</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Streptomyceten .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Aminoglycosid-Antibiotika .....</b>	<b>6</b>
2.2.1 AGA-Klassifizierung .....	7
2.2.2 Wirkmechanismus der antibiotisch aktiven AGAs .....	11
2.2.3 Resistenz .....	12
2.2.4 Medizinische Anwendung .....	13
2.2.5 Biosynthese von 2-Desoxystreptamin (2-DOS) enthaltenden AGAs, die Paromamin als Intermediat bilden .....	14
2.2.5.1 Organisation und funktionelle Charakterisierung der Gencluster für AGAs	14
2.2.5.1.1 Charakterisierung der Gencluster der NEO-Familie .....	15
2.2.5.1.2 Charakterisierung der Gencluster der KAN/GEN-Familie .....	17
2.2.5.2 Biosynthese des Paromamin-Intermediats .....	18
2.2.5.3 Biosynthese von Neomycin und Lividomycin .....	21
2.2.5.4 Biosynthese von Kanamycin und Nebramycinen .....	23
<b>2.3 Spezielle Enzymgruppen, die an der Biosynthese der AGAs beteiligt sind ..</b>	<b>25</b>
2.3.1 Oxidoreduktasen und Aminotransferasen .....	25
2.3.2 Carbamoyltransferasen .....	26
<b>2.4 Ziele dieser Arbeit .....</b>	<b>27</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Chemikalien, Enzyme und Kits .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Bakterienstämme .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Vektoren und rekombinante Plasmide .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Oligonukleotide .....</b>	<b>38</b>
<b>3.5 Nährmedien .....</b>	<b>39</b>
3.5.1 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	40

---

3.5.2 Medien zur Anzucht von Streptomyceten.....	42
3.5.3 Medium zur Anzucht von <i>Micrococcus luteus</i> .....	44
<b>3.6 Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....</b>	<b>44</b>
3.6.1 Anzucht und Stammhaltung von <i>E. coli</i> .....	44
3.6.2 Anzucht und Stammhaltung von Streptomyceten .....	44
<b>3.7 Transformationstechniken .....</b>	<b>45</b>
3.7.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	45
3.7.2 Protoplastentransformation von Streptomyceten-Protoplasten .....	46
<b>3.8 Konjugation .....</b>	<b>47</b>
<b>3.9 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>48</b>
3.9.1 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA .....	48
3.9.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	49
3.9.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	49
3.9.4 Enzymatische Reaktionen mit DNA .....	50
3.9.4.1 Restriktionsendonuclease-Spaltung von DNA.....	50
3.9.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	50
3.9.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten .....	50
3.9.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	51
3.9.6 Aufreinigung amplifizierter DNA-Fragmente.....	52
3.9.7 DNA-Sequenzierung und Computeranalyse von Sequenzdaten .....	52
<b>3.10 Heterologe Genexpression.....</b>	<b>54</b>
3.10.1 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> .....	54
3.10.1.1 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter der Kontrolle des T7-Promotors.....	54
3.10.1.2 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter der Kontrolle des Promotors P <sub>rhaBAD</sub> .....	55
3.10.1.3 Variationen der Expressionsbedingungen.....	55
3.10.2 Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i> und <i>S. coelicolor</i> .....	56
<b>3.12 Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>57</b>
3.12.1 Herstellung von Proteinextrakten .....	57
3.12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	58
3.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
3.12.4 Western Blot und immunologischer Nachweis immobilisierter His-tag Proteine.....	60
3.12.5 Reinigung von His-tag-Fusionsproteinen .....	61
<b>3.13 Enzymtests .....</b>	<b>63</b>
3.13.1 Enzymatische Synthese der Substrate für Enzymtests mit den	

Oxidoreduktasen NeoQ/LivQ und den Aminotransferasen NeoB/LivB .....	63
3.13.1.1 Synthese von 2'- <i>N</i> -Acetylparomamin .....	63
3.13.1.2 Synthese von 2'''- <i>N</i> -Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C .....	63
3.13.1.3 Synthese von 6'''-Hydroxyneomycin C .....	64
3.13.2 Photometrische Bestimmung der Oxidoreduktase-Aktivität von NeoQ und LivQ .....	65
3.13.3 Charakterisierung der Aminotransferasen NeoB und LivB .....	66
3.13.4 Nachweis der Carbamoyltransferase-Aktivität von TobZ .....	66
<b>3.14 Festphasenextraktion („solid phase extraction“, SPE) .....</b>	<b>67</b>
<b>3.15 Dünnschichtchromatographie (DC) .....</b>	<b>67</b>
<b>3.16 Bioautographie .....</b>	<b>68</b>
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 Enzymatisch katalysierte Synthesen von Biosynthese-Intermediaten     des Neomycin-Biosynthesewegs .....</b>	<b>69</b>
4.1.1 Synthese von 2'- <i>N</i> -Acetylparomamin .....	69
4.1.2 Synthese von 2'''- <i>N</i> -Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C .....	72
4.1.3 Synthese von 6'''-Hydroxyneomycin C .....	75
4.1.4 Festphasenextraktion der enzymatisch synthetisierten Biosynthese- Intermediate des NEO-Biosynthesewegs .....	78
<b>4.2 Vergleichende Charakterisierung der Oxidoreduktasen NeoQ und LivQ bzw.     der Aminotransferasen NeoB und LivB .....</b>	<b>80</b>
4.2.1 Klonierung und Überproduktion von LivQ und NeoQ .....	80
4.2.2 Bestimmung der Oxidoreduktaseaktivität .....	84
4.2.3 Klonierung und Überproduktion von LivB und NeoB .....	89
4.2.4 Nachweis der Enzymaktivität der Aminotransferasen LivB und NeoB .....	93
<b>4.3 Die Carbamoyltransferase TobZ .....</b>	<b>99</b>
4.3.1 Heterologe Expression von TobZ .....	99
4.3.1 Nachweis der 6''- <i>O</i> -Carbamoyltransferaseaktivität von TobZ .....	100
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>106</b>
<b>5.1 Biochemische NEO-Intermediat-Synthese und Aufarbeitung     für Enzymtests .....</b>	<b>106</b>
<b>5.2 Die „Q“-Oxidoreduktasen und die „B“-Aminotransferasen der     NEO- und LIV-Biosynthese .....</b>	<b>108</b>
5.2.1 Die Oxidoreduktasen LivQ und NeoQ .....	108
5.2.1.1 Substratspezifität der Oxidoreduktasen LivQ und NeoQ .....	111
5.2.2 Die Aminotransferasen LivB und NeoB .....	113
<b>5.3 Die Carbamoyltransferase TobZ .....</b>	<b>118</b>

<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>143</b>
<b>7.1 Aminosäuresequenzvergleich der „Q“-Oxidoreduktasen.....</b>	<b>143</b>
<b>7.2 Aminosäuresequenzvergleich der „B“-Aminotransferasen.....</b>	<b>145</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>X</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>XI</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Chemische Strukturen der Streptamin enthaltenden AGAs Streptomycin und Spectinomycin.....	7
Abb. 2.2: Chemische Strukturen 4,5-disubstituierter 2-DOS enthaltender AGAs .....	8
Abb. 2.3: Chemische Strukturen 4,6-disubstituierter 2-DOS enthaltender AGAs .....	9
Abb. 2.4: Chemische Strukturen der monosubstituierten AGAs Apramycin und Hygromycin B.....	9
Abb. 2.5: Chemische Strukturen von Fortamin A und Istamycin A .....	10
Abb. 2.6: Chemische Struktur von Acarbose .....	10
Abb. 2.7: AGA-modifizierende Enzyme als Resistenzmechanismen am Beispiel von KAN-B (nach Mingeot-Leclercq <i>et al.</i> , 1999).....	13
Abb. 2.8: Gencluster der NEO-Familie.....	16
Abb. 2.9: Gencluster der KAN/GEN-Familie .....	17
Abb. 2.10: Das <i>apr</i> -Cluster aus <i>S. sp.</i> („tenebrarius“) DSM 40477 .....	18
Abb. 2.11: Biosyntheseweg des Paromamins.....	20
Abb. 2.12: Biosynthesewege von Neomycin B in <i>S. fradiae</i> und Lividomycin B in <i>S. lividus</i> .....	22
Abb. 2.13: Biosynthesewege in <i>S. kanamyceticus</i> und <i>S. sp.</i> DSM40477.....	24
Abb. 4.1: Reaktionsschema zur Synthese von 2'- <i>N</i> -Acetylparomamin .....	69
Abb. 4.2: Heterologe Produktion von AAC(2') in <i>S. lividans</i> TK23-pUWLHisaac(2')....	70
Abb. 4.3: DC zur Bildung von 2'- <i>N</i> -Acetylparomamin durch N-His <sub>10</sub> -AAC(2').....	71
Abb. 4.4: Reaktionsschema zur Synthese von 2'''- <i>N</i> -Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C ..	72
Abb. 4.5: Heterologe Produktion von NeoF in <i>S. lividans</i> 66 TK64-p201PW/neoF.....	73
Abb. 4.6: DC zur Bildung von 2'''- <i>N</i> -Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C .....	74
Abb. 4.7: Reaktionsschema zur Synthese von 6'''-Hydroxyneomycin C.....	75
Abb. 4.8: Heterologe Produktion von NeoD in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pET16/neoD.....	76
Abb. 4.9: DC zum Nachweis der Deacetylierung von 2'''- <i>N</i> -Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C.....	77
Abb. 4.10: Festphasenextraktion synthetisierter Substrate.....	79
Abb. 4.11: Heterologe Produktion, Western Blot und Reinigung von C-His <sub>6</sub> -LivQ.....	81
Abb. 4.12: Heterologe Produktion, Western Blot und Reinigung von N-His <sub>10</sub> -NeoQ ...	82
Abb. 4.13: Absorptionsspektren der Proteine LivQ und NeoQ.....	83
Abb. 4.14: Testprinzip des MTT/PMS-Oxidoreduktasetests am Beispiel der Oxidation von Paromamin durch das Enzym NeoQ.....	85
Abb. 4.15: Graphische Auswertung des MTT/PMS-Oxidoreduktasetests für die Enzyme NeoQ und LivQ .....	86
Abb. 4.16: Heterologe Produktion, Western Blot und Reinigung von N-His <sub>10</sub> -LivB.....	90

---

Abb. 4.17: Heterologe Produktion, Western Blot und Reinigung von C-His6-NeoB ....	91
Abb. 4.18: Absorptionsspektren der Proteine LivQ und NeoQ.....	92
Abb. 4.19: Reaktionsschema zur Synthese von Neamin aus Paromamin und NEO-C aus 6''-Hydroxyneomycin C.....	94
Abb. 4.20: DC zum Nachweis der Aminotransferaseaktivität von NeoB durch die Bildung von Neamin.....	95
Abb. 4.21: DC zum Nachweis der Aminotransferaseaktivität von NeoB durch die Bildung von NEO-C.....	96
Abb. 4.22: DC zum Test der Aminotransferase-Aktivität von LivB in Kombination mit der Oxidoreduktase LivQ .....	97
Abb. 4.23: Heterologe Kombination einer Oxidoreduktase (LivQ bzw. NeoQ) mit einer Aminotransferase (LivB bzw. NeoB) aus <i>S. lividus</i> und <i>S. fradiae</i> .....	98
Abb. 4.24: Heterologe Expression von TobZ und Reinigung von N-His <sub>10</sub> -TobZ .....	100
Abb. 4.25: Reaktionsschema zu den (möglichen) durch TobZ katalysierten Carbamoyltransferase-Reaktionen .....	101
Abb. 4.26: DC zum Nachweis der Carbamoyltransferase-Aktivität von TobZ für die Substrate TOB und KAN-B .....	102
Abb. 4.27: DC zur Analyse der Carbamoylierung von KAN-A durch TobZ .....	103
Abb. 4.28: DC zu den über SPE gereinigten TobZ-Produkten und dazugehöriges Bioautogramm.....	104
Abb. 5.1: Strukturmodelle von LivQ (grün), NeoQ (blau), ParQ (lila) und RibQ (orange) .....	109
Abb. 5.2: Mögliche FAD-Bindedomäne von LivQ (grün) bzw. NeoQ (blau).....	110
Abb. 5.3: Komplexbildung zwischen Ribostamycin bzw. Neomycin B mit der 16S-rRNA (Abbildung aus François <i>et al.</i> , 2005) .....	113
Abb. 5.4: Kristallstruktur der Aminotransferase LivB (Daten in Kooperation mit Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Physikalische Biotechnologie Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).....	115
Abb. 5.5: Kristallstruktur der Aminotransferase LivB überlagert mit den LOOPP Modellen von NeoB, ParB und RibB .....	116
Abb. 5.6: Kristallstruktur der Carbamoyltransferase TobZ (Daten in Kooperation mit Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Physikalische Biotechnologie, Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) .....	120
Abb. 5.7: Ausschnitt der Kristallstruktur von TobZ (Daten in Kooperation mit Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Physikalische Biotechnologie, Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).....	122
Abb. 5.8: Biokombinatorische Ansätze zur Bildung neuer KAN-A-Derivate.....	123
Abb. 5.9: Biokombinatorische Ansätze zur Bildung neuer KAN-C-Derivate.....	124

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verwendete <i>E.coli</i> Stämme .....	32
Tabelle 3.2: Verwendete Streptomycceten-Stämme .....	32
Tabelle 3.3: andere Bakterien .....	32
Tabelle 3.4: Vektoren .....	33
Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete Cosmide .....	33
Tabelle 3.6: Erhaltene rekombinante Plasmide .....	34
Tabelle 3.7: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide .....	34
Tabelle 3.8: Oligonucleotide.....	38
Tabelle 3.9: Antibiotika und Medienzusätze.....	39
Tabelle 3.10: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze .....	51
Tabelle 3.11: Standard PCR Programm für <i>Taq</i> -DNA-Polymerase .....	51
Tabelle 3.12: PCR-Programm für Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase.....	52
Tabelle 3.13: Verwendete Anlagerungstemperaturen der jeweiligen PCR-Reaktionen	52
Tabelle 3.13: Thermocycler Programm für die DNA-Sequenzierreaktion .....	53
Tabelle 4.1: Spezifische Enzymaktivitäten <sup>1</sup> von NeoQ und LivQ für verschiedene Substrate <sup>2</sup> .....	88
Tabelle 5.1: Sequenzidentitäten zwischen LivQ, NeoQ, ParQ und RibQ .....	108
Tabelle 5.2: Sequenzidentitäten zwischen LivB, NeoB, ParB und RibB .....	114

## Abkürzungsverzeichnis

2-DOS	2-Desoxystreptamin
AAC	AGA <i>N</i> -Acetyltransferase
Abb.	Abbildung
AGA(s)	Aminoglycosidantibiotikum (-ka)
Amp	Ampicilin
ANT	AGA <i>O</i> -Nucleotidyltransferase
APH	AGA <i>O</i> -Phosphotransferase
APR/ <i>apr</i>	Apramycin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP/ADP	Adenosin-5'-tri/diphosphat
Bp/Kbp	Basenpaare/Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAP	Carbamoylphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid
FOR/ <i>for</i>	Fortimicin
GEN/ <i>gen</i>	Gentamicin
Glc	Glucose
His	Histidin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid
KAN/ <i>kan</i>	Kanamycin
kDa	kilo Dalton
LIV/ <i>liv</i>	Lividomycin
MIC	Minimale Inhibitor Konzentration
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
NAD <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NEB	Nebramycin
NEO/ <i>neo</i>	Neomycin
OD	optische Dichte

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PLP/PMP	Pyridoxal-/Pyridoxamin-5-phosphat
PMS	Phenazinmethosulfat
PRPP	5-Phospho-d-ribosyl-1( $\alpha$ )-pyrophosphat
r/tRNA	ribosomale/transkriptionale Ribonukleinsäure
RIB	Ribostamycin
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Streptomyces</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thio	Thiostrepton
TOB/tob	Tobramycin
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDP-GlcNAc	Uridindiphospho-5'-N-Acetyl-D-glucosamin
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
X-Gal	5'-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-1-Galactopyranosid

# 1 Zusammenfassung

2-Desoxystreptamin (2-DOS) enthaltende Aminoglycosidantibiotika (AGAs) inhibieren durch Bindung an die ribosomale 30 S Untereinheit die Translation. Durch diese Hemmung der Proteinbiosynthese wirken sie sowohl bakterizid gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien, und werden daher als Breitbandantibiotika eingesetzt. Zunehmende Resistenzen aber auch Nebenwirkungen (Nephro- und Ototoxizität) schränken die Anwendung ein. Strukturell bestehen 2-DOS-AGAs aus einem oder mehreren zum Teil stark modifizierten Aminozuckerresten die glykosidisch mit dem Aminocyclitol 2-DOS verknüpft sind. Dabei ist das 2-DOS in der Neomycin (NEO)-Familie 4,5-disubstituiert und in der Kanamycin (KAN)-Familie 4,6-disubstituiert. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Enzymen, die an spezifischen Modifizierungsschritten beteiligt sind. Detaillierte Kenntnisse der Enzymfunktionen schaffen die Möglichkeiten, durch gezielte enzymatische Modifikationen und biokombinatorische Ansätze neue, auch verbesserte Wirkstoffe zu generieren.

Im Mittelpunkt der Arbeit standen Untersuchungen zu den AGA-Oxidoreduktasen („Q“-Enzyme) und die mit diesen Enzymen korrespondierenden Aminotransferasen („B“-Enzyme). Daher wurden die Enzyme LivB und LivQ aus *S. lividus* sowie NeoB und NeoQ aus *S. fradiae* vergleichend charakterisiert. Zum Nachweis der Enzymfunktionen mussten verschiedene Biosynthese-Intermediate der NEO-Biosynthese, die als potentielle Substrate der Enzyme eingesetzt werden sollten, enzymatisch synthetisiert werden: 2'-*N*-Acetylparomamin mittels einer AAC(2')-Acetyltransferase aus Paromamin, 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C wurde in einem durch die Glycosyltransferase NeoF katalysierten Umsatz aus RIB und UDP-GlcNAc gebildet, und konnte durch die Deacetylase NeoD zu 6'''-Hydroxyneomycin C umgesetzt werden.

In einem neu etablierten MTT/PMS-gekoppelten Oxidoreduktasetest konnte gezeigt werden, dass NeoQ entsprechend der postulierten Biosynthese eine bifunktionale Oxidase ist, die die 6'-Oxidation des Pseudodisaccharids Paromamin und die 6'''-Oxidation des Pseudotetrasaccharids 6'''-Hydroxyneomycin C katalysiert. LivQ oxidierte nur 6'''-Hydroxyneomycin C, und akzeptierte keines der eingesetzten Pseudodisaccharide und ist somit nur monofunktional.

Des Weiteren wurde in gekoppelten Tests geprüft, ob die Aminotransferasen LivB bzw. NeoB die durch die „Q“-Enzyme gebildeten Aldehydgruppen aminieren. Dabei katalysierte NeoB die Aminierung der beiden durch NeoQ gebildeten Substrate zu Neamin beziehungsweise Neomycin C (NEO-C). Überraschend war jedoch, dass LivB ebenfalls in der Lage war, beide Substrate zu aminieren und damit *in vitro* ebenso wie NeoB bifunktional ist. Somit ist LivQ verantwortlich dafür, dass, im Gegensatz zur NEO-Synthese, bei der LIV-Synthese nur die 6'''-Gruppe aminiert wird.

Die von *S. sp.* DSM 40477 produzierten Nebramycine (NEB) sind die einzigen 2-DOS-AGAs die eine Carbamoylgruppe aufweisen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die postulierte Carbamoyltransferase TobZ die 6''-Carbamoylierung der Substrate Kanamycin B (KAN-B) und Tobramycin (TOB) zu NEB-4 und NEB-5' katalysiert. Aber auch das strukturell ähnliche und nicht in *S. sp.* DSM 40477 vorkommende AGA KAN-A konnte durch TobZ zu 6''-O-Carbamoyl-kanamycin A carbamoyliert werden. Dieses semi-synthetische AGA wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

## 1 Summary

2-Deoxystreptamine (2-DOS) containing aminoglycosides (AGAs) are translational inhibitors acting on the 30 S subunit of the bacterial ribosome. Due to the protein synthesis inhibition AGAs are bactericidally active against gram-positive and gram-negative bacteria, and therefore they are used as broad-spectrum antibiotics. However, their application is limited by increasing resistances and also by side effects (nephro- and ototoxicity). The chemical structure of 2-DOS-AGAs consists of the central aminocyclitol 2-DOS, to which one or more modified amino sugars are attached by glycosidic bonds. The 2-DOS core of the AGAs belonging to the neomycin (NEO) family is 4,5-disubstituted, in the kanamycin (KAN) family 2-DOS is 4,6-disubstituted. The aim of this thesis was to characterize specific AGA-modifying enzymes. The profound knowledge of the enzyme activities is a necessary precondition for generating selective enzymatic modifications and biocombinatorial approaches leading to new improved therapeutics.

This work was focused on the analysis of the AGA-oxidoreductases ("Q"-enzymes) and their corresponding aminotransferases ("B"-enzymes). Therefore, the enzymes LivB and NeoB from *S. lividus* as well as the NeoB and NeoQ from *S. fradiae* were comparatively analyzed. In order to characterize the enzymes biochemically, different NEO-biosynthesis intermediates had to be synthesized enzymatically: 2'-*N*-acetylparomamine from paromamine using the AAC(2') acetyltransferase, and the production of 2'''-*N*-acetyl-6'''-hydroxyneomycin C from ribostamycin and UDP-GlcNAC was catalyzed by NeoF. 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C could be subsequently deacetylated to 6'''-hydroxyneomycin C employing the deacetylase NeoD.

Applying newly established MTT/PMS coupled oxidoreductase-assays showed that NeoQ is bifunctional as predicted in the postulated biosynthesis pathway. NeoQ catalyzed the 6'-oxidation of the pseudodisaccharide paromamine and the 6'''-oxidation of the pseudotetrasaccharide 6'''-hydroxyneomycin C. However, LivQ only oxidized the 6'''-hydroxyneomycin C and did not accept any pseudodisaccharide. Therefore, this enzyme is only monofunctional.

Furthermore coupled assays were performed to find out, if the aminotransferases LivB or NeoB do aminate the aldehyde groups generated by the "Q"-enzymes. The NeoB enzyme catalyzed the amination of both substrates generated by NeoQ yielding to neamine and neomycin C (NEO-C), respectively. Surprisingly LivB was also able to aminate the two substrates. Therefore LivB, like NeoB, is also a bifunctional enzyme *in vitro*. Consequently LivQ is responsible for the fact that only the 6'''-group is aminated in the LIV-synthesis, while in the NEO synthesis, 6' and 6''' become aminated by NeoB. The nebramycines (NEB) produced by *S. sp.* DSM 40477 are the only 2-DOS-AGAs, which possess a carbamoyl-group. This study proved the postulated function of the carbamoyltransferase TobZ, which catalyzed the 6''-carbamoylation of the substrates kanamycin B (KAN-B) to NEB-4 and tobramycin (TOB) to NEB-5'. Moreover KAN-A, that is structurally similar to TOB and KAN-B, but is not produced by *S. sp.* DSM 40477, was also modified by TobZ to 6''-*O*-carbamoyl-kanamycin A. This new semi-synthetic AGA has not been described in literature until now.

## 2 Einleitung

### 2.1 Streptomyceten

Das 1943 durch Waksman *et. al* in den Kulturen von *Streptomyces griseus* entdeckte Aminoglycosid-Antibiotikum (AGA) Streptomycin rückte die Gattung *Streptomyces*, die zur Familie der *Streptomycetaceae* und der Ordnung *Actinomycetales* innerhalb der Klasse *Actinobacteria* gehört (Stackebrandt *et al.*, 1997), in den Focus der Forschung, und damit auch den Erdboden als „Healing Soil“ (07.11.1949, Time), dem Lebensraum dieser grampositiven, aeroben Prokaryoten (Lechevalier und Lechevalier, 1970). Inzwischen wurden mehr als 500 *Streptomyces* Arten beschrieben (J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature-Genus *Streptomyces*, <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesb.html>), die fast ausnahmslos apathogen sind. Die Zuordnung zur Gattung *Streptomyces* erfolgt prinzipiell zum einen über Zellwandbestandteile, denn das Peptidoglykangerüst enthält typischerweise das LL-Isomer der Diaminopimelinsäure (Uchida und Seino, 1997), und zum anderen über 16S-rRNA Homologien (Wellington *et al.*, 1992; Mehling *et al.*, 1995; Koch *et al.*, 1996). Charakteristisch ist außerdem der hohe GC-Gehalt der genomischen DNA, der mit 61-80 % den höchsten in der Natur vorkommenden Wert erreicht (Wright und Bibb, 1992; Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003). Das Streptomyceten Genom liegt, im Unterschied zu den meisten anderen Bakterien, meist als lineares Chromosom vor, an dessen Enden Proteine gebunden sind (Volf und Altenbuchner, 2000), und ist mit einer Größe von 8-10 MBp, wie beispielsweise bei den sequenzierten Chromosomen von *S. coelicolor* A3(2) (8,7 MBp; Bentley *et al.*, 2002), *S. avermitilis* MA-4680 (9 MBp; Ikeda *et al.*, 2003) und *S. griseus* IFO 13350 (8,5 MBp; Ohnishi *et al.*, 2008), etwa doppelt so groß ist wie das Genom von *Escherichia coli* K12 (4,6 MBp; Blattner *et al.*, 1997). Die Gene des Primärmetabolismus liegen mittig des Chromosoms in der Nähe des Origin für die vegetative DNA-Replikation (Bentley *et al.*, 2002; Piepersberg *et al.*, 2007).

Streptomyceten weisen zudem einen morphologisch komplexen Lebenszyklus auf, wobei der Großteil die meiste Zeit im Erdboden als inaktive Sporen vorliegt (Kieser *et al.*, 2000). Die Sporen schützen vor Austrocknung und Nährstoffarmut, sind aber im Gegensatz zu Endosporen anderer grampositiver Bakterien, wie z.B. *Bacillus* sp., nicht resistent gegenüber extremer Hitze bzw. pH-Werten (Sonenshein, 2000). Bei guten Wachstumsbedingungen keimt die Spore aus, und bildet oberflächlich und im Medium

ein verzweigtes Netzwerk von vegetativen multi-nukleotiden Filamenten, das Substratmycel. Diese filamentöse Morphologie ermöglicht es, dabei das feste Substrat im Boden effizienter zu kolonisieren als unbewegliche, einzellige Mikroorganismen (Migueluez *et al.*, 2000). Durch physiologischen Stress, wie z. B. Nährstofflimitation, aber auch durch andere chemische Signalstoffe wird das Wachstum des Luftmycels angeregt. An den Enden der Lufthyphen werden schließlich durch Bildung von Sporulationssepten Sporen abgeschnürt. Die entstehenden Sporenketten können je nach Art eine spiralförmige Struktur aufweisen (Kieser *et al.*, 2000) und waren namensgebend für *Streptomyces* (Griechisch für „gedrehter Pilz“). Vor allem durch Wind und Tiere werden die ausgereiften Sporen, die jeweils eine Kopie des Genoms beinhalten, verbreitet, womit sich der Lebenszyklus schließt.

Aufgrund der verschiedenen morphologischen Differenzierungsstufen wurden Streptomyceten ursprünglich als Spezies zwischen Bakterien und Pilzen betrachtet, wobei die Gemeinsamkeiten zu den Pilzen auf die konvergente Evolution, der Adaption an gleiche Umweltbedingungen als saprophytische Bodenmikroorganismen, zurückzuführen sind. Durch extrazelluläre hydrolytische Enzyme, wie z. B. Agarasen,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen, Cellulasen, Chitinasen, Ligninasen, Proteasen, Xylanasen und viele mehr (McCarthy und Williams, 1992; Piepersberg, 1993; Dae *et al.*, 2008), werden schwer hydrolysierbare Naturstoffe abgebaut, so dass Streptomyceten zur Remineralisierung des Bodens im natürlichen Stoffkreislauf beitragen. Neben der industriellen Nutzung der hydrolytischen Enzyme (Hartung, 1989), sind Streptomyceten auch als Organismen zur Bioremediation von Interesse (Benimeli *et al.*, 2008; Marta *et al.*, 2009; Polti *et al.*, 2009). Außergewöhnlich ist die Biochemie der Streptomyceten jedoch vor allem hinsichtlich der produzierten Sekundärmetabolite. 67% der in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika werden von Actinomyceten produziert, wovon wiederum 80% aus der Gruppe der Streptomyceten stammen (Berdy, 1974; Piepersberg, 1993; Kieser *et al.*, 2000). Die chemischen Strukturen der in Streptomyceten produzierten Antibiotika sind dabei sehr vielfältig, so dass aus den Kulturen u. a. Aminoglycoside, Amphenicole (z.B. Chloramphenicol),  $\beta$ -Lactame (z.B. Cephamycine), Lincosamide (z.B. Lincomycin), Peptide (z.B. das Glycopeptid Vancomycin, das Lipopeptid Daptomycin oder das Peptid Actinomycin), Polyketide (z.B. Tetracycline oder Macrolide wie Erythromycin und Rifamycin) und Streptogramine (z.B. Pristinamycin) isoliert werden konnten. Doch Antibiotika sind nicht die einzigen Sekundärmetabolite, die mit dem Beginn des Luftmycelwachstums einer Kultur auf Festmedium bzw. der späten logarithmischen Phase einer Flüssigkultur produziert werden. Darüber hinaus existiert noch eine Vielzahl anderer bioaktiver Naturstoffe, die zum Teil in der Humanmedizin eingesetzt werden wie z.B. Antimykotika (z.B. Nystatin),

Cytostatika (z.B. Bleomycin), Enzyminhibitoren (z.B. der  $\alpha$ -Glucosidasehemmer Acarbose), Immunsuppressiva (z.B. Rapamycin) oder auch in der Agrarkultur zum Pflanzenschutz wie z.B. Herbizide (z.B. Bialaphos), Fungizide (Validamycin A) oder akarizid und insektizid wirkende Stoffe (z.B. Abamectin).

Ursache für die Vielfalt der Sekundärmetabolite sind die variablen Genpools der Streptomyceten, die darin begründet liegen, dass zum einen das Genom vor allem im Bereich der Chromosomenenden, wo zumeist die Biosynthesecluster der Sekundärmetabolite lokalisiert sind (Chater und Hopwood, 1993; Piepersberg *et al.*, 2002), ziemlich instabil ist (Birch *et al.*, 1990; Leblond und Decaris, 1994); und zum anderen, dass durch die zahlreich vorhandenen Transferyene, Mobilisierungsgene, Transposons bzw. Insertionssquenzen häufig horizontaler Gentransfer auftritt (Piepersberg *et al.*, 2002; 2007).

Im Gegensatz zu den gut erforschten pharmakologischen Wirkungen der Sekundärmetabolite, ist nur wenig über die ökologische Bedeutung dieser Stoffe bekannt. Sie könnten zum Schutz vor Nahrungskonkurrenten während der Sporulation gebildet werden (Chater und Merrick, 1979). Inzwischen wird jedoch auch angenommen, dass es sich um Zell-Zell-Signalmoleküle handelt (Piepersberg, 1992; 1993; 1995; Piepersberg *et al.*, 2002; Yim *et al.*, 2006; 2007). In geringen Konzentrationen, wie sie wahrscheinlich auch in der Natur zu erwarten wären, führen Antibiotika in den Targetzellen zu Modulationen globaler Transkriptionsprozesse und haben statt des antibiotischen einen hormetischen Effekt (Yim *et al.*, 2007). Beispielsweise wird der horizontale Gentransfer durch geringe Tetracyclin Konzentrationen gesteigert (Celli und Trieu-Cuot, 1998). Auch wird über die Funktion der Sekundärmetabolite als *Quorum Sensing* Signale spekuliert, denn auch das gut untersuchte *Quorum Sensing* Signal *N*-Acylhomoserin-Lacton von *Pseudomonas aeruginosa* wirkt bakterizid gegen grampositive Bakterien (Kaufmann *et al.*, 2005; Qazi *et al.*, 2006).

## 2.2 Aminoglycosid-Antibiotika

Aminoglykosidantibiotika (AGAs) bestehen aus einem oder mehreren zum Teil stark modifizierten Aminosuckerresten die glykosidisch mit einem Aminocyclitol verknüpft sind (Piepersberg, 1995; 1997; Piepersberg *et al.*, 2007). Nach der Entdeckung des Streptomycins wurden durch gezielte „Screening“ Programme viele weitere AGAs entdeckt, z. B. Neomycin (Waksman und Lechevalier, 1949), Kanamycin B (Umezawa *et al.*, 1957), Gentamicin (Black *et al.*, 1963), Tobramycin (Higgins und Kastner, 1967), Ribostamycin (Akita *et al.*, 1970), Lividomycin (Mori *et al.*, 1971) und Butirosin (Dion *et al.*, 1972). Die Hauptproduzenten sind neben *Streptomyces* spp. auch Vertreter weiterer Actinomycetales Gattungen, u. a. *Streptoverticillium*, *Streptosporangium*, *Saccharopolyspora*, *Streptoalloteichus*, *Micronospora*, *Dactylosporangium* und *Frankia* (Piepersberg, 1997; Wehmeier und Piepersberg, 2009; Wehmeier *et al.*, 2009). Sehr selten werden AGAs aus den Kulturen anderer Bakteriengruppen isoliert wie z. B. Butirosin von *Bacillus circulans* oder Sorbistin von Pseudomonaden. Nach dem Auftreten erster Resistenzen (vgl. 2.2.4) wurden zusätzlich halbsynthetische AGAs, wie z. B. die Derivate des Kanamycins: Dibekacin (Umezawa *et al.*, 1971), Amikacin (Kawaguchi *et al.*, 1972) und Arbekacin (Kondo *et al.*, 1973a; 1973b) bzw. das Gentamicin-Derivat Isepamicin (Neu und Fu, 1978) entwickelt. Während zunächst der pharmakologische Einsatz untersucht wurde, liegen die Forschungsschwerpunkte inzwischen bei (1) der Biosynthese und Physiologie der AGAs in den Produzenten, (2) den molekularen Wirkmechanismen am bakteriellen Ribosom und in Eukaryoten, (3) Resistenzmechanismen im Produzenten und in klinisch relevanten Bakterien und (4) der Ergründung des biologischen Potentials der AGAs um beispielsweise neue Anwendungsmöglichkeiten zu erfassen (Wehmeier und Piepersberg, 2009). Auf die verschiedenen Gebiete soll im Folgenden näher eingegangen werden.

## 2.2.1 AGA-Klassifizierung

AGAs können aufgrund des charakteristischen Cyclitols (Aglycon) in verschiedene Klassen unterteilt werden:

### I) Streptamin enthaltende AGAs

Hierzu zählen z. B. die in der Abb. 2.1 dargestellten AGAs Streptomycin (STR) und Spectinomycin (SPC), deren Streptamin Einheit farblich markiert ist.

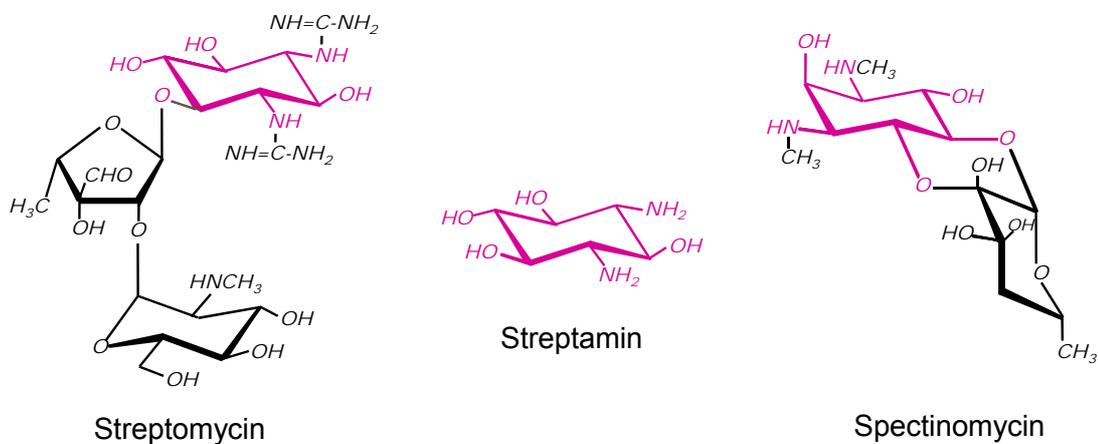
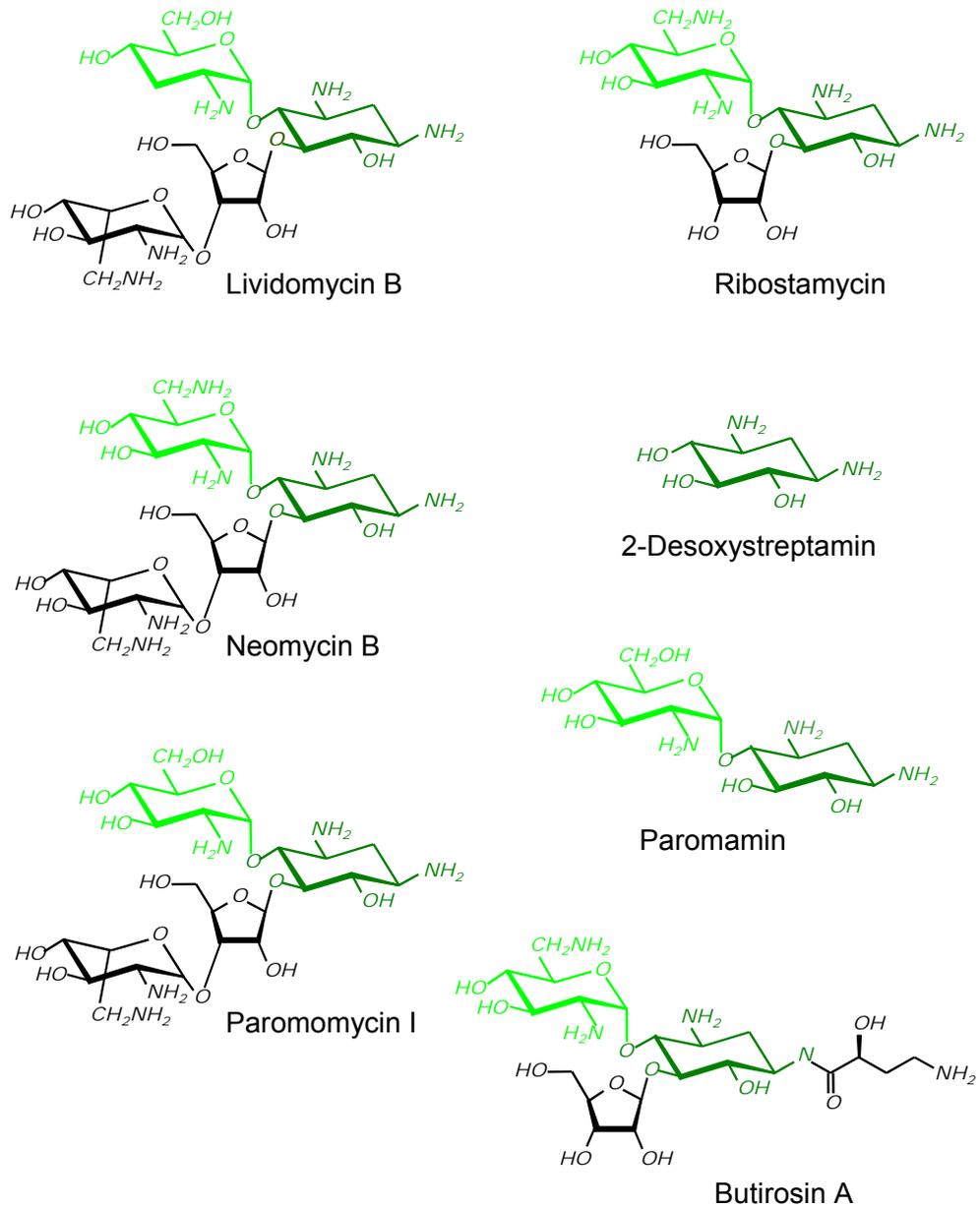


Abb. 2.1: Chemische Strukturen der Streptamin enthaltenden AGAs Streptomycin und Spectinomycin

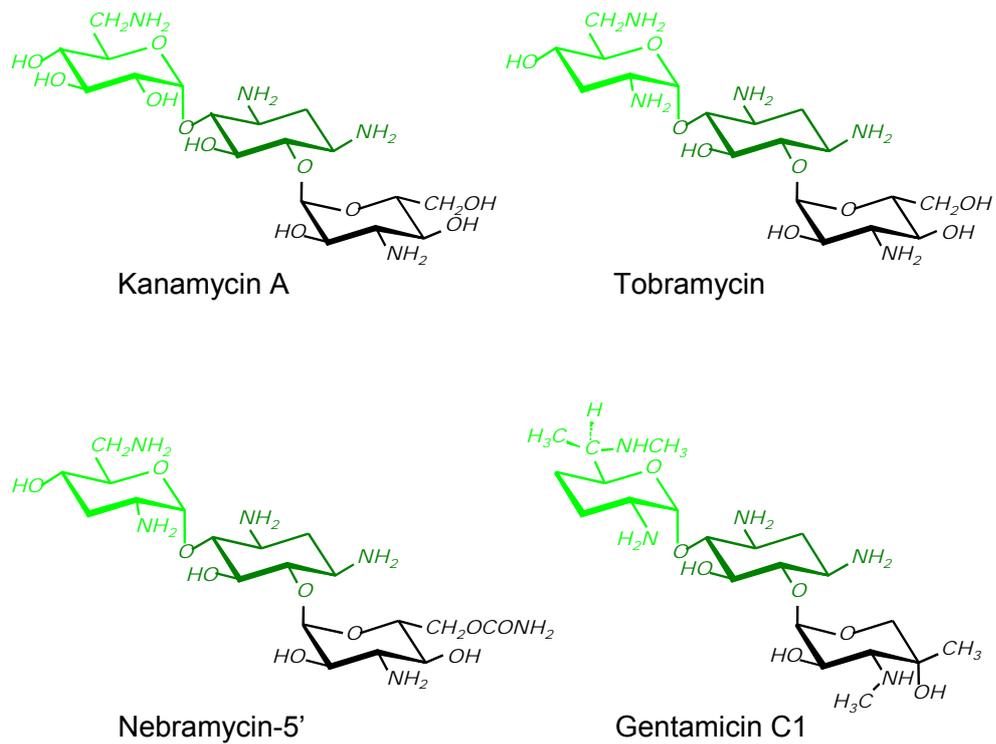
### II) 2-Desoxystreptamin (2-DOS) enthaltende AGAs, die Paromamin als Intermediat bilden

Das zentrale Biosyntheseintermediat dieser relativ homogenen Klasse von 2-DOS enthaltenden AGAs ist das Pseudodisaccharid Paromamin. Je nach Glycosylierung des 2-DOS wird weiter unterteilt, Vertreter der Neomycin (NEO)-Familie wie z. B. Neomycin, Paromomycin und Ribostamycin sind 4,5-disubstituiert (siehe Abb. 2.2), AGA der Kanamycin (KAN)/Gentamicin (GEN)-Familie sind 4,6-disubstituiert (siehe Abb. 2.3).



**Abb. 2.2: Chemische Strukturen 4,5-disubstituierter 2-DOS enthaltender AGAs**

Das charakteristische Cyclitol 2-DOS und die Paromamin-Grundstruktur sind farblich markiert.

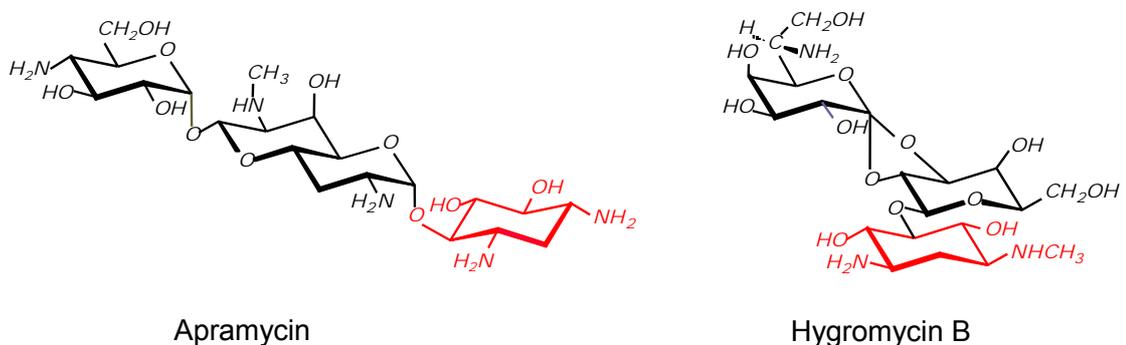


**Abb. 2.3: Chemische Strukturen 4,6-disubstituierter 2-DOS enthaltender AGAs**

Das charakteristische Cyclitol 2-DOS und die Paromamin-Grundstruktur sind farblich markiert.

### III) Monosubstituierte 2-DOS AGAs

Auch diese AGAs enthalten 2-DOS, die Glycosylierung erfolgt jedoch nur an einer Position, bei Apramycin an der 4- bzw. Hygromycin B an der 5-Position (siehe Abb. 2.4).

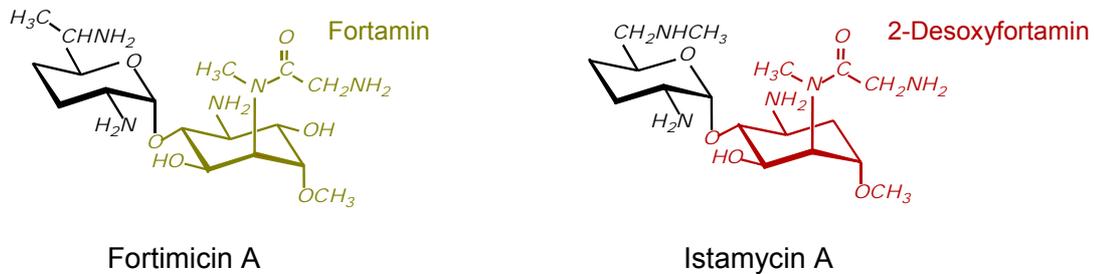


**Abb. 2.4: Chemische Strukturen der monosubstituierten AGAs Apramycin und Hygromycin B**

Das Cyclitol 2-DOS ist rot markiert.

#### IV) Fortamin und 2-Desoxyfortamin enthaltende AGAs

Die Vertreter dieser Klasse sind die Pseudodisaccharid-Aminoglycoside Fortimicin (FOR) und Istamycin (IST). Diese enthalten als Cyclitol entweder Fortamin bzw. 2-Desoxyfortamin (siehe Abb. 2.5). Dieser Cyclitolbaustein leitet sich von *myo*-Inositol bzw. 2-Desoxy-*scyllo*-Inosose ab (Piepersberg *et al.*, 2007).

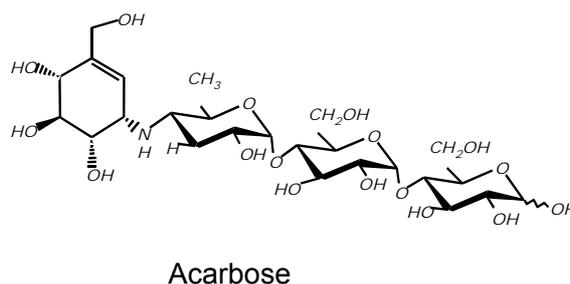


**Abb. 2.5: Chemische Strukturen von Fortamin A und Istamycin A**

Die Cyclitoleinheiten Fortamin und 2-Desoxyfortamin sind jeweils farbig hervorgehoben.

#### V) C7-Cyclitol enthaltende AGAs

AGAs dieser Klasse enthalten anstatt eines von Glucose-6-Phosphat abgeleiteten C6-Cyclitols eine C7-Cyclitoleinheit (Valienol, Valiolol, Valienamin), die ausgehend von Sedoheptulose-7-Phosphat gebildet wird. Das Valienamin ist z. B. das Aglycon des Trehalase-Inhibitors Validamycin A bzw. des nicht antibiotisch wirkenden  $\alpha$ -Glucosidase-Hemmers Acarbose (siehe Abb. 2.6).



**Abb. 2.6: Chemische Struktur von Acarbose**

### 2.2.2 Wirkmechanismus der antibiotisch aktiven AGAs

Die meisten AGAs sind Breitbandantibiotika die sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien abtöten (Kotra *et al.*, 2000). Die bakterizide Wirkung der 2-DOS-AGAs beruht auf der Bindung an die 30S Untereinheit des bakteriellen 70S Ribosoms (Moazed und Noller, 1987). Die ribosomale 30S Untereinheit setzt sich aus der 16S-rRNA und 21 Proteinen (S1-S21) zusammen, wobei 2-DOS-AGAs mit der 16S-rRNA in der A-Stelle interagieren. Die Wirkungsweise wurde vor allem durch hochauflösende NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt (Lynch *et al.*, 2003; Ogle und Ramakrishnan, 2005). In Anwesenheit des Antibiotikums werden zwei universell konservierte Reste (A1492 und A1493) ausgeschwenkt, wie es sonst auftritt, wenn eine entsprechend des Codons der mRNA komplementäre Aminoacyl-tRNA an der A-Stelle exponiert ist (Carter *et al.*, 2000; Ogle *et al.*, 2001; Vicens und Westhof, 2001; Ogle *et al.*, 2002). Diese Konformationsänderung führt dazu, dass das Ribosom nicht mehr korrekt zwischen komplementärer und nichtkomplementärer Aminoacyl-tRNA unterscheiden kann, und in Folge der verringerten Decodierungsfunktion die Fehlerrate steigt (Pape *et al.*, 2000; Magnet und Blanchard, 2005). Des Weiteren erhöht die Interaktion des 2-DOS-AGAs mit der A-Stelle die Affinität zur Aminoacyl-tRNA was zudem die Translokation inhibiert (Wirmer und Westhof, 2006). Das Ergebnis des Verlustes der translationalen Präzision ist die Synthese nicht funktioneller, fehlgefalteter Proteine, die letztlich zum Zelltod führen.

Einige 2-DOS-AGAs können auch mit der 18S-rRNA der eukaryotischen 40S Ribosomenuntereinheit wechselwirken und die Korrekturlesefunktion des Ribosoms beeinträchtigen, wodurch u. a. Stopcodons überlesen werden können (Manuvakhova *et al.*, 2000; James *et al.*, 2005). Im Falle von Krankheiten, die durch Transkripte mit frühzeitigen Stopcodons ausgelöst werden, wie z. B. Cystische Fibrose und Muskeldystrophie ist die *Nonsense-Suppression* ein gewünschter Effekt, da dieser zu einer Synthese eines funktionellen Vollängen-Proteins führen kann (Bedwell *et al.*, 1997; Senior, 1999; Wagner *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2004).

Es wurden aber auch weitere Angriffsziele der AGAs gefunden. So können AGAs mit der viralen RNA des Hepatitis-Delta-Virus (HDV) und des Humanen-Immunschwäche-Virus (HIV) interagieren, und durch Behinderung essentieller RNA-Protein-Kontakte die Replikation des viralen Genoms inhibieren (Chia *et al.*, 1997; Tok *et al.*, 2001; Bernacchi *et al.*, 2007).

### 2.2.3 Resistenz

Grundsätzlich sind anaerobe Bakterien relativ unempfindlich gegenüber AGAs, da die AGA-Aufnahme über die Plasmamembran einen hohen Protonengradienten erfordert, welcher in aeroben Bakterien durch ein sauerstoffabhängiges Elektronentransportkettensystem generiert wird (Bryan und Kwan, 1981). Intensive medizinische Anwendungen führten für die AGAs, wie auch für andere Antibiotika, zu einer zunehmenden Resistenzentwicklung vorher sensitiver Stämme. Eine Vielzahl von Resistenzgenen ist transferierbar durch R-Plasmide, Transposons, Insertionselemente und Integrons (Umezawa *et al.*, 1967; Doi *et al.*, 1968; Shaw *et al.*, 1993; Davies, 1994; Hall und Collis, 1998). Dabei werden drei Resistenzstrategien gegen AGAs unterschieden (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Shakya und Wright, 2007):

#### **(1) Modifikation des AGA-Transports**

Der Import kann bedingt durch Mutationen an bestimmten Membranproteinen, aber ebenso durch Mutationen, die ein geringes elektrochemisches Potential zur Folge haben, gestört sein (McEnroe und Taber, 1984; Young *et al.*, 1992). Daneben sind einige Bakterien dazu befähigt, das aufgenommene AGA durch Efflux-Pumpen aktiv wieder auszuschleusen (Rosenberg *et al.*, 2000; Poole, 2005).

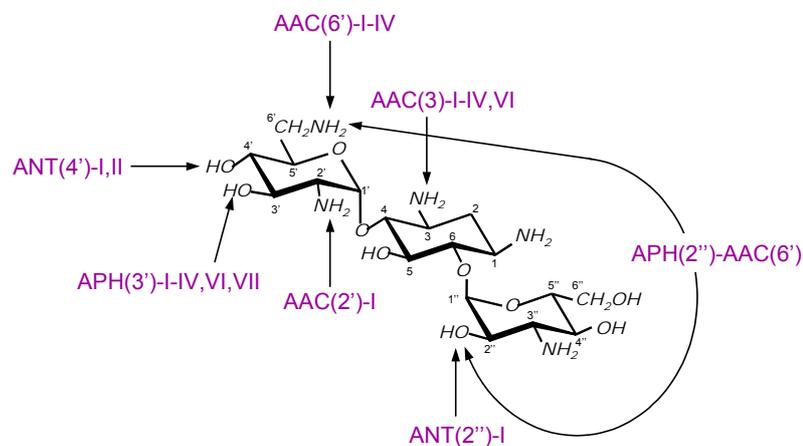
#### **(2) Modifikation/Mutation der AGA-Bindestelle im Ribosom**

Die Mutation der Base A1408 der 16S-rRNA gewährleistet eine Resistenz gegenüber 2-DOS-AGAs (Prammananan *et al.*, 1998; Recht *et al.*, 1999a; 1999b). Wichtige Kontaktbasen können aber auch durch S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferasen modifiziert werden (Galimand *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003; Doi *et al.*, 2004). Diese Methylierung gewährleistet zudem die Selbstresistenz in einigen Produzentenstämmen (siehe 4,6-disubstituierte 2-DOS-AGAs; Skeggs *et al.*, 1987).

