

**Untersuchungen zur Biosynthese  
der Propylprolin-Untereinheit  
des Antibiotikums Lincomycin A  
aus *Streptomyces lincolnensis*.**

---

Dem Fachbereich Chemie der Bergischen Universität  
Gesamthochschule Wuppertal vorgelegte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.),

eingereicht von

Dipl.-Chem. Dietmar Neußer,  
geb. am 8. Mai 1969 in Wuppertal.

Wuppertal, im November 1999

## Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Wolfgang Piepersberg für die Überlassung des Themas dieser Arbeit zur weitgehend selbständigen Bearbeitung, sein stets offenes Ohr für wissenschaftliche Fragen jedweder Art und sein großes Interesse an den erreichten Ergebnissen danken.

Herrn Professor Dr. Günther Vogel danke ich für sein Einverständnis, das Koreferat über diese Arbeit zu übernehmen.

Bei Herrn Dr. Udo Wehmeier möchte ich mich für die Zeit und Geduld bedanken, die er mir für hilfreiche Diskussionen, Vermittlung wertvoller Anregungen und der Durchsicht dieser Arbeit gewidmet hat.

Alle Mitglieder des Lehrstuhls für Chemische Mikrobiologie schafften durch ständige Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit ein sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Dafür sei Ihnen herzlich gedankt.

Sven Thamm stand mir seit dem Hauptstudium mit seiner stets kritischen Meinung und seinem Rat zur Seite und hat durch seine ausgeprägte Kollegialität und natürlich durch unsere langen, erlebnisreichen Abende in Wuppertal und auf Tagungen nicht nur meine aufrichtige Dankbarkeit verdient, sondern auch unsere Freundschaft vertieft.

Danke auch meinem gesamten Freundeskreis für die gemeinsam verbrachte Zeit, in der ich mir Abwechslung und Ausgleich vom Laboralltag (sog. »kreative Pausen«) verschaffte.

Meiner Freundin Anja danke ich für ihr Verständnis und Toleranz, manche Dinge »rein naturwissenschaftlich« zu sehen, ihre stete Hilfsbereitschaft und vielen Bemühungen zum Thema »Arbeitsplatzsuche«.

Sabine: danke für's Korrekturlesen!

# Inhalt

|   |      |
|---|------|
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....                        | V    |
| <b>Tabellenverzeichnis</b> .....                          | VII  |
| <b>Abkürzungen</b> .....                                  | VIII |
| <b>Zusammenfassung</b> .....                              | X    |
| <b>Summary</b> .....                                      | XI   |
| <br>  |      |
| <b>1 Einleitung</b> .....                                 | 1    |
| 1.1 Allgemeine Merkmale von Streptomyceten.....           | 1    |
| 1.2 Antibiotika .....                                     | 2    |
| 1.3 Lincomycin und Lincosamide.....                       | 3    |
| 1.4 Biosynthese des Lincomycins .....                     | 7    |
| 1.5 Ziele dieser Arbeit.....                              | 14   |
| <br>  |      |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....                      | 15   |
| 2.1 Material .....  | 15   |
| 2.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....                     | 15   |
| 2.1.2 Klonierungsvektoren und rekombinante Plasmide ..... | 16   |
| 2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Kits.....                   | 19   |
| 2.1.4 Oligonukleotide .....                               | 20   |
| 2.1.5 Nährmedien .....                                    | 21   |
| 2.1.6 Antibiotika.....                                    | 23   |
| 2.1.7 Lösungen .....                                      | 23   |
| 2.1.8 Geräte .....  | 28   |
| 2.1.9 Computerprogramme .....                             | 29   |
| 2.2 Methoden.....   | 29   |

---

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 2.2.1    | Anzuchtbedingungen und Lagerung von Bakterienkulturen .....                        | 29 |
| 2.2.1.1  | Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> .....                                      | 29 |
| 2.2.1.2  | Anzucht und Lagerung von <i>Streptomyces</i> sp. ....                              | 29 |
| 2.2.1.3  | Anzucht und Lagerung von <i>Micrococcus luteus</i> .....                           | 30 |
| 2.2.2    | Isolierung von Nukleinsäuren .....   | 30 |
| 2.2.2.1  | Präparation von Plasmid-DNA.....   | 30 |
| 2.2.2.2  | Isolierung von chromosomaler DNA .....   | 31 |
| 2.2.2.3  | Isolierung von Gesamt-RNA.....   | 31 |
| 2.2.3    | <i>In vitro</i> Manipulation von DNA.....  | 31 |
| 2.2.4    | Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....                                    | 32 |
| 2.2.5    | Elution von DNA aus Agarosegelen .....   | 32 |
| 2.2.6    | Radioaktive und nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....              | 32 |
| 2.2.7    | Hybridisierung an immobilisierte Nukleinsäuren und Detektion .....                 | 32 |
| 2.2.8    | DNA-Sequenzierung .....  | 33 |
| 2.2.9    | Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR-Technik.....                               | 34 |
| 2.2.10   | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Streptomyceten-Protoplasten .... | 34 |
| 2.2.11   | Transformation von <i>E. coli</i> und Streptomyceten .....                         | 35 |
| 2.2.12   | Mutation von <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 .....                                | 35 |
| 2.2.13   | Plattendiffusionstests zur Bestimmung der Antibiotikaproduktion .....              | 35 |
| 2.2.14   | Komplementationen .....  | 36 |
| 2.2.14.1 | Genetische Komplementation .....   | 36 |
| 2.2.14.2 | Substratkomplementation.....   | 36 |
| 2.2.15   | Erzeugung eines Ts-resistenten <i>M. luteus</i> -Stammes .....                     | 37 |
| 2.2.16   | Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> und <i>S. lividans</i> .....            | 37 |
| 2.2.17   | Herstellung zellfreier <i>E. coli</i> und <i>S. lividans</i> -Extrakte.....        | 38 |
| 2.2.18   | Quantitative Proteinbestimmung.....  | 38 |
| 2.2.19   | Reinigung von His-tag•LmbB1 und His-tag•LmbY .....                                 | 38 |
| 2.2.20   | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....                               | 39 |
| 2.2.21   | Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot).....               | 39 |
| 2.2.22   | Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine.....                             | 40 |
| 2.2.23   | Enzymtestsystem für LmbB1 und Berechnung des $K_M$ -Wertes.....                    | 40 |
| 2.2.24   | Sauerstoffverbrauchsmessung der LmbB1-Aktivität.....                               | 41 |
| 2.2.25   | Bestimmung der Brenzkatechin-2,3-Dioxygenase (Xyle)-Aktivität.....                 | 41 |

---

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.2.26 | Enzymtest auf NADPH:F <sub>420</sub> -Reduktase-Aktivität .....   | 42 |
| 2.2.27 | Fütterung von <i>S. lincolnensis</i> mit <sup>14</sup> C-markiertem Tyrosin .....   | 43 |
| 3      | Ergebnisse .....  | 44 |
| 3.1    | Analyse der ersten zwei Schritte der Propylprolin-Biosynthese .....   | 44 |
| 3.1.1  | Allgemeine Eigenschaften der genetischen Umgebung von <i>lmbB1</i> .....  | 44 |
| 3.1.2  | Konstruktion von Plasmiden zur Expression von <i>lmbB1</i> und <i>lmbB2</i> .....   | 45 |
| 3.1.3  | <i>In vivo</i> Umsetzungen von L-DOPA und L-Tyrosin .....   | 48 |
| 3.1.4  | Heterologe Expression von <i>lmbB1</i> und <i>lmbB2</i> .....   | 51 |
| 3.1.5  | Ermittlung der Lagerungs- und Enzymtestbedingungen und Substratanaloga  | 52 |
| 3.1.6  | Reinigung von His-tag•LmbB1 .....   | 56 |
| 3.1.7  | Ermittlung des <i>K<sub>M</sub></i> -Wertes und der spezifischen Aktivitäten.....   | 58 |
| 3.1.8  | Messung des Sauerstoffverbrauchs .....  | 60 |
| 3.1.9  | Versuch der Analyse des Produktes einer Umsetzung von<br>L-DOPA durch LmbB1 .....   | 61 |
| 3.1.10 | As-Sequenzvergleich von LmbB1 mit McpII .....   | 62 |
| 3.2    | Charakterisierung des Gens <i>lmbY</i> .....  | 65 |
| 3.2.1  | Allgemeine Eigenschaften der genetischen Umgebung von <i>lmbY</i> .....   | 65 |
| 3.2.2  | Überprüfung verschiedener Bakterienstämme auf (a) die Anwesenheit von<br><i>lmbY</i> oder homologen Genen und (b) die Position von <i>lmbY</i> in den<br>Lincomycinproduzenten mit Hilfe von DNA-DNA-Hybridisierung ..... | 66 |
| 3.2.3  | Herstellung einer <i>lmbY</i> -Insertionsmutante von <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 ...   | 68 |
| 3.2.4  | Analyse der erzeugten Mutanten.....   | 70 |
| 3.2.5  | Komplementation der erzeugten Insertionsmutanten.....   | 74 |
| 3.2.6  | Produktion von löslichem LmbY und His-tag•LmbY.....   | 76 |
| 3.2.7  | Reinigung und Nachweis von His-tag•LmbY .....   | 79 |
| 3.2.8  | Versuch der Durchführung einer zweidimensionalen PAGE von LmbY .....  | 81 |
| 3.2.9  | Enzymtests auf NADPH:F <sub>420</sub> - und F <sub>420</sub> :PPL-Reduktase-Aktivität .....   | 83 |
| 3.2.10 | Substratkomplementation der <i>lmbY</i> -Insertionsmutanten von <i>S. lincolnensis</i> ..   | 87 |
| 3.2.11 | Versuche zur Bestimmung von Promotoraktivitäten oberhalb von <i>lmbY</i><br>und zur Transkriptanalyse .....   | 88 |
| 3.2.12 | Fütterungsexperimente mit <sup>14</sup> C-markiertem Tyrosin .....  | 90 |

---

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 4   | Diskussion.....  | 92  |
| 4.1 | Identifizierung der Funktionen von LmbB1 und LmbB2 .....   | 92  |
| 4.2 | Untersuchungen zur Charakterisierung von <i>lmbY</i> ..... | 98  |
| 5   | Literatur .....  | 109 |
|     | Anhänge.....   | 119 |
|     | Anhang 1. DNA-Sequenzen.....                               | 120 |
|     | Anhang 2. Klonierungsstrategien.....                       | 131 |
|     | Anhang 3. Plasmidkarten .....                              | 139 |

**Abbildungsverzeichnis**

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Abb. 1-1.</b>  | Isolierung von <i>Streptomyces lincolnensis</i> 78-11 [...].   | 5  |
| <b>Abb. 1-2.</b>  | Anordnung der Gene des <i>lmb/lmr</i> -Genclusters.  | 8  |
| <b>Abb. 1-3.</b>  | Hypothetischer Biosyntheseweg von Lm A.  | 11 |
| <b>Abb. 1-4.</b>  | Coenzym F <sub>420</sub> [...].  | 12 |
| <b>Abb. 1-5.</b>  | Postulierte Funktionen von LmbY.   | 13 |
| <b>Abb. 3-1.</b>  | Transkriptlängen und G+C-Gehalt im Bereich von <i>lmbB1</i> .  | 44 |
| <b>Abb. 3-2.</b>  | Schema des rekombinanten Plasmides pT7AdExAB12 [...].  | 45 |
| <b>Abb. 3-3.</b>  | Anzucht von <i>S. lividans</i> TK23-Transformanten auf SPMR-Agarplatten.   | 50 |
| <b>Abb. 3-4.</b>  | Darstellung der <i>S. lincolnensis</i> LmbB1- und LmbB2-Proteine in<br>Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen.   | 52 |
| <b>Abb. 3-5.</b>  | Versuche, die Aktivität des LmbB1-Enzyms in zellfreien Extrakten<br>zu stabilisieren.  | 53 |
| <b>Abb. 3-6.</b>  | Chemische Strukturen verschiedener Puffer, die für einen <i>in vitro</i><br>Enzymtest von LmbB1 erprobt wurden.  | 54 |
| <b>Abb. 3-7.</b>  | Bestimmung der optimalen Enzymtestbedingungen und Vorversuche<br>für die Reinigung von His-tag•LmbB1.  | 55 |
| <b>Abb. 3-8.</b>  | Substanzen, die Strukturelemente aufweisen, die ebenfalls in L-DOPA<br>zu finden sind.   | 56 |
| <b>Abb. 3-9.</b>  | Darstellung der Expression und Reinigung des His-tag•LmbB1-Proteins<br>in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel.   | 58 |
| <b>Abb. 3-10</b>  | Michaelis-Menten-Diagramm und Lineweaver-Burk-Auftragung eines<br>Enzymtests mit gereinigtem His-tag•LmbB1 und L-DOPA als Substrat.  | 59 |
| <b>Abb. 3-11.</b> | Messung des Sauerstoffverbrauchs der Umwandlung von L-DOPA<br>zu einer gelben Substanz durch LmbB1.  | 60 |
| <b>Abb. 3-12.</b> | Zwei übereinandergelegte UV/VIS-Spektren der Überstände von<br>Expressionskulturen <i>E. coli</i> JM109 (DE3)/pET16B1B2, die mit<br>L-DOPA bzw. L-Tyrosin supplementiert wurden. | 61 |
| <b>Abb. 3-13.</b> | Vergleich der As-Sequenzen von LmbB1 und McpII.  | 64 |
| <b>Abb. 3-14.</b> | Aufbau des Genclusters im Bereich von <i>lmbY</i> .  | 67 |
| <b>Abb. 3-15.</b> | Zerstörung der genomischen Genstruktur von <i>S. lincolnensis</i><br>NRRL 2936 durch homologe Rekombination [...].   | 69 |

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Abb. 3-16.</b> Darstellung der PCR-Produkte aus genomischer DNA der <i>lmbY</i> -Insertionsmutanten in Agarosegelen. ....  | 71  |
| <b>Abb. 3-17.</b> Nicht-radioaktive »Southern« Analyse von zehn <i>S. lincolnensis lmbY</i> -Insertionsmutanten. ....   | 72  |
| <b>Abb. 3-18.</b> Mögliche und tatsächliche Rekombinationsereignisse der genomischen DNA von <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 mit den rekombinanten Plasmiden pDNW25Z und pDNW25E. ....   | 73  |
| <b>Abb. 3-19.</b> Das <i>lmb/lmr</i> -Gencluster im Bereich von <i>lmbY</i> . ....  | 75  |
| <b>Abb. 3-20.</b> Darstellung des <i>S. lincolnensis</i> LmbY-Proteins in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli. ....   | 77  |
| <b>Abb. 3-21.</b> Schematische Darstellung des unterschiedlichen Aufbaus der <i>lmbY</i> -Expressionsplasmide und Vergleich der <i>lmbY</i> Shine-Dalgarno-Sequenzen der verwendeten Plasmide mit der Consensus-Sequenz von <i>E. coli</i> . .... | 78  |
| <b>Abb. 3-22.</b> Expression von <i>lmbY</i> und <i>his-tag•lmbY</i> in <i>S. lividans</i> TK23. ....   | 79  |
| <b>Abb. 3-23.</b> Reinigung von His-tag•LmbY. ....  | 80  |
| <b>Abb. 3-24.</b> »Western« Analyse von His-tag•LmbY. ....  | 80  |
| <b>Abb. 3-25.</b> Proteomanalysen von <i>S. lividans</i> TK23/pUWL201 und <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2 durch zweidimensionale Gelelektrophorese. ....  | 82  |
| <b>Abb. 3-26.</b> Mögliche Enzymaktivitäten von LmbY. ....  | 83  |
| <b>Abb. 3-27.</b> Messung der Aktivität der NADPH-abhängigen F <sub>420</sub> -Reduktase. ....  | 85  |
| <b>Abb. 3-28.</b> Darstellung von PHA · HCl aus Lm A. ....  | 87  |
| <b>Abb. 3-29.</b> Versuche zum Einbau von <sup>14</sup> C-markiertem L-Tyrosin. ....  | 91  |
| <b>Abb. 4-1.</b> Einleitende Schritte des postulierten PPL-Biosynthesewegs. ....  | 94  |
| <b>Abb. 4-2.</b> Das <i>lmb/lmr</i> -Gencluster im Bereich von <i>lmbY</i> . ....   | 102 |
| <b>Abb. 4-3.</b> Vergleich der As-Sequenz von LmbX [...] mit den Sequenzen von PhzF [...], PhzF [...] und PhzC [...]. ....  | 103 |
| <b>Abb. 4-4.</b> Postulierte Funktionen von LmbY [...]. ....  | 107 |

## Tabellenverzeichnis

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| <b>Tab. 1-1.</b>  | Strukturvariationen von Lincomycin und Celesticetin. ....   | 3   |
| <b>Tab. 1-2.</b>  | Lincomycin-Produzenten. ....  | 4   |
| <b>Tab. 2-1.</b>  | Übersicht der verwendeten Bakterienstämme. ....   | 15  |
| <b>Tab. 2-2.</b>  | Übersicht der verwendeten Klonierungsvektoren. ....   | 16  |
| <b>Tab. 2-3.</b>  | Übersicht der neu konstruierten rekombinanten Plasmide. ....  | 17  |
| <b>Tab. 2-4.</b>  | Übersicht der verwendeten Oligonukleotide. ....   | 20  |
| <b>Tab. 3-1.</b>  | Rekombinante Plasmide für Expressionen von <i>lmbB1</i> und <i>lmbB2</i> . ....   | 47  |
| <b>Tab. 3-2.</b>  | L-DOPA- bzw. L-Tyrosin-umwandelnde Aktivitäten verschiedener<br><i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS-Transformanten. ....                            | 49  |
| <b>Tab. 3-3.</b>  | Aktivitäten verschiedener <i>S. lividans</i> TK23-Transformanten. ....  | 51  |
| <b>Tab. 3-4.</b>  | Aufstellung aller Proteinextrakte mit ihren zugehörigen Aktivitäten. ....   | 59  |
| <b>Tab. 3-5.</b>  | LmbY-ähnliche, F <sub>420</sub> -bindende Proteine, ihre Ursprünge und ihre<br>Ähnlichkeit mit LmbY. ....                                       | 66  |
| <b>Tab. 3-6.</b>  | Größen der DNA-Fragmente, die mit einem <sup>32</sup> P-markiertem internen<br>438 bp <i>NaeI</i> Fragment aus <i>lmbY</i> hybridisierten. .... | 68  |
| <b>Tab. 3-7.</b>  | Ergebnisse der Komplementationen der <i>S. lincolnensis</i> <i>lmbY</i> -Insertions-<br>mutanten 2 und 9 durch Transformation [...]. ....       | 76  |
| <b>Tab. 3-8.</b>  | Enzymtests auf NADPH:F420- bzw. F420:DDPPL-Reduktase-Aktivität. ....  | 86  |
| <b>Tab. 3-9.</b>  | Substratkomplementationen der erzeugten <i>lmbY</i> -Insertionsmutanten. ....   | 88  |
| <b>Tab. 3-10.</b> | Promotoraktivität stromaufwärts des <i>lmbY</i> Gens gelegener DNA-Bereiche. ...  | 89  |
| <b>Tab. 4-1.</b>  | R <sub>F</sub> -Werte relevanter <sup>14</sup> C-markierter Substanzen. ....  | 108 |

## Abkürzungen

|                     |   |                         |  |
|---------------------|---|-------------------------|--|
| A                   | Ampere  | Glc                     | Glucose  |
| ABC                 | ATP Binding Cassette  | h                       | Stunde(n)  |
| ATCC                | American Type Culture Collection (USA)  | His                     | Histidin   |
| AGE                 | Agarosegelelektrophorese  | His-tag•X               | Poly-Histidin/X-Fusionsprotein   |
| Ap                  | Ampicillin  | HPLC                    | Hochleistungsflüssigchromatographie<br>(High performance liquid chromatography)  |
| APS                 | Ammoniumpersulfat   | IP                      | isoelektrischer Punkt  |
| Am                  | Apramycin   | IPTG                    | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid   |
| As                  | Aminosäure(n)   | ISP                     | International <i>Streptomyces</i> Project  |
| ATP                 | Adenosintriphosphat   | i.V.m.                  | in Verbindung mit  |
| B1                  | Vitamin B1 (Thiamin)  | Kn                      | Kanamycin  |
| bp                  | Basenpaar(e)  | kb                      | Kilobasen  |
| BSA                 | Rinderserumalbumin  | kDa                     | Kilodalton   |
| BUGH                | Bergische Universität Gesamthochschule  | LCF                     | Lincomycin Cosynthesis Factor  |
| ca.                 | zirka   | L-DOPA                  | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin  |
| Cm                  | Chloramphenicol   | Lm                      | Lincomycin (IUPAC: Methyl-6,8-dideoxy-6-[1-methyl-4-propyl-2-pyrrolidin-carboxamido]-1-thio-D-erythro- $\alpha$ -D-galactooctopyranosid) |
| Ci                  | Curie   | <i>lmb</i> , <i>Lmb</i> | Lincomycin-Biosynthesegen,<br>bzw. -protein (Genprodukt)   |
| CIA                 | Chloroform/Isoamylalkohol (1:1 v/v)   | <i>lmr</i> , <i>Lmr</i> | Lincomycin-Resistenzgen,<br>bzw. -protein (Genprodukt)   |
| cpm                 | gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute                                      | Lys                     | Lysozym  |
| CTP                 | Cytidintriphosphat  | <i>M.</i>               | <i>Micrococcus</i>   |
| d                   | Tag   | MCS                     | Multi cloning site (Polylinker)  |
| Da                  | Dalton  | <i>mel</i> , <i>Mel</i> | Melanin-Biosynthesegen,<br>bzw. -protein (Genprodukt)  |
| dd H <sub>2</sub> O | bidestilliertes Wasser (Millipore)  | MIC                     | Minimal inhibition concentration   |
| dest.               | destilliert   | min                     | Minute   |
| DMF                 | Dimethylformamid  | MLS                     | Macrolide Lincosamide Streptogramin B  |
| DMSO                | Dimethylsulfoxid  | MM                      | Minimalmedium  |
| DNA                 | Desoxyribonukleinsäure  | MTL                     | Methylthiolincosaminid   |
| dsDNA               | doppelsträngige (double stranded) DNA   | M <sub>r</sub>          | relatives Molekulargewicht   |
| DSM                 | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig          | NADH                    | Nicotinamidadeninindinukleotid<br>(reduzierte Form)  |
| DDPPL               | 3-Propyl- <sup>2</sup> -pyrrolin-5-carbonsäure<br>(2,3-Didehydropropylprolin) | NADPH                   | Nicotinamidadeninindinukleotidphosphat<br>(reduzierte Form)  |
| DTT                 | Dithiothreitol  |                         |  |
| dXTP                | 2'-Desoxynukleosidtriphosphat   |                         |  |
| <i>E.</i>           | <i>Escherichia</i>  |                         |  |
| EDTA                | Ethyldiamintetraacetat (Natriumsalz)  |                         |  |
| Er                  | Erythromycin  |                         |  |
| EtBr                | Ethidiumbromid  |                         |  |
| FPLC                | Fast protein liquid chromatography  |                         |  |

|                  |  |                 |  |
|------------------|--|-----------------|--|
| NMR              | magnetische Kernresonanz<br>(Nuclear Magnetic Resonance) | SAM             | <i>S</i> -Adenosylmethionin  |
| NRRL             | Northern Regional Research<br>Laboratory (USA)           | SD              | Shine-Dalgarno (Sequenz)   |
| nt               | Nukleotid(e)   | SDS             | Natriumlaurylsulfat<br>(Sodiumdodecylsulfat)   |
| OD <sub>x</sub>  | Optische Dichte bei einer<br>Wellenlänge von X nm        | sec             | Sekunde  |
| <i>orf</i> , ORF | offener Leserahmen<br>(Open reading frame)               | Sm              | Streptomycin   |
| <i>P.</i>        | <i>Pseudomonas</i>                                       | SSC             | Natriumchlorid/Natriumcitrat-Lösung  |
| PAA              | Polyacrylamid  | ssDNA           | einzelsträngige (single stranded) DNA  |
| PAGE             | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                          | Suc             | Saccharose (Sucrose)   |
| PCR              | Polymerase-Kettenreaktion<br>(Polymerase chain reaction) | TDPPL           | 3-Propyliden- <sup>1</sup> -pyrrolin-5-carbonsäure<br>(1,2,3,6-Tetrahydropropylprolin)                                 |
| PEG              | Polyethylenglykol  | TES             | <i>N</i> -[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-<br>aminoethansulfonsäure (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub> S) |
| PHA              | Propylhygrinsäure (Propylhygric Acid)                    | Ts              | Thiostrepton   |
| PPL              | Propylprolin   | Tris            | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| RBS              | Ribosomenbindestelle                                     | ÜN              | Über-Nacht   |
| RE               | Rohextrakt (zellfreier Extrakt)                          | ÜN <sub>K</sub> | Über-Nacht-Kultur  |
| R <sub>f</sub>   | relative to front  | ÜS              | Überstand  |
| Rf               | Rifampicin   | UV              | ultraviolettes Licht   |
| RNA              | Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)                      | V               | Volt   |
| rpm              | Umdrehungen pro Minute<br>(Rounds per minute)            | VT              | Volumenteil  |
| RT               | Raumtemperatur   | v/v             | volume per volume  |
| S                | Svedberg-Einheit   | w/v             | weight per volume  |
| <i>S.</i>        | <i>Streptomyces</i>                                      | X-Gal           | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-<br>D-galactopyranosid  |
|                  |  | ZE              | Zellextrakt  |

## Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse der Gene *lmbB1*, *lmbB2* und *lmbY*, die Teile des Lincomycin A-Biosyntheseclusters von *Streptomyces lincolnensis* darstellen und deren Genprodukte an der Herstellung der Propylprolin (PPL)-Untereinheit beteiligt sind.

Wenn die Gene *lmbB1B2* gemeinsam in *Escherichia coli* überexprimiert wurden, dann setzten diese Zellen spezifisch L-Tyrosin und L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) zu einem gelb gefärbten Produkt um. Das alleine produzierte LmbB1-Protein katalysierte die Umwandlung von L-DOPA, aber nicht von L-Tyrosin. Das gereinigte LmbB1-Protein zeigte einen  $K_M$ -Wert für L-DOPA von 258  $\mu\text{M}$ . Die L-Tyrosin-umsetzende Aktivität konnte nur *in vivo* nachgewiesen werden und war von LmbB2 abhängig. Die Daten ließen den Schluß zu, daß LmbB1 eine spezifische extradiol-spaltende L-DOPA-2,3-Dioxygenase ist und LmbB2 eine L-Tyrosin-3-Hydroxylase repräsentiert. Das labile Produkt der Ringspaltung durch LmbB1 konnte weder mit Ammoniak abgefangen noch gereinigt werden. Es wird daher spekuliert, daß es eine heterozyklische Struktur besitzt.

Das LmbY-Protein wies 24 - 29 %ige As-Sequenzidentität zu verschiedenen  $F_{420}$ -abhängigen Reduktasen auf. Bei der Hybridisierung eines *lmbY* Fragmentes mit der chromosomalen DNA verschiedener *Streptomyces*-Stämme wurden eindeutige Signale bei allen Lincomycin-Produzenten erhalten, deren Muster sich in vier Gruppen einteilen ließen. Es wurden Knock-out-Mutanten des Gens *lmbY* in *S. lincolnensis* NRRL 2936 hergestellt, die einen Lincomycin<sup>-</sup>-Phänotyp zeigten. Die Mutanten ließen sich durch Fütterung mit PPL und nur durch die vollständige Transkriptionseinheit (Operon) *lmbUYX* in trans komplementieren. Durch Promotorprobe-Versuche wurde im Bereich zwischen -286 und -113 bp vor *lmbU* die Anwesenheit eines schwachen Promotors entdeckt. Die heterologe Expression von *lmbY* in *S. lividans* unter der Kontrolle des *ermEp* lieferte lösliches Protein. Die mit Poly-Histidin fusionierte Version des Enzyms wurde zu 96 - 98 % gereinigt. Die in *S. lincolnensis* gemessene NADPH: $F_{420}$ -Reduktase-Aktivität konnte in allen Mutanten mit zerstörtem *lmbY* (und/oder *lmbX*) noch nachgewiesen werden. Dadurch wurde diese Funktion für LmbY ausgeschlossen. Die verschiedenen Anhäufungsprodukte der hergestellten Mutanten konnten durch Fütterung von L-[U-<sup>14</sup>C]Tyrosin dünn-schicht-chromatographisch dargestellt werden und deren  $R_f$ -Werte bestimmt werden. Es gelang jedoch nicht, genügend Zwischenprodukt für einen Umsatz mit LmbY zu gewinnen. Zusammenfassend ist LmbY, wahrscheinlich auch LmbX, als eindeutig an der PPL-Biosynthese beteiligt einzuordnen.

## Summary

The objective of this study was the functional analysis of the genes *lmbB1*, *lmbB2*, and *lmbY*. These genes are part of the lincomycin A production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis*, and their gene products are involved in the biosynthesis of the propylproline (PPL) subunit of the antibiotic.

The proteins LmbB1 and LmbB2, when concomitantly over-produced in *Escherichia coli*, resulted in enzyme activities specific for the conversion of both L-tyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) to a yellow-colored product. The LmbB1 protein alone was able to catalyze the conversion of L-DOPA but not of L-tyrosine. The purified LmbB1 protein was found to have a  $K_M$  for L-DOPA of 258  $\mu\text{M}$ . The LmbB2-dependent L-tyrosine converting activity was only detectable in *in vivo* experiments. The data suggest that the protein LmbB1 is an L-DOPA extradiol-cleaving 2,3-dioxygenase and that the protein LmbB2 represents an L-tyrosine 3-hydroxylase. As the unstable product of the ring cleavage by LmbB1 could neither be trapped by ammonia nor be purified, it was speculated that its structure represents a heterocyclic precursor of the propylhygric acid moiety of lincomycin A.

The LmbY protein shares a 24 - 29% amino acid sequence identity with different  $F_{420}$ -dependent reductases. In hybridization experiments using chromosomal DNA isolated from various *Streptomyces* strains and an *lmbY*-fragment as a probe, signals were only obtained with DNAs of lincomycin producing strains. These were assigned to four groups according to their hybridization patterns. Mutants were generated in which the gene *lmbY* of *S. lincolnensis* NRRL 2936 had been knocked out. These strains could only be complemented by feeding PPL or by reintroduction of the full size operon *lmbUYX*. Promotorprobe assays revealed a weak promoter activity in a region from -286 to -113 bp upstream of *lmbU*. Soluble LmbY and His-tag•LmbY was obtained by heterologous expression of *lmbY* in *S. lividans* under the control of *ermEp*. The His-tag fusion protein of the enzyme was purified up to 96 - 98 %. The NADPH: $F_{420}$ -reductase activity found in *S. lincolnensis* extracts remained in all mutants in which *lmbY* (and/or *lmbX*) had been disrupted excluding this activity as a function of LmbY. By adding L-[U- $^{14}\text{C}$ ]tyrosine to the growth media the mutants accumulated radioactively labeled substances. These were separated by thin layer chromatography and their  $R_f$  values determined. Unfortunately, yields were not high enough to allow a conversion by LmbY. All results support the hypothesis that LmbY, and probably LmbX, are enzymes involved in the biosynthesis of PPL.

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Merkmale von Streptomyceten

Streptomyceten sind weit verbreitete, Gram-positive Bakterien, die vorwiegend im Boden vorkommen. Sie werden gemeinsam mit anderen filamentös wachsenden, überwiegend aerob lebenden Bakterien der Gruppe der Actinomyceten zugeordnet (Williams *et al.*, 1989). Streptomyceten zeichnen sich durch einen charakteristischen Lebenszyklus aus, der mit dem Auskeimen der Sporen auf festem Nährboden beginnt. Die weitere morphologische Differenzierung verläuft zunächst über die Bildung eines verzweigten Substratmyzels. Durch die Vernetzung der entwickelten Filamente entstehen Kolonien mit glatter Oberfläche. Gegen Ende der vegetativen Wachstumsphase kommt es zur Ausbildung eines Luftmyzels. Dabei werden die Hyphen des Luftmyzels durch die Einführung von Septen abgeschnürt. Am apikalen Ende der Hyphen entstehen dadurch schließlich Konidiosporen, die der Verbreitung und dem Fortbestand dienen (Waksman und Lechevalier, 1962; Kutzner *et al.*, 1984). Begleitend zu diesem morphologischen Differenzierungsvermögen tritt eine sukzessive Veränderung der Zellphysiologie ein, die meistens erst in der stationären Wachstumsphase zur Biosynthese von Antibiotika (s. Abschnitt 1.2) und weiterer Sekundärmetabolite, wie Pigmenten (z.B. Melanin) und Geruchsstoffen (z.B. Geosmin), führt. Streptomyceten scheiden nicht nur eine Vielzahl niedermolekularer Sekundärmetabolite aus, sondern sie besitzen außerdem die Fähigkeit, eine Reihe reaktionsträger Biopolymere abzubauen (Peczynska-Czoch und Mordarski, 1988). Dazu werden zusätzlich extrazelluläre Hydrolasen synthetisiert und sekretiert, die in der Lage sind, z.B. Lignozellulose, Chitin, Polyphenole, Chitosane, Keratine, Pektine, Agar und Peptide zu zersetzen.

Das Streptomyceten-Genom ist mit  $8 - 10 \cdot 10^6$  bp ungefähr doppelt so groß wie vergleichsweise das *Escherichia coli*-Genom (Redenbach *et al.*, 1996; Kieser *et al.*, 1992; Leblond *et al.*, 1993) und hat einen hohen G+C-Gehalt, der im Durchschnitt bei ca. 73 % liegt (Enquist und Bradley, 1971). Derzeit steht die Sequenzierung des kompletten linearen Chromosoms des genetischen Modellorganismus *S. coelicolor* A3(2) kurz vor seiner Vollendung (Sanger Center, England).

## 1.2 Antibiotika

Antibiotika sind Substanzen, die schon in geringen Mengen in den für sie empfänglichen Organismen Wachstumshemmungen hervorrufen. Über 70 % der heute weltweit über 10000 beschriebenen Antibiotika werden von Actinomyceten produziert (Omura, 1992; Gräfe, 1992; Piepersberg und Zeek, 1994; Piepersberg, 1993). Dieser hohe Prozentsatz macht die Bedeutung von Actinomyceten für die Medizin und Biotechnologie deutlich. Aus diesem Grund werden heutzutage Streptomyceten-Hochleistungsstämme zur Gewinnung von Antibiotika im 100 m<sup>3</sup>-Maßstab fermentiert.

Die von Streptomyceten produzierten Antibiotika werden aufgrund ihrer molekularen Struktur verschiedenen Substanzklassen zugeordnet: Man findet u.a. Polyketide (Tetracycline, Makrolide), Saccharide (Aminoglykoside, Lincosamide), Peptide (Actinomycine,  $\beta$ -Lactame) und Nukleolege (Aminonukleoside, Peptidylnukleoside). So unterschiedlich wie die Struktur ist auch die Wirkungsweise der aufgeführten Chemotherapeutika. Diese beruht auf verschiedenen Eingriffen in den Zellstoffwechsel, so beispielsweise in die Zellwandsynthese, den Membrantransport, die DNA-Replikation, die RNA-Synthese, die Translation, den Nukleotid- und Fettsäureaufbau, sowie die Störung einzelner Enzyme des Intermediärmetabolismus (Gräfe, 1992).

Die Produzenten schützen sich gegen die Toxizität der von ihnen synthetisierten Antibiotika durch die Expression von resistenzvermittelnden Proteinen (Cundliffe, 1989). Die häufigsten Resistenzmechanismen basieren auf

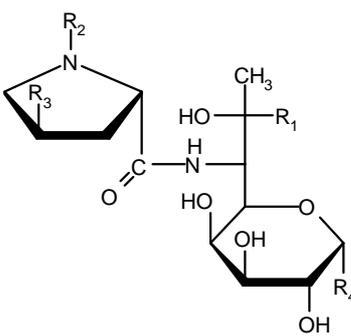
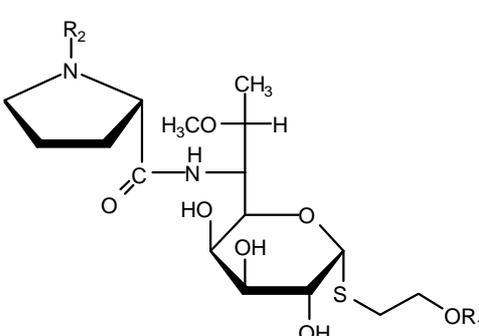
- a) Modifikationen des Wirkortes durch Basenaustausch in der rRNA (Pernodet *et al.*, 1988), Methylierung der 23S rRNA (Weisblum, 1985) oder der 16S rRNA (Piendl *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1985),
- b) Veränderung der Zellwanddurchlässigkeit durch aktiven Export (Ohnuki *et al.*, 1985; Neal und Chater, 1987) oder Erniedrigung der Zellpermeabilität (Fierro *et al.*, 1988),
- c) Inaktivierung des Antibiotikums durch Acetylierung (Lacalle *et al.*, 1989), Phosphorylierung (O'Hara *et al.*, 1989; Skinner und Cundliffe, 1980), Abbau (Sykes und Matthew, 1976) oder Bindung an Proteine (Gatignol *et al.*, 1988),
- d) Bypass-Reaktionen (Wise und Abou-Donia, 1975) oder Erhöhung der Wirkortkonzentration (Behrmann *et al.*, 1990).

### 1.3 Lincomycin und Lincosamide

#### *Chemischer Aufbau und Variationen*

Lincomycin (Lm) gehört zur Gruppe der Lincosamid-Antibiotika, die der Familie der MLS- (Macrolid, Lincosamid, Streptogramin B) Antibiotika (Cundliffe, 1989) untergeordnet ist. Es ist aus einem Hygrinsäurederivat (methyliertes Propylprolin (PPL)) und einem Zuckerteil (Methylthiolincosaminid (MTL)) aufgebaut, die über eine Amidbindung miteinander verknüpft sind.

**Tab. 1-1.** Strukturvariationen von Lincomycin (**A**) und Celesticetin (**B**).

| <b>A</b>  | <b>Lincomycine</b>     | <b>R<sub>1</sub></b>            | <b>R<sub>2</sub></b>          | <b>R<sub>3</sub></b>           | <b>R<sub>4</sub></b>           |
|---|------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|   | Lincomycin A           | H                               | CH <sub>3</sub>               | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | SCH <sub>3</sub>               |
|   | Lincomycin B           | H                               | CH <sub>3</sub>               | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>  | SCH <sub>3</sub>               |
|   | Lincomycin C           | H                               | CH <sub>3</sub>               | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |
|   | Lincomycin D           | H                               | H                             | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | SCH <sub>3</sub>               |
|   | Lincomycin K           | H                               | H                             | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |
|   | Lincomycin S           | H                               | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |
|   | Lincomycinsulfoxid     | H                               | CH <sub>3</sub>               | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | S(O)CH <sub>3</sub>            |
|   | Hydroxylincomycin      | H                               | H                             | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | OH                             |
|   | Pentyllincomycin       | H                               | H                             | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | SCH <sub>3</sub>               |
|   | Acetatlincomycin       | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O | CH <sub>3</sub>               | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | SCH <sub>3</sub>               |
| <b>B</b>  | <b>Celesticine</b>     | <b>R<sub>1</sub></b>            | <b>R<sub>2</sub></b>          |                                |                                |
|  | Celesticetin A         | CH <sub>3</sub>                 | Salicylyl                     |                                |                                |
|   | Celesticetin B         | CH <sub>3</sub>                 | Isobutyryl                    |                                |                                |
|   | Celesticetin C         | CH <sub>3</sub>                 | Anthranilyl                   |                                |                                |
|   | Celesticetin D         | CH <sub>3</sub>                 | Acetyl                        |                                |                                |
|   | Desalicetin            | CH <sub>3</sub>                 | H                             |                                |                                |
|   | N-Demethylcelesticetin | H                               | Salicylyl                     |                                |                                |
|   | Desalicetinsalicylat   | CH <sub>3</sub>                 | p-Aminosalicylyl              |                                |                                |

Celesticetin, ebenfalls zur Gruppe der Lincosamide gehörig, wurde noch vor Lm entdeckt (Hoeksema *et al.*, 1955) und hat eine dem Lm sehr ähnliche Struktur, die erst mehr als ein Jahrzehnt später aufgeklärt wurde (Hoeksema, 1968). Tab. 1-1 zeigt die Strukturen von Lm und Celesticetin und ebenfalls eine Auswahl der Variationen, die sich aus Substitutionen der Seitenketten ergeben.

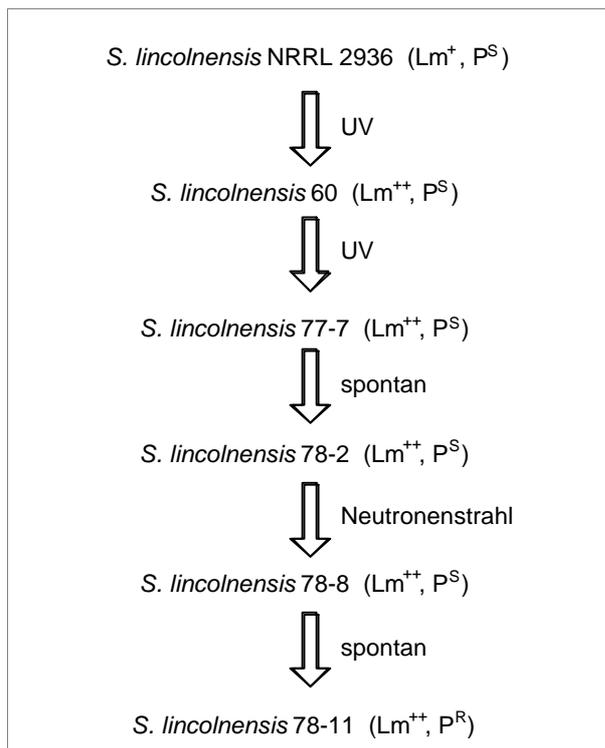
#### *Lm-Produzenten*

Lm wurde als erstes aus *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936 isoliert. Dieser Stamm produziert unter optimalen Bedingungen 25 mg/l Lm A und in geringeren Mengen Lm B (vgl. Tab. 1-1). Andere Actinomyceten, hauptsächlich Vertreter der Gattung *Streptomyces* (*S.*), synthetisieren ebenfalls Lm (s. Tab. 1-2). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *S. lincolnensis* 78-11 ist eine phagenresistente, Lm A-überproduzierende Mutante von *S. lincolnensis* NRRL 2936 (Zhang, 1993), die ca. 2,5 g/l Lm A synthetisiert. Die Entstehung dieses Stammes kann Abb. 1-1 entnommen werden. Die Lincomycine C, D und S können nur durch Zugabe von Hemmstoffen wie z.B. Ethioninen, Sulfonamiden und Sulfanilamiden erhalten werden (Argoudelis *et al.*, 1964; 1970; 1973). Celesticetin und seine Derivate werden von *S. caelestis* NRRL 2418 produziert.

**Tab. 1-2.** Lincomycin <sup>a</sup>-Produzenten.

| <b>Organismus</b>                   | <b>Literatur</b>   |
|-------------------------------------|--|
| <i>S. lincolnensis</i> 78-11        | Zhang <i>et al.</i> (1992), Peschke <i>et al.</i> (1995)                               |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936    | Bergy <i>et al.</i> (1963), Brahme <i>et al.</i> (1984a), Peschke <i>et al.</i> (1995) |
| <i>S. lincolnensis</i> RIA 1246     | Neußer <i>et al.</i> (1998)  |
| <i>S. lincolnensis</i> UC 5124      | Chung und Crose (1990)   |
| <i>S. espinosus</i> NRRL 5729       | Peschke <i>et al.</i> (1995)   |
| <i>S. sp. (espinosus)</i> NRRL 3890 | Peschke <i>et al.</i> (1995)   |
| <i>S. pseudogriseolus</i> NRRL 3985 | Argoudelis und Coats (1973), Peschke <i>et al.</i> (1995)                              |
| <i>S. vellosus</i> NRRL 8037        | Bergy <i>et al.</i> (1963), Peschke <i>et al.</i> (1995)                               |
| <i>Micromonospora halophytica</i>   | Bibikova <i>et al.</i> (1989)  |

<sup>a</sup> Unter normalen Fermentationsbedingungen werden Lincomycin A und in geringen Mengen Lincomycin B (Bergy *et al.*, 1963; Brahme *et al.*, 1984a; Patterson *et al.*, 1964) produziert. Durch Zugabe von Hemmstoffen wie Ethioninen, Sulfonamiden oder Sulfanilamiden können die Lincomycine C, D und S erhalten werden (Argoudelis *et al.*, 1970; 1973).



**Abb. 1-1.** Isolierung von *Streptomyces lincolnensis* 78-11 durch Mutagenisierung von *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936 (aus Zhang, 1993).

Lm<sup>+</sup>, Lincomycin produzierend,  
 Lm<sup>++</sup>, Lincomycin überproduzierend,  
 P<sup>S</sup>, Phagen sensitiv,  
 P<sup>R</sup>, Phagen resistent.

### Resistenz

Der in klinischen Isolaten am häufigsten verbreitete Resistenzmechanismus gegenüber den antibiotischen Substanzen der chemisch sehr unterschiedlichen Klassen Makrolide, Lincosamide und Streptogramin B-Derivate ist die sogenannte MLS-Resistenz. Diese beruht auf einer Mono- oder Dimethylierung des Adenins der 23S-rRNA, das der Position 2058 in *E. coli* entspricht, durch S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methyltransferasen (Skinner *et al.*, 1983). Durch diese chemische Veränderung wird die Affinität des Antibiotikums zum Wirkort herabgesetzt und somit eine Inhibition der Translation unterbunden.

Im Lm-Produzenten *S. lincolnensis* wurden drei Resistenz-vermittelnde Gene nachgewiesen: *lmrA* kodiert für ein 50,2 kDa-Protein mit einer Länge von 481 Aminosäuren (As). Es besitzt 12 hydrophobe Segmente, die typische transmembrane Domänen bilden könnten. Diese stimmen in ihrer Struktur und Anordnung mit denjenigen anderer pH-abhängiger, integraler Transportproteine überein. Das 31,5 kDa große LmrB-Protein (278 As) ist hydrophil und hat aufgrund von Sequenzähnlichkeiten wahrscheinlich die Funktion einer 23S-rRNA-Adenin (2058)-N-Methyltransferase. LmrA und LmrB sind sehr substratspezifisch und besitzen keine Kreuzresistenzen zu anderen Lincosamiden (Zhang *et al.*, 1992). Die abgeleitete As-Sequenz des dritten Resistenzgens, *lmrC*, hat zwei (N- und C- terminale) ATP-

bindende Stellen (»Walker Motive«; Walker *et al.*, 1982), die charakteristisch für die Familie der ABC-Transporterproteine sind. LmrC hat starke Sequenzähnlichkeit zu den Makrolid-Resistenzproteinen von anderen Streptomyceten, wie z.B. TlrC, CarA und SrmB sowie zum Erythromycinresistenzprotein MsrA von *Staphylococcus epidermidis*. Transformanten von *Streptomyces lividans* TK23 mit einem *lmrC*-Plasmid erreichten bei der Supplementierung mit Erythromycin einen viermal höheren MIC-Wert (125 µg/ml) als der Stamm ohne Plasmid, während die Lm-Resistenz auf 500 µg/ml anstieg (Peschke *et al.*, 1995).

### *Medizinische Anwendung*

Lincomycine sind gegen anaerobe und aerobe Streptococcen, Staphylococcen, Mycoplasmen, *Corynebacterium diphtheriae*, Bacteroides, Fusobakterien und Clostridien wirksam. Das semisynthetische Clindamycin ist etwa zweifach wirksamer als Lm und wird bei oraler Einnahme zu ~80 % resorbiert. Bei Lm liegt die Resorption bei <40 % und wird durch gleichzeitige Nahrungsaufnahme noch behindert.

Der Wirkort von Lm A ist die Peptidyltransferase des Bakterienribosoms. Wie andere Translationsinhibitoren der MLS-Familie bindet vermutlich auch Lm A an einen Teil der Zentralschleife der 23S-rRNA (Cundliffe, 1990).

Die Resistenz gegen Lincomycine entwickelt sich langsam in mehreren Schritten. Partielle Parallelresistenz besteht zu Erythromycin (Er), wobei erythromycinresistente Keime oft Lm-sensitiv sind. Durch die Tatsache, daß Lincomycine eine gute Penetration ins Knochengewebe besitzen, sind sie das Mittel der Wahl bei Knorpel- und Knocheninfektionen. Sie werden außerdem als »Reservemittel« bei den Staphylococcenstämmen verabreicht, die gegen andere Antibiotika resistent sind. Die Halbwertszeit von Lm im Körper beträgt 4 - 5 h, die von Clindamycin nur 3 h. Beide Stoffe werden in aktiver Form renal eliminiert. Als Nebenwirkungen können Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und Bauchschmerzen auftreten; seltener sind allergische Erscheinungen (Küttler, 1990).

## 1.4 Biosynthese des Lincomycins

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit den Lm-Biosynthesegenen und ihrer Anordnung auf dem Chromosom. Außerdem werden die bekannten Schritte der Lm-Produktion, die über zwei Phasen verläuft, beschrieben. Abschließend werden die Gene *lmbA*, *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbU*, *lmbY* und *lmbX* und die postulierten Funktionen ihrer entsprechenden Genprodukte behandelt.

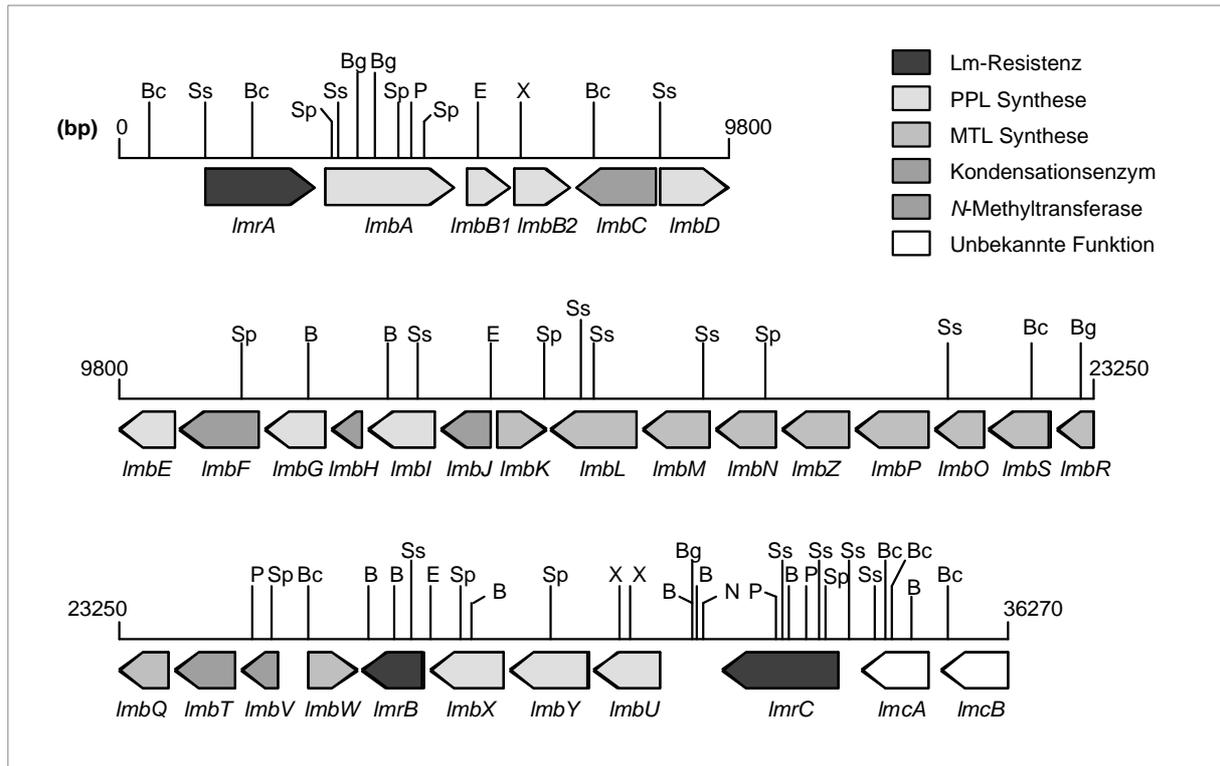
### *Genetische Anordnung der Biosynthesegene*

In Streptomyceten sind Ähnlichkeiten in der Organisation der Gene für Resistenz, Synthese, Transport und Regulation der produzierten Antibiotika zu erkennen. Sie liegen in sogenannten »Clustern« benachbart auf dem Chromosom (Martin und Liras, 1989; Vining und Stuttard, 1994). Eine solche genomische Organisation findet man beispielsweise für Streptomycin (Retzlaff *et al.*, 1993), Erythromycin (Weber *et al.*, 1985; Katz und Donadio, 1992), Methylenomycin (Chater und Bruton, 1985), Tylosin (Cox *et al.*, 1985), Oxytetracyclin (McDowall *et al.*, 1991) und wie im folgenden beschrieben für Lm. Von den 30 Genen im *lmb/lmr*-Gencluster zeigen nur gut die Hälfte eine Ähnlichkeit mit Genen, deren Funktion bekannt ist (s. Abb. 1-2). Man vermutet, daß die Aufteilung der Gene wie die Synthese zweigeteilt ist, d.h. das »linke« Segment des Clusters von *lmrA* bis *lmbK* beinhaltet die meisten Gene, die für die PPL-Biosynthese verantwortlich sind und wird von *lmrA*, einem der drei Resistenzgene, flankiert. Das »rechte« Segment von *lmbL* bis *lmrC* enthält vorwiegend Gene der MTL-Biosynthese und die beiden anderen Resistenzgene *lmrB* und *lmrC* (Chung und Crose, 1990).

Da die Vorläufermoleküle PPL und MTL auf zwei getrennten Wegen hergestellt (Abb. 1-3 A; B) und anschließend nach Aktivierung kondensiert und methyliert (Abb. 1-3 C) werden, wird die Synthese der einzelnen Untereinheiten im folgenden getrennt behandelt.

### *Synthese von PPL*

Witz *et al.* (1971) haben mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektroskopie gezeigt, daß die Radioaktivität aus L-[1-<sup>14</sup>C]Tyrosin und L-[<sup>15</sup>N]Tyrosin in die Propylhygrinsäureeinheit von Lm eingebaut wird. Als man eine Lm-produzierende Kultur mit L-[U-<sup>14</sup>C]Tyrosin fütterte, wurde ungefähr siebenmal soviel Radioaktivität in die Aminosäureuntereinheit eingebaut, als bei einer Fütterung mit C-1-markiertem Tyrosin.



**Abb. 1-2.** Anordnung der Gene des *lmb/lmr*-Genclusters. EMBL Zugangsnummer X79146 (nach Peschke *et al.*, 1995). Restriktionsschnittstellen: B, *Bam*HI; Bc, *Bcl*I; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; N, *Nco*I; P, *Pst*I; Sp, *Sph*I; Ss, *Sst*I; X, *Xho*I.

Daraus schlossen Witz und Mitarbeiter, daß sieben von neun Kohlenstoffatomen der Propylhygrinsäureeinheit aus Tyrosin kommen.

Argoudelis *et al.* (1969) fanden durch die Verwendung einer Kombination von radioaktiver Markierung und Massenspektroskopie heraus, daß die beiden fehlenden C-Atome der Propylhygrinsäureuntereinheit (die *N*-Methylgruppe und das terminale C-Atom der Propyl-Seitenkette) aus Methionin stammen. Ebenfalls ging aus  $^{13}\text{C}$ -NMR Untersuchungen mit deuterierten Vorstufen hervor, daß die PPL-Synthese von L-Tyrosin ausgeht (Brahme *et al.*, 1984a).

Es wurde außerdem gezeigt, daß L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) und 3-Propylen- $^1$ -pyrrolin-5-carbonsäure (Abb. 1-3 A II, anderer Name: 1,2,3,6-Tetradehydropropylprolin, TDPPL) Zwischenprodukte der PPL-Synthese sind (Brahme *et al.*, 1984a; Kuo *et al.*, 1992). Coats *et al.* und Kuo *et al.* untersuchten *S. lincolnensis*-Mutanten, die in ihrer Lm-Produktion gehemmt waren. Es stellte sich heraus, daß TDPPL in der Mutante *S. lincolnensis* NTG-3 akkumuliert wurde, der eine Reduktase fehlte, die einen Cofaktor verwendete, der für die Synthese von PPL nötig war. Dieser Cofaktor wurde als LCF (»lincomycin cosynthetic factor«, Abb. 1-4) bezeichnet und ist mit der Deazaflavineinheit ( $F_0$ ) des  $F_{420}$ -Coenzym von

methanogenen Bakterien strukturgleich (Coats *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1989; 1992). Die Lm-Produktion von *S. lincolnensis* NTG-3 konnte durch die Fütterung mit geringen Mengen sterilfiltriertem Überstand einer Anzucht von *S. lincolnensis* NTG-5 (eine andere Lm<sup>-</sup>-Mutante, die aber noch PPL produzierte) wiederhergestellt werden. Aus der Tatsache, daß sie durch die PPL-Zugabe wieder Lm produzierte, folgerten sie, daß der Cofaktor für einen der Schritte zwischen L-DOPA und PPL notwendig ist. Die Kombination der Ergebnisse von Brahme *et al.* und Kuo *et al.* lassen für die letzten Schritte der PPL-Synthese den in Abb. 1-3 gezeigten Weg zu, der über ein Enamin (Abb. 1-3 A I), TDPPL (Abb. 1-3 A II) und 3-Propyl-<sup>2</sup>-pyrrolin-5-carbonsäure (Abb. 1-3 A III, anderer Name: 2,3-Didehydropropylprolin, DDPPL) zu PPL führt. Schmidt (1994) wies dem LmbC-Protein, das aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Modulen von Peptidsynthetasen ein Acyladenylat-bildendes Enzym sein sollte, zwei mögliche Funktionen zu: zum einen, daß der Schritt zwischen L-Tyrosin und L-DOPA katalysiert wird, zum anderen, daß LmbC PPL für die anschließende Kondensation mit MTL aktiviert. Man wird im Abschnitt 3.1 bzw. 4.1 sehen, daß die erste Funktion, die für LmbC postuliert wurde, von LmbB2 übernommen wird. Schmidt postulierte weiterhin, daß LmbG (zu der Methyltransferase-Familie gehörig) an der Übertragung einer Methylgruppe aus SAM auf ein PPL-Zwischenprodukt beteiligt ist.

### *MTL-Synthese*

Die Vorläufer von MTL sind wahrscheinlich Zwischenprodukte des Pentosephosphat-Weges. Fütterungsversuche mit D-[U-<sup>13</sup>C]Glucose und anschließender Analyse des <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Kopplungsmusters in MTL und Lm ergaben, daß der C<sub>8</sub>-Körper des MTL aus der Kondensation einer Pentoseeinheit (C<sub>5</sub>) mit einer C<sub>3</sub>-Einheit entstehen muß (Brahme *et al.*, 1984b). Die letzten Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß diese C<sub>3</sub>-Einheit z.B. Dihydroxyaceton ist und zusammen mit Pentose-5-phosphat von LmbR zu Octulose-8-phosphat umgesetzt wird (vgl. Abb. 1-3 B; A. Arnold, persönliche Mitteilung). LmbR hat die größte Sequenzähnlichkeit auf Proteinebene mit den Aldolasen MipB und TalC aus *Escherichia coli*, die Fructose-6-phosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton zu spalten vermögen (G. Sprenger, Jülich, persönliche Mitteilung).

Für den ersten Schritt der MTL-Synthese ist auch noch eine andere Funktion für LmbR postuliert. Ribose-5-phosphat reagiert mit Sedoheptulose-7-phosphat unter Abspaltung von Erythrose-4-phosphat zu Octulose-8-phosphat. LmbR hätte in diesem Fall die Funktion einer Transaldolase (siehe Abb. 1-3 B). Für LmbK wurde bisher immer eine Phosphatasefunktion angenommen, die der PPL-Synthese dienen sollte. Eine solche Aktivität wird jedoch nur

während der weiteren MTL-Synthese benötigt (vgl. Abb. 1-3 B). Nach neueren Sequenzvergleichen und Enzymtests werden den übrigen Enzymen der MTL-Synthese die in Abb. 1-3 B aufgeführten Funktionen zugewiesen, auf die hier nicht näher eingegangen wird. Der abgebildete Weg, der über Octose führt, die dann als Nukleotid-aktivierter Zucker weiter modifiziert wird, weist den Enzymen die nach den vorhandenen Informationen wahrscheinlichsten Funktionen zu.