#### **(3) AGA-modifizierende Enzyme**

Der häufigste und klinisch relevanteste Resistenzmechanismus ist die enzymatische Modifikation von NH<sub>2</sub>- bzw. OH-Gruppen an den AGA-Molekülen, die essentiell für die Wechselwirkung mit der ribosomalen 30S Untereinheit sind. Es werden drei Enzymfamilien unterschieden (siehe Abb. 2.7), die AGA O-Phosphotransferasen (APHs), die AGA O-Nucleotidyltransferasen (ANTs) und die AGA N-Acetyltransferasen (AACs) (Shaw *et al.*, 1993; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; Vakulenko und Mobashery, 2003; Shakya und Wright, 2007). APHs katalysieren die ATP-abhängige Phosphorylierung einer OH-Gruppe, ANTs sind ebenfalls ATP abhängig und vermitteln die Adenylierung einer OH-Gruppe. NH<sub>2</sub>-Gruppen werden durch AACs in einer Acetyl-Coenzym A abhängigen Reaktion acetyliert. Die Enzyme weisen eine hohe

Regioselektivität aber auch eine hohe Substratflexibilität auf, so dass ein Enzym gleich mehrere AGAs inaktivieren kann (Fong und Berghuis, 2002). Das Problem der Kreuzresistenz ergibt sich vor allem für das bifunktionale Protein AAC(6')-APH(2'') (siehe Abb. 2.7), das durch die *N*-Acetylierung der 6'-NH<sub>2</sub>-Gruppe Resistenz gegen TOB, Amikacin, Netilmicin, Dibekacin, Sisomicin, KAN und Isepamicin, und durch die O-Phosphorylierung der 2''-OH-Gruppe, Resistenz gegen KAN, Gentamicin, TOB, Sisomicin und Dibekacin verleiht (Vakulenko und Mobashery, 2003), und damit die Mehrzahl der klinisch relevanten AGAs unwirksam macht. Es existiert außerdem eine Vielzahl von Isoenzymen, die alle dieselbe Position modifizieren, deren Resistenprofil jedoch unterschiedlich ist.



**Abb. 2.7: AGA-modifizierende Enzyme als Resistenzmechanismen am Beispiel von KAN-B (nach Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999)**

Hinter den Enzymfamilien APH, ANT und AAC ist in Klammern die Position der Modifikation angegeben. Durch römische Zahlen werden Isoenzyme gekennzeichnet.

## 2.2.4 Medizinische Anwendung

Das 1943 entdeckte Streptomycin war das erste wirksame Antibiotikum gegen *Mycobacterium tuberculosis* (Schatz *et al.*, 1944), dem Erreger der Tuberkulose, und wird auch heute noch eingesetzt. Sonst wird nur eine geringe Zahl an AGAs klinisch angewendet; aufkommende Resistenzen sind dabei ebenso limitierend wie Nebenwirkungen. Da AGAs aufgrund der Hydrophilie nach oraler Gabe schlecht resorbiert werden, erfolgt die Verabreichung meist intravenös oder intramuskulär. AGAs können die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden, jedoch die Placentaschranke (Lüllmann *et al.*, 2006). Aufgrund der schlechten Membranpermeabilität dringen sie

kaum in Körperzellen ein, außer in die proximalen Tubuluszellen der Nebennierenrinde und Haarzellen des Innenohrs. Nebenwirkung können daher Nephrotoxizität (meist reversibel) und Ototoxizität (irreversibel, durch Verlust von sensorischen Zellen) sein (Mingeot-Leclercq und Tulkens, 1999; Bates, 2003; Rougier *et al.*, 2004; Guthrie, 2008). Auch wenn die Halbwertszeiten der AGAs relativ kurz sind (ca. 2 h bei Gentamicin und Tobramycin; Lockwood und Bower, 1973) haben Untersuchungen gezeigt, dass eine täglich hohe Einmaldosis besser ist, da die Nephrotoxizität geringer ist und der Erreger wirksamer im Wachstum gehemmt wird (Preston und Briceland, 1995; Urban und Craig, 1997); denn *in vitro* Tests zeigen, dass Bakterienzellen auch nach Entfernung des AGAs aus dem Medium für weitere Stunden gehemmt werden (postantibiotischer Effekt) (Zhanel und Craig, 1994). Zudem ist eine rasch folgende zweite Exposition aufgrund der transitorischen Resistenz („first exposure effect“) nicht nützlich, da die Funktionen der Bakterienzellen für einige Zeit beeinträchtigt sind. Dies bedeutet, dass auch aktive Transportmechanismen gestört sind, so dass AGAs schlecht in die Bakterienzellen aufgenommen werden, und daher nicht wirken können (Urban und Craig, 1997). Die AGA-Gabe erfolgt meist in Kombination mit  $\beta$ -Lactamantibiotika bzw. Vancomycin, da durch Störung der Zellwandbiosynthese eine erhöhte intrazelluläre AGA-Aufnahme möglich ist (synergistischer Effekt; Leibovici *et al.*, 2009). Für systemische Anwendungen werden v. a. GEN, TOB, Netilmicin und Amikacin eingesetzt. Lokal finden NEO und Paromomycin bei oraler Gabe zur Reduktion der aeroben Darmflora sowie GEN, NEO und KAN in Form von Salben, Augentropfen und Puder Anwendung.

## **2.2.5 Biosynthese von 2-Desoxystreptamin (2-DOS) enthaltenden AGAs, die Paromamin als Intermediat bilden**

### **2.2.5.1 Organisation und funktionelle Charakterisierung der Gencluster für AGAs**

Die Gene, die für die verschiedenen AGA-Biosynthesen codieren, sind in Genclustern organisiert, die fast ausschließlich auf der variablen Chromosomenregion lokalisiert sind (Piepersberg *et al.*, 2007). Während anfangs die Aufklärung der Biosynthese meist über Fütterungsversuche und Mutantanalysen erfolgte (Piepersberg und Distler, 1997; Piepersberg *et al.*, 2002), konnte nach Sequenzierung der AGA-Cluster mittels Cosmid-Klonen und anschließender Annotation der Biosyntheseweg postuliert werden

(Piepersberg *et al.*, 2007). Dadurch wird auch eine zielgerichtete Studie einzelner Gene bzw. ihrer Genprodukte ermöglicht.

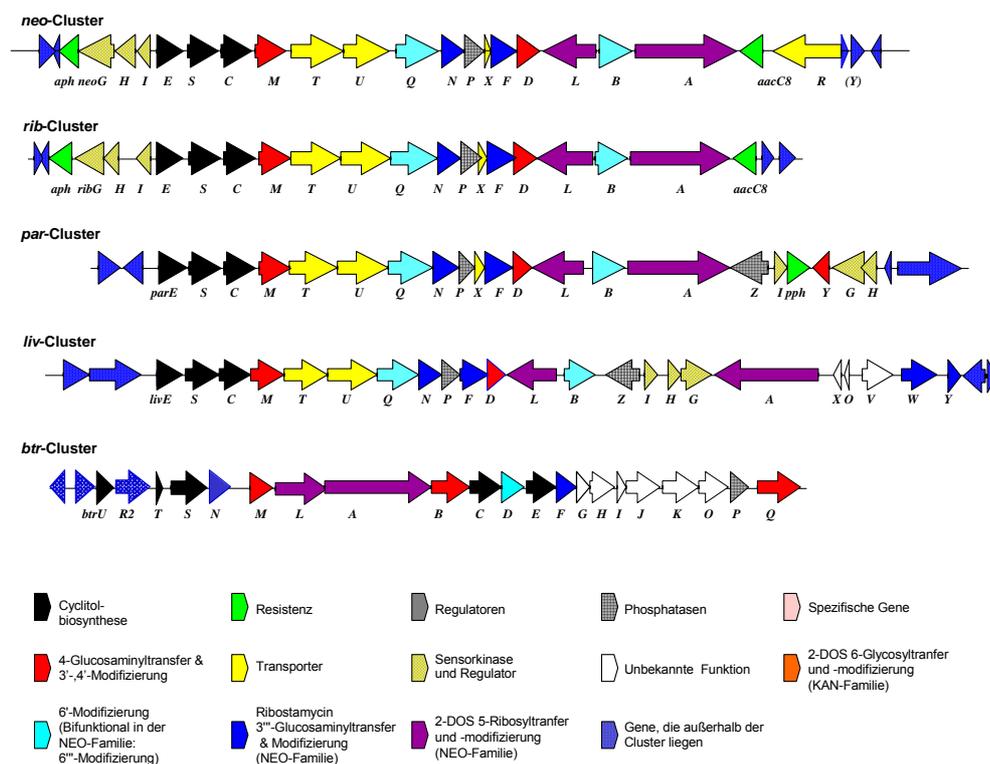
Abbildung 2.8 zeigt die Gencluster der NEO-Familie bestehend aus dem *neo*-Cluster von *S. fradiae* DSM 40063 (Accession Code AJ629247), dem *rib*-Cluster von *S. ribosidificus* NRRL-B-11466 (Accession Code AJ744850), dem *par*-Cluster von *S. rimosus* subsp. *paromomycinus* NRRL 2455 (Accession Code AJ628955), dem *liv*-Cluster von *S. lividus* CBS 844.73 (Accession Code AJ748832) und dem *btr*-Cluster von *B. circulans* ATCC 21558 (Accession Code AJ781030 und AB097196) (Piepersberg *et al.*, 2007).

Es ist zu erkennen, dass diese AGA nicht nur strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen (vgl. Abb. 2.2), auch die Cluster sind bezüglich genetischer Ausstattung und Anordnung der Gene sehr ähnlich. Beispielweise liegen in der NEO-Familie die Gene, deren Genprodukte die Synthese von 2-DOS und den ersten Glycosylierungsschritt zum Paromamin (E, S, C, M) katalysieren, immer direkt hintereinander. Im Gegensatz dazu liegen die homologen Gene (E, S1, C, M1) in den Clustern der KAN/GEN-Familie (siehe Abb. 2.9), dem *kan*-Cluster von *S. kanamyceticus* DSM 40500 (Accession Code AJ628422), dem *tob*-Cluster von *S. sp.* („*tenebrarius*“) DSM 40477 (Accession Code AJ810851) und dem *gen*-Cluster von *Micromonospora echinospora* DSM 43036 (Accession Code AJ628149) nicht zusammen (Piepersberg *et al.*, 2007). Neben den konservierten Genen, deren Genprodukte zur Synthese gemeinsamer Intermediate benötigt werden, finden sich zusätzlich in jedem Gencluster spezifische Gene für potentielle Regulatoren, für Exporter und Gene die für AGA-modifizierende Enzyme codieren und so Selbstresistenzen vermitteln (vgl. 2.2.3). Einigen Genen konnte jedoch auch keine eindeutige Funktion in Bezug auf die Biosynthesen zugewiesen werden.

#### 2.2.5.1.1 Charakterisierung der Gencluster der NEO-Familie

Die Produzenten der **4,5-disubstituierten AGAs**, d.h. *S. fradiae*, *S. ribosidificus*, *S. rimosus* subsp. *paromomycinus* und *S. lividus* weisen alle Aktivitäten für die AGA-modifizierenden Enzyme APH(3') und AAC(3) auf (Cundliffe, 1989). Daher war zu erwarten, dass entsprechende Gene auch in den Biosynthese-Genclustern identifiziert werden können. Die Abbildung 2.8 zeigt, dass sowohl das *neo*- als auch das *rib*-Cluster von zwei Resistenzgenen, einem Phosphotransferasegen (*aph*) und einem Acetyltransferasegen (*aacC8*) flankiert wird. Doch nicht immer befinden sich die Resistenzgene im Cluster, z. B. liegt das Acetyltransferasegen *aacC7* von *S. rimosus*

subsp. *paromomycinus* in einem anderen Bereich des Chromosoms (Piepersberg *et al.*, 2007), und auch im *liv*-Cluster wurde kein resistenzvermittelndes Gen gefunden. Die *neo*- und *rib*-Cluster sind nahezu identisch. Überraschend dabei ist jedoch, dass sich homologe Gene zu *neoF* und *neoN*, welche für eine Glycosyltransferase und eine Epimerase codieren, die den dritten Glycosyltransfer und die die anschließende 5''-Epimerisierung vermitteln, auch im *rib*-Cluster wiederfinden (*ribF*, *ribN*). Das ist nicht zu erwarten, denn während bei der Biosynthese von NEO in *S. fradiae* ein D-Glucosaminrest an die 3''-Position des RIB transferiert wird, bleibt diese Gruppe trotz vorhandener Gene in *S. ribosidificus* unbesetzt (vgl. Abb. 2.2). Möglicherweise ist die Ursache eine Leserahmenverschiebung in *ribN*, die auf bisher ungeklärte Weise die Glycosylierung blockiert, oder die entsprechenden Gene werden gar nicht exprimiert (Piepersberg *et al.*, 2007).



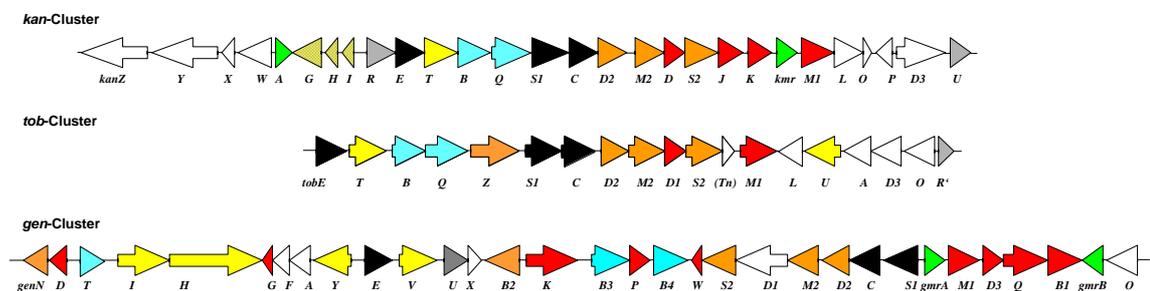
**Abb. 2.8: Gencluster der NEO-Familie**

Die Legende gibt die bekannten bzw. postulierten Funktionen der Genprodukte an und ordnet sie Gruppen zu. Die Accession Codes der Cluster in der EMBL-Datenbank werden im Text aufgeführt.

Das *btr*-Cluster weicht etwas von den anderen Genclustern innerhalb der NEO-Familie ab. Der Produzent von Butirosin *B. subtilis* ist ebenfalls zwar ein Gram positives Bakterium, weist aber im Gegensatz zu den *Actinobacteria* einen geringeren GC-Gehalt der DNA auf und zählt daher zu den *Firmicutes* (Gibbons und Murray, 1978).

### 2.2.5.1.2 Charakterisierung der Gencluster der KAN/GEN-Familie

In den Genclustern der **4,6-disubstituierten AGAs** KAN und GEN wurden Resistenzgene, die für 16S-rRNA Methyltransferasen (*kmr*, *gmrA*, *gmrB*) bzw. eine Acetyltransferase (*kanA*) codieren, identifiziert (siehe Abb. 2.9). Dagegen konnte im *tob*-Cluster kein Resistenzgen identifiziert werden. Da das *tob*-Cluster sowohl in *S. sp.* DSM 40477 als auch in anderen Produzenten wie *Streptoalloteichus hindustans* DSM 44523 und *Saccharopolyspora hirusta* DSM 43463 nie allein vorliegt, sondern immer in Koexistenz mit dem *apr*-Cluster (Piepersberg *et al.*, 2007), wird wahrscheinlich die Resistenzfunktion durch ein Gen innerhalb des *apr*-Clusters (*kamB*, 16S-rRNA Methyltransferase, vgl. Abb. 2.10) vermittelt. Die KamB Methyltransferase verursacht jedenfalls eine Resistenz gegenüber beiden AGAs.



**Abb. 2.9: Gencluster der KAN/GEN-Familie**

Die Legende ist in Abbildung 2.8 dargestellt, und die Accession Codes der Cluster in der EMBL-Datenbank werden im Text aufgeführt.

Während KAN und TOB strukturell aber auch hinsichtlich der Cluster sehr ähnlich sind (vgl. Abb. 2.3 und 2.9), ist das *gen*-Cluster ein Mix aus den *kan*- und *for*-Genclustern und unterscheidet sich deutlich in Genanzahl und Ausstattung. Höchstwahrscheinlich ist das *gen*-Cluster in *Micromonospora echinospora* durch die Fusion zweier Cluster, einer *kan*- und einer *for*-ähnlichen Vorstufe, entstanden. Denn die flankierenden Segmente haben starke Ähnlichkeit zum *for*-Cluster, mit äquivalenten Genen wie z. B. *forHIJ/genHJ*, *forD2/genQ*, *forT/genI* u. v. m., und der zentrale Teil weist homologe

Gene zum kan-Cluster u. a. *kanS1CD2N2/genS1CD2N2* (Piepersberg *et al.*, 2007). Es bestehen jedoch nicht nur Ähnlichkeiten zwischen den Genclustern, auch die chemische Struktur von GEN ist eine Mischung aus denjenigen von KAN und FOR (vgl. Abb. 2.3).



**Abb. 2.10: Das *apr*-Cluster aus *S. sp.* („*tenebrarius*“) DSM 40477**

Die Legende ist in Abbildung 2.8 dargestellt und das Cluster unter dem Accession Code AJ629123 in der EMBL-Datenbank hinterlegt.

### 2.2.5.2 Biosynthese des Paromamin-Intermediats

Umfangreiche frühere Studien haben über Isolierung von verschiedenen Produkten von idiotrophen Mutanten, d. h. Defektmutanten, die die Fähigkeit zur Synthese des Sekundärstoffes verloren haben, und durch Fütterungsversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen, 2-DOS und Paromamin als Intermediate bei der Biosynthese von 2-DOS AGAs der NEO- und KAN/GEN-Familie identifiziert (Shier *et al.*, 1969; Claes *et al.*, 1973; Rinehart und Stroshane, 1976; Testa und Tilley, 1976; Fang *et al.*, 1984). Die Synthese des Paromamins ist für den NEO-Produzenten *S. fradiae* inzwischen vollständig aufgeklärt (vgl. Abb. 2.11).

Die Biosynthese beginnt mit der Zyklisierungsreaktion von Glucose-6-phosphat, des zentralen Metaboliten im Primärstoffwechsel, zu 2-Desoxy-*scyllo*-inosose. Die Zyklisierung wird durch die 2-Desoxy-*scyllo*-inosose Synthasen („C“-Enzyme, Piepersberg *et al.*, 2007) katalysiert, wobei  $\text{NAD}^+$  und  $\text{Co}^{2+}$  als Co-Faktoren benötigt werden (Kudo und Eguchi, 2009). Diese Reaktion konnte bereits für viele homologe „C“-Enzyme aus verschiedenen Clustern gezeigt werden u. a. NeoC (Yamauchi und Kakinuma, 1992; Kudo *et al.*, 2005), KanC (Kharel *et al.*, 2004b; Aboshanab, 2005; Thuy *et al.*, 2005), TobC (Kharel *et al.*, 2004a), RibC (Subba *et al.*, 2005) bzw. BtrC (Kudo *et al.*, 1999); für letzteres wurde auch die Kristallstruktur veröffentlicht (Nango *et al.*, 2008). Das Gen für die 2-Desoxy-*scyllo*-inosose Synthase eignet sich daher auch gut als Biomarker zur Identifikation von 2-DOS enthaltenden AGAs (Piepersberg *et al.*, 2007; Kudo und Eguchi, 2009). Die 2-Desoxy-*scyllo*-inosose wird in einer PLP

abhängigen Aminotransferase-Reaktion mit L-Glutamat als Aminogruppen-Donor zu 2-Desoxy-*scyllo*-inosamin aminiert. Diese durch ein „S(1)“-Enzym katalysierte Reaktion konnte bereits für NeoS (Huang *et al.*, 2005; Kudo *et al.*, 2005), BtrS (Huang *et al.*, 2002; Tamegai *et al.*, 2002), KanS1 (Aboshanab, 2005), und TobS1 (Kharel *et al.*, 2005) gezeigt werden. Die Kristallstruktur von BtrS veranschaulicht die Bindung von PLP bzw. PMP in dieser Aminotransferase (Popovic *et al.*, 2006).

Anschließend wird die Hydroxylgruppe an Position 1 in einer NAD<sup>+</sup> abhängigen Reaktion oxidiert. Die Dehydrogenasen NeoE (Kudo *et al.*, 2005) und KanE (Aboshanab, 2005) benötigen zur Katalyse der Oxidation zusätzlich Zn<sup>2+</sup>-Ionen als Co-Faktor. Beim BTR-Biosyntheseweg ist zwar ein homologes BtrE Protein vorhanden, durch das Fehlen von zwei Zink-Bindemotiven ist es jedoch scheinbar nicht in der Lage diese Oxidation zu katalysieren. Die Bildung der Ketogruppe wird stattdessen wahrscheinlich durch BtrN, einer Radikal-SAM-Dehydrogenase, katalysiert (Yokoyama *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 2008a). Es folgt eine zweite Aminierung durch die „S(1)“-Aminotransferase, wobei 2-Desoxystraptamin (2-DOS) entsteht. Die Enzyme NeoS, BtrS und KanS1 sind nachweislich bifunktional, d. h. sie haben die Fähigkeit sowohl den Aminotransfer auf 2-Desoxy-*scyllo*-inosose als auch auf 1-Keto-2-desoxy-*scyllo*-inosamin zu katalysieren (Yokoyama *et al.*, 2005). Der nächste Schritt in der Biosynthese ist eine Glycosylierung, bei der ein *N*-Acetyl-Glucosaminrest auf 2-Desoxystreptamin übertragen wird. Es wurde gezeigt, dass die Glycosyltransferasen NeoM und KanM1 in Anwesenheit von UDP-*N*-Acetyl-D-glucosamin und Mg<sup>2+</sup> 2'-*N*-Acetylparomamin bilden (Fan *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008b). Und schließlich wird die 2'-*N*-Acetyleinheit durch eine Deacetylase („D“-Enzyme der NEO-Familie bzw. KanN) entfernt und Paromamin gebildet (Truman *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008b).

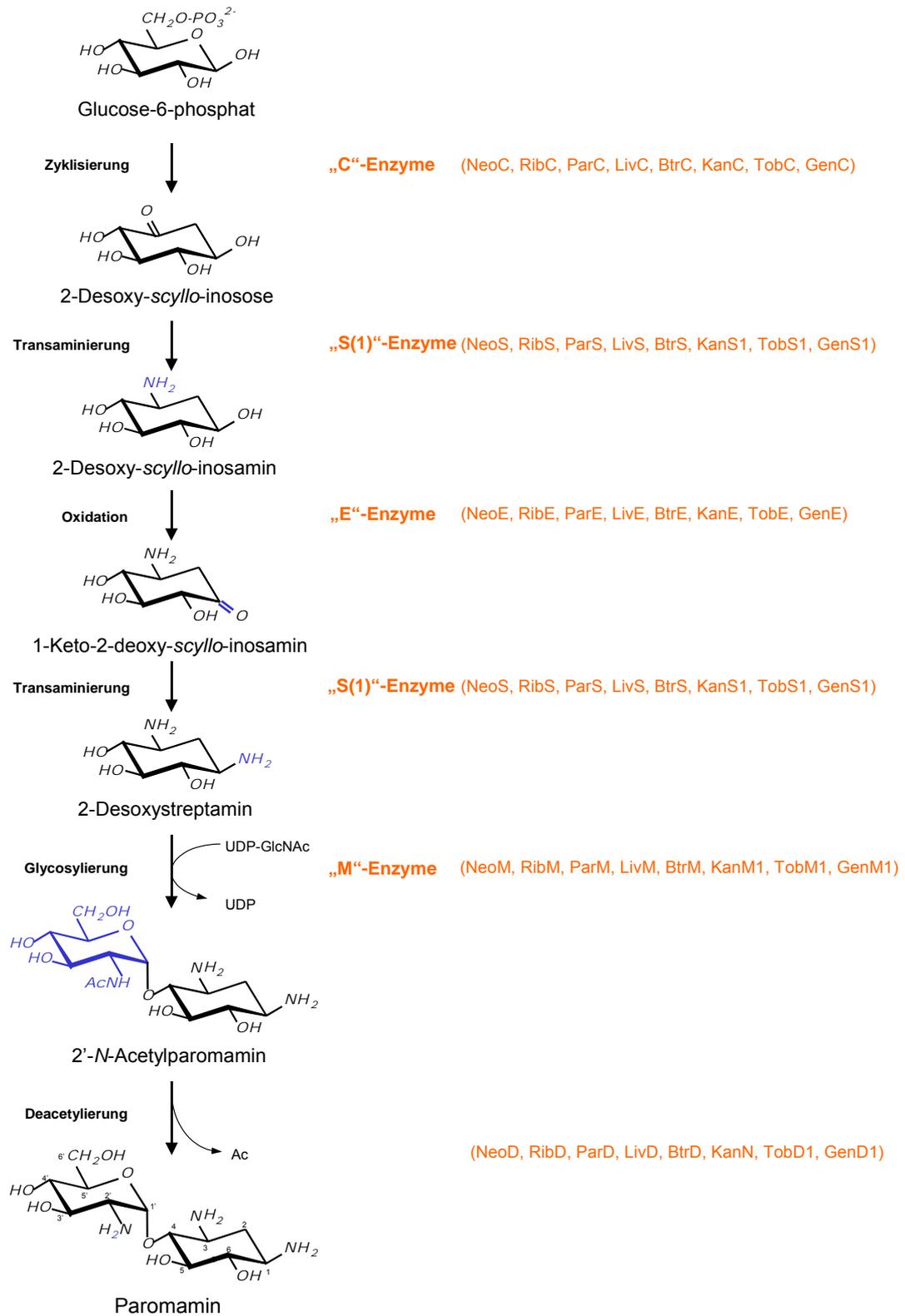


Abb. 2.11: Biosyntheseweg des Paromamins

### 2.2.5.3 Biosynthese von Neomycin und Lividomycin

Während es bereits eine Vielzahl von Erkenntnissen zur Synthese des Neomycins in *S. fradiae* gibt, sind wenig experimentelle Daten zur Lividomycin Biosynthese in *S. lividus* vorhanden. Die chemische Struktur und zum *neo*-Cluster homologe Gene ermöglichen es jedoch, eine Biosynthese zu postulieren, die der NEO-Synthese sehr ähnlich ist (vgl. Abb. 2.12; Piepersberg *et al.*, 2007).

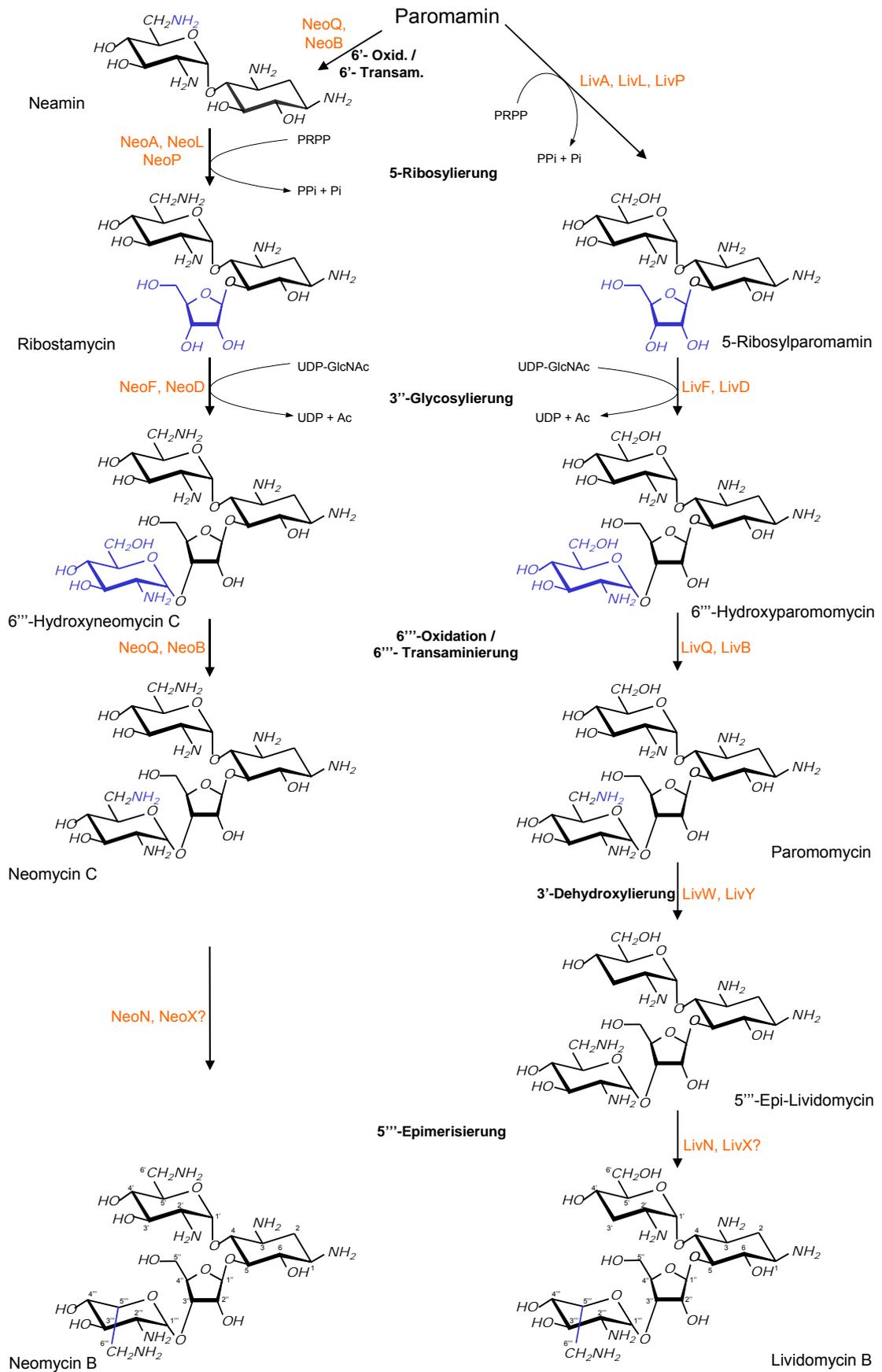
Paromamin ist das letzte gemeinsame Intermediat in der Synthese von NEO und LIV. Der nächste Schritt in der NEO-Biosynthese ist die Bildung des Neamins durch zwei aufeinanderfolgende Reaktionen an der 6'-Position des Paromamins, einer Oxidation katalysiert durch NeoQ, und einer durch NeoB katalysierten Aminierung der entstandenen Ketogruppe in einer PLP abhängigen Reaktion mit L-Glutamat bzw. L-Glutamin als Aminogruppendonor (Huang *et al.*, 2007).

Es schließt sich eine Ribosylierung mittels 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat (PRPP) an, aus der RIB entsteht. Die postulierten Enzyme für diese Reaktion in der NEO-Synthese sind NeoA, NeoL und NeoP. Für die BTR-Synthese wurde bereits gezeigt, dass die Ribosylierung in zwei Schritten abläuft: einer durch BtrL katalysierten Phosphoribosylierung von Neamin zu 5''-Phosphoribostamycin, gefolgt von einer BtrP katalysierten Dephosphorylierung zu Ribostamycin (Kudo *et al.*, 2007). Bei der LIV-Synthese bleibt die 6'-OH-Gruppe erhalten und Paromamin wird wahrscheinlich direkt durch LivA, LivL und LivP zu 5'-Ribosylparomamin ribosyliert (Piepersberg *et al.*, 2007).

Als nächstes folgt in beiden Synthesewegen eine weitere Glycosylierungsreaktion. Die Glycosyltransferase NeoF katalysiert in Anwesenheit von divalenten Metallionen ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) den Transfer der *N*-Acetyl-D-glucosamin-Einheit von UDP-GlcNAc auf RIB. Die Deacetylase NeoD entfernt die 2'''-*N*-Acetyleinheit, so dass 6'''-Hydroxyneomycin C gebildet wird (Fan *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008b).

Die zu NeoF und NeoD homologen Proteine LivF und LivD können sehr wahrscheinlich bei der LIV-Synthese eine homologe Reaktion katalysieren, so dass hier 6'''-Hydroxy-paromomycin entsteht (Piepersberg *et al.*, 2007).

Die Synthese von NEO und LIV setzt sich fort mit einer Transaminierung der 6'''-Position, wobei die Produkte Neomycin C (NEO-C) in der NEO-Biosynthese bzw. Paromomycin in der LIV-Biosynthese gebildet werden. Diese Reaktion wird wahrscheinlich bei der NEO-Biosynthese analog der Bildung des Neamins wieder durch die Oxidoreduktase NeoQ und die Aminotransferase NeoB katalysiert (Huang *et al.*, 2007), die somit bifunktional sind. Die homologen Enzyme im LIV-Produzenten sind

Abb. 2.12: Biosynthesewege von Neomycin B in *S. fradiae* und Lividomycin B in *S. lividus*

LivQ und LivB, die allerdings diese Reaktion offenbar nur in der 6''-Position des Pseudotetrasaccharids katalysieren können.

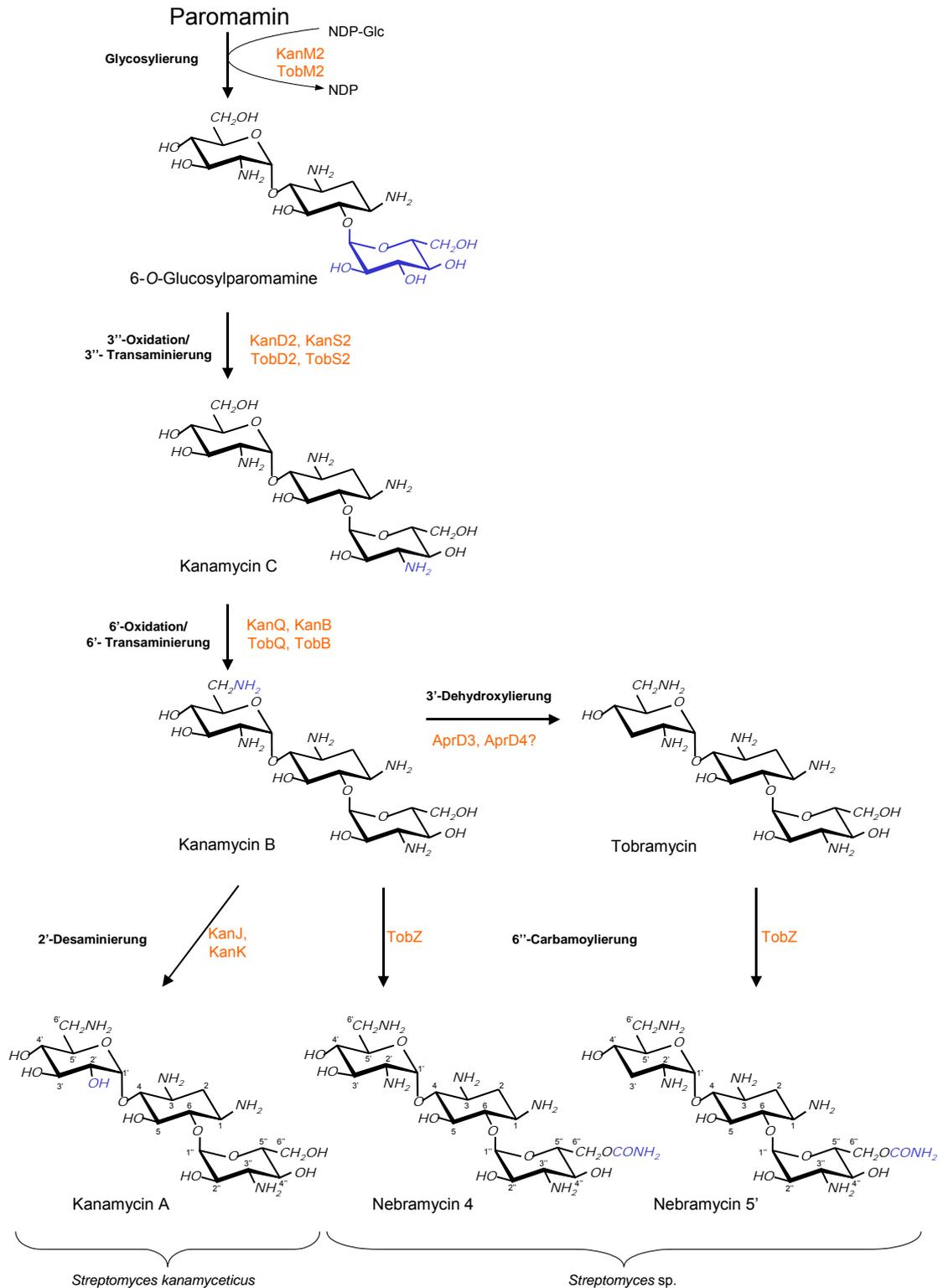
Während NEO-C direkt zu NEO-B in einer Epimerisierungsreaktion an der 5''-Position umgewandelt wird, erfolgt bei der LIV-Synthese zunächst eine 3'-Dehydroxylierung, bevor die 5''-Epimerisierung zu LIV-B stattfindet (Piepersberg *et al.*, 2007). Katalysiert wird die 3'-Dehydroxylierung wahrscheinlich durch LivW und LivY, deren Funktion in einem anderen Zusammenhang, bei der 3'-Dehydroxylierung von Kanamycinen in den Mutanten  $\Delta kanQ::livWY$  und  $\Delta kanD2::livWY$ , nachgewiesen wurde (Mühlenweg *et al.*, eingereichtes Manuskript).

#### 2.2.5.4 Biosynthese von Kanamycin und Nebramycinen

*S. kanamyceticus* produziert ein Gemisch aus den Kanamycinen A, B und C (Cron *et al.*, 1958), und auch in *S. sp.* DSM 40477 werden verschiedene Nebramycine synthetisiert, wobei die Hauptkomponenten die Faktoren Neb-4 (=6''-O-Carbamoylkanamycin B), Neb-5 (=Kanamycin B), Neb-5' (=6''-O-Carbamoyltobramycin) und Neb-6 (=Tobramycin) sind (Stark *et al.*, 1967; Pauncz, 1978). Bisher wurden einzelne Proteine aus dem *neo*- und *tob*-Cluster zur Bildung des Paromamins charakterisiert (vgl. 2.2.5.2). Und auch die heterologe Produktion von Paromamin in *S. lividans* TK24 gelang durch die simultane heterologe Expression der Gene *kanC*, *kanS1*, *kanE*, *kanM1* und *kanN* (Nepal *et al.*, 2009). Die weiteren postulierten Schritte zur Biosynthese der Vielzahl an genannten Produkten bei *S. kanamyceticus* und *S. sp.* DSM 40477 basieren auf *in silico* Analysen und werden in Abbildung 2.13 gezeigt (Piepersberg *et al.*, 2007).

Mit Hilfe der Glycosyltransferase KanM2 bzw. TobM2 wird aus Paromamin und nukleotidaktivierter D-Glucose (eventuell UDP-Glucose) 6-O-Glucosylparomamin gebildet. Durch die Wirkung der Dehydrogenase KanD2/TobD2 wird die 3''-Position des 6-O-Glucosylparomamins oxidiert, und die Ketogruppe anschließend durch die Aminotransferase KanS2/TobS2 aminiert, so dass KAN-C entsteht. Das Fehlen von 3''-NH<sub>2</sub>-Gruppen in den Syntheseprodukten von *kanD2* Mutanten bestärkt die postulierte Reaktion (Mühlenweg *et al.*, eingereichtes Manuskript).

Es folgt eine Aminierung der 6'-Hydroxylgruppe, die wahrscheinlich durch KanQ/TobQ und KanB/TobB katalysiert wird. Analysen von *kanQ* Mutanten bestätigen die postulierte 6'-Oxidation, da den produzierten Substanzen die 6'-NH<sub>2</sub>-Gruppe fehlt (Mühlenweg *et al.*, eingereichtes Manuskript).

Abb. 2.13: Biosynthesewege in *S. kanamyceticus* und *S. sp.* DSM40477

Das entstandene KAN-B wird in *S. kanamyceticus* voraussichtlich durch KanJ und KanK zum Hauptprodukt KAN-A desaminiert. In *S. sp.* DSM 40477 erfolgt keine 2'-Desaminierung, stattdessen wird die 3'-Position entweder dehydroxyliert oder KAN-B direkt zu NEB-4 carbamoyliert. Es konnten keine Gene für Proteine, die die 3'-Dehydroxylierung katalysieren, im *tob*-Cluster gefunden werden. Es wird aber spekuliert, dass die Proteine AprD3 und AprD4 die in dem *S. sp.* DSM 40477 koexistenten *apr*-Cluster codiert werden (siehe Abb. 2.10), diese Funktion wahrnehmen. HPLC-MS und NMR Analysen zeigten, dass nach dem Einbringen der Gene *aprD3* und *aprD4* in *S. kanamyceticus* Endprodukte mit fehlender 3'-OH-Gruppe gebildet werden, und die Enzyme AprD3/D4 funktionell homolog zu LivWY aus dem *liv*-Cluster sind (Mühlenweg *et al.*, eingereichtes Manuskript). Durch die 3'-Dehydroxylierung entsteht Tobramycin (TOB), das zu NEB-5' carbamoyliert werden kann. Katalysiert wird die 6''-Carbamoylierung von KAN-B und TOB höchstwahrscheinlich durch TobZ.

## 2.3 Spezielle Enzymgruppen, die an der Biosynthese der AGAs beteiligt sind

### 2.3.1 Oxidoreduktasen und Aminotransferasen

Redoxreaktionen sind nicht nur im Zellstoffwechsel essentiell, sondern auch bei der Biosynthese der AGAs. Durch die Oxidation wird eine Ketosäure gebildet auf die, katalysiert durch Aminotransferasen (auch Transaminasen genannt, EC 2.6.1), reversibel einer Aminogruppe von einer Aminosäure übertragen werden kann (Mehta *et al.*, 1993).

Bei der Synthese der AGAs der NEO-, KAN- und GEN-Familien sind zur Synthese des 2-DOS-Cyclitols zwei Aminotransferasereaktionen notwendig (vgl. Abb. 2.11), die wie bereits für die BTR-, NEO- und KAN-Biosynthese gezeigt wurde, von einem einzigen Enzym (NeoS, BtrS, KanS1) katalysiert werden (Yokoyama *et al.*, 2005; Piepersberg *et al.*, 2007). Diese bifunktionalen Aminotransferasen haben PLP als Co-Faktor gebunden und verwenden L-Glutamin als Aminodonor. Der präzise Substraterkennungsmechanismus ist jedoch trotz vorhandener Kristallstruktur des BtrS noch ungeklärt (Popovic *et al.*, 2006). Die „S(1)“-Aminotransferasen sind jedoch nicht die einzigen bifunktionalen Enzyme, ebenso sollen die Oxidoreduktase NeoQ und die

Aminotransferase NeoB, die L-Glutamat bzw. L-Glutamin als Aminodonor verwendet, in der NEO-Biosynthese zwei Reaktionen katalysieren, wobei das Pseudodisaccharid (Paromamin) und das Pseudotetrasaccharid (6''-Hydroxy-neomycin C) als Substrat erkannt werden (Huang *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu scheinen homologe Proteine der LIV- und PAR-Biosynthese nur ein Pseudotetrasaccharid als Substrat zu erkennen. Aminogruppen sind wesentlich für die Funktion der AGAs, dies zeigt sich u. a. deutlich beim Vergleich der Minimalen Inhibitor Konzentrationen (MIC) von Paromamin (6'-OH Gruppe) und Neamin (6'-NH<sub>2</sub> Gruppe, vgl. 2.2.5.3). Beispielsweise wurden für *Bacillus subtilis* PCI 219 MIC's von 125 µg/ml für Paromamin und von 4 µg/ml für Neamin angegeben (Tatsuta *et al.*, 1967), d.h. es braucht die 32 fache Menge an Paromamin um den gleichen inhibitorischen Effekt wie Neamin zu erzielen. Es ist daher auch nicht überraschend, dass die NH<sub>2</sub>-Gruppen der AGA-Moleküle Angriffspunkt für resistenzvermittelnde *N*-Acetyltransferasen sind. Da die Interaktionen der AGAs mit der rRNA bereits bekannt sind (Carter *et al.*, 2000; Lynch und Puglisi, 2001), könnte durch das gezielte Einfügen neuer NH<sub>2</sub>-Gruppen die antibiotische Wirkung möglicherweise erhöht werden, da die Bindung zum Substrat verstärkt werden könnte. Andererseits könnten durch das Entfernen von NH<sub>2</sub>-Gruppen Resistenzmechanismen umgangen werden. Daher ist die Kenntnis der Substratspezifitäten der Oxidoreduktasen und Aminotransferasen Voraussetzung für weitere biokombinatorische Ansätze.

### 2.3.2 Carbamoyltransferasen

Carbamoyltransferasen (auch Transcarbamoylasen genannt, EC 2.1.3) katalysieren die Übertragung eines Carbamoyl-Restes. Vor allem zwei Carbamoyltransferasen des Primärstoffwechsels wurden sehr gut untersucht, die Aspartat- und die Ornithin-Carbamoyltransferase (Houghton *et al.*, 1984; Kantrowitz und Lipscomb, 1988; Gordon, 2003). Beiden Carbamoyltransferasen gemein ist die Übertragung des Carbamoylrestes auf eine Amino-Gruppe.

Es wurden aber auch Sekundärmetabolite, die eine Carbamoylgruppe tragen, identifiziert, z. B. das Zytostatikum Mitomycin (Poletto *et al.*, 1968), das  $\beta$ -Lactam Antibiotikum Cephameycin (Coque *et al.*, 1995), das Macrolid-Antibiotikum Concanamycin A (Haydock *et al.*, 2005), das Streptamin enthaltende AGA Bluensomycin (Walker, 1990), das Aminocumarin-Antibiotikum Novobiocin (Xu *et al.*, 2004) und die Nebramycine (Piepersberg *et al.*, 2007). Zum Teil wurden in den Biosyntheseclustern Gene gefunden, die für mögliche Carbamoyltransferasen

codieren. Durch Sequenzvergleiche konnte das AS-Motiv VxHHxAH identifiziert werden, welches typisch ist für Enzyme mit O-Carbamoylierungsaktivität, die z. B. in Carbamoylierungen von Antibiotika und Nodulationsfaktoren involviert sind (Blokesch *et al.*, 2004). Auch die vermeintliche O-Carbamoyltransferase TobZ der NEB-Biosynthese enthält dieses Motiv **VQHHLAH** (AS 112-118).

*In vitro* Tests mit der Carbamoyltransferase NovN, die an der Synthese von Novobiocin in *Streptomyces spheroides* beteiligt ist (Freel Meyers *et al.*, 2003), und Untersuchungen zu CmCH, der Carbamoyltransferase zur Synthese von Cephamycin in *Streptomyces clavuligerus* (Brewer *et al.*, 1980; Coque *et al.*, 1995), zeigen, dass beide Transferasen Carbamoylphosphat als Carbamoylgruppendonor verwenden und ATP-abhängig sind.

## 2.4 Ziele dieser Arbeit

Auf Grundlage von Sequenzierungen des *neo*-Genclusters aus *S. fradiae*, des *liv*-Clusters aus *S. lividus* bzw. *tob*-Genclusters aus *S. sp.* DSM 40477 (vgl. 2.2.5.1) und nachfolgenden *in silico* Analysen konnten die NEO-/LIV- bzw. die NEB-Biosynthesen postuliert werden (siehe 2.2.5.2-4; Piepersberg *et al.*, 2007). Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Enzymen, die die Grundstruktur der AGAs während der Synthese modifizieren, und auch für mögliche Modifizierungen in biokombinatorischen Ansätzen genutzt werden könnten.

Die Oxidoreduktase NeoQ und die Aminotransferase NeoB sollten bei der NEO-Biosynthese die Oxidation und Aminierung sowohl der 6' als auch der 6'''-Position katalysieren und somit bifunktional sein. Die zu NeoQ und NeoB homologen Enzyme LivQ und LivB des *liv*-Clusters katalysieren dagegen vermutlich nur die Oxidation und Aminierung der 6'-Position. Zum Nachweis dieser postulierten Enzymfunktionen mussten zuerst die benötigten Biosynthese-Intermediate, die als Substrate in *in vitro* Tests eingesetzt werden sollten, biochemisch produziert werden. Die Enzym-Eigenschaften der Proteine sollten dann überprüft werden, um Aussagen zu ihren Substratspezifitäten, benötigten Cofaktoren und der Möglichkeit, sie zur Produktion neuer Derivate zu verwenden, zu erhalten. Dazu mussten die Proteine heterolog überproduziert werden, und sollten zum Teil auch für weitere Kristallisierungsstudien vorbereitet werden.

Des Weiteren sollte die Funktion der postulierten Carbamoyltransferase TobZ untersucht werden. Das *tobZ*-Gen ist das bisher einzige Carbamoyltransferasegen, das

in einem AGA-Biosynthescluster identifiziert wurde. Neben der Carbamoylierung der natürlichen Substrate sollte untersucht werden, ob AGAs anderer Produzenten als Substrate von TobZ carbamoyliert werden können, um so in einem Schritt auch neue AGAs synthetisieren zu können.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

#### Chemikalien:

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, München
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich, München
Acetyl-Coenzym A (CoA)	Roche, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Amersham/GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Agarose	Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München Peqlab, Erlangen
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bradford Reagenz	BioRad, München
Carbamoylphosphat (CAP)	Sigma-Aldrich, München
Chemikalien p. a. Qualität	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, München
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Ninhydrin	Roth, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden Sigma-Aldrich, München
Phenazinmethosulfat (PMS)	Sigma-Aldrich, München
Pyridoxalphosphat (PLP)	Sigma-Aldrich, München
Uridine-5'-diphospho- <i>N</i> -acetylglucosamin (UDP-GlcNAc)	Sigma-Aldrich, München

Weiterhin verwendete, hier jedoch nicht aufgeführte Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „pro analysi“ und wurden von den Firmen, Difco, Gibco-BRL, Merck, Serva, Sigma-Aldrich oder Roth bezogen.