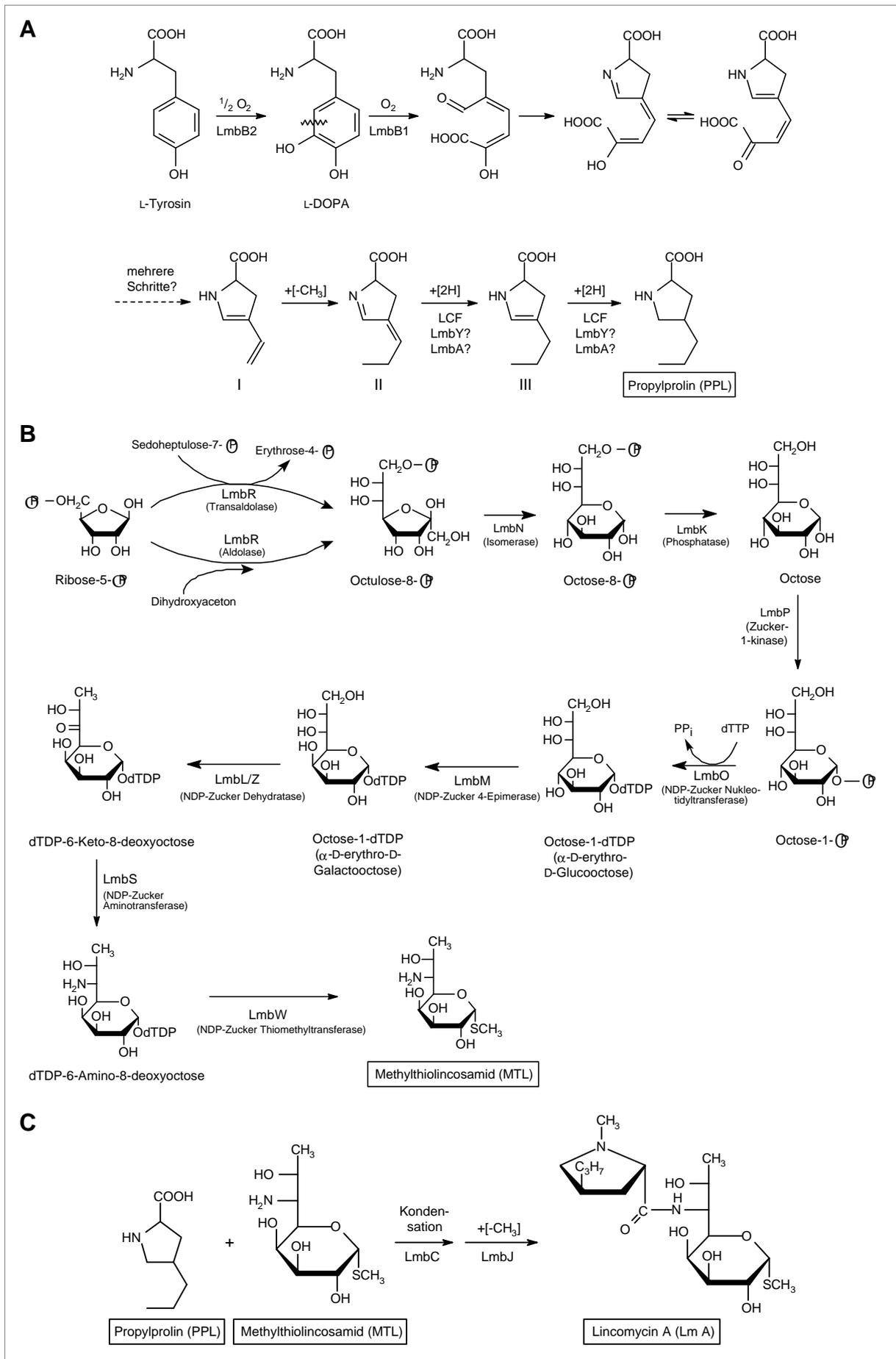
#### *LmbA, LmbB1 und LmbB2*

Schmidt wies 1994 den Enzymen LmbA, LmbB1 und LmbB2 folgende Funktionen zu: LmbA, ein 63 kDa-Protein, das Ähnlichkeiten zu einer  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase hat, könnte an der Synthese des LCF beteiligt sein, da dieser in seiner aktiven Form mindestens eine  $\gamma$ -Glutamyluntereinheit (s. Abb. 1-4) enthält. Eine andere Möglichkeit ist, daß LmbA keine direkte Funktion für die PPL-Synthese erfüllt (Peschke *et al.*, 1995). Die letztere Hypothese wird durch die von Chung *et al.* (1997) beschriebenen Transposon-induzierten Mutanten in *lmbA*, die nicht mehr in der Lage waren, Lm zu produzieren, aber durch PPL komplementiert werden konnten, gestützt. Ferner wurde von Schmidt vermutet, daß für die Umsetzung von L-DOPA zwingend die beiden Proteine LmbB1 und LmbB2, die möglicherweise die Unter-einheiten einer Dioxygenase darstellen, notwendig sind. Diese Hypothese wird in dieser Arbeit korrigiert (vgl. Abschnitte 3.1 und 4.1).

#### *LmbU, LmbY und LmbX*

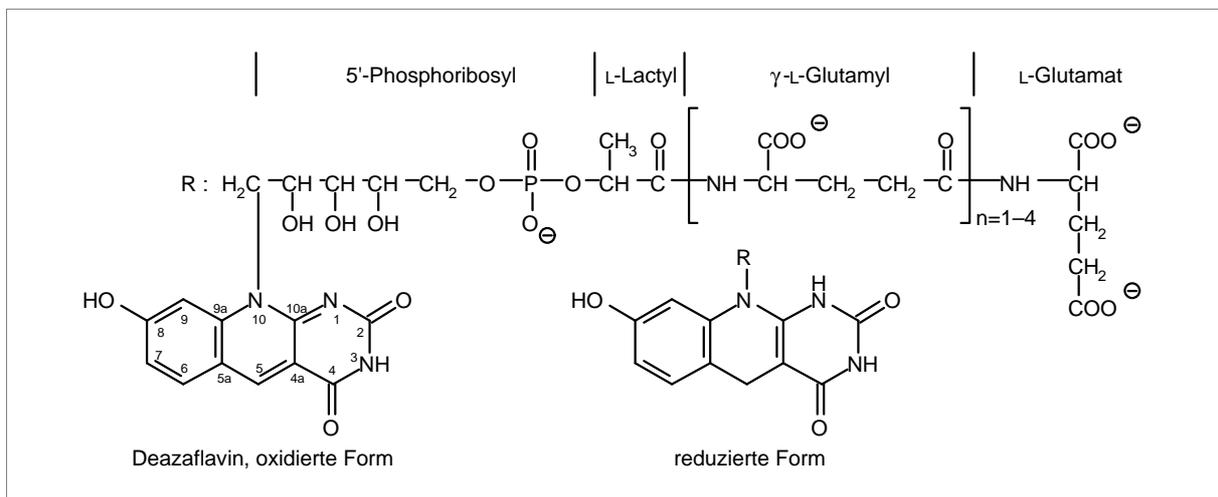
Das Gen *lmbU* kodiert für ein relativ kleines Protein mit 224 As und besitzt geringe Ähnlichkeiten zu Regulatorproteinen, weil es in Position 7 das in Streptomyceten seltene und möglicherweise regulatorische TTA-Codon für Leucin enthält (Zhang, 1993).

Die Funktion von LmbY aus *S. lincolnensis* ist in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Wegen seiner Ähnlichkeit mit  $F_{420}$ -abhängigen Enzymen wurde postuliert, daß LmbY entweder die Reduktion von TDPPL zu DDPPL katalysiert oder das Coenzym  $F_{420}$ , das bei dieser Reaktion oxidiert wird, durch LmbY regeneriert wird (Abb. 1-5; Peschke *et al.*, 1995). Die erste Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, daß *lmbY* im Lm-Gencluster liegt. Die letzte Vermutung wird durch Berichte unterstützt, die aussagen, daß  $F_{420}$  zuerst aus methanogenen Bakterien (Peck und Archer, 1987; Schönheit *et al.*, 1981), aus *S. lincolnensis* (Kuo *et al.*, 1989) und *S. griseus* (Eker *et al.*, 1980) isoliert und identifiziert wurde. Die letzte Vermutung konnte in dieser Arbeit überprüft werden (vgl. Abschnitte 3.2 und 4.2).



**Abb. 1-3.** (s. vorherige Seite) Hypothetischer Biosyntheseweg von Lm A. Die postulierten Zweige der Biosynthese basieren auf den Ergebnissen mehrerer Berichte (Brahme *et al.*, 1984b; Kuo *et al.*, 1992; Peschke *et al.*, 1995; Schmidt, 1994; A. Arnold, persönliche Mitteilung). **A.** Postulierter Syntheseweg der Untereinheit PPL ausgehend von L-Tyrosin. Der gestrichelte Pfeil stellt noch nicht untersuchte Schritte dar. Die numerierten Strukturen sind: **I** 3-Vinyl-<sup>2</sup>-pyrrolin-5-carbonsäure, **II** TDPPL und **III** DDPPL. Auf die letzten beiden Schritte wird in Abb. 1-5 näher eingegangen. **B.** Der Weg der MTL-Synthese geht von Ribose-5-phosphat aus und führt über Octose. Für den ersten Schritt sind die beiden gezeigten Möglichkeiten postuliert, wobei eine Aldolase-Funktion für LmbR als wahrscheinlicher erachtet wird. **C.** Dargestellt sind die beiden finalen Schritte, Kondensation der Untereinheiten und abschließende N-Methylierung. Eingerahmt sind die wichtigen Zwischenstufen PPL und MTL und das Endprodukt Lm A.

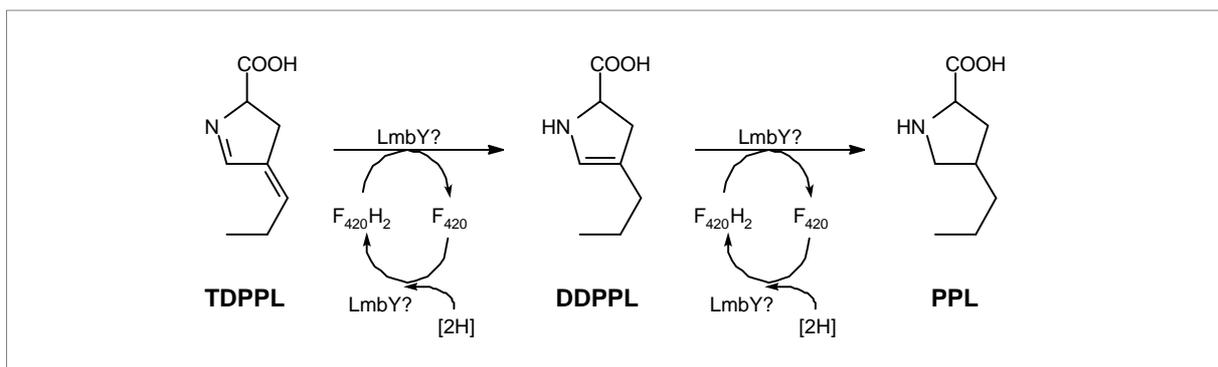
F<sub>420</sub>-abhängige NADP-Reduktasen wurden in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Eirich und Dugger, 1984), *Halobacterium cutirubrum* (de Wit *et al.*, 1987), *Streptomyces griseus* (Eker *et al.*, 1989) und *Archaeoglobus fulgidus* (Kunow *et al.*, 1993) gefunden und untersucht. Eker *et al.* (1989) haben einen Enzymtest mit einer 8-Hydroxy-5-deazaflavin: NADPH Oxidoreduktase aus *Streptomyces griseus* und mehreren Substraten entwickelt, um die Substratspezifität des Enzyms zu charakterisieren. Daraus ging hervor, daß der K<sub>M</sub>-Wert mit F<sub>420</sub> als Substrat (3,4 µM) den niedrigsten Wert erreichte, d.h. den stabilsten Enzym-Substrat-Komplex bildete. F<sub>0</sub> erreichte einen ähnlichen Wert von K<sub>M</sub> = 5,7 µM. Andere Substrate reagierten nicht oder hatten höhere K<sub>M</sub>-Werte, z.B. ein an der Riboseeinheit



**Abb. 1-4.** Coenzym F<sub>420</sub> (7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin-5'-phosphoryl-L-lactyl-γ-L-glutamyl-L-glutamat). Die Struktur besteht aus einer 8-Hydroxy-5-deazaflavin-Untereinheit, die am N-10 mit Phosphoribose verknüpft ist. Über eine Phosphodiesterbrücke ist der Zucker mit der Hydroxylgruppe eines Lactylrests verbunden, an dessen Carboxylgruppe ein γ-Glutamyl- und ein Glutamatrest peptidartig gebunden sind. Die mit Ribose verbundene 8-Hydroxy-5-deazaflavin-Untereinheit (F<sub>0</sub> oder LCF (»lincomycin cosynthetic factor«), 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin) kann ins Medium sekretiert werden (Le Van *et al.*, 1985).

endständig phosphoryliertes  $F_0$  erreichte  $15,5 \mu\text{M}$ . Die Biosynthese von  $F_{420}$  aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* wurde von Le Van *et al.* (1985) untersucht. Es ergab sich aus Fütterungsversuchen mit  $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat, daß die Ribityluntereinheit durch Reduktion von Ribose entsteht und daß der Vorläufer des Pyrimidin-Ringes ein Purinderivat, wahrscheinlich aus Guanin, ist. Sie postulierten weiter, daß der carbozyklische Ring ausgehend von einem Produkt des Shikimat-Weges synthetisiert wird. Jaenchen *et al.* (1984) waren der Meinung, daß Tyrosin der Vorläufer ist, da in Tyrosin und in den carbozyklischen Ring des freigesetzten  $F_0$  die  $^{13}\text{C}$ -Bausteine in gleicher Weise eingebaut wurden. Die Biosynthese der Seitenkette ist bisher nicht untersucht worden.

Aus den Sequenzvergleichen vor Beginn dieser Arbeit ergab sich, daß LmbY einer Proteinfamilie zugeordnet werden kann, der auch Alkanal-Monooxygenasen (LuxA-Proteine) angehören (Zhang, 1993). Zwei konservierte Regionen befinden sich am N- (As 94 - 109) und am C-Terminus (As 271 -286) des Proteins. Zhang (1993) postulierte zunächst drei Funktionen, die LmbY ausführen könnte: (1) LmbY könnte die Funktion einer Aromaten-Monooxygenase haben und die Oxidation eines L-Tyrosin-Derivates katalysieren. (2) Bei LmbY könnte es sich um eine Aromaten-Dioxygenase handeln, welche die Dioxidation von L-DOPA katalysiert. (3) LmbY könnte als Sensorprotein zusammen mit LmbU (*lmbU* liegt direkt stromaufwärts von *lmbY* auf dem Chromosom) fungieren und regulatorische Funktionen haben, denn es wurden ebenfalls Ähnlichkeiten zu FixL gefunden, welches ein Sensorprotein aus *Rhizobium meliloti* darstellt. Bei LmbY fehlen allerdings an bestimmten



**Abb. 1-5.** Postulierte Funktionen von LmbY. Die linken Reaktionen wurden von Peschke *et al.* (1995) postuliert. Die theoretischen Reaktionsmöglichkeiten für LmbY wurden erweitert, da der folgende Schritt von DDPPL nach PPL ebenfalls eine Reduktion darstellt. In beiden Fällen wird angenommen, daß LmbY entweder eine  $F_{420}$ :TDPPL/DDPPL-Reduktase oder eine NADPH: $F_{420}$ -Reduktase sein könnte. TDPPL, 1,2,3,6-Tetrahydropropylprolin; DDPPL, 2,3-Didehydropropylprolin; PPL, Propylprolin.

Stellen für Sensorproteine charakteristische Aminosäuren. Die Funktionen für LmbY der beiden ersten Annahmen wurden in dieser Arbeit den Enzymen LmbB1 und LmbB2 zugewiesen (vgl. Abschnitte 3.1 und 4.1).

Das Translationsprodukt von *lmbX* zeigte Verwandtschaft zu Enzymen des Zucker-Metabolismus. LmbX wies im Bereich der As 102 - 130 signifikante Ähnlichkeiten zu der 3-Deoxy-D-manno-octulonsäure-Transferase (KdtA) aus *E. coli* auf, deren Substrat strukturell ähnlich dem Octose-8-phosphat des Lm-Biosyntheseweges (s. Abb. 1-3) sein könnte. Dieser Annahme widersprechen aber die in dieser Arbeit hergestellten *S. lincolnensis*-Mutanten (vgl. Abschnitte 3.2 und 4.2).

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

Die Biosynthese von Lm in *S. lincolnensis* wurde schon von anderen Arbeitsgruppen untersucht. Trotz der vielfältigen dabei angewandten Analysemethoden und anderen durchgeführten Experimenten, konnten immer nur Teilaspekte der Lm-Biosynthese aufgedeckt werden, d.h. keiner der beiden Pfade, die zu den Untereinheiten PPL und MTL führen, ist lückenlos erforscht. In dieser Arbeit sollten Beiträge zur Aufklärung der ersten und der letzten Reaktionen des Biosynthesepfades, der zur PPL-Untereinheit führt, geleistet werden.

Die Enzyme LmbA, LmbB1 und LmbB2 sollten einzeln oder in Kombination auf L-DOPA-umwandelnde Aktivität untersucht werden. Es galt einen Enzymtest für das gefundene Enzym oder das Holoenzym zu etablieren und das Produkt dieser Umsetzung, eine gelbe Substanz, zu analysieren.

Ein anderer Schwerpunkt in dieser Arbeit wurde auf die Analyse des Gens *lmbY* gelegt. Zunächst war es Aufgabe, *lmbY*-Insertionsmutanten von *S. lincolnensis* herzustellen, die einen Lm- bzw. PPL-negativen Phänotyp aufweisen sollten. Diese galt es nach einer genetischen Analyse mittels Substratfütterung (z.B. PPL) oder durch Transformation mit geeigneten Plasmiden zu komplementieren. Ferner sollten durch Fütterung der hergestellten Mutanten mit <sup>14</sup>C-markiertem Tyrosin Aussagen über die angehäuften Syntheseprodukte gemacht werden, diese isoliert und auf Umsetzung durch LmbY getestet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Tab. 2-1. Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

| Stamm <sup>a</sup>                    | Genotyp/Antibiotikum <sup>b</sup>   | Herkunft                     |
|---------------------------------------|---|------------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$           | F <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , $\phi$ 80d, <i>endA1</i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>relA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i>  | Hanahan, 1983                |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)             | F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> , $\lambda$ (DE3)  | Studier <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>E. coli</i> JM109 (DE3)            | F' <i>traD36 proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>R</sup> Z M15, <i>relA1</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> $\Delta$ ( <i>lac-proA,B</i> ), <i>thi-1</i> , $\lambda$ (DE3)   | Promega (Heidelberg)         |
| <i>E. coli</i> JM110                  | F' <i>traD36 proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>R</sup> Z M15, <i>relA1</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> $\Delta$ ( <i>lac-proA,B</i> ), <i>thi-1</i> , <i>dam</i> <sup>-</sup> , <i>dcm</i> <sup>-</sup>               | Promega (Heidelberg)         |
| <i>E. coli</i> ET12567                | F <sup>-</sup> , <i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>recF143</i> , <i>zjj201::Tn10</i> , <i>galk2</i> , <i>galT22</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>xyl-5</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>hisG4</i> , <i>tsx-78</i> , <i>mtl-1</i> <i>glnV44</i> | Oh und Chater, 1997          |
| <i>M. luteus</i> DSM 348              | Er <sup>S</sup> , Lm <sup>S</sup> , Ts <sup>S</sup> , Am <sup>R</sup> , Hy <sup>R</sup>   | DSM; Tang, G.                |
| <i>M. luteus</i> DN218                | Er <sup>S</sup> , Lm <sup>S</sup> , Am <sup>R</sup> , Hy <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>   | diese Arbeit                 |
| <i>S. caelestis</i> NRRL 2418         | <u>Celesticetin</u>   | Laborsammlung                |
| <i>S. spinosus</i> NRRL 5729          | <u>Lm</u>   | Laborsammlung                |
| <i>S. galbus</i> DSM 40480            | <u>Sm</u>   | DSM; Laborsammlung           |
| <i>S. glaucescens</i> GLA.0 DSM 40716 | <u>Hydroxy-Sm</u>   | DSM; Laborsammlung           |
| <i>S. griseus</i> DSM 40236           | <u>Sm</u> , Wildtyp   | DSM; Laborsammlung           |
| <i>S. griseus</i> N2-3-11             | <u>Sm</u> , Sm-überprod. Mutante  | Kaken Chem. Co., Tokyo       |
| <i>S. lincolnensis</i> 78-11          | <u>Lm</u> , P <sup>R</sup> c, Lm-überprod. Mutante  | Tang, G.                     |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936      | <u>Lm</u> , P <sup>S</sup> c, Wildtyp   | Swezey, J. L.                |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu1  | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbY</i> , <i>lmbX</i>  | diese Arbeit                 |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu2  | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbY</i> , <i>lmbX</i>  | diese Arbeit                 |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu3  | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbY</i> , <i>lmbX</i>  | diese Arbeit                 |

| Stamm <sup>a</sup>                                 | Genotyp/Antibiotikum <sup>b</sup>   | Herkunft  |
|--|---|---|
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu4               | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbX</i>  | diese Arbeit  |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu5               | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbY</i> , <i>lmbX</i>  | diese Arbeit  |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu6               | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbY</i> , <i>lmbX</i>  | diese Arbeit  |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu7               | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbY</i> , <i>lmbX</i>  | diese Arbeit  |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu8               | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbY</i> , <i>lmbX</i>  | diese Arbeit  |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu9               | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbY</i> , <i>lmbX</i><br><sup>d</sup>  | diese Arbeit  |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 Mu10              | Lm <sup>-</sup> , PPL <sup>-</sup> , Am <sup>R</sup> ( <i>aacC4</i> ), <i>lmbY</i> , <i>lmbX</i>  | diese Arbeit  |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 5321                   | Lm <sup>-</sup>   | Tang, G.  |
| <i>S. lividans</i> 66 TK23                         | <i>spc-1</i> , Lm <sup>S</sup>  | John Innes Institute,<br>Hopwood <i>et al.</i> , 1985 |
| <i>S. lividans</i> 66 TK23/<br>pSTW13.2i/pSTW350/0 | <i>spc-1</i> , Lm <sup>S</sup> , pSTW13.2 (mini-circle,<br><i>strB1p</i> vor <i>xyIE</i> , Hy <sup>R</sup> ), pSTW350/0<br>( <i>strRp</i> vor <i>strR</i> , Ts <sup>R</sup> ) | Thamm, 1999   |
| <i>S. pseudogriseolus</i> NRRL 3985                | <u>Lm</u>   | Laborsammlung   |
| <i>S. sp. (espinosus)</i> NRRL 3890                | <u>Lm</u>   | Laborsammlung   |
| <i>S. vellosus</i> NRRL 8037                       | <u>Lm</u>   | Laborsammlung   |

<sup>a</sup> *E.*, *Escherichia*; *M.*, *Micrococcus*; *S.*, *Streptomyces*. <sup>b</sup> Die von den Bakterien synthetisierten Antibiotika sind unterstrichen dargestellt. <sup>c</sup> P<sup>S</sup>/P<sup>R</sup>, Phagen sensitiv/resistent. <sup>d</sup> Es ist möglich, daß in *S. lincolnensis* NRRL 2936 Mu9 *lmbX* noch intakt ist, wenn Transkription und Translation stromabwärts von *aacC4* nicht abbrechen (vgl. Abb. 3-18 [3.]).

## 2.1.2 Klonierungsvektoren und rekombinante Plasmide

**Tab. 2-2.** Übersicht der verwendeten Klonierungsvektoren.

| Vektor             | Eigenschaften   | Herkunft                             |
|--------------------|---|--------------------------------------|
| pBluescript II SK+ | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , <i>lacZα</i> , f1(+)  | Stratagene (Heidelberg)              |
| pET-11a            | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , <i>lacI<sup>P</sup></i> , <i>T7F10p</i>                             | Studier <i>et al.</i> , 1990         |
| pET-11all          | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , <i>lacI<sup>P</sup></i> , <i>T7F10p</i> , pQE60 RBS                 | Weingarten, P.<br>(unveröffentlicht) |
| pET-16b            | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , <i>lacI<sup>P</sup></i> , <i>T7F10p</i> , »His-tag«                 | Novagen (Madison, U.S.A.)            |
| pGM102             | pACYC184 <i>ori</i> , <i>aphII</i> , <i>cat</i> , pSG5 <i>ori</i> , <i>tsr</i>                      | Muth <i>et al.</i> , 1988            |
| pJOE837            | <i>bla</i> , <i>hyg<sup>R</sup></i> , <i>mel</i>  | Altenbuchner, 1988                   |
| pLysS              | pACYC184 mit Φ3.8 und nachfolgendem Lysozym-Gen in der <i>Bam</i> HI-Schnittstelle, Cm <sup>R</sup> | Studier <i>et al.</i> , 1990         |
| pT7-5              | <i>bla</i> , ColE1 <i>ori</i> , <i>T7F10p</i>   | Tabor und Richardson, 1985           |
| pT7-7              | <i>bla</i> , ColE1 <i>ori</i> , <i>T7F10p</i>   | Tabor und Richardson, 1985           |
| pUC18              | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , <i>lacZα</i> , <i>lacp</i>  | Vieira und Messing, 1982             |

| Vektor    | Eigenschaften  | Herkunft  |
|-----------|--|---|
| pUCAd2    | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , <i>lacp</i> , <i>E. coli</i> RBS  | Peschke, U. (unveröffentlicht)                    |
| pUCBM21   | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , <i>lacp</i>   | Vieira und Messing, 1982                          |
| pUWL201   | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , pJ101 <i>ori</i> , <i>tsr</i> , <i>ermEp</i>   | Wehmeier, U. F. (unveröffentlicht)                |
| pUWL201 N | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , pJ101 <i>ori</i> , <i>tsr</i> , <i>ermEp</i> , <i>NdeI</i> Schnittstelle durch Klenow-Behandlung deletiert | Weingarten, P./Wehmeier, U. F. (unveröffentlicht) |
| pUWL218   | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , pJ101 <i>ori</i> , <i>tsr</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i>   | Wehmeier, 1995                                    |
| pWKD13    | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , SCP2 <i>ori</i> , <i>tsr</i> , <i>mel</i> (promotorlos), <i>xyIE</i> (promotorlos)                         | Retzlaff und Distler, 1995                        |
| pWKD13II  | ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> , pJ101 <i>ori</i> , <i>tsr</i> , <i>mel</i> (promotorlos), <i>xyIE</i> (promotorlos)                        | Retzlaff und Distler, 1995                        |

**Tab. 2-3.** Übersicht der neu konstruierten rekombinanten Plasmide.

| rekombinantes Plasmid      | Eigenschaften   | Herkunft     |
|----------------------------|---|--------------|
| pBlue-272 <sup>a</sup>     | 0,27 kb <i>Clal/SmaI</i> Fragment aus pTU661-98 in pBluescript II SK+   | diese Arbeit |
| pBlue-434 <sup>a</sup>     | 0,44 kb <i>PstI/SmaI</i> Fragment aus pUC-434 B in pBluescript II SK+   | diese Arbeit |
| pBlueSK+dUYdX <sup>a</sup> | 2,1 kb <i>SmaI</i> Fragment aus pTU661-98 in pBluescript II SK+   | diese Arbeit |
| pDNW1 <sup>b</sup>         | 1,0 kb <i>NaeI/SalI</i> Fragment aus pSZW755 in pUC18   | Neußer, 1995 |
| pDNW1 K <sup>a,b</sup>     | <i>KpnI</i> Schnittstelle in pDNW1 durch Klenow-Behandlung deletiert  | diese Arbeit |
| pDNW2 <sup>b</sup>         | 1,0 kb <i>EcoRI/PstI</i> Fragment aus pDNW1 in pUWL201  | Neußer, 1995 |
| pDNW2 K <sup>a,b</sup>     | 1,0 kb <i>EcoRI/PstI</i> Fragment aus pDNW1 K in pUWL201  | diese Arbeit |
| pDNW3 <sup>b</sup>         | 1,0 kb <i>KpnI/SalI</i> Fragment aus pDNW1 in pBluescript II SK+  | Neußer, 1995 |
| pDNW13.1 <sup>a,b</sup>    | 0,48 kb <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUC18-B1 in pT7-7  | diese Arbeit |
| pDNW13.2 <sup>a,b</sup>    | 0,95 kb <i>NdeI/EcoRI</i> Fragment aus pUC18-B2 in pT7-7  | diese Arbeit |
| pDNW13.12 <sup>a,b</sup>   | 1,43 kb <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUC18-B1B2 in pT7-7  | diese Arbeit |
| pDNW14.1 <sup>a,b</sup>    | 0,50 kb <i>HindIII/BamHI</i> Fragment aus pUCBM21-B1 in pUWL201   | diese Arbeit |
| pDNW14.2 <sup>a,b</sup>    | 0,97 kb <i>HindIII/BamHI</i> Fragment aus pUCBM21-B2 in pUWL201   | diese Arbeit |
| pDNW14.12 <sup>a,b</sup>   | 1,47 kb <i>HindIII/BamHI</i> Fragment aus pUCBM21-B1B2 in pUWL201   | diese Arbeit |
| pDNW15.1 <sup>a,b</sup>    | 0,48 kb <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUC18-B1 in pET-16b  | diese Arbeit |
| pDNW15.2 <sup>a,b</sup>    | 0,95 kb <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUC18-B2 in pET-16b  | diese Arbeit |
| pDNW16 <sup>a,b</sup>      | 0,88 kb <i>NdeI/BamHI</i> PCR Fragment (Quelle: pDNW3) in pET-16b   | diese Arbeit |
| pDNW25E <sup>a,b</sup>     | 1,3 kb <i>SmaI/EcoRV</i> Apramycin Fragment aus pEFBA in pBlueSK+dUYdX ( <i>SphI/Klenow</i> ), Genorientierungen von <i>aacC4</i> und <i>lmbY</i> gleich          | diese Arbeit |
| pDNW25Z <sup>a,b</sup>     | 1,3 kb <i>SmaI/EcoRV</i> Apramycin Fragment aus pEFBA in pBlueSK+dUYdX ( <i>SphI/Klenow</i> ), Genorientierungen von <i>aacC4</i> und <i>lmbY</i> entgegengesetzt | diese Arbeit |

| rekombinantes Plasmid      | Eigenschaften   | Herkunft                     |
|----------------------------|---|------------------------------|
| pDNW26                     | 1,3 kb <i>HindIII</i> Fragment aus pUCDN16 in pUWL201   | diese Arbeit                 |
| pDNW26RBSY <sup>a,b</sup>  | 1,3 kb <i>KpnI/BamHI</i> Fragment aus pSPDN16 in pUWL201 N                                    | diese Arbeit                 |
| pDNW27 <sup>a,b</sup>      | 2,1 kb <i>HindIII/EcoRI</i> Fragment aus pUC-YX in pUWL218                                    | diese Arbeit                 |
| pDNW27J <sup>a,b</sup>     | 2,1 kb <i>HindIII/EcoRI</i> (Klenow) Fragment aus pDNW27 in pJOE837 ( <i>HindIII/EcoRV</i> )  | diese Arbeit                 |
| pDNW28 <sup>a,b</sup>      | 2,95 kb <i>BglII/EcoRI</i> Fragment aus pTU661-98 in pUWL218                                  | diese Arbeit                 |
| pDNW28J <sup>a,b</sup>     | 2,95 kb <i>HindIII/EcoRI</i> (Klenow) Fragment aus pDNW27 in pJOE837 ( <i>HindIII/EcoRV</i> ) | diese Arbeit                 |
| pDNW31II <sup>a,b</sup>    | 0,30 kb <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment aus pUC-272 in pWKD13II                                   | diese Arbeit                 |
| pDNW32II <sup>a,b</sup>    | 0,44 kb <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment aus pBlue-434 in pWKD13II                                 | diese Arbeit                 |
| pDNW33II <sup>a,b</sup>    | 0,44 kb <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment aus pUC-434 in pWKD13II                                   | diese Arbeit                 |
| pEFBA <sup>b</sup>         | 1,46 kb <i>PstI/SpeI aacC4</i> Fragment in pBluescript II SK+                                 | Fernández, E.                |
| pET16B1 <sup>b</sup>       | 0,48 kb PCR Fragment (Quelle: NRRL 2936) in pET-16b   | Neusser <i>et al.</i> , 1998 |
| pET16B2 <sup>b</sup>       | 0,95 kb PCR Fragment (Quelle: NRRL 2936) in pET-16b   | Neusser <i>et al.</i> , 1998 |
| pET16B1B2 <sup>b</sup>     | 0,58 kb <i>XbaI/SpeI lmbB1</i> Fragment aus pET16B1 in pET16B2 ( <i>XbaI</i> )                | Neusser <i>et al.</i> , 1998 |
| pSPDN16 <sup>a</sup>       | 0,98 kb <i>XbaI/BamHI</i> Fragment aus pDNW16 in pSPORT1                                      | diese Arbeit                 |
| pSPDN16RBSY <sup>a</sup>   | 0,3 kb <i>KpnI/NcoI</i> PCR Fragment (Quelle: pDNW2 K) in pSPDN16                             | diese Arbeit                 |
| pSZW755 <sup>b</sup>       | 1,6 kb <i>SmaI/SalI</i> Fragment aus pTU661-98 in pUC18                                       | Zhang, 1993                  |
| pT7AdExAB12                | 3,4 kb <i>HindIII/XbaI</i> Fragment aus pUCAdExAB12 in pT7-6                                  | Schmidt, 1994                |
| pTU661-98 <sup>b</sup>     | 4,1 kb <i>SstI</i> Fragment in pUC18  | Zhang, 1993                  |
| pUC18-B1 <sup>a</sup>      | 0,48 kb blunt PCR Fragment (Quelle: 78-11) in pUC18 ( <i>SmaI</i> )                           | diese Arbeit                 |
| pUC18-B2 <sup>a</sup>      | 0,95 kb blunt PCR Fragment (Quelle: 78-11) in pUC18 ( <i>SmaI</i> )                           | diese Arbeit                 |
| pUC18-B1B2 <sup>a</sup>    | 1,43 kb blunt PCR Fragment (Quelle: 78-11) in pUC18 ( <i>SmaI</i> )                           | diese Arbeit                 |
| pUC-272 <sup>a</sup>       | 0,29 kb <i>KpnI/BamHI</i> Fragment aus pTU661-98 in pUC18                                     | diese Arbeit                 |
| pUC-434 <sup>a</sup>       | 0,43 kb <i>BamHI/SmaI</i> Fragment aus pTU661-98 in pUC18                                     | diese Arbeit                 |
| pUC-434 B <sup>a</sup>     | <i>BamHI</i> Schnittstelle in pUC-434 durch Klenow-Behandlung deletiert                       | diese Arbeit                 |
| pUC-YX <sup>a</sup>        | 2,1 kb <i>XhoI/EcoRI</i> Fragment aus pTU661-98 in pUC18 ( <i>Sall/EcoRI</i> )                | diese Arbeit                 |
| pUCAd2-lmbB1 <sup>a</sup>  | 0,6 kb <i>NcoI/BamHI</i> Fragment aus pET16B1 in pUCAd2                                       | diese Arbeit                 |
| pUCAd2-lmbB2 <sup>a</sup>  | 1,3 kb <i>NcoI/BamHI</i> Fragment aus pET16B1 in pUCAd2                                       | diese Arbeit                 |
| pUCBM21-B1 <sup>a</sup>    | 0,49 kb <i>XbaI/BamHI</i> Fragment aus pDNW13.1 in pUCBM21                                    | diese Arbeit                 |
| pUCBM21-B2 <sup>a</sup>    | 0,96 kb <i>XbaI/BamHI</i> Fragment aus pDNW13.2 in pUCBM21                                    | diese Arbeit                 |
| pUCBM21-B1B2 <sup>a</sup>  | 1,45 kb <i>XbaI/BamHI</i> Fragment aus pDNW13.12 in pUCBM21                                   | diese Arbeit                 |
| pUCDN16                    | 1,3 kb <i>XbaI/BamHI</i> Fragment aus pDNW16 in pUC18   | diese Arbeit                 |
| pUWL201-lmbB1 <sup>a</sup> | 0,6 kb <i>HindIII/BamHI</i> Fragment aus pUCAd2-lmbB1 in pUWL201                              | diese Arbeit                 |
| pUWL201-lmbB2 <sup>a</sup> | 1,3 kb <i>HindIII/BamHI</i> Fragment aus pUCAd2-lmbB1 in pUWL201                              | diese Arbeit                 |

<sup>a</sup> Klonierungsstrategie in Anhang 2. <sup>b</sup> Plasmidkarte in Anhang 3.