#### Antibiotika:

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Apramycin	Sigma-Aldrich, München
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Kanamycin A	Sigma-Aldrich, München
Kanamycin B	Sigma-Aldrich, München
Paromamin	Roussel Uclaf, Romainville, Frankreich
Paromomycin	Sigma-Aldrich, München
Ribostamycin	Sigma-Aldrich, München
Tobramycin	Sigma-Aldrich, München
Thiostrepton	Squibb and Sons, Princeton, USA
Gentamicin	Serva, Heidelberg

#### Enzyme:

BioTherm <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Genecraft, Köln
DNA Polymerase I Klenow Fragment	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNase I	Sigma-Aldrich, München
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
	Roche, Mannheim
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich, München
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Kits:

## Proteinbestimmung/ Proteinmodifizierung:

Bradford Reagenz	BioRad, München
Roti-Nanoquant	Roth, Karlsruhe
One-Step Complete Western Blot Kit	Genscript, New Jersey, USA
Xa Removal Resin	Qiagen, Hilden
DNA-Aufbereitung und PCR:	
peqGold Plasmid Miniprep Kit	Peqlab, Erlangen
Roti-Prep Plasmid	Roth, Karlsruhe
Gel-Extraktions Kit	Genscript, New Jersey, USA
peqGold Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
DNA-Purification Kit	Genscript, New Jersey, USA
MiniPrep Kit	Genscript, New Jersey, USA
Phusion High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs, Schwalbach

Verschiedene Materialien:

3 MM Whatman paper	Roth, Karlsruhe
DC-Alufolien Kieselgel 60 F254	Macherey-Nagel, Düren
	Merck, Darmstadt
Hybond P	Amersham/GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Polymeric Solid Phase Extraction (SPE-Säulen, Strata-X-C)	Phenomenex, Aschaffenburg
Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren	Vivascience AG Hannover
Immobilon-P	Millipore GmbH, Schwalbach
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Roth, Karlsruhe

## 3.2 Bakterienstämme

**Tabelle 3.1: Verwendete *E.coli* Stämme**

Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1</i> $\lambda$ <i>gyrA96 relA1</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Hanahan, 1983
JM109	e14 <sup>-</sup> ( <i>mcrA</i> <sup>-</sup> ) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 relA1</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) [F <sup>+</sup> <i>traD36</i> <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>f</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]	Yanisch-Perron et al., 1985
JM109(DE3)	<i>E. coli</i> JM109, $\lambda$ (DE3)	Promega, Heidelberg
JM109(DE3)pRare	<i>E. coli</i> JM109(DE3), <i>cam</i> , tRNA-Codons: AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA	Novagen, Bad Soden
ET12567	F <sup>-</sup> <i>dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR recF143</i> <i>zjj201::Tn10 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6</i> <i>thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl glnV44</i>	Oh und Chater, 1997
ETpUZ	wie <i>E. coli</i> ET12567, pUZ8002 (Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	Paget et al., 1999
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm gal</i> $\lambda$ (DE3)	Studier und Moffatt, 1986
BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ Prophage-T7 RNA Poly- merasegen pLysS <i>cat</i>	Novagen, Bad Soden
ArcticExpress™ (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> <sup>+</sup> <i>endA Hte</i> (Tet <sup>r</sup> ) [ <i>cpn10 cpn60 Gent</i> <sup>r</sup> ] $\lambda$ (DE3)	Stratagene, Amsterdam, NL
Rosetta™2(DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> <sup>+</sup> <i>lacY1</i> pLysS/RARE ( <i>argU argW ilex glyT leuW proL Cm</i> <sup>r</sup> ) $\lambda$ (DE3)	Novagen, Bad Soden

**Tabelle 3.2: Verwendete Streptomycceten-Stämme**

Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
<i>S. coelicolor</i> A3(2) M145	Act <sup>+</sup> , Upd <sup>+</sup>	Kieser et al., 2000
<i>S. lividans</i> 66 TK23	<i>spc-1 SLP2</i> <sup>-</sup> <i>SLP3</i> <sup>-</sup>	Kieser et al., 2000
<i>S. lividans</i> 66 TK64	<i>pro-2 str-6 SLP2</i> <sup>-</sup> <i>SLP3</i> <sup>-</sup>	Kieser et al., 2000
<i>S. kanamyceticus</i>	Kanamycinproduzent	DSM 40500

**Tabelle 3.3: andere Bakterien**

Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
<i>Micrococcus luteus</i>	Aminoglykosidantibiotika sensitiver Stamm	DSM 348

### 3.3 Vektoren und rekombinante Plasmide

**Tabelle 3.4: Vektoren**

Vektor	Eigenschaften	Herkunft
pAC11	<i>cam lacI P<sub>T7-<math>\phi</math>10</sub> lacO s10-leader p15A-ori</i>	Wehmeier und Rockser, unveröffentlicht, 2008
pAC16	<i>cam lacI P<sub>T7-<math>\phi</math>10</sub> lacO s10-leader p15A-ori</i>	Wehmeier und Rockser, unveröffentlicht, 2008
pAC2775	<i>cam P<sub>rhaBAD</sub> rnb His-tag ColE1-ori</i>	Wehmeier und Rockser, unveröffentlicht, 2008
pET11a	<i>bla lacI P<sub>T7-<math>\phi</math>10</sub> lacO s10-leader ColE1-ori</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
pET16b	<i>bla lacI P<sub>T7-<math>\phi</math>10</sub> lacO s10-leader His<sub>10</sub>-tag Factor Xa Schnittstelle ColE1-ori</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
pET28b	<i>kan lacI P<sub>T7-<math>\phi</math>10</sub> lacO s10-leader N-term.-His<sub>6</sub>-T7-tag C-term.-His<sub>6</sub>-tag Thrombin Schnittstelle f1-ori ColE1-ori</i>	Novagen, Bad Soden
pGP1-2	<i>kan <math>\lambda</math>P<sub>L</sub>-T7 gen I P<sub>LAC</sub> cl857 p15A-ori</i>	Tabor und Richardson, 1985
pIJ4123	<i>kan tsr redD P<sub>tipA</sub> His-tag pIJ101-ori</i>	Murakami <i>et al.</i> , 1989
pIJ6021	<i>kan tsr P<sub>tipA</sub> pIJ101-ori</i>	Murakami <i>et al.</i> , 1989
pJOE2702	<i>bla P<sub>rhaBAD</sub> rnb ColE1-ori</i>	Volff <i>et al.</i> , 1996
pJOE2775	<i>bla P<sub>rhaBAD</sub> rnb His-tag ColE1-ori</i>	Volff <i>et al.</i> , 1996
pSUTNESLB10	<i>cat P<sub>T7-<math>\phi</math>10</sub> groESL (S. griseus) P15A-ori</i>	Pöhling <i>et al.</i> , 1997
pUCPU21	<i>bla lacZ' ColE1-ori</i>	Wehmeier und Hammes, unveröffentlicht
pUWL201PW	<i>bla tsr P<sub>ermE</sub> ColE1-ori pIJ101-ori</i>	Doumith <i>et al.</i> , 2000
pUWL218/219	<i>bla tsr lacZ' ColE1-ori pIJ101-ori</i>	Wehmeier, 1995
pUWLHis	<i>bla tsr P<sub>ermE</sub> ColE1-ori pIJ101-ori</i>	Wehmeier, unveröffentlicht
pUWL <sub>oriT,APR</sub>	<i>bla tsr P<sub>ermE</sub> ColE1-ori pIJ101-ori RK2-oriT aac(3)IV</i>	Blaesing <i>et al.</i> , 2005

**Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete Cosmide**

Cosmid	Eigenschaften	Referenz
SfrF04	NEO-Biosynthesecluster von <i>S. fradiae</i> (DSM AJ629247 40063)	Piepersberg <i>et al.</i> , 2007
SlID01	LIV-Biosynthesecluster von <i>S. lividus</i> (ATCC AJ748832 21178)	Piepersberg <i>et al.</i> , 2007
SteK17	TOB-Biosynthesecluster von <i>S. sp. „tenebrarius“</i> (DSM 40477) AJ810851	Piepersberg <i>et al.</i> , 2007

**Tabelle 3.6: Erhaltene rekombinante Plasmide**

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
p201PW/ <i>aac2'</i>	540 Bp <i>aaC2'</i> -DNA-Fragment aus TOPO/ <i>aac2'</i> Mandt, 2008 ( <i>NdeI/BamHI</i> ) in pUWL201PW ( <i>NdeI/BamHI</i> )	
p201PW/ <i>neoF</i>	1,1 Kbp <i>neoF</i> -DNA-Fragment aus pUC20/ <i>neoF+</i> Mandt, 2008 ( <i>NdeI/BamHI</i> ) in pUWL201PW ( <i>NdeI/BamHI</i> )	
pET16/ <i>neoD</i>	0,8 Kbp <i>neoD</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoD+</i> Mandt, 2008 ( <i>NdeI/BamHI</i> ) in pET16b ( <i>NdeI/BamHI</i> ) ligiert	
pBSW162neoQES	<i>neoQ NdeI/BamHI</i> PCR Fragment (1,7 Kbp) Schürmann, (Primer: <i>neoQ-A</i> + <i>neoQ-ES</i> , Matrize: Cosmid unveröffentlicht SfrF04) in pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )	
pBSW151neoBES	<i>neoB NdeI/BamHI</i> PCR Fragment (1,4 Kbp) (Primer: Schürmann, <i>neoQ-A</i> + <i>neoB-ES</i> , Matrize: Cosmid SfrF04) in unveröffentlicht pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )	
pBSW150neoBEF	<i>neoB NdeI/BamHI</i> PCR Fragment (1,4 Kbp) (Primer: Schürmann, <i>neoQ-A</i> + <i>neoB-EF</i> , Matrize: Cosmid SfrF04) in unveröffentlicht pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )	

**Tabelle 3.7: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide**

Plasmid	Konstruktion <sup>a)</sup>
<i>neoQ</i> -Konstrukte	
pUWLHisneoQES	<i>neoQ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pBSW162neoQES in pUWLHis ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pET28neoQES	<i>neoQ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pBSW162neoQES in pET28b ( <i>NdeI/BamHI</i> )
<i>neoB</i> -Konstrukte	
pUWLHisneoBES	<i>neoB NdeI/BamHI</i> Fragment (1,4 Kbp) aus pBSW151neoBES in pUWLHis ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC75neoBEF	<i>neoB NdeI/BamHI</i> Fragment (1,4 Kbp) aus pBSW150neoBEF in pAC75 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pJOE2775neoBEF	<i>neoB NdeI/BamHI</i> Fragment (1,4 Kbp) aus pBSW150neoBEF in pJOE2775 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pET28neoBEF	<i>neoB NdeI/BamHI</i> Fragment (1,4 Kbp) aus pBSW150neoBEF in pET28b ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pET28neoBES	<i>neoB NdeI/BamHI</i> Fragment (1,4 Kbp) aus pBSW151neoBES in pET28b ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUWL201PWneoBEFHis	<i>neoB NdeI/HindIII</i> Fragment (1,4 Kbp) aus pAC75neoBEF in pUWL201PW ( <i>NdeI/HindIII</i> )

Plasmid	Konstruktion <sup>a)</sup>
pET16neoBES	<i>neoB</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,4 Kbp) aus pBSW151neoBES in pET16b ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUWL201PWneoBES	<i>neoB</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,4 Kbp) aus pBSW151neoBES in pUWL201PW ( <i>NdeI/BamHI</i> )
<i>livQ</i> -Konstrukte	
pUCPU21livQEF	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> PCR Fragment (1,6 Kbp) (Primer: <i>livQ</i> -A + <i>livQ</i> -EF, Matrize: Cosmid SliD01) in pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUCPU21livQES	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> PCR Fragment (1,9 Kbp), Primer: <i>livQ</i> -A + <i>livQ</i> -ES, Matrize: Cosmid SliD01) in pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC11livQEF	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,6 Kbp) aus pUCPU21livQEF in pAC11 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC11livQES	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,9 Kbp) aus pUCPU21livQES in pAC11 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC16livQEF	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,6 Kbp) aus pUCPU21livQEF in pAC16 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC16livQES	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,9 Kbp) aus pUCPU21livQES in pAC16 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC75livQEF	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,6 Kbp) aus pUCPU21livQEF in pAC75 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC75livQES	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,9 Kbp) aus pUCPU21livQES in pAC75 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pJOE2775livQEF	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,6 Kbp) aus pAC11livQEF in pJOE2775 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUWL201PWlivQES	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,9 Kbp) aus pAC11livQES in pUWL201PW ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUWLHislivQES	<i>livQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,9 Kbp) aus pAC11livQES in pUWLHis ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pT7-7livQEFHis	<i>livQ</i> <i>NdeI/HindIII</i> Fragment (1,6 Kbp) aus pAC75livQEF in pT7-7 ( <i>NdeI/HindIII</i> )
pUWL201PWlivQEFHis	<i>livQ</i> <i>NdeI/HindIII</i> Fragment (1,6 Kbp) aus pAC75livQEF in pUWL201PW ( <i>NdeI/HindIII</i> )
<i>livB</i> -Konstrukte	
pUCPU21livBEF	<i>livB</i> <i>NdeI/BamHI</i> PCR Fragment (1,3 Kbp) (Primer: <i>livB</i> -A + <i>livB</i> -EF, Matrize: Cosmid SliD01) in pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUCPU21livBES	<i>livB</i> <i>NdeI/BamHI</i> PCR Fragment (1,3 Kbp) (Primer: <i>livB</i> -A + <i>livB</i> -ES, Matrize: Cosmid SliD01) in pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC11livBEF	<i>livB</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (1,3 Kbp) aus pUCPU21livBEF in pAC11 ( <i>NdeI/BamHI</i> )

Plasmid	Konstruktion <sup>a)</sup>
pAC11livBES	NdeI + BamHI Fragment aus pUCPU21livBES (1,28 Kbp), Vektor: NdeI + BamHI
pAC16livBEF	<i>livB</i> NdeI/BamHI Fragment (1,3 Kbp) aus pUCPU21livBEF in pAC16 (NdeI/BamHI)
pAC16livBES	<i>livB</i> NdeI/BamHI Fragment (1,3 Kbp) aus pUCPU21livBES in pAC16 (NdeI/BamHI)
pAC75livBEF	<i>livB</i> NdeI/BamHI Fragment (1,3 Kbp) aus pUCPU21livBEF in pAC75 (NdeI/BamHI)
pAC75livBES	<i>livB</i> NdeI/BamHI Fragment (1,3 Kbp) aus pUCPU21livBES in pAC16 (NdeI/BamHI)
pJOE2775livBEF	<i>livB</i> NdeI/BamHI Fragment (1,3 Kbp) aus pAC75livBEF in pJOE2775 (NdeI/BamHI)
pUWLHislivBES	<i>livB</i> NdeI/BamHI Fragment (1,3 Kbp) aus pAC75livBES in pUWLHis (NdeI/BamHI)
pUWL201PWlivBES	<i>livB</i> NdeI/BamHI Fragment (1,3 Kbp) aus pAC75livBES in pUWL201PW (NdeI/BamHI)
pET16livBES	<i>livB</i> NdeI/BamHI Fragment (1,3 Kbp) aus pAC75livBES in pET16b (NdeI/BamHI)
pT7-7livBEFHis	<i>livB</i> NdeI/HindIII Fragment (1,3 Kbp) aus pAC75livBEF in pT7-7 (NdeI/HindIII)
pUWL201PWlivBEFHis	<i>livB</i> NdeI/HindIII Fragment (1,3 Kbp) aus pAC75livBEF in pUWL201PW (NdeI/HindIII)
<i>tobZ</i> -Konstrukte	
pUCPU21tobZEF	<i>tobZ</i> NdeI/BamHI PCR Fragment (1,7 Kbp) (Primer: <i>tobZ</i> -A + <i>tobZ</i> -EF, Matrize: Cosmid SteK17) in pUCPU21 (NdeI/BamHI)
pUCPU21tobZES	<i>tobZ</i> NdeI/BamHI PCR Fragment (1,7 Kbp) (Primer: <i>tobZ</i> -A + <i>tobZ</i> -ES, Matrize: Cosmid SteK17) in pUCPU21 (NdeI/BamHI)
pET11tobZEF	<i>tobZ</i> NdeI/BamHI Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZEF in pET11a (NdeI/BamHI)
pET11tobZES	<i>tobZ</i> NdeI/BamHI Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZES in pET11a (NdeI/BamHI)
pET16tobZEF	<i>tobZ</i> NdeI/BamHI Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZEF in pET16b (NdeI/BamHI)
pET16tobZES	<i>tobZ</i> NdeI/BamHI Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZES in pET16b (NdeI/BamHI)
pJOE2775tobZEF	<i>tobZ</i> NdeI/BamHI Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZEF in pJOE2775 (NdeI/BamHI)
pJOE2775tobZES	<i>tobZ</i> NdeI/BamHI Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZES in

Plasmid	Konstruktion <sup>a)</sup>
	pJOE2775 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUWL201PWtobZES	<i>tobZ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZES in pUWL201PW ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUWL <sub>oriT,APR</sub> tobZES	<i>tobZ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZES in pUWL <sub>oriT,APR</sub> ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC11tobZEF	<i>tobZ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZEF in pAC11 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC11tobZES	<i>tobZ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZES in pAC11 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC16tobZEF	<i>tobZ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZEF in pAC16 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC16tobZES	<i>tobZ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZES in pAC11 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC75tobZEF	<i>tobZ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZEF in pAC75 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pAC75tobZES	<i>tobZ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZES in pAC75 ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUWLHistobZES	<i>tobZ NdeI/BamHI</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZES in pUWLHis ( <i>NdeI/BamHI</i> )
pUWL201PWtobZEFHis	<i>tobZ NdeI/HindIII</i> Fragment (1,7 Kbp) aus pUCPU21tobZEF in pUWL201PW ( <i>NdeI/HindIII</i> )
pUWLHisaac(2')	<i>aac(2')</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment (0,5 Kbp) aus p201PW/ <i>aac2'</i> in pUWLHis ( <i>NdeI/BamHI</i> )

<sup>a)</sup> Die Kürzel ES bzw. EF beschreiben, ob das natürliche Stopp-Codon erhalten blieb (ES), oder dieses durch die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease (*BamHI*) ersetzt wurde.

### 3.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide für die PCR-Reaktionen wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Fett geschriebene Basen kennzeichnen Basenaustausche um Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen einzufügen, die unterstrichen dargestellt sind.

**Tabelle 3.8: Oligonucleotide**

Primer	Sequenz
tobZ-A	5'-GGAGGTAGAC <u>CATATG</u> CGTGCCT-3'
tobZ-ES	5'-GCGT <u>GGATCC</u> CTAGTGGCGGA-3'
tobZ-EF	5'-GTGGTGGC <u>GGATCC</u> GCGGAGGT-3'
neoB-A	5'-CCCCTGGGGTGAC <u>CATATG</u> ACGA-3'
neoB-ES	5'-GGGG <u>GGATCC</u> TCAGTCGTCCAGC-3'
neoB-EF	5'-GGGCGGG <u>ATCC</u> GTCGTC-3'
neoQ-A	5'-GGCAC <u>CATATG</u> AAGCGCCTTCG-3'
neoQ-ES	5'-GCGCGG <u>GGATCC</u> TCAGACGTGC-3'
neoQ-EF	5'-GCGGG <u>ATCC</u> GACGTGC-3'
livB-A	5'-GGACCG <u>CATATG</u> ACGCGAAATTCC-3'
livB-ES	5'-GTTG <u>GGATCC</u> CTGTTCCG-3'
livB-EF	5'-CCGT <u>GGATCC</u> GTCGTCCAGGAG-3'
livQ-A	5'-GCAT <u>CATATG</u> GAGCGCCTGC-3'
livQ-ES	5'-GTCGAG <u>GGATCC</u> TCGGGTA-3'
livQ-EF	5'-GTGCC <u>GGATCC</u> CACATGGG-3'

Primer für die Sequenzierreaktion:

universal primer	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
reverse primer	5'-GAAACAGCTATGACCATG-3'

### 3.5 Nährmedien

Die Sterilisation der Medien erfolgte im Autoklaven für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck. Festmedien enthielten max. 2 % Agar. Hitzelabile Komponenten wie z. B. Antibiotika (Tab. 3.9) und nicht autoklavierbare Bestandteile wurden vor ihrer Verwendung mit einem Membranfilter sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur unterhalb von 60 °C nachträglich zugesetzt.

**Tabelle 3.9: Antibiotika und Medienzusätze**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Konzentration (µg/ml) im Medium</b>
Ampicillin	100
Apramycin	25-50
Chloramphenicol <sup>1</sup>	25
Gentamicin	20
Hygromycin B	25-50
Kanamycin	50
Nalidixinsäure	40
Phosphomycin	120
Rifampicin <sup>2</sup>	400
Tetracyclin <sup>1</sup>	25
Thiostrepton <sup>3</sup>	25-50
Tobramycin	10
<b>Sonstige optionale Medienzusätze</b>	
IPTG	0,2 mM
X-Gal <sup>2</sup>	0,5 mM

<sup>1</sup> in 30% Ethanol, <sup>2</sup> in DMF, <sup>3</sup> in DMSO

### 3.5.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

#### **Autoinduktionsmedium** (Studier, 2005)

1% NZ-Amine  
0,5% Hefeextrakt  
pH 7;  
nach dem Autoklavieren:  
50x L-Lösung:  
12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
12,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
50 mM NH<sub>4</sub>Cl  
5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
50x Z-Lösung:  
0,2% Lactose  
0,05% D-Glucose  
0,5% Glycerin  
0,2 ml/l Spurenelemente (1000x)

#### **LB-Medium (Luria Bertani)** (Miller, 1972)

10 g/l Trypton  
10 g/l NaCl  
5 g/l Hefeextrakt  
pH 7

#### **LB-Betain/Sorbitol-Medium** (Chen *et al.*, 1999)

LB-Medium  
2,5 mM Betain  
1 M D-Sorbitol

#### **M9-Minimalmedium** (Sambrook und Russell, 2001)

6 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1 g/l NH<sub>4</sub>Cl  
0,5 g/l NaCl  
pH 7,4;  
nach dem Autoklavieren:  
10 ml/l D-Glucose (40%)  
1 ml/l MgSO<sub>4</sub> (1 M)  
1 ml/l FeSO<sub>4</sub> (4,2 g/l)  
1 mg/l Thiamin

**Rich LB-Medium** (Richter und Loewen, 1982)

20 g/l Trypton  
5 g/l NaCl  
10 g/l Hefeextrakt  
2 ml/l Glycerin  
50 mM K-PO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,2

**SLANT Medium** (Wehmeier, 1991)

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
5 ml/l Glycerin (20%)

**SLANT 50/50 Medium** (Wehmeier, 1991)

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
500 ml/l Glycerin (20%)

**SOB** (Hanahan, 1983)

20 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
0,58 g/l NaCl  
0,19 g/l KCl  
nach dem Autoklavieren:  
10 ml/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (1M)  
10 ml/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (1M)

**SOC** (Hanahan, 1983)

3,6 g/l D-Glucose zu SOB

**Spurenelemente-Lösung (1000x)** (Sambrook und Russel, 2001)

20 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM MnSO<sub>4</sub>  
10 mM ZnSO<sub>4</sub>  
2 mM CoCl<sub>2</sub>  
2 mM CuCl<sub>2</sub>  
2 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
2 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>  
2 mM NiCl<sub>2</sub>

**TB-Medium** (Tartoff und Hobbs, 1987)

12 g/l Trypton  
24 g/l Hefeextrakt  
4 ml/l Glycerin  
nach Abkühlen:  
2,31 g/100 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
12,54 g/100 ml  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

**2YT-Medium** (Sambrook und Russel, 2001)

16 g/l Trypton  
10 g/l NaCl  
10 g/l Hefeextrakt

### 3.5.2 Medien zur Anzucht von Streptomyceten

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

103 g Saccharose  
10 g D-Glucose  
10,12 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
0,25 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$   
0,1 g Casaminoacids  
5 g Hefeextrakt  
ad 980 ml  $\text{dH}_2\text{O}$   
nach dem Autoklavieren:  
1 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5%)  
8 ml  $\text{CaCl}_2$  (3,68%)  
1,5% L-Prolin (20%)  
10 ml TES (5,73% pH 7,2)  
0,2 ml Spurenelement-Lösung  
0,5 ml NaOH (1 N)

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

103 g/l Saccharose  
10 g/l D-Glucose  
0,25 g/l  $\text{K}_2\text{SO}_4$   
10,12 g/l  $\text{MgCl}_2$   
0,1 g/l Casaminoacids  
2 g/l Spurenelement-Lösung (1000x)  
5 g/l Hefeextrakt  
5,73 g/l TES

nach dem Autoklavieren:

1 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5%)  
0,4 ml  $\text{CaCl}_2$  (5 M)  
1,5 ml L-Prolin (20%)  
0,7 ml NaOH (1 N)

**SMA-Agar** (Distler und Piepersberg, 1985)

20 g/l Sojabohnenmehl  
20 g/l Mannitol  
20 g/l Agar  
ad 1 l Leitungswasser

**SPMR-Medium** (Babcock und Kendrick, 1988)

Saccharose  
5 g/l D-Glucose  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l  $\text{MgCl}_2$   
20 ml/l TES (1 M) pH 7,6  
2 ml Spurenelement-Lösung (1000x)  
nach dem Autoklavieren:  
2 ml  $\text{CaCl}_2$  (5 M)

**Spurenelement-Lösung (1000x)** (Kieser et al., 2000)

1 g/l  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
1 g/l  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
1 g/l  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$   
1 g/l  $\text{CaCl}_2$  anhydrous

**TSB-Medium** (Kieser et al., 2000)

30 g/l Trypton Soya Broth (Oxoid)

**TSB/PEG 8000-Medium** (Babcock und Kendrick, 1988)

30 g/l Trypton Soya Broth (Oxoid)  
5% PEG 8000  
nach dem Autoklavieren:  
0,5% Glycin  
5 mM  $\text{MgCl}_2$

### 3.5.3 Medium zur Anzucht von *Micrococcus luteus*

**Weichnähragar für Bioautographie** (verändert nach Boeck *et al.*, 1978)

- 1,5 g/l Rinderextrakt
- 3 g/l Hefeextrakt
- 6 g/l Pepton
- 7 g/l Agar

## 3.6 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

### 3.6.1 Anzucht und Stammhaltung von *E. coli*

Die verschiedenen Stämme und Transformanten wurden durch Ausstriche von Dauerkulturen bzw. Ausstriche von Transformationsansätzen auf LB-Agar-Platten bei 37°C angezogen. Zur Selektion wurde das Medium mit verschiedenen Antibiotika supplementiert (Tab. 3.9). Von diesen Platten erfolgte zunächst die Inokulation von 2-5 ml Flüssigmedium im Glasröhrchen zur Vorkultivierung der Zellen bei 37°C ÜN. Die Hauptkulturen (10-500 ml) wurden in Glaskolben unter guter Belüftung bei 250 rpm in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Das Wachstum wurde durch Messung der Optischen Dichte bei 595 nm an einem Spektralphotometer verfolgt.

Zur Herstellung von Dauerkulturen der *E. coli* Stämme wurden in 10 ml SLANT-Medium im Glasröhrchen bei 37°C ÜN kultiviert. Die stationäre Übernachtskultur wurde bei 5000g sedimentiert, in 2 ml SLANT 50/50-Medium resuspendiert und bei -20°C gelagert.

### 3.6.2 Anzucht und Stammhaltung von Streptomyceten

Die Streptomycetenstämme wurden bei 28°C-30°C und bei Anzucht in Flüssigkulturen unter Schütteln im Schikanekolben mit Metallspirale bebrütet. Plasmidtragende Stämme wurden stets unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert.

Zur Herstellung von Sporensuspensionen wurden die Stämme und Transformanten von Streptomycceten zur Sporulation auf SMA-Platten, bzw. *S. kanamyceticus* auf R2YE-Platten ausgestrichen. Die Sporen wurden von dem Substratmycel mit einer sterilen Impföse gelöst und mit einer 20%igen Glycerin-Lösung (v/v) von der Platte gespült. Die erhaltene Sporensuspension wurde durch sterile Watte filtriert und bei -20°C gelagert. Um eine maximale Expression der heterologen Gene zu erreichen, war in jedem Fall eine neue Protoplastentransformation der Dauerkultur vorzuziehen.

## 3.7 Transformationstechniken

### 3.7.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden nach Hanahan (1983) oder mittels der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Sambrook und Russel, 2001) hergestellt. Die Transformation erfolgte analog zu Sambrook und Russel (2001). In den Transformationsansatz wurden 100 µl Zellsuspension und 0,01-1 µg DNA eingesetzt. Die Zellen wurden in SOC- oder LB-Medium regeneriert und auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Zur Blau/Weiß-Selektion wurden die Platten zusätzlich mit X-Gal und/oder IPTG versetzt.

**FSB-Puffer** (Hanahan, 1983) zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen

45 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
1 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
100 mM KCl  
3 mM [(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Co]Cl  
10% (v/v) Glycerin  
10 mM KOAc, pH 7,5  
pH 6,4

### 3.7.2 Protoplastentransformation von Streptomycceten-Protoplasten

Die Protoplastierung und Transformation von *S. lividans* erfolgte nach der Methode von Babcock und Kendrick (1988), wobei die Zellen in TSB-PEG 8000 bzw. TSB bei 28°C 24-36 h angezogen wurden.

#### **P-Puffer** (Chater *et al.*, 1982)

103 g Saccharose  
0,25 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
2,02 g MgCl<sub>2</sub>  
2 ml Spurenelemente Lösung  
ad 800 ml dH<sub>2</sub>O, Aliquots a 80 ml  
nach dem Autoklavieren:  
1 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5%)  
10 ml CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O (3,68%)  
10 ml TES (5,73%) pH 7,2 (Natronlauge)

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

1 M Tris mit Maleinsäure auf pH 8 eingestellt

#### **T-Puffer** (Babcock und Kendrick, 1988)

25 ml Saccharose (10,3%)  
1 ml K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5%)  
0,2 ml Spurenelemente-Lösung  
ad 100 ml dH<sub>2</sub>O, Aliquots a 9,3 ml,  
nach dem Autoklavieren:  
0,2 ml CaCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (5 M)  
0,5 ml TM-Puffer

#### **PEG 1000/T-Puffer**

je 1 g PEG 1000 autoklavieren und vor Transformation mit 1 ml T-Puffer versetzen

Das Mycel wurde durch Zentrifugation bei 3000g sedimentiert, zweifach in 10,3% Saccharose-Lösung gewaschen und in 8 ml P-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 37°C etwa 10-60 min inkubiert bis mikroskopisch die Protoplastierung der Zellen ersichtlich war. Nach Zugabe von weiteren 8 ml P-Puffer wurde die Zellsuspension durch sterile Watte filtriert, bei 3000g sedimentiert und in 1 ml P-Puffer resuspendiert. Die Protoplasten wurden zu 100 µl aliquotiert, ÜN bei -20°C verwahrt und dann bei -80°C gelagert oder direkt zur Transformation eingesetzt.

Zur Transformation wurden die Protoplasten schnell bei RT aufgetaut und bei 4000g 7 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in P-Puffer resuspendiert, mit 100 µg Plasmid-DNA (isoliert aus dem methylierungsdefizienten Stamm ET12567) und 200 µl T-Puffer/PEG versetzt und behutsam gemischt. Nach der weiteren Zugabe von 1 ml P-Puffer wurden die Zellen auf SPMR-Platten zur Regeneration ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. War die Regeneration nach 12-36 h ersichtlich, wurden die Platten mit 2 ml dest. H<sub>2</sub>O und dem entsprechenden Antibiotikum überschichtet, umso die Zellen unter dem entsprechenden Selektionsdruck zu kultivieren.

### 3.8 Konjugation

Da es nicht gelang *S. kanamyceticus* zu protoplastieren bzw. erfolgreich zu transformieren, wurde versucht über Konjugation die Plasmide pUWL<sub>oriT,APR</sub>tobZES und pUWL<sub>oriT,APR</sub> zu übertragen. Dabei lag ein Protokoll von Mandt (2008) zugrunde, welches auf die Methoden von Bierman *et al.*, 1992, Flett *et al.*, 1997 und Kieser *et al.*, 2000 zurückgreift.

Für die Konjugation wurden 20 ml 2YT-Medium, supplementiert mit Apramycin (Endkonzentration: 25 µg/ml), Chloramphenicol (Endkonzentration: 12,5 µg/ml) und Kanamycin (Endkonzentration: 25 µg/ml), mit 500 µl ÜN Kultur des Donorstammes *E.coli* ETpUZ, der auch das zu konjugierende Plasmid enthielt, beimpft und aerob bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. Nach Zellernte bei 4000g für 10 min wurde das Zellpellett vorsichtig in 2YT-Medium resuspendiert, und ohne Antibiotikum langsam bei 37°C und 90 UpM für eine Stunde geschüttelt. 1 ml einer Sporensuspension (vgl. 3.6.2) des Rezipienten *S. kanamyceticus* wurde in 9 ml TSB für 10 min unter gelegentlichem Schwenken inkubiert und 5 Stunden bei 30°C geschüttelt (Keimungsphase). Dann wurden Donor und Rezipient im gleichen Verhältnis vorsichtig gemischt und je 1 ml auf SPMR- und R2YE-Medium ausplattiert. Anschließend wurden die Platten 8 Stunden bei 28°C inkubiert, danach mit APR und Phosphomycin überschichtet (Endkonzentrationen: APR: 35 µg/ml, Phosphomycin: 120 µg/ml) und für mehrere Tage weiter bei 28°C inkubiert. Exkonjuganten wurden mehrmals auf frische Platten überimpft, wobei die APR Konzentration auf 50 µg/ml erhöht und auf Phosphomycin nach der zweiten Sporulationsrunde verzichtet wurde.

## 3.9 Molekularbiologische Methoden

### 3.9.1 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 2 Methoden verwendet:

1) Für analytische Zwecke wurde die Plasmid-DNA aus stationären 1,5 ml *E. coli* Kulturen mittels alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (1979) isoliert.

Benötigte Lösungen für die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979):

#### Lösung I

50 mM D-Glucose  
50 mM Tris-HCl pH 8  
10 mM EDTA pH 8

#### Lösung II

1% (w/v) SDS  
200 mM NaOH

#### Lösung III

3 M Kaliumacetat  
1,8 M Ameisensäure

2) Um reine Plasmid-/Cosmid-DNA zu erhalten, erfolgte die Isolierung mit Hilfe der unter 3.1 aufgeführten Plasmidpräparationskits nach Angaben des Herstellers.

Die Plasmidisolierung aus Streptomyceten unterschied sich zur Präparation aus *E. coli* nur darin, dass der Resuspensionspuffer (Lösung 1) mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und die Inkubationszeit in diesem auf 30 min (37°C) verlängert wurde.

### 3.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Methode von Sambrook und Russel (2001) in einer horizontalen Flachbettkammer.

Benötigte Lösungen:

#### **TAE-Puffer (50x)**

242 g/l Tris/HCl pH 8  
57,1 ml/l Eisessig  
0,4 g/l EDTA

#### **DNA-Ladungspuffer (10x)**

30% Glycerin  
10 mM Tris/HCl pH 7,5  
1 mM EDTA pH 8  
0,25% Bromphenol Blau  
0,25% Xylene-Cyanol

Die Gelmatrix bestand in der Regel aus 0,8% Agarose, für kleinere Fragmente ( $\leq 500$  Bp) 2% Agarose. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge an Agarose eingewogen, mit 1x TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle bis zur Klärung der Lösung erhitzt, danach erfolgte die Zugabe von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid. Bei Gebrauch wurde diese Lösung in eine entsprechende Form gegossen. Der Gellauf erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung von 120 V. Die durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Moleküle wurden anschließend auf dem Transilluminator mit parallel aufgetrennten DNA-Längenstandards verglichen. Als Größenstandard diente entweder 1 Kbp DNA Leiter (Roche, Mannheim) oder 1 Kbp Plus DNA Leiter (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

### 3.9.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus ausgeschnittenen Agarosegelstücken erfolgte mit dem Gel-Extraktions Kit (Genscript, NJ, USA) oder dem peqGold Gel Extraction Kit (Peqlab, Erlangen). Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht aus der Agarose ausgeschnitten und gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1/10 des Probenvolumens in einem Kontrollgel aufgetrennt und im Vergleich zum DNA-Längenstandard abgeschätzt.

### **3.9.4 Enzymatische Reaktionen mit DNA**

#### **3.9.4.1 Restriktionsendonuclease-Spaltung von DNA**

Einfache oder multiple Restriktionsendonuclease-Spaltungen von DNA wurden nach den Angaben des Enzymherstellers (vgl. 3.1) durchgeführt. Die DNA-Konzentration im Verdau-Ansatz betrug bis zu 0,1 µg/µl bei einer spezifischen Enzymaktivität von 0,5–2 U/µg DNA. Die Inkubationszeit für präparative Ansätze betrug 90–120 min; bei analytischen Ansätzen wurde diese auf etwa 60 min reduziert. Alle Enzyminkubationen wurden bei 37°C durchgeführt, sofern keine gegenteiligen Empfehlungen des Lieferanten vorlagen.

#### **3.9.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Die Phosphatgruppen am 5'-Ende der hydrolysierten DNA-Fragmente wurden bei Bedarf mittels alkalischer Phosphatase entfernt, umso die Ligation von Vektor und DNA-Fragment zu begünstigen. Das mit dem gewünschten Restriktionsenzym(en) hydrolysierte Vektorfragment wurde mit alkalischer Phosphatase (SAP) und dem dazugehörigen Puffer versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde das Enzym 15 min bei 65°C inaktiviert.

#### **3.9.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA-Fragmenten und linearisiertem Vektor-DNA erfolgte mittels T4-DNA-Ligase. Das Verhältnis von Vektor-DNA zu DNA-Fragment betrug 1:3 und das Volumen in der Regel 20 µl. Die Ligation wurde, gemäß den Herstellerangaben ÜN bei 4°C durchgeführt. Darauf folgend wurde ein Teil des Ligationsansatz direkt in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert.

### 3.9.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Technik wurden DNA-Fragmente amplifiziert bzw. *in vitro* verändert um Erkennungsstellen für Restriktionendonukleasen einzufügen. Sämtliche PCR Ansätze wurden in einem Personal Thermocycler (Biometra, Göttingen) unter Verwendung der unter 3.1 aufgeführten DNA-Polymerasen durchgeführt. Nachfolgende Tabellen 3.10–3.13 beschreiben die Bedingungen der PCR-Reaktionen. Die *Annealing*-Temperatur der Primer wurde mit Hilfe des Programms PrimerX ([www.primerx.com](http://www.primerx.com)) berechnet. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden im Anschluss an jede PCR 5 µl-Aliquots elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt.

**Tabelle 3.10: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze**

Standardreaktionsansatz	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase
Polymerasepuffer	10 µl (10 x Puffer)	10 µl (5 x GC-Puffer)
dNTP-Mix	16 µl (1,25 mM)	1 µl (10 mM)
Primer (100 pmol/µl)	1-2 µl	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	6 µl (50 mM)	bereits im Polymerasepuffer enthalten
DMSO	10 µl	1,5 µl
Template DNA	0,5-1 µl	1 µl
Polymerase	2 U ("Hot Start" Zugabe erst nach initialen Denaturierung)	2 U
dH <sub>2</sub> O	ad 100 µl	ad 50 µl

**Tabelle 3.11: Standard PCR Programm für *Taq*-DNA-Polymerase**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
initiale Denaturierung	98°C	5 min	
Denaturierung I	95°C	1 min	5 x
Primer <i>annealing</i> I (PA I)	variabel	45 sec	
Elongation I	72°C	1 min/Kbp	
Denaturierung II	95°C	1 min	25 x
Primer <i>annealing</i> II (PA II)	variabel	45 sec	
Elongation II	72°C	1 min/Kbp	
terminale Elongation	72°C	5 min	
Lagerung	10°C	∞	

**Tabelle 3.12: PCR-Programm für Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
initiale Denaturierung	98°C	2 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	25 x
Primer <i>annealing</i>	variabel	30 sec	
Elongation	72°C	45 sec/Kbp	
terminale Elongation	72°C	10 min	
Lagerung	10°C	∞	

**Tabelle 3.13: Verwendete Anlagerungstemperaturen der jeweiligen PCR-Reaktionen**

Gen	Primerpaar (vgl. 3.4)	Template (vgl. Tab. 3.5)	DNA- Polymerase	<i>Annealing</i> -Temperatur
<i>livB</i>	LivB-A/LivB-ES	Slid01	<i>Taq</i>	54°C (PAI), 57°C (PAII)
	LivB-A/LivB-EF			54°C (PAI), 58°C (PAII)
<i>livQ</i>	LivQ-A/LivQ-ES	Slid01	Phusion	58°C
	LivQ-A/LivQ-EF			
<i>tobZ</i>	TobZ-A/TobZ-ES TobZ-A/TobZ-EF	SteK17	<i>Taq</i>	54°C (PAI), 60°C (PAII)

### 3.9.6 Aufreinigung amplifizierter DNA-Fragmente

Ergab die Überprüfung der PCR im Agarosegel ein Amplifikationsprodukt, wurde dieses mit dem DNA-Purification Kit (Genscript, NJ, USA) aufgereinigt. Bei mehreren Banden wurde der gesamte PCR-Ansatz im Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte Fragment wie im Abschnitt 3.9.3 beschrieben isoliert.

### 3.9.7 DNA-Sequenzierung und Computeranalyse von Sequenzdaten

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der nicht-radioaktiven Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Hilfe des A.L.F.Express-Sequenzierers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung eines 6 M Harnstoff/6% „Hydrolink Long Ranger“-Gels (Biozym, Hessisch Oldendorf). Für die Sequenzreaktion im Thermocycler (vgl. Tab. 3.13) wurden das „Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sowie die unter 3.4 angegebenen Oligonukleotide und in Tab. 3.4 aufgeführten Vektoren verwendet.

**Tabelle 3.13: Thermocycler Programm für die DNA-Sequenzierreaktion**

Zeit	Temperatur	Wiederholungen
5 min	98°C	
10 sec	95°C	← 30 x
45 sec	58°C	
1 min 20 sec	68°C	
1 min	68°C	

Alternativ wurde die DNA-Sequenzierung von der Firma GATC-Biotech (Konstanz) durchgeführt.

Die durch den A.L.F.Express-Sequenzierer erhaltenen Daten wurden zunächst mit dem Programm "Alfwin Software Version 2.10.6" (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgearbeitet. Vergleiche von zwei oder mehreren DNA- oder Proteinsequenzen wurde mit Hilfe der Programme MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin>), BLAST2sequences ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Tatusova und Madden, 1999) und Clustal W ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt. Das Programm Clone Manager5 (Scientific and Education Software, 1998) wurde zur Planung von Klonierungen und Restriktionen verwendet. Für die Datenbank-Recherche in den Datenbanken GenBank, EMBL, SwissProt, TrEMBL und TrEMBL\_NEW wurden die Dienstprogramme BLAST (Altschul *et al.*, 1990) und omniBLAST benutzt ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)).

## 3.10 Heterologe Genexpression

### 3.10.1 Heterologe Genexpression in *E. coli*

#### 3.10.1.1 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter der Kontrolle des T7-Promotors

Gene, die in pET-Vektoren sowie pAC11 und pAC16 integriert sind, stehen unter der Kontrolle des T7 $\Phi$ 10-Promotors. Der T7-Promotor des Bakteriophagen T7 wird durch die T7-RNA-Polymerase erkannt (Tabor und Richardson, 1985). Da diese RNA-Polymerase nicht natürlicherweise in *E. coli* vorkommt, werden zur Genexpression *E. coli* Stämme verwendet, bei denen das T7-RNA-Polymerase-Gen des T7-Phagen unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors mit Hilfe eines Lambda-Phagen DE3 stabil ins Chromosom integriert ist. Gleichzeitig enthalten die Expressionsplasmide ein *lacI<sub>q</sub>*-Gen, das für den Lactoserepressor LacI codiert, welcher zum einen an den *lac*-Operator stromabwärts des *lacUV5*-Promotors bindet und so eine Transkription der T7-RNA-Polymerase inhibiert, und zweitens an einen *lac*-Operator bindet, der auf dem Expressionsplasmid stromabwärts des T7 $\Phi$ 10-Promotors lokalisiert ist, und somit die Expression des Zielgens reprimiert wird (Studier und Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990). Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,2 oder 1,0 mM) bzw. Lactose (0,2-0,4%) werden die Lactoserepressoren inaktiviert und die Expression der Gene induziert.

Für die heterologe Genexpression wurden entsprechende Flüssigmedien mit einer ÜN-Kultur des Expressionsplasmid tragenden *E. coli* Stammes zu einer Optischen Dichte OD<sub>595 nm</sub> von 0,1 angeimpft, bei entsprechender Temperatur inkubiert und dann bei einer OD<sub>595nm</sub> von 0,5-1,0 die Expression des Zielgens durch IPTG Zugabe induziert. Vor und zu definierten Zeitpunkten nach der IPTG-Zugabe wurde je 1 ml als Probe entnommen, die Zellen abzentrifugiert und das Sediment ohne Überstand bei -20 °C gelagert.

Lag bereits vor der IPTG-Induktion eine unerwünschte Basalexpression des Zielgens vor, konnte diese durch Zugabe von 1% Glucose zum Medium reduziert werden und somit die Expressionsbedingungen verbessert werden.

Eine Zugabe von Rifampicin 10-15 min nach der IPTG-Induktion, ermöglichte es, durch Hemmung der *E. coli* RNA-Polymerase, von der Rifampicin insensitiven T7-RNA-Polymerase kontrollierte Gene selektiv zu exprimieren.

### 3.10.1.2 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter der Kontrolle des Promotors

#### $P_{rhaBAD}$

Die Vektoren pJOE2702, pJOE2775 und pAC2775 wurden für die Genexpression unter der Kontrolle des L-Rhamnose induzierbaren Promotors  $P_{rhaBAD}$  (Egan und Schleif, 1993; Volff *et al.*, 1996) verwendet. Beim strikt regulierten Rhamnose-Promotorsystem sind zwei Trans-Aktivatoren erforderlich (RhaR und RhaS), die von *E. coli* codiert werden. In Anwesenheit von L-Rhamnose bindet RhaR an  $P_{rhaRS}$  und initiiert sowohl die eigene als auch die RhaS-Synthese. RhaS bindet wiederum nach Aktivierung durch L-Rhamnose als Effektor an den  $P_{rhaBAD}$ -Promotor und aktiviert die Transkription.

Zur heterologen Überexpression konnten die in Tab. 3.1 genannten *E. coli* Stämme eingesetzt werden. Die Anzucht erfolgte Analog der unter 3.10.11 beschriebenen Bedingungen. Anstelle von IPTG erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 0,2-0,4% (w/v) steriler L-Rhamnose bei einer  $OD_{595}$  der Kulturen von 0,4-0,6.

### 3.10.1.3 Variationen der Expressionsbedingungen

Zur Vermeidung von unlöslichen und enzymatisch inaktiven Proteinaggregaten („inclusion bodies“) wurden verschiedene Parameter verändert und miteinander kombiniert:

- Reduktion der Temperatur während der Proteinexpression  
Die Expressionskultur wurde mit einer stationären Vorkultur inokuliert und bei folgenden Temperaturen kultiviert: 37°C, 28°C, 20°C, 16°C oder 12°C. Die Induktion erfolgte bei  $OD_{595}$  von 0,5-1,0.
- Verschiedene Anzuchtsmedien  
Für die heterologe Genexpression wurden verschiedene Flüssigmedien (vgl. 3.5.1) verwendet, die plasmidtragenden Stämme unterlagen dabei stets dem entsprechenden Selektionsdruck. Bei Expression in LB-Betain-Sorbitol-Medium

wurde die Kultur nach der Induktion für mind. 12 h beim Autoinduktionsmedium mind. 24 h weiterkultiviert.

- **Verschiedene *E. coli* Expressionsstämme**  
Tabelle 3.1 zeigt die Expressionsstämme auf, die zum Einsatz kamen. Entsprechend des Benutzerprotokolls für ArcticExpress wurde die Expressionskultur mit einer stationären Vorkultur inokuliert. War die OD<sub>595</sub> von 0,5 erreicht, wurde die Kultur für ca 15 min auf 12°C gekühlt und induziert. Alternativ wurde die Expressionskultur bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,5 bei 12°C oder 20°C kultiviert, dann wurde induziert und weitere 24 h bei 12°C inkubiert.
- **Expressionsplasmid pGP1-2**  
Das Plasmid pGP1-2 ist mit ColE1 Plasmiden kompatibel und ermöglicht die heterologe Genexpression unter Kontrolle des T7-Promotors in einem T7-RNA-Polymerase freien Stamm (also ohne DE3). pGP1-2 enthält das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des  $\lambda$ P<sub>L</sub>-Promotors, dieser wird durch die plasmidcodierte thermosensitive Variante des cI-Repressors negativ reguliert (Tabor und Richardson, 1985). Die Expressionsplasmide wurden bei 30°C in pGP1-2 tragende DH5 $\alpha$  oder JM109 transformiert. Die Kultur wurde bei 30°C bis zum Erreichen einer OD<sub>595</sub> 0,5 kultiviert. Die Induktion fand bei 42°C für 15-30 min (Inaktivierung des cI-Repressors auf pGP1-2) und durch Zugabe von 0,4 mM IPTG (Inaktivierung des LacI-Repressors auf den Expressionsplasmiden statt. Zur weiteren Optimierung wurde die Kultur mit Rifampicin (siehe 3.10.11) angezogen. Die Kultur wurde nach der Induktion weiter bei 30°C oder 37°C inkubiert.

### 3.10.2 Heterologe Genexpression in *S. lividans* und *S. coelicolor*

Die heterologe Genexpression unterliegt in den pUWL-Plasmiden (Doumith *et al.*, 2000, Blaesing *et al.*, 2005) der Kontrolle des konstitutiven Promotors P<sub>ermE\*</sub>; dabei handelt es sich um die hochregulierte Variante des P<sub>ermE</sub>-Promotors des Erythromycin-Resistenzgens (Bibb *et al.*, 1985). *S. lividans* 66 TK23 oder TK64 bzw. *S. coelicolor* wurden mit den entsprechenden Plasmiden (Tab. 3.4, 3.6, 3.7) transformiert und in verschiedenen Medien (vgl. 3.5.2) bei 28°C für 48-120 h kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Die Zellen wurden zentrifugiert, und das gewonnene Zellpellet entweder sofort weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

Das auf dem Thiostrepton-induzierbaren  $P_{tipA}$  Promotor (Murakami *et al.*, 1989) basierende Expressionssystem der pIJ-Vektoren (Takano *et al.*, 1995) wurde zur Expression in *S. lividans* TK64 benutzt. Die Kulturen wurden in verschiedenen Medien bei 28°C für 12-36 h angezogen, dann das System mit 20 µg/ml Thiostrepton induziert und weitere 24-48 h bei 28°C inkubiert.

## 3.12 Proteinbiochemische Methoden

### 3.12.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zellsuspensionen von *E. coli* sowie aus Streptomyceten Kulturen wurden sedimentiert und in Zellaufschlusspuffer resuspendiert.

Verwendete Puffer:

#### **Zellaufschlusspuffer A**

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
1 mM DTT  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
3 mM 2-Mercaptoethanol

#### **Zellaufschlusspuffer B**

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **Zellaufschlusspuffer C**

50 mM Tris/HCl pH 8  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

Nach Resuspension wurden diese stets auf Eis gekühlten Zellsuspensionen durch kurze Ultraschall-Behandlung (bei *E. coli*: drei Zyklen a 15 sec, bei Streptomyceten: drei Zyklen a 30-60 sec) aufgeschlossen. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurden die erhaltenen Rohextrakte fraktioniert, dabei wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Bestandteilen wie Zelltrümmer, nicht aufgeschlossene Zellen und Einschlusskörperchen durch Zentrifugation bei 15000g, 4°C für 30 min getrennt. Die

verschiedenen Fraktionen wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese vergleichend analysiert. Gegebenenfalls wurden Proteinextrakte durch Konzentratoren (Vivascience AG Hannover) verdichtet, wobei sich das Ausschluß-Molekulargewicht nach dem Protein richtete (10 kDa, 30 kDa bzw. 50 kDa), das überproduziert worden war und weiter analysiert werden sollte.

### **3.12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte wurde mit dem Bradford-Reagenz (BioRad, München) bzw. Roti-Nanoquant (Roth, Karlsruhe) nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Die Eichgerade wurde mit BSA erstellt und bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen.

### **3.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinextrakten unter denaturierenden Bedingungen fand in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der Methode von Schägger und Jagow (1987) statt. Diese enthielten im Sammelgel 4% T/3% C. Je nach Probe wurden 10%ige bzw. 16%ige Trenngele verwendet, die zusätzlich noch 13,3% Glycerin enthielten. Um die Polymerisation zu starten wurden Ammoniumpersulfat und TEMED in einer Endkonzentration von 0,05% und 0,005% zugesetzt. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen an Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 80-150 V. Zur Größenabschätzung wurde ein Proteingrößenstandard aufgetragen. Die Gele wurden in Coomassie-Lösung für 2 h oder ÜN gefärbt und in dH<sub>2</sub>O entfärbt.

Benötigte Lösungen:

#### Probenpuffer

4% (w/v) SDS  
12% (w/v) Glycerin  
50 mM Tris/HCl pH 6,8  
2% (v/v) Mercapthoethanol  
0,01% (w/v) Serva Blue G

#### 49,5%T/3%C PAA-Lösung

480 g/l Acrylamid  
15 g/l N-N Bisacrylamid

#### Gel-Puffer

3 M Tris/HCl pH 8,4  
0,3% (w/v) SDS

#### Anoden-Puffer

0,2 M Tris/HCl pH 8,9

#### Kathoden-Puffer

0,1 M Tris  
0,1 M Tricin  
0,1% (w/v) SDS

#### Kolloidale-Coomassie-Färbung

Lösung 1  
5% (w/v) Brilliant Blue G-250  
Lösung 2  
2% (w/v) Ortho-Phosphorsäure  
10% (v/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
2% von Lösung 1 in Lösung 2

#### Coomassie-Färbe-Lösung

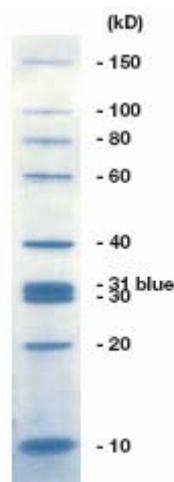
20 ml Methanol  
80 ml Kolloidale-Coomassie-Färbung

Verwendete Proteingrößenstandards:

Roti-Mark

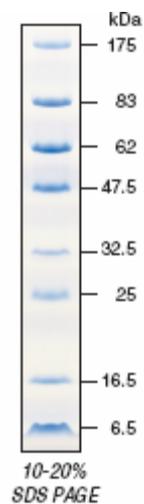
10-150 kDa PLUS

(Roth, Karlsruhe)



Prestained Protein  
Marker, Broad Range

(New England  
Biolabs, Schwalbach)



### 3.12.4 Western Blot und immunologischer Nachweis immobilisierter His-tag Proteine

Bei geringer Proteinproduktionsrate, oder zur Überprüfung ob es sich tatsächlich um das gewünschte überproduzierte Protein handelte, wurden immunologische Nachweise mit Antikörpern durchgeführt. Dazu wurde zunächst, wie zuvor beschrieben, eine Trennung der Proteinextrakte mit SDS-PAGE durchgeführt, statt der Coomassie-Färbung folgte jedoch eine 30minütige Äquilibration des Gels in Blotting Puffer. Anschließend wurden die Proteine nach der Semi-Dry-Methode (Kyhse-Andersen, 1984) auf Hybond P (Amersham Biosciences, Freiburg) bzw. Immobilon-P-Membran (Millipore GmbH, Schwalbach) transferiert. Dabei wurde ein kontinuierliches Puffer-System (Lihme *et al.*, 1986) verwendet, bei dem die in Blotpuffer getränkten Lagen Whatman-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) zwischen zwei Elektroden einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München) als Pufferreservoir dienen. Zwischen den Elektroden wurde ein homogenes elektrisches Feld erzeugt, worin die Proteine bei einer Stromstärke von 20 V für 25 min aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Membran übertragen wurden. Die nachfolgende Inkubation der Membran in 3% BSA in TBS-Puffer für 1 h oder ÜN sollte unspezifische Bindungsstellen sättigen. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 min mit TBST-Puffer und einmal in TBS-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem monoklonalen His-tag Antikörper (Novagen, Bad Soden) in einer 1:1500 Verdünnung in 3% BSA-TBS-Puffer für 1 h bei RT. Durch erneutes Waschen wurde überschüssiger erster Antikörper entfernt, daraufhin wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (Anti-Maus-IgG Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase, Novagen, Baden Soden) 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion/Exposition erfolgte mit NBT/BCIP-Lösung (Roche, Mannheim).

Benötigte Lösungen:

#### Blotting-Puffer

48 mM Tris/HCl pH 7,5  
39 mM Glycine  
20% Methanol

#### Block-Lösung

3% (w/v) BSA in TBS

#### TBS (20x)

3 M NaCl  
200 mM Tris/HCl pH 7,5

#### TBSTT (10x)

5 M NaCl  
200 mM Tris/HCl pH 7,5  
2% (v/v) Triton-X 100  
0,5% (v/v) Tween-20

#### Colorimetrische Detektion

120 µl NBT  
120 µl BCIP  
500 µl AP Puffer (20x)  
ad 10 ml dH<sub>2</sub>O

Bei Verwendung des One-Step Complete Western Blot Kit (Genscript, NJ, USA) wurden die Proteine wie bereits beschrieben auf eine mitgelieferte WestClear Nitrocellulose Membrane geblottet. Die weiteren Schritte wurde entsprechend des Benutzerprotokolls durchgeführt und abschließend wurden mittels ChromoSensor One Solution TMB (Tetramethylbenzidine) die His-tag Proteine detektiert.

### 3.12.5 Reinigung von His-tag-Fusionsproteinen

Die Reinigung der His-tag markierten Proteine (N-term. 10 x His-tag: pET16, pAC16, pUWLHis; N-term. 6 x His-tag: pET28; C-term. 6 x His-tag: pJOE2775, pAC75, pET28) erfolgte über immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) mittels Ni-NTA-Säulchen (Qiagen, Hilden; Sigma-Aldrich, München) oder im "Batch"-Verfahren mit Ni-NTA-Agarose (Sigma-Aldrich, München). Dabei wurden lösliche Fusionsproteine unter nativen und unlösliche Proteinaggregate unter denaturierenden Bedingungen angereichert, und der Proteingehalt durch Bradford-Proteinbestimmung und SDS-PAGE ermittelt.