### 2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Kits

Wenn nicht anders vermerkt, wurde nur entmineralisiertes doppelt destilliertes Wasser (dd H<sub>2</sub>O) verwendet. Die für diese Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen.

#### *Chemikalien*

|   |  |
|---|--|
| Agarose LE.....   | Roche Diagnostics, Mannheim  |
| Antibiotika.....  | Serva, Heidelberg; Roche Diagnostics, Mannheim;<br>Squibb and Sons, Princeton (U.S.A.); Sigma-Aldrich,<br>Deisenhofen            |
| Blockierungsreagenz, Pefabloc <sup>®</sup> SC, Chaps..... | Roche Diagnostics, Mannheim  |
| Chemikalien, p. a. Qualität .....                         | Fluka, Buchs; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe;<br>Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Deisenhofen<br>Roche Diagnostics, Mannheim |
| DC-Platten .....  | Merck, Darmstadt   |
| Propylprolin.....   | Shiau-Ta Chung, Pharmacia & Upjohn,<br>Kalamazoo (U.S.A.)  |
| dNTPs.....  | Roche Diagnostics, Mannheim  |
| Hybond N <sup>+</sup> -Membran .....                      | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg   |
| Medienbestandteile.....                                   | Gibco BRL, Eggenstein; Difco, Detroit (U.S.A.);<br>Merck, Darmstadt; Oxoid, Wesel; Roth, Karlsruhe                               |
| Ni-NTA-Agarose .....                                      | Qiagen, Hilden   |
| PVDF-Membran (Hybond P) .....                             | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg   |
| Radiochemikalien, Röntgenfilme .....                      | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg   |
| Antibiotikatestplättchen (Ø 0,9 mm) .....                 | Schleicher & Schüll, Dassel/Relliehausen   |

#### *Enzyme*

|   |  |
|---|--|
| Alkalische Phosphatase (CIP),<br>einschließlich 10× Puffer..... | Roche Diagnostics, Mannheim  |
| DNA Polymerase I (Klenow Fragment) .....                        | Gibco BRL, Eggenstein  |
| DNase I (RNase frei) .....                                      | Roche Diagnostics, Mannheim  |
| Lysozym .....   | Serva, Heidelberg  |
| Restriktionsendonukleasen,<br>einschließlich 10× Puffer.....    | Gibco BRL, Eggenstein; Roche Diagnostics,<br>Mannheim; Biolabs, Schwalbach |
| Ribonuklease A .....  | Sigma-Aldrich, Deisenhofen   |
| T4-DNA Ligase, einschließlich 5× Puffer .....                   | Gibco BRL, Eggenstein  |

*Taq* DNA-Polymerase,  
einschließlich 10× Puffer/Salze .....Gibco BRL, Eggenstein  
Vent DNA-Polymerase, einschließlich 10× Puffer.....Biolabs, Schwalbach

### Kits

Chromogenic Western Blotting Kit .....Roche Diagnostics, Mannheim  
Jet-Sorb Kit.....Genomed, Bad Oeynhausen  
Protein Assay Kit.....BioRad, München  
QIAprep Spin Miniprep Kit.....Qiagen, Hilden  
NucleoSpin System.....Macherey-Nagel, Düren  
QIAquick Gel Extraction Kit.....Qiagen, Hilden  
QIAquick PCR Purification Kit.....Qiagen, Hilden  
NucleoSpin Extract 2 in 1 .....Macherey-Nagel, Düren  
*rediprime* Random Primer Labelling Kit.....Amersham Buchler, Braunschweig  
DIG-High Prime Kit .....Roche Diagnostics, Mannheim  
DIG Nucleic Acid Detection Kit .....Roche Diagnostics, Mannheim  
T7-Sequenase 7-deaza-dGTP DNA sequencing Kit...Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  
Thermosequenase Cycle Sequencing Kit .....Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2-4 aufgeführt. Sie wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg), Gibco BRL (Eggenstein) und Interactiva (Ulm) bezogen. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die eingefügten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

**Tab. 2-4.** Übersicht der verwendeten Oligonukleotide. Die Erkennungsstellen von Restriktionsendonukleasen sind in den Sequenzen unterstrichen und in Klammern hinter den Bezeichnungen vermerkt, wenn nicht schon im Oligonukleotidnamen enthalten. Die Namen und die Sequenzen der Oligonukleotide wurden durch die Schriftart »Courier« kenntlich gemacht.

| Bezeichnung                           | 5´-Sequenz-3´, Länge (nt)                           | Anlagerungs-<br>temperatur<br>(Fehlpaarungen) |
|---------------------------------------|---|---|
| 1mbY-SphI-2                           | 5´-GGCGA <u>AG</u> CATGCGCCACGGTGTTCGT-3´, 25       | 71,1 (1)                                      |
| 1mbY-NdeI-2                           | 5´-GGCGA <u>CATATG</u> CGCCACGGTGTTCGT-3´, 25       | 58,0 (3)                                      |
| 1mbY-SalI                             | 5´-ACATG <u>T</u> CGACCATCTCGAAC-3´, 20             | 51,7 (0)                                      |
| 1mbB1a ( <i>NdeI</i> )                | 5´-GG <u>CATATG</u> CCGTCAGTAAAGTCAATGC-3´, 27      | 60,0 (3)                                      |
| 1mbB1b ( <i>Bam</i> HI, <i>SpeI</i> ) | 5´-GCGGAT <u>CCACTAGT</u> GAACTCATCGGGGCCGTC-3´, 33 | 60,0 (6)                                      |

| Bezeichnung              | 5'-Sequenz-3', Länge (nt)                | Anlagerungs-<br>temperatur<br>(Fehlpaarungen) |
|--------------------------|--|---|
| 1mbB2a ( <i>NdeI</i> )   | 5'-GGCATATGAGTTCACTCGAGGCACGCCGCA-3', 30 | 60,0 (3)                                      |
| 1mbB2b ( <i>BglII</i> )  | 5'-CCAGATCTCAACTCGCCGCCGCGGTGGC-3', 28   | 60,0 (3)                                      |
| 1mbB1aN ( <i>NdeI</i> )  | 5'-AGGGAGGCCCATATGCCGTCAGTAA-3', 25      | 51,6 (3)                                      |
| 1mbB1bN ( <i>BamHI</i> ) | 5'-CGGTGCGGGGATCCTCGAGTGAAGT-3', 25      | 55,9 (3)                                      |
| 1mbB2aN ( <i>NdeI</i> )  | 5'-ACGGCCCCCATATGAGTTCACTCGA-3', 24      | 49,3 (3)                                      |
| 1mbB2bN (-)              | 5'-GCCCCGCGAGATGTCAACTCGCCGC-3', 24      | 54,2 (4)                                      |
| 1mbX-NdeI                | 5'-CCGGAGGACATATGATCGTGGTCCCGTT-3', 28   | 58,1 (3)                                      |
| 1mbX-BglII               | 5'-CTGACGCAAGGAGATCTCGGCGACTACA-3', 28   | 56,6 (3)                                      |
| 1mbY-a                   | 5'-ATGCGCCACGGTGTCTGTG-3', 18            | 60,9 (0)                                      |
| 1mbY-e                   | 5'-TCATGCTTCCTCCGGTGCG-3', 19            | 61,5 (0)                                      |
| aacC4-a                  | 5'-ATGCCCTCGTGGTCAGGTCTG-3', 21          | 60,7 (0)                                      |
| aacC4-e                  | 5'-TCATGAGCTCAGCCAATCGACTG-3', 23        | 61,1 (0)                                      |
| RBSY-KpnI                | 5'-GGTACCAGCCCCGACCCGAGCA-3', 21         | 66,8 (0)                                      |
| RBSY-NcoI                | 5'-GCCCATGGTTTCGCCCCGCTCTCCTC-3', 24     | 67,5 (1)                                      |

### 2.1.5 Nährmedien

Wenn nicht gesondert angegeben, wurden alle Medien- und Lösungsbestandteile in destilliertem Wasser gelöst.

#### Nährmedien für *E. coli*:

##### LB-Medium/-Agar (Miller, 1972)

|        |             |
|--------|-------------|
| 10 g/l | Trypton     |
| 5 g/l  | Hefeextrakt |
| 5 g/l  | NaCl        |
| 17 g/l | Agar        |

##### M9-Salzlösung

|       |   |
|-------|---|
| 64 g  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O |
| 15 g  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       |
| 2,5 g | NaCl  |
| 5 g   | NH <sub>4</sub> Cl                                    |

ad 1 l, 15 min autoklavieren.

##### M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

|  |                   |
|--|-------------------|
| 20 %   | 5× M9-Salzlösung  |
| 2 %  | 1 M Glucoselösung |
| ad 1 l mit sterilem dd H <sub>2</sub> O auffüllen. |                   |

##### Slant 50:50 (Wehmeier, 1991)

|        |                     |
|--------|---------------------|
| 5 g    | Difco Bacto-Trypton |
| 2,5 g  | Difco Hefeextrakt   |
| 250 ml | dd H <sub>2</sub> O |
| 250 ml | 87 % Glycerin (v/v) |

**Slant-Medium** (Wehmeier, 1991)

|         |                     |
|---------|---------------------|
| 20 g    | Difco Bacto-Trypton |
| 10 g    | Difco Hefeextrakt   |
| 10 ml   | 20 % Glycerin       |
| ad 1 l. |                     |

**SOB-Medium** (Hanahan, 1983)

|        |                     |
|--------|---------------------|
| 2 %    | Difco Bacto-Trypton |
| 10 mM  | NaCl                |
| 2,5 mM | KCl                 |
| 0,5 %  | Hefeextrakt         |

→ Forts. nächste Spalte

Lösung autoklavieren und einstellen auf:

|       |                   |
|-------|-------------------|
| 10 mM | MgCl <sub>2</sub> |
| 10 mM | MgSO <sub>4</sub> |

**SOC-Medium** (Hanahan, 1983)

SOB-Medium einstellen auf:

|       |           |
|-------|-----------|
| 20 mM | D-Glucose |
|-------|-----------|

**2× TY-Medium** (Miller, 1972)

|        |             |
|--------|-------------|
| 16 g/l | Trypton     |
| 10 g/l | Hefeextrakt |
| 5 g/l  | NaCl        |

**Nährmedien für Streptomycceten:****Chemisch definiertes Medium, CDM**(Witz *et al.*, 1971)

|         |  |
|---------|--|
| 30 g/l  | Glucose                                |
| 1 mg/l  | ZnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O   |
| 1 mg/l  | FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O |
| 1 g/l   | MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O |
| 0,5 g/l | NaCl                                   |

in 900 ml dd H<sub>2</sub>O lösen, autoklavieren und in das erkaltete Medium 100 ml CDM-Lösung (10×) zufügen.

**CDM-Lösung (10×)**

|        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| 30 g/l | Trinatriumcitrat                |
| 20 g/l | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> |
| 25 g/l | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |

mit Schwefelsäure auf pH 7,0 einstellen und sterilfiltrieren.

**SMA-Agar** (Distler *et al.*, 1985)

|                        |          |
|------------------------|----------|
| 20 g/l                 | Sojamehl |
| 20 g/l                 | D-Mannit |
| 20 g/l                 | Agar     |
| ad 1 l Leitungswasser. |          |

**SNA-Agar** (Zhang, 1993)

|       |                |
|-------|----------------|
| 0,8 % | Nutrient-Broth |
| 0,6 % | Agar           |

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

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| 103 g                                     | Saccharose                      |
| 10 g                                      | MgCl <sub>2</sub>               |
| 5 g                                       | D-Glucose                       |
| 5 g                                       | Difco Hefeextrakt               |
| 22 g                                      | Difco Agar                      |
| 20 ml                                     | 1 M TES, pH 7,6 (mit 10 M NaOH) |
| 2 ml                                      | Spurenelementlösung             |
| ad 1 l, autoklavieren und später zugeben: |                                 |
| 2 ml                                      | 5 M CaCl <sub>2</sub>           |

**TSB-Medium** (Hopwood *et al.*, 1985)

|        |   |
|--------|---|
| 30 g/l | Oxoid Tryptone Soja Broth powder (LM 129) |
|--------|---|

**TSB-Mg-Gly-Medium** (Hopwood *et al.*, 1985)

|        |   |
|--------|---|
| 30 g/l | Oxoid Tryptone Soja Broth powder (LM 129) |
| 5 mM   | MgCl <sub>2</sub>                         |
| 0,5 %  | Glycin                                    |

### 2.1.6 Antibiotika

Von den Antibiotika wurden Stammlösungen erstellt, sterilfiltriert und wenn erforderlich die Medien mit ihnen supplementiert. Soweit nicht gesondert angegeben, wurden die Antibiotika in doppelt destilliertem Wasser aufgenommen.

| Antibiotikum (Abk.)      | Stammlösung    | Endkonzentration im Medium |
|--------------------------|----------------|----------------------------|
| Ampicillin, Na-Salz (Ap) | 100×           | 100 µg/ml                  |
| Apramycin (Am)           | 1000×/500×     | 12,5 (SMA)/25 (SPMR) µg/ml |
| Chloramphenicol (Cm)     | 100×           | 25 µg/ml                   |
| Hygromycin B (Hy)        | 1000×          | 250 µg/ml                  |
| Lincomycin (Lm)          | 100×           | 30 µg/ml                   |
| Thiostrepton (Ts)        | 1000×, in DMSO | 25 µg/ml                   |
| Tobramycin (Tb)          | 100×           | 10 µg/ml                   |
| Kanamycin, Sulfat (Kn)   | 100×           | 2,5 µg/ml                  |

### 2.1.7 Lösungen

#### Blaumarker für AGE (5×)

(Sambrook *et al.*, 1989)

100 mM EDTA, pH 8,0

0,25 % Bromphenol (dunkelblau)

0,25 % p-Xylenol (hellblau)

in 50 % Glycerin.

#### DEPC-behandeltes Wasser

0,15 % Diethylpyrocarbonat

vor dem Autoklavieren min. 1 d bei 37 °C

inkubieren.

#### dNTP-Stammlösung

1,25 mM dATP

1,25 mM dCTP

1,25 mM dGTP

1,25 mM dTTP

Lagerung bei 4 °C.

#### L-DOPA-Stammlösung

10 mM L-Dihydroxyphenylalanin  
(1,973 mg/ml)

#### F<sub>0</sub>-Stammlösung (50×)

1,25 mM Faktor F<sub>0</sub> (0,454 mg/ml)

Lagerung bei -20 °C (dunkel).

#### F<sub>420</sub>-Stammlösung (50×)

1,25 mM Faktor F<sub>420</sub> (0,951 mg/ml)

Lagerung bei -20 °C (dunkel).

#### Formaldehyd-RNA-Gel-Lösungen

(Sambrook *et al.*, 1989)

#### - 10× MOPS-Laufpuffer

200 mM MOPS (4-Morpholinpropansulfonsäure)

50 mM NaOAc

10 mM EDTA

in DEPC-H<sub>2</sub>O ansetzen, mit 10 M NaOH auf pH 7,0 einstellen und nicht autoklavieren.

**Forts. Formaldehyd-RNA-Gel-Lösungen:****- 1× MOPS-Laufpuffer**

10 % 10× MOPS-Laufpuffer  
 0,22 M Formaldehyd  
 in DEPC-H<sub>2</sub>O ansetzen, EtBr hinzufügen.

**- Auftragspuffer**

50 µl Formamid  
 5 µl 2 % Bromphenolblau  
 46 µl Glycerin  
 immer frisch ansetzen.

**- Aufnahmebuffer**

56 µl DEPC-H<sub>2</sub>O  
 100 µl Formamid  
 34 µl Formaldehyd  
 10 µl 10× MOPS-Laufpuffer  
 immer frisch ansetzen.

**FSB-Puffer** (Hanahan *et al.*, 1983)

10 mM KOAc  
 100 mM KCl  
 45 mM MnCl<sub>2</sub>  
 10 mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
 3 mM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub>  
 10 % Glycerin (w/v)  
 mit HCl auf pH 6,4 einstellen.

**Glucose-Stammlösung (100×)**

1 M D-Glucose

**»High SDS«-Puffer** (Roche Diagnostics)

7 % SDS  
 50 % deionisiertes Formamid  
 5× SSC  
 2 % Blockierungsreagenz  
 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0  
 0,1 % N-Lauroylsarcosin

**IPTG-Stammlösung**

100 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid  
 sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C.

**λ-DNA-Größenmarker**

40 µg λ-DNA in 400 µl, mit *EcoRI* und  
*HindIII* geschnitten.

Fragmentgrößen (bp): 21700, 5150, 5000, 4268,  
 3420, 1980, 1904, 1590, 1330, 940, 831, 560,  
 148.

**Lysozym-Stammlösung**

40 mg/ml Lysozym  
 sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C.

**2-Mercaptoethanol-Stammlösung (10×)**

50 mM 2-Mercaptoethanol  
 (0,39 g ad 100 ml)

**P-Puffer** (Hopwood *et al.*, 1985)

103 g Saccharose  
 0,25 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 2,02 g MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O  
 2,0 ml Spurenelementlösung  
 ad 800 ml, autoklavieren und steril zugeben:  
 1 ml 0,5 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 10 ml 3,68 % CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
 10 ml 5,73 % TES, pH 7,2

**Phenol/CIA-Lösung** (Birnboim *et al.*, 1979)

25 VT Phenol  
 24 VT Chloroform  
 1 VT Isoamylalkohol

**PHA-Stammlösung**

58,5 mM Propylhygrinsäure · HCl (10 g/l)  
 in 100 mM TES, pH 7,6.

**PPL-Stammlösung**

31,8 mM Propylprolin (5 g/l)  
 in 20 mM TES, pH 7,6.

**Prähybridisierungslösung für DNA-DNA****Hybridisierungen (6× SSC)**

333 ml 20× SSC-Lösung  
 0,5 % SDS  
 1 g Blockierungsreagenz  
 ad 1 l, auf 90 °C erhitzen, bis das  
 Blockierungsreagenz gelöst ist.

**Proteingel-Lösungen für Gele nach****Laemmli (1970):****- Acryl-/Bisacrylamid-Lösung**

30,00 g Acrylamid  
 0,80 g Bisacrylamid  
 ad 100 ml, Lösung filtrieren.

**- Aufschlußpuffer (Höfer Scientific)**

1 VT Lösung A  
 1 VT Lösung B

**Lösung A**

120 mM Tris/HCl, pH 6,8  
 2 % SDS  
 2 % 2-Mercaptoethanol  
 20 % Glycerin

**Lösung B**

0,02 % Bromphenolblau

**- Elektrophoresepuffer (10×) (Laemmli, 1970)**

30,33 g Tris/HCl, pH 8,3  
 144,00 g L-Glycin  
 10,00 g SDS  
 ad 1 l.

**- Sammelgelpuffer (Laemmli, 1970)**

96 ml 521 mM Tris/HCl, pH 6,8  
 4 ml 10 % SDS

**- SDS-Gel-Entfärbelösung (Sambrook *et al.*, 1989)**

25 % Methanol  
 10 % Eisessig

Forts. **Proteingel-Lösungen für Gele nach Laemmli:**

**- SDS-Gel-Färbelösung (Sambrook *et al.*, 1989)**

0,125 % Coomassie Blue-Stammlösung  
 50 % Methanol  
 10 % Eisessig

Coomassie Blue-Stammlösung

2,0 g Coomassie Blue R250 (Serva Blue)  
 ad 200 ml, filtrieren.

**- Trenngelpuffer (Laemmli, 1970)**

96 ml 1,625 M Tris/HCl, pH 8,8  
 4 ml 10 % SDS

**Proteingel-Lösungen für Gele nach Schagger****und von Jagow (1987):****- Acryl-/Bisacrylamid-Lösung**

48 % (w/v) Acrylamid  
 1,5 % (w/v) Bisacrylamid  
 Lösung filtrieren.

**- Anodenpuffer (1×)**

0,2 M Tris/HCl, pH 8,9

**- Aufschlußpuffer**

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

**- Kathodenpuffer (1×)**

0,1 M Tris, pH 8,25  
 0,1 M Tricine  
 0,1 M SDS

**- Fixierungslösung**

50 % Methanol  
 10 % Eisessig

Forts. **Proteingel-Lösungen für Gele nach  
Schaegger und v. Jagow:**

**- Gelpuffer (3×)**

3 M Tris/HCl, pH 8,45  
0,3 M SDS

**- SDS-Gel-Entfärbelösung**

10 % Eisessig

**- SDS-Gel-Färbelösung**

0,025 % Serva Blue G-Stammlösung  
10 % Eisessig

**Proteingel-Marker (14 - 66 kDa)**

10 µl/Spur Dalton Mark VII-L  
(Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

$M_r$  (kDa):  $\alpha$ -Lactalbumin 14,2; Trypsin Inhibitor  
20,1; Trypsinogen, PMSF-behandelt 24,0;  
Carboanhydrase 29,0; Glycerinaldehyd-3-phosphat  
Dehydrogenase 36,0; Ovalbumin 45,0;  
Rinderserumalbumin 66,0.

**Proteingel-Marker (29 - 205 kDa)**

10 µl/Spur SDS-6H High Molecular Weight  
Standard Mixture (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)  
 $M_r$  (kDa): Carboanhydrase 29,0; Glycerinaldehyd-  
3-phosphat Dehydrogenase 36,0; Ovalbumin  
45,0; Rinderserumalbumin 66,0; Phosphorylase b  
97,4;  $\beta$ -Galaktosidase 116,0; Myosin 205,0.

**Proteingel-Marker (vorgefärbt)**

10 µl/Gel Prestained PAGE Marker (BioRad)  
 $M_r$  (kDa): 50; 45; 40; 35; 30; 23; 18; 9.

**Proteingel-Marker (vorgefärbt)**

10 µl/Gel Prestained PAGE Marker  
(Gibco BRL)  
 $M_r$  (kDa): 200,0; 97,4; 68,0; 43,0; 29,0; 18,4;  
14,3.

**Reinigung von His-tag•LmbB1:**

**- Lysepuffer (LP)**

300 mM NaCl  
50 mM Tris/HCl, pH 8,0

**- Waschpuffer 1 (WP1)**

300 mM NaCl  
50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
10 % Glycerin

**- Waschpuffer 2 (WP2)**

300 mM NaCl  
1 M Tris/HCl, pH 8,0  
10 % Glycerin

**- Elutionspuffer (EP)**

300 mM NaCl  
50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
10 % Glycerin  
200 mM Histidin

**RNase-Stammlösung (100×)**

20 mg/ml RNase  
Lagerung bei -20 °C

**SET-Puffer** (Pospiech und Neumann, 1995)

75 mM NaCl  
25 mM EDTA  
20 mM Tris/HCl, pH 7,5

**Spurenelementlösung** (Hopwood *et al.*, 1985)

40 mg/l  $ZnCl_2$   
200 mg/l  $FeCl_3$   
10 mg/l  $CuCl_2$   
10 mg/l  $MnCl_2$   
10 mg/l  $Na_2B_4O_7 \cdot 6 H_2O$   
10 mg/l  $(NH_2)_6Mo_7O_2 \cdot 2 H_2O$

**SSC-Lösung (20×)** (Sambrook *et al.*, 1989)

3,0 M NaCl  
 0,3 M Natriumcitrat  
 pH 7,2 mit Citronensäure einstellen;  
 bei Arbeiten mit RNA Lösung mit DEPC  
 behandeln.

**STET-Puffer** (Holmes und Quigley, 1981)

8 % Saccharose  
 10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
 50 mM EDTA  
 0,5 % Triton® X-100 (Octylphenolpoly-  
 ethylenglycolether)

**T-Puffer** (Hopwood *et al.*, 1985)

25 ml 10,3 % Saccharose  
 1,0 ml 2,5 % K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 0,2 ml Spurenelementlösung  
 75 ml dd H<sub>2</sub>O  
 autoklavieren und steril zugeben:  
 0,2 ml 0,25 M CaCl<sub>2</sub>  
 0,5 ml 1,0 M Tris/Maleinsäure, pH 8,0

**TAE-Puffer (50×)** (Sambrook *et al.*, 1989)

24,2 % Tris, pH 8,3  
 17 % Eisessig  
 0,05 mM EDTA

**TE-Puffer** (Sambrook *et al.*, 1989)

10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
 1 mM EDTA, pH 8,0

**TE/RNase-Lösung**

20 µg/ml RNase in TE-Puffer

**TES-Puffer**

20 µg/ml RNase in TE-Puffer

**Thiamin-Stammlösung (100×)**

20 mg/ml Thiamin · HCl  
 sterilfiltrieren.

**L-Tyrosin-Stammlösung (gesättigt)**

2,2 mM L-Tyrosin ( $\hat{=}$  max. Löslichkeit  
 bei 20 °C, 0,4 g/l)

**»Western Blot«-Lösungen:****- Amidoschwarzlösung** (Batteiger *et al.*, 1982)

1% (v/v) Amidoschwarz  
 in 90 % Methanol/10 % Essigsäure

**- Blockierungspuffer**

3 % Rinderserumalbumin  
 in TBS-Puffer.

**- TBS-Puffer**

10 mM Tris/HCl, pH 7,5  
 150 mM NaCl

**- TBST-Puffer**

20 mM Tris/HCl, pH 7,5  
 500 mM NaCl  
 0,05 % (v/v) Tween® 20  
 0,2 % (v/v) Triton® X-100

**- Western-Puffer**

1,01 g Tris, pH 8,3  
 4,80 g L-Glycin  
 10 ml 10 % SDS  
 ad 1 l.

**X-Gal-Stammlösung**

20 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl-  
 $\beta$ -D-galactopyranosid)  
 Lagerung bei -20 °C (dunkel).

**Zellpuffer**

100 mM NaCl  
 50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
 10 % (w/v) Saccharose

## 2.1.8 Geräte

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| DNA-Sequenzer                       | A.L.F. DNA-Sequenzer und A.L.F. Express,<br>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  |
| Agarosegel-Kammern                  | Geltray U.V. transparent (220V - 50 Hz),<br>Renner GmbH, Dannstadt  |
| Luftschüttler                       | TR-125 (200 rpm) / RC-106 (100 rpm),<br>Infors AG, Bottmingen, Schweiz;<br>GFL3020, Burgwedel;<br>G24 Environmental Incubator Shaker,<br>New Brunswick Scientific, Edison, N.J., U.S.A. |
| O <sub>2</sub> -Elektrode/Messzelle | Scientific Division, YSI Yellow Spring Instruments Co. Inc.,<br>Mod. 5301, Yellow Spring, Ohio, U.S.A.  |
| PCR-Thermoblock                     | Personal Cyclor, Biometra, Göttingen  |
| SDS-PAGE-Kammern                    | ServaBlueLine, Serva, Heidelberg<br>Renner GmbH, Dannstadt  |
| Speed-Vac                           | Vacuum Concentrator, Bachhofer, Reutlingen  |
| Ultraschall-Sonifier                | Sonoplus UW60 / Spannungsquelle HD60,<br>Bandelin electronic, Berlin  |
| UV-Leuchttisch                      | UV-Transilluminator, UVP Inc., 302 nm   |
| UV/VIS-Photometer                   | UVIKON 810, Kontron Instruments, Ecning bei München<br>UV/VIS-Spektrometer, Perkin Elmer, Überlingen  |
| Videophotographiersystem            | Video Copy Processor, Mitsubishi<br>mit einer Videokamera der Firma Intas   |
| Wasserbäder                         | Haake W13/D1, Karlsruhe;<br>Julabs 12B/PC, Seelbach   |
| Wasserbad -Schüttler                | Gyrotory Water bath shaker G76, New Brunswick Scientific,<br>Edison, N.J., U.S.A.   |
| »Western Blot« Apparatur            | TRANS-BLOT SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, München   |
| Zentrifugen                         | Sigma 3K1 (12 und 50 ml);<br>Sigma 3K10 (2, 12 und 50 ml);<br>Biofuge pico, Heraeus Instruments, Osterode (1,5 und 2 ml)  |

### 2.1.9 Computerprogramme

DNA- sowie Proteinsequenzanalysen wurden mit dem Programm »DNA Strider™ 1.2, A DNA And Sequence Analysis Program« (C. Marck, CEA, Frankreich) durchgeführt. Multiple Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm »Clustal W 1.7« (Metrowerks Inc.) durchgeführt. Paarweise Sequenzvergleiche mit den Datenbanken EMBL und SWISSPROT, sowie BLAST-Suchen wurden mit dem Programmpaket »FASTA 1.4x2« (Pearson und Lipman, 1988) erstellt. Hybridisierungstemperaturen von Oligonukleotiden wurden mit dem Programm »Primer-Find V. 3.0, A PCR-Primer Analysis Program« (Fröbel Labor-Geräte, Lindau) berechnet. Zirkuläre Plasmide wurden mit »MacPlasmap v1.82 und v2.1a2, A Plasmid Construction Program« (CGC Scientific Inc., St. Louis, U.S.A.) erstellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzuchtbedingungen und Lagerung von Bakterienkulturen

#### 2.2.1.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

*E. coli* Stämme wurden in LB-, 2×TY- bzw. M9-Medium und auf LB-Agar bei 37 °C inkubiert und zur Selektion auf rekombinante Plasmide immer unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert. Dem LB-Agar wurde zur Selektion rekombinanter pUC18-, pUCBM21-, pBluescript II SK+- und pUWL218-Derivate ca. 50 µg/ml X-Gal zugesetzt. Für Dauerkulturen wurden die Stämme in Slant-Medium bei entsprechender Temperatur und Selektion ÜN inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 2500 rpm abzentrifugiert, im halben Volumen Slant 50:50-Medium resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.1.2 Anzucht und Lagerung von *Streptomyces* sp.