Die Verwendung der Ni-NTA-Säulchen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Für das "Batch"-Verfahren wurde die Ni-NTA-Agarose mit 1 Vol. dH<sub>2</sub>O gewaschen und bei 5000g, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde mit 10 Vol. des Lyse-Puffers äquilibriert. Die Agarose wurde dann mit dem Proteinextrakt 30-60 min bei 4°C rotierend inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die beladene Ni-NTA-Agarose 2-4 mal mit 10 Vol. Wasch-Puffer gewaschen. Zur Elution wurden 1-2 Vol. Elutions-Puffer zugesetzt und für 10-120 min oder ÜN rotierend inkubiert. Das Eluat wurde durch Zentrifugation erhalten und gegebenenfalls durch Konzentratoren (siehe 3.12.1) verdichtet.

Puffer zur Proteinreinigung unter nativen Bedingungen:

#### Lyse-Puffer I

50 mM Tris  
500 mM NaCl  
10% Glycerin  
10 mM Imidazol  
pH-Einstellung auf pH 8 (HCl)

#### Lyse-Puffer II

50 mM Tris  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol  
pH-Einstellung auf pH 8 (HCl)

**Wasch-Puffer I**

analog Lysepuffer  
20 mM Imidazol

**Wasch-Puffer II**

analog Lysepuffer  
15 mM Imidazol

**Elutions-Puffer I**

analog Lysepuffer  
250 mM Imidazol

**Elutions-Puffer II**

analog Lysepuffer  
250 mM Imidazol

Puffer zur Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen (aus dem Handbuch „The QIAexpressionist“, Qiagen, Hilden):

**Lyse-Puffer A**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Tris  
6 M GuHCl  
auf pH 8 (NaOH)

**Wasch-Puffer C:**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Tris  
8 M Harnstoff  
auf pH 6,3 (HCl)

**Lyse-Puffer B**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Tris  
8 M Harnstoff  
auf pH 8 (NaOH)

**Elutions-Puffer E:**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Tris  
8 M Harnstoff  
auf pH 4,5 (HCl)

Erfolgte die Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen, wurde hinterher zur Renaturierung und Entsalzung eine Dialyse der Proben ÜN bei 4°C in 5 l Dialysepuffer (10 mM Tris, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, auf pH 8) durchgeführt.

Wenn notwendig konnte das an das Protein fusionierte His-tag (bei Verwendung des Expressionsplasmides pET16b) durch Faktor Xa (Qiagen, Hilden) in einem Reaktionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 6,5, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) abgespalten werden.

### 3.13 Enzymtests

#### 3.13.1 Enzymatische Synthese der Substrate für Enzymtests mit den Oxidoreduktasen NeoQ/LivQ und den Aminotransferasen NeoB/LivB

Sämtliche Reaktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie überprüft und über Festphasenextraktion gereinigt.

##### 3.13.1.1 Synthese von 2'-*N*-Acetylparomamin

Das für die 2'-Acetylierung des Paromamins notwendige Enzym AAC(2'), hier aus *S. kasugaensis* (Mandt, 2008), wurde heterolog in *S. lividans* 66 TK64 über das Plasmid pUWLHisaac(2') produziert (72 h bei 28°C, TSB, vgl. 3.10.2). Nach Zellernte und Resuspension des Pelletts in Lyse-Puffer II wurde, wie im Abschnitt 3.12.5 beschrieben, das Proteinextrakt erhalten, und daraus das N-terminale 10 x His markierte AAC(2') Fusionsprotein unter nativen Bedingungen gereinigt.

Zusammensetzung der Acetylierungsreaktion (modifiziert nach Hotta *et al.*, 2000)

- 50 mM Tris/HCl pH 7,5
- 3 mM Paromamin
- 7 mM *N*-Acetyl-Coenzym A
- 10 µg gereinigtes AAC(2') je 1 ml Reaktionsansatz

Im Allgemeinen betrug das Volumen des Acetylierungsansatzes 0,1-1 ml welcher bei 30 °C ÜN inkubiert wurde.

##### 3.13.1.2 Synthese von 2'''-*N*-Acetyl -6'''-hydroxyneomycin C

Das Gen *neoF* codiert für eine Glykosyltransferase, die die Übertragung der *N*-Acetyl-D-glucosamin-Einheit von UDP-GlcNAc auf Ribostamycin katalysiert (Fan *et al.*, 2008; Mandt, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008b). Zur heterologen Expression von NeoF wurden Transformanten von *S. lividans* 66 TK23 oder TK64-p201PW/neoF in TSB-Flüssigmedium, supplementiert mit 30 µg/ml Thiostrepton, bei 28°C für 72 h

angezogen. Für den Reaktionsansatz wurde die lösliche Fraktion des Zellaufschlusses (Zellaufschlusspuffer B, vgl. 3.12.1) verwendet. Es wurde festgestellt, dass das Einfrieren der Zellen zu einer Aktivitätsverringeringung führte.

Zusammensetzung des Glykosylierungsansatzes:

- 50 mM Tris/HCl pH 7,5
- 3 mM Ribostamycin
- 3 mM UDP-*N*-Acetyl-glucosamin
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 20% (v/v) NeoF-Proteinextrakt (lösliche Fraktion)

Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C ÜN inkubiert und anschließend die Umsetzung von Ribostamycin zu 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C über DC-Analyse überprüft.

### 3.13.1.3 Synthese von 6'''-Hydroxyneomycin C

Die 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C Deacetylase NeoD (Fan *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008b) wurde in *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/neoD rekombinant produziert. Die heterologe Expression erfolgte in 50 ml LB<sub>Amp</sub> bei 30°C; nach Induktion bei einer OD<sub>595</sub> von 0,6 mit IPTG wurde die Kultur weitere 4 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und in 2,5 ml Zellaufschlusspuffer B durch Ultraschall (vgl. 3.12.1) aufgeschlossen. Zentrifugal-Konzentratoren (10 kDa, Vivaspin, Vivascience AG Hannover) grenzten die lösliche Fraktion auf ein Volumen von 500 µl ein.

Zusammensetzung des Deacetylierungsansatzes:

- NeoF-Glykosylierungsansatz
- 20 % (v/v) aufkonzentrierter NeoD-Proteinextrakt

Die Reaktion erfolgte ÜN bei 37°C.

### 3.13.2 Photometrische Bestimmung der Oxidoreduktase-Aktivität von NeoQ und LivQ

Die Enzymaktivität der AGA-Oxidasen NeoQ und LivQ wurde 10 min lang photometrisch bei Raumtemperatur mittels einer PMS-gekoppelten Reduktion von MTT bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen (Kistler und Lin, 1972).

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (verändert nach Lengeler und Lin, 1972):

vor dem Test frisch angesetzte Lösungen:

- 0,1% PMS
- Mix A
- 0,33 ml Tris/HCl 1M pH 7.5
- 0,07 ml MTT 0.5%
- 0,1 ml Triton X-100 20%
- 5,97 ml dH<sub>2</sub>O

Jeder Testansatz enthielt:

- 50 µl PMS (0,1%)
- 100 µl (z. T. durch Festphasenextraktion gereinigtes) Testsubstrat (2,5 mM)
- 300 µl Mix A
- Start der Reaktion mit der Zugabe von:
- 10 µl gereinigtes Protein (Konzentration der Proteinlösung: 2,5 µg Protein/µl)

Die PMS- und MTT-Lösungen wurden immer frisch angesetzt, da beide Stoffe lichtempfindlich sind. Des Weiteren enthielten die Reaktionsansätze das Detergenz Triton-X-100, welches das wasserunlösliche MTT-Formazan stabilisiert und so eine photometrische Messung ermöglichte (Stowe *et al.*, 1995).

Die spezifische Aktivität wurden angegeben in [mM (MTT) · min<sup>-1</sup> · mg (Protein)<sup>-1</sup>]:

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot \text{MTT [mM]}}{\text{min} \cdot 13 \cdot \text{Proteinmenge [mg]}}$$

$\Delta E/\text{min}$  = Änderung der Extinktion pro min

13 = molare Extinktionskoeffizient des reduzierten MTT bei 570 nm  
(Produktdatenblatt von Sigma, Nakamura *et al.*, 1986)

MTT [mM] = die Konzentration an MTT im Test betrug 0,776 mM

### 3.13.3 Charakterisierung der Aminotransferasen NeoB und LivB

Entsprechend der bereits beschriebenen Transaminierung von Paromamin zu Neamin durch NeoB in einem mit NeoQ gekoppelten Test (Huang *et al.*, 2007) wurde die Aminotransferaseaktivität von NeoB bzw. LivB unter Beteiligung einer AGA-Oxidase (NeoQ oder LivQ) und mit verschiedenen Substraten untersucht. Dazu wurden die jeweiligen His-tag-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen mit den in 3.12.5 aufgeführten Pufferlösungen I gereinigt.

#### Zusammensetzung des Aminotransferase-Tests

- 50 mM Tris/HCl pH 8
- 2,5 mM L-Glutamat
- 0,1 mM Pyridoxalphosphat (PLP)
- 0,5 mM (z. T. durch Festphasenextraktion gereinigtes, siehe 3.14) Substrat
- 25 µg/100 µl gereinigte Oxidase (NeoQ oder LivQ)
- 25 µg/100 µl gereinigte Aminotransferase (NeoB oder LivB)

Nach Inkubation der Reaktionsansätze ÜN bei 37°C wurden die AGAs zunächst über Festphasenextraktion isoliert und die erhaltenen Suspensionen über DC (3.1.5) aufgetrennt. Eine vorherige dünnschichtchromatographische Überprüfung war aufgrund des hohen Glutamatgehalts mit Ninhydrin-Reagenz nicht möglich.

### 3.13.4 Nachweis der Carbamoyltransferase-Aktivität von TobZ

Zur Untersuchung der Carbamoyltransferase-Aktivität von TobZ wurden sowohl gereinigtes Enzym als auch durch Zentrifugalkonzentratoren (50 kDa, Vivascience AG Hannover) ankonzentrierte lösliche Fraktionen in Zellaufschlusspuffer C eingesetzt (10% (v/v)).

#### Zusammensetzung des Carbamoylierungsansatzes

(verändert nach Freel Meyers *et al.*, 2004):

- 50 mM Tris pH 8
- 10 mM MgCl<sub>2</sub> 30 mM CAP
- 5 mM ATP
- 2 mM AGA (KAN-A, KAN-B, TOB)

Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte 6 h bei 37°C oder ÜN bei 30°C.

Des Weiteren wurde geprüft, ob auch andere Metallionen als Co-Faktoren für die Carbamoyltransferase TobZ wirken können. Dazu wurde das  $\text{MgCl}_2$  im Zellaufschluss-puffer und im Testansatz jeweils durch eines der folgenden Salze ersetzt (zu einer Endkonzentration von 5 mM):  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$  und  $\text{CoCl}_2$ .

### 3.14 Festphasenextraktion („solid phase extraction“, SPE)

Die basischen AGAs konnten über starke Kationenaustauschsäulen (strata-X-C, Phenomenex Aschaffenburg) aus den Reaktionsansätzen (3.13.1.1-3.13.1.3 und 3.13.3) isoliert und von Störkomponenten befreit werden. Dazu erfolgte zuerst die Konditionierung der Säule mit 1 ml Methanol und anschließend 1 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . Danach wurde die Probe, welche mit dem gleichen Volumen an konzentrierter Ameisensäure versetzt wurde, aufgegeben. Es folgte die Reinigung durch Waschen mit 2 ml Methanol/ 5% Ameisensäure (1:1) und 1 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . Schließlich wurde das Isolat mit 1 ml Methanol/ 25% Ammoniak (1:1) eluiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das entstandene Präzipitat wurde in Wasser gelöst, so dass die Konzentration des Aminoglykosidantibiotikum ca. 10 mM betrug, und zur Überprüfung 1  $\mu\text{l}$  mittels DC aufgetrennt.

### 3.15 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zum Auftrennen und Nachweis der AGAs wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt, eine planare Chromatographie bei der als stationäre Phase eine mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolie (Kieselgel 60 F254, Macherey-Nagel, Düren oder Merck, Darmstadt) diente.

Als mobile Phase wurden folgende Fließmittel verwendet:

**Fließmittel A** (Pauncz, 1978)

0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,5)

1,5 M  $\text{NaCl}$

5% Tertiärbutylalkohol

**Fließmittel B** (Yu *et al.*, 2008)

Propanol/Methanol/Ammoniak (25%) (25:20:23)

**Fließmittel C**

Methanol/Chloroform/Ammoniak (12,5%) (1:0,2:1)

Zur Sättigung der Dampfphase wurden die Chromatographiekammern vor der Benutzung mehrere Stunden bei Raumtemperatur mit dem Laufmittel inkubiert. Nach Entwicklung und Trocknung der DC-Folien, erfolgte entweder die Detektion durch besprühen mit Ninhydrin-Lösung (0,2% in Ethanol) und anschließender Hitzebehandlung, oder das Chromatogramm wurde für die Bioautographie eingesetzt.

### **3.16 Bioautographie**

Die Bioautographie ist ein mikrobiologisches Testsystem zur Identifizierung antibiotisch aktiver Substanzen. Dabei wurde das Dünnschichtchromatogramm in eine Petrischale gelegt, dünn mit Weichnähragar (vgl. 3.5.3), der mit einer ÜN-LB-Kultur des Prüfstammes *M. luteus* inokuliert wurde, überschichtet und ÜN bei 37°C inkubiert. Zur besseren Veranschaulichung der Wachstumshemmzonen wurde anschließend der Agar wieder vorsichtig von der DC-Folie gelöst und in Klarsichtfolie mit einem schwarzen Papier im Hintergrund eingescannt.

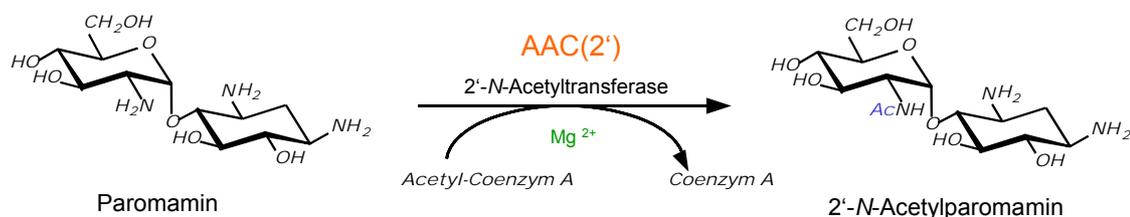
## 4 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit behandelten Aminoglycosidantibiotika (AGAs) bestehen aus der Aminocyclitol-Kernstruktur 2-Desoxystreptamin (2-DOS) und glycosidisch verknüpften Aminozyckern. Während die enzymatische Biosynthese von 2-DOS bereits vollständig geklärt ist (siehe 2.2.5.2) und jüngst auch Glycosylierungsreaktionen nachgewiesen worden sind (siehe 2.2.5.3), ist wenig über die modifizierenden Biosynthese-Enzyme wie z. B. Oxidoreduktasen, Aminotransferasen oder Methyltransferasen bekannt. Die späteren Modifikationen nehmen aber großen Einfluss auf die antibiotische Wirkung der AGAs und sollten daher Gegenstand dieser Arbeit sein. Zur Untersuchung der Oxidoreduktasen NeoQ und LivQ und der Aminotransferasen NeoB und LivB wurden neben den kommerziell erhältlichen Substraten, wie Paromamin, Ribostamycin (RIB) bzw. Paromomycin zusätzlich die entsprechenden Biosynthese-Intermediate 2'-*N*-Acetylparomamin, 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C und 6'''-Hydroxyneomycin C enzymatisch synthetisiert.

### 4.1 Enzymatisch katalysierte Synthesen von Biosynthese-Intermediaten des Neomycin-Biosynthesewegs

#### 4.1.1 Synthese von 2'-*N*-Acetylparomamin

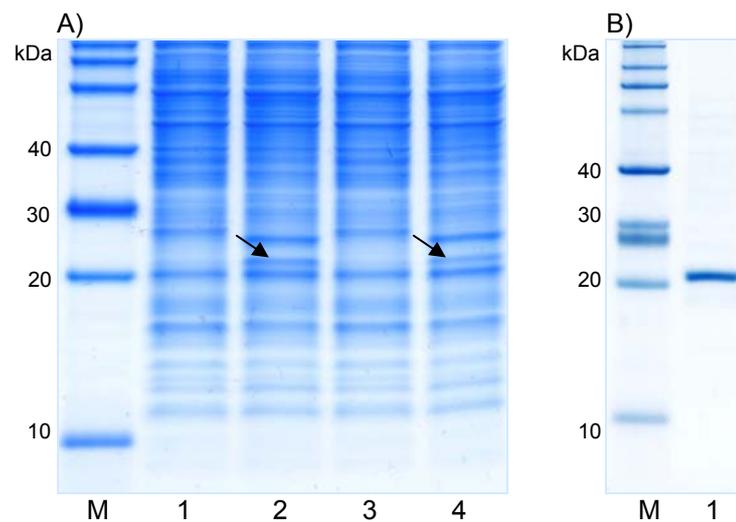
Die Synthese von Neamin durch 6'-Aminierung von Paromamin wird in der Biosynthese von Neomycin (NEO) in *S. fradiae* durch die Enzyme NeoQ und NeoB katalysiert (Huang *et al.*, 2007). In der postulierten Synthese von Lividomycin (LIV) in



**Abb. 4.1: Reaktionsschema zur Synthese von 2'-*N*-Acetylparomamin**

Die 2'-*N*-Acetyltransferase AAC(2') katalysiert den Transfer der Acetatgruppe von Acetyl-Coenzym A auf Paromamin.

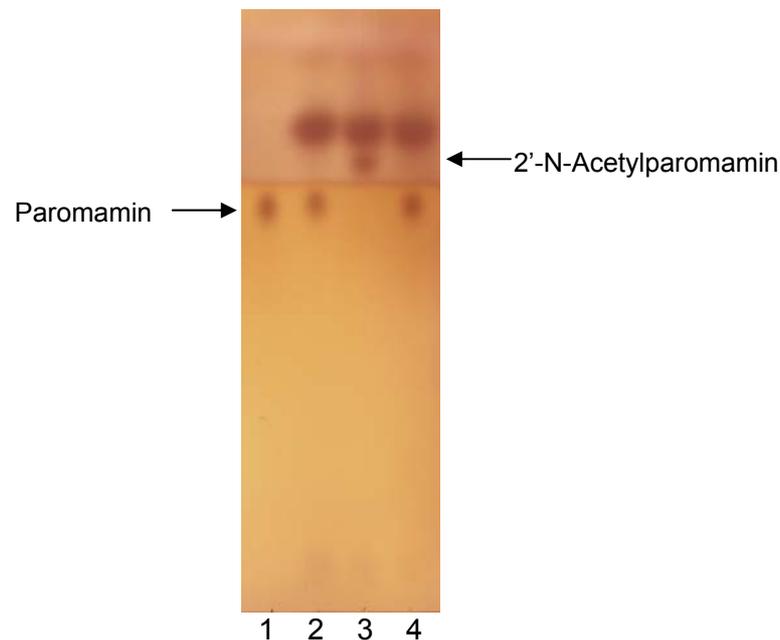
*S. lividus* bleibt jedoch die 6'-Position als OH Gruppe erhalten. Somit ist Paromamin das letzte gemeinsame Intermediat in den Biosynthesen für LIV und NEO. Die Paromamin-Synthese erfolgt durch die von NeoM bzw. LivM katalysierte Glycosylierung von 2-DOS mit UDP-GlcNAc. Das entstandene 2'-*N*-Acetylparomamin wird anschließend durch NeoD zu Paromamin deacetyliert (Fan *et al.*, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008b). Im Biosyntheseweg für LIV konnten die homologen Proteine LivD und LivM gefunden werden (Piepersberg *et al.*, 2007). Um 2'-*N*-Acetylparomamin als Substrat für Enzymumsätze zu generieren, wurde Paromamin mittels des Resistenzzyms AAC(2'), das die Acetat-Gruppe von Acetyl-Coenzym A an die 2'-Aminogruppe von AGAs der NEO-Gruppe transferiert (siehe Abb. 4.1), acetyliert. Dazu wurde bereits das entsprechende Gen *aac(2')* aus *S. kasuganensis* in den *E. coli*/*Streptomyces* „shuttle“ Vektor pUWL201PW kloniert (p201PW/*aac2'*), so dass das native Protein produziert werden konnte (nicht gezeigt).



**Abb. 4.2: Heterologe Produktion von AAC(2') in *S. lividans* TK23-pUWLHisaac(2')**

A) Heterologe Expression in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 72 h, Spur 1-2: Gesamtzellextrakte von *S. lividans* 66 TK23-pUWLHis (Kontrolle 1) bzw. -pUWLHisaac(2') (2), Spur 3-4: lösliche Fraktionen von *S. lividans* 66 TK23-pUWLHis (Kontrolle 3) bzw. -pUWLHisaac(2') (4); B) Reinigung von N-His<sub>10</sub>-AAC(2') über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (vgl. 3.12.5), Spur 1: Elution; M: Marker: 10-150 kDa PLUS Roti-Mark. Die Analyse der Proben erfolgte im 16%igen (A) bzw. 10%igen (B) PAGE-SDS Gel.

Um jedoch eine schnelle und effiziente Reinigung des Proteins zu ermöglichen erfolgte die Klonierung in pUWLHis; dadurch konnte das AAC(2')-Protein als N-His<sub>10</sub>-Protein produziert und weiter aufgereinigt werden. Das entstandene Konstrukt pUWLHisaac(2') wurde in *S. lividans* 66 TK23 oder TK64 (vgl. 3.7.2) transformiert und AAC(2') heterolog in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 72h produziert (siehe Abb. 4.2). Das N-His<sub>10</sub>-AAC(2') Fusionsprotein konnte wie unter 3.12.5 beschrieben mit den Pufferlösungen II unter nativen Bedingungen gereinigt werden. Das theoretische Molekulargewicht des Proteins von 17 kDa weicht von der Analyse im Proteingel ab (ca. bei 22 kDa, vgl. Abb. 4.2), möglicherweise wird das Laufverhalten des relativ kleinen Proteins durch das N-His<sub>10</sub>-tag beeinflusst. Das gereinigte AAC(2')-Protein (vgl. Abb. 4.2) wurde im weiteren Verlauf für Acetylierungsansätze mit Paromamin als Substrat eingesetzt. Die Acetylierungsreaktion setzte sich wie unter 3.12.1.1 beschrieben zusammen. Im Chromatogramm der Abb. 4.3 (Spur 3) ist zu sehen, dass Paromamin dabei vollständig durch AAC(2') acetyliert werden konnte.

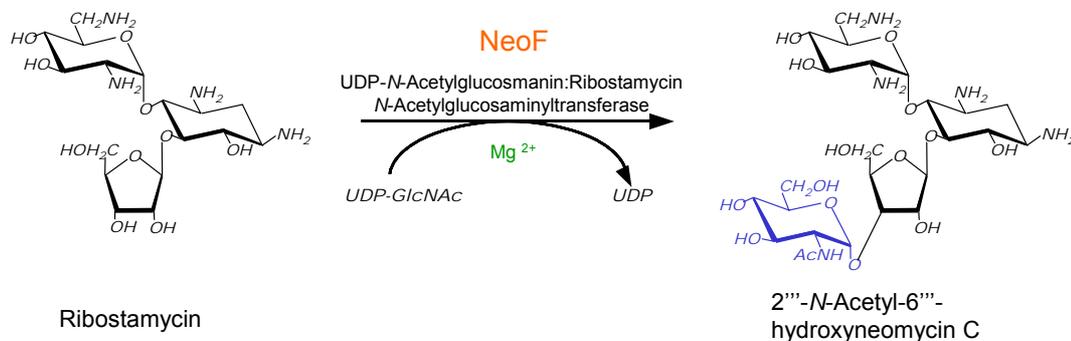


**Abb. 4.3: DC zur Bildung von 2'-N-Acetylparomamin durch N-His<sub>10</sub>-AAC(2')**

Spur 1: 1 µl einer 10 mM Paromamin-Stammlösung, Spur 2-4: 3,5 µl der Reaktionsansätze, Spur 2 (Kontrolle): Reaktion ohne Enzymzusatz, Spur 3: Umsatz von Paromamin nach Zusatz von gereinigtem N-His<sub>10</sub>-AAC(2'), Spur 4 (Kontrolle): Reaktion mit N-His<sub>10</sub>-AAC(2') aber ohne *N*-Acetyl-Coenzym A; Fließmittel: C, Detektion mit Ninhydrin-Lösung.

#### 4.1.2 Synthese von 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C

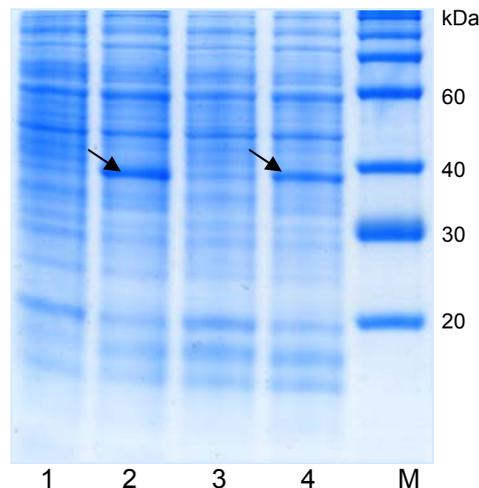
Als zweites Substrat, das für Umsätze mit den Oxidoreduktasen und Aminotransferasen benötigt wurde, sollte 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C enzymatisch in einer Glycosyltransferasereaktion aus RIB und UDP-GlcNAc synthetisiert werden. Die bereits von Fan *et al.* (2008) und Yokoyama *et al.* (2008) analysierte Glycosyltransferase NeoF katalysiert in der NEO-Biosynthese den Transfer der N-Acetyl-D-glucosamin-Einheit von UDP-GlcNAc auf RIB (vgl. Abb. 4.4).



**Abb. 4.4: Reaktionsschema zur Synthese von 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C**

Durch die enzymatische Funktion von NeoF wird die N-Acetylglucosamin-Einheit von UDP-GlcNAc auf RIB übertragen, dabei ist für die Enzymaktivität ein zweifach positiv geladenes Metallion (hier: Mg<sup>2+</sup>) nötig.

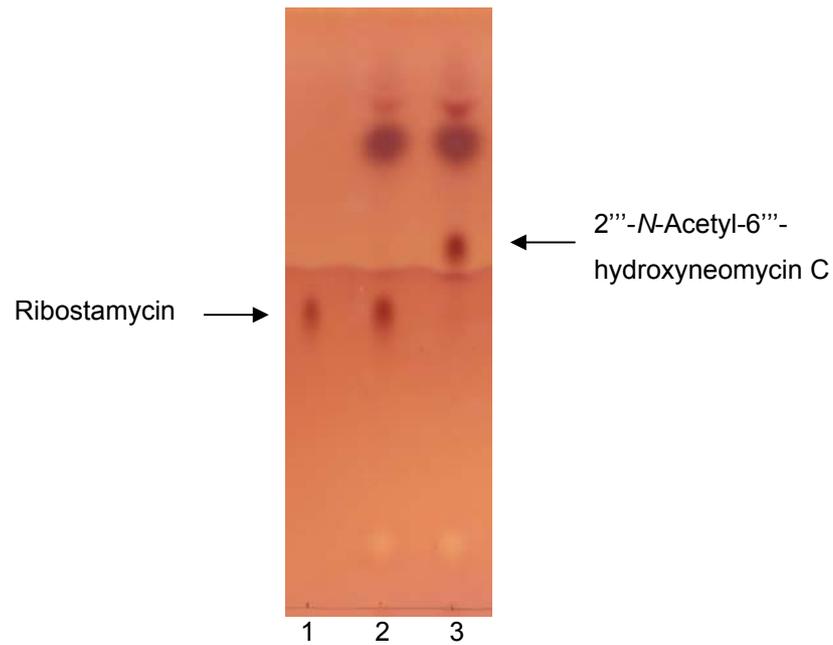
Dabei sind für die Funktion des NeoF zweifach positiv geladene Metallionen, insbesondere Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Co<sup>2+</sup> als Co-Faktoren essentiell. Homologe Proteine wurden in den Biosynthesewegen für LIV, PAR und RIB identifiziert (Piepersberg *et al.*, 2007). Die Überproduktion des Proteins NeoF erfolgte mit dem Konstrukt p201PW/neoF in *S. lividans* 66 TK23 oder TK64 bei 28°C für 72h in TSB<sub>Thio</sub>-Flüssigmedium. Zur Überprüfung der heterologen NeoF Produktion wurden die Proteinextrakte über SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei war das produzierte NeoF Protein mit einem MW von 39 kDa deutlich zu erkennen (siehe Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Heterologe Produktion von NeoF in *S. lividans* 66 TK64-p201PW/neoF**

SDS-PAGE der heterologen Expression in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 72 h, Spur 1-2: Gesamtzellextrakte von *S. lividans* 66 TK64-pUWL201PW (Kontrolle 1) bzw. -p201PW/neoF (2), Spur 3-4: lösliche Fraktionen von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PW (Kontrolle 3) bzw. -p201PW/neoF (4); M: Marker: 10-150 kDa PLUS Roti-Mark. Die Analyse der Proben erfolgte im 16%igen PAGE-SDS Gel.

Die Optimierung der Glycosyltransferasereaktion ergab eine vollständige durch NeoF katalysierte Konversion des RIB zu 2''-*N*-Acetyl-6''-hydroxyneomycin C, wenn in einem Ansatz identische molare Konzentrationen von RIB bzw. von UDP-GlcNAc mit 20% der löslichen NeoF-haltigen Fraktion von frisch angezogenen Zellen (Zellaufschlusspuffer B, vgl. 3.12.1) versetzt, und ÜN bei 30°C inkubiert wurden (Zusammensetzung des Glycosylierungsansatzes siehe 3.13.1.2; siehe Abb. 4.6, Spur 3). Wurden die nach der Überproduktion erhaltenen Zellen von *S. lividans* 66 TK23 oder TK64-p201PW/neoF länger als 5 Tage vor dem Zellaufschluss eingefroren, konnte eine starke Aktivitätsverringering registriert werden. In Kontrollansätzen ohne Enzym war kein Umsatz erkennbar, so dass eine Hintergrundaktivität von *S. lividans* ausgeschlossen werden konnte.

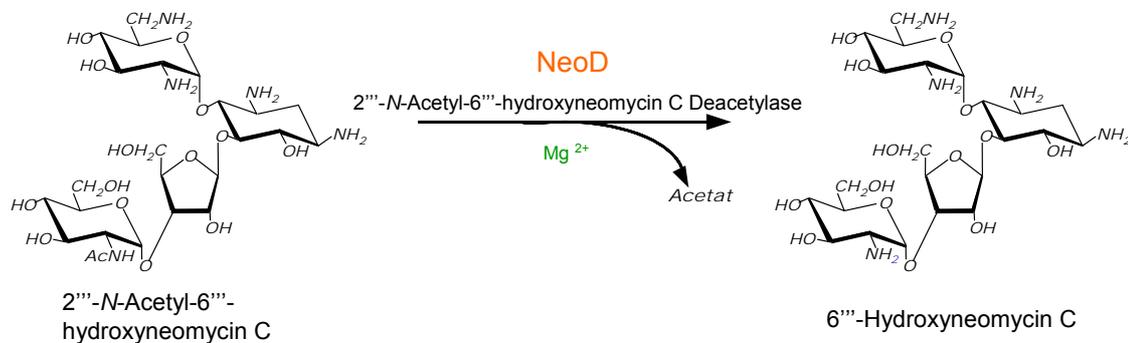


**Abb. 4.6: DC zur Bildung von 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C**

Spur 1: 1  $\mu$ l einer 10 mM RIB-Stammlösung, Spur 2 (Kontrolle): 3,5  $\mu$ l der RIB Glycosyltransferasereaktion (siehe 3.13.1.2) mit der löslichen Fraktion von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PW, Spur 3: 3,5  $\mu$ l der RIB Glycosyltransferasereaktion mit der löslichen Fraktion von *S. lividans* 66 TK23-p201PW/neoF, Fließmittel: C, Detektion mit Ninhydrin-Lösung.

### 4.1.3 Synthese von 6'''-Hydroxyneomycin C

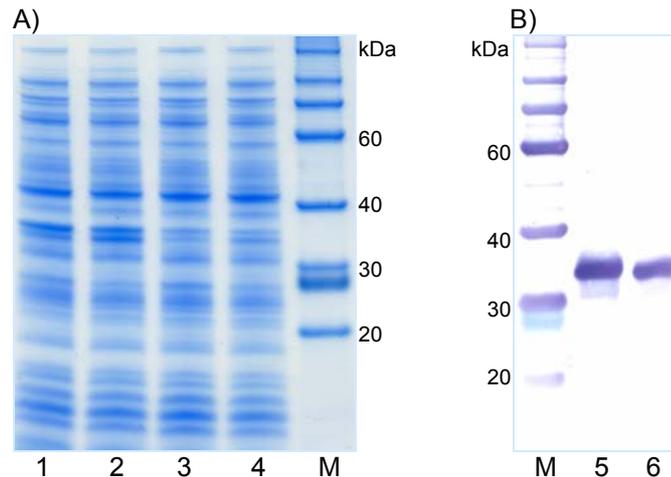
Da nicht sicher war, ob 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C oder 6'''-Hydroxyneomycin C das eigentliche Substrat für die 6'''-Aminierungsreaktion ist, musste auch 6'''-Hydroxyneomycin C enzymatisch synthetisiert werden. Nachdem RIB vollständig mittels NeoF zu 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C umgesetzt werden konnte, sollte die 2'''-*N*-Acetyl-Einheit enzymatisch mit Hilfe der Deacetylase NeoD entfernt werden (vgl. Abb. 4.7).



**Abb. 4.7: Reaktionsschema zur Synthese von 6'''-Hydroxyneomycin C**

Das Protein NeoD katalysiert die Deacetylierung von 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C.

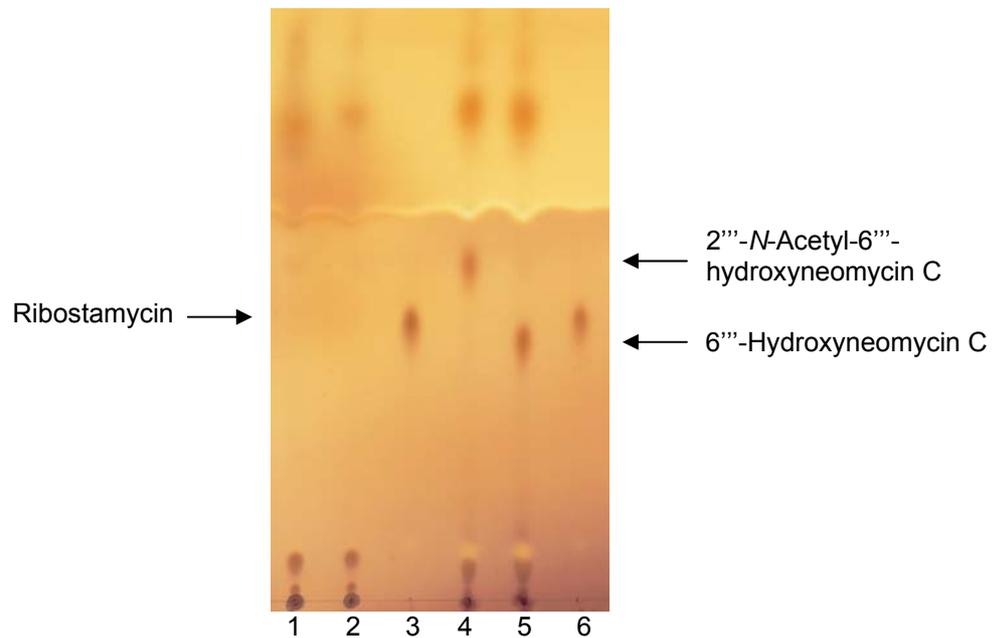
Die Deacetylase NeoD ist bifunktional und *in vitro* in der Lage, sowohl die Deacetylierung von 2'-*N*-Acetylparomamin als auch von 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C zu katalysieren (Yokoyama *et al.*, 2008b). Dabei zeigt das Enzym keine Präferenz für eines der beiden Substrate. Es wurde spekuliert, dass die zweite Deacetylierungsreaktion *in vivo* möglicherweise durch eine andere Deacetylase katalysiert wird. Allerdings wird vom NEO-Cluster nur eine Deacetylase codiert. Mutanten mit einer gezielten Gendisruption im *neoD*-Gen sind nach der Zugabe von 2-DOS zum Medium nicht in der Lage NEO zu bilden, nach dem Zufüttern von Neamin wird aber erneut NEO gebildet (Fan *et al.*, 2008). Auch im LIV-Biosynthesecluster konnte nur ein Protein gefunden werden (LivD) welches zu NeoD 58% Sequenzidentität aufweist (LivD 252 AS, NeoD 279 AS) und wahrscheinlich sowohl die Deacetylierung von 2'-*N*-Acetylparomamin als auch von 2'''-*N*-Acetyl-6'''-paromomycin katalysiert.



**Abb. 4.8: Heterologe Produktion von NeoD in *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/neoD**

Heterologe Expression A) SDS-PAGE Spur 1-2: Gesamtzellextrakte von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/neoD (1) bzw. -pET16b (2), Spur 3-4: lösliche Fraktionen von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/neoD (3) bzw. -pET16b (4); B) Western Blot mit Anti-His-tag-Antikörper zum Nachweis von N-His<sub>10</sub>-NeoD, Spur 5: Gesamtzellextrakt von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/neoD, Spur 6: lösliche Fraktion von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/neoD; M: Marker: 10-150 kDa PLUS Roti-Mark. Die Analyse der Proben erfolgte im 10%igen PAGE-SDS Gel.

Zur Produktion von NeoD wurde 50 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium mit der ÜN-Kultur von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/neoD zu einer OD<sub>595 nm</sub> von 0,1 inokuliert und bei 30°C bebrütet. Die Proteinproduktionsrate des His<sub>10</sub>-NeoD Fusionsproteins mit einem errechneten MW von 31 kDa, war dabei so gering, dass das Protein nur im Western Blot nachzuweisen war (vgl. Abb. 4.8). Für Deacetylierungsansätze wurden die Zellen immer direkt nach der Überproduktion von NeoD aufgearbeitet. Dazu wurden die Zellen in 2,5 ml Puffer B aufgeschlossen und die lösliche Fraktion auf 500 µl durch 10 kDa Zentrifugal-Konzentratoren (vgl. 3.12.1) eingengt. Als Substrat für NeoD Umsätze diente dann ein NeoF Enzymumsatz (siehe 4.1.2), der 2''-N-Acetyl-6''-hydroxyneomycin C enthielt und zu 20% (v/v) mit der eingengten NeoD-haltigen Proteinfraction versetzt wurde. Nach Inkubation des Ansatzes ÜN bei 37°C konnte eine vollständige Deacetylierung zu 6''-Hydroxyneomycin C beim Nachweis über DC gezeigt werden (siehe Abb. 4.9, Spur 4). Über Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigtes NeoD Protein wies in Enzymansätzen keine Deacetylaseaktivität auf (nicht gezeigt).

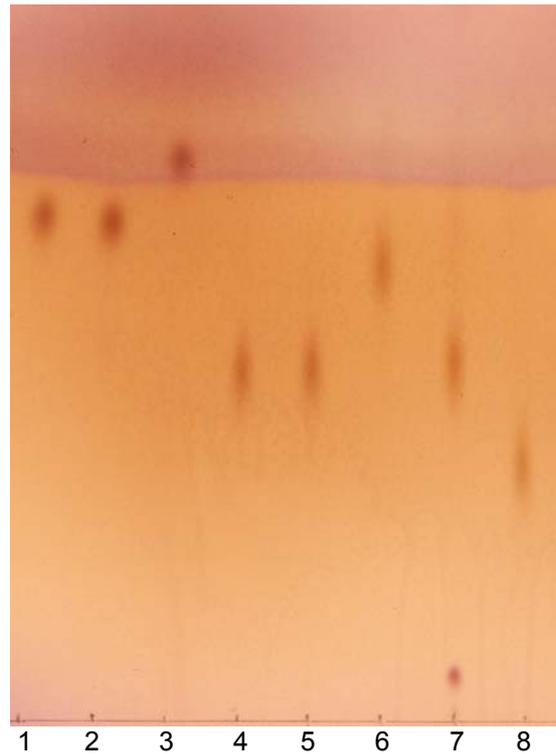


**Abb. 4.9: DC zum Nachweis der Deacetylierung von 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C**

Spur 1: 2 µl konzentrierte lösliche Proteinfraction von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/neoD, Spur 2: 2 µl konzentrierte lösliche Proteinfraction von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16, Spur 3: 1 µl einer 10 mM RIB-Stammlösung, Spur 4 (Kontrolle): 3,5 µl des Reaktionsansatzes: 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C (NeoF-Umsatz) + Proteinfraction von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16, Spur 5: 3,5 µl des Reaktionsansatzes: 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C (NeoF-Umsatz)+ Proteinfraction von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/neoD, Spur 6: 1 µl von 10 mM RIB-Stammlösung; Fließmittel: C, Detektion mit Ninhydrin-Lösung.

#### 4.1.4 Festphasenextraktion der enzymatisch synthetisierten Biosynthese-Intermediate des NEO-Biosynthesewegs

Nachdem die Substrate für nachfolgende Analysen zur Charakterisierung der Enzyme synthetisiert worden waren, mussten zunächst die synthetisierten Intermediate isoliert werden, da sie teilweise Komponenten enthielten, die die zu untersuchenden Enzyme inhibieren konnten. So erwies sich z. B. das *N*-Acetyl-Coenzym A als störend bei den Aktivitätstests der Proteine LivQ und NeoQ. Da es gelang, die Substrate 2'-*N*-Acetylparomamin, 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C und 6'''-Hydroxyneomycin C durch die enzymatischen Umsätze mittels AAC(2'), NeoF und NeoD (Abb. 4.3, 4.6, 4.9) nahezu 100%ig rein zu erhalten, konnte eine Isolierung über Festphasenextraktion (SPE) erfolgen. Dazu wurden starke Kationenaustauschsäulen (strata-X-C, Phenomenex Aschaffenburg) verwendet, die mit Toluolsulfonsäure funktionalisiertes Sorbens enthielten. Durch Ansäuerung der zu analysierenden Proben mit Ameisensäure lagen die Aminogruppen der AGAs in Kationenform vor und wurden so von den stark sauren Sulfonsäuren elektrostatisch angezogen und immobilisiert. Die in den Ansätzen enthaltenen Proteine konnten dabei aufgrund ihrer Größe das Sorbens nicht passieren, Verunreinigungen wie Salze oder neutrale/saure Substanzen konnten durch mehrere Waschschrte entfernt werden. Die basischen Verbindungen, wie die AGAs, wurden im Austausch mit Ammonium-Ionen eluiert. Die Isolate wurden nach der Elution in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und das Präzipitat zu einer Endkonzentration von 10 mM in Wasser gelöst. Zum Vergleich wurden auch die Substrate Paromamin und RIB aus Stammlösungen extrahiert. Die Analyse der Substrate durch die DC-Methode zeigte, dass die Extraktion nahezu verlustfrei verlief (siehe Abb. 4.10).



**Abb. 4.10: Festphasenextraktion synthetisierter Substrate**

Jeweils 1  $\mu$ l Spur 1-8, 1: 10 mM Paromamin-Stammlösung, 2: über SPE gereinigtes Paromamin, 3: über SPE gereinigtes 2'-*N*-Acetyl-Paromamin, 4: 10 mM Ribostamycin-Stammlösung, 5: über SPE gereinigtes Ribostamycin, 6: über SPE gereinigtes 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C, 7: über SPE gereinigtes 6'''-Hydroxyneomycin C, 8: 10 mM Neomycin B; Fließmittel: C, Detektion mit Ninhydrin-Lösung.

## 4.2 Vergleichende Charakterisierung der Oxidoreduktasen NeoQ und LivQ bzw. der Aminotransferasen NeoB und LivB

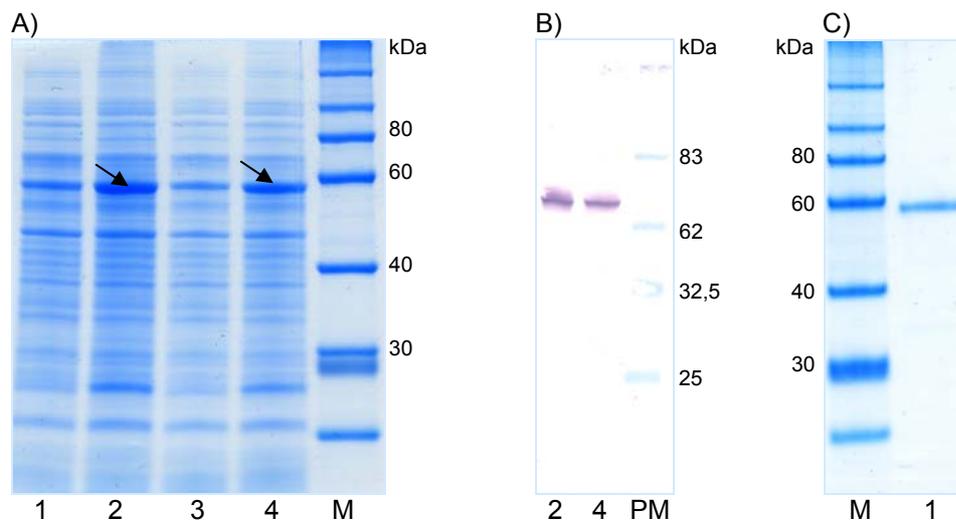
Die postulierten Enzyme des LIV-Biosynthesewegs in *S. lividus* (vgl. 2.2.5.3, Abb. 2.12) zur Einführung der 6''-Aminogruppe, die Oxidoreduktase LivQ bzw. Aminotransferase LivB, weisen hohe Sequenzidentität zu NeoQ (72%, NeoQ 541 AS, LivQ 546 AS) bzw. NeoB (71%, NeoB/LivB 416 AS) aus dem NEO-Cluster in *S. fradiae* auf, und wurden deshalb vergleichend untersucht. Erste Studien zu NeoQ und NeoB von Huang *et al.* (2007) gaben Hinweise auf eine Bifunktionalität der beiden Enzyme, und zeigten in einem NeoQ/NeoB gekoppelten Test eine Umsetzung von Paromamin zu Neamin. In anderen Ansätzen wurde die NeoB-Aktivität durch die Rückreaktion von NEO-C zu 6''-Dehydro-6''-oxoneomycin C bestimmt. In der Biosynthese von LIV ist nur der zweite Schritt, die Aminierung an der 6''-Position erforderlich, da an der 6'-Position die OH-Gruppe des Paromamins erhalten bleibt. Daher war es sinnvoll, zu untersuchen, ob die Enzyme LivQ und LivB bzw. NeoQ und NeoB auch in *in vitro* Enzymtests unterschiedliche Substratspezifitäten zeigen.

### 4.2.1. Klonierung und Überproduktion von LivQ und NeoQ

Zur heterologen Expression der postulierten Oxidoreduktasen LivQ und NeoQ wurden das *livQ* Gen (1641 Bp) aus dem LIV-Biosynthesecuster von *S. lividus* und das *neoQ* Gen (1626 Bp) aus dem NEO-Cluster von *S. fradiae* mit den Primerpaaren *livQ*-A und *livQ*-EF/*livQ*-ES bzw. *neoQ*-A und *neoQ*-ES mittels PCR amplifiziert (vgl. 3.9.5). Über die Primer wurden durch Basenaustausche Erkennungsstellen für Restriktionsendonucleasen (*Nde*I bzw. *Bam*HI) eingefügt, die eine Klonierung in den Vektor pUCPU21 ermöglichten. Nach erfolgreicher Sequenzverifizierung wurden die Gene in verschiedene *E. coli* bzw. *Streptomyces* Expressionsvektoren ligiert (vgl. Tab. 3.4 und 3.7).

Bei allen Ansätzen mit *E. coli* lag das heterologe LivQ Protein trotz Verwendung verschiedener Promotorsysteme, unterschiedlicher *E. coli* Stämme und Variierung der Expressionsbedingungen (vgl. 3.10) ausschließlich in unlöslicher Form vor. Gleiches war bei der Produktion des N-His<sub>10</sub>-LivQ Proteins (pUWLHisLivQES) in *S. lividans* 66 TK23 oder TK64 und *S. coelicolor* zu beobachten. Durch Restriktion von pAC75livQEF mit den Endonucleasen *Nde*I und *Hind*III und der Ligation des erhaltenen *livQ*-Fragments in pUWL201PW (*Nde*I und *Hind*III) wurde das Plasmid

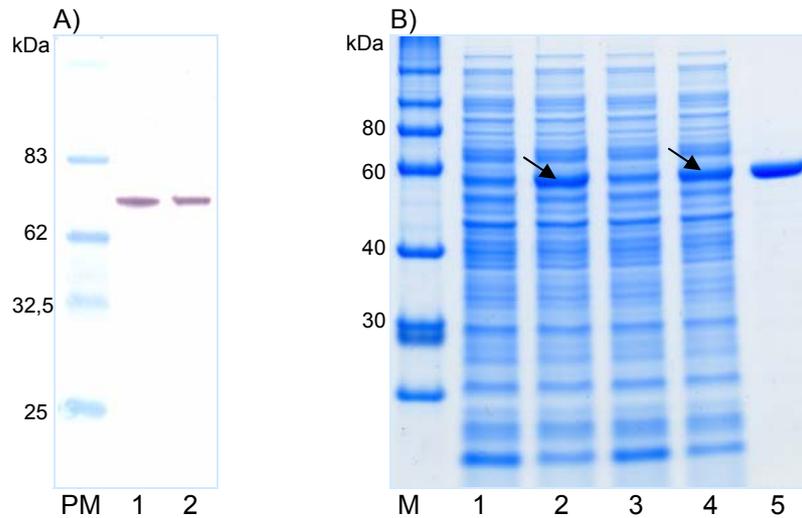
pUWL201PWlivQEFHis konstruiert. Über dieses konnte LivQ als C-His<sub>6</sub>-Fusionsprotein löslich in *S. lividans* 66 TK23 oder TK64 (72 h bei 28°C, TSB<sub>Thio</sub>) produziert werden. Der Zusatz von Riboflavin (Endkonzentration: 10 µM), als Vorstufe für den vermutlich proteingebundenen Co-Faktor FAD, führte weder in *E. coli* noch in *S. lividans* zu einer Löslichkeit bzw. zu einer Erhöhung der Produktionsraten von LivQ. Abbildung 4.11 zeigt die Produktion und Reinigung des C-His<sub>6</sub>-LivQ-Fusionsprotein mit einem MW von 59,7 kDa.



**Abb. 4.11: Heterologe Produktion, Western Blot und Reinigung von C-His<sub>6</sub>-LivQ**

A) SDS-PAGE der heterologen Expression in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 72 h, Spur 1-2: Gesamtzellextrakte von *S. lividans* 66 TK64-pUWL201PW (1) bzw. -pUWL201PWlivQEFHis (2), Spur 3-4: lösliche Fraktionen von *S. lividans* 66 TK64-pUWL201PW (3) bzw. -pUWL201PWlivQEFHis (4); B) Western Blot mit Anti-His-tag-Antikörper zum Nachweis von C-His<sub>6</sub>-LivQ, Spuren 2 und 4 analog von A); C) Spur 1: Elution der Reinigung von C-His<sub>6</sub>-LivQ über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Puffer II, vgl. 3.12.5); M: Marker: 10-150 kDa PLUS Roti-Mark, PM: Prestained Protein Marker. Die Analyse der Proben erfolgte im 10%igen PAGE-SDS Gel.

Auch das NeoQ Protein lag in *E. coli* BL21 (DE3) als unlösliches Expressionsprodukt vor. Die lösliche Proteinproduktion konnte aber mit *S. lividans* 66 TK23 oder TK64-pUWLHisneoQES, angezogen in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 72 h, erreicht werden. Im Western Blot (Abb. 4.12) ist zu sehen, dass das produzierte Protein vollständig löslich ist. Das N-His<sub>10</sub>-tag markierte NeoQ Fusionsprotein besitzt ein theoretisches MW von 59,4 kDa, dies entspricht der Größe des gereinigten produzierten Proteins in Abb. 4.12.

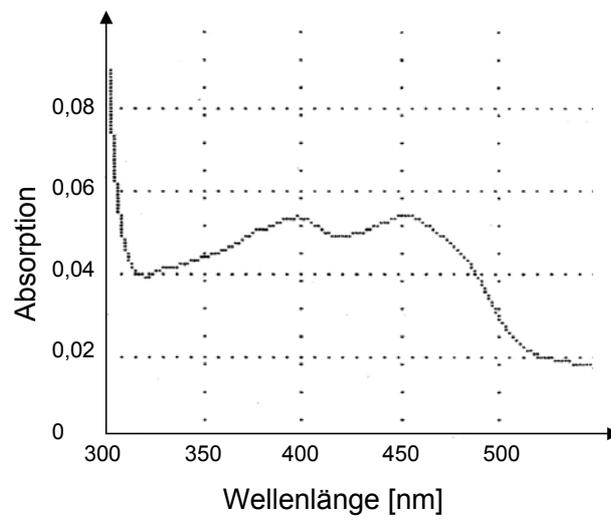


**Abb. 4.12: Heterologe Produktion, Western Blot und Reinigung von N-His<sub>10</sub>-NeoQ**

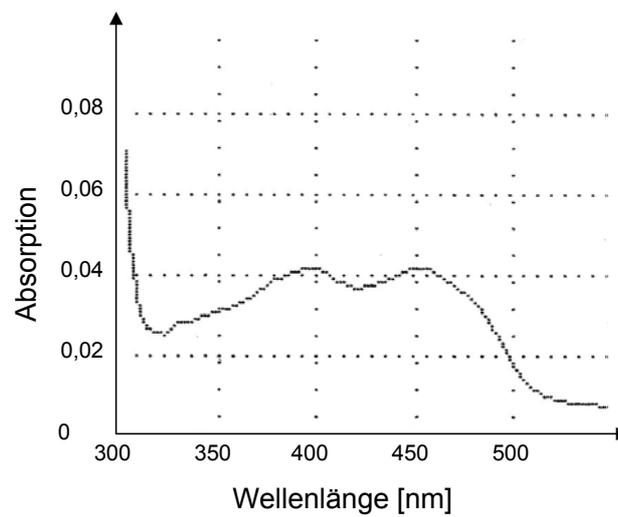
A) Western Blot des Gesamtzellextrakts (1) und der löslichen Fraktionen (2) von *S. lividans* TK23-pUWLHisneoQES; B) SDS-PAGE der heterologen Expression in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 72 h, Spur 1-2: Gesamtzellextrakte von *S. lividans* TK23-pUWLHis (1) bzw. -pUWLHisneoQES (2), Spur 3-4: lösliche Fraktionen von *S. lividans* TK23-pUWLHis (3) bzw. -pUWLHisneoQES (4), Spur 5: Elution der Reinigung von N-His<sub>10</sub>-NeoQ über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Puffer II, vgl. 3.12.5) ; M: Marker: 10-150 kDa PLUS Roti-Mark, PM: Prestained Protein Marker. Die Analyse der Proben erfolgte im 10%igen PAGE-SDS Gel.