Die Anzucht von Streptomyceten erfolgte bei 28 - 30 °C in TSB- oder SPMR-Medium auf einem Rotationsschüttler bei ca. 200 rpm oder auf SPMR- und SMA-Agar. Plasmidhaltige Streptomyceten-Stämme wurden mit Ts, Hy oder Am selektioniert. Die Anzucht von *S. lividans* und *S. lincolnensis* für Protoplasten-Präparationen erfolgte in TSB-Mg-Gly-

Medium. Die kurzfristige Lagerung fand bei 4 - 7 °C auf den Agarplatten statt. Zur Herstellung von Sporensuspensionen wurden die Stämme auf SMA-Agar bebrütet, bis sich ein Sporenrasen gebildet hatte. Die Sporen wurden mit ca. 5 ml 30 % Glycerin von der Platte geschwemmt. Die Suspension wurde anschließend durch sterile Watte filtriert und bei -20 °C gelagert (modifiziert nach Hopwood *et al.*, 1985).

### 2.2.1.3 Anzucht und Lagerung von *Micrococcus luteus*

*Micrococcus luteus* wurde für die Verwendung in Plattendiffusionstests (s. Abschnitt 2.2.13) in LB-Medium bzw. auf LB-Agar bei 37 °C inkubiert. Die Stammkultur wurde wie eine *E. coli*-Kultur in Slant-Medium ÜN inkubiert und in Slant 50:50 bei -20 °C gelagert.

Für die Genomanalyse der *M. luteus*-Mutanten wurden der Wildstamm und die fünf zu untersuchenden *M. luteus*-Stämme über 2 d bei 30 °C in je 20 ml TSB- bzw. TSB Ts-Medium angezogen.

## 2.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Kochpräparation nach Holmes und Quigley (1981) wurde mit *E. coli* DH5 $\alpha$ , JM110 und ET12567 Zellen durchgeführt. Die Zellen einer 1,5 ml ÜNK des zu präparierenden Klons wurden in 250 - 300  $\mu$ l STET-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym suspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Suspension 45 sec in kochendes Wasser gestellt. Nach 10 min Zentrifugation (15000 rpm) wurde das Sediment mit einem Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 300  $\mu$ l 100 % Isopropanol vermischt. Es wurde erneut zentrifugiert (5 min, 15000 rpm), das Sediment mit 1 ml 70 % Ethanol (4 °C) gewaschen und 5 min zentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen und die DNA 3 - 4 min in der Speed-Vac getrocknet. Die gefällte DNA wurde in 40 - 60  $\mu$ l TE/RNase oder dd H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Für Sequenzierreaktionen oder für präparative Restriktionen wurde die Plasmid-DNA mit dem »QIAprep Spin Miniprep Kit« isoliert. Anders als im Standardprotokoll vorgesehen, wurde die DNA abschließend für die Sequenzierung in 100  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O oder für Restriktionen in 100  $\mu$ l EB-Puffer (Bestandteil des Kits) aufgenommen.

### 2.2.2.2 Isolierung von chromosomaler DNA

Genomische DNA aus *Streptomyces* sp. und *Micrococcus luteus* wurde entsprechend der von Pospiech und Neumann (1995) beschriebenen Methode isoliert. Bei Streptomyceten wurde die zehnfache Menge an Lysozym eingesetzt und *M. luteus* wurde wie unter Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben angezogen.

### 2.2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA aus Streptomyceten wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) präpariert. Die Streptomycetenanzuchten wurden mit Eis (-20 oder -80 °C) gründlich vermengt, in ein vorgekühltes (4 °C) Sorvall-Gefäß abgegossen und bei 4 °C und 8000 rpm 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit eiskaltem Wasser gewaschen und wieder (s.o.) abzentrifugiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder bei -80 °C gelagert oder gleich der RNA-Präparation zugeführt. Dazu wurde ca. 400 mg gefrorene Zellmasse unter flüssigem Stickstoff zermörsert und in einem SS34-Röhrchen in 4 ml Lösung D aus dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi aufgenommen. Es wurde nach deren Protokoll (alles mit Mengenfaktor 4) weiterverfahren bis nach der ersten Fällung der RNA. Diese wurde in 1,2 ml Lösung D aufgenommen, auf zwei 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und erneut mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und in 250 - 500 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.2.3 *In vitro* Manipulation von DNA

Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatasen, Klenow-Fragment der DNA Polymerase I und T4-DNA Ligasen wurden gemäß den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller eingesetzt.

Zur Inaktivierung der eingesetzten Enzyme wurden zwei Methoden verwendet: (1) Der Ansatz wurde mit Hitze behandelt (10 - 20 min, 65 - 70 °C). (2) Die DNA wurde einer präparativen Agarosegelelektrophorese unterworfen und anschließend aus dem Gel eluiert.

#### 2.2.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur quantitativen und qualitativen Analyse von DNA-Präparationen bzw. Restriktionsansätzen wurde ein 0,8 %iges Agarosegel in 1×TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml EtBr verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Als Größenmarker diente die »100 bp ladder« (Gibco BRL, Eggenstein) oder *EcoRI/HindIII*-hydrolysierte  $\lambda$ -DNA. Die Elektrophorese wurde 30 - 60 min bei 80 - 120 V durchgeführt.

Die Trennung von RNA in 1,6 %igen Agarosegelen folgte der bei Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode mit Formaldehyd (Endkonzentration: 0,22 M) als denaturierendem Agens in 1×MOPS-Laufpuffer. Als Längenstandard diente die »RNA ladder« (Gibco BRL, Eggenstein).

#### 2.2.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels verschiedener Kits. Fragmente, deren Größe kleiner als 100 bp waren, wurden mit dem »Jet-Sorb Kit« eluiert. Größere Fragmente konnten mit dem »QIAquick Gel Extraction Kit« oder dem »NucleoSpin Extract 2 in 1« isoliert werden.

#### 2.2.6 Radioaktive und nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit dem »rediprime Random Primer Labelling Kit« und 50 µCi  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol) nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert.

Durch den Einbau von DIG-11-dUTP wurden DNA-Fragmente nicht-radioaktiv markiert. Dies erfolgte nach dem Prinzip der »random primed« DNA Markierung (Feinberg und Vogelstein, 1983) mittels des »DIG-High Prime Kits« (nach beiliegendem Protokoll).

#### 2.2.7 Hybridisierung an immobilisierte Nukleinsäuren und Detektion

Zur Übertragung gelelektrophoretisch getrennter restringierter DNA oder RNA auf positiv geladene Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>) wurde das Transfersystem nach Chomczynski (1992) mit 0,4 N NaOH (DNA) oder 20× SSC (RNA) als Transferpuffer gewählt.

Bei DNA-DNA Hybridisierungen (»Southern Blot«) mit radioaktiv markierten Sonden wurden die Membranen 1 - 2 h in Prähybridisierungslösung bei 65 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die markierte und denaturierte Sonde zugegeben. Dabei betrug die gewählte Hybridisierungstemperatur 65 °C, da homologe DNA-Fragmente als Sonden eingesetzt wurden. Nicht gebundene Sonde wurde nach mindestens 12 h durch Waschen mit 6× SSC, 0,5 % SDS entfernt. Wenn nötig wurde die Stringenz der Waschschritte durch Erniedrigung der SSC Konzentration und/oder durch Steigerung der Inkubationstemperatur erhöht.

Bei DNA-RNA Hybridisierungen (»Northern Blot«) wurde der »High SDS«-Puffer verwendet. Dabei betrug die Hybridisierungstemperatur 50 °C. Nicht gebundene Sonde wurde durch Waschen mit 5× SSC, 0,1 % SDS und 2× SSC, 0,1 % SDS entfernt.

Die Detektion der Radioaktivität erfolgte mit »HyperFilm MP« Röntgenfilmen bei -80 °C (DNA) oder mit »HyperFilm β-max« Röntgenfilmen unter Verwendung von Verstärkerfolien bei RT (RNA).

Bei Verwendung nicht-radioaktiv markierter Sonden erfolgte (a) die Hybridisierung der DIG-11-dUTP-markierten DNA, (b) der immunologische Nachweis der hybridisierten DNA und (c) die Dephosphorylierung des BCIP durch die alkalische Phosphatase und die dadurch induzierte Redoxreaktion der NBT/BCIP Lösung (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (Toluidinsalz)) mit dem »DIG Nucleic Acid Detection Kit« nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde nach dem von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Didesoxynukleotid-Kettenabbruchverfahren durchgeführt. Die Sequenzierung mit Fluorescein- oder CY5-markierten Primern erfolgte mit dem »Thermosequenzase Cycle-Sequencing Kit«. Die aus der Sequenzierreaktion resultierenden Fragmente wurden in einem 6 M Harnstoff/6 % »HydroLink Long Ranger«-Gel (Biozym, Hessisch Oldendorf) getrennt und mittels eines »A.L.F. DNA-Sequencer« bzw. »A.L.F. Express« detektiert. Die Umsetzung der gemessenen Fluoreszenzspitzen zu einer DNA-Sequenz erfolgte durch das Computerprogramm A.L.F. Manager 2.5 oder A.L.F. Win 2.1.

### 2.2.9 Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR-Technik

Die Amplifikation eines DNA-Abschnittes mit Hilfe der PCR-Technik (Polymerase Chain Reaction; Saiki *et al.*, 1985) wurde in Thermoblöcken mit einer Heizrate von 1 °C/sec durchgeführt. Ein Standardansatz von 100 µl enthielt folgende Komponenten:

16 µl dNTP-Stammlösung, 10 µl 10× Polymerasepuffer, 10 µl DMSO, 2,5 U (0,5 µl) *Taq*-Polymerase, 1 µl Template-DNA (10 - 100 ng), 1 µl je Oligonukleotid (Primer, OD<sub>260</sub> = 1,00/100 µl = 100 pmol), auf 100 µl mit dd H<sub>2</sub>O auffüllen, darüber 50 µl Mineralöl. Die Inkubation in einem Thermoblock erfolgte mit dem folgenden Programm:

|               |            |           |
|---------------|------------|-----------|
| Denaturierung | 95 °C      | 1 min     |
| Anlagerung    | 49 - 72 °C | 1 min     |
| Verlängerung  | 72 °C      | 1 min/kbp |

Die Amplifizierung erfolgte in 30 Reaktionszyklen. Vor Beginn der Zyklen wurde die GC-reiche Streptomyceten-DNA 5 min bei 98 °C denaturiert. Die Zugabe der Polymerase erfolgte nach einem »Hot-Start« während des ersten 95 °C-Schrittes. Um die Verlängerung aller Fragmente zu gewährleisten, wurde nach Abschluß der Zyklen noch einmal 5 min bei 72 °C inkubiert. Nach Beendigung wurden 5 µl des Ansatzes auf ein Agarosegel zur Analyse aufgetragen. Die Beschreibungen der verwendeten Oligonukleotide können dem Abschnitt 2.1.4 entnommen werden. Das gewünschte Produkt von mehreren parallel entstandenen Amplifikaten wurde über ein Agarosegel von den anderen Banden getrennt. Enthielt der Ansatz nur ein Produkt wurde es mit dem »QIAquick PCR Purification Kit« isoliert.

### 2.2.10 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Streptomyceten-Protoplasten

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach dem Protokoll von Hanahan (1983) hergestellt. Die Zellsuspension wurde zu je 150 µl Aliquots erst 4 - 6 h bei -20 °C, für die restliche Zeit bei -80 °C gelagert.

Die Protoplastierung von Streptomyceten erfolgte nach der Vorschrift von Babcock und Kendrick (1988) in TSB-Mg-Gly-Medium. Die in P-Puffer suspendierten Protoplasten wurden in 50 µl-Aliquots erst bei -20 °C, dann bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.11 Transformation von *E. coli* und Streptomyceten

Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Für *S. lividans* und *S. lincolnensis* kam die PEG-induzierte Protoplasten-Transformation nach Hopwood *et al.* (1985) zur Anwendung. Zur Erreichung hoher Transformationsraten wurden die Protoplasten mit unmethylierter Plasmid-DNA (aus *E. coli* JM110 oder ET12567) nach dem Protokoll von Oh und Chater (1997) transformiert.

### 2.2.12 Mutation von *S. lincolnensis* NRRL 2936

Für die gezielte Mutation eines Gens wurden Protoplasten von *S. lincolnensis* NRRL 2936 mit den entsprechenden rekombinanten Plasmiden nach dem Protokoll von Oh und Chater (1997) transformiert, auf SPMR-Agar ausgestrichen und mit 25 µg/ml Am auf mögliche Rekombinanten selektioniert. Die entstandenen Transformanten wurde noch zweimal auf SMA-Platten mit 10 µg/ml Am überimpft, bevor sie zur Analyse durch Hemmhoftests, PCR und »Southern Blot« eingesetzt wurden.

### 2.2.13 Plattendiffusionstests zur Bestimmung der Antibiotikaproduktion

Um Lm-produzierende Bakterienstämme und die in dieser Arbeit erzeugten Mutanten auf die Produktion von Lm zu untersuchen, wurden sie auf SPMR-Platten ausgestrichen und 3 - 4 d bei 28 - 30 °C inkubiert, bis eine deutliche Sporenentwicklung zu erkennen war. Von diesen Platten wurden aus dem Bakterienrasen Agarscheiben von 9 - 10 mm Durchmesser und 5 - 6 mm Höhe ausgestanzt. 150 ml SNA-Agar wurden in eine Nunc-Schale gefüllt und die Agarscheiben auf den erkalteten Agar gelegt. 50 ml eines auf ca. 40 °C erkalteten SNA-Agars wurden mit 1,25 ml einer ÜNK *M. luteus* angeimpft und über den bereits erhärteten SNA-Agar in der Nunc-Schale geschichtet. Für die quantitative Bestimmung der Antibiotikakonzentration einer Flüssigkultur wurden auf die erkaltete zweite Schicht Antibiotikatestplättchen (ø 0,9 mm) gelegt, die mit 100 µl Kulturüberstand bzw. mit Lm-Lösung (Lm-Eichreihe von 10 - 180 µg/ml) getränkt waren. Die Platte wurde 2 - 4 h auf 4 °C gestellt und anschließend über 2 d bei 28 °C oder ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Größe der entstandenen Hemmhöfe waren ein Hinweis, ob und wieviel Lm von dem entsprechenden Organismus produziert wurde.

## 2.2.14 Komplementationen

### 2.2.14.1 Genetische Komplementation

Die Regeneration der defekten Lm-Produktion der erzeugten Insertionsmutanten erfolgte durch Transformation mit den entsprechend konstruierten Komplementationsplasmiden. Die erhaltenen Transformanten wurden auf SPMR Hy bzw. Ts und SPMR Am Hy bzw. Am Ts angezogen und dreimal erneut Einzelkolonien auf frische Platten mit dem jeweiligen Selektionsdruck ausgestrichen, bevor die komplementierte Mutante als »genetisch stabil« bezeichnet wurde.

### 2.2.14.2 Substratkomplementation

#### *Herstellung von Propylhygrinsäurehydrochlorid (PHA · HCl)*

PHA · HCl wurde durch alkalische Hydrolyse von 2 g Lm in 8,3 % Natriumhydroxidlösung und anschließender Trennung von MTL durch einen stark basischen Anionentauscher (Fluka Amberlite IRA-400, 20 - 50 mesh) isoliert. Die Prozedur wurde nach der Vorschrift von Brahme *et al.* (1984a) durchgeführt.

#### *Substratkomplementationen kombiniert mit Plattendiffusionstests*

Um die in dieser Arbeit erzeugten Mutanten auf die Produktion von Lm zu untersuchen, wurden sie auf SPMR-Platten ausgestrichen und 3 - 4 d bei 28 - 30 °C inkubiert, bis eine deutliche Sporenentwicklung zu erkennen war. Von diesen Platten wurden aus dem Bakterienrasen Agarscheiben von 9 - 10 mm Durchmesser und 5 - 6 mm Höhe ausgestanzt und auf eine neue sterile Petrischale gelegt. Dann wurden mit sterilen Zahnstochern Löcher mit einem Durchmesser und einer Tiefe von ca. 2 - 3 mm in die Mitte der Agarscheiben gegraben. In diese Löcher wurden 20 µl PPL-Lösung, 10 µl PHA-Lösung oder als Nullkontrolle 20 µl 0,1 M TES (pH 7,6) pipettiert. Die Petrischale wurde in einen Exsikkator gestellt, dessen unterer Teil mit Wasser befüllt war, damit die Agarscheiben keine Flüssigkeit verloren. Nach 24 h Inkubation bei 28 - 30 °C wurde ein mit einer ÜNK *M. luteus* angeimpfter SNA-Agar um die Agarscheiben gegossen. Nach dem Erhärten des Agars wurde die Platte 2 - 4 h auf 4 °C gestellt und anschließend über 2 d bei 28 °C oder ÜN bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Hemmhöfe waren ein Hinweis, ob wieder Lm von den Mutanten produziert wurde.

### 2.2.15 Erzeugung eines Ts-resistenten *M. luteus*-Stammes

Eine Impföse *M. luteus* DSM 348 von einer LB-Platte wurde in 100 µl P-Puffer suspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 7 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und der klare ÜS abgenommen. Die Zellen wurden in 50 - 100 µl P-Puffer resuspendiert. 10 µl pUWL218-DNA (Präparation aus *E. coli* ET12567) und 200 µl PEG1000/T-Puffer (1 g/1 ml) wurden zupipettiert und nach 1 min 1 ml P-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde auf einer LB Ts Gradientenplatte (0 - 15 µg/ml Ts) ausplattiert und ÜN bei 37 °C bebrütet.

### 2.2.16 Heterologe Genexpression in *E. coli* und *S. lividans*

Das Genprodukt wurde mit Hilfe eines T7-RNA-Polymerase/Promotor-Systems in *E. coli* produziert (Tabor und Richardson, 1985). Dazu wurde hinter den *F10*-Promotor in dem entsprechenden Vektor das zu exprimierende Gen in die MCS kloniert. Die entstandenen rekombinanten Plasmide wurden durch Transformation in die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) pLysS oder JM109 (DE3) eingebracht. Die Transformanten wurden ÜN in LB Ap bei 37 °C angezogen. Eine Expressionskultur (LB Ap oder M9MM Ap Glc 10 % LB) wurde mit der ÜNK auf eine  $OD_{595} = 0,05$  angeimpft und bei 28 - 35 °C angezogen. Bei einer  $OD_{595} = 0,60$  wurde die T7-RNA-Polymerase durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert und die Kultur bei 28 °C weiter geschüttelt. 120 min nach der Induktion wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 10 °C, 7500 rpm, GSA-Rotor) und in Zellpuffer aufgenommen (0,25 g Naßzellen/ml). Um ein heterologes Protein in *S. lividans* zu produzieren, wurde das entsprechende Gen mit Hilfe des konstitutiven *ermE*-Promotors exprimiert. Dazu wurden die *S. lividans*-Stämme, die pUWL201 (als Negativkontrolle) und die pUWL201-Derivate trugen, 3 d bei 28 °C in TSB-Medium unter Schütteln inkubiert. Das Myzel wurde bei gleicher Zelldichte durch Zentrifugation vom Medium getrennt und zweimal mit Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8; 50 mM NaCl) gewaschen. Die *E. coli*-Zellen (in Zellpuffer) und *S. lividans*-Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.17 Herstellung zellfreier *E. coli* und *S. lividans* -Extrakte

Die gefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in Volumina bis 5 ml mittels Ultraschall aufgeschlossen (5 mm Mikrospitze; Power: 70 %, Cycle 60 %; 5 - 10 Intervalle à 15 sec). Während und nach der Beschallung wurde der Extrakt von außen mit einer Eis-NaCl-Ethanol-Kältemischung gekühlt. Der erhaltene Extrakt wurde à 2 ml aliquotiert und zentrifugiert (30 min, 4 °C, 13500 rpm). Der Überstand (Rohextrakt, zellfreier Extrakt) wurde entweder sofort weiter verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.18 Quantitative Proteinbestimmung

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford (1976) benutzt. Als Referenz für eine Eichgerade diente eine Stammlösung BSA (Rinderserumalbumin, 1 mg/ml). Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentrationen unter Verwendung des Bradford-Reagenzes (BioRad, München) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.19 Reinigung von His-tag•LmbY und His-tag•LmbB1

Die Reinigung von His-tag•Proteinen wurde mittels selbst gepackter Ni-NTA-Agarose-Säulen (Ni<sup>2+</sup>-geladene Sepharose CL-6B in 6 % Agarose, 50 % Suspension/30 % EtOH) durchgeführt. Für die Anreicherung von His-tag•LmbY wurde nach der Vorschrift des Herstellers (Qiagen, 1997) verfahren (Protocol 11. Batch purification under native conditions).

Dieses Standardprotokoll konnte aufgrund großer Aktivitätsverluste für die Reinigung des His-tag•LmbB1 nicht eingehalten werden. Im folgenden wird die von der Vorschrift des Herstellers der Ni-NTA-Agarose stark abgeänderte Prozedur beschrieben. Alle verwendeten Lösungen (Ni-NTA-Agarose, Lysepuffer (LP), Waschbuffer 1 (WP1), Waschpuffer 2 (WP2), Elutionspuffer (EP)) wurden auf Eis gekühlt. Eine Säule mit einem Gesamtvolumen von ca. 10 ml wurde mit 2 - 4 ml Ni-NTA-Agarose (50 % Suspension) beschickt und mit LP bei einer Flußrate von 0,5 ml/min äquilibriert. Dann wurde die Säule mit Rohextrakt beschickt und der Durchbruch insgesamt dreimal wieder auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit LP gewaschen und anschließend an eine FPLC angeschlossen, an der folgende Programmschritte durchlaufen wurden:

| Schritt | Dauer (ml) | Flußrate (ml/min) | angelegte Pufferlösung                           |
|---------|------------|-------------------|--|
| 1       | 15         | 0,4               | WP1  |
| 2       | 10         | 0,4               | Gradient von 0/100 % WP2/WP1 bis 80/20 % WP2/WP1 |
| 3       | 10         | 0,4               | 80/20 % WP2/WP1                                  |
| 4       | 1          | 0,4               | Gradient von 80/20 % WP2/WP1 bis 0/100 % WP2/WP1 |
| 5       | 4          | 0,5               | WP1  |

Zur Elution des His-tag•LmbB1-Proteins von der Säule wurde bei einer Flußrate von 0,5 ml/min in drei Schritten erst mit 50/50 % EP/WP1, dann mit 75/25 % EP/WP1 und abschließend mit 100 % EP gewaschen.

### 2.2.20 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem Gelsystem nach der Methode von Laemmli *et al.* (1970) oder Schägger und von Jagow (1987) mit einem 4 - 5 %igem Sammelgel und einem Trenngel, dessen Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration je nach Anwendung zwischen 8 und 16,5 % betrug. Die ausschließlich analytischen Gelelektrophoresen wurden in einer »ServaBlueLine«-Gelkammer durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proben zusammen mit dem Proteingel-Marker 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert. Während des Laufs wurde eine konstante Spannung von 100 - 140 V angelegt. Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurden die Gele mit Coomassie Blue R250 (Merril, 1990; Schägger und Jagow, 1987) gefärbt. Als Molmassenstandards wurden der »Dalton Mark VII-L«-, der »SDS-6H«- oder vorgefärbte Molekulargewichtsmarker verwendet.

Zweidimensionale Gelelektrophoresen (2D-PAGE) wurden nach der Vorschrift von Görg (1997) und M. Haase (BUGH Wuppertal, persönliche Mitteilung) durchgeführt.

### 2.2.21 Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membranen (»Western Blot«)

Die PVDF-Membran (»Hybond P«) wurde 30 sec in Methanol getaucht und anschließend mindestens 10 min in Western-Puffer äquilibriert. Das analytische PAA-Gel wurde ebenfalls für 1 - 2 min dazugegeben. Die Proteine wurden nach Aufbau des Blots mittels der »TRANS-BLOT SD Semi-Dry Transfer Cell« auf die PVDF-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte 15 min bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA in Western-Puffer. Die

erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch reversible Amidoschwarz-Färbung (0,2 % Amidoschwarz in 1 % Essigsäure) mit anschließender Hintergrundentfärbung durch H<sub>2</sub>O überprüft. Durch mehrmaliges Waschen der Membran mit TBS-Puffer und Inkubation ÜN in Blockierungspuffer wurde die Färbung nahezu vollständig rückgängig gemacht.

### 2.2.22 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Zum Nachweis immobilisierter Proteine (vgl. Abschnitt 2.2.21) wurde die Membran ÜN in Blockierungspuffer geschwenkt und anschließend für 1 h mit Anti-Penta-His Antikörperlösung inkubiert (Verdünnungsfaktor 1:2000 in Blockierungspuffer). Danach wurde die Membran zweimal mit TBST-Puffer und einmal mit TBS-Puffer für jeweils 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für 1 h mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG/alkalische Phosphatase-Konjugat; Qiagen, Hilden), der 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt war. Ungebundener sekundärer Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit TBST entfernt. Nach Zugabe der verdünnten NBT/BCIP-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim; Verdünnungsfaktor 1:75 in (0,1 M Tris/HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl)) als Substrat für die alkalische Phosphatase erfolgte der indirekte Nachweis des Erstantikörpers gegen His-tag-Proteine durch die violette Färbung der entsprechenden Banden. Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden bei RT statt.

### 2.2.23 Enzymtestsystem für LmbB1 und Berechnung des $K_M$ -Wertes

Die LmbB1-Aktivität konnte in einem Testsystem bestimmt werden, dessen Komponenten wie folgt angegeben sind:

- 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 150, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 bzw. 2000  $\mu$ M  
L-DOPA für die Aktivitätsmessung des gereinigten Enzyms (*E3*), bzw.
- 500  $\mu$ M L-DOPA für die Aktivitätsmessung des RE, *FT1*, *FT2*, *FT3*, *FT4*
- 4,97  $\mu$ g RE; 24,30  $\mu$ g *FT1*; 19,05  $\mu$ g *FT2*; 0,68  $\mu$ g *FT3*; 0,20  $\mu$ g *FT4* bzw. 86 ng *E3*
- ad 1000  $\mu$ l mit dd H<sub>2</sub>O



Änderung der Extinktion in der Lösung zu Beginn und nach 5 min bei einer Wellenlänge von 413 nm verfolgt. Es wurden ebenfalls Kontrollreaktionen durchgeführt, indem anstatt des o.g. RE (a) kein RE, (b) gekochter RE (*E. coli* JM109 (DE3)/pET16B1), (c) RE (*E. coli* JM109 (DE3)/pET-16b) eingesetzt wurde.

### 2.2.25 Bestimmung der Brenzkatechin-2,3-Dioxygenase (XylE)-Aktivität

Die Messung der XylE-Aktivität (Umsetzung des farblosen Brenzkatechins zum gelb gefärbten 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd) erfolgte in Anlehnung an die von Ingram *et al.* (1989) publizierte Methode. Abweichend von dieser Vorschrift wurden *S. lividans* TK23 Zellen, die Derivate der Plasmide pWKD13 und pWKD13II trugen, nach 3 d Wachstum in TSB Ts-Medium geerntet. Das Myzel wurde mit Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8; 50 mM NaCl) gewaschen, und nach dem Ultraschallaufschluß wurde der Zellextrakt in 2 ml-Gefäßen zentrifugiert (13500 rpm, 30 min, 4 °C). Die Proteinkonzentration des zellfreien Extraktes wurde nach der Bradford-Methode (vgl. Abschnitt 2.2.18) bestimmt. Durch Zugabe von 20 µl des zellfreien Extraktes zu 980 µl Reaktionspuffer (0,2 mM Brenzkatechin in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5) wurde die Reaktion gestartet und die Extinktionsänderung bei  $\lambda = 375$  nm über einen Zeitraum von 5 - 10 min verfolgt. Die spezifischen XylE-Aktivitäten wurden mit Hilfe der Extinktionsänderungen des linearen Bereiches des Substratumsatzes nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Aktivität (kat} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{\Delta E \cdot V_1}{t \cdot \epsilon \cdot d \cdot V_2 \cdot c_{\text{Prot}}}$$

$\Delta E$  = Extinktionsänderung bei 375 nm  $V_1$  = 1 ml; Volumen des Gesamtansatzes (ml)

$t$  = Zeit (sec)  $\epsilon = 33 \cdot 10^6$  ml  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>  $\cdot$  cm<sup>-1</sup>; molarer Extinktionskoeffizient (ml  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>  $\cdot$  cm<sup>-1</sup>)

$d$  = 1 cm; Schichtdicke der Küvette (cm)  $V_2$  = 20 µl; Volumen der eingesetzten Proteinmenge (ml)

$c_{\text{Prot}}$  = Proteinkonzentration des eingesetzten zellfreien Extraktes (mg  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>)

### 2.2.26 Enzymtest auf NADPH:F<sub>420</sub>-Reduktase-Aktivität

Die NADPH-abhängige F<sub>420</sub>-Reduktase-Aktivität wurden auf der Grundlage von Eker *et al.* (1989) gemessen. Die Ansatzgröße der einzelnen Enzymtests betrug 1 ml und enthielt folgende Komponenten:

- 0,4 M NaCl
- 10 mM Kaliumphosphat, pH 6,0
- 5 mM 2-Mercaptoethanol
- 100 µM NADPH
- ad 970 µl dd H<sub>2</sub>O
- 10 µl Proteinextrakt
- 25 µM F<sub>420</sub>

NaCl-Lösung, Phosphatpuffer, 2-Mercaptoethanol, NADPH und Wasser wurden in den angegebenen Mengen vorgelegt. Die Extinktion wurde so lange verfolgt, bis sie einen konstanten Wert annahm. Dann wurde der Proteinextrakt zugegeben und ebenfalls gewartet, bis die Extinktion konstant blieb. Abschließend wurden 20 µl 50× F<sub>420</sub>-Lösung zupipettiert, gemischt und der Extinktionsverlauf 4 - 8 min aufgezeichnet.