Die His-tag markierten Proteine LivQ und NeoQ konnten mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt werden (Abb. 4.11, 4.12, Pufferlösung II siehe 3.12.5); die Proteinlösungen mit den gereinigten Enzymen erschienen dabei gelb. Diese gelbe Färbung wird als ein Indiz für das proteingebundene Flavin Adenin Dinucleotid (FAD) interpretiert; daneben konnten in beiden Aminosäuresequenzen über das Programm „Conserved Domain Search“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009) ein Bereich gefunden werden (218 AS), der Sequenzähnlichkeiten zu einer N-terminalen FAD Bindedomäne der Glucose-Methanol-Cholin (GMX) Oxidoreduktasen aufweist. Es wurden daher Absorptionsspektren der Proteinlösungen aufgenommen. Die Absorptionsspektren der Proteine LivQ (Abb. 4.13) und NeoQ (Abb. 4.14) zeigen deutliche Absorptionsmaxima im Bereich von 390 nm und 455 nm. Diese entsprechen den Absorptionsmaxima von 375 nm und 450 nm einer FAD-Lösung (Solomon und Shinitzky, 1977). Die leichte spektrale Verschiebung könnte auf Interaktionen des Coenzym mit den Proteinen zurückzuführen sein. Daraus lässt sich schließen, dass LivQ und NeoQ zur Gruppe der Flavoproteine gehören und FAD als Co-Faktor benötigen. Diese Ergebnisse sind auch konform zu den publizierten Daten (Huang *et al.*, 2007).

A)



B)



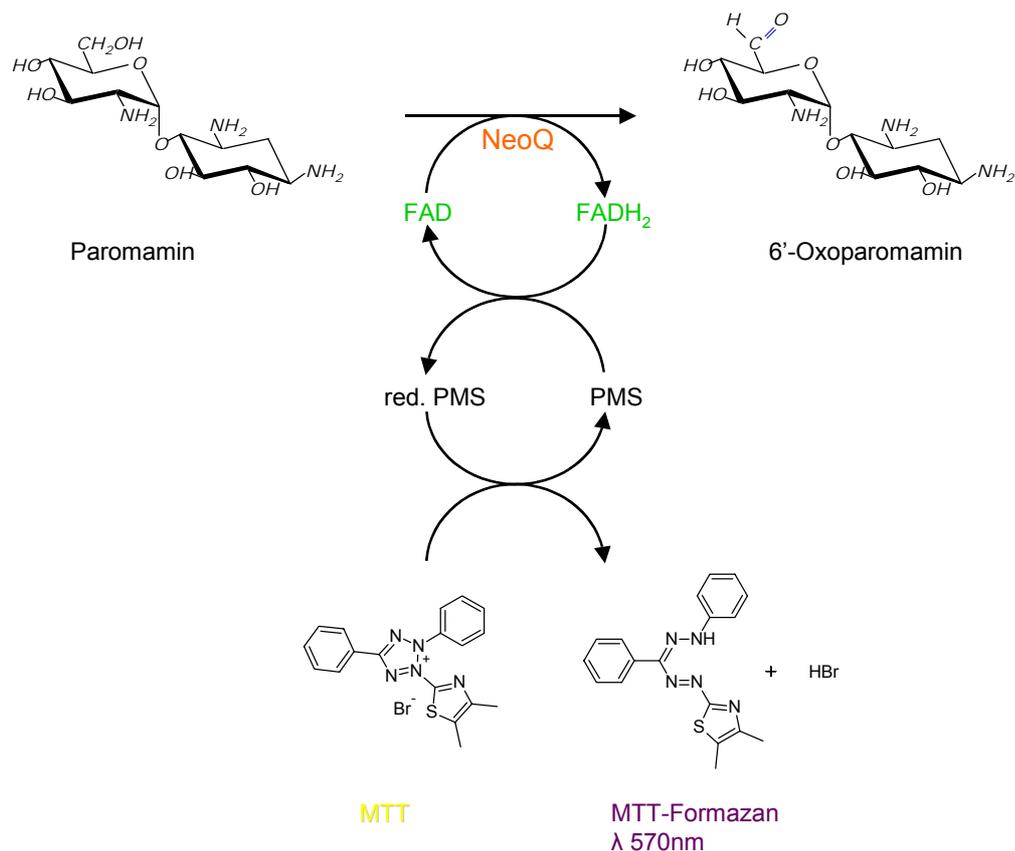
**Abb. 4.13: Absorptionsspektren der Proteine LivQ und NeoQ**

Die Absorptionsspektren der gereinigten Proteine A) C-His<sub>6</sub>-LivQ und B) N-His<sub>10</sub>-NeoQ wurden mittels des Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS Photometers aufgenommen; dabei diente der proteinfreie Elutionspuffer II als Blindwert.

#### 4.2.2 Bestimmung der Oxidoreduktaseaktivität

Die Arbeitshypothese war, dass die Enzyme LivQ und NeoQ bei der Biosynthese von LIV und NEO die Oxidation folgender Intermediate katalysieren: zum einen von 6'''-Hydroxy-paromomycin zu 6'''-Oxoparomomycin (LivQ), und zum anderen von Paromamin zu 6'-Oxoparomamin bzw. von 6'''-Hydroxyneomycin C zu 6'''-Oxoneomycin C (NeoQ). Die Aminotransferasen LivB bzw. NeoB übertragen anschließend eine Aminogruppe auf die bei der Oxidationsreaktion entstandene Ketogruppe. Bisher wurde nur die Aktivität von NeoQ in Enzymtests zusammen mit NeoB bei der Bildung von Neamin aus Paromamin gezeigt (Huang *et al.*, 2007). Der Nachweis der postulierten Bifunktionalität des NeoQ Enzyms konnte noch nicht erbracht werden.

Mittels eines gekoppelten Tests mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) und PMS (Phenazinmethosulfat) sollte die Aktivität der heterolog in *S. lividans* 66 TK23 oder TK64 produzierten und gereinigten N-His<sub>10</sub>-NeoQ- und C-His<sub>6</sub>-LivQ-Proteine, unabhängig von den Aminotransferasen, analysiert werden. In Abbildung 4.14 ist das Testprinzip am Beispiel der Oxidation von Paromamin durch das NeoQ Enzym gezeigt. Bei der Oxidation des Substrats wird der im Enzym NeoQ bzw. LivQ gebundene Co-Faktor FAD reduziert. PMS wird im weiteren Verlauf durch FADH<sub>2</sub> reduziert und wiederum durch MTT (gelb) oxidiert, das gebildete MTT-Formazan erscheint violett-blau und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden. Die Reinigung der eingesetzten Substrate über Festphasenextraktion (SPE, siehe 3.14 und 4.1.2) reduzierte die möglichen Hintergrundreaktionen, da MTT in Gegenwart von PMS auch nicht-enzymatisch unter anderem durch freie SH-Gruppen, wie z. B. durch Coenzym A, reduziert werden kann (Manchenko, 2003).

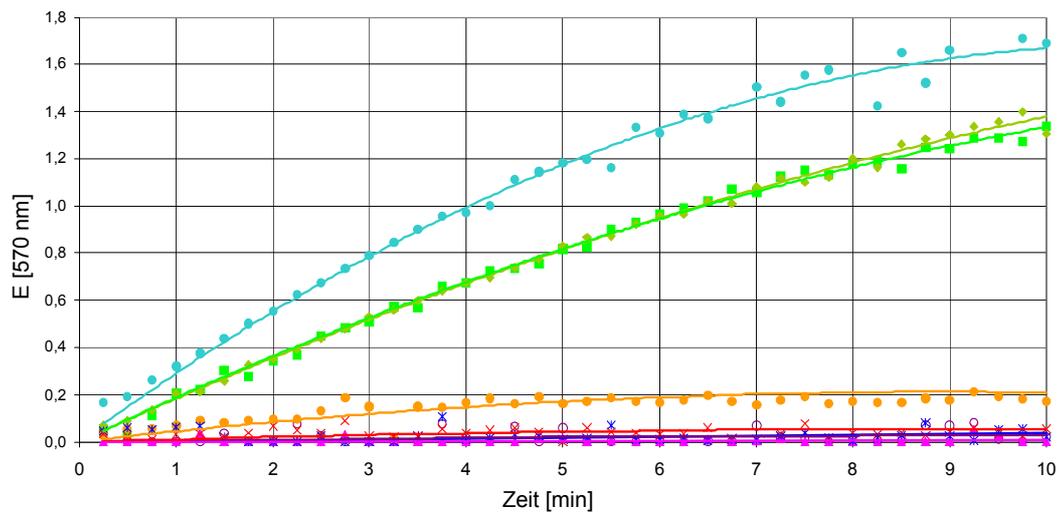


**Abb. 4.14: Testprinzip des MTT/PMS-Oxidoreduktasetests am Beispiel der Oxidation von Paromamin durch das Enzym NeoQ**

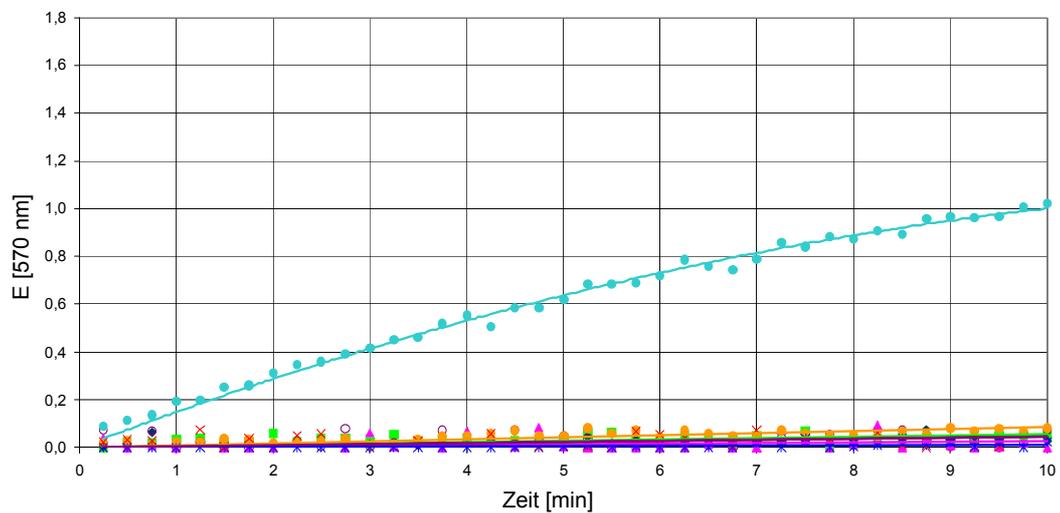
Durch die katalytische Aktivität des NeoQ wird Paromamin an der 6'-Position oxidiert, dabei wird die prosthetische Gruppe FAD zu FADH<sub>2</sub> reduziert. PMS wird im weiteren Verlauf durch FADH<sub>2</sub> reduziert und wiederum durch MTT (gelb) oxidiert, das gebildete MTT-Formazan erscheint violett-blau und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden.

Durch dieses Testverfahren konnten die Enzyme NeoQ und LivQ analysiert werden. Dazu wurden die Tests wie in 3.13.2 beschrieben angesetzt und die Reaktion durch Zugabe von gereinigtem Protein gestartet. Als Leerwert diente ein entsprechender Reaktionsansatz mit Elutionspuffer II. In Abbildung 4.15. ist für die verschiedenen getesteten Substrate der Verlauf der photometrischen Messung über einen Zeitraum von 10 min unter Verwendung des N-His<sub>10</sub>-NeoQ Proteins und des C-His<sub>6</sub>-LivB Proteins dargestellt. Wie unter 3.12.2 beschrieben wurden im Bereich des linearen Anstiegs die spezifischen Enzymaktivitäten (mM (MTT) · min<sup>-1</sup> · mg (Protein)<sup>-1</sup>) berechnet (siehe Tabelle 4.1).

## A) NeoQ



## B) LivQ



## C)

- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| ■ Paromamin                                | ◆ Paromamin (SPE)              |
| ○ 2'-N-Acetylparomamin (SPE)               | ▲ Ribostamycin (SPE)           |
| ● 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin (SPE) | ● 6'''-Hydroxyneomycin C (SPE) |
| ✱ Paromomycin                              | ✕ Saccharose                   |

**Abb. 4.15: Graphische Auswertung des MTT/PMS-Oxidoreduktasetests für die Enzyme NeoQ und LivQ**

Die Diagramme zeigen die in einem Intervall von 15 sec gemessenen Extinktionen ( $OD_{570\text{ nm}}$ ) der MTT/PMS-Oxidoreduktasetests von NeoQ (A) und LivQ (B) mit den in Legende (C) aufgeführten Substraten.

Für die Tests wurden sowohl erhältliche Substanzen als auch über Festphasenextraktion (SPE) gereinigte Substrate eingesetzt. Das Disaccharid Saccharose diente als Substrat in Negativkontrollen, mit dem keine Umsätze gemessen wurden. Die Ergebnisse bestätigen, dass ohne ein passendes Substrat keine Reduktion von MTT zu MTT-Formazan durch die Proteine NeoQ und LivQ stattfindet.

In den Biosynthesen von LIV und NEO sind 2'-*N*-Acetyl-Paromamin und Paromamin gemeinsame Intermediate. Das Paromamin wird im weiteren Verlauf der Biosynthese von NEO zu Neamin aminiert und zu RIB ribosyliert. Währenddessen bleibt bei der postulierten Biosynthese von LIV die OH-Gruppe erhalten, und Paromamin wird umgehend zu 5'-Ribosylparomamin ribosyliert. Die Enzymtests bestätigten, dass von NeoQ nur Paromamin (spezif. Enzymaktivität:  $4,2 \text{ mM (MTT)} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg (Protein)}^{-1}$ ) und nicht 2'-*N*-Acetyl-Paromamin (spezifische Enzymaktivität:  $0 \text{ mM (MTT)} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg (Protein)}^{-1}$ ) oxidiert werden kann. Dabei zeigt Abb. 4.15 (A) auch, dass die Reaktionsverläufe mit erhältlichem Paromamin und dem zur Kontrolle über Festphasenextraktion (SPE) gereinigten Paromamin nahezu identisch sind. Wie bereits im Chromatogramm Abb. 4.10 gezeigt, ist also der Verlust der synthetisierten gereinigten Intermediate sehr gering und so ein Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten mittels der so gewonnenen Substrate möglich. Bei allen Ansätzen mit LivQ hingegen konnte weder mit 2'-*N*-Acetyl-Paromamin noch mit Paromamin ein Substratumsatz gemessen werden.

Als weiteres Substrat wurde RIB eingesetzt. Im RIB ist die 6'-Position bereits aminiert und die 6'''-OH-Gruppe noch nicht vorhanden. Trotz mehrerer OH-Gruppen im RIB war sowohl mit NeoQ als auch mit LivQ keine Enzymaktivität nachweisbar. Diese Beobachtung unterstützt die von uns postulierten Biosynthesewege und zeigt, dass die Enzyme NeoQ und LivQ nur spezifische Zielgruppen erkennen und auch *in vitro* signifikante Substratspezifitäten aufweisen.

Mittels der Glycosyltransferase NeoF wurde mit den Substraten RIB und UDP-GlcNAc das 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C enzymatisch synthetisiert und anschließend durch NeoD zu 6'''-Hydroxyneomycin C deacetyliert. Diese beiden Intermediate der NEO Biosynthese wurden auch in Enzymtests mit LivQ verwendet. Sie unterscheiden sich von den postulierten LIV Biosyntheseintermediaten 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-paromomycin und 6'''-Hydroxyparomomycin nur in der 6'-Position, die bei der LIV Biosynthese als OH-Gruppe erhalten bleibt. Das 6'''-Hydroxyneomycin C wurde sowohl durch NeoQ als auch LivQ umgesetzt (siehe Abb. 4.15). Die spezifische Enzymaktivität von NeoQ ist mit diesem Substrat 1,5-fach höher als mit Paromamin. Überraschend war jedoch, dass 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin ebenfalls durch NeoQ oxidiert

werden konnte, allerdings ist die spezifische Enzymaktivität von  $1 \text{ mM (MTT)} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg (Protein)}^{-1}$  nicht sehr hoch. NeoQ ist also tatsächlich ein bifunktionales Enzym, das wahrscheinlich eine höhere Affinität zu 6'''-Hydroxyneomycin C als zu Paromamin besitzt.

Auch das LivQ Enzym zeigt mit 6'''-Hydroxyneomycin C eine deutliche spezifische Aktivität von  $3,5 \text{ mM (MTT)} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg (Protein)}^{-1}$ , aber nur eine sehr geringe spezifische Enzymaktivität von  $0,3 \text{ mM (MTT)} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg (Protein)}^{-1}$  mit 2'''-*N*-Acetyl-6'''-Hydroxyneomycin C. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass im Verlauf der LIV-Biosynthese nur 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-paromomycin das natürliche Substrat ist und zunächst durch LivD deacetyliert und anschließend durch LivQ zu 6'''-Oxo-paromomycin oxidiert wird. LivQ erkennt also im Gegensatz zu NeoQ nur ein Substrat und ist daher monofunktional.

In *S. lividus* wird wahrscheinlich durch die Aminierung von 6'''-Oxoparomomycin mittels LivB Paromomycin gebildet (Piepersberg *et al.*, 2007). Es sollte mit Hilfe von Paromomycin geklärt werden, ob NeoQ auch in der Lage ist, die 6'-OH-Gruppe dieses Substrats zu oxidieren. Das Enzym zeigt mit Paromomycin jedoch keine Aktivität. Die Oxidation der 6'-OH-Gruppe kann also nicht nachträglich am Pseudotetrasaccharid, sondern muss auf Stufe des Pseudodisacharids Paromamin erfolgen.

**Tabelle 4.1: Spezifische Enzymaktivitäten<sup>1</sup> von NeoQ und LivQ für verschiedene Substrate<sup>2</sup>**

Substrat <sup>2</sup>	NeoQ	LivQ
2'- <i>N</i> -Acetyl-Paromamin	0,0	0,1
Paromamin	4,2	0,1
Ribostamycin	0,0	0,0
2'''- <i>N</i> -Acetyl-6'''-Hydroxyneomycin C	1,0	0,3
6'''-Hydroxyneomycin C	6,4	3,5
Paromomycin	0,1	0,0

<sup>1</sup> angegeben in  $\text{mM (MTT)} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$

<sup>2</sup> SPE gereinigt

Unklar war in diesen Versuchen, ob die Oxidoreduktasen zusätzliche Metallionen als Co-Faktoren benötigen. Daher wurde geprüft, ob der Zusatz von Metallionen einen positiven Effekt auf die Aktivität von NeoQ hat. Dabei wurde Paromamin als Substrat und die entsprechenden Metallionen in einer Endkonzentration von 1 mM im Test verwendet. Es konnte jedoch keine Steigerung der Aktivität nachgewiesen werden. Mit

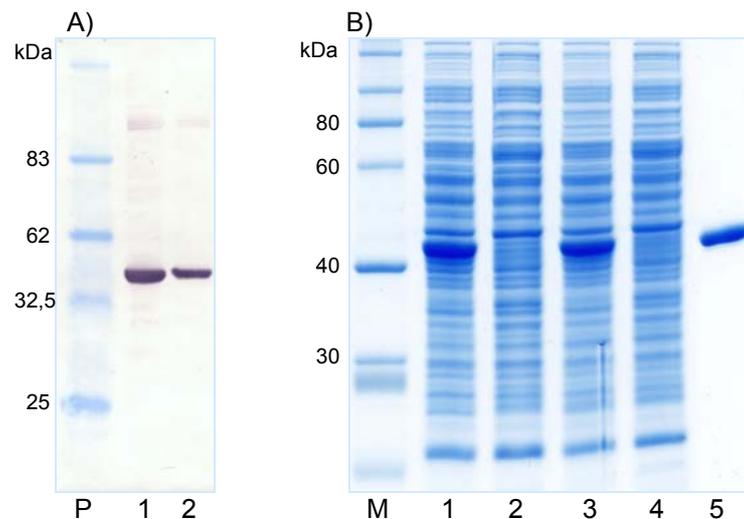
den Salzen ZnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> wurde das Enzym inhibiert (zu 100%), bzw. mit MgCl<sub>2</sub> wurde nur noch die halbe und mit CoCl<sub>2</sub> nur noch 1/10 der spezifischen Enzymaktivität ermittelt. KCl hatte keinen Einfluss auf die Reaktion. Aus diesen Daten lässt sich jedoch nicht direkt ableiten, dass NeoQ von diesen Metallionen inhibiert wird. Möglicherweise war die Salzkonzentration zu hoch. Die Metallionen könnten stattdessen aber auch die Redoxaktivität des PMS inhibieren, so wie es für das Mg<sup>2+</sup>-Ion beschrieben wurde (Rothe, 2002). Dadurch wird offenbar der Elektronentransfer an das MTT unterbunden.

### 4.2.3 Klonierung und Überproduktion von LivB und NeoB

Die Gene *livB* (1248 Bp) aus *S. lividus* und *neoB* (1248 Bp) aus *S. fradiae*, die für die (postulierten) Aminotransferasen LivB und NeoB codieren, wurden mit den Primerpaaren livB-A und livB-EF/livB-ES bzw. neoB-A und neoB-EF/neoB-ES per PCR amplifiziert (vgl. 3.9.5). Nach Spaltung der PCR-Fragmente mit den Restriktionsendonucleasen *NdeI* und *BamHI*, deren Erkennungssequenzen über die Primer eingefügt worden waren, wurde das erhaltene DNA-Fragment in den Vektor pUCPU21 kloniert. Über Sequenzierung wurde die Nucleotidsequenz überprüft und anschließend die Gene in verschiedene *E. coli* bzw. *Streptomyces* Expressionsvektoren ligiert (siehe Tab. 3.4 und 3.7).

Während das LivB Protein bei allen heterologen Expressionen in *E. coli* trotz verschiedenster Bedingungen (vgl. 3.10) jeweils unlöslich vorlag, gelang die lösliche Produktion in *S. lividans* 66 TK23 oder TK64 sehr gut. Mit den Expressions-Plasmiden pUWL201PWlivBES, pUWLHislivBES und pUWL201PWlivBEFHis konnte natives LivB, N-His<sub>10</sub>-LivB und C-His<sub>6</sub>-LivB in *S. lividans* 66 TK23 oder 64, angezogen in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 48-72 h, produziert werden. Bereits im Rohextrakt ist deutlich N-His<sub>10</sub>-LivB mit einem MW von 46 kDa zu erkennen (Abb. 4.16).

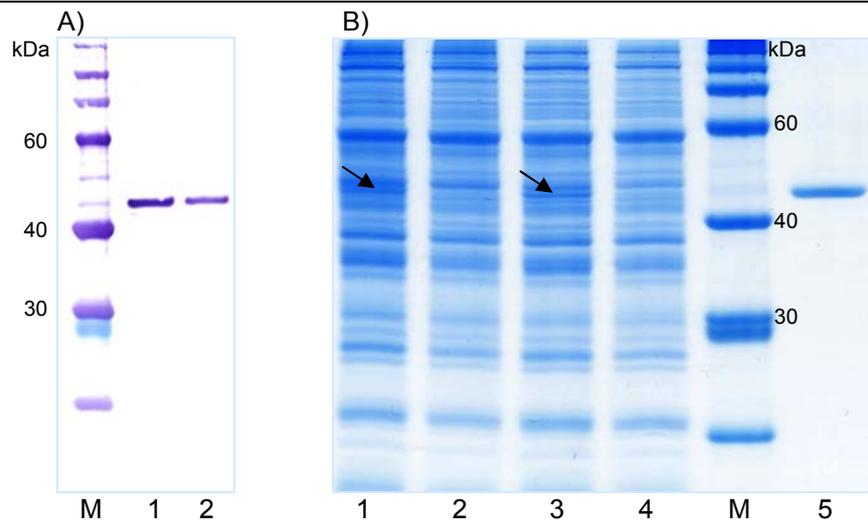
Die Fusionsproteine N-His<sub>10</sub>-LivB und C-His<sub>6</sub>-LivB ließen sich gut mit den Pufferlösungen II über Ni-NTA-Affinitätschromatographie reinigen (siehe 3.12.5). Da LivB in diesem Puffer nicht sehr stabil war und teilweise schon bei der Reinigung und bei Lagerung ÜN auf Eis ausfiel, wurden im weiteren Verlauf Puffer verwendet, die 10 % Glycerin enthielten (Pufferlösungen I, 3.12.5), um das Protein zu stabilisieren. Die Proteinlösung mit gereinigtem N-His<sub>10</sub>-LivB bzw. C-His<sub>6</sub>-LivB war rosa gefärbt.



**Abb. 4.16: Heterologe Produktion, Western Blot und Reinigung von N-His<sub>10</sub>-LivB**

A) Western Blot des Gesamtzell-extrakts (1) und der löslichen Fraktionen (2) von *S. lividans* 66 TK64-pUWLHislivBES; B) SDS-PAGE der heterologen Expression in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 72 h, Spur 1-2: Gesamtzell-extrakte von *S. lividans* 66 TK64-pUWLHislivBES (1) bzw. -pUWLHis (2), Spur 3-4: lösliche Fraktionen von *S. lividans* 66 TK64-pUWLHislivBES (3) bzw. -pUWLHis (4), Spur 5: Elution der Reinigung von N-His10-LivB über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Puffer I, vgl. 3.12.5); M: Marker: 10-150 kDa PLUS Roti-Mark, PM: Prestained Protein Marker. Die Analyse der Proben erfolgte im 10%igen PAGE-SDS Gel.

Versuche zur löslichen heterologen Proteinproduktion von NeoB in verschiedenen *E. coli* Stämmen (vgl. Tab. 3.1) mit den unter Tab. 3.7 aufgeführten konstruierten Plasmiden führten nicht zum Erfolg. Und auch bei der Anzucht von *S. lividans* 66 TK23 oder TK64-pUWLHisneoBES bzw. -pUWL201PWneoBEFHis in TSB<sub>Thio</sub>-Flüssigmedium für 72 h bei 28°C, konnte nur wenig unlösliches His-tag-markiertes NeoB Protein nachgewiesen werden. Durch Zugabe von Pyridoxin (Vitamin B6, als Vorstufe für den Transaminase-Co-Faktor PLP) zu einer Endkonzentration von 10 µM, konnte die Proteinlöslichkeit auch nicht verbessert werden. Nur die Verwendung von frischen Transformanten von *S. lividans* 66 TK64-pUWL201PWneoBEFHis direkt von der Transformationsplatte und deren Anzucht in SPMR<sub>Thio</sub> für 72 h bei 28°C führte zur Produktion von löslichem C-His<sub>6</sub>-NeoB mit einem MW von 46 kDa (siehe Abb. 4.17). C-His<sub>6</sub>-NeoB konnte über Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit Pufferlösungen I (siehe 3.12.5) gereinigt werden; die Proteinlösung erschien dabei im Gegensatz zu LivB farblos.

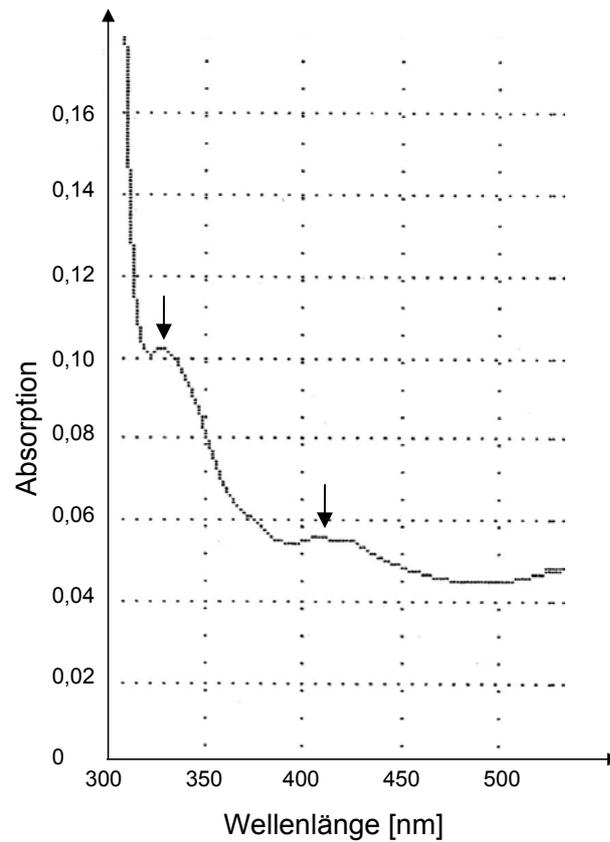


**Abb. 4.17: Heterologe Produktion, Western Blot und Reinigung von C-His6-NeoB**

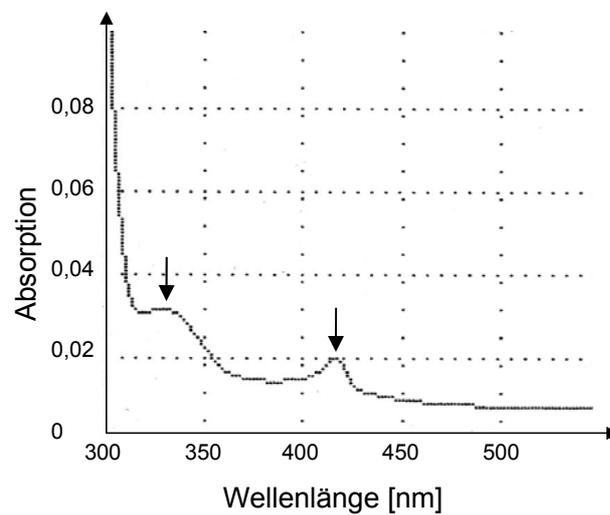
A) Western Blot des Gesamtzellextrakts (1) und der löslichen Fraktionen von *S. lividans* 66 TK64-pUWLHislivBES (2); (B) SDS-PAGE der heterologen Expression in SPMR<sub>Thio</sub> bei 28°C für 72 h, Spur 1-2: Gesamtzellextrakte von *S. lividans* 66 TK64-pUWL201PWneoBEFHIS (1) bzw. -pUWL201PW (2), Spur 3-4: lösliche Fraktionen von *S. lividans* 66 TK64-pUWL201PWneoBEFHIS (3) bzw. -pUWL201PW (4), Spur 5: Elution der Reinigung von C-His<sub>6</sub>-NeoB über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Puffer I, vgl. 3.12.5) ; M: Marker: 10-150 kDa PLUS Roti-Mark. Die Analyse der Proben erfolgte im 10%igen PAGE-SDS Gel.

Die prosthetische Gruppe aller Aminotransferasen ist PLP, das sich von Pyridoxin (Vitamin B6) ableitet und die reversible Übertragung einer Aminogruppe von einer Aminosäure auf eine Oxosäure katalysiert. Über das Programm „Conserved Domain Search“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009) konnte in den AS-Sequenzen von LivB und NeoB ein Bereich von 413 AS auffindig gemacht werden, mit Sequenzähnlichkeiten zur PLP-abhängigen Aspartat-Aminotransferase (AAT) Superfamilie. Neben AS-Resten zur möglichen Bindung des PLP wurde ein spezifischer und hoch konservierter Lysin-Rest (K 231) gefunden, mit dem PLP Schiff-Basen als Zwischenprodukt bilden könnte. Dabei wird im Verlauf der Transaminierung PMP gebildet (siehe Einleitung). Durch Aufnahme von Absorptionsspektren der gereinigten Proteine LivB und NeoB sollte der Co-Faktor PLP in den Proteinen nachgewiesen werden. Es wurden für beide Proteine Absorptionspeaks im Bereich von 325 nm (PMP) und 415 nm (PLP) ermittelt (siehe Abb. 4.18). Diese Absorptionspeaks entsprechen denen anderer PLP abhängiger Proteine (Vazquez *et al.*, 1991; Stetefeld *et al.*, 2006). Damit wurde der Nachweis erbracht, dass die Proteine PLP bzw. PMP als Coenzym enthielten.

A)



B)



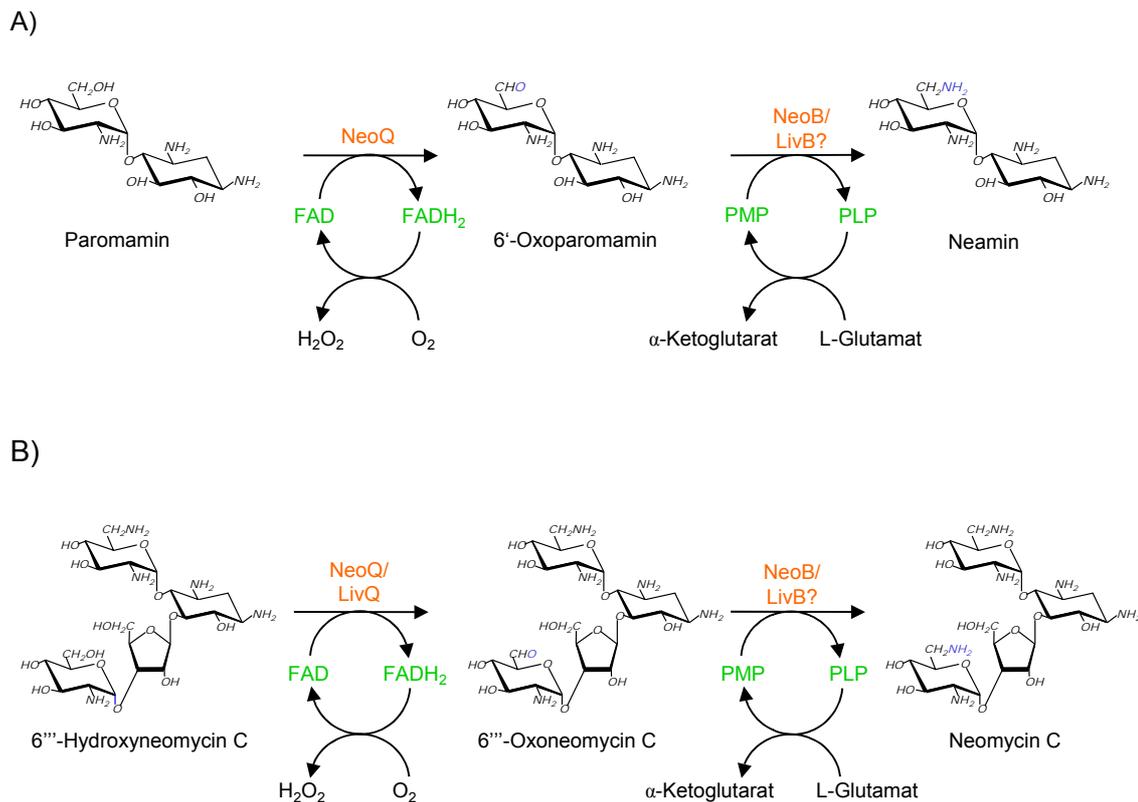
**Abb. 4.18: Absorptionsspektren der Proteine LivQ und NeoQ**

Die Absorptionsspektren der gereinigten Proteine A) N-His<sub>10</sub>-LivB und B) C-His<sub>6</sub>-NeoB wurden mittels des Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS Photometers aufgenommen, dabei diente der proteinfreie Elutionspuffer I als Blindwert. Die Pfeile markieren die Absorptionspeaks.

#### 4.2.4 Nachweis der Enzymaktivität der Aminotransferasen LivB und NeoB

Die Aminotransferasen LivB und NeoB katalysieren die Übertragung von Aminogruppen auf die durch die LivQ und NeoQ gebildeten Aldehydgruppen der vorauflaufenden Intermediate. Das LivB Protein sollte hierbei die Bildung von Paromomycin aus 6'-Oxoparomomycin katalysieren. Die Funktion von NeoB wurde bereits bei der Synthese von Neamin aus Paromamin in einem mit NeoQ gekoppelten Test und in Form einer Rückreaktion, bei der Neomycin C (NEO-C) desaminiert wurde, gezeigt (Huang *et al.*, 2007). Über Rückreaktionen, bei denen NEO-C und Neamin durch C-His<sub>6</sub>-NeoB und Paromomycin durch N-His<sub>10</sub>-LivB desaminiert werden sollten, wurde zuerst versucht, die bereits publizierten Ergebnisse zu reproduzieren und auch die LivB-Aktivität nachzuweisen. Dies führte jedoch zu keinem Resultat, denn trotz der Verwendung verschiedener Aminogruppenakzeptoren wie  $\alpha$ -Ketoglutarat, Oxalacetat, Glyoxylat, Pyruvat und Succinyl-Semialdehyd konnte weder eine Desaminierung der Substrate, noch die Bildung der dazugehörigen Aminosäure gezeigt werden. Daher erfolgten die Analysen der Aminotransferase-Aktivitäten wie im folgenden beschrieben über die Vorwärtsreaktionen.

Die durch LivQ bzw. NeoQ-katalysierte Oxidation hergestellten Intermediate wurden dabei als Substrate für Analysen der Aminotransferase-Aktivität in gekoppelten Essays verwendet. Dabei zeigte sich im Verlauf der Tests, dass keine weiteren exogenen Co-Faktoren wie z. B. NAD<sup>+</sup> in den Reaktionsansätzen erforderlich waren. Das enzymgebundene FADH<sub>2</sub> überträgt den Wasserstoff auf molekularen Sauerstoff, wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildet wird. Der Nachweis für die Notwendigkeit des Sauerstoffs wurde bereits für das NeoQ Enzym erbracht (Huang *et al.*, 2007). Aufgrund dessen enthielten die Reaktionsansätze keine weiteren Oxidationsmittel und setzten sich wie unter 3.13.3 beschrieben aus dem Substrat (Paromamin oder 6'''-Hydroxyneomycin C), L-Glutamat als Aminogruppendonor, PLP und jeweils einer über Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit Pufferlösungen II gereinigten Oxidoreduktase (C-His<sub>6</sub>-LivQ oder N-His<sub>10</sub>-NeoQ) und einer Aminotransferase (N-His<sub>10</sub>-LivB oder C-His<sub>6</sub>-NeoB) zusammen. Nach Inkubation der Tests ÜN bei 37°C wurden die Reaktionen durch Einfrieren gestoppt. Da der hohe L-Glutamatgehalt in den Reaktionsansätzen eine sofortige Überprüfung durch DC unmöglich machte, wurden die Ansätze zunächst über Festphasenextraktion isoliert und die erhaltenen Suspensionen über DC aufgetrennt.



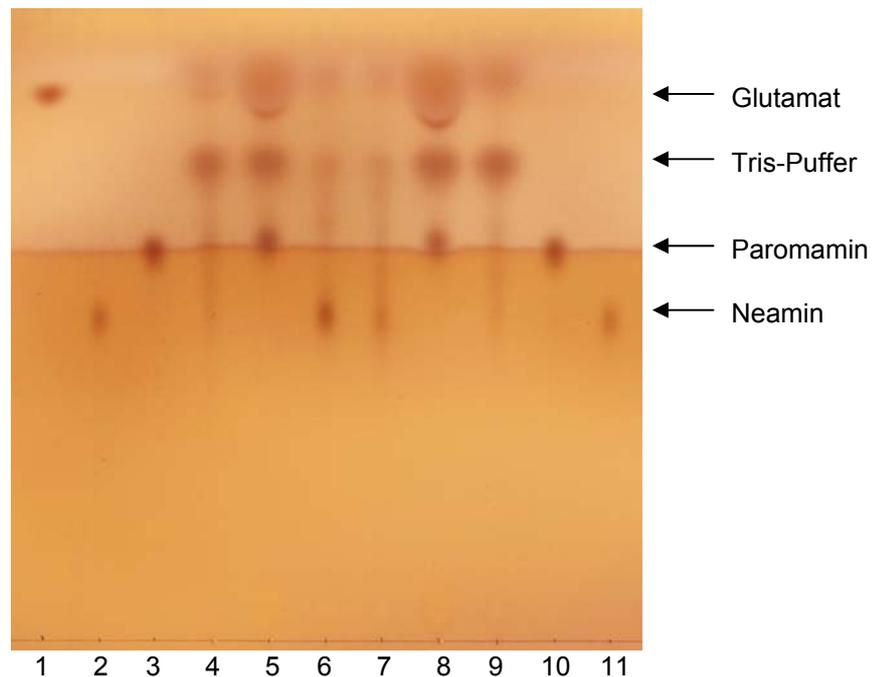
**Abb. 4.19: Reaktionsschema zur Synthese von Neamin aus Paromamin und NEO-C aus 6'''-Hydroxyneomycin C**

Gezeigt sind die durch NeoQ bzw. LivQ katalysierten Oxidationsreaktionen die zu den Intermediaten 6'-Oxoparomamin und 6'''-Oxoneomycin C führen, und die darauf folgende Aminotransferasereaktion vermittelt durch NeoB bzw. LivB.

In Abbildung 4.19 sind die verschiedenen postulierten Enzymumsätze für die durch LivQ bzw. NeoQ und den korrespondierenden Aminotransferasen LivB und NeoB katalysierte Bildung von Neamin aus Paromamin und NEO-C aus 6'''-Hydroxyneomycin C dargestellt. Es sollte analysiert werden, ob LivB ebenso wie LivQ monofunktionell ist, und ob man in jeweiligen Hybridansätzen die Oxidoreduktasen und Aminotransferasen aus den Stämmen *S. lividus* und *S. fradiae* miteinander kombinieren kann.

Zunächst wurde jedoch die von Huang *et al.* (2007) beschriebene Umsetzung von Paromamin zu Neamin bei Verwendung der Enzyme N-His<sub>10</sub>-NeoQ und C-His<sub>6</sub>-NeoB als Standardtests adaptiert und wiederholt (siehe Abb. 4.20). So konnte gezeigt werden, dass NeoQ und NeoB in Anwesenheit von L-Glutamat die Bildung von Neamin aus Paromamin katalysieren können. Durch Zugabe von PLP konnte die Umsatzrate noch weiter gesteigert werden (siehe Abb. 4.20). Während mit NeoB, entsprechend

den Erwartungen, als alleinigem Enzym im Ansatz keine Umsätze beobachtet wurden, war in Tests mit NeoQ als einzigem Enzym Paromamin verschmiert auf der DC sichtbar. Das gleiche Phänomen war zu beobachten, wenn in den Ansätzen mit beiden Enzymen der  $\text{NH}_2$ -Donor L-Glutamat weggelassen wurde, so dass die Aminotransferase-Reaktion nicht ablaufen konnte. Eine Erklärung für das „Verschmieren“ in den DC-Spuren könnte dabei sein, dass die Substrate/Produkte bei der Oxidation teilweise am Enzym gebunden blieben und erst allmählich durch das Laufmittel abgelöst wurden.



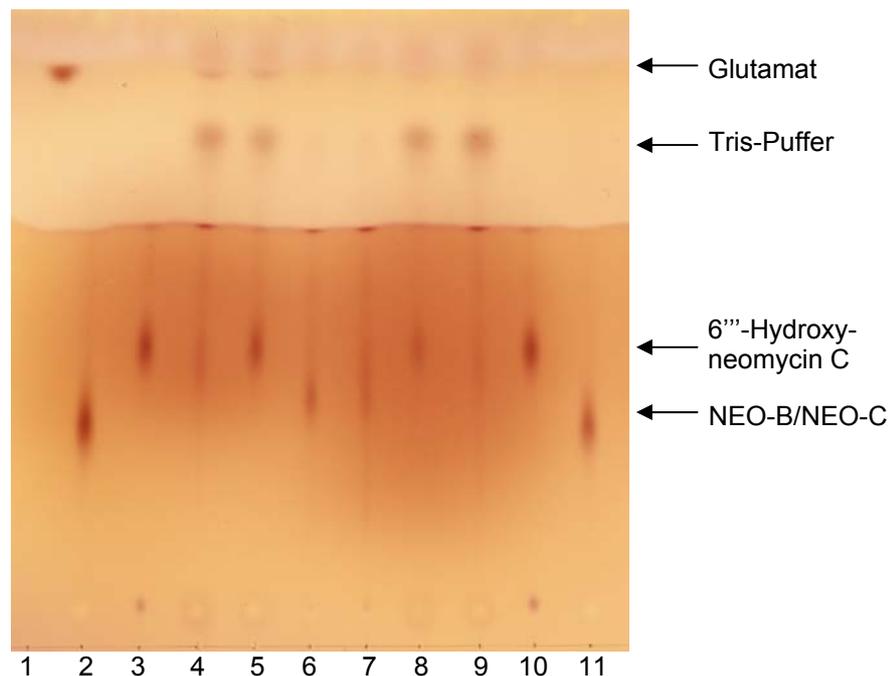
**Abb. 4.20: DC zum Nachweis der Aminotransferaseaktivität von NeoB durch die Bildung von Neamin**

Spur 1: 1  $\mu\text{l}$  einer 1 mM L-Glutamat-Stammlösung, Spuren 2 und 11: 1  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Neamin-Stammlösung, Spuren 3 und 10: 1  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Paromamin-Stammlösung; in den Reaktionsansätzen der Spuren 4-9 wurde Paromamin als Substrat eingesetzt: Spur 4 (Kontrolle): Ansatz mit N-His<sub>10</sub>-NeoQ, Spur 5 (Kontrolle): Reaktionsansatz mit C-His<sub>6</sub>-NeoB, Spur 6: Reaktionsansatz mit beiden Enzymen (N-His<sub>10</sub>-NeoQ und C-His<sub>6</sub>-NeoB), Spur 7: Ansatz analog 6 jedoch ohne PLP, Spur 8 (Kontrolle): Ansatz ohne jegliches Enzym, Spur 9 (Kontrolle): Ansatz mit beiden Enzymen (N-His<sub>10</sub>-NeoQ und C-His<sub>6</sub>-NeoB) aber ohne L-Glutamat; Fließmittel: C, Detektion erfolgte mit Ninhydrin-Lösung.

Auch die Bildung von NEO-C aus 6'''-Hydroxyneomycin C durch die Enzyme N-His<sub>10</sub>-NeoQ gemeinsam mit C-His<sub>6</sub>-NeoB konnte gezeigt werden (siehe Abb. 4.21). Der DC-Spot des gebildeten NEO-C zeigte ein Laufverhalten wie NEO-B, welches als Standard

diente. Ebenso konnte in diesen Ansätzen eine erhöhte Umsatzrate durch die Zugabe von PLP zur Reaktion beobachtet werden. Zudem war das eingesetzte Substrat wieder in Reaktionen mit NeoQ und NeoB ohne L-Glutamat oder mit NeoQ als einzigem Enzym, verschmiert sichtbar.

Die Ergebnisse in Abb. 4.20 und 4.21 bestätigen, dass die Aminotransferase NeoB wie die Oxidoreduktase NeoQ bifunktional ist, und die Übertragung einer Aminogruppe sowohl auf 6'-Oxoparomamin als auch auf 6'''-Oxoneomycin C katalysiert (vgl. Abb. 4.19).

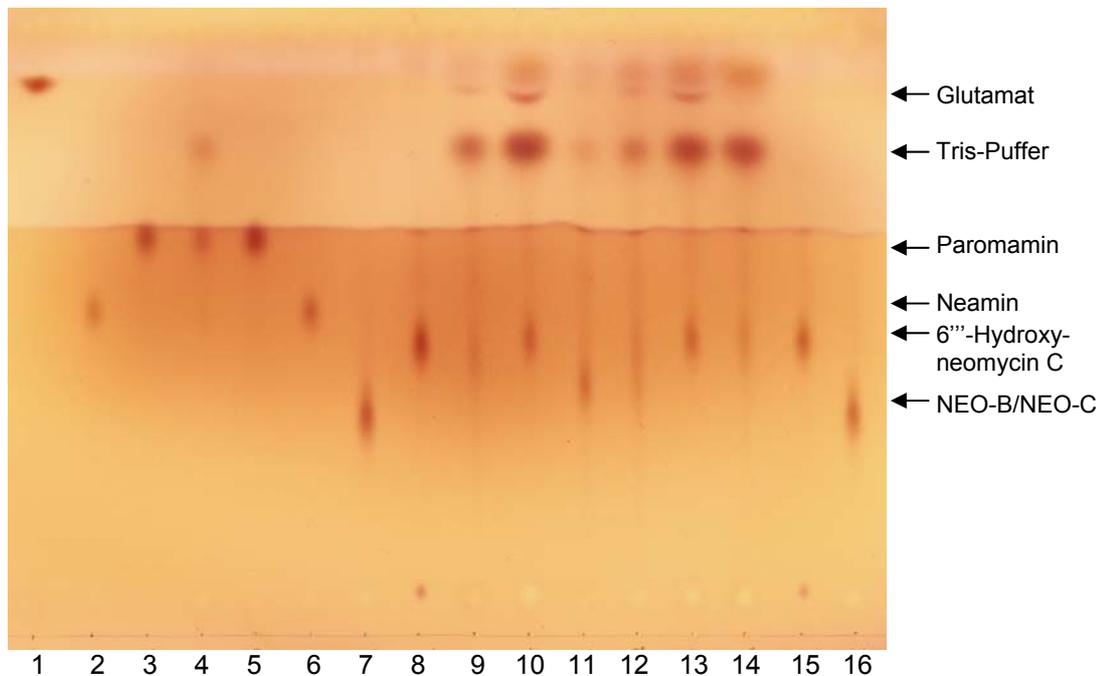


**Abb. 4.21: DC zum Nachweis der Aminotransferaseaktivität von NeoB durch die Bildung von NEO-C**

Spur 1: 1  $\mu$ l einer 1 mM L-Glutamat-Stammlösung, Spuren 2 und 11: 1  $\mu$ l einer 10 mM Neo-B-Stammlösung, Spuren 3 und 10: 6'''-Hydroxyneomycin C (SPE gereinigt), in den Reaktionsansätzen der Spuren 4-9 wurde 6'''-Hydroxyneomycin als Substrat eingesetzt: Spur 4 (Kontrolle): Ansatz mit N-His<sub>10</sub>-NeoQ, Spur 5 (Kontrolle): Reaktionsansatz mit C-His<sub>6</sub>-NeoB, Spur 6: Reaktionsansatz mit beiden Enzymen (N-His<sub>10</sub>-NeoQ und C-His<sub>6</sub>-NeoB), Spur 7: Ansatz analog 6 jedoch ohne PLP, Spur 8 (Kontrolle): Ansatz ohne jegliches Enzym, Spur 9 (Kontrolle): Ansatz mit beiden Enzymen (N-His<sub>10</sub>-NeoQ und C-His<sub>6</sub>-NeoB) aber ohne L-Glutamat; Fließmittel: C, Detektion erfolgte mit Ninhydrin-Lösung.

Auf gleiche Weise wurden Tests mit dem Enzympaar N-His<sub>10</sub>-LivB und C-His<sub>6</sub>-LivQ durchgeführt (siehe Abb. 4.22). In den Ansätzen mit Paromamin als Substrat konnten erwartungsgemäß keine Reaktionsumsätze gezeigt werden, da LivQ Paromamin nicht als Substrat akzeptiert und somit auch kein Substrat für LivB generiert wurde. Es konnte jedoch eine Umsetzung von 6'''-Hydroxyneomycin zu NEO-C mittels C-His<sub>6</sub>-

LivQ/N-His<sub>10</sub>-LivB gezeigt werden. Dieses Ergebnis bestätigte den postulierten Biosyntheseweg, so dass nach der LivQ-vermittelten Oxidation des 6'''-Hydroxy-paromomycins LivB die Aminierung zu Paromomycin katalysiert. Die Kontrollen zeigten keine Umsätze; aber wie bereits im NeoQ-Test scheint auch LivQ mit 6'''-Hydroxyneomycin C zu reagieren, was durch einen schwachen Spot angedeutet wird.



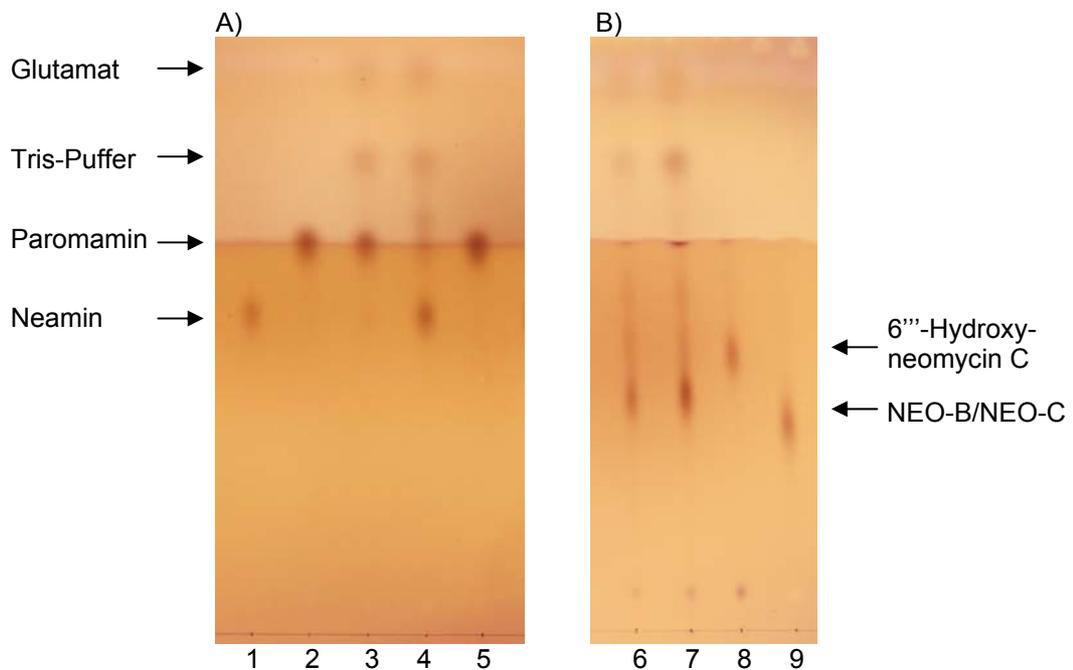
**Abb. 4.22: DC zum Test der Aminotransferase-Aktivität von LivB in Kombination mit der Oxidoreduktase LivQ**

Spur 1: 1 µl einer 1 mM L-Glutamat-Stammlösung, Spuren 2 und 6: 1 µl einer 10 mM Neamin-Stammlösung, Spuren 3 und 5: 1 µl einer 10 mM Paromamin-Stammlösung, Spur 4: Test mit beiden Enzymen (C-His<sub>6</sub>-LivQ und N-His<sub>10</sub>-LivB) und Paromamin als Substrat, Spuren 7 und 16: 1 µl einer 10 mM Neo-B-Stammlösung, Spuren 8 und 15: 6'''-Hydroxyneomycin C (SPE gereinigt), in den Reaktionsansätzen der Spuren 9-14 wurde 6'''-Hydroxyneomycin als Substrat eingesetzt: Spur 9 (Kontrolle): Ansatz mit C-His<sub>6</sub>-LivQ, Spur 10 (Kontrolle): Reaktionsansatz mit N-His<sub>10</sub>-LivB, Spur 11: Reaktionsansatz mit beiden Enzymen (C-His<sub>6</sub>-LivQ und N-His<sub>10</sub>-LivB), Spur 12: Ansatz analog 11 jedoch ohne PLP, Spur 13 (Kontrolle): Ansatz ohne jegliches Enzym, Spur 14 (Kontrolle): Ansatz mit beiden Enzymen (C-His<sub>6</sub>-LivQ und N-His<sub>10</sub>-LivB) aber ohne L-Glutamat; Fließmittel: C, Detektion erfolgte mit Ninhydrin-Lösung.

In einem nächsten Versuch sollten die Enzyme der LIV- und NEO-Biosynthesen miteinander kombiniert werden (siehe Abb. 4.23). Dazu sollten NeoQ und LivB sowie LivQ und NeoB gemeinsam mit den verschiedenen Substraten inkubiert werden. Interessanterweise wurde dabei Paromamin in einer Reaktion mit N-His<sub>10</sub>-NeoQ und

N-His<sub>10</sub>-LivB zu Neamin umgesetzt (siehe Abb. 4.23). Dies war überraschend, denn während LivQ Paromamin nicht erkannte, war jedoch LivB durchaus in der Lage auf die oxidierte Form des Paromamins (6'-Oxoparomamin) eine Aminogruppe zu übertragen. Während LivQ nur 6'''-Hydroxyneomycin C erkannte, konnte LivB sowohl die Transaminierung von 6'-Oxoparomamin als auch von 6'''-Oxoneomycin C katalysieren und war somit ebenfalls bifunktional. Daraus folgte, dass die Oxidation die limitierende Reaktion ist.

Da Paromamin nicht durch LivQ oxidiert wurde, war auch kein Umsatz dieses Substrats in Ansätzen mit C-His<sub>6</sub>-LivQ und C-His<sub>6</sub>-NeoB zu beobachten. Die Synthese von NEO-C aus 6'''-Hydroxyneomycin C gelang dagegen mit beiden Kombinationen: LivQ und NeoB, NeoQ und LivB. Die katalytische Aktivität der Oxidoreduktasen und Aminotransferasen aus *S. lividus* und *S. fradiae* sind also miteinander kombinierbar.



**Abb. 4.23: Heterologe Kombination einer Oxidoreduktase (LivQ bzw. NeoQ) mit einer Aminotransferase (LivB bzw. NeoB) aus *S. lividus* und *S. fradiae***

Sowohl mit Paromamin (A) als auch mit 6'''-Hydroxyneomycin C (B) als Substrat wurde der Aminotransferase-Test mit Kombinationen von C-His<sub>6</sub>-LivQ und C-His<sub>6</sub>-NeoB (Spuren 3 und 6) und von N-His<sub>10</sub>-NeoQ und N-His<sub>10</sub>-LivB (Spuren 4 und 7) durchgeführt. Als Standards wurden Paromamin (Spuren 2 und 5), Neamin (Spur 1), 6'''-Hydroxyneomycin C (Spur 8) und NEO-B (Spur 9) aufgetragen. Fließmittel: C, Detektion erfolgte mit Ninhydrin-Lösung.

## 4.3 Die Carbamoyltransferase TobZ

### 4.3.1 Heterologe Expression von TobZ

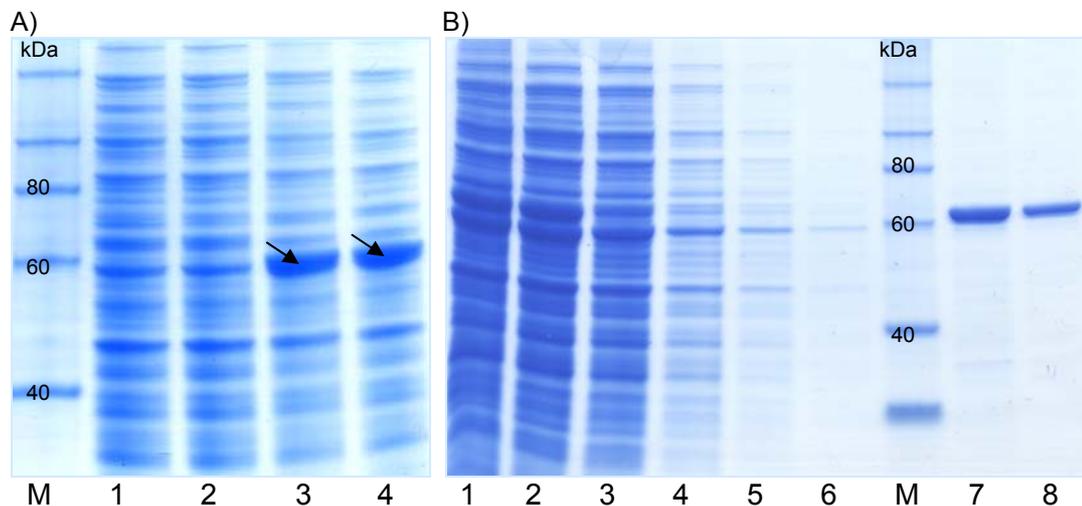
Die postulierte 6''-O-Carbamoyltransferase TobZ aus dem TOB-Cluster von *Streptomyces* sp. („*tenebrarius*“) DSM 40477 ist ein einzigartiges Modifikationsenzym in den bisher beschriebenen AGA-Biosynthesen. *S. sp.* DSM 40477 produziert neben Apramycin auch die AGAs Tobramycin (TOB) und Nebramycine (NEB), letztere enthalten eine Carbamoylgruppe. Weil die von *S. sp.* DSM 40477 synthetisierten Nebramycine meist in Form von NEB-4 (Synonym: 6''-O-Carbamoylkanamycin B) und NEB-5' (Synonym: 6''-O-Carbamoyltobramycin) vorliegen, wurde postuliert, dass die Carbamoylierung der finale Schritt in der Biosynthese von NEB ist, bei dem die AGAs Kanamycin B (KAN-B) und Tobramycin (TOB) von TobZ als Substrate erkannt werden (Piepersberg *et al.*, 2007). Diese Hypothese sollte in dieser Arbeit überprüft werden.

Zur heterologen Expression wurde das *tobZ* Gen (1713 Bp) mit den Primerpaaren *tobZ*-A und *tobZ*-EF/*tobZ*-EF und dem Cosmid SteK17 als Template mittels PCR amplifiziert. Da das *tobZ* Gen keine entsprechenden Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonucleasen *Nde*I und *Bam*HI enthielt, wurden diese über die Primer eingefügt. Dies ermöglichte eine Klonierung in den Vektor pUCPU21, und nach Überprüfung der DNA-Sequenz wurde das Gen in verschiedene *E. coli* bzw. *Streptomyces* Expressionsvektoren ligiert.

Zur heterologen Expression in *E. coli* wurde eine Vielzahl von Plasmiden konstruiert (vgl. Tab. 3.7). Ungeachtet der verschiedenen genutzten *E. coli* Stämme (vgl. Tab. 3.1) und Modifikation der Expressionsbedingungen (siehe 3.10) wurde stets unlösliches TobZ Protein gebildet. Daher wurde aus Expressionen von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16*tobZ*ES und *E. coli* JM109-pJOE2775*tobZ*EF die Fusionsproteine N-His<sub>10</sub>-TobZ bzw. C-His<sub>6</sub>-TobZ unter denaturierenden Bedingungen gereinigt, und anschließend versucht, ÜN in Dialysepuffer mit bzw. ohne MgCl<sub>2</sub> (siehe 3.12.5) die Renaturierung des TobZ Proteins herbeizuführen. Jedoch konnte nach Zentrifugation der Proteinlösung kein lösliches Protein nachgewiesen werden, ebenso war die Analyse der Enzymaktivität negativ (nicht gezeigt).

Schließlich konnte in *S. lividans* 66 TK23 oder TK64 das Protein jedoch unter Verwendung von pUWL201PW*tobZ*ES als natives TobZ, mit pUWLHistobZES als N-His<sub>10</sub>-TobZ Fusionsprotein und mit pUWL201PW*tobZ*EFHis als C-His<sub>6</sub>-TobZ Fusionsprotein produziert werden. Die Anzucht zur heterologen Proteinexpression

erfolgte dazu in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 48-96 h. In Abbildung 4.24 sind sowohl das überproduzierte native Protein mit einem MW von 62 kDa, als auch N-His<sub>10</sub>-TobZ mit einem MW von 64 kDa nach Trennung in einem SDS-PAGE gezeigt.



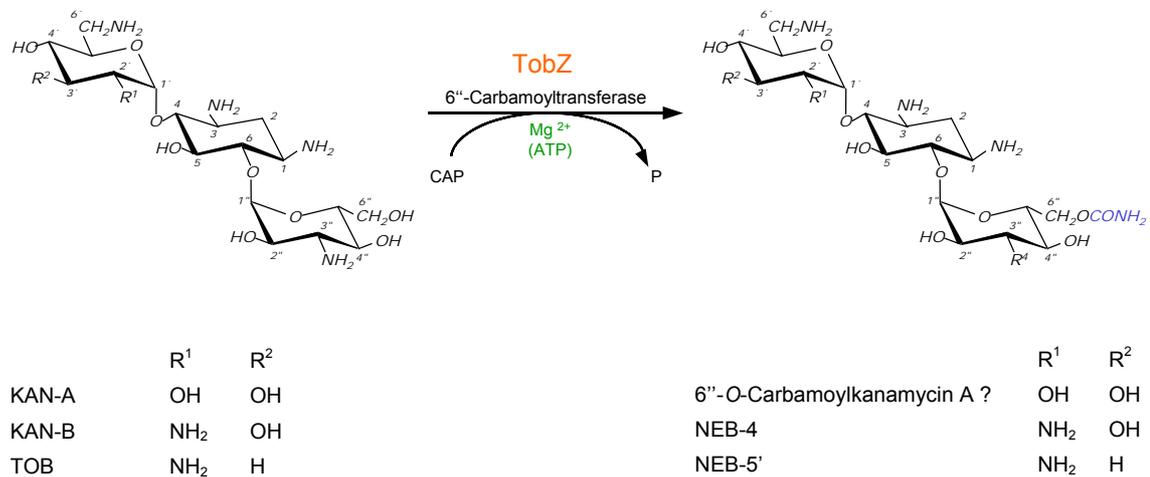
**Abb. 4.24: Heterologe Expression von TobZ und Reinigung von N-His<sub>10</sub>-TobZ**

A) SDS-PAGE der heterologen Expression in TSB<sub>Thio</sub> bei 28°C für 72 h, Spur 1 und 3: Gesamtzellextrakte von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PW (1) bzw. -pUWL201PWtobZES (3), Spur 2 und 4: lösliche Fraktionen von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PW (2) bzw. -pUWL201tobZES (4); B) Reinigung von N-His<sub>10</sub>-TobZ aus *S. lividans* 66 TK23-pUWLHistobZES über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Puffer II, vgl. 3.12.5): Spur 1: Gesamtzellextrakt, Spur 2: lösliche Fraktion, Spur 3: Durchlauf, Spur 4-6: Waschschrte 1-3, Spur 7-8: Elution 1 und 2; M: Marker: 10-150 kDa Roti-Mark. Die Analyse der Proben erfolgte im 10%igen PAGE-SDS Gel.

#### 4.3.1 Nachweis der 6''-O-Carbamoyltransferaseaktivität von TobZ

Die Analyse von TobZ orientierte sich an Tests für eine andere Carbamoyltransferase (NovN) aus dem Sekundärstoffwechsel von *Streptomyces spheroides*, die an der Synthese des Gyrase-Hemmstoffs Novobiocin beteiligt ist. Die Aktivität der Carbamoyltransferase NovN ist abhängig von Mg<sup>2+</sup> und ATP (Freel Meyers *et al.*, 2004). Die Tests zur 6''-Carbamoyltransferaseaktivität von TobZ enthielten daher wie unter 3.13.4 beschrieben neben dem Substrat und Carbamoylphosphat (CAP) als Carbamoylgruppendedonor, auch MgCl<sub>2</sub> und ATP. Im Gegensatz zu TobZ-haltigen Proteinfractionen von *S. lividans* 66 TK23 oder TK64-pUWL201PWtobZES, welche in 50 mM Tris/HCl pH 8 und 10 mM MgCl<sub>2</sub> aufgeschlossen und über 50 kDa Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert wurden, zeigten die über Ni-NTA-

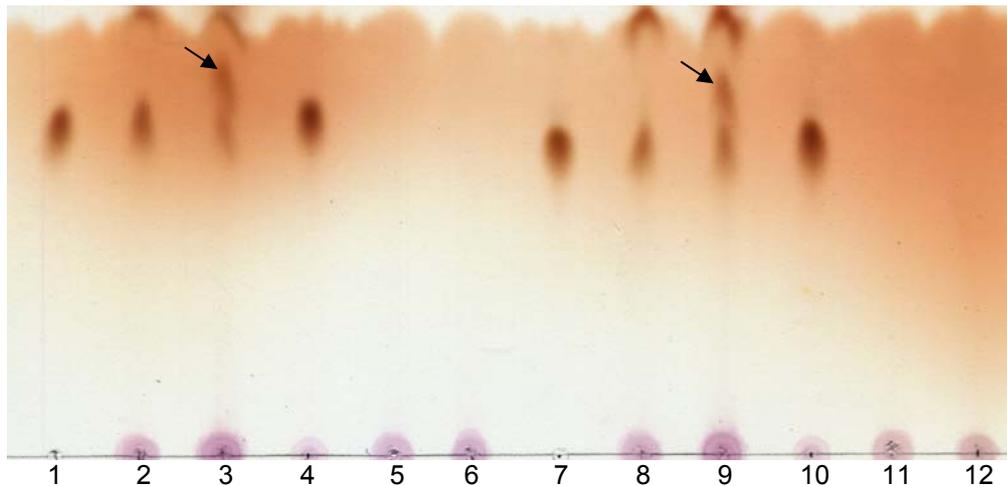
Affinitätschromatographie gereinigten N-His<sub>10</sub>-TobZ bzw. C-His<sub>6</sub>-TobZ auch bei Zusatz von MgCl<sub>2</sub> zum Proteinreinigungspuffer keine Aktivität. Daher wurden die nachfolgend beschriebenen Tests immer mit konzentrierten, löslichen TobZ-haltigen Proteinextrakten durchgeführt.



**Abb. 4.25: Reaktionsschema zu den (möglichen) durch TobZ katalysierten Carbamoyltransferase-Reaktionen**

TobZ transferiert die Carbamoylgruppe von CAP auf die 6''-OH Gruppe von TOB und KAN-B. KAN-A ist kein natürliches Substrat von TobZ, sollte aber aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit, ebenfalls carbamoyliert werden. Dabei würde 6''-O-Carbamoylkanamycin A entstehen.

Zunächst wurden TobZ-Aktivitätstests mit den natürlichen Substraten KAN-B und TOB durchgeführt; beide AGAs unterscheiden sich nur hinsichtlich der 3'-Gruppe, die bei TOB dehydroxyliert ist (siehe Abb. 4.25). Es wurden entsprechende Enzymtests angesetzt und diese nach Inkubation über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (siehe Abb. 4.26). Beide Substrate konnten dabei durch TobZ carbamoyliert werden. Im Gegensatz zu Kontrollansätzen mit Proteinextrakten von *S. lividans* 66 TK23 oder TK64-pUWL201PW war bei den Reaktionen mit nativem TobZ ein signifikanter neuer Spot sichtbar. In Ansätzen ohne CAP war keine Umsetzung zu erkennen. Daher wurde davon ausgegangen, dass TobZ die Carbamoylierung von KAN-B zu NEB-4 und TOB zu NEB-5' katalysiert hatte. Die Möglichkeit, die Produkte mit Referenzsubstanzen zu vergleichen war nicht gegeben, da diese nicht erhältlich waren. Aufgrund der geringen Umsatzraten und dem Vorhandensein von Ausgangssubstrat nach der Inkubation, war eine einfache Aufreinigung der neuen Produkte zur Charakterisierung der exakten Struktur auch nicht möglich.



**Abb. 4.26: DC zum Nachweis der Carbamoyltransferase-Aktivität von TobZ für die Substrate TOB und KAN-B**

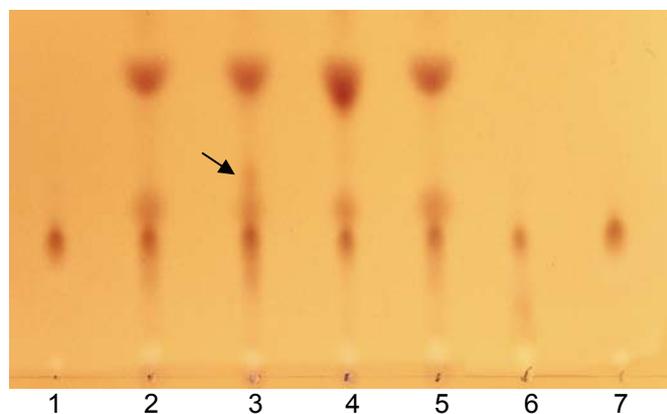
Spur 1-6 Testreihe mit dem Substrat TOB und Spur 7-12 Testreihe mit dem Substrat KAN-B; Spur 1: TOB Stammlösung und Spur 7: KAN-B Stammlösung, Spuren 2 und 8 (Kontrollen): Test mit konzentriertem löslichen Proteinextrakt von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PW, Spuren 3 und 9: Carbamoylierungsansatz mit konzentriertem löslichen Proteinextrakt von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PWtobZ, Spuren 4 und 10 (Kontrollen): Test analog 3 und 9, jedoch ohne CAP, Spuren 5 und 11 (Kontrollen): Test mit konzentriertem löslichen Proteinextrakt von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PW ohne TOB (5) bzw. KAN-B (11), Spuren 6 und 12 (Kontrollen): Test mit konzentriertem löslichen Proteinextrakt von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PWtobZ ohne TOB (6) bzw. KAN-B (12); zur Entwicklung der DC wurde das Fließmittel A verwendet, und der Nachweis erfolgte mit Ninhydrin-Lösung. Die Pfeile markieren durch TobZ carbamoyliertes TOB bzw. KAN-B.

Das Vorhandensein von  $MgCl_2$  ist für eine Aktivität von TobZ essentiell, da ohne  $MgCl_2$  im Reaktionsansatz keine Aktivität nachweisbar war. Es wurde daher geprüft, ob eventuell auch andere Metallionen als Co-Faktoren für die Carbamoyltransferase TobZ wirken können. Dazu wurde das  $MgCl_2$  im Zellaufschlusspuffer und im Testansatz jeweils durch eines der folgenden Salze ersetzt (zu einer Endkonzentration von 5 mM):  $CaCl_2$ , KCl, NaCl,  $ZnSO_4$ ,  $ZnCl_2$ ,  $MnCl_2$  und  $CoCl_2$ . Im Vergleich zu Ansätzen mit  $MgCl_2$  war mit  $CoCl_2$  und etwas schwächer auch mit  $MnCl_2$  Aktivität des TobZ Enzyms nachweisbar (nicht gezeigt).

Ebenso wurde überprüft, ob die TobZ-Aktivität auch ATP abhängig ist. Bei Reaktionen ohne ATP war sowohl mit KAN-B als auch TOB ein sehr schwacher Umsatz zu erkennen. Da auch im Proteinextrakt Reste von ATP vorhanden sein könnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die eventuell in den Extrakten vorhandene ATP-Konzentration für eine Enzymaktivität verantwortlich war. Da das Protein durch die

Reinigungsprozeduren seine Aktivität verlor, konnten diese Ansätze nicht mit extraktfreiem Protein durchgeführt werden.

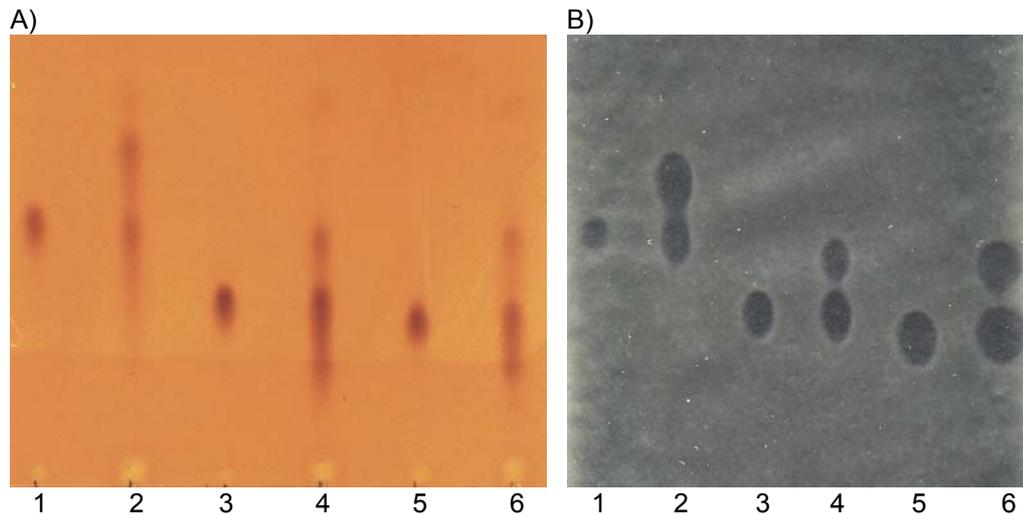
Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Kanamycin A (KAN-A) zu KAN-B und TOB (siehe Abb. 4.25) sollte getestet werden, ob TobZ auch in der Lage ist KAN-A als Substrat zu erkennen. KAN-A wird nicht vom NEB-Produzentenstamm *S. sp.* DSM 40477 produziert und ist auch keine Vorstufe von TOB oder NEB, sondern wird nur von *S. kanamyceticus* synthetisiert. Die Reaktionen wurden wie unter 3.13.4 beschrieben durchgeführt. Für die Auftrennung der Reaktionsprodukte erwies sich das Fließmittel A als ungeeignet, da keine Trennung von Substrat und Produkt möglich war. Es wurde daher das Fließmittel B (vgl. 3.15) verwendet. Abbildung 4.27 zeigt das Chromatogramm mit einem zusätzlichen Spot, der mit KAN-A als Substrat in Carbamoylierungsansätzen mit konzentriertem löslichen Proteinextrakt von *S. lividans* 66 TK64-pUWL201PWtobZ erhalten wurde und der bei Kontrollansätzen nicht auftrat. Es kann daher eine Hintergrundaktivität von *S. lividans* ausgeschlossen werden. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass TobZ in der Lage ist, auch die Carbamoylierung von KAN-A zu dem neuen AGA 6''-O-Carbamoylkanamycin A zu katalysieren. Dieses semi-synthetische AGA wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.



**Abb. 4.27: DC zur Analyse der Carbamoylierung von KAN-A durch TobZ**

Spuren 1 und 7: KAN-A Stammlösung, Spur 2 (Kontrolle): Test mit konzentriertem löslichen Proteinextrakt von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PW, Spur 3: Test mit konzentriertem löslichen Proteinextrakt von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PWtobZ, Spur 4 (Kontrolle): Test analog 2 jedoch ohne CAP, Spur 5 (Kontrolle): Test analog 3 jedoch ohne CAP, Spur 6: konzentrierter löslicher Proteinextrakt von *S. lividans* 66 TK23-pUWL201PWtobZ; zur Entwicklung der DC wurde das Fließmittel B verwendet, und der Nachweis erfolgte mit Ninhydrin-Lösung. Der Pfeil markiert durch TobZ carbamoyliertes KAN-A.

Möglicherweise könnte diese Carbamoyltransferase-Reaktion auch direkt im KAN-A-Produzentenstamm durch heterolog produziertes TobZ herbeigeführt werden. Der Versuch zur Konjugation von pUWL<sub>oriT,APR</sub>tobZES in den Apramycin sensitiven *S. kanamyceticus* gelang jedoch nicht.



**Abb. 4.28: DC zu den über SPE gereinigten TobZ-Produkten und dazugehöriges Bioautogramm**

A) jeweils 1 µl von 20 mM-Lösungen: Spur 1: TOB Stammlösung; Spur 2: SPE gereinigtes TobZ-Produkt von TOB, Spur 3: KAN-B Stammlösung, Spur 4: SPE gereinigtes TobZ-Produkt von KAN-B, Spur 5: KAN-A Stammlösung, Spur 6: SPE gereinigtes TobZ-Produkt von KAN-A; die Auftragung von B) entspricht der von A) jedoch mit Variierung der Auftragsmenge: Spur 1: 2 µl TOB, Spur 2: 6 µl SPE gereinigtes TobZ-Produkt von TOB, Spur 3: 1 µl KAN-B, Spur 4: 3 µl SPE gereinigtes TobZ-Produkt von KAN-B, Spur 5: 1 µl KAN-A Stammlösung, Spur 6: 3 µl SPE gereinigtes TobZ-Produkt von KAN-A; zur Entwicklung der DCs wurde das Fließmittel B verwendet und der Nachweis erfolgte bei A) mit Ninhydrin-Lösung; die DC-Platte bei B) wurde mit Weichnähragar, der mit einer ÜN-LB-Kultur des Prüfstammes *M. luteus* inokuliert wurde, überschichtet.

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den neuen Spots in den Chromatogrammen in Abb. 4.26 und 4.27 tatsächlich um AGAs handelte und dass diese neuen AGAs antibiotisch aktiv waren, wurde abschließend ein Bioautogramm angefertigt. Dazu wurden die Reaktionsansätze zunächst wie unter 3.14 beschrieben durch Festphasenextraktion gereinigt und anschließend durch DC mit Fließmittel B aufgetrennt. Zum Vergleich wurde eine DC mit Ninhydrin-Lösung entwickelt und eine andere mit Weichnähragar, der mit einer ÜN-LB-Kultur des Prüfstammes *M. luteus* inokuliert wurde, überschichtet (vgl. 3.16). Abbildung 4.28 zeigt das Bioautogramm, welches zeigt, dass bei den Carbamoylierungsreaktionen neue AGAs gebildet wurden.

Denn es waren Hemmhöfe zu erkennen, die den carbamoylierten Substraten zugeordnet werden konnten. Berücksichtigt man die Fläche und Intensität der Spots und die Durchmesser der Hemmhöfe, könnte man schließen, dass eventuell durch die Carbamoylierung sogar die biologische Aktivität gesteigert werden konnte.

## 5 Diskussion

Wie auch bei allen anderen Antibiotikaklassen führte die intensive medizinische Nutzung der AGAs zur Verbreitung von resistenten pathogenen Bakterien. Durch chemische Modifikationen konnten jedoch zum Teil AGAs produziert werden, wie z. B. Amikacin (Kawaguchi *et al.*, 1972) und Arbekacin (Kondo *et al.*, 1973a; 1973b) bzw. Isepamicin (Neu und Fu, 1978), welche die Resistenzmechanismen umgehen. Eine weitere Möglichkeit zur Produktion neuer AGAs ist die gezielte Kombination bekannter Enzyme der verschiedenen Biosynthesewege, dazu ist jedoch ein detailliertes Wissen zur Biochemie der Genprodukte der verschiedenen Cluster unumgänglich. In dieser Arbeit wurden daher die durch die Gene *neoQ* und *neoB* des *neo*-Clusters, *livB* und *livQ* des *liv*-Clusters und *tobZ* des *tob*-Clusters codierten Enzyme untersucht. Die durch diese Genprodukte katalysierten Syntheseschritte sind an spezifischen Modifizierungsschritten beteiligt und somit auch für weiterführende Experimente von großer Bedeutung.

### 5.1 Biochemische NEO-Intermediat-Synthese und Aufarbeitung für Enzymtests

Zur Untersuchung der Oxidoreduktasen NeoQ und LivQ sowie der Aminotransferasen NeoB und LivB mussten zunächst Intermediate der NEO-Biosynthese synthetisiert werden. Katalysiert wurden diese Synthesen durch bereits beschriebene Enzyme (siehe 2.2.5 und 4.1).

Neben dem verfügbaren Substrat Paromamin sollte auch die postulierte Synthesestufe 2'-N-Acetylparomamin in Enzymtests mit NeoQ und LivQ eingesetzt werden. Die Acetylierung von Paromamin zu 2'-N-Acetylparomamin gelang vollständig in einer Acetylierungsreaktion mit dem Acetylgruppendonor Acetyl-Coenzym A und gereinigtem, in *S. lividans* 66 TK23 bzw. TK64 produzierten, N-His<sub>10</sub>-AAC(2') Enzym (vgl. 4.1.1, Abb. 4.3). Die Acetyltransferase AAC(2'), die auch bei der 2'-N-Acetylierung anderer Antibiotika wie Arbekacin beschrieben wurde (Hotta *et al.*, 1996), stammte vom Kusugamycin-Produzenten *S. kasuganesis*.

Neben Paromamin sollte 6'''-Hydroxyneomycin C ein Substrat für die Oxidoreduktase NeoQ darstellen (Piepersberg *et al.*, 2007; vgl. Abb. 2.12), das über zwei Schritte

enzymatisch aus RIB hergestellt wurde. Zunächst wurde RIB durch die Glycosyltransferase NeoF mittels UDP-GlcNAc sowie  $Mg^{2+}$  als Co-Faktor zu 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C glykosyliert (Fan *et al.*, 2008; Mandt, 2008; Yokoyama *et al.*, 2008b). Das Enzym NeoF wurde dazu in *S. lividans* 66 TK23 bzw. TK64 als natives Protein produziert. Durch die Verwendung äquimolarer Konzentrationen an RIB und UDP-GlcNAc sowie frisch angezogener Zellen konnte die Reaktion so optimiert werden, dass die DC-Analyse eine vollständige Konversion des RIB zu dem erwarteten Produkt 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C zeigte (vgl. 4.1.2, Abb. 4.6). In einer vorhergehenden Arbeit war eine 100 %ige Umsetzung durch NeoF nicht gelungen und es wurde spekuliert, dass das Enzym entweder instabil ist oder die Enzymumsetzung ab einer bestimmten Produktkonzentration durch feedback-Hemmung inhibiert wurde (Mandt, 2008). In der hier vorliegenden Arbeit konnte dieses nach Optimierung der Ansätze nicht beobachtet werden. Längerfristiges Einfrieren der Zellen (>5 Tage) vor dem Aufschluss führte allerdings zu einem deutlichen Aktivitätsverlust von NeoF. Das gebildete 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin C konnte dann durch die katalytische Aktivität von NeoD vollständig zu 6'''-Hydroxyneomycin C deacetyliert werden (vgl. 4.1.3, Abb. 4.9). Neben dieser Reaktion ist die Deacetylase NeoD zudem *in vitro* in der Lage die Deacetylierung von 2'-N-Acetylparomamin zu katalysieren. Jedoch spekulierten Fan *et al.* (2008), ob *in vivo* die Deacetylierung von 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxyneomycin möglicherweise durch eine weitere Deacetylase katalysiert wird. Gendisruptionsmutanten, bei denen in das *neoD* Gen gezielt das Thiostrepton-Resistenzgen (*tsr*) inseriert wurde, waren nach Zugabe von 2-DOS zum Medium nicht in der Lage NEO zu bilden, jedoch nach dem Zufüttern von Neamin. Diese von Fan *et al.* postulierte Deacetylase müsste jedoch von einem Gen außerhalb des Clusters codiert werden, denn im *neo*-Gencluster sowie auch in anderen verwandten AGA-Clustern wie z. B. den sehr ähnlichen *liv*-, *btr*- und *par*-Clustern konnte jeweils nur ein Gen, das für eine Deacetylase codiert, identifiziert werden. Bei genauerer Betrachtung der zusätzlichen Daten (Supplementary Information, Fan *et al.*, 2008) fällt auf, dass bei der Zufütterung von Neamin nur noch 13 % an Neomycin im Vergleich zum Wildtyp produziert werden; bei Gabe von RIB sind es sogar nur noch 1 %. Möglicherweise sind diese Produktionsraten nicht auf das Vorhandensein einer weiteren Deacetylase zurückzuführen. Das Problem liegt vielleicht stattdessen in der Art, wie die Mutation generiert wurde. Denn durch die Insertion des *tsr*-Gens blieben, im Gegensatz zu einer vollständigen Deletion, die *neoD*-Genfragmente erhalten. Im ungünstigen Fall könnte durch das noch vorhandene *neoD*-Fragment ein verkürztes NeoD Protein mit deutlich geringerer Aktivität codiert werden. Wahrscheinlicher ist daher, dass NeoD auch *in vivo* beide Deacetylierungs-Reaktionen katalysiert.

Alle in dieser Arbeit synthetisierten Substrate wurden mittels Festphasenextraktion isoliert (vgl. 4.1.4, Abb. 4.10). Diese relativ schnelle Methode ermöglichte die nahezu vollständige Extraktion der geringen Konzentrationen an synthetisierten Substraten. Neben dem Entfernen störender Nebenkomponten aus den enzymatischen Umsätzen konnten nach Vakuumzentrifugation die Präzipitate in exakten Konzentrationen eingesetzt werden.

## 5.2 Die „Q“-Oxidoreduktasen und die „B“-Aminotransferasen der NEO- und LIV-Biosynthese

### 5.2.1 Die Oxidoreduktasen LivQ und NeoQ

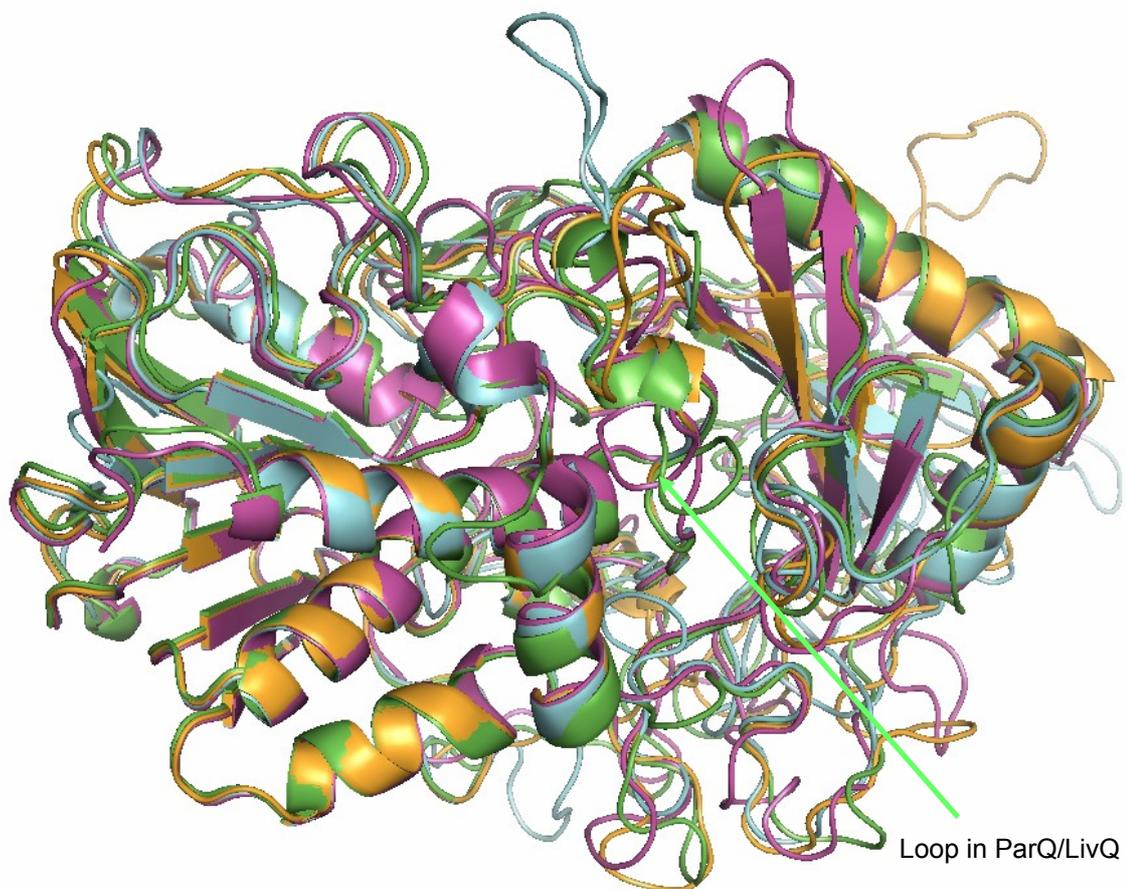
Phylogenetische Untersuchungen deuten auf eine enge Verwandtschaft von NeoQ zu RibQ (*S. ribosidificus* NRRL-B-11466 (Accession Code AJ744850)) und von LivQ zu ParQ (*S. rimosus* subsp. *paromomycinus* NRRL 2455 (Accession Code AJ628955)) hin (Piepersberg *et al.*, 2007), die auch durch die hohen Sequenzidentitäten zwischen den einzelnen Enzymen deutlich wird (vgl. Tab. 5.1).

**Tabelle 5.1: Sequenzidentitäten zwischen LivQ, NeoQ, ParQ und RibQ**

	NeoQ (541 AS)	ParQ (546 AS)	RibQ (541 AS)
LivQ (546 AS)	72 %	<b>80 %</b>	70 %
NeoQ (541 AS)		71 %	<b>89 %</b>
ParQ (546 AS)			70 %

Auch die möglichen Proteinstrukturen (siehe Abb. 5.1), die mit dem Programm LOOPP (Linear Optimization of Protein Potentials, <http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>, Meller und Elber, 2001) berechnet und durch das 3D-Grafikprogramm PyMol visualisiert wurden (<http://www.pymol.org>, DeLano, 2002), weisen paarweise deutliche Gemeinsamkeiten auf. Dabei kann man eine Loop-Struktur im Zentrum der Enzyme LivQ und ParQ erkennen (mit Pfeil in Abb. 5.1 markiert), die in NeoQ und RibQ fehlt. Die AS-Sequenz des Loops ist innerhalb der Enzyme hoch konzerviert (AS 125-130), jedoch sind die Aminosäuren unmittelbar davor und danach zwischen den Proteinen deutlich verschieden und könnten somit eventuell für die Orientierung des Loops

verantwortlich sein. Möglicherweise ist diese Struktur für die Substratdiskriminierung notwendig. Denn während NeoQ bifunktional an der Modifikation am C-6' und C-6'' beteiligt ist, und vermutlich auch RibQ die C-6'-Position des Paromamins oxidiert, wird die C-6' Position bei LIV und PAR nicht modifiziert. LivQ und ParQ dürfen daher den Paromamin-Vorläufer nicht als Substrat akzeptieren. Es erscheint logisch, dass die Substratspezifität auf Ebene der „Q“-Enzyme erfolgt, da sonst chemisch instabile Aldehydintermediate gebildet würden, welche als nicht verbrauchte Beiprodukte den Prozess der weiteren AGA-Biosynthese erheblich stören würden.

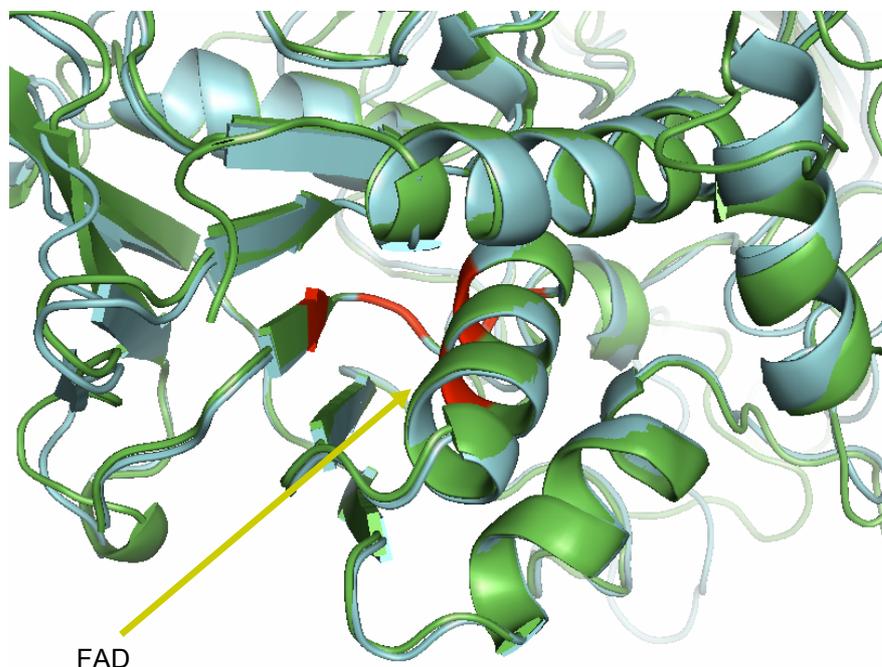


**Abb. 5.1: Strukturmodelle von LivQ (grün), NeoQ (blau), ParQ (lila) und RibQ (orange)**

Anhand der Sequenzen wurde über das Programm LOOPP (Linear Optimization of Protein Potentials, <http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>, Meller und Elber, 2001) die mögliche Strukturen berechnet, die anschließend mit PyMol visualisiert und abgeglichen wurden (<http://www.pymol.org>, DeLano, 2002).

Ein AS-Sequenzvergleich der vier Proteine lässt verschiedene, besonders stark konservierte Bereiche erkennen, darunter der für Oxidoreduktasen, die als Co-Faktor FAD oder NAD(P) binden, beschriebenen Consensus-Sequenz **V/IXGX<sub>1-2</sub>GXXGXXXG/A** entsprechenden N-terminalen AS-Sequenz 42-53 **VIGSGASGA/SVAA** (vgl. Anhang 1, Kleiger und Eisenberg, 2002). Diese Sequenz ist Bestandteil der so genannten Rossmann-Faltung, die aus  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  Motiven besteht (Rossmann und Argos, 1976). Das Nucleotid-Bindemotiv **GX<sub>1-2</sub>GXXG** bildet dabei eine glycinreiche Phosphat-Bindeschleife, welche die ADP-Untereinheit von FAD oder NAD(P) bindet (Wierenga *et al.*, 1986). Der erste Glycinrest erlaubt die Drehung des  $\beta$ -Faltblatts in den Loop, der zweite Glycinrest vermittelt den Kontakt ans Pyrophosphat des Nucleotids und der dritte Glycinrest bildet eine dichte Packung des  $\beta$ -Faltblatts und der  $\alpha$ -Helix.

Die Aufnahme der Absorptionsspektren der über Ni-NTA-Agarose gereinigten Proteine LivQ und NeoQ ergab, dass beide Proteine Absorptionsmaxima aufwiesen, die einer FAD-Lösung entsprechen (siehe Abb. 4.13). LivQ und NeoQ sind also Flavoproteine die FAD als Co-Faktor gebunden haben, was auch die gelbe Färbung der Proteinlösungen von gereinigtem LivQ und NeoQ erklärt. Eine Markierung der oben genannten Aminosäuren 42-53 in den 3-dimensionalen-Strukturmodellen von LivQ und NeoQ zeigt einen Bereich mit  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices (siehe Abb. 5.2), der sehr wahrscheinlich die FAD-Bindedomäne darstellt.



**Abb. 5.2: Mögliche FAD-Bindedomäne von LivQ (grün) bzw. NeoQ (blau)**

Rot markiert sind die mit dem von Kleiger und Eisenberg beschriebenen Motiv übereinstimmenden Aminosäuren 42-53 **VIGSGASGA/SVAA**.

### 5.2.1.1 Substratspezifität der Oxidoreduktasen LivQ und NeoQ

In dem Oxidoreduktasetest konnte indirekt über die Bildung von MTT-Formazan die Aktivität der Enzyme LivQ und NeoQ für die Substrate: 2'-*N*-Acetyl-Paromamin, Paromamin, RIB, 2'''-*N*-Acetyl-6'''-Hydroxyneomycin C, 6'''-Hydroxyneomycin C und Paromomycin quantitativ bestimmt werden (vgl. 4.2.2, Abb. 4.15, Tabelle 4.1). Dabei konnte unabhängig von der Anwesenheit der Aminotransferase NeoB gezeigt werden, dass NeoQ die Substrate Paromamin und 6'''-Hydroxyneomycin C erkennt und umsetzt. Dies entspricht der postulierten Funktion dieses Enzyms in der NEO-Biosynthese und zeigt auch eindeutig, dass NeoQ ein bifunktionales Enzym ist.

Die spezifische Enzymaktivität von NeoQ liegt für das 6'''-Hydroxyneomycin C 34 % höher als für Paromamin. Dies könnte zwei Gründe haben: eventuell war NeoQ evolutionär zunächst monofunktionell und erst Mutationen führten dazu, dass auch die 6'-Oxidation des Paromamins katalysiert wird. Oder die höhere Affinität liegt darin begründet, dass 6'''-Hydroxyneomycin C *in vivo* in geringeren Mengen als Paromamin vorhanden ist, da Zwischenschritte wie die Ribosylierung und die 3'-Glycosylierung (vgl. Abb. 2.12) die Synthese verzögern könnten.

Acetylierte Substrate wurden ebenfalls in NeoQ-Tests eingesetzt (vgl. 4.2.2, Abb. 4.15, Tabelle 4.1). Dabei konnte mit 2'-*N*-Acetylparomamin kein Umsatz gemessen werden. Die *in vitro* Tests zeigten aber eine Oxidoreduktaseaktivität des NeoQ-Enzyms mit 2'''-*N*-Acetyl-6'''-Hydroxyneomycin C, allerdings betrug die spezifische Enzymaktivität im Vergleich zur deacetylierten Form nur 15 %. Da in den Produzenten neben 2'''-*N*-Acetyl-6'''-Hydroxyneomycin C auch die beiden nicht acetylierten Substrate vorhanden sind, dürfte die 6'''-Oxidation von 2'''-*N*-Acetyl-6'''-Hydroxyneomycin C *in vivo* wahrscheinlich keine Rolle spielen. Jedoch erklärt dieser Befund eventuell die beschriebene Neomycin-Restproduktionsrate der *neoD*-Disruptionsmutante von Fan *et al.* (2008).

Die Beobachtung der Inaktivität des NeoQ mit Paromomycin, wie NEO-C ein Pseudotetrasaccharid, das aber am C-6' eine OH-Gruppe enthält, zeigt, dass die 6'-Oxidation demnach nur auf Stufe des Pseudodisaccharids Paromamin erfolgen kann. Daher müssen auch die Enzyme für die 5-Ribosylierung (NeoA, NeoL und NeoP) strikt zwischen Paromamin und dem Substrat Neamin unterscheiden können.

Die MTT/PMS-gekoppelten Tests wurden ebenso mit dem LivQ-Protein durchgeführt (vgl. 4.2.2, Abb. 4.15, Tabelle 4.1). Es konnte dabei keine Oxidoreduktaseaktivität mit Paromamin gemessen werden, jedoch zeigte sich Aktivität von LivQ, wenn 6'''-Hydroxyneomycin C verwendet wurde. Diese entsprach jedoch nur 55 % der

spezifischen Aktivität, die für NeoQ ermittelt wurde (vgl. Tabelle 4.1). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass 6'''-Hydroxyneomycin C nicht das eigentliche Substrat des LivQ Enzyms in *S. lividus* ist. Nur 2'-*N*-Acetyl-Paromamin und Paromamin wären natürliche Intermediate der LIV-Synthese (vgl. Abb. 2.12); denn während in der NEO-Biosynthese die 6'-OH-Gruppe des Paromamins aminiert wird, und Neamin gebildet wird, bleibt wahrscheinlich die 6'-OH-Gruppe in der LIV-Synthese bis zum Endprodukt erhalten. Für einen alternativen Verlauf der LIV-Biosynthese über (NEO-ähnliche) 6'-aminierte Zwischenprodukte, die nachträglich wieder desaminiert und 6'-hydroxyliert würden, ergibt sich experimentell und auch aus dem im *liv*-Cluster codierten Enzymbestand heraus keinerlei Hinweis. Die folgenden Schritte, die 5-Ribosylierung sowie die 3''-Glycosylierung und die anschließende 2'''-Deacetylierung, werden daher sehr wahrscheinlich in beiden Biosynthesen analog ablaufen. Das sich nur hinsichtlich des C-6' des 6'''-Hydroxyneomycins C unterscheidende 6'''-Hydroxypalomomycin wird daher *in vivo* in *S. lividus* das natürliche Substrat darstellen (siehe Abb. 2.12), für das LivQ wahrscheinlich auch eine höhere spezifische Aktivität aufweist. Durch die hier erzielten Ergebnisse wird somit die postulierte LIV-Synthese bestätigt (Piepersberg *et al.*, 2007).

Im Vergleich zu NeoQ ist die Oxidoreduktase LivQ somit monofunktional. Schon ein Vergleich der Proteine zeigt, dass die Aminosäure-Reste sich zu 28 % unterscheiden (vgl. Tabelle 5.1, Anhang 7.1). Beim Sequenzvergleich von LivQ, NeoQ, ParQ, das ebenso wie LivQ 6'''-Hydroxypalomomycin oxidieren soll, und RibQ, das wie NeoQ Paromamin oxidieren soll, liegt der deutlichste Unterschied bei den AS-Resten 172-177 von LivQ bzw. ParQ, die bei NeoQ und RibQ fehlen. Aufschlussreich wäre daher eine Mutante von *livQ* bzw. *parQ*, in deren die AS 172-177 deletiert sind. Eventuell kann eine solche Mutante Paromamin oxidieren. Weiterhin wäre von Interesse, ob RibQ wie NeoQ bifunktional ist, da in der RIB-Synthese in *S. ribosidificus* keine 3''-Glycosylierung stattfindet, wird das zweite mögliche Substrat nicht gebildet. Dies muss aber nicht zwingend bedeuten, dass RibQ nicht auch wie NeoQ bifunktional ist und auch 6'''-Hydroxyneomycin C oxidieren könnte.

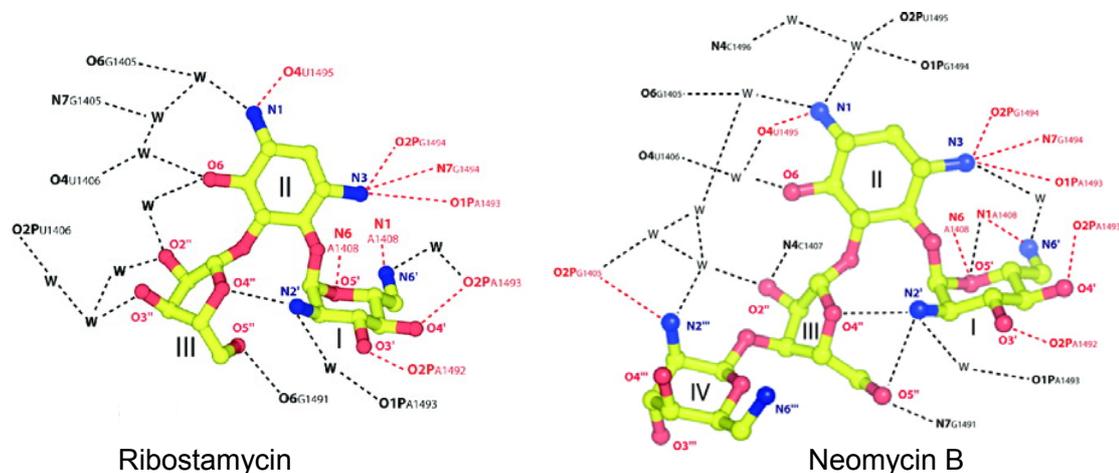
Möglicherweise geben Kristallstrukturanalysen zu NeoQ und LivQ, die derzeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Milton Stubbs an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg generiert werden, genauere Informationen zur Bindung der Substrate am Enzym und zu dem Grund der verschiedenen Substratspezifitäten.

Da für die Oxidation sowohl in den MTT/PMS-gekoppelten Tests als auch in den nachfolgend beschriebenen Ansätzen mit den korrespondierenden Aminotransferasen keine weiteren exogenen Co-Faktoren, wie z. B. NAD<sup>+</sup>, zugesetzt werden mussten, wird wahrscheinlich das reduzierte enzymgebundene FADH<sub>2</sub> zur Regenerierung direkt

den Wasserstoff auf molekularen Sauerstoff übertragen. Für NeoQ wurde bereits gezeigt, dass die Anwesenheit von Sauerstoff in den Reaktionsansätzen notwendig ist (Huang *et al.*, 2007). Die Oxidoreduktasen NeoQ und LivQ lassen sich daher auch phänotypisch den direkt reoxidierten, Flavin-haltigen Oxidasen (EC 1.1.3) zuordnen.