### 2.2.27 Fütterung von *S. lincolnensis* mit <sup>14</sup>C-markiertem Tyrosin

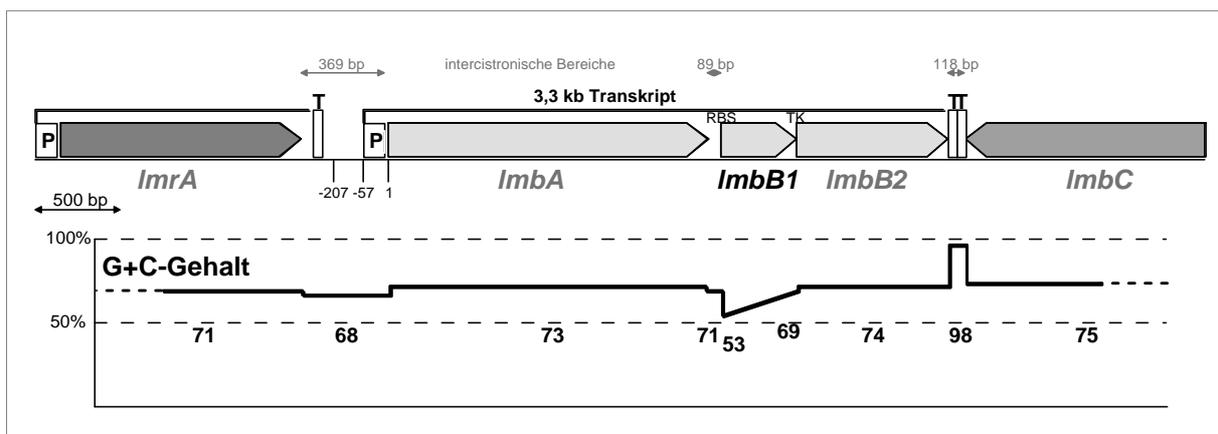
Von den *S. lincolnensis*-Stämmen wurden Vorkulturen in 10 ml CDM angelegt, die 4 d bei 28 °C inkubiert wurden. Die Zellen wurden mit insgesamt 10 ml CDM gewaschen und in 4 ml CDM aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 3 ml mit weiteren 7 ml CDM in einem Luftschtüttler bei 28 °C und 150 rpm in Schikanekolben kultiviert. Nach 24 h wurden diese Kulturen mit je 2,5 µCi (50 µl) L-[U-<sup>14</sup>C]Tyrosin versetzt und noch weitere 7 d inkubiert. Abschließend wurden die Kulturen zentrifugiert, der Medienüberstand bei -80 °C gelagert und die Zellen zweimal mit je 5 ml dd H<sub>2</sub>O gewaschen und ebenfalls bei -80 °C gelagert. Die Kulturextrakte (aufgeschlossene Zellen und Kulturbrühe im Verhältnis 1:1) wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-Platten mit [40 VT Methanol/ 56 VT Chloroform/4 VT Ammoniak] als Lösungsmittel untersucht.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Analyse der ersten zwei Schritte der Propylprolin-Biosynthese

### 3.1.1 Allgemeine Eigenschaften der genetischen Umgebung von *lmbB1*

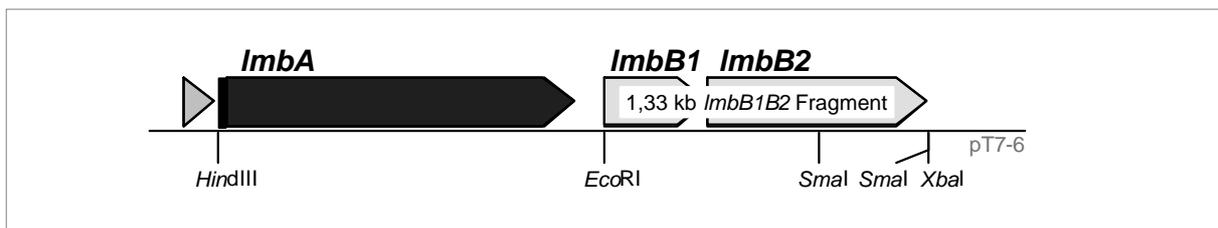
Die Aufklärung der kompletten DNA-Sequenz des postulierten *lmb/lmr*-Genclusters, inklusive des Bereiches von *lmbB1* (vgl. Anhang 1-1), wurde von Peschke *et al.* (1995) veröffentlicht. Dabei wurden die Leserahmen wie in Abb. 3-1 gezeigt festgelegt. Das *lmrA* Gen besitzt seinen eigenen Promotor und Terminator. »Northern Blot« Analysen haben ergeben, daß die Gene *lmbA*, *lmbB1* und *lmbB2* durch eine 3,3 kb mRNA kotranskribiert werden (Schmidt, 1994). Stromaufwärts des Gens *lmbB1* ist eine Ribosomenbindestelle (RBS) lokalisiert. Da das Gen *lmbB2* keine eigene RBS besitzt und das Startcodon von *lmbB2* (im folgenden Beispiel **fett** dargestellt) und das Stopcodon von *lmbB1* (unterstrichen dargestellt) überlappen (...CGAT**u**GAGT...), wird angenommen, daß *lmbB2* durch translationale Kopplung (Gold und Stormo, 1987) exprimiert wird. Das Gen *lmbB1* hat eine Länge von 480 bp, die für 159 Aa mit einer berechneten Molekülmasse von ca. 18 kDa kodieren.



**Abb. 3-1.** Transkriptlängen und G+C-Gehalt im Bereich von *lmbB1*. [P], Promotor; T, Terminator; RBS, Ribosomenbindestelle; TK, translationale Kopplung. Oberhalb der Gene sind in grau die intercistronischen Bereiche angegeben. Weitere Erklärungen sind im Text aufgeführt.

Der Leserahmen fällt durch seinen G+C-Gehalt auf, der im 5'-Bereich (die ersten 120 bp) 53 % und am 3'-Ende (die letzten 250 bp) 69 % beträgt (Durchschnitt 63,3 %) und für Streptomyceten-DNA ungewöhnlich niedrig ist. Die benachbarten Gene weisen den typischen G+C-Gehalt von 73 % (*lmbA*) bzw. 74 % (*lmbB2*) auf (Neusser *et al.*, 1998). Das 954 bp umfassende Gen *lmbB2* codiert für ein 317 As großes Protein mit einer errechneten relativen Masse von 34,8 kDa.

Bisher war bekannt, daß das Genprodukt von *lmbB1* L-DOPA *in vivo* zu einer gelben Substanz umsetzt (Schmidt, 1994). Ausgehend von der ursprünglichen Meinung, daß die gesamte Region, *lmbB1* und *lmbB2*, erforderlich für die Umsetzung von L-DOPA ist (P. Tichy, Prag, persönliche Mitteilung), wurde von Schmidt unter anderem das rekombinante Plasmid pT7AdExAB12 konstruiert (vgl. Abb. 3-2). Mit dessen Hilfe wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS die *in vivo* Konversion von L-DOPA erreicht. Es konnte aber von Schmidt durch Konstruktion verschiedener anderer Plasmide (pT7AdExA (*lmbA*), pT7AdExAB1 (*lmbA*, *lmbB1*), pT7AdExAB2 (*lmbA*, *lmbB2*), pT7ExB12 (*lmbB1*, *lmbB2*)) nicht gezeigt werden, auf welches Genprodukt die L-DOPA-umwandelnde Aktivität beschränkt war.



**Abb. 3-2.** Schema des rekombinanten Plasmides pT7AdExAB12 von Schmidt (1994). Es wurde ein 1,99 kb *lmbA* Fragment und ein 1,33 kb *lmbB1B2* Fragment hintereinander in pT7-6 kloniert. Das *lmbB1B2* Fragment, welches hier verwendet wurde, war um 110 bp am N-Terminus verkürzt, weil man annahm, daß sich der Genstart kurz hinter der eingezeichneten *EcoRI* Schnittstelle befand. Durch die Bestimmung der N-terminalen As-Sequenz von LmbB1 konnte jedoch gezeigt werden, daß das Startcodon 110 bp weiter stromaufwärts liegt als vermutet.

### 3.1.2 Konstruktion von Plasmiden zur Expression von *lmbB1* und *lmbB2*

Es wurden eine Vielzahl neuer Plasmide konstruiert, mit deren Hilfe die Gene *lmbB1* und *lmbB2* aus *S. lincolnensis* NRRL 2936 und 78-11 heterolog exprimiert werden sollten. Die Motivation für die Herstellung neuer Plasmide war die Tatsache, daß die rekombinanten Plasmide von Schmidt (1994) für eine Lokalisierung der L-DOPA-umwandelnden Aktivität nicht genau genug waren. Dies wurde erst durch PCR-Amplifikation und Expression der

einzelnen Gene möglich. In diesem Zusammenhang konnten die Aktivitäten der Genprodukte der zu untersuchenden Gene aus *S. lincolnensis* NRRL 2936 und 78-11 verglichen werden.

Die einzelnen Gene wurden, wie bereits erwähnt, erst mittels PCR amplifiziert, mit den entsprechenden Enzymen restringiert und in *E. coli* Vektoren kloniert. Nachfolgend werden die Klonierungsstrategien, die in den Anhängen 2-1 bis 2-4 schematisch dargelegt sind, erläutert. Tab. 3-1 zeigt eine Übersicht aller beschriebenen rekombinanten Expressionsplasmide.

Zur Konstruktion von pET16B1 und pET16B2 wurden für die Amplifikation der kompletten Leserahmen von *lmbB1* und *lmbB2* die Oligonukleotidpaare *lmbB1a/lmbB1b* bzw. *lmbB2a/lmbB2b* verwendet, die aufgrund der in diesem Bereich bekannten *S. lincolnensis*-DNA-Sequenz abgeleitet wurden. Durch die Primer *lmbB1a* bzw. *lmbB2a* wurde am Anfang der Gene die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NdeI* eingefügt. Bedingt durch den Primer *lmbB1b* entstand am Ende von *lmbB1* eine *BamHI*- und eine *SpeI*-Schnittstelle und durch den Primer *lmbB2b* am Ende von *lmbB2* eine *BglIII*-Schnittstelle. Die Amplifikate wurden mit *NdeI/BamHI* bzw. *NdeI/BglIII* hydrolysiert und in pET-16b (*NdeI/BamHI*) kloniert. Ausgehend von den zuvor konstruierten Plasmiden wurde das *XbaI/SpeI* Fragment aus pET16B1 in pET16B2 (*XbaI*) kloniert und zwar so, daß die beiden Gene gleich orientiert waren. Es entstand das Plasmid pET16B1B2, bei dem stromaufwärts beider Gene jeweils die RBS aus pET-16b kloniert war.

Um diese Gene aus *S. lincolnensis* NRRL 2936 auch in *S. lividans* exprimieren zu können, wurden diese, wie in Anhang 2-4 beschrieben, über pUCAd2 in pUWL201 kloniert. Die fertigen Plasmide wurden als pUWL201-*lmbB1* und pUWL201-*lmbB2* bezeichnet. Diese zusätzlichen Plasmide wurden hergestellt, da heterolog produzierte Proteine aus Streptomyceten oftmals inaktive und unlösliche Einschlußkörper (sog. »inclusion bodies«) bilden.

Die pDNW13-Serie (vgl. Tab. 3-1, Anhang 2-1) wurde aus chromosomaler DNA von *S. lincolnensis* 78-11 mit Hilfe der Oligonukleotidpaare *lmbB1aN/lmbB1bN* (*lmbB1*), *lmbB2aN/lmbB2bN* (*lmbB2*) bzw. *lmbB1aN/lmbB2bN* (*lmbB1B2*) bei einer Anlagerungstemperatur von 65 °C amplifiziert. Dadurch entstand bei beiden Fragmenten wiederum die Erkennungssequenz für die *NdeI*-Restriktionsendonuklease im Bereich des Startcodons. Die DNA wurde zunächst »blunt end« mit pUC18 (*SmaI*) ligiert. Die entstandenen Zwischenkonstrukte pUC18-B1 und pUC18-B1B2 wurden mit *NdeI/BamHI* hydrolysiert und das *lmbB1* - bzw. das *lmbB1B2* Fragment in pT7-7 kloniert. Das *lmbB2* Fragment wurde durch Restriktion von pUC18-B2 mit *NdeI/EcoRI* isoliert und mit pT7-7 ligiert. Es entstanden die Plasmide pDNW13.1, pDNW13.2 und pDNW13.12, die *lmbB1* und *lmbB2* unter Kontrolle

des *T7 F10* Promotors exprimierten und als Vorläufer der Plasmide der pDNW14-Serie dienten. Diese Plasmide wurden ebenfalls für die Produktion von LmbB1 und LmbB2 in *S. lividans* hergestellt und als Vektor diente erneut pUWL201. Um die Gene in die jeweils richtige Orientierung zu bringen, mußten die Gene als *XbaI/BamHI*-Fragmente aus der pDNW13-Serie in pUCBM21 gebracht werden, um von dort aus als *HindIII/BamHI*-Fragmente hinter den *ermE*-Promotor des Vektors pUWL201 kloniert zu werden (vgl. Anhang 2-2).

In den Plasmiden pDNW15.1 und pDNW15.2 sind die Gene *lmbB1* und *lmbB2* aus *S. lincolnensis* 78-11 ähnlich eingefügt, wie in den Plasmiden pET16B1 und pET16B2 (*lmbB1* bzw. *lmbB2* aus *S. lincolnensis* NRRL 2936). Das entsprechende Gen wurde jeweils zwischen die *NdeI*- und die *BamHI*-Schnittstelle von pET-16b positioniert. Die hierbei klonierten DNA-Fragmente waren jeweils mit *NdeI/BamHI* aus pUC18-B1 bzw. aus pDNW13.2 ausgeschnitten worden (vgl. Anhang 2-3).

**Tab. 3-1.** Rekombinante Plasmide für Expressionen von *lmbB1* und *lmbB2* (Klonierungsstrategien: s. Anhang 2-1 bis 2-4, Plasmidkarten: s. Anhang 3).

| Konstrukt     | prod. Protein(e), Promotor                  | Quelle der DNA                   |
|---------------|---|----------------------------------|
| pET16B1       | His-tag•LmbB1, <i>T7 F10p</i>               | <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 |
| pET16B2       | His-tag•LmbB2, <i>T7 F10p</i>               | <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 |
| pET16B1B2     | His-tag•LmbB1/His-tag•LmbB2, <i>T7 F10p</i> | <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 |
| pUWL201-lmbB1 | His-tag•LmbB1, <i>ermEp</i>                 | <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 |
| pUWL201-lmbB2 | His-tag•LmbB2, <i>ermEp</i>                 | <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 |
| pDNW13.1      | LmbB1, <i>T7 F10p</i>                       | <i>S. lincolnensis</i> 78-11     |
| pDNW13.2      | LmbB2, <i>T7 F10p</i>                       | <i>S. lincolnensis</i> 78-11     |
| pDNW13.12     | LmbB1, <i>T7 F10p</i>                       | <i>S. lincolnensis</i> 78-11     |
| pDNW14.1      | LmbB1, <i>ermEp</i>                         | <i>S. lincolnensis</i> 78-11     |
| pDNW14.2      | LmbB2, <i>ermEp</i>                         | <i>S. lincolnensis</i> 78-11     |
| pDNW14.12     | LmbB1/LmbB2, <i>ermEp</i>                   | <i>S. lincolnensis</i> 78-11     |
| pDNW15.1      | His-tag•LmbB1, <i>T7 F10p</i>               | <i>S. lincolnensis</i> 78-11     |
| pDNW15.2      | His-tag•LmbB2, <i>T7 F10p</i>               | <i>S. lincolnensis</i> 78-11     |

### 3.1.3 *In vivo* Umsetzungen von L-DOPA und L-Tyrosin

Durch die Arbeit von Schmidt (1994) wurde *in vivo* gezeigt, daß bei gemeinsamer Expression der Gene *lmbAB1B2* L-DOPA zu einer gelben Substanz unbekannter Struktur umgewandelt wurde. Welche Genprodukte dieser drei Gene für die Konversion verantwortlich waren, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurden zunächst mit den oben beschriebenen rekombinanten Plasmiden weitere *in vivo* Experimente durchgeführt. Transformiert mit den verschiedenen Plasmiden wurden die *E. coli*-Stämme wie in Abschnitt 2.2.16 beschrieben kultiviert. Für diese Versuche wurde der Rezipientenstamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ausgewählt. Dieser Stamm war durch das Vorhandensein des Plasmids pLysS vorteilhaft, da 60 - 90 min nach Induktion das auf dem Plasmid codierte Lysozym eine Autolyse der Zellen bewirkte und die Enzymaktivität von LmbB1 bzw. LmbB2 freisetzte. Insofern intrazelluläre Proteine nicht schon vorher ausgeschleust worden waren, war nun gewährleistet, daß die vermehrt produzierten Proteine im umgebenden Medium vorlagen. Durch die Wahl eines farblosen bis sehr schwach gelben Minimalmediums konnten Farbveränderungen der Kultur gut verfolgt werden. Die Zugabe von L-DOPA bzw. L-Tyrosin erfolgte als Feststoff, weil Stammlösungen dieser Substanzen entweder oxidierten (die frisch angesetzten, farblosen L-DOPA-Lösungen wurden bei 5 - 7 °C innerhalb von 2 d braun) oder zu geringe Konzentrationen hatten (die max. Löslichkeit von L-Tyrosin in Wasser bei 20 °C beträgt nur 2,2 mM). So konnte gewährleistet werden, daß immer eine ausreichende Menge an Substrat gelöst war. Wie zu erwarten war, verhielten sich *lmbB1*-exprimierende Transformanten (mit den Plasmiden pET16B1, pDNW13.1 oder pDNW15.1) gleich. Nach Induktion der Expression mit IPTG bei einer OD<sub>595</sub> von 0,6 und anschließender Supplementierung mit L-DOPA, färbten sich diese Kulturen gelb. L-Tyrosin hatte keinen Einfluß auf die Färbung des Mediums. Es wurden zwei Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurden die Kulturen vor der Induktion geteilt, die eine mit IPTG versetzt und die zweite nicht. Zugabe von L-DOPA zu beiden Ansätzen bewirkte nur bei der mit IPTG induzierten Kultur eine Gelbfärbung. Zum anderen wurden Transformanten angezogen, die pET-16b bzw. pT7-7 trugen, d.h. nur die Expressionsvektoren ohne entsprechendes Gen. Auch diese Kulturen veränderten ihre Farbe nach Induktion mit IPTG und L-DOPA- bzw. L-Tyrosin-Zugabe nicht. Transformanten, die nur *lmbB2* exprimierten (mit den Plasmiden pET16B2, pDNW13.2, pDNW15.2), verursachten keine Farbveränderungen der Medien nach Induktion und Zugabe von L-DOPA- bzw. L-Tyrosin. *E. coli* Stämme mit den Plasmiden pT7AdExAB12 und pET16B1B2, die *lmbB1* und *lmbB2* exprimierten, verhielten sich einerseits wie die Stämme

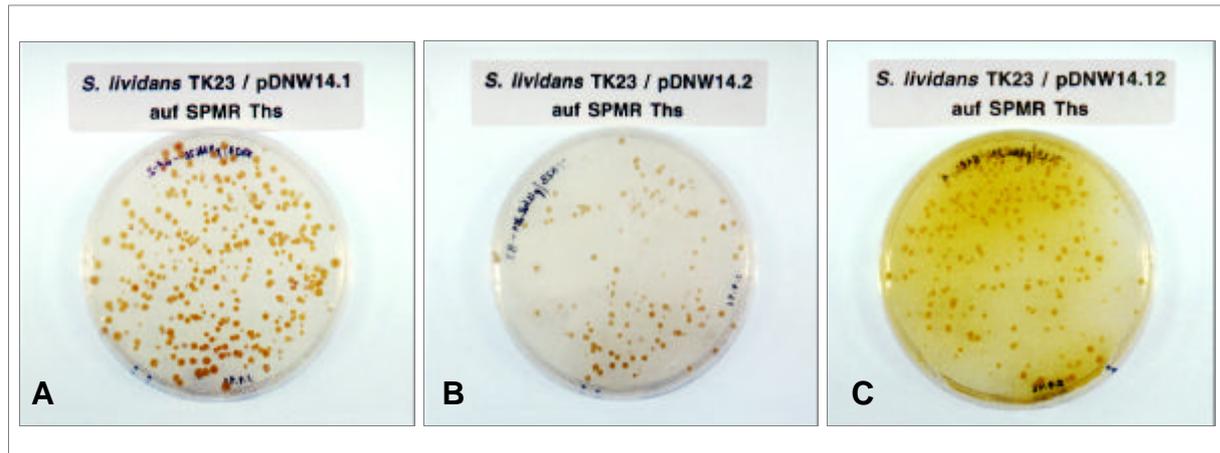
**Tab. 3-2.** L-DOPA- bzw. L-Tyrosin-umwandelnde Aktivitäten verschiedener *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Transformanten. L-DOPA (1 mg/ml) und L-Tyrosin (0,4 mg/ml) wurden 15 min nach Induktion mit IPTG zugegeben.

| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS/<br>rekombinantes Plasmid | Induktion<br>mit IPTG | Supplementierung<br>nach Induktion | Färbung<br>nach 1 h |
|---|-----------------------|------------------------------------|---------------------|
| pET-16b, pT7-7  | +                     | L-DOPA                             | –                   |
| pET16B1, pDNW13.1, pDNW15.1                               | –                     | L-DOPA                             | –                   |
| pET16B1, pDNW13.1, pDNW15.1                               | +                     | L-DOPA                             | gelb                |
| pET16B2, pDNW13.2, pDNW15.2                               | –                     | L-DOPA                             | –                   |
| pET16B2, pDNW13.2, pDNW15.2                               | +                     | L-DOPA                             | –                   |
| pET16B1B2, pT7AdExAB12                                    | –                     | L-DOPA                             | –                   |
| pET16B1B2, pT7AdExAB12                                    | +                     | L-DOPA                             | gelb                |
| pET-16b, pT7-7  | +                     | L-Tyrosin                          | –                   |
| pET16B1, pDNW13.1, pDNW15.1                               | +                     | L-Tyrosin                          | –                   |
| pET16B2, pDNW13.2, pDNW15.2                               | +                     | L-Tyrosin                          | –                   |
| pET16B1B2, pT7AdExAB12                                    | –                     | L-Tyrosin                          | –                   |
| pDNW13.12   | +                     | L-Tyrosin                          | –                   |
| pET16B1B2, pT7AdExAB12                                    | +                     | L-Tyrosin                          | gelb                |
| pET-16b   | +                     | –                                  | – <sup>a</sup>      |
| pET16B2   | –                     | –                                  | – <sup>a</sup>      |
| pET16B2   | +                     | –                                  | braun <sup>a</sup>  |

<sup>a</sup> Diese Kulturen wurden in LB-Medium angezogen. Bei allen anderen Kulturen, die nicht gesondert markiert wurden, verwendete man Minimalmedium.

mit pET16B1, pDNW13.1 oder pDNW15.1, d.h. sie färbten eine mit IPTG und L-DOPA versetzte Anzuchtlösung gelb, andererseits reicherten sie auch eine mit IPTG/L-Tyrosin supplementierte Kulturlösung mit gelber Substanz an. Auch hier veränderte sich die Farbe des Mediums der Kontrollen nicht. Im Gegensatz zu den in Minimalmedium angezogenen LmbB2-produzierenden Kulturen, verursachte eine Kultivierung von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET16B2 auf LB-Platten eine Braunfärbung des Agars bei IPTG-Induktion der Zellen.

Es sei noch erwähnt, daß es keinen Unterschied ausmachte, ob die DNA für die Konstruktionen der Expressionsplasmide aus *S. lincolnensis* NRRL 2936 oder dem



**Abb. 3-3.** Anzucht von *S. lividans* TK23-Transformanten auf SPMR-Agarplatten. **A.** *S. lividans* TK23/pDNW14.1. **B.** *S. lividans* TK23/pDNW14.2. **C.** *S. lividans* TK23/pDNW14.12.

Überproduktionsstamm 78-11 stammte, d.h. die Enzymaktivitäten waren identisch. Die Ergebnisse der *in vivo* Experimente mit *E. coli* sind in Tab. 3-2 zusammengefaßt.

Frühere Erfahrungen mit Streptomycetengenossen hatten gezeigt, daß deren Genprodukte, produziert in *E. coli*, nicht aktiv waren, weil sich »inclusion bodies« gebildet hatten. Ausbleibende oder unzureichende Aktivität der produzierten Enzyme könnte ebenfalls durch das Fehlen geeigneter Chaperone oder niedermolekularer Cofaktoren begründet sein. Die Temperatur und der pH-Wert des Mediums während der Anzucht spielten auch eine erhebliche Rolle. Solche Schwierigkeiten konnten durch Wahl alternativer Expressionssysteme z.T. vermieden bzw. umgangen werden. Die Expression in *S. lividans* TK23 mit Hilfe des *ermEp* hatte sich schon für *lmbY* bewährt (Neusser, 1995). *S. lividans* wurde mit pDNW14.1 (*lmbB1*), pDNW14.2 (*lmbB2*), pDNW14.12 (*lmbB1* und *lmbB2*), pUWL201-*lmbB1* (*lmbB1*) bzw. pUWL201-*lmbB2* (*lmbB2*) transformiert und die Transformanten auf SPMR-Agar angezogen. Nach drei Tagen Inkubation konnte eine intensive Gelbfärbung im Bereich der Kolonien von *S. lividans*/pDNW14.12 beobachtet werden, während alle anderen Transformanten keine Farbveränderung des Mediums bewirkten (vgl. Abb. 3-3). Die fünf Stämme wurden auf SMA-Agar und in TSB-Medium überführt und weitere drei Tage bei 28 °C inkubiert. Auf dem SMA-Agar verhielten sich die Stämme genau wie auf SPMR, während in TSB-Flüssigmedium die *lmbB1*-exprimierenden Stämme nur bei Zugabe von L-DOPA eine Gelbfärbung verursachten. Wenn *lmbB2* exprimiert wurde, konnte eine Braunfärbung beobachtet werden. *S. lividans*/pDNW14.12 in TSB-Flüssigmedium verfärbte, genau wie auf SPMR- und SMA-Agar, ohne jegliche Supplementierung das umgebende

Medium gelb. In Tab. 3-3 sind alle Ergebnisse der *in vivo* Versuche mit den *S. lividans*-Transformanten zusammengestellt.

**Tab. 3-3.** Aktivitäten verschiedener *S. lividans* TK23-Transformanten.

| <i>S. lividans</i> TK23/<br>rekombinantes Plasmid | Medium/Agar <sup>a</sup> | Supplementierung | Färbung<br>nach 3 d |
|---|--------------------------|------------------|---------------------|
| pDNW14.1, pUWL201-lmbB1                           | TSB                      | –                | –                   |
| pDNW14.1, pUWL201-lmbB1                           | TSB                      | L-DOPA           | gelb                |
| pDNW14.1, pUWL201-lmbB1                           | SPMR/SMA                 | –                | –                   |
| pDNW14.2, pUWL201-lmbB2                           | TSB                      | –                | braun               |
| pDNW14.2, pUWL201-lmbB2                           | SPMR/SMA                 | –                | –                   |
| pDNW14.12   | TSB                      | –                | gelb                |
| pDNW14.12   | SPMR/SMA                 | –                | gelb                |

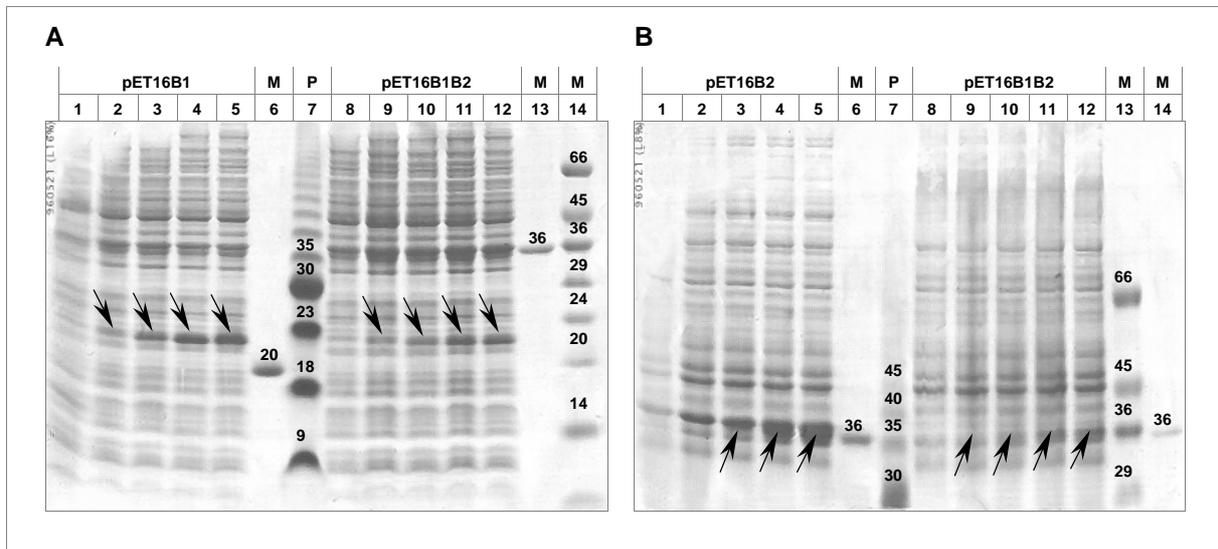
<sup>a</sup> TSB, TSB-Flüssigmedium; SPMR, SPMR-Agar; SMA, SMA-Agar

### 3.1.4 Heterologe Expression von *lmbB1* und *lmbB2*

Die Expression der Gene *lmbB1* und *lmbB2* konnte durch die Darstellung der vermehrten Produktion der Genprodukte mit Hilfe einer PAA-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. In einem Volumen von 150 ml wurden *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Transformanten, in denen die rekombinanten Plasmide pET16B1, pET16B2 bzw. pET16B1B2 eingebracht worden waren, angezogen (vgl. Abschnitt 2.2.16). Es wurden zusätzliche Proteine erwartet, die am N-Terminus um insgesamt 21 As-Reste, darunter 12 Histidine (His-tag), verlängert waren. Die zellfreien Extrakte (vgl. Abschnitt 2.2.17), die His-tag•LmbB1 (theor. 20,4 kDa) beinhalteten, wurden auf ein 16,5 % Schägger-Gel aufgetragen, diejenigen mit His-tag•LmbB2 (theor. 37,4 kDa) auf ein 8 % Schägger-Gel. Nach der Elektrophorese zeigte sich auf den Coomassie-gefärbten PAA-Gelen schließlich, daß zwei zusätzliche Proteinbanden mit den Größen 22,5 und 36 kDa auftraten (s. Abb. 3-4).

Es wurden ebenfalls Kulturen *E. coli* JM109 (DE3)/pDNW13.1 und -/pDNW13.2 angezogen, die LmbB1 und LmbB2 ohne His-tag produzieren sollten. Auf der anschließenden PAGE waren zwei Banden von vermehrt produzierten Proteinen zu sehen (PAA-Gele nicht

gezeigt), deren Größen auf 18 und 34 kDa festgelegt wurden. Diese Werte korrelierten mit den zuvor berechneten Größen für die Proteine, die bei 18 und 34,8 kDa lagen.



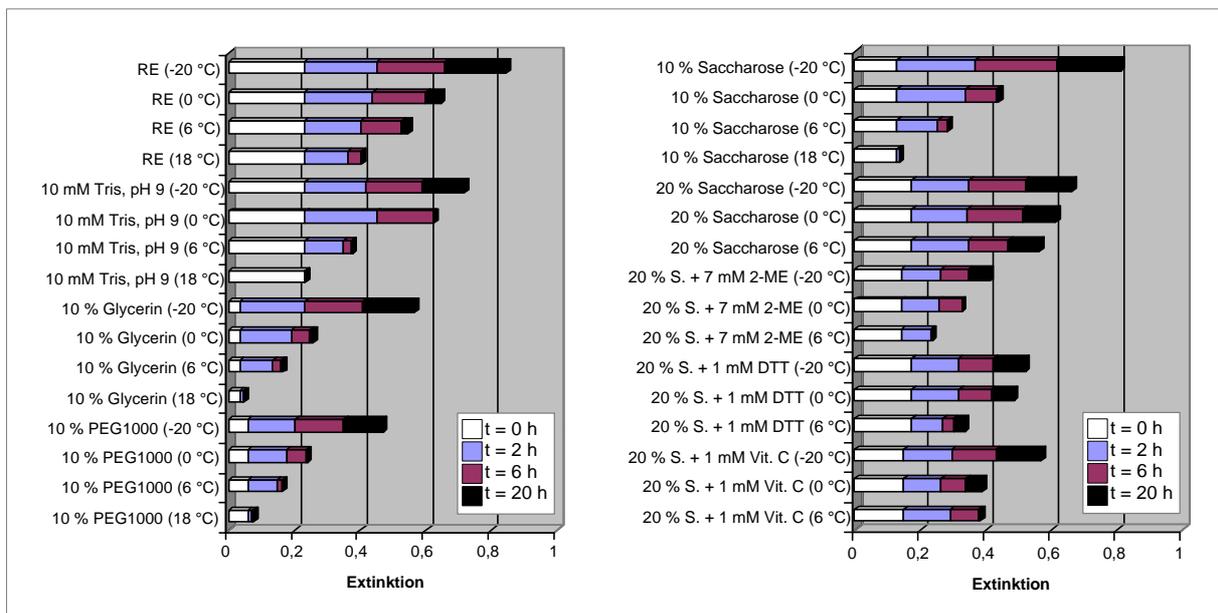
**Abb. 3-4.** Darstellung der *S. lincolnensis* LmbB1- und LmbB2-Proteine in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen. Die vermehrt produzierten Proteine sind mit einem His-tag N-terminal fusioniert und haben Größen von 22 und 36 kDa (siehe Pfeile). P (Spur 7), vorgefärbter (»prestained«) Proteingelmarker; M (Spuren 6, 13, 14), Proteingelmarker, Größen (in kDa) sind auf dem Gel angegeben. **A.** Das linke Gel (16,5 % Trenngel, ca. 20 - 30 µg Protein/Spur) zeigt die Auftrennung der Gesamtzell-extrakte von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET16B1 und -/pET16B1B2, die vor Induktion mit IPTG (Spur 1 und 8) und 30, 60, 90 und 120 min nach Induktion (Spuren 2 - 5 und 9 - 12) hergestellt wurden. **B.** Das rechte Gel (8 % Trenngel, ca. 20 - 30 µg Protein/Spur) zeigt die Auftrennung der Gesamtzell-extrakte von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET16B2 und -/pET16B1B2, die vor Induktion mit IPTG (Spur 1 und 8) und 30, 60, 90 und 120 min nach Induktion (Spuren 2 - 5 und 9 - 12) hergestellt wurden.

### 3.1.5 Ermittlung der Lagerungs- und Enzymtestbedingungen und Substratanaloga

#### *Lagerung der Proteinextrakte*

Für die Durchführung einer möglichst genauen Bestimmung eines  $K_M$ -Wertes von LmbB1 für L-DOPA, war ein Proteinextrakt mit höchstmöglicher Aktivität nötig. Im folgenden wurde als Expressionsstamm nicht wie bisher *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, sondern *E. coli* JM109 (DE3) verwendet, damit die Zellen nicht vorzeitig lysierten. Diese Maßnahme sollte einem vermeidbaren Aktivitätsverlust vorbeugen. Um nicht vor jedem Enzymtest eine erneute Expressionskultur anziehen zu müssen, wurde eine 1 l-Kultur von JM109 (DE3)/pET16B1

angezogen, die Zellen in Zellpuffer aufgenommen (0,25 g Naßzellen/ml) und aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen mit produziertem Enzym konnten ohne Aktivitätsverlust mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden. Wenn die LmbB1-beinhalten- den Zellen zu zellfreien Extrakten verarbeitet waren, erwies sich die Erhaltung der Aktivität über länger als 24 h als schwierig. Es wurde bei verschiedenen Temperaturen (-20, 0, 6, 18 °C) mittels einer Auswahl von bewährten Agenzien versucht, die Aktivität zu erhalten (vgl. Abb. 3-5). Der frisch gewonnene Rohextrakt konnte bei -20 °C gelagert werden, wobei jedoch bei jedem Einfrieren/Auftauen-Zyklus ca. 10 - 15 % Aktivität verloren ging. Es zeigte sich, daß bei -20 °C die Zugabe von 10 % oder 20 % Saccharose zur Erhaltung der Aktivität günstiger war als die Zugabe von PEG1000 oder Glycerin, doch die Anfangsaktivität (t = 0 h, 2 h) war geringer als die des reinen RE. Auch mit Vitamin C, DTT und 2-Mercaptoethanol konnte keine Stabilisierung bzw. Verbesserung der Aktivität festgestellt werden. In Tris-Puffer (50 - 100 mM, pH 8 - 9) und auf Eis konnte der Rohextrakt über 1 - 2 d stabil gehalten werden. Da bei keiner der beschriebenen Methoden der Rohextrakt über längere Zeit, d.h.

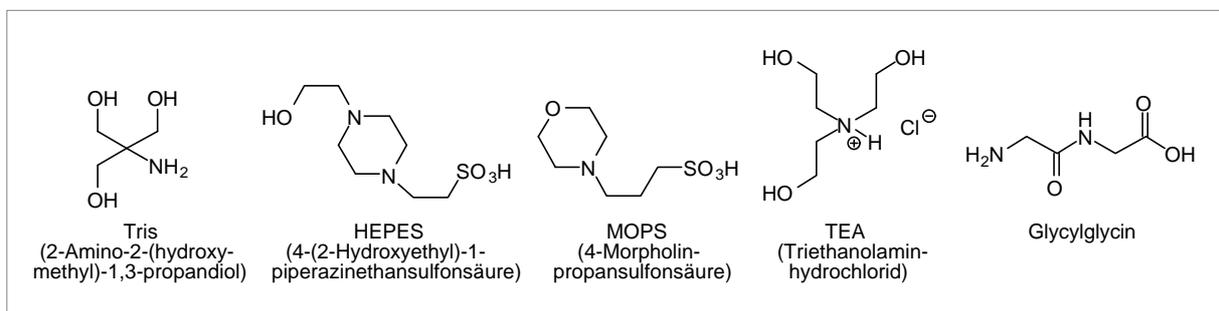


**Abb. 3-5.** Versuche, die Aktivität des LmbB1-Enzyms in zellfreien Extrakten zu stabilisieren. Es wurde der Rohextrakt (RE) mit einer Auswahl von bewährten Agenzien versetzt und die Extinktionsänderung bei 413 nm in einem Standardenzymtest (vgl. Abschnitt 2.2.23) gemessen. Diese Messung wurde nach 2 h, 6 h und 20 h mit denselben Extrakten wiederholt und die vier einzelnen Extinktionsänderungen addiert (die Summe entspricht der Gesamtlänge des Balkens). Die Mengenangaben von Glycerin, PEG1000 und Saccharose (S.) sind in % w/v angegeben. Bei allen Tests wurde die gleiche Proteinmenge eingesetzt. 2-ME, 2-Mercaptoethanol; DTT, Dithiothreitol; Vit. C, Ascorbinsäure.

mindestens 7 d, stabilisiert werden konnte, wurden die im folgenden beschriebenen Enzymtests mit jeweils frisch aufgeschlossenen Zellen durchgeführt. Dabei betrug die Aktivitätsabnahme der zellfreien Extrakte nach 6 h bei 0 °C weniger als 5 %.

#### Wahl eines geeigneten Puffersystems und das pH-Optimum

Bevor das pH-Optimum des Enzyms LmbB1 ermittelt wurde, mußte zunächst ein geeigneter Puffer gesucht werden. Zur Wahl standen Tris, Na-/K-Phosphat, HEPES, MOPS, TEA und Glycylglycin (s. Abb. 3-6).

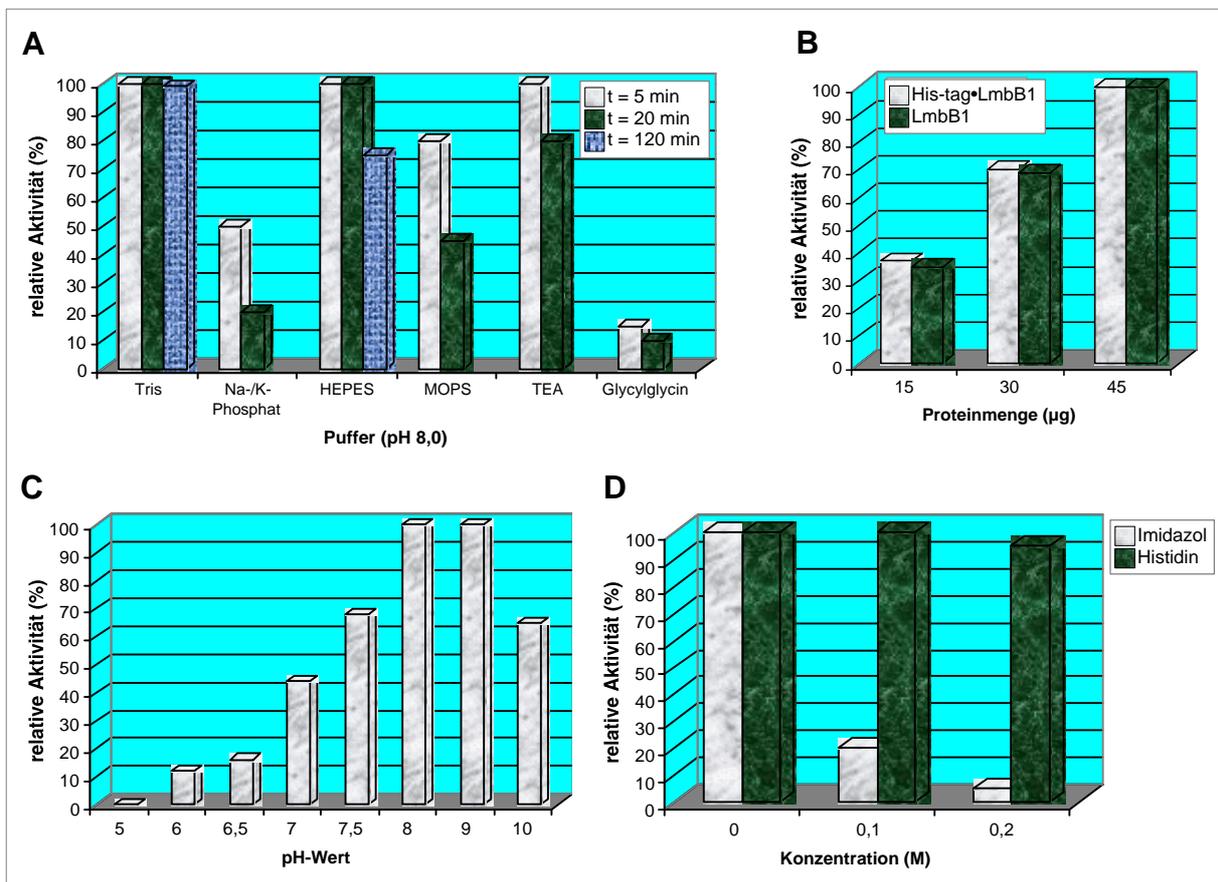


**Abb. 3-6.** Chemische Strukturen verschiedener Puffer, die für einen *in vitro* Enzymtest von LmbB1 erprobt wurden.

Die verschiedenen Puffer wurden in einem Standardtest mit folgenden Komponenten eingesetzt: 100 mM Puffer, pH 7,5; 20 µg Protein (ca. 5 µl zellfreier Extrakt); 0,5 mM L-DOPA. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Proteins gestartet. Die erste Extinktionsänderung wurde nach 3 min abgelesen und nach weiteren 20 min der zweite Wert aufgenommen. Die Extinktionen wurden direkt miteinander graphisch verglichen (vgl. Abb. 3-7 A). Man konnte erkennen, daß Tris und HEPES am besten für diese Reaktion geeignet waren. In beiden Puffern wurden Zellaufschlüsse von JM109 (DE3)/pET16B1 durchgeführt. Nach 2 h Lagerung auf Eis wurden erneut die Umsatzraten verglichen und gravierende Unterschiede festgestellt. Während LmbB1 in Tris nahezu keine Aktivität verloren hatte, war die des LmbB1 in HEPES auf 75 % der ursprünglichen Aktivität gesunken. Daher wurde das pH-Optimum der Reaktion in Tris-Puffer bestimmt. Der Reaktionsansatz ähnelte dem der Pufferbestimmung; es wurde 0,1 mM Tris mit den pH-Werten 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0 und 10,0 eingesetzt. Es stellte sich heraus, daß das pH-Optimum dieser Reaktion zwischen pH 8 und 9 lag und daß unterhalb von pH 7,5 und oberhalb von pH 9 die Aktivität des Enzyms stark abnahm (vgl. Abb. 3-7 C).

### Vergleich der Aktivitäten von LmbB1 und His-tag•LmbB1

Man kann unmöglich voraussagen, ob die His-tag-Version eines Enzyms die gleiche Aktivität hat, wie das native Protein. Wenn kein Unterschied festzustellen ist, wird das His-tag•Protein bevorzugt, weil es leichter zu reinigen ist. Für einen direkten Vergleich wurden die zellfreien Extrakte der Anzuchten von *E. coli* BL21 pLysS/pDNW13.1 und -pET16B1 in einem Enzymtest eingesetzt. Mittels einer PAGE wurde gezeigt, daß die Mengen der beiden entstandenen Proteine relativ zum Gesamtprotein nahezu identisch waren, da in beiden Fällen unter der Kontrolle des *T7 F10p* exprimiert wurde (Gel nicht gezeigt). Bei Einsatz der gleichen Proteinmengen in einem Standardtest (100 mM Tris, pH 8,0; 15, 30 und 45 µg Protein; 0,5 mM L-DOPA) konnte photometrisch belegt werden, daß durch das N-terminal fusionierte His-tag-Peptid keine Beeinträchtigung der Aktivität auftrat (vgl. Abb. 3-7 B).

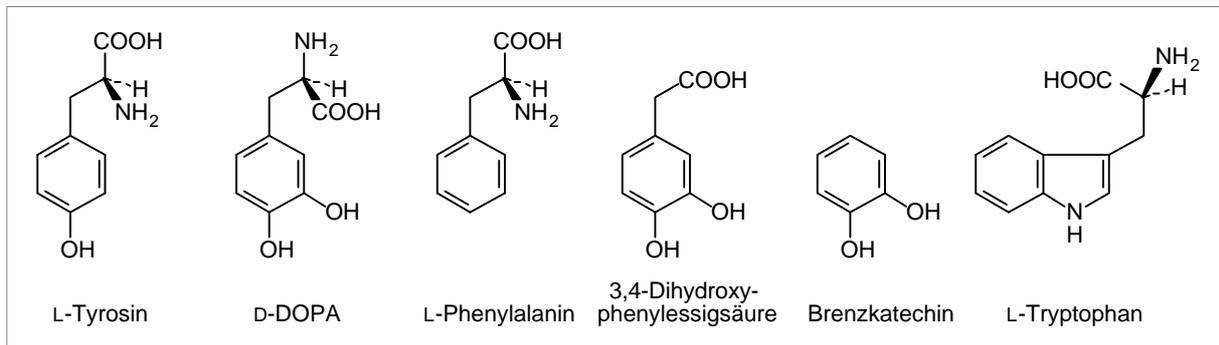


**Abb. 3-7.** Bestimmung der optimalen Enzymtestbedingungen und Vorversuche für die Reinigung von His-tag•LmbB1. Die Enzymtests wurden auf der Grundlage des Standardtestsystems wie unter Abschnitt 2.2.23 beschrieben durchgeführt. **A.** Wahl des optimalen Puffers für die Aufnahme enzymatischer Tests. Die verschiedenen Puffer wurden auf pH 8,0 eingestellt. **B.** Darlegung der Aktivitätsidentität von His-tag•LmbB1 und LmbB1. Die Tests wurden in Tris/HCl, pH 8 durchgeführt. **C.** Meßreihe zur Bestimmung des pH-Bereichs, durchgeführt in Tris-Puffer. **D.** Einfluß von Imidazol und Histidin auf die Aktivität von LmbB1. Als Puffer wurde Tris/HCl, pH 8 verwendet.

### Mögliche Existenz von Substratanaloga und Inhibitoren

Bisher wurde immer nur L-DOPA als Substrat von LmbB1 eingesetzt. Es wäre durchaus möglich, daß LmbB1 in der Lage ist, noch andere Substrate umzusetzen, bei denen eine Spaltung des aromatischen Ringes zu einer Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 413 nm führt. Eine Auswahl von möglichen Substraten, die zu L-DOPA Ähnlichkeit besitzen, wurde in einem Standardtest (100 mM Tris, pH 8,0; 20 µg Protein aus RE; 0,5 mM Substrat) eingesetzt. Das Ergebnis war bei den getesteten Substraten L-Tyrosin, D-DOPA, L-Phenylalanin, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, Brenzkatechin und L-Tryptophan (vgl. Abb. 3-8) gleich, d.h. es konnte keine Extinktionsänderung gemessen werden.

Die oben genannten Substanzen übten, ebenso wie Ammoniumchlorid und Histidin, aber auch keine inhibierende Wirkung auf die Aktivität von His-tag•LmbB1 aus. Es sei nochmals erwähnt, daß im Gegensatz dazu, Phosphat-Puffer, Glycylglycin und Imidazol, genau wie ein pH-Wert unter 7, hemmende Wirkungen auf LmbB1 bzw. His-tag•LmbB1 hatten (vgl. Abb. 3-7 C und D).



**Abb. 3-8.** Substanzen, die Strukturelemente aufweisen, die ebenfalls in L-DOPA zu finden sind. Sie wurden auf die Eigenschaft untersucht, in einer Reaktion mit LmbB1 als Substratanaloga zu L-DOPA zu dienen.

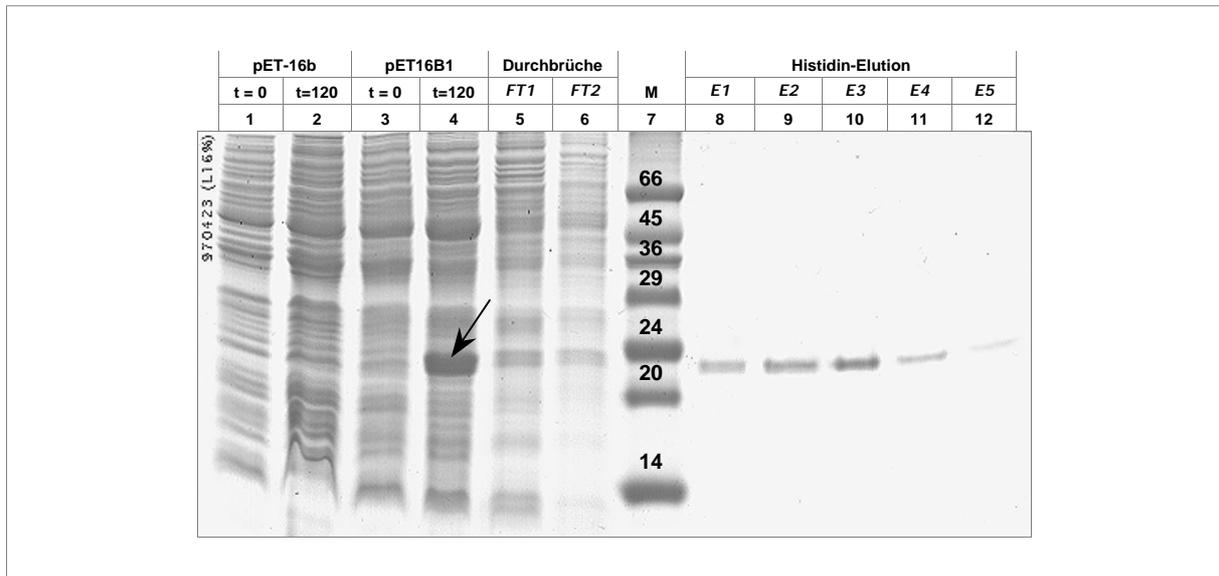
#### 3.1.6 Reinigung von His-tag•LmbB1

Für die präparative Reinigung von His-tag•LmbB1 wurde ein zellfreier Extrakt von *E. coli* JM109 (DE3)/pET16B1 mittels Ni-NTA-Agarose von den Proteinen ohne His-tag befreit. Im Standardprotokoll des Herstellers der Ni-NTA-Agarose wurde vorgeschlagen, Imidazol (250 mM) oder wahlweise einen pH-Gradienten (pH 7 - 4) zur Elution des His-tag•Proteins zu

verwenden. Als optimiertes Puffersystem für alle Wasch- und Elutionsschritte wurde Na-Phosphat angegeben. Da wie unter Abschnitt 3.1.15 angegeben, für Arbeiten mit LmbB1 oder His-tag•LmbB1 (a) nur Tris als Puffer verwendet werden durfte und (b) Imidazol und ein pH-Wert unter 7 die Aktivität stark herabsetzten, mußte eine völlig veränderte Reinigungsstrategie angewendet werden (vgl. Abschnitt 2.2.19). Die mit Lysepuffer (LP) äquilibrierte Säule wurde mit dem gewonnenen zellfreien Extrakt beschickt und der Durchbruch insgesamt dreimal wieder auf die Säule gegeben, um die Ausbeute an gebundenem His-tag•LmbB1 zu erhöhen (letzter Durchbruch = *FT1*). Die Säule wurde mit LP gewaschen (Durchbruch = *FT2*) und anschließend an eine FPLC angeschlossen. Es war bekannt, daß Tris die Adsorption von Proteinen an die Ni-NTA-Matrix erschwert (Qiagen, 1997). In dem Fall von His-tag•LmbB1 hatte man es mit einem Fusionsprotein zu tun, welches durch die hohe Anzahl von 12 Histidin-Resten in der N-terminalen Region besonders stark mit der Ni-NTA-Agarose interagieren sollte. Mit Hilfe der FPLC wurde ein linearer Tris-Gradient (pH 8,0) erzeugt, mit dem es möglich war, die Adsorption nicht relevanter Proteine zu schwächen. Dabei wurden die in Abschnitt 2.2.19 angegebenen Programmschritte 1 - 5 durchlaufen und die Fraktionen *FT3* und *FT4* von der Säule gespült. *FT3* konnte gewonnen werden, indem die Säule mit WP gewaschen wurde (Schritt 1). Durch den angelegten Gradienten (Schritt 2) und die Behandlung mit 80/20 % WP2/WP1 (Schritt 3) produzierte man die vierte Fraktion (*FT4*). Zur Elution des His-tag•LmbB1-Proteins wurde mit Histidin-haltigen Pufferlösungen gespült. Erst mit 0,1 M (*E1*), dann mit 0,15 M (*E2*) und zuletzt mit 0,2 M Histidin (*E3* - *E8*). Bei einer Endkonzentration von 0,2 M Histidin nahm die Menge an Protein im Durchbruch der Säule ab, was durch die Extinktionsänderung bei einer Wellenlänge von 280 nm gut verfolgt werden konnte. Hier zeigte sich auch ein weiterer Vorteil von Histidin, das, im Gegensatz zu Imidazol, nicht bei 280 nm absorbiert. Das Gesamtelutionsvolumen betrug 12 ml.

Die Zellextrakte der zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben der Expressionskultur, die gewonnenen Durchbrüche (*FT1* und *FT2*) und die wichtigsten Eluate (*E1* - *E5*) wurden einer PAGE unterzogen (s. Abb. 3-9). Das His-tag•LmbB1 konnte in Spur 4 (pET16B1,  $t = 120$  min) auf einer Höhe, die etwa 22 - 23 kDa entsprach, gut erkannt werden. Diese Bande trat wie erwartet nicht bei der Nullkontrolle in Spur 2 (pET-16b,  $t = 120$  min) auf. Es ist ebenso zu sehen, daß nach der Induktion mit IPTG fast ausschließlich His-tag•LmbB1 produziert wurde und daß beim Beladen der Säule mit dem RE mindestens 90 % des Fusionsproteins an der Ni-NTA-Matrix adsorbierte (siehe die Durchbrüche *FT1* und *FT2* in den Spuren 5 und 6). Die im Coomassie-gefärbten PAA-Gel dargestellten Elutionsfraktionen *E1* bis *E5* in den Spuren 8 bis 12 weisen keine anderen sichtbaren Proteine auf. Man konnte also

davon ausgehen, daß die Reinigung des gewünschten Proteins bis zur Homogenität (> 99 %) erreicht wurde.

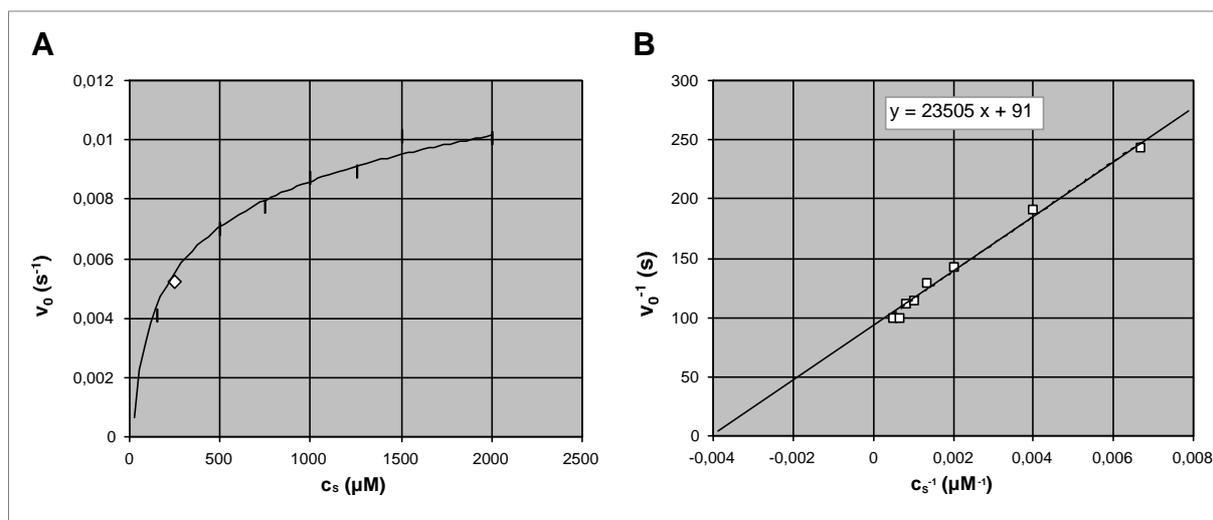


**Abb. 3-9.** Darstellung der Expression und Reinigung des His-tag•LmbB1-Proteins in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel. Die Spuren 1 - 4 enthalten die zellfreien *E. coli* JM109 (DE3)-Extrakte mit dem Vektor pET-16b (Spur 1: 0 min; Spur 2: 120 min nach Induktion) und dem rekombinanten Plasmid pET16B1 (Spur 3: 0 min; Spur 4: 120 min nach Induktion). Die anderen Spuren enthalten die einzelnen Säuleneluate FT1 (Spur 5), FT2 (Spur 6) und E1 - E5 (Spur 8 - 12). Der Pfeil markiert das vermehrt produzierte His-tag•LmbB1-Protein. M, Proteingrößenstandard, die molekularen Massen (kDa) sind auf dem Gel angegeben (Spur 7).

### 3.1.7 Ermittlung des $K_M$ -Wertes und der spezifischen Aktivitäten

Es wurde der  $K_M$ -Wert des gereinigten His-tag•LmbB1-Proteins mit L-DOPA als Substrat bestimmt. Dazu mußte die Extinktion der Reaktion, wie unter Abschnitt 2.2.23 beschrieben, verfolgt werden, wobei 150, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 und 2000  $\mu\text{M}$  L-DOPA als Substrat eingesetzt wurden. Die Messung wurde fünfmal für jede L-DOPA-Konzentration wiederholt und die gemittelten Anfangsgeschwindigkeiten (Extinktionsänderungen/Zeiteinheit) gegen die Substratkonzentrationen in einem Michaelis-Menten-Diagramm aufgetragen (vgl. Abb. 3-10 A). Der  $K_M$ -Wert wurde durch die doppeltreziproke Darstellung der Daten des Michaelis-Menten-Diagramms in einem Lineweaver-Burk-Diagramm bestimmt (vgl. Abb. 3-10 B). Die sich aus den acht Meßpunkten ergebende Gerade hatte die Gleichung:

$$y(\text{sec}) = 23505 (\mu\text{M} \times \text{sec}) x (\mu\text{M}^{-1}) + 91 (\text{sec}).$$



**Abb. 3-10.** Michaelis-Menten-Diagramm (A) und Lineweaver-Burk-Auftragung (B) eines Enzymtests mit gereinigtem His-tag•LmbB1 und L-DOPA als Substrat. Es wurden 150, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 und 2000  $\mu\text{M}$  L-DOPA eingesetzt. Die sich ergebende Geradengleichung der Lineweaver-Burk-Auftragung ist in der Grafik angegeben.

Nachdem von den einzelnen untersuchten Extrakten eine Proteinbestimmung (vgl. Abschnitt 2.2.18) durchgeführt worden war, konnten die Gesamtaktivitäten und die spezifischen Aktivitäten ermittelt werden, die in Tab. 3-4 zusammengefaßt sind. Aus den spezifischen Aktivitäten des RE und des gereinigten Enzyms konnte ein Reinigungsfaktor von 2,9 berechnet werden.

**Tab. 3-4.** Aufstellung aller Proteinextrakte mit ihren zugehörigen Aktivitäten.

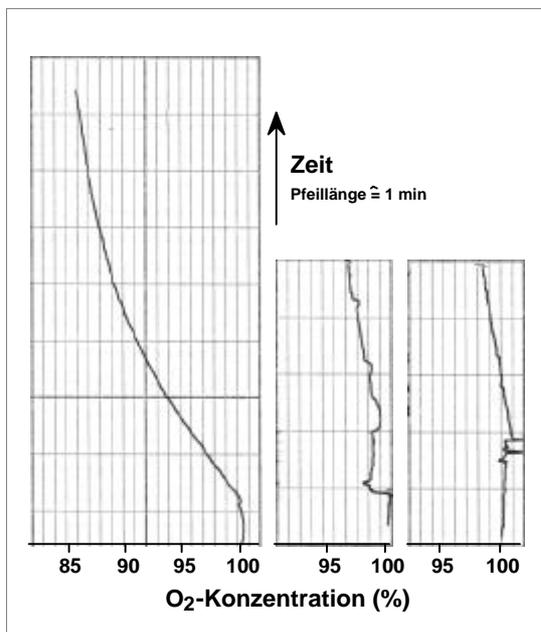
| Fraktion <sup>a</sup> | Gesamtvolumen (ml) | Gesamtprotein (mg) | Enzymaktivität (nkat) | spez. Aktivität (nkat/mg) |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------|
| RE                    | 0,50               | 2,49               | 145,32 (100 %)        | 58,36                     |
| FT1                   | 1,25               | 1,22               | 3,87 (2,7 %)          | 3,17                      |
| FT2                   | 3,15               | 1,20               | 1,45 (1,0 %)          | 1,21                      |
| FT3                   | 12,50              | 0,17               | 0                     | 0                         |
| FT4                   | 25,50              | 0,10               | 0                     | 0                         |
| E1 - E8               | 12,00              | 0,44               | 74,86 (51,5 %)        | 170,14                    |

Faktor  
2,9

<sup>a</sup> RE, Rohextrakt; FT1 - 4, Eluate, die durch Waschen der Säule mit Puffer entstanden sind; E1 - E8, Histidin-Elution; nähere Erklärungen sind im Text angegeben.