### 5.2.2 Die Aminotransferasen LivB und NeoB

Durch Kristallstrukturanalysen wurde die Wechselwirkung von AGAs mit RNA-Fragmenten, die die Decodierungs-A-Stelle des Ribosoms enthielten, analysiert (François *et al.*, 2005). Abbildung 5.3 zeigt die Kontakte eines Komplexes aus Ribostamycin bzw. Neomycin mit der RNA. Ribostamycin, auch ein Intermediat der NEO-Synthese, ist den Ringen I-III mit NEO-B identisch. Die Analysen von François *et al.* (2005) zeigten, dass neben der Anzahl der Ringe auch die Zahl der positiven Ladungen an der spezifischen und hoch affinen Komplexbildung des AGA mit der ribosomalen RNA beteiligt ist. Die positiven Ladungen sind die Folge von Protonierungen der  $\text{NH}_2$ -Gruppen bei einem physiologischen pH-Wert. Aminogruppen



**Abb. 5.3: Komplexbildung zwischen Ribostamycin bzw. Neomycin B mit der 16S-rRNA (Abbildung aus François *et al.*, 2005)**

Gezeigt ist die Struktur von Ribostamycin und Neomycin B, mit den Ringen I-III bzw. IV. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt, wobei konservierte Kontakte mit der minimalen A-Stelle rot hervorgehoben sind. Die Buchstaben geben Atome der AGAs, bzw. der RNA an, wobei die Nummerierung der RNA-Atome nach der *E. coli* Nummerierung erfolgte, W steht für ein Wassermolekül.

sind also entscheidend für die Bindung des AGAs am Ribosom, und damit der bakteriziden Wirkung. Es ist aber auch ersichtlich, dass die exakte Position der AGAs in der RNA und deren Wechselwirkungen mit Nukleotiden der RNA sich selbst bei strukturell verwandten AGAs bereits deutlich unterscheiden (Abb. 5.3), so dass eine Vorhersage, welche Modifikationen an den Positionen der NH<sub>2</sub>-Gruppen besonders vorteilhaft sind, daher kaum möglich erscheint.

Ebenso wie bei den „Q“-Enzymen zeigen Stammbaumanalysen auch für die Aminotransferasen LivB und NeoB eine enge Verwandtschaft zu äquivalenten Proteinen der PAR- und RIB-Biosynthese (Piepersberg *et al.*, 2007). Die Sequenzidentitäten der Proteine sind daher entsprechend hoch, wobei wiederum paarweise größere Übereinstimmungen zwischen LivB/ParB sowie zwischen NeoB/RibB bestehen (vgl. Tab. 5.2).

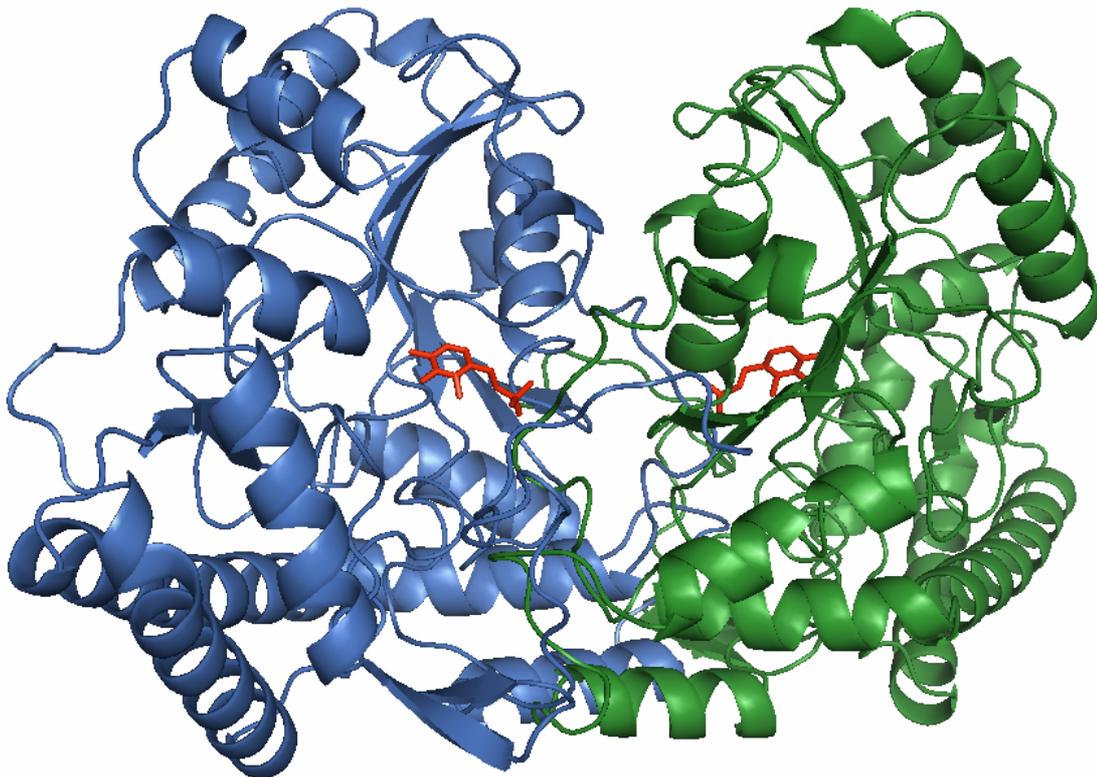
**Tabelle 5.2: Sequenzidentitäten zwischen LivB, NeoB, ParB und RibB**

	NeoB (416 AS)	ParB (417 AS)	RibB (416 AS)
LivB (416 AS)	71 %	<b>79 %</b>	68 %
NeoB (416 AS)		69 %	<b>86 %</b>
ParB (416 AS)			68 %

Aminotransferasen enthalten PLP als prosthetische Gruppe (siehe 2.3.1), die für den Aminierungs-Mechanismus essentiell ist. Dabei bildet die Aldehydgruppe von PLP in Abwesenheit eines Substrats mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Restes eine „Schiff-Base“, welches die eigentliche aktive Gruppe darstellt. Ein solcher spezifischer und hochkonservierter Lysin-Rest wurde in LivB (K 231), NeoB (K 231), RibB (K 231) und ParB (K 232) gefunden. Neben diesen katalytisch bedeutsamen Resten konnten mit dem Programm „Conserved Domain Search“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009) auch Aminosäure-Reste identifiziert werden, die bei Aminotransferasen, die als Dimer vorliegen, die Inhibitor-Co-Faktor Bindetasche bilden (vgl. Anhang 7.2). Über diese Bindestellen bleibt PLP durch nichtkovalente Kräfte fest am Enzym gebunden, auch wenn die Aminogruppe einer hinzukommenden Aminosäure die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysin-Restes ersetzt. Diese Bindestellen weisen auch auf eine mögliche Inhibierung dieser Aminotransferasen durch Gabaculin (3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure) einem Inhibitor PLP-abhängiger Aminotransferasen, hin. Allerdings wird beispielsweise die Aminotransferase BtrS, welche 2-Desoxy-scyllo-

inosose und 1-Keto-2-desoxy-scyllo-inosamin aminiert (siehe Abb. 2.11), nicht durch diesen klassischen Inhibitor gehemmt (Popovic *et al.*, 2006).

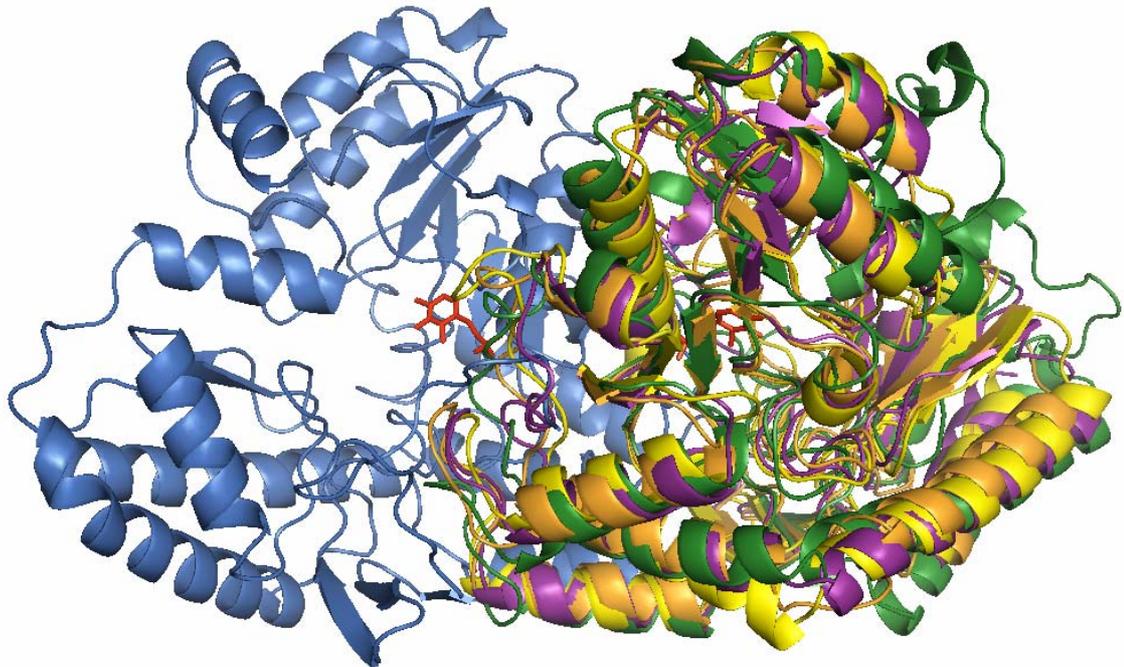
Die Absorptionsspektren der aufkonzentrierten Proteinlösungen der Proteine N-His<sub>10</sub>-LivB bzw. C-His<sub>6</sub>-NeoB zeigten Absorptionspeaks, die PMP bzw. PLP entsprechen (siehe Abb. 4.18). Diese Ergebnisse bestätigen PLP als Co-Faktor dieser Aminotransferasen. Erste Analysen der in einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Milton Stubbs an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erhaltenen Kristallstruktur von LivB (siehe Abb. 5.4) belegen, dass LivB tatsächlich ein Homodimer bildet, und jede Untereinheit jeweils ein PLP-Molekül bindet. Das aktive Zentrum könnte sich im zentralen Bereich des Dimers an den Seitenflächen des PLPs befinden. Weitere Analysen mit „Soaking“-Experimenten sollen hierzu genauere Details liefern.



**Abb. 5.4: Kristallstruktur der Aminotransferase LivB (Daten in Kooperation mit Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Physikalische Biotechnologie Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)**

Blau und grün dargestellt sind jeweils die Untereinheiten des Homodimers, rot der gebundene Co-Faktor PLP.

Die Aminotransferasen NeoB, ParB und RibB bilden wahrscheinlich ebenso Homodimere, denn bei einem Vergleich decken sich die über LOOPP berechneten 3-dimensionalen Proteinmodelle dieser Aminotransferasen mit einer Untereinheit des LivB-Homodimers (vgl. Abb. 5.5).



**Abb. 5.5: Kristallstruktur der Aminotransferase LivB überlagert mit den LOOPP Modellen von NeoB, ParB und RibB**

Dargestellt ist das bereits in Abb. 5.4 gezeigte Homodimer von LivB mit den beiden Untereinheiten in blau und grün. Diese Kristallstruktur von LivB wurde mittels PyMol mit den LOOPP Modellen von NeoB (gelb), ParB (lila) und RibB (orange) abgeglichen. Enzymgebundenes PLP ist rot gefärbt.

### 5.2.3.1 Substratspezifität der Aminotransferasen LivB und NeoB

Der Nachweis der enzymatischen Aminotransferase-Aktivität von LivB und NeoB über die Rückreaktionen, also eine Deaminierung mit den gereinigten Proteinen, war nicht erfolgreich. Daher sollte ein Aktivitätsnachweis über die eigentliche Reaktion erfolgen. In Enzymtests, bei denen die Aminotransferase-Reaktion mit der LivQ bzw. NeoQ katalysierten Oxidation gekoppelt wurde, konnte die Aktivität der Enzyme LivB bzw. NeoB gezeigt werden. In den gekoppelten Reaktionen mit den Enzymen NeoQ und NeoB sowie L-Glutamat als Aminogruppen-Donor wurde, entsprechend der postulierten Biosynthese (siehe Abb. 2.12), einerseits Paromamin zu Neamin und auch 6'''-Hydroxyneomycin C zu NEO-C umgesetzt (siehe Abb. 4.20 und 4.21). Die

Aminotransferase NeoB ist also wie NeoQ bifunktional. Unterstützt werden diese Befunde von einem kürzlich erschienenen Artikel, indem ebenso die enzymatische Synthese des NEO-C mit Hilfe der Proteine NeoF, NeoD, NeoQ und NeoB beschrieben wird (Kudo *et al.*, 2009).

Durch den Zusatz von PLP konnte die Umsatzrate erhöht werden (vgl. 4.2.3). Vor und während der Proteinreinigung sowie bei der Reaktion möglicherweise entstandene unbesetzte PLP-Bindestellen könnten durch PLP im Reaktionsgemisch wieder besetzt werden und letztlich somit die Umsetzung gesteigert werden.

Auffällig war, dass von Ansätzen in denen nur die Oxidoreduktasen LivQ bzw. NeoQ enzymatisch aktiv waren, die Substratspots nach Inkubation nur noch als „verschmierte“ Spuren auf der DC sichtbar war (siehe Abb. 4.20-4.22). Eventuell blieben die Substrate bzw. Produkte der Oxidoreduktasen an das Enzym gebunden, und wurden bei der Auftrennung über DC erst allmählich durch das Laufmittel abgelöst. Vielleicht interagiert die Oxidoreduktase mit der Aminotransferase und das oxidierte Intermediat wird innerhalb dieses Komplexes übertragen. Jedoch wurden bisher nur wenige solcher Interaktionen beschrieben, wie z. B. die Enzym-Enzym-Komplexbildung der Aspartat-Aminotransferase mit der Glutamat-Dehydrogenase (Fahien *et al.*, 1971; Churchich, 1978) oder die Interaktion der mitochondrialen Branched-Chain Aminotransferase mit der Glutamat-Dehydrogenase (Islam *et al.*, 2010). Eine Komplexbildung kann dabei auch die Aktivität der einzelnen Enzyme steigern (Fahien *et al.*, 1971). In der Biosynthese von TOB wurde auch für die Aminotransferase TobS2 vermutet, dass diese Aminotransferase mit der korrespondierenden Dehydrogenase interagiert. Diese Annahme beruht auf Analysen eines TobS2-Kristalls, in dem eine ungewöhnliche Schleife identifiziert wurde, die aus dem Protein herausragt und durchaus für eine Protein-Protein-Interaktion funktional sein könnte (Hennig, 2009).

Es wurde auch geprüft, ob die Enzyme der LIV- und NEO-Biosynthese miteinander kombiniert werden können (vgl. 4.2.3). Bei den Tests zeigte sich, dass durch LivB in Kombination mit NeoQ ebenfalls Paromamin zu Neamin umgesetzt wurde (Abb. 4.23). Die Umsatzraten waren dabei vergleichbar mit denen, die in Enzymtests mit NeoQ und NeoB erhalten wurden. Die Aminotransferase LivB ist also auch bifunktional, obwohl in der LIV-Biosynthese nur die 6''-Position aminiert wird. Während die Oxidoreduktase LivQ eine hohe Substratspezifität aufweist und lediglich 6''-Hydroxyneomycin C als Substrat akzeptierte und die 6'-Position der verwendeten Substrate nicht oxidierte (vgl. 4.2.2, Abb. 4.15, Tabelle 4.1), katalysiert LivB *in vitro* auch die Aminierung der 6'-Position. Eine entsprechend diskriminierende Substratspezifität der Aminotransferase LivB ist prinzipiell jedoch auch nicht notwendig, denn erst die bei der Oxidation gebildete Aldehydgruppe ermöglicht eine Aminierung. Damit ist eindeutig erwiesen,

dass die Evolutionsrichtung von einem NEO-Biosyntheseweg zu demjenigen in der LIV-Biosynthese als Weiterentwicklung geführt hat. Offensichtlich war LivQ ehemals auch wie NeoQ bifunktional und hat diese Fähigkeit verloren. Dafür spricht, dass die Aminotransferase LivB noch bifunktional ist. Aus den Genclustern lässt sich jedoch nicht schließen, welches Cluster die ursprüngliche Form der „Q“-Enzyme codiert, denn die Anordnung der Gene innerhalb der Gencluster der Produzenten der NEO-Familie ist so stark konserviert, dass keines der angesprochenen Gene in einem Bereich liegt, der variabel erscheint. Daher ist zu vermuten, dass die Unterschiede in der Modifikation der 6'-Position durch einen evolutiven Selektionsdruck der gebildeten Endprodukte in den Stämmen zustande gekommen ist (Piepersberg *et al.*, 2007; Piepersberg persönliche Mitteilung).

### 5.3 Die Carbamoyltransferase TobZ

Es wurde postuliert, dass TobZ die finalen Schritte in der NEB-Biosynthese in *S. sp.* DSM 40477, die 6''-Carbamoylierung von TOB zu NEB-5' und die 6''-Carbamoylierung von KAN-B zu NEB-4 katalysiert, da nicht alle Endprodukte des NEB-Komplexes carbamoyliert sind (Piepersberg *et al.*, 2007). Um Aktivitätstests durchzuführen musste das Enzym zunächst produziert werden. Bei heterologer Expression des *tobZ* Gens in *E. coli* lag das überproduzierte Protein ausschließlich unlöslich in Form von „inclusion bodies“ vor. Lösliches TobZ Protein konnte jedoch sowohl nativ als auch als N-His<sub>10</sub>-TobZ bzw. C-His<sub>6</sub>-TobZ heterolog in *S. lividans* 66 TK23 oder TK64 überproduziert werden. Enzymtests mit aufkonzentrierten löslichen Protein, die das native TobZ enthielten, zeigten Carbamoyltransferase-Aktivität mit den Substraten TOB und KAN-B, und bestätigten den postulierten Biosyntheseweg. Für die Carbamoylierung durch TobZ sind neben dem Carbamoylgruppendonator CAP auch MgCl<sub>2</sub> und ATP im Reaktionsansatz notwendig (vgl. 4.3.1, Abb. 4.26). Neben Mg<sup>2+</sup>- dienen wahrscheinlich auch Mn<sup>2+</sup>- bzw. Co<sup>2+</sup>-Kationen als alternative Co-Faktoren für TobZ. Mg<sup>2+</sup>-Kationen wurden auch als Co-Faktoren für die Sekundärstoffwechsel-Carbamoyltransferasen CmcH der Cephamycin-Biosynthese aus *S. clavuligerus* (Brewer *et al.*, 1980; Coque *et al.*, 1995) und NovN der Novobiocin-Biosynthese aus *S. spheroides* beschrieben (Freel Meyers *et al.*, 2004).

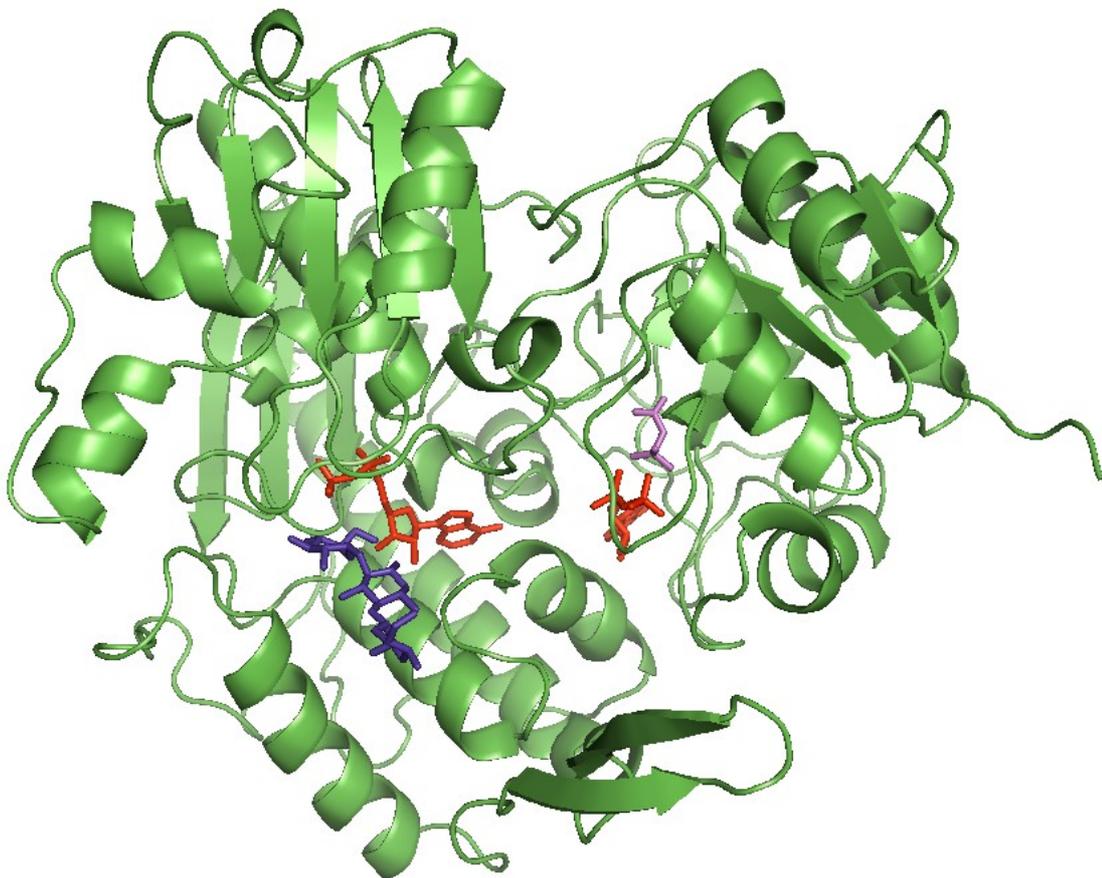
Im Gegensatz zu dem aufkonzentrierten Protein wies über das „Batch“-Verfahren gereinigtes His-tag TobZ-Fusionsprotein keine Aktivität auf. Dies kann verschiedene

Ursachen haben: Das His-tag könnte die Funktion des Proteins beeinträchtigen, daher erfolgte die His-tag Fusion zum einen N-Terminal und zum anderen C-Terminal. Zusätzlich wurde das N-His-tag mit Faktor Xa abgespalten. Doch weder durch die Änderung der Position des His-tags noch durch Abspaltung des N-His<sub>10</sub>-tags konnte enzymatisch aktives gereinigtes Protein generiert werden. Daher wurde geschlossen, dass die fehlende enzymatische Aktivität des Proteins ein Resultat der Reinigung war. So wurde beispielsweise für die O-Carbamoyltransferase Cmch aus *S. clavuligerus* eine Hemmung durch NaCl beschrieben (Brewer *et al.*, 1980). Um eine Inhibierung von TobZ durch Komponenten, die in dem Reinigungsprozess eingesetzt wurden, auszuschließen, wurde zusätzlich eine Dialyse durchgeführt. Aber auch dialysiertes N-His<sub>10</sub>-TobZ bzw. C-His<sub>6</sub>-TobZ war enzymatisch inaktiv.

Die Funktion des ATP für die durch TobZ katalysierte Carbamoylierungsreaktion ist unklar. In Carbamoylierungsansätzen ohne ATP war die TobZ-Aktivität stark reduziert. Da diese Tests mit konzentrierten Proteinextrakten durchgeführt wurden, könnten darin Reste von ATP enthalten gewesen sein, die noch ausreichend waren für die gemessenen Enzymwerte. Auch die Carbamoyltransferasen Cmch und NovN sind ATP-abhängig, dabei wurde spekuliert, ob ATP als Substrat oder Effektor wirkt (Freel Meyers *et al.*, 2004). Die Aminosäuresequenz des TobZ weist zwei Nucleotid-Bindemotive auf, die auch als ATP-Bindungsstellen beschrieben wurden (Walker-Boxen, Walker *et al.*, 1982). Während die AS 310-315 von TobZ die Abfolge **GRGEVG** aufweisen, die dem bekannten Motiv der Walker-Box GxGxxG (Walker *et al.*, 1982; Saraste *et al.*, 1990; Hanks und Quinn, 1991) entspricht, wurde in dem Bereich der AS 411-416 von TobZ zusätzlich die Sequenz **GVGLNA** gefunden, die mit dem selteneren ATP-Bindemotiv GxGxxA (Golsteyn *et al.*, 1994) übereinstimmt. Tatsächlich konnte jetzt gezeigt werden, dass in dem analysierten Kristall des TobZ Proteins 2 Moleküle ADP gebunden vorlagen, dazu auch noch der benötigte Carbamoylgruppen-Donor CAP sowie das Substrat TOB (vgl. Abb. 5.6). Die Frage, wozu das Protein auch ATP benötigt, ist völlig unklar. Prinzipiell ist keine Energie für die Transcarbamoylierungs-Reaktion notwendig, da CAP eine energiereiche Verbindung ist (Freie Energie bei Hydrolyse  $\Delta G^{0'}$  -39 kJ/mol, zum Vergleich ATP  $\rightarrow$  ADP  $\Delta G^{0'}$  -35 kJ/mol, Doenecke *et al.*, 2005).

Die Regulation der Carbamoyltransferase-Aktivität von TobZ über ATP oder Phosphorylierungsreaktionen scheint daher wahrscheinlich. Dabei könnte auch die Synthese des CAP eine Rolle spielen. Im Primärstoffwechsel ist CAP Substrat bei der Biosynthese des Kohlenstoffskeletts des Pyrimidinrings und bei der Biosynthese der Aminosäure Arginin. CAP wird durch die CAP-Synthetase in einer 2 Mol ATP-verbrauchenden Reaktion gebildet. In *S. lividans* wurde bereits eine CAP-Synthetase

charakterisiert (Vaishnav *et al.*, 2000). In *S. coelicolor* codieren vermutlich die Gene *carA* und *carB* für die kleine und große Untereinheit der CAP-Synthetase (Bentley *et al.*, 2002). Die Bindung des ATP im TobZ könnte als allosterischer Effektor durch eine Konformationsänderung eine Aktivierung des Enzyms zur Folge haben, und damit sicherstellen, dass nur dann eine Transcarbamoylierung stattfindet, wenn genügend ATP zur Bildung von CAP in der Zelle vorhanden ist. Bei Betrachtung der TobZ-Kristallstruktur (siehe Abb. 5.5) fällt auf, dass die beiden ADP Moleküle nahe dem TOB bzw. CAP gebunden sind, eventuell ermöglicht das ATP auch die Bindung der beiden Substrate im Enzym, oder es wirkt einer Hydrolyse des Phosphatrests im CAP vor der Transferreaktion entgegen.



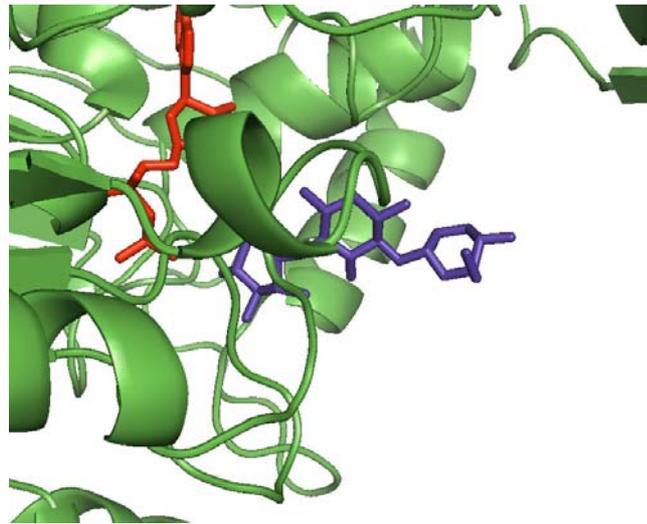
**Abb. 5.6: Kristallstruktur der Carbamoyltransferase TobZ (Daten in Kooperation mit Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Physikalische Biotechnologie, Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)**

In grün ist die dreidimensionale Struktur von TobZ dargestellt, in roter Farbe gebundenes ADP, pink CAP und blau TOB.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit, die auch eine Erklärung dafür wäre, dass TobZ immer nur in der löslichen Gesamtproteinfraktion als aktives Protein erhalten wurde, wäre die mögliche ATP-abhängige Phosphorylierung des Enzyms durch Proteinkinasen. Die Proteinphosphorylierung ist eine der wichtigsten regulatorischen Mechanismen bei der Signaltransduktion (Ogawara *et al.*, 1999). Während in Eukaryoten Serin-, Threonin- und Tyrosinreste phosphoryliert werden, sind es in Prokaryoten hauptsächlich Histidin- und Aspartatreste. *In vitro* Tests mit Extrakten von *S. griseus*,  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP und Kinase-Inhibitoren zeigten die Präsenz von vielfach phosphorylierten Proteinen, wobei jedoch die meisten Phosphorylierungen deutlich durch Inhibitoren, die Kinasen des eukaryotischen Typs hemmen, blockiert wurden (Hong *et al.*, 1993). Die Genomsequenz von *S. coelicolor* zeigte auch das Vorhandensein von 39 potentiellen Proteinkinasen eukaryotischen Typs (Bentley *et al.*, 2002; Urabe *et al.*, 2008), die mögliche regulatorische Effekte auf verschiedene metabolische Prozesse, morphologische Differenzierung und den Sekundärmetabolismus haben könnten (Hong *et al.*, 1993). Beispielsweise führt der Verlust der Ser-/Thr-Proteinkinase PkaD in *S. coelicolor* zu einer signifikanten Verringerung der Actinorhodin-Produktion (Ogawara *et al.*, 1999). Der Einfluss von Proteinkinasen im Sekundärmetabolismus der Streptomyceten ist noch wenig erforscht, doch könnte eine Proteinkinase, die sowohl in *S. sp.* DSM 40477 als auch *S. lividans* vorkommt, TobZ phosphorylieren. TobZ könnte aber auch durch den gegenteiligen Prozess, der Hydrolyse von Phosphatresten durch in der Zelle vorkommende Protein-Phosphatasen, aktiviert werden. Bei dieser Reaktion würde jedoch kein ATP verbraucht werden.

Neben den natürlichen Substraten TOB und KAN-B wurde auch das strukturell ähnliche KAN-A durch TobZ carbamoyliert (siehe Abb. 4.27). Somit scheint vor allem der am 2-DOS 6-substituierte Glycosylrest zur Erkennung des AGA-Substrats am Enzym wichtig, denn dieser ist bei TOB, KAN-B und KAN-A identisch. Des Weiteren zeigt sich bei der Analyse der Kristallstruktur, dass der 4-substituierte Glycosylrest, in dem sich die durch TobZ carbamoylierten AGAs unterscheiden, aus dem Protein herausragt (siehe Abb. 5.7) und somit für die Substraterkennung scheinbar eine untergeordnete Rolle spielt. Allerdings deuten diese Ergebnisse und die Analyse der Kristallstruktur darauf hin, dass eine potentielle Carbamoylierung von AGAs anderer Familien (z. B. NEO-Familie) durch TobZ eher unwahrscheinlich ist. Die Substrate TOB und KAN-B sind Pseudotrisaccharide deren Aglycon 2-DOS 4,6-disubstituiert ist, wodurch ein lineares Molekül entsteht. AGAs der NEO-Familie haben nur den Paromamin-Teil mit den Kanamycinen gemein, sind stattdessen 4,5-disubstituiert und im Falle von NEO und LIV Pseudotetrasaccharide. Den Kanamycinen ähnlich sind die

Gentamicine, die ebenfalls Pseudotrisaccharide sind und deren 2-DOS Einheit 4,6-disubstituiert ist. Carbamoylierungsversuche mit TobZ an Gentamicinen führten jedoch aufgrund unzureichender Analytik zu keinem Ergebnis. Wahrscheinlich sind sie jedoch keine Substrate, da sie keine 5''-CH<sub>2</sub>OH-Gruppe aufweisen, denn im Gegensatz zur KAN-Familie ist in der GEN-Familie 2-DOS an der 6-Position nicht mit Glucose sondern mit Xylose glycosyliert.



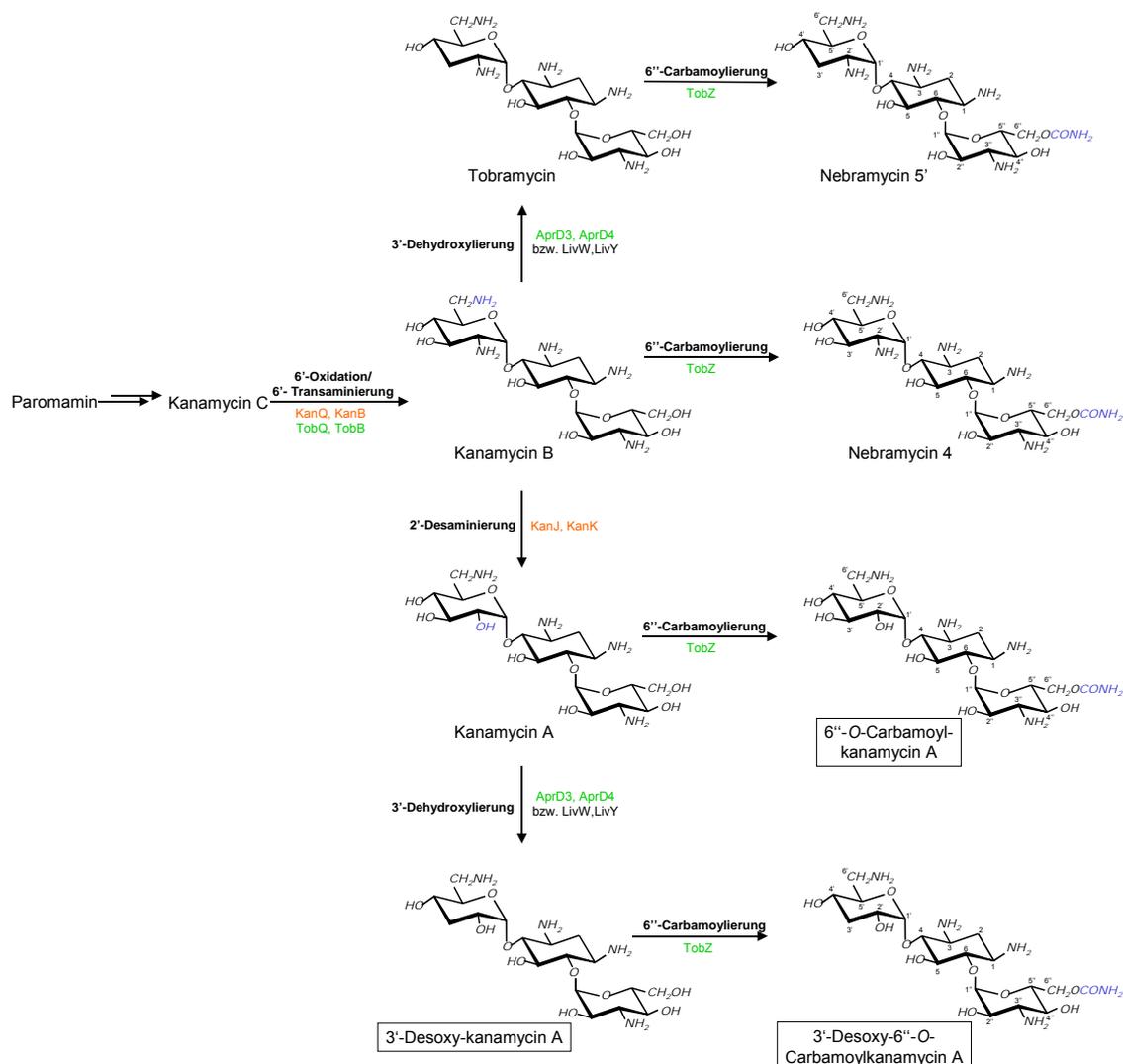
**Abb. 5.7: Ausschnitt der Kristallstruktur von TobZ (Daten in Kooperation mit Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Physikalische Biotechnologie, Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)**

In grün ist die dreidimensionale Struktur von TobZ dargestellt, in roter Farbe gebundenes ADP und blau TOB.

Das durch die *in vitro* Carbamoylierung des KAN-A entstandene neue semi-synthetische AGA 6''-O-Carbamoylkanamycin A wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Kombination der AGA-Biosynthesewege von *S. kanamyceticus* und *S. sp.* DSM 40477 könnten somit folglich *in vivo* ebenso zur Produktion dieses neuen AGA im Produzentenstamm führen. Abbildung 5.8 zeigt einen möglichen biokombinatorischen Ansatz. Durch Konjugation könnte das *tobZ* Gen in *S. kanamyceticus* eingebracht werden, und damit 6''-O-Carbamoylkanamycin A auch *in vivo* gebildet werden.

Das zusätzliche Einbringen von Enzymen zur 3'-Dehydroxylierung (AprD3, AprD4 bzw. LivW, LivY) in *S. kanamyceticus* würde das Produktspektrum zusätzlich erweitern, zudem sollten die Resistenzenzyme APH(3')-I-IV, VI, VII keine Resistenz mehr gegen 3'dehydroxylierte AGAs vermitteln können. Neben den von *S. sp.* DSM 40477 bekannten Produkten TOB, NEB-4 und NEB-5' könnten die neuen AGAs 3'-Desoxy-

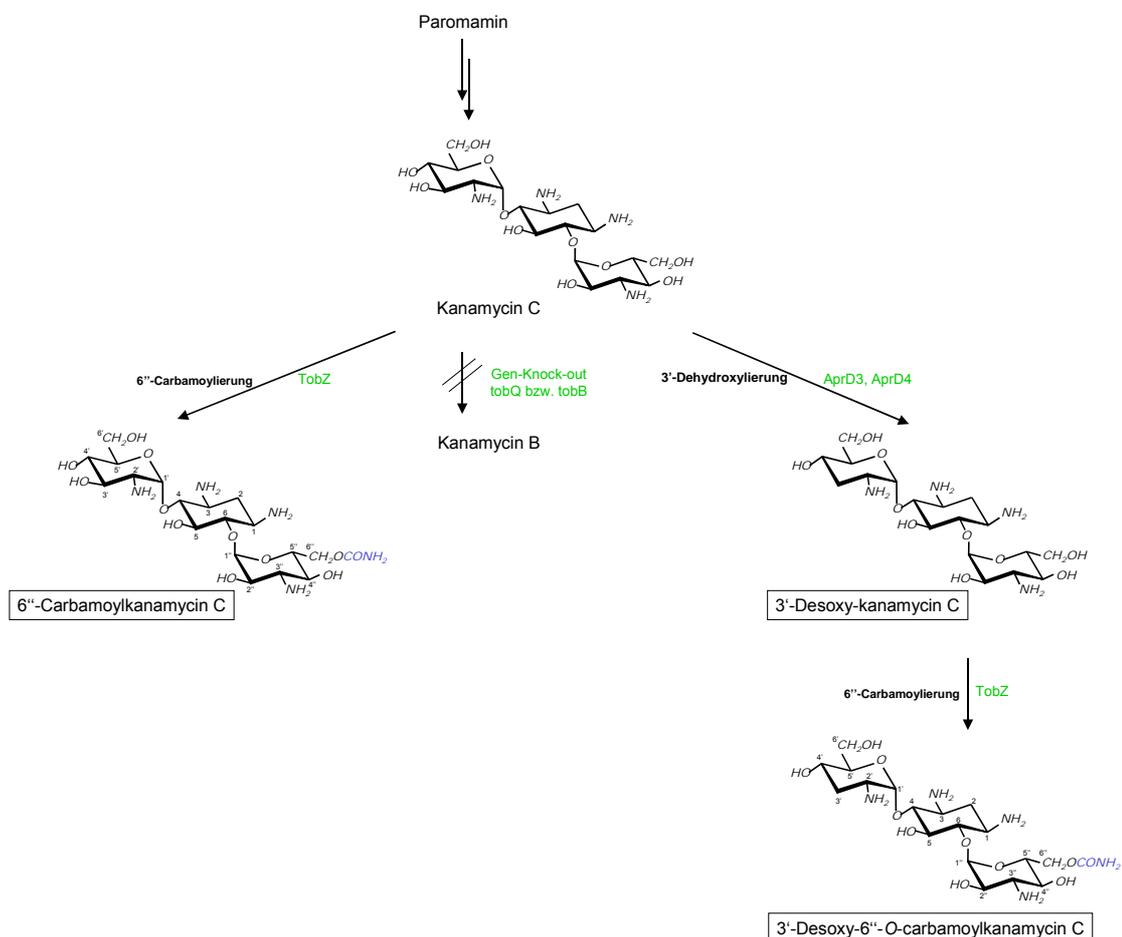
kanamycin A und 3'-Desoxy-6''-carbamoyl-kanamycin A gebildet werden. Ein gleiches Produktspektrum wäre auch in *S. sp.* DSM 40477 nach Konjugation von *kanJ* und *kanQ*, deren Genprodukte wahrscheinlich die 2'-Desaminierung von KAN-B zu KAN-A katalysieren, zu erwarten. Insgesamt muss jedoch beachtet werden, dass der Produzent sensitiv gegenüber dem entstehenden neuen AGA sein könnte. Beispielsweise ist *S. kanamyceticus* sensitiv gegenüber TOB (Mandt, 2008), so dass das resistenzvermittelnde Gen *kmr* aus *S. sp.* DSM 40477 ebenfalls konjugiert werden müsste. Die Carbamoylierung könnte auch eine erhöhte antibiotische Wirkung zur Folge haben. Das Bioautogramm mit *M. luteus* zeigte, dass der Prüfstamm deutlich sensitiver gegenüber 6''-O-Carbamoylkanamycin A als gegenüber KAN-A war (siehe Abb. 4.28).



**Abb. 5.8: Biokombinatorische Ansätze zur Bildung neuer KAN-A-Derivate**

Eingerahmt sind mögliche neue Produkte durch Kombination von Enzymen der NEB-Biosynthese (grün) und der KAN-Biosynthese (orange).

In der Literatur wurde bereits ein anderes Carbamoylierungsprodukt beschrieben, das durch die Gendisruption des *tobQ*-Gens, das für eine 6'-Dehydrogenase codiert, in *S. tenebrarius* H6 erhalten wurde. Die Bildung von Tobramycin blieb aus und stattdessen konnte 3'-Desoxy-6''-O-Carbamoylkanamycin C isoliert werden. Dieses AGA ist antibiotisch aktiv, jedoch weniger als TOB; allerdings ist auch die Toxizität geringer als bei TOB (Yu *et al.*, 2008). Mutagenesen sind daher eine weitere Möglichkeit zur Produktion neuer AGAs. Abbildung 5.9 zeigt einen möglichen biokombinatorischen Ansatz: durch Gen-Knock-out von *tobQ* bzw. *tobB* bleibt die Transaminierung von KAN-C zu KAN-B aus und Endprodukte wie TOB, NEB-4 und NEB-5' würden nicht gebildet. Stattdessen wäre zu erwarten, dass KAN-C direkt oder nach 3'-Dehydroxylierung durch AprD3 und AprD4 mittels TobZ carbamoyliert werden würde.



**Abb. 5.9: Biokombinatorische Ansätze zur Bildung neuer KAN-C-Derivate**

Eingerahmt sind mögliche neue Endprodukte die durch den Gen-Knock-out von *tobQ* bzw. *tobB* in *S. sp.* DSM 40477 zu erwarten wären (siehe Text).

## 5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bifunktionalität der Oxidoreduktase NeoQ und der Aminotransferase NeoB gezeigt werden. *In vitro* wurde neben Neamin aus Paromamin auch NEO-C aus 6''-Hydroxyneomycin C mit Hilfe der Enzyme NeoQ und NeoB produziert. Die NEO-Biosynthese ist damit nahezu vollständig geklärt, ungezeigt ist die 5-Ribosylierung, die jedoch bereits für die BTR-Synthese beschrieben wurde (Kudo *et al.*, 2007). Unklar ist noch die 5''-Epimerisierung des NEO-C zu NEO-B, die wahrscheinlich durch NeoN und NeoX katalysiert wird (Piepersberg *et al.*, 2007).

Es wurden auch Erkenntnisse zur LIV-Biosynthese gewonnen. Wie sich zeigte, ist die eingeschränkte Substratspezifität des LivQ Ursache dafür, dass nicht wie bei der NEO-Synthese neben der 6''-Position auch die 6'-Position des Endprodukts aminiert vorliegt. LivQ konnte *in vitro* nur die 6''-OH-Gruppe des 6''-Hydroxyneomycin C oxidieren und ist damit monofunktional. Überraschend war jedoch, dass LivB in der Lage war, die durch Oxidation des Paromamins mittels NeoQ entstandene 6'-Aldehydgruppe zu aminieren.

Mit diesem gewonnen Wissen, dass LivB *in vitro* ebenfalls bifunktional ist, könnte theoretisch durch Konjugation des *neoQ* in *S. lividus* ein neues AGA synthetisiert werden. Analog der NEO-Synthese sollte NEO-C als Intermediat gebildet werden. In *S. fradiae* wird NEO-C direkt zu NEO-B epimerisiert. Bei *S. lividus* erfolgt vor der 5''-Epimerisierung jedoch zunächst eine 3'-Dehydroxylierung, so dass das neue AGA 3'-Desoxy-neomycin B zu erwarten wäre.

Des Weiteren wurde die Carbamoylierungsaktivität des TobZ untersucht. Neben den natürlich vorkommenden Substraten TOB und KAN-B katalysierte TobZ auch die 6''-Carbamoylierung des KAN-A und das neue, bisher unbeschriebene AGA 6''-O-Carbamoylkanamycin A wurde gebildet. Durch die Kombination von Enzymen der KAN- und NEB-Biosynthesen aber auch durch Mutagenesen könnten weitere neue AGAs synthetisiert werden.

Diese und weitere Charakterisierungen der verschiedenen Enzyme der AGA-Biosynthesen schaffen die Möglichkeit zukünftig *in vitro* und eventuell auch *in vivo* neue AGAs zu synthetisieren, mit dem Ziel nicht nur Resistenzmechanismen zu blockieren sondern auch die Toxizität zu verringern. Und da bereits klinische Studien zu LIV-A, NEO-B, KAN-A, KAN-B und TOB existieren, könnte die klinische Testphase schneller verlaufen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aboshanab, K.M.A. 2005. Genetic studies on the biosynthesis of the major aminoglycoside antibiotics: Isolation, analysis and comparison of the biosynthetic gene clusters for 12 aminoglycoside antibiotics. Dissertation Bergische Universität Wuppertal, Wuppertal.
- Akita, E., Ito, T., Tsuruoka, T. und Niida, T. 1970. Synthesis of an aminocyclitol antibiotic, SF-733 (ribostamycin). *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 10: 33-7.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-10.
- Babcock, M.J. und Kendrick, K.E. 1988. Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 170: 2802-8.
- Bates, D.E. 2003. Aminoglycoside ototoxicity. *Drugs Today (Barc)* 39: 277-85.
- Bedwell, D.M., Kaenjok, A., Benos, D.J., Bebok, Z., Bubien, J.K., Hong, J., Tousson, A., Clancy, J.P. und Sorscher, E.J. 1997. Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* 3: 1280-4.
- Benimeli, C.S., Fuentes, M.S., Abate, C.M. und Amoroso, M.J. 2008. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces sp.* M7 and its effects on *Zea mays* growth. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61: 233-239.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. und Hopwood, D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-7.
- Berdy, J. 1974. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv Appl Microbiol* 18: 309-406.
- Bernacchi, S., Freisz, S., Maechling, C., Spiess, B., Marquet, R., Dumas, P. und Ennifar, E. 2007. Aminoglycoside binding to the HIV-1 RNA dimerization initiation site: thermodynamics and effect on the kissing-loop to duplex conversion. *Nucleic Acids Res* 35: 7128-39.
- Bibb, M.J., Janssen, G.R. und Ward, J.M. 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* 38: 215-26.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Rao, R.N. und Schoner, B.E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp.* *Gene* 116: 43-9.

- Birch, A., Hausler, A. und Hutter, R. 1990. Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* 172: 4138-42.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23.
- Black, J., Calesnick, B., Williams, D. und Weinstein, M.J. 1963. Pharmacology of Gentamicin, a New Broad-Spectrum Antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 161: 138-47.
- Blaesing, F., Mühlenweg, A., Vierling, S., Ziegelin, G., Pelzer, S. und Lanka, E. 2005. Introduction of DNA into *Actinomycetes* by bacterial conjugation from *E. coli*--an evaluation of various transfer systems. *J Biotechnol* 120: 146-61.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. und Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-62.
- Blokesch, M., Paschos, A., Bauer, A., Reissmann, S., Drapal, N. und Bock, A. 2004. Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE. *Eur J Biochem* 271: 3428-36.
- Boeck, L.D., Hoehn, M.M., Sands, T.H. und Wetzel, R.W. 1978. A32390A, a new biologically active metabolite. I. Discovery and fermentation studies. *J Antibiot (Tokyo)* 31: 19-26.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brewer, S.J., Taylor, P.M. und Turner, M.K. 1980. An adenosine triphosphate-dependent carbamoylphosphate--3-hydroxymethylcephem O-carbamoyl-transferase from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochem J* 185: 555-64.
- Bryan, L.E. und Kwan, S. 1981. Mechanisms of aminoglycoside resistance of anaerobic bacteria and facultative bacteria grown anaerobically. *J Antimicrob Chemother* 8 Suppl D: 1-8.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. und Ramakrishnan, V. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407: 340-8.
- Celli, J. und Trieu-Cuot, P. 1998. Circularization of Tn916 is required for expression of the transposon-encoded transfer functions: characterization of long tetracycline-inducible transcripts reading through the attachment site. *Mol Microbiol* 28: 103-17.
- Chater, K.F. und Hopwood, D.A. 1993. *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. . Pages 83-89 in Sonenshein, J.P., ed. *Streptomyces*. ASM, Washington, DC.

- Chater, K.F., Hopwood, D.A., Kieser, T. und Thompson, C.J. 1982. Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr Top Microbiol Immunol* 96: 69-95.
- Chater, K.F. und Merrick, M.J. 1979. Developmental Biology of Prokaryotes. Pages 93-114 in Parish, J.H., ed. *Streptomyces*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Chen, S., von Bamberg, D., Hale, V., Breuer, M., Hardt, B., Muller, R., Floss, H.G., Reynolds, K.A. und Leistner, E. 1999. Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin. Identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* Tu 1892. *Eur J Biochem* 261: 98-107.
- Chia, J.S., Wu, H.L., Wang, H.W., Chen, D.S. und Chen, P.J. 1997. Inhibition of Hepatitis Delta Virus Genomic Ribozyme Self-Cleavage by Aminoglycosides. *J Biomed Sci* 4: 208-216.
- Churchich, J.E. 1978. Interaction between brain enzymes glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 1105-10.
- Claes, P.J., Vanderhaeghe, H. und Compernelle, F. 1973. Isolation and identification of minor components of commercial kanamycin. *Antimicrob Agents Chemother* 4: 560-3.
- Coque, J.J., Perez-Llarena, F.J., Enguita, F.J., Fuente, J.L., Martin, J.F. und Liras, P. 1995. Characterization of the cmcH genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 3'-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis. *Gene* 162: 21-7.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-90.
- Cron, M.J., Fardig, O.B., Johnson, D.L., Palermiti, F.M., Schmitz, H. und Hooper, I.R. 1958. The chemistry of kanamycin. *Ann N Y Acad Sci* 76: 27-30.
- Cundliffe, E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* 43: 207-33.
- Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264: 375-82.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-90.
- DeLano, W.L. 2002. The PyMol Molecular Graphics System. <http://www.pymol.org>, Palo Alto, Ca, USA.
- Dion, H.W., Woo, P.W., Willmer, N.E., Kern, D.L., Onaga, J. und Fusari, S.A. 1972. Butirosin, a new aminoglycosidic antibiotic complex: isolation and characterization. *Antimicrob Agents Chemother* 2: 84-8.
- Distler, J. und Piepersberg, W. 1985. Cloning and characterization of a gene from *Streptomyces griseus* coding for a streptomycin-phosphorylating activity. *FEMS Microbiology Letters* 28: 113-117.

- Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G. und Gerok, W. 2005. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Thieme, Stuttgart.
- Doi, O., Miyamoto, M., Tanaka, N. und Umezawa, H. 1968. Inactivation and phosphorylation of kanamycin by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* 16: 1282-4.
- Doi, Y., Yokoyama, K., Yamane, K., Wachino, J., Shibata, N., Yagi, T., Shibayama, K., Kato, H. und Arakawa, Y. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 491-6.
- Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U.F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.M., Piepersberg, W. und Raynal, M.C. 2000. Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Gen Genet* 264: 477-85.
- Egan, S.M. und Schleif, R.F. 1993. A regulatory cascade in the induction of rhaBAD. *J Mol Biol* 234: 87-98.
- Fahien, L.A., Lin-Yu, J.H., Smith, S.E. und Happy, J.M. 1971. Interactions between glutamate dehydrogenase, transaminases, and keto acids. *J Biol Chem* 246: 7241-9.
- Fan, Q., Huang, F., Leadlay, P.F. und Spencer, J.B. 2008. The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: genetic and biochemical evidence for the roles of two glycosyltransferases and a deacetylase. *Org Biomol Chem* 6: 3306-14.
- Fang, J.R., Pearce, C.J. und Rinehart, K.L., Jr. 1984. Neomycin biosynthesis: the involvement of neamine and paromamine as intermediates. *J Antibiot (Tokyo)* 37: 77-9.
- Flett, F., Mersinias, V. und Smith, C.P. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett* 155: 223-9.
- Fong, D.H. und Berghuis, A.M. 2002. Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry. *Embo J* 21: 2323-31.
- François, B., Russell, R.J., Murray, J.B., Aboul-ela, F., Masquida, B., Vicens, Q. und Westhof, E. 2005. Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res* 33: 5677-90.
- Freel Meyers, C.L., Oberthur, M., Anderson, J.W., Kahne, D. und Walsh, C.T. 2003. Initial characterization of novobiocin acid noviosyl transferase activity of NovM in biosynthesis of the antibiotic novobiocin. *Biochemistry* 42: 4179-89.
- Freel Meyers, C.L., Oberthur, M., Xu, H., Heide, L., Kahne, D. und Walsh, C.T. 2004. Characterization of NovP and NovN: completion of novobiocin biosynthesis by sequential tailoring of the noviosyl ring. *Angew Chem Int Ed Engl* 43: 67-70.

- Galimand, M., Courvalin, P. und Lambert, T. 2003. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2565-71.
- Gibbons, N.E. und Murray, R.G.E. 1978. Proposals Concerning the Higher Taxa of Bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 28: 1-6.
- Golsteyn, R.M., Schultz, S.J., Bartek, J., Ziemiecki, A., Ried, T. und Nigg, E.A. 1994. Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila* polo and *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5. *J Cell Sci* 107 ( Pt 6): 1509-17.
- Gordon, N. 2003. Ornithine transcarbamylase deficiency: a urea cycle defect. *Eur J Paediatr Neurol* 7: 115-21.
- Guthrie, O.W. 2008. Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology* 249: 91-6.
- Hall, R.M. und Collis, C.M. 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat* 1: 109-19.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80.
- Hanks, S.K. und Quinn, A.M. 1991. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* 200: 38-62.
- Hartung, B. 1989. Streptomyceten als Bildner industriell und diagnostisch bedeutsamer Enzyme. *Acta Biotechnologica* 9: 157-172.
- Haydock, S.F., Appleyard, A.N., Mironenko, T., Lester, J., Scott, N. und Leadlay, P.F. 2005. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide concanamycin A in *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449. *Microbiology* 151: 3161-9.
- Hennig, J. 2009. Strukturelle Untersuchungen an den extrazellulären Ligandenbindenden Domänen der Parathormon Rezeptoren 1 und 2 sowie der L-Glutamin-Glykosyl-Prasomamin-3"-Aminotransferase TobS2. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Higgins, C.E. und Kastner, R.E. 1967. Nebramycin, a new broad spectrum antibiotic complex II: Description of *Streptomyces tenebrarius*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7: 332.
- Hong, S.K., Matsumoto, A., Horinouchi, S. und Beppu, T. 1993. Effects of protein kinase inhibitors on in vitro protein phosphorylation and cellular differentiation of *Streptomyces griseus*. *Mol Gen Genet* 236: 347-54.
- Hotta, K., Sunada, A., Ikeda, Y. und Kondo, S. 2000. Double stage activity in aminoglycoside antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)* 53: 1168-74.
- Hotta, K., Zhu, C.B., Ogata, T., Sunada, A., Ishikawa, J., Mizuno, S., Ikeda, Y. und Kondo, S. 1996. Enzymatic 2'-N-acetylation of arbekacin and antibiotic activity of its product. *J Antibiot (Tokyo)* 49: 458-64.

- Houghton, J.E., Bencini, D.A., O'Donovan, G.A. und Wild, J.R. 1984. Protein differentiation: a comparison of aspartate transcarbamoylase and ornithine transcarbamoylase from *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 4864-8.
- Howard, M.T., Anderson, C.B., Fass, U., Khatri, S., Gesteland, R.F., Atkins, J.F. und Flanigan, K.M. 2004. Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann Neurol* 55: 422-6.
- Huang, F., Haydock, S.F., Mironenko, T., Spiteller, D., Li, Y. und Spencer, J.B. 2005. The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: characterisation of an aminotransferase involved in the formation of 2-deoxystreptamine. *Org Biomol Chem* 3: 1410-8.
- Huang, F., Li, Y., Yu, J. und Spencer, J.B. 2002. Biosynthesis of aminoglycoside antibiotics: cloning, expression and characterisation of an aminotransferase involved in the pathway to 2-deoxystreptamine. *Chem Commun (Camb)*: 2860-1.
- Huang, F., Spiteller, D., Koorbanally, N.A., Li, Y., Llewellyn, N.M. und Spencer, J.B. 2007. Elaboration of neosamine rings in the biosynthesis of neomycin and butirosin. *Chembiochem* 8: 283-8.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. und Omura, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21: 526-31.
- Islam, M.M., Nautiyal, M., Wynn, R.M., Mobley, J.A., Chuang, D.T. und Hutson, S.M. 2010. Branched-chain amino acid metabolon: interaction of glutamate dehydrogenase with the mitochondrial branched-chain aminotransferase (BCATm). *J Biol Chem* 285: 265-76.
- James, P.D., Raut, S., Rivard, G.E., Poon, M.C., Warner, M., McKenna, S., Leggo, J. und Lillicrap, D. 2005. Aminoglycoside suppression of nonsense mutations in severe hemophilia. *Blood* 106: 3043-8.
- Kantrowitz, E.R. und Lipscomb, W.N. 1988. *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase: the relation between structure and function. *Science* 241: 669-74.
- Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.H., Rogers, C.J., Meijler, M.M., Moss, J.A., Clapham, B., Brogan, A.P., Dickerson, T.J. und Janda, K.D. 2005. Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 309-14.
- Kawaguchi, H., Naito, T., Nakagawa, S. und Fujisawa, K.I. 1972. BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 25: 695-708.
- Kharel, M.K., Basnet, D.B., Lee, H.C., Liou, K., Woo, J.S., Kim, B.G. und Sohng, J.K. 2004a. Isolation and characterization of the tobramycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces tenebrarius*. *FEMS Microbiol Lett* 230: 185-90.
- Kharel, M.K., Subba, B., Basnet, D.B., Woo, J.S., Lee, H.C., Liou, K. und Sohng, J.K. 2004b. A gene cluster for biosynthesis of kanamycin from *Streptomyces*

- kanamyceticus*: comparison with gentamicin biosynthetic gene cluster. *Arch Biochem Biophys* 429: 204-14.
- Kharel, M.K., Subba, B., Lee, H.C., Liou, K. und Sohng, J.K. 2005. Characterization of L-glutamine:2-deoxy-scyllo-inosose aminotransferase (tbmB) from *Streptomyces tenebrarius*. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 89-92.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. und Hopwood, D.A. 2000. *Practical streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Kistler, W.S. und Lin, E.C. 1972. Purification and properties of the flavine-stimulated anaerobic L- glycerophosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 112: 539-47.
- Kleiger, G. und Eisenberg, D. 2002. GXXXG and GXXXA motifs stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann folds through C(alpha)-H... O hydrogen bonds and van der waals interactions. *J Mol Biol* 323: 69-76.
- Koch, C., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A. und Stackebrandt, E. 1996. 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 46: 765-8.
- Kondo, S., Iinuma, K., Yamamoto, H., Ikeda, Y. und Maeda, K. 1973a. Letter: Synthesis of (S)-4-amino-2-hydroxybutyryl derivatives of 3',4'-dideoxykanamycin B and their antibacterial activities. *J Antibiot (Tokyo)* 26: 705-7.
- Kondo, S., Iinuma, K., Yamamoto, H., Maeda, K. und Umezawa, H. 1973b. Letter: Syntheses of 1-n-(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl)-kanamycin B and -3', 4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. *J Antibiot (Tokyo)* 26: 412-5.
- Kotra, L.P., Haddad, J. und Mobashery, S. 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3249-56.
- Kudo, F. und Eguchi, T. 2009. Biosynthetic enzymes for the aminoglycosides butirosin and neomycin. *Methods Enzymol* 459: 493-519.
- Kudo, F., Fujii, T., Kinoshita, S. und Eguchi, T. 2007. Unique O-ribosylation in the biosynthesis of butirosin. *Bioorg Med Chem* 15: 4360-8.
- Kudo, F., Hosomi, Y., Tamegai, H. und Kakinuma, K. 1999. Purification and characterization of 2-deoxy-scyllo-inosose synthase derived from *Bacillus circulans*. A crucial carbocyclization enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)* 52: 81-8.
- Kudo, F., Kawashima, T., Yokoyama, K. und Eguchi, T. 2009. Enzymatic preparation of neomycin C from ribostamycin. *J Antibiot (Tokyo)* 62: 643-6.
- Kudo, F., Yamamoto, Y., Yokoyama, K., Eguchi, T. und Kakinuma, K. 2005. Biosynthesis of 2-deoxystreptamine by three crucial enzymes in *Streptomyces fradiae* NBRC 12773. *J Antibiot (Tokyo)* 58: 766-74.

- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10: 203-9.
- Leblond, P. und Decaris, B. 1994. New insights into the genetic instability of *streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 123: 225-32.
- Lechevalier, M.P. und Lechevalier, H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic *actinomycetes*. *Int J Syst Bacteriol* 20: 435-443.
- Leibovici, L., Vidal, L. und Paul, M. 2009. Aminoglycoside drugs in clinical practice: an evidence-based approach. *J Antimicrob Chemother* 63: 246-51.
- Lengeler, J. und Lin, E.C. 1972. Reversal of the mannitol-sorbitol diauxie in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 112: 840-8.
- Lihme, A., Schafer-Nielsen, C., Larsen, K.P., Muller, K.G. und Bog-Hansen, T.C. 1986. Divinylsulphone-activated agarose. Formation of stable and non-leaking affinity matrices by immobilization of immunoglobulins and other proteins. *J Chromatogr* 376: 299-305.
- Lockwood, W.R. und Bower, J.D. 1973. Tobramycin and gentamicin concentrations in the serum of normal and anephric patients. *Antimicrob Agents Chemother* 3: 125-9.
- Lüllmann, H., Mohr, K. und Hein, L. 2006. *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Lynch, S.R., Gonzalez, R.L. und Puglisi, J.D. 2003. Comparison of X-ray crystal structure of the 30S subunit-antibiotic complex with NMR structure of decoding site oligonucleotide-paromomycin complex. *Structure* 11: 43-53.
- Lynch, S.R. und Puglisi, J.D. 2001. Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J Mol Biol* 306: 1037-58.
- Magnet, S. und Blanchard, J.S. 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 105: 477-98.
- Mandt, C. 2008. Biosynthesen von Aminoglycosidantibiotika: Glycosyltransferasen und Deacetylasen. Dissertation Bergische Universität Wuppertal, Wuppertal.
- Manuvakhova, M., Keeling, K. und Bedwell, D.M. 2000. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *Rna* 6: 1044-55.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N. und Bryant, S.H. 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* 37: D205-10.

- Marchler-Bauer, A. und Bryant, S.H. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* 32: W327-31.
- Marta, A.P., Roberto, O.G., María, J.A. und Carlos, M.A. 2009. Bioremediation of chromium(VI) contaminated soil by *Streptomyces* sp. MC1. *Journal of Basic Microbiology* 49: 285-292.
- McCarthy, A.J. und Williams, S.T. 1992. *Actinomycetes* as agents of biodegradation in the environment -- a review. *Gene* 115: 189-192.
- McEnroe, A.S. und Taber, H.W. 1984. Correlation between cytochrome aa3 concentrations and streptomycin accumulation in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 507-12.
- Mehling, A., Wehmeier, U.F. und Piepersberg, W. 1995. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS Microbiol Lett* 128: 119-25.
- Mehta, P.K., Hale, T.I. und Christen, P. 1993. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem* 214: 549-61.
- Meller, J. und Elber, R. 2001. Linear programming optimization and a double statistical filter for protein threading protocols. *Proteins* 45: 241-61.
- Migueluez, E.M., Hardisson, C. und Manzanal, M.B. 2000. *Streptomyces*: a new model to study cell death. *Int Microbiol* 3: 153-8.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y. und Tulkens, P.M. 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 727-37.
- Mingeot-Leclercq, M.P. und Tulkens, P.M. 1999. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1003-12.
- Moazed, D. und Noller, H.F. 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 327: 389-94.
- Mori, T., Ichianagi, T., Kondo, H., Tokunaga, K. und Oda, T. 1971. Studies on new antibiotic lividomycins. II. Isolation and characterization of lividomycins A, B and other aminoglycosidic antibiotics produced by *Streptomyces lividus*. *J Antibiot (Tokyo)* 24: 339-46.
- Mühlenweg, A., Mandt, C., Clausnitzer, D., Wohlert, S.-E., Fischer, C., Pelzer, S., Piepersberg, W. und Wehmeier, U.F. eingereichtes Manuskript. Enzymatic and Mutational Analysis of Biosynthetic Steps in the Kanamycin Biosynthetic Pathway from *Streptomyces kanamyceticus* and *in vivo* Biosynthesis of new Kanamycins by Pathway Engineering.
- Murakami, T., Holt, T.G. und Thompson, C.J. 1989. Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 171: 1459-66.

- Nakamura, A., Urabe, I. und Okada, H. 1986. Anchimeric assistance in the intramolecular reaction of glucose-dehydrogenase-polyethylene glycol NAD conjugate. *J Biol Chem* 261: 16792-4.
- Nango, E., Kumasaka, T., Hirayama, T., Tanaka, N. und Eguchi, T. 2008. Structure of 2-deoxy-scylo-inosose synthase, a key enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics, in complex with a mechanism-based inhibitor and NAD<sup>+</sup>. *Proteins* 70: 517-27.
- Nepal, K.K., Oh, T.J. und Sohng, J.K. 2009. Heterologous production of paromamine in *Streptomyces lividans* TK24 using kanamycin biosynthetic genes from *Streptomyces kanamyceticus* ATCC12853. *Mol Cells* 27: 601-8.
- Neu, H.C. und Fu, K.P. 1978. 1-N HAPA gentamicin B, a new aminoglycoside active against gentamicin resistant isolates--activity compared to other aminoglycosides. *J Antibiot (Tokyo)* 31: 385-93.
- Ogawara, H., Aoyagi, N., Watanabe, M. und Urabe, H. 1999. Sequences and evolutionary analyses of eukaryotic-type protein kinases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 145 ( Pt 12): 3343-52.
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Tarry, M.J., Carter, A.P. und Ramakrishnan, V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* 292: 897-902.
- Ogle, J.M., Murphy, F.V., Tarry, M.J. und Ramakrishnan, V. 2002. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* 111: 721-32.
- Ogle, J.M. und Ramakrishnan, V. 2005. Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* 74: 129-77.
- Oh, S.H. und Chater, K.F. 1997. Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms. *J Bacteriol* 179: 122-7.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. und Horinouchi, S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* 190: 4050-60.
- Paget, M.S., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J. und Buttner, M.J. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 181: 204-11.
- Pape, T., Wintermeyer, W. und Rodnina, M.V. 2000. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol* 7: 104-7.
- Pauncz, J.K. 1978. Separation of nebramycin components by ion-exchange thin-layer chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* 1: 313.
- Piepersberg, W. 1992. Metabolism and cell individualization. Pages 294-299 in Chadwick, D., Whelan, J. und Widdows, K., eds. *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*. John Wiley & Sons.

- Piepersberg, W. 1993. Streptomycetes and Corynebacteria. Pages 433-468 in Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P., eds. *Biotechnology – Second Edition*. VCH-Verlag, Weinheim.
- Piepersberg, W. 1995. Streptomycin and related aminoglycosides. *Biotechnology* 28: 531-70.
- Piepersberg, W. 1997. Molecular biology, biochemistry, and fermentation of aminoglycoside antibiotics in Strohl, W.R., ed. *Biotechnology of Industrial Antibiotics – Second Edition*. Marcel-Dekker Inc., New York.
- Piepersberg, W., Aboshanab, K., Schmidt-Beißner, H. und Wehmeier, U.F. 2007. The Biochemistry and Genetics of Aminoglycoside Producers. Pages 15-118 in Arya, D.P., ed. *Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery* Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Piepersberg, W., Diaz-Guardamino Uribe, P.M., Stratmann, A., Thomas, H., Wehmeier, U.F. und Zhang, C.-S. 2002. Recent developments in the biosynthesis and regulation of aminoglycosides. Pages 27-41 in Fierro, F. und Martin, J.F., eds. *Microbial secondary metabolites: Biosynthesis, genetics and regulation* Research Signpost, Kerala (India).
- Piepersberg, W. und Distler, J. 1997. Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites– Second, Revised Edition. Pages 397-488 in Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P., eds. *Biotechnology*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Pöhling, S., Piepersberg, W. und Wehmeier, U.F. 1997. Protein secretion in *Streptomyces griseus* N2-3-11: characterization of the secA gene and its growth phase-dependent expression. *FEMS Microbiol Lett* 156: 21-9.
- Poletto, J.F., Allen, G.R., Jr. und Weiss, M.J. 1968. The mitomycin antibiotics. Synthetic studies. XX. N-substituted carbamoyl and acyl esters of a related 3-hydroxymethyl-4,7-indoloquinone. *J Med Chem* 11: 882-5.
- Polti, M.A., Garcia, R.O., Amoroso, M.J. und Abate, C.M. 2009. Bioremediation of chromium(VI) contaminated soil by *Streptomyces* sp. MC1. *J Basic Microbiol* 49: 285-92.
- Poole, K. 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 479-87.
- Popovic, B., Tang, X., Chirgadze, D.Y., Huang, F., Blundell, T.L. und Spencer, J.B. 2006. Crystal structures of the PLP- and PMP-bound forms of BtrR, a dual functional aminotransferase involved in butirosin biosynthesis. *Proteins* 65: 220-30.
- Prammananan, T., Sander, P., Brown, B.A., Frischkorn, K., Onyi, G.O., Zhang, Y., Bottger, E.C. und Wallace, R.J., Jr. 1998. A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J Infect Dis* 177: 1573-81.

- Preston, S.L. und Briceland, L.L. 1995. Single daily dosing of aminoglycosides. *Pharmacotherapy* 15: 297-316.
- Qazi, S., Middleton, B., Muharram, S.H., Cockayne, A., Hill, P., O'Shea, P., Chhabra, S.R., Camara, M. und Williams, P. 2006. N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 74: 910-9.
- Recht, M.I., Douthwaite, S., Dahlquist, K.D. und Puglisi, J.D. 1999a. Effect of mutations in the A site of 16 S rRNA on aminoglycoside antibiotic-ribosome interaction. *J Mol Biol* 286: 33-43.
- Recht, M.I., Douthwaite, S. und Puglisi, J.D. 1999b. Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *Embo J* 18: 3133-8.
- Richter, H.E. und Loewen, P.C. 1982. Catalase synthesis in *Escherichia coli* is not controlled by catabolite repression. *Arch Biochem Biophys* 215: 72-7.
- Rinehart, K.L., Jr. und Stroshane, R.M. 1976. Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)* 29: 319-53.
- Rosenberg, E.Y., Ma, D. und Nikaido, H. 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol* 182: 1754-6.
- Rossmann, M.G. und Argos, P. 1976. Exploring structural homology of proteins. *J Mol Biol* 105: 75-95.
- Rothe, G.M. 2002. Enzyme assays after gel electrophoresis. Pages 171-207 in Eienthal, R. und Danson, M.J., eds. *Enzyme Assays Second Edition*. Oxford University Press.
- Rougier, F., Claude, D., Maurin, M. und Maire, P. 2004. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Curr Drug Targets Infect Disord* 4: 153-62.
- Sambrook, J. und Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. und Wittinghofer, A. 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15: 430-4.
- Schägger, H. und von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-79.
- Schatz, A., Bugie, E. und Waksman, S.A. 1944. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 55: 66-69.
- Senior, K. 1999. Duchenne muscular dystrophy improved by gentamicin. *Mol Med Today* 5: 461.

- Shakya, T. und Wright, G.D. 2007. Mechanisms of Aminoglycoside Antibiotic Resistance. Pages 119-140 in Arya, D.P., ed. *Aminoglycoside Antibiotics*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. und Miller, G.H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57: 138-63.
- Shier, W.T., Rinehart, K.L., Jr. und Gottlieb, D. 1969. Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63: 198-204.
- Skeggs, P.A., Holmes, D.J. und Cundliffe, E. 1987. Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other *actinomycetes*. *J Gen Microbiol* 133: 915-23.
- Solomon, B. und Shinitzky, M. 1977. Comparative fluorescence studies of native and crosslinked glucose oxidase. *Biopolymers* 16: 1853-62.
- Sonenshein, A.L. 2000. Bacterial sporulation: a response to environmental signals. Pages 199-215 in Storz, G. und Hengge-Aronis, R., eds. *Bacterial Stress Responses*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. und Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 47: 479-491.
- Stark, W.M., Hoehn, M.M. und Knox, N.G. 1967. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. I. Detection and biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 7: 314-23.
- Stetefeld, J., Jenny, M. und Burkhard, P. 2006. Intersubunit signaling in glutamate-1-semialdehyde-aminomutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13688-93.
- Stowe, R.P., Koenig, D.W., Mishra, S.K. und Pierson, D.L. 1995. Nondestructive and continuous spectrophotometric measurement of cell respiration using a tetrazolium-formazan microemulsion. *Journal of microbiological methods*. 22: 283.
- Studier, F.W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41: 207-34.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-30.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 60-89.
- Subba, B., Kharel, M.K., Lee, H.C., Liou, K., Kim, B.G. und Sohng, J.K. 2005. The ribostamycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces ribosidificus*: comparison with butirosin biosynthesis. *Mol Cells* 20: 90-6.
- Tabor, S. und Richardson, C.C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 1074-8.

- Takano, E., White, J., Thompson, C.J. und Bibb, M.J. 1995. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* 166: 133-7.
- Tamegai, H., Nango, E., Kuwahara, M., Yamamoto, H., Ota, Y., Kuriki, H., Eguchi, T. und Kakinuma, K. 2002. Identification of L-glutamine: 2-deoxy-scyllo-inosose aminotransferase required for the biosynthesis of butirosin in *Bacillus circulans*. *J Antibiot (Tokyo)* 55: 707-14.
- Tartoff, K.D. und Hobbs, C.A. 1987. Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones. *Bethesda Res. Lab.* 9: 12-14.
- Tatsuta, K., Kitazawa, E. und Umezawa, S. 1967. Studies of antibiotics and related substances. XXXII. Syntheses of neamine and its analogue. *Bull Chem Soc Jpn* 40: 2371-5.
- Tatusova, T.A. und Madden, T.L. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 174: 247-50.
- Testa, R.T. und Tilley, B.C. 1976. Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis: II. Gentamicin. *J Antibiot (Tokyo)* 29: 140-6.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-80.
- Thuy, M.L., Kharel, M.K., Lamichhane, R., Lee, H.C., Suh, J.W., Liou, K. und Sohng, J.K. 2005. Expression of 2-deoxy-scyllo-inosose synthase (kanA) from kanamycin gene cluster in *Streptomyces lividans*. *Biotechnol Lett* 27: 465-70.
- Tok, J.B., Dunn, L.J. und Des Jean, R.C. 2001. Binding of dimeric aminoglycosides to the HIV-1 rev responsive element (RRE) RNA construct. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 1127-31.
- Truman, A.W., Huang, F., Llewellyn, N.M. und Spencer, J.B. 2007. Characterization of the enzyme BtrD from *Bacillus circulans* and revision of its functional assignment in the biosynthesis of butirosin. *Angew Chem Int Ed Engl* 46: 1462-4.
- Uchida, K. und Seino, A. 1997. Intra- and Intergeneric Relationships of Various Actinomycete Strains Based on the Acyl Types of the Muramyl Residue in Cell Wall Peptidoglycans Examined in a Glycolate Test. *Int J Syst Bacteriol* 47: 182-190.
- Umezawa, H., Okanishi, M., Kondo, S., Hamana, K., Utahara, R., Maeda, K. und Mitsuhashi, S. 1967. Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. *Science* 157: 1559-61.
- Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, R., Osato, Y., Nitta, K. und Takeuchi, T. 1957. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J Antibiot (Tokyo)* 10: 181-8.

- Umezawa, H., Umezawa, S., Tsuchiya, T. und Okazaki, Y. 1971. 3',4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot (Tokyo)* 24: 485-7.
- Urabe, H., Aoyagi, N., Ogawara, H. und Motojima, K. 2008. Expression and characterization of the *Streptomyces coelicolor* serine/threonine protein kinase PkaD. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 778-85.
- Urban, A.W. und Craig, W.A. 1997. Daily dosage of aminoglycosides. *Curr Clin Top Infect Dis* 17: 236-55.
- Vaishnav, P., Randev, S., Jatiani, S., Aggarwal, S., Keharia, H., Vyas, P.R., Nareshkumar, G. und Archana, G. 2000. Characterization of carbamoyl phosphate synthetase of *Streptomyces* spp. *Indian J Exp Biol* 38: 931-5.
- Vakulenko, S.B. und Mobashery, S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 16: 430-50.
- Vazquez, M.A., Munoz, F., Donoso, J. und Garcia Blanco, F. 1991. Spectroscopic study of the Schiff bases of dodecylamine with pyridoxal 5'-phosphate and 5'-deoxypyridoxal. A model for the Schiff bases of pyridoxal 5'-phosphate in biological systems. *Biochem J* 279 ( Pt 3): 759-67.
- Vicens, Q. und Westhof, E. 2001. Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure* 9: 647-58.
- Volff, J.N. und Altenbuchner, J. 2000. A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett* 186: 143-50.
- Volff, J.N., Eichenseer, C., Viell, P., Piendl, W. und Altenbuchner, J. 1996. Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. *Mol Microbiol* 21: 1037-47.
- Wagner, K.R., Hamed, S., Hadley, D.W., Gropman, A.L., Burstein, A.H., Escolar, D.M., Hoffman, E.P. und Fischbeck, K.H. 2001. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 49: 706-11.
- Waksman, S.A. und Lechevalier, H.A. 1949. Neomycin, a New Antibiotic Active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms. *Science* 109: 305-307.
- Walker, J.B. 1990. Possible evolutionary relationships between streptomycin and bluensomycin biosynthetic pathways: detection of novel inositol kinase and O-carbamoyltransferase activities. *J Bacteriol* 172: 5844-51.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. und Gay, N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* 1: 945-51.

- Wehmeier, U.F. 1991. Das *sor*-Operon aus *Klebsiella pneumoniae*. Molekulargenetische Analysen zur Struktur und Funktion der Gene und Genprodukte. Dissertation Universität Osnabrück, Osnabrück.
- Wehmeier, U.F. 1995. New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors allowing blue-white screening on XGal plates. *Gene* 165: 149-50.
- Wehmeier, U.F. und Piepersberg, W. 2009. Enzymology of aminoglycoside biosynthesis-deduction from gene clusters. *Methods Enzymol* 459: 459-91.
- Wellington, E.M., Stackebrandt, E., Sanders, D., Wolstrup, J. und Jorgensen, N.O. 1992. Taxonomic status of *Kitasatosporia*, and proposed unification with *Streptomyces* on the basis of phenotypic and 16S rRNA analysis and emendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. *Int J Syst Bacteriol* 42: 156-60.
- Wierenga, R.K., Terpstra, P. und Hol, W.G. 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* 187: 101-7.
- Wirmer, J. und Westhof, E. 2006. Molecular contacts between antibiotics and the 30S ribosomal particle. *Methods Enzymol* 415: 180-202.
- Wright, F. und Bibb, M.J. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113: 55-65.
- Xu, H., Heide, L. und Li, S.M. 2004. New aminocoumarin antibiotics formed by a combined mutational and chemoenzymatic approach utilizing the carbamoyltransferase NovN. *Chem Biol* 11: 655-62.
- Yamauchi, N. und Kakinuma, K. 1992. Confirmation of in vitro synthesis of 2-deoxy-scyllo-inosose, the earliest intermediate in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine, using cell free preparations of *Streptomyces fradiae*. *J Antibiot (Tokyo)* 45: 774-80.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-19.
- Yim, G., Wang, H.H. und Davies, J. 2006. The truth about antibiotics. *Int J Med Microbiol* 296: 163-70.
- Yim, G., Wang, H.H. und Davies, J. 2007. Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362: 1195-200.
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H. und Arakawa, Y. 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362: 1888-93.
- Yokoyama, K., Kudo, F., Kuwahara, M., Inomata, K., Tamegai, H., Eguchi, T. und Kakinuma, K. 2005. Stereochemical recognition of doubly functional aminotransferase in 2-deoxystreptamine biosynthesis. *J Am Chem Soc* 127: 5869-74.

- Yokoyama, K., Numakura, M., Kudo, F., Ohmori, D. und Eguchi, T. 2007. Characterization and mechanistic study of a radical SAM dehydrogenase in the biosynthesis of butirosin. *J Am Chem Soc* 129: 15147-55.
- Yokoyama, K., Ohmori, D., Kudo, F. und Eguchi, T. 2008a. Mechanistic study on the reaction of a radical SAM dehydrogenase BtrN by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 47: 8950-60.
- Yokoyama, K., Yamamoto, Y., Kudo, F. und Eguchi, T. 2008b. Involvement of two distinct N-acetylglucosaminyltransferases and a dual-function deacetylase in neomycin biosynthesis. *Chembiochem* 9: 865-9.
- Young, M.L., Bains, M., Bell, A. und Hancock, R.E. 1992. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2566-8.
- Yu, Y., Hou, X., Ni, X. und Xia, H. 2008. Biosynthesis of 3'-deoxy-carbamoylkanamycin C in a *Streptomyces tenebrarius* mutant strain by tacB gene disruption. *J Antibiot (Tokyo)* 61: 63-9.
- Zhanel, G.G. und Craig, W.A. 1994. Pharmacokinetic contributions to postantibiotic effects. Focus on aminoglycosides. *Clin Pharmacokinet* 27: 377-92.

## 7 Anhang

### 7.1 Aminosäuresequenzvergleich der „Q“-Oxidoreduktasen

Aminosäuresequenzvergleich der Oxidoreduktasen LivQ, ParQ, RibQ und NeoQ mit dem Onlineprogramm Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>; Corpet, 1988):

Bei mehr als 90 %iger Übereinstimmung sind die Aminosäuren rot und bei mehr als 50 % in blau geschrieben. Gelb unterlegt ist das von Kleiger und Eisenberg (2002) beschriebene Consensus-Motiv **V/IXGX<sub>1-2</sub>GXXGXXXG/A**, und grau unterlegt sind beim Vergleich untereinander fehlende AS-Reste.

Die Konsensussymbole: ! = I oder V, \$ = L oder M, % = F oder Y, # = N,D,Q,E,B oder Z

	1				50
LivQ	<i>ME</i> RLRGPSPL	ENTT <i>AR</i> HPPAP	<i>LG</i> PAHRDGL <i>E</i>	PGT <i>ADR</i> VWDV	<i>CV</i> IGSGASGA
ParQ	<i>ME</i> HLRGPSPL	ANPG <i>AR</i> HPEL	<i>LG</i> PAHRDGF <i>G</i>	DEA <i>ADR</i> VWDV	<i>CV</i> IGSGASGA
NeoQ	<i>MK</i> RLRGTLPS	DARH <i>AW</i> HPEP	<i>LG</i> PAHRD <i>G</i> WD	TRDD <i>DR</i> VWDV	<i>VV</i> IGSGASGS
RibQ	<i>MK</i> GLRGTLPS	DARH <i>AW</i> HPEP	<i>LG</i> PAHRD <i>G</i> WD	SRDD <i>DR</i> VWDV	<i>VV</i> IGSGASGS
Consensus	<i>Mer</i> LRGpsPl	.n..ArH <i>P</i> ep	<i>LG</i> PAHRD <i>G</i> ..	... <i>a</i> DRVWDV	<i>CV</i> IGSGASGA
	51				100
LivQ	<i>VA</i> ADRLVRQ <i>G</i>	<i>LD</i> VLMVEEGF	<i>RL</i> APHVGLDE	<i>AE</i> SLSRQALA	<i>RD</i> GEGNWTDE
ParQ	<i>VA</i> ADRLVRQ <i>G</i>	<i>LD</i> VLMVEEGF	<i>RL</i> AGHVDLDE	<i>AE</i> TLCRQAVA	<i>RD</i> DEGNWTDE
NeoQ	<i>VA</i> ADRLVRQ <i>G</i>	<i>LD</i> VLMIEEGF	<i>RL</i> SPDLGNPE	<i>LD</i> DMC <i>R</i> TALA	<i>RD</i> GQGGWTDE
RibQ	<i>VA</i> ADRLVRQ <i>G</i>	<i>LD</i> VLMVEEGF	<i>RL</i> SPHLGNPE	<i>LD</i> NMC <i>R</i> TALA	<i>RD</i> ADGGWTDQ
Consensus	<i>VA</i> ADRLVRQ <i>G</i>	<i>LD</i> VLM!EEGF	<i>RL</i> aphv <i>gl</i> de	<i>a</i> #.\$c <i>R</i> qALA	<i>RD</i> g#GnWTD#
	101				150
LivQ	<i>GW</i> PWTTSNLG	<i>GG</i> TVYYGGAS	<i>FR</i> YRPFDFDP	<i>GE</i> LVHTDGVD	<i>VR</i> WPYTLADL
ParQ	<i>GW</i> PWTTSNLG	<i>GG</i> TVFYGGAS	<i>FR</i> YQPFDFDP	<i>GT</i> LIDTGTTE	<i>VR</i> WPYTLAEL
NeoQ	<i>GW</i> PWTTSNLG	<i>GG</i> TVFYGGAS	<i>WR</i> YRPFDFDP	<i>SE</i> LVDAGGLD	<i>VR</i> WPYGLAEL
RibQ	<i>GW</i> PWTTSNLG	<i>GG</i> TVFYGGAS	<i>WR</i> YRPFDFDP	<i>SE</i> LIDVGDLD	<i>VR</i> WPYGLPEL
Consensus	<i>GW</i> PWTTSNLG	<i>GG</i> TV%YGGAS	<i>fr</i> YrPFDFDP	<i>ge</i> L!dt <i>g</i> g.#	<i>VR</i> WPYtLa#L
	151				200
LivQ	<i>VP</i> YYEVLERR	<i>LG</i> VCGGDAPG	<i>IHR</i> GS <i>RH</i> SRG	<i>PA</i> HQPSPAAR	<i>VL</i> RAAGE <i>SL</i> G
ParQ	<i>AP</i> YYEVLERR	<i>LG</i> VCGGPPAE	<i>GS</i> NGARHSRG	<i>PA</i> HEPSAAAR	<i>VLY</i> TAGTSLG
NeoQ	<i>AP</i> YYDVLERR	<i>LG</i> VCGGEEGE	<i>G</i> -----SRG	<i>PA</i> HPPTAAAE	<i>VLY</i> EAGTALG
RibQ	<i>AP</i> YYDVLERR	<i>LG</i> VCGGEEGV	<i>G</i> -----SRG	<i>PA</i> HPPTAAAE	<i>ILY</i> EAGTALG
Consensus	<i>a</i> PYY#VLERR	<i>LG</i> VCGG...e	<i>g</i> ... <i>g</i> . <i>rh</i> SRG	<i>PA</i> H.PsaaAR	<i>!Ly</i> .AGt <i>s</i> LG
	201				250
LivQ	<i>YR</i> PFPTPLAI	<i>NR</i> DPHGGRAA	<i>CARD</i> SLCVSH	<i>LC</i> PTGAKGDV	<i>VAV</i> FLAPLAA
ParQ	<i>YK</i> PFPTPLAI	<i>NR</i> DPYEGRAG	<i>CDR</i> VSLCVSH	<i>AC</i> PTGAKGDV	<i>VAV</i> FLAPLAA
NeoQ	<i>YE</i> PFPTPLAI	<i>NR</i> HAHGGRSA	<i>CERN</i> SLCVSH	<i>QC</i> STGAKGDA	<i>VAV</i> FLAPLAA
RibQ	<i>YD</i> PFPTPLAV	<i>NR</i> HAHGGRSA	<i>CER</i> GTLCVSH	<i>QC</i> PPTAKGDA	<i>VAV</i> FLAPLAG
Consensus	<i>Y</i> .PFPTPLA!	<i>NR</i> DphgGRaa	<i>C</i> . <i>R</i> . <i>s</i> LCVSH	<i>.C</i> pTgAKGDv	<i>VAV</i> FLAPLAA
	251				300

LivQ	<i>HPNFALRTGV</i>	<i>RALRLEQDRS</i>	<i>GEVA AVRCLD</i>	<i>RQTGQAHRVR</i>	<i>ARVYVACNA</i>
ParQ	<i>HPNFMLRTGV</i>	<i>RAVRLEQNRT</i>	<i>GEVSALRCLD</i>	<i>RVSGQTREVR</i>	<i>ARAFVLACNA</i>
NeoQ	<i>HPNF<sup>T</sup>LRTGV</i>	<i>RALRLNQDRP</i>	<i>DAVGSVTCLD</i>	<i>RLGRTTHRVR</i>	<i>ARSFVACNA</i>
RibQ	<i>HSNF<sup>T</sup>LRTGM</i>	<i>RALRLDQDRP</i>	<i>DAVTSATCLD</i>	<i>RLSRRTH<sup>T</sup>IR</i>	<i>ARSFVACNA</i>
Consensus	<i>HpNF.LRTGv</i>	<i>RALRL#Q#R.</i>	<i>gev.avrCLD</i>	<i>R.sgqthr!R</i>	<i>AR.%VvACNA</i>
	301				350
LivQ	<i>IQSAALLLRS</i>	<i>RTPYSPDGVG</i>	<i>NHSHLVGRGL</i>	<i>CMKLSEYL<sup>L</sup>SG</i>	<i>TVDA-DPAVL</i>
ParQ	<i>IQTAAALLLRS</i>	<i>RTAYSPSGVG</i>	<i>NHSGLVGRGL</i>	<i>CVKLSEYVSG</i>	<i>VVQA-APEVL</i>
NeoQ	<i>IQSAALLLRS</i>	<i>RGGRAPDGVG</i>	<i>NHSGLVGRGL</i>	<i>TMKLSEYVSG</i>	<i>VVDAPSAATL</i>
RibQ	<i>IQTAAALLLRS</i>	<i>RGGHAP<sup>E</sup>GVG</i>	<i>NHSGLVGRGL</i>	<i>TMKLSEYVSG</i>	<i>FVEAPAGLTL</i>
Consensus	<i>IQsAALLLRS</i>	<i>Rt.ySpDgVG</i>	<i>NHSGLVGRGL</i>	<i>cmKLSEYvSG</i>	<i>vv#A.apavL</i>
	351				400
LivQ	<i>ADPYTNTGPF</i>	<i>STVAFLDHYL</i>	<i>DPDCPGGFGG</i>	<i>LIYESKRDQR</i>	<i>HKLVD<sup>A</sup>LEL</i>
ParQ	<i>ADPDVHKGPF</i>	<i>STVAFLDHYL</i>	<i>DEDCPTGVGG</i>	<i>LIYESKRDRA</i>	<i>PKLVRDALEL</i>
NeoQ	<i>ADWRAHAGPF</i>	<i>STIAFLDHYL</i>	<i>DADCPTGVGG</i>	<i>MIYESKNDMP</i>	<i>SRIRD<sup>D</sup>VLEL</i>
RibQ	<i>ADWRAHTGPF</i>	<i>STIAFLDHYL</i>	<i>DPDCPTGVGG</i>	<i>MIYESKNDMP</i>	<i>ERFRD<sup>D</sup>VLEL</i>
Consensus	<i>ADp..<sup>ht</sup>GPF</i>	<i>ST!AFLDHYL</i>	<i>DpDCPtGvGG</i>	<i>\$IYESKRD..</i>	<i>.klv.DaLEL</i>
	401				450
LivQ	<i>RIETILADHP</i>	<i>NLDNRVGLST</i>	<i>HLDEDGMPAV</i>	<i>VIDYTPDPRD</i>	<i>LDRLRYMTGR</i>
ParQ	<i>RIETILSDHP</i>	<i>NLDNRVGLSR</i>	<i>YVDEDGLPAI</i>	<i>VDYRTDPRD</i>	<i>QARLRYMTGR</i>
NeoQ	<i>RIETILADHP</i>	<i>NLDNRVRLSS</i>	<i>HADEDGVPAV</i>	<i>VIDYTPDPRD</i>	<i>LRRLAYMTDV</i>
RibQ	<i>RIETILADHP</i>	<i>NLDNRVRLSH</i>	<i>HVDEDGVPAV</i>	<i>VIDYTPDPRD</i>	<i>LRRLTYMTDR</i>
Consensus	<i>RIETILaDHP</i>	<i>NLDNRVgLS.</i>	<i>hvDEDG.PA!</i>	<i>ViDYtpDPRD</i>	<i>l.RLrYMTgr</i>
	451				500
LivQ	<i>CERLLRTAGA</i>	<i>RGIRSRSTGF</i>	<i>AQGSSHLHGT</i>	<i>CRAGHDPARS</i>	<i>VVD<sup>A</sup>WGRVHS</i>
ParQ	<i>CERLLRAAGA</i>	<i>DGIRHKATGF</i>	<i>AQGSSHLHGT</i>	<i>CRAGDDPARS</i>	<i>VVDG<sup>W</sup>GRVHS</i>
NeoQ	<i>CERLLRKAGA</i>	<i>TGIAHEESGF</i>	<i>AQGSCHLHGT</i>	<i>CRAGDDPATS</i>	<i>VVDG<sup>W</sup>GRVHS</i>
RibQ	<i>CEQLLRQAGA</i>	<i>TGIEHEQSGF</i>	<i>AQGSCHLHGT</i>	<i>CRAGDDPATS</i>	<i>VVDG<sup>W</sup>GRVHS</i>
Consensus	<i>CeRLLR.AGA</i>	<i>.Girh..<sup>t</sup>GF</i>	<i>AQGSsHLHGT</i>	<i>CRAGdDPArS</i>	<i>VVDg<sup>W</sup>GRVHS</i>
	501				547
LivQ	<i>ADNVYIVDGS</i>	<i>FMPYPGGLNP</i>	<i>TLTIQAHALR</i>	<i>TSRAIASHLA</i>	<i>ADRAAHV</i>
ParQ	<i>ADNVYVVDGS</i>	<i>FMPYPGGLNP</i>	<i>TLTIQAHALR</i>	<i>TSKAVASQLA</i>	<i>APHAAHA</i>
NeoQ	<i>APNVYVVDGG</i>	<i>FMPYPGGLNP</i>	<i>TLTIQAHALR</i>	<i>SAKAVAGDLV</i>	<i>SRHTAHV</i>
RibQ	<i>ALNVYVVDGS</i>	<i>FMPYPGGLNP</i>	<i>TLTIQAHALR</i>	<i>SARAVAGDLV</i>	<i>SRHAVHV</i>
Consensus	<i>AdNVY!VDGS</i>	<i>FMPYPGGLNP</i>	<i>TLTIQAHALR</i>	<i>tsrA!As.La</i>	<i>a.haaHv</i>

## 7.2 Aminosäuresequenzvergleich der „B“-Aminotransferasen

Aminosäuresequenzvergleich der Aminotransferasen LivB, ParB, RibB und NeoB mit dem Onlineprogramm Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>; Corpet, 1988):

Bei mehr als 90 %iger Übereinstimmung sind die Aminosäuren rot und bei mehr als 50 % in blau geschrieben. Grün unterlegt ist der spezifische und hochkonservierte Lysin-Rest zur Bildung der „Schiff-Base“ mit dem Co-Faktor PLP. Und grau unterlegt sind Inhibitor-Co-Faktor Bindestellen die im Falle eines Dimers Bindetaschen bilden würden.

Die Konsensussymbole: ! = I oder V, \$ = L oder M, % = F oder Y, # = N,D,Q,E,B oder Z

	1				50
LivB	<i>MT</i> <b>NSSTLAE</b>	<i>KPT</i> <b>CPKDADG</b>	<i>NP</i> <b>RIFTAARG</b>	<i>AR</i> <b>LTD</b> RAGKE	<i>WID</i> <b>FDN</b> ARGS
ParB	<i>MT</i> <b>QNFATLAE</b>	<i>IPT</i> <b>CPRNAEG</b>	<i>NP</i> <b>RVFVSASG</b>	<i>AY</i> <b>VTDD</b> AGKR	<i>WID</i> <b>FDN</b> TRGS
NeoB	<i>MT</i> <b>KNSLLAE</b>	<i>FPT</i> <b>CPRDEKD</b>	<i>RPR</i> <b>VFTAASG</b>	<i>AW</i> <b>LTD</b> ESGFR	<i>WID</i> <b>FDN</b> ARGS
RibB	<i>MT</i> <b>ENSSLLAE</b>	<i>FPT</i> <b>CPRDVQD</b>	<i>RPR</i> <b>VFTSASG</b>	<i>AY</i> <b>VTDK</b> SGFC	<i>WID</i> <b>FDN</b> ARGS
Consensus	<i>MT</i> <b>.NsstLAE</b>	<i>.PTC</i> <b>Pr#a.g</b>	<i>nPR</i> <b>!FtaAsG</b>	<i>AylTD</i> <b>.aGkr</b>	<i>WID</i> <b>FDN</b> aARGS
	51				100
LivB	<i>VVL</i> <b>GHADPEI</b>	<i>AE</i> <b>AVARAASG</b>	<i>AAG</i> <b>TATGWSP</b>	<i>LV</i> <b>DTVAD</b> RLL	<i>AL</i> <b>CGGEV</b> VGL
ParB	<i>VLL</i> <b>GHGDPEV</b>	<i>AE</i> <b>AVGRAATG</b>	<i>AL</i> <b>GTATGWSP</b>	<i>LL</i> <b>DTVTS</b> RLL	<i>EL</i> <b>CGGEV</b> VGL
NeoB	<i>ILL</i> <b>GHGDPVV</b>	<i>AE</i> <b>AVARAATG</b>	<i>AD</i> <b>GTATGWSR</b>	<i>RVD</i> <b>AVLER</b> LH	<i>AL</i> <b>CGGEV</b> VGL
RibB	<i>IVL</i> <b>GHGDPRV</b>	<i>VE</i> <b>AVGRAATG</b>	<i>AD</i> <b>GTATGWSP</b>	<i>RVD</i> <b>AVLER</b> LH	<i>AL</i> <b>CGGEV</b> VGL
Consensus	<i>!LL</i> <b>GHgDPe!</b>	<i>ae</i> <b>AVaRAATg</b>	<i>A.GT</i> <b>ATGWSp</b>	<i>lvDtV</i> <b>..RlL</b>	<i>aL</i> <b>CGGEV</b> VGL
	101				150
LivB	<i>FRT</i> <b>GTSAVRA</b>	<i>AV</i> <b>LAVRESVG</b>	<i>RPL</i> <b>VLSSGYH</b>	<i>GY</i> <b>DPMWY</b> PPH	<i>EP</i> <b>LEPNADGI</b>
ParB	<i>FRT</i> <b>GTSAVRA</b>	<i>AV</i> <b>LAVREAVG</b>	<i>APL</i> <b>VLSSGYH</b>	<i>GY</i> <b>DPMWY</b> PAK	<i>AP</i> <b>FEPNADGI</b>
NeoB	<i>FR</i> <b>SGTAAVRA</b>	<i>AV</i> <b>LAVREATG</b>	<i>RPL</i> <b>LLSAGYH</b>	<i>GY</i> <b>DPMWY</b> PSE	<i>AP</i> <b>LEPNADGV</b>
RibB	<i>FR</i> <b>SGTAAVRA</b>	<i>AG</i> <b>LAVREATG</b>	<i>RPL</i> <b>LVSAGYH</b>	<i>GY</i> <b>DPMWY</b> PSD	<i>AP</i> <b>LVPNADGV</b>
Consensus	<i>Frt</i> <b>GTsAVRA</b>	<i>Av</i> <b>LAVREavG</b>	<i>rPLv</i> <b>lSsGYH</b>	<i>GYDPMWYP</i> <b>..</b>	<i>aPl</i> <b>ePNADG!</b>
	151				200
LivB	<i>VDF</i> <b>FYDLDLL</b>	<i>AG</i> <b>LLRD</b> -RDR	<i>IA</i> <b>AVVISPDH</b>	<i>MHL</i> <b>TPGWYAR</b>	<i>AR</i> <b>ALLADAGV</b>
ParB	<i>VDF</i> <b>FFDL</b> DVL	<i>AG</i> <b>LLRDG</b> RER	<i>VA</i> <b>AVVSPDH</b>	<i>MHL</i> <b>SPRWYER</b>	<i>AR</i> <b>ALLAEAAV</b>
NeoB	<i>VDF</i> <b>FFDL</b> GLL	<i>RE</i> <b>LLRA</b> -PER	<i>VA</i> <b>AVVSPDH</b>	<i>MHL</i> <b>SPGWYRE</b>	<i>L</i> <b>RRLCSAAGV</b>
RibB	<i>VDF</i> <b>FFDL</b> GLL	<i>A</i> <b>ELLAA</b> -PER	<i>VA</i> <b>AVVSPDH</b>	<i>MHL</i> <b>SAAWYRE</b>	<i>L</i> <b>RQLCSAAGV</b>
Consensus	<i>VDF</i> <b>F%DL</b> dLL	<i>ag</i> <b>LLrd</b> .r#R	<i>!AAV</i> <b>!SPDH</b>	<i>MHL</i> <b>spgWY</b> .r	<i>aRa</i> <b>Lla</b> .AgV
	201				250
LivB	<i>PL</i> <b>IV</b> DEVKVG	<i>LRY</i> <b>G</b> PGLSTA	<i>DLL</i> <b>DADVWV</b>	<i>AK</i> <b>G</b> MANGYPT	<i>AAV</i> <b>G</b> SRTLL
ParB	<i>PL</i> <b>IV</b> DEVKVG	<i>LRY</i> <b>G</b> PGLSTA	<i>GLL</i> <b>DADVWV</b>	<i>AK</i> <b>G</b> VANGFPT	<i>AAV</i> <b>G</b> SRTLL
NeoB	<i>V</i> <b>LVA</b> DEVKVG	<i>LRY</i> <b>A</b> PGLSTA	<i>E</i> <b>LL</b> APDVWV	<i>AK</i> <b>G</b> MANGHAV	<i>SAV</i> <b>G</b> SRRLL
RibB	<i>V</i> <b>L</b> IADEVKVG	<i>LRY</i> <b>S</b> PGLSTA	<i>E</i> <b>LL</b> NPDVWV	<i>AK</i> <b>G</b> MANGHAV	<i>SAV</i> <b>G</b> PRALL
Consensus	<i>pL</i> <b>!v</b> DEVKVG	<i>LRY</i> <b>g</b> PGLSTA	<i>.LL</i> <b>d</b> ADVWV	<i>AK</i> <b>G</b> mANG.pt	<i>aAV</i> <b>G</b> sRtLL
	251				300
LivB	<i>KPL</i> <b>REVS</b> FTS	<i>FF</i> <b>EPT</b> VLAAA	<i>ERT</i> <b>L</b> ARVATG	<i>AP</i> <b>Q</b> RTVREAG	<i>ER</i> <b>F</b> LTHARKS
ParB	<i>KPL</i> <b>REVS</b> YTS	<i>FF</i> <b>EPT</b> VLAAA	<i>ERT</i> <b>L</b> ARVATG	<i>EP</i> <b>Q</b> RTVRETG	<i>DL</i> <b>F</b> VEHARSA
NeoB	<i>KPL</i> <b>KEVS</b> FTS	<i>FF</i> <b>EPT</b> ILAAA	<i>DA</i> <b>A</b> LARVATG	<i>EP</i> <b>Q</b> RAVREAG	<i>DR</i> <b>F</b> L RHARKA
RibB	<i>RPL</i> <b>KEVS</b> FTS	<i>FF</i> <b>EPT</b> ILAAA	<i>DA</i> <b>V</b> LSRVATG	<i>EP</i> <b>Q</b> RALREAG	<i>DR</i> <b>F</b> LCHARKA
Consensus	<i>kPL</i> <b>r</b> EVs%TS	<i>FF</i> <b>EPT</b> !LAAA	<i>#rt</i> <b>L</b> aRVATG	<i>eP</i> <b>Q</b> rtvREAg	<i>#r</i> <b>F</b> L.HARka

	301		350
LivB	<i>LAGAGLPVEL</i>	<i>AGDGSFFQFV</i>	<i>AATRELEKAL</i> <i>WWATEDEGLL</i> <i>FYRGDNQAVS</i>
ParB	<i>LAAASLPLEV</i>	<i>AGNGTFFQFV</i>	<i>PATREVKKAF</i> <i>YKATEEEGLL</i> <i>FYRNDNQAVS</i>
NeoB	<i>LDDASLPVEI</i>	<i>AGDGTFFQFV</i>	<i>PATEELEAL</i> <i>YGAANAEGLL</i> <i>FYAGDNQGV</i>
RibB	<i>LQDAALPVEI</i>	<i>AGDGTFFQFV</i>	<i>PASEELEYAF</i> <i>YAAANTEGLL</i> <i>FYAGDNQGV</i>
Consensus	<i>La.AsLPvE.</i>	<i>AG#GtFFQFV</i>	<i>pAtrElekaI</i> <i>y.At#.EGLL</i> <i>FYrgDNQaVS</i>
	351		400
LivB	<i>AAFDPDLDD</i>	<i>AEARFTRVCD</i>	<i>RLAPYASDAP</i> <i>VSEEARYLAA</i> <i>WNVIDGLRDA</i>
ParB	<i>AAFDPDLDD</i>	<i>ARARFSRVCD</i>	<i>RLAPFAAAGP</i> <i>VGEEARYQAA</i> <i>WSVMDGLREA</i>
NeoB	<i>AAFDEAVLGE</i>	<i>AERRFARVCE</i>	<i>RLAPYAGGEP</i> <i>VGDAARYRVA</i> <i>WNVMDGLRQA</i>
RibB	<i>AAFDDAVLTD</i>	<i>AEQRFTRVCD</i>	<i>RLSAYAGGEP</i> <i>VDEAARYRVA</i> <i>WNVMDGLREA</i>
Consensus	<i>AAFgpdVLd#</i>	<i>AearFtRVC#</i>	<i>RLap%A...P</i> <i>Vg#eARY.aA</i> <i>WnVmDGLR#A</i>
	401		417
LivB	<i>ARDDRTTREW</i>	<i>ISRLDD</i>	
ParB	<i>ERDARETREW</i>	<i>VDRFLDD</i>	
NeoB	<i>PRDREETTGL</i>	<i>LARLLDD</i>	
RibB	<i>ERDRAATDGM</i>	<i>LARLLDD</i>	
Consensus	<i>eRD.reTrew</i>	<i>..RLDD</i>	

---

## Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. W. Piepersberg für die Überlassung des interessanten Themas und für die Möglichkeit zur Promotion.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. U. F. Wehmeier für die stete Diskussionsbereitschaft sowie für die wertvollen Anregungen im Verlauf der experimentellen Arbeiten und beim Verfassen der Dissertation. Darüber hinaus bedanke ich mich bei PD Dr. Wehmeier und Prof. Dr. Piepersberg für die Übernahme der Gutachten.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. T. Stubbs an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, die engagiert an der Strukturaufklärung der Proteine LivB, NeoB, LivQ, NeoQ und TobZ arbeiten, und mir freundlicherweise erste Daten für die Diskussion zur Verfügung gestellt haben.

Allen Mitarbeitern der Fachgruppe Biologie im Fachbereich C der Bergischen Universität Wuppertal danke ich für das freundliche und produktive Arbeitsklima, insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. H. Mölleken bedanken.

Ein großer Dank geht an Yvonne Rockser, die mir erste Einblicke in die Arbeitsweise mit Streptomyceten gab, und immer hilfreiche praktische Ratschläge parat hatte.

Herzlich danke ich Dr. Nadine Merettig, die mit ihrer positiven Art für eine hervorragende Arbeitsatmosphäre sorgte, und mir während dieser Zeit auch eine Freundin geworden ist.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde Anne, Jana und Nico, die trotz der Entfernung für mich da sind und mir die Daumen drücken.

Ein ganz herzlicher Dank gebührt meiner Familie und der Familie meines Freundes.

Danke Ludwig für ganz viel Verständnis!

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Diana Clausnitzer

.....  
Wuppertal, im Februar 2010