### 3.1.8 Messung des Sauerstoffverbrauchs

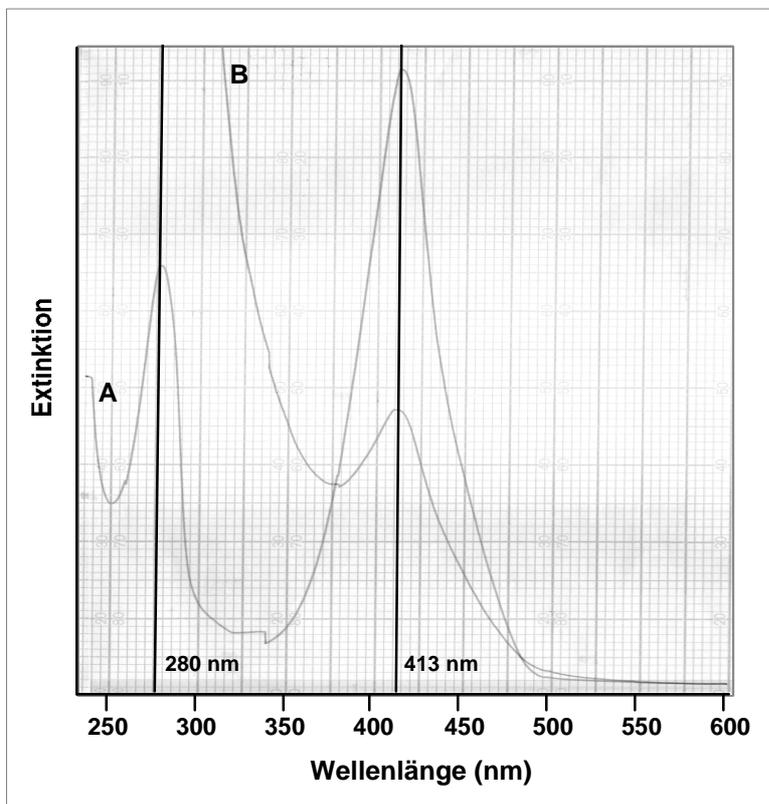
Durch die in dieser Arbeit und von anderen erbrachten Ergebnisse (Neusser *et al.*, 1998) konnte davon ausgegangen werden, daß LmbB1 sich wie eine L-DOPA-2,3-Dioxygenase verhält. Dies schließt einen meßbaren Verbrauch von Sauerstoff während der Reaktion mit ein. Diese Vermutung konnte mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode bestätigt werden. Gab man RE von *E. coli* JM109 (DE3)/pET16B1 zu einer Tris-gepufferten Lösung von L-DOPA so nahm, wie schon bekannt, die Lösung eine gelbliche Farbe an. Gleichzeitig sank der Sauerstoffgehalt, der zu Beginn der Reaktion auf 100 % gesetzt wurde, innerhalb von 2,5 min auf 89 % und in 4 min auf 86 % (s. Abb. 3-11 A). Zum Vergleich wurden einige Nullkontrollen durchgeführt. Ohne Zugabe von RE blieb die Sauerstoffmenge über einen Meßraum von 5 min bei 100 % (Daten nicht gezeigt). Verwendete man RE von *E. coli* JM109 (DE3)/pET-16b (s. Abb. 3-11 B) oder durch Erhitzen inaktivierten RE von *E. coli* JM109 (DE3)/pET16B1, sank die O<sub>2</sub>-Menge in dem Reaktionsansatz während einer Meßdauer von 2,5 min nur um 3 % bzw. 2 %.



**Abb. 3-11.** Messung des Sauerstoffverbrauchs der Umwandlung von L-DOPA zu einer gelben Substanz durch LmbB1. 100 % Sauerstoff entspricht der O<sub>2</sub>-Konzentration zu Beginn des Tests. In allen Ansätzen wurden Tris-Puffer und L-DOPA vorgelegt und anschließend zellfreier Extrakt zugegeben. **A.** RE von *E. coli* JM109 (DE3)/pET16B1, 11 % O<sub>2</sub>-Verbrauch nach 2,5 min. **B.** RE von *E. coli* JM109 (DE3)/pET-16b, 3 % O<sub>2</sub>-Verbrauch nach 2,5 min. **C.** RE von *E. coli* JM109 (DE3)/pET16B1 (gekocht), 2 % O<sub>2</sub>-Verbrauch nach 2,5 min.

### 3.1.9 Versuch der Analyse des Produktes einer Umsetzung von L-DOPA durch LmbB1

In Abschnitt 3.1.3 wurde gezeigt, daß bei Zugabe von L-DOPA bzw. L-Tyrosin zu einer induzierten *E. coli*-Kultur mit dem rekombinanten Plasmid pET16B1B2 in beiden Fällen eine gelbe Substanz produziert wurde. Von den Medienüberständen wurden UV/VIS-Spektren aufgenommen (s. Abb. 3-12). Obwohl die Spektren auf den ersten Blick unterschiedlich aussahen, fand man bei beiden ein Maximum bei 413 nm, welches charakteristisch für die gelbe Substanz war, die durch LmbB1 aus L-DOPA entsteht (Neusser *et al.*, 1998). Beide Spektren wiesen Maxima bei 280 nm auf, welches in der Hauptsache durch L-DOPA (274 nm) bzw. L-Tyrosin (275 nm) und das Minimalmedium selbst verursacht wurden.



**Abb. 3-12.** Zwei übereinandergelegte UV/VIS-Spektren der Überstände von Expressionskulturen *E. coli* JM109 (DE3)/pET16B1B2, die mit L-DOPA (A) bzw. L-Tyrosin (B) supplementiert wurden. Die beiden Hauptabsorptionsmaxima wurden durch senkrechte Striche bei 280 und 413 nm gekennzeichnet.

Es wurde ebenfalls versucht, NMR-Spektren von der gelben Substanz aufzunehmen. Für ein auswertbares  $^1\text{H}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sollten mindestens 10 - 15 mg des reinen Produkts zur Verfügung stehen. Während der Reinigung der gelben Substanz stellte sich heraus, daß bei Verringerung des Lösungsmittelvolumens die ursprünglich fluoreszierend gelbe Substanz braun wurde. Bei vollständiger Entfernung des Lösungsmittels durch Gefriertrocknung blieb ein braunes Pulver übrig, welches sich wieder in Wasser lösen ließ. Die Lösung nahm dabei

eine gelbe, aber nicht mehr die ursprüngliche hellgelbe Farbe an. Es wurde deshalb vermutet, daß es sich hierbei um eine teilweise Polymerisation handelte. Eine  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse dieser braunen Substanz, die sich auch in DMSO gut löste (mit brauner Färbung), brachte ein nicht zu interpretierendes Spektrum (nicht gezeigt). Die Tatsache, daß sich die gelbe Substanz nicht in einem unpolaren Lösungsmittel löste, machte eine Reinigung durch Ausschütteln oder Umkristallisation unmöglich.

Eine Trennung der gelben Substanz von Nebenprodukten wurde auch mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie versucht. Dabei zeigte sich, daß Zellulose geeigneter war, als z.B. Kieselgel oder Papier, bei denen die gelbe(n) Substanz(en) als sehr breite und diffuse Bande(n) zu erkennen war(en). Mit einer Mischung aus 70 % Isopropanol und 30 % Wasser als Lösungsmittel konnte nach dem Lauf auf der Zellulose-DC-Platte eine breite, aber scharfe gelbe Bande aufgetrennt werden. Ob eine echte Trennung von den Nebenprodukten erfolgt war, konnte nicht erkannt werden.

### 3.1.10 As-Sequenzvergleich von LmbB1 mit MpcII

Um LmbB1 in eine Proteinfamilie einzuordnen, wurde eine Datenbanksuche durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Die beste Übereinstimmung fand sich mit der C-terminalen Hälfte der Metapyrocatechase MpcII (Genbank Zugangsnummer X52415; Kabisch und Fortnagel, 1990) aus *Alcaligenes eutrophus* (22 % Identität in einem 127 As-Abschnitt). Der in Abb. 3-13 gezeigte Proteinvergleich von LmbB1 mit MpcII wies folgende Sequenzähnlichkeiten auf: (1) ein Motiv (blau), das bei vielen Catechol-2,3-Dioxygenasen auftritt und die Consensus-Sequenz  $\text{Hx}_7\text{FYx}_2\text{DPxGx}_3\text{E}$  hat (Harayama und Reikik, 1989), wobei in LmbB1 nur der erste Histidin-Rest fehlt; (2) die His-His-hydrophob-Motive (rot), die typisch für Oxygenasen sind und zwei- bis dreimal pro Protein vorkommen. Sie sind vermutlich für die katalytische Aktivität und/oder die Bindung bivalenter Ionen, z.B.  $\text{Fe}^{2+}$  verantwortlich (Nozaki, 1979); (3) am N-Terminus von MpcII fällt ein Bereich auf, der erst im letzten Drittel von LmbB1 wiedergefunden werden kann. Dieser Proteinbereich in LmbB1 könnte eine ähnliche Funktion haben, wie der entsprechende N-Terminus von MpcII.

In einem zweiten Suchlauf (<http://blocks.fhcrc.org/>) wurde ausschließlich nach bekannten Motiven (Blocks) gesucht, d.h. Bereichen, deren Funktionen bekannt und typisch für die entsprechenden Enzyme sind (Henikoff und Henikoff, 1991). Dabei fanden sich drei As-Blöcke A, B und C, die Ähnlichkeiten zu bekannten Enzymen hatten, die alle zu der Gruppe

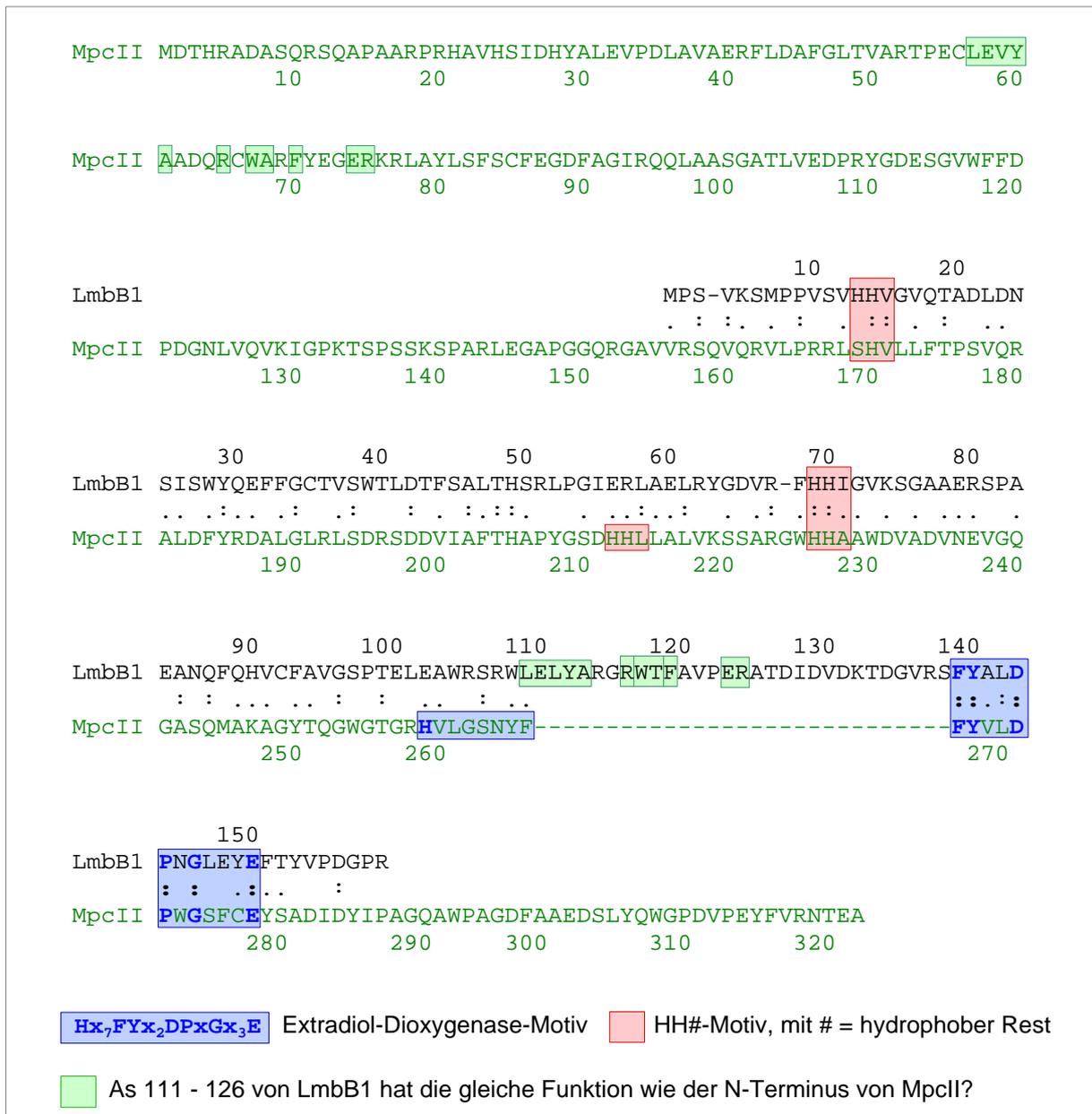
der ringspaltenden Extradiol-Dioxygenasen gehören. Zu jedem Block sind im folgenden die drei Proteine mit den besten Übereinstimmungen angegeben:

Block A: (1) Metapyrocatechase II (Catechol-2,3-Dioxygenase, EC 1.13.11.2) aus *Alcaligenes eutrophus*; (2) Biphenyl-2,3-diol 1,2-Dioxygenase (EC 1.13.11.39) aus *Pseudomonas paucimobilis* (*Sphingomonas paucimobilis*); (3) Biphenyl-2,3-diol 1,2-Dioxygenase I (EC 1.13.11.39) aus *Rhodococcus globerulus*.

Block B: (1) wie (1) aus Block A; (2) Metapyrocatechase (Catechol-2,3-Dioxygenase, EC 1.13.11.2) aus *Bacillus stearothermophilus*; (3) wie (2) aus Block A.

Block C: (1) wie (1) aus Block A; (2) wie (2) aus Block B; (3) wie (2) aus Block A.

Wie unschwer zu erkennen war, hatte auch bei dieser Suche die Metapyrocatechase II aus *Alcaligenes eutrophus* die beste Übereinstimmung mit der eingegebenen As-Sequenz. Die anderen gefundenen Proteine, eine weitere Metapyrocatechase und zwei Biphenyl-2,3-diol 1,2-Dioxygenasen untermauern die bisherigen Ergebnisse, daß LmbB1 eine ringspaltende Extradiol-Dioxygenase ist.



**Abb. 3-13.** Vergleich der Aa-Sequenzen von LmbB1 und MpcII. Die Proteinähnlichkeit beträgt 22 % Identität in 127 Aa. LmbB1 (schwarz), L-DOPA-2,3-Dioxygenase aus *Streptomyces lincolnensis*. MpcII (grün), Metapyrocatechase aus *Alcaligenes eutrophus*. Konservierte Regionen: (1) In blau hervorgehoben, ein Motiv, das bei vielen Extradiol-Dioxygenasen auftritt, wobei bei LmbB1 nur der erste Histidin-Rest fehlt. (2) In rot, die His-His-hydrophob-Motive, die typisch für Oxygenasen sind und 2 - 3 mal pro Protein vorkommen und vermutlich Fe<sup>2+</sup> binden. (3) Grün markiert ist im letzten Drittel von LmbB1 ein Bereich, der am N-Terminus von MpcII wiedergefunden werden kann (ebenfalls grün markiert). Diese beiden Proteinabschnitte könnten eine ähnliche Funktion haben. Unter der Sequenz ist außer der Legende für die konservierten Regionen die Consensus-Sequenz für Extradiol-Dioxygenase-Motive angegeben. Mit x sind variable Aa bezeichnet.

## 3.2 Charakterisierung des Gens *lmbY*

### 3.2.1 Allgemeine Eigenschaften der genetischen Umgebung von *lmbY*

Die Leserahmen im Bereich von *lmbY* wurden wie in Abb. 3-14 A dargestellt festgelegt (Peschke *et al.*, 1995). Das Gen *lmbY* hat eine Länge von 888 bp, die für 296 Aa kodieren und eine molekulare Masse von 32,4 kDa ausmachen. Das Gen *lmbU*, welches stromaufwärts von *lmbY* lokalisiert ist und eine Länge von 672 bp hat, kodiert für ein 224 Aa-Protein mit einer relativen Masse von 25,3 kDa. Stromabwärts von *lmbY* liegt das 891 bp umfassende Gen *lmbX*, dessen Genprodukt eine errechnete Masse 30,7 kDa bei 297 Aa hat. Die Gene *lmbY* und *lmbX* sind höchstwahrscheinlich translational gekoppelt (Gold und Stormo, 1987), denn, vergleichbar mit *lmbB1* und *lmbB2* (vgl. Abschnitt 3.1.1), überlappen das Startcodon von *lmbX* (im Beispiel **fett** dargestellt) und das Stopcodon von *lmbY* (unterstrichen): ...GCATGATC....

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, konnte die Funktion des Genproduktes von *lmbY* noch nicht aufgeklärt werden. Es bestand die Hypothese, daß es eine Deazaflavin-Coenzym-abhängige Oxidoreduktase ist, deren zweites Substrat entweder NAD(P)H oder TDPPL ist. Es wurden Datenbanksuchen (»BLAST Searches«) durchgeführt, um nach Sequenzhomologien zu anderen Proteinen, deren Funktionen bekannt waren, zu suchen. Dabei wurden die Ergebnisse vorheriger Datenbanksuchen bestätigt. Die ähnlichen Proteine sind in Tab. 3-5 wiedergegeben. Es fällt auf, daß die meisten Proteine F<sub>420</sub>-abhängige N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylentetrahydromethanopterin-Reduktasen und einige F<sub>420</sub>-abhängige Dehydrogenasen sind. Für *LmbY* wurde aber weiterhin vermutet, daß es für einen Syntheseschritt der PPL-Untereinheit verantwortlich ist, was auch im Laufe der Arbeit bestätigt wird. Da die gefundenen F<sub>420</sub>-abhängigen Proteine in vielen verschiedenen Stämmen vorkommen und dort anscheinend Primärstoffwechselfunktionen einnehmen, konnte man davon ausgehen, daß die Ähnlichkeit zu *LmbY* durch ein F<sub>420</sub>-bindendes Motiv verursacht wurde. Es mußten weiterhin andere Wege gefunden werden, um die Bedeutung von *LmbY* für die Lm-Biosynthese ersichtlich zu machen.

Es war weiterhin nicht bekannt, welche Länge das Transkript im Bereich von *lmbY* hat. Es bestanden die Möglichkeiten, daß entweder ein 1,8 kb *lmbYX* oder ein 2,6 kb *lmbUYX* Transkript entsteht (vgl. Abb. 3-14 A). Darüber hinaus mußte die Vermutung bestätigt werden, daß *lmbY* zu denjenigen Genen gehört, die für die Synthese der PPL-Untereinheit von Lm verantwortlich sind.

**Tab. 3-5.** *lmbY*-ähnliche, F<sub>420</sub>-bindende Proteine, ihre Ursprünge und ihre Ähnlichkeit mit *lmbY*.

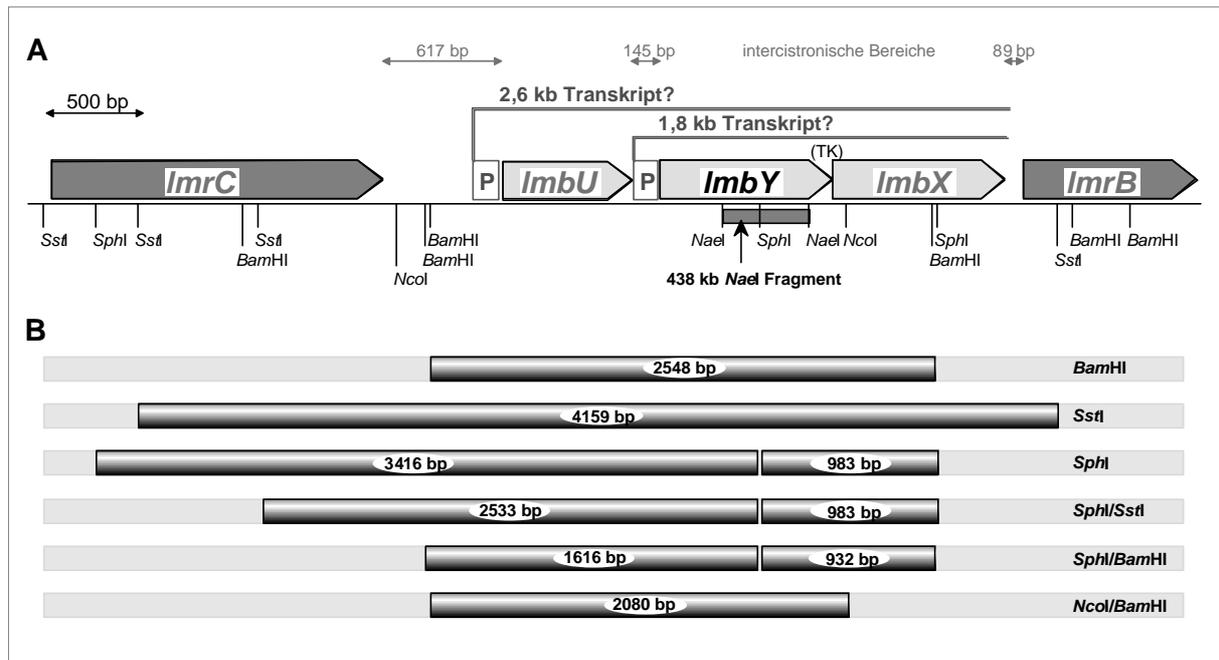
| Protein   | Stamm                                       | Ähnlichkeiten <sup>a</sup>               |
|---|---|--|
| N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylentetrahydro-methanopterin Reduktase                                     | <i>Methanococcus jannaschii</i>             | I = 57/221 (25 %),<br>Ä = 98/221 (43 %)  |
| N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylentetrahydro-methanopterin Reduktase                                     | <i>Archaeoglobus fulgidus</i>               | I = 69/275 (25 %),<br>Ä = 114/275 (41 %) |
| Methylentetrahydro-methanopterin Reduktase  | <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> | I = 54/222 (24 %),<br>Ä = 92/222 (41 %)  |
| Coenzym F <sub>420</sub> -abhängige N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methylentetrahydro-methanopterin Reduktase | <i>Methanopyrus kandleri</i>                | I = 56/231 (24 %),<br>Ä = 97/231 (41 %)  |
| F <sub>420</sub> -abhängige Glucose-6-phosphat Dehydrogenase  | <i>Mycobacterium avium</i>                  | I = 63/215 (29 %),<br>Ä = 92/215 (42 %)  |
| F <sub>420</sub> -abhängige Alkohol Dehydrogenase   | <i>Methanoculleus thermophilicus</i>        | I = 56/226 (24 %),<br>Ä = 95/226 (41 %)  |

<sup>a</sup> I, Identität; Ä, Summe aus identischen und ähnlichen As (bestimmt nach Matrix BLOSUM62).

### 3.2.2 Überprüfung verschiedener Bakterienstämme auf (a) die Anwesenheit von *lmbY* oder homologen Genen und (b) die Position von *lmbY* in den Lincomycinproduzenten mit Hilfe von DNA-DNA-Hybridisierung

Die in der Diplomarbeit (Neußer, 1995) durchgeführten Versuche, bei denen nach weiteren Stämmen (außer *S. lincolnensis* 78-11 und NRRL 2936) gesucht wurde, die *lmbY* oder ein homologes Gen besitzen, wurden erweitert. Dazu wurden von Lm-Produzenten (Nr. 1 - 7) und von Lm-Nichtproduzenten (Nr. 8 - 13) die chromosomale DNA isoliert (vgl. Abschnitt 2.2.2.2):

- |  |  |
|--|--|
| 1) <i>S. lincolnensis</i> 78-11        | Lm <sup>+</sup> (Überproduktionsmutante) |
| 2) <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936    | Lm <sup>+</sup> (Wildtyp)                |
| 3) <i>S. lincolnensis</i> NRRL 5321    | Lm <sup>-</sup> (Mutante von NRRL 2936)  |
| 4) <i>S. pseudogriseolus</i> NRRL 3985 | Lm <sup>+</sup>                          |
| 5) <i>S. sp. (espinosus)</i> NRRL 3890 | Lm <sup>+</sup>                          |
| 6) <i>S. espinosus</i> NRRL 5729       | Lm <sup>+</sup>                          |
| 7) <i>S. vellosus</i> NRRL 8037        | Lm <sup>+</sup>                          |
- Forts. Nr. 8 - 13: nächste Seite



**Abb. 3-14. A.** Aufbau des Genclusters im Bereich von *ImbY*. [P] markiert die vermuteten Stellen der Promotoren, die als Startpunkt für ein 2,6 kb *ImbUYX* oder ein 1,8 kb *ImbYX* Transkript dienen würden. Oberhalb der Gene sind in grau die intercistronischen Bereiche angegeben. (TK), putative translationale Kopplung. Das 438 kb *NaeI ImbY* Fragment (herausgehoben im Block mit senkrechten Linien) wurde als Sonde für »Southern« Experimente verwendet (s. Abschnitt 3.2.2). **B.** Es sind die DNA-Fragmente aus hydrolysierten chromosomaler DNA von *S. lincolnensis* 78-11 und NRRL 2936 zu sehen, die mit der o.g. Sonde hybridisierten (vgl. auch Tab. 3-6). Die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind rechts neben den hybridisierenden Fragmenten angegeben.

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| 8) <i>S. caelestis</i> NRRL 2418          | $Lm^-$ (Celesticetin <sup>+</sup> ) |
| 9) <i>S. lividans</i> 66 TK23             | $Lm^-$                              |
| 10) <i>S. galbus</i> DSM 40480            | $Lm^-$ (Sm <sup>+</sup> )           |
| 11) <i>S. griseus</i> DSM 40236           | $Lm^-$ (Sm <sup>+</sup> )           |
| 12) <i>S. griseus</i> N2-3-11             | $Lm^-$ (Sm <sup>+</sup> )           |
| 13) <i>S. glaucescens</i> GLA.0 DSM 40716 | $Lm^-$ (5'-OH-Sm <sup>+</sup> )     |

Die chromosomale DNA der einzelnen Stämme wurde jeweils mit folgenden Restriktionsendonukleasen behandelt: *BamHI*, *SstI*, *SphI*, *SphI/SstI*, *SphI/BamHI*, *NcoI/BamHI*. Die hydrolysierte DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf Membranen geblotet. Das interne 438 bp *NaeI* Fragment aus *ImbY* wurde als Sonde verwendet (s. Abb. 3-14). Dabei hybridisierten die <sup>32</sup>P-markierten Sondenmoleküle an den DNA-Fragmenten mit den in Tab. 3-6 aufgelisteten Größen (Agarosegele und Autoradiogramme nicht gezeigt). Nur die DNA aus *Lm*-Produzenten, nicht aber z.B. aus Celesticetinproduzenten hybridisierte mit

der Sonde. Dieses Ergebnis bestätigte frühere Resultate (Peschke *et al.*, 1995), in denen größere Segmente des *lmb*-Clusters als Sonden verwendet wurden.

**Tab. 3-6.** Größen der DNA-Fragmente, die mit einem  $^{32}\text{P}$ -markiertem internen 438 bp *NaeI* Fragment aus *lmbY* hybridisierten. Die mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen hydrolysierte und auf Nylonmembranen immobilisierte DNA wurde aus den aufgelisteten *Streptomyces*-Stämmen isoliert. n.g., nicht getestet; –, kein Signal aufgetreten.

| Stamm                                 | <i>Bam</i> HI              | <i>Sst</i> I               | <i>Sph</i> I                          | <i>Sph</i> I/ <i>Sst</i> I             | <i>Sph</i> I/ <i>Bam</i> HI            | <i>Nco</i> I/ <i>Bam</i> HI |
|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--|--|-----------------------------|
| <i>S. lincolnsensis</i> 78-11         | 2,5<br>[2,55] <sup>a</sup> | 4,2<br>[4,16] <sup>a</sup> | 3,4; 1,0<br>[3,41; 0,98] <sup>a</sup> | 2,5; 0,95<br>[2,53; 0,98] <sup>a</sup> | 1,6; 0,95<br>[1,62; 0,93] <sup>a</sup> | 2,0<br>[2,08] <sup>a</sup>  |
| <i>S. lincolnsensis</i> NRRL 2936     | 2,5<br>[2,55] <sup>a</sup> | 4,2<br>[4,16] <sup>a</sup> | 3,4; 1,0<br>[3,41; 0,98] <sup>a</sup> | 2,5; 0,95<br>[2,53; 0,98] <sup>a</sup> | 1,6; 0,95<br>[1,62; 0,93] <sup>a</sup> | 2,0<br>[2,08] <sup>a</sup>  |
| <i>S. lincolnsensis</i> NRRL 5321     | 2,5                        | 4,2                        | 3,4; 1,0                              | 2,5; 0,95                              | 1,6; 0,95                              | 2,0                         |
| <i>S. pseudogriseolus</i> NRRL 3985   | 20; (3,1) <sup>b</sup>     | n.g.                       | > 22; 1,0                             | 1,9; 0,95                              | 1,0                                    | 10                          |
| <i>S. sp. (espinosus)</i> NRRL 3890   | 20; (2,7) <sup>b</sup>     | n.g.                       | 10; 1,0                               | 1,9; 0,95                              | n.g.                                   | 10                          |
| <i>S. espinosus</i> NRRL 5729         | n.g.                       | n.g.                       | 10; 1,0                               | 1,9; 0,95                              | n.g.                                   | 10                          |
| <i>S. vellosus</i> NRRL 8037          | 2,0                        | 4,6                        | 5,5; 1,0                              | 4,2; 0,95                              | 1,0; < 0,1                             | 10                          |
| <i>S. caelestis</i> NRRL 2418         | –                          | –                          | –                                     | –                                      | –                                      | –                           |
| <i>S. lividans</i> 66 TK23            | –                          | –                          | –                                     | –                                      | –                                      | –                           |
| <i>S. galbus</i> DSM 40480            | –                          | –                          | –                                     | –                                      | –                                      | –                           |
| <i>S. griseus</i> DSM 40236           | –                          | –                          | –                                     | –                                      | –                                      | –                           |
| <i>S. griseus</i> N2-3-11             | –                          | –                          | –                                     | –                                      | –                                      | –                           |
| <i>S. glaucescens</i> GLA.0 DSM 40716 | –                          | –                          | –                                     | –                                      | –                                      | –                           |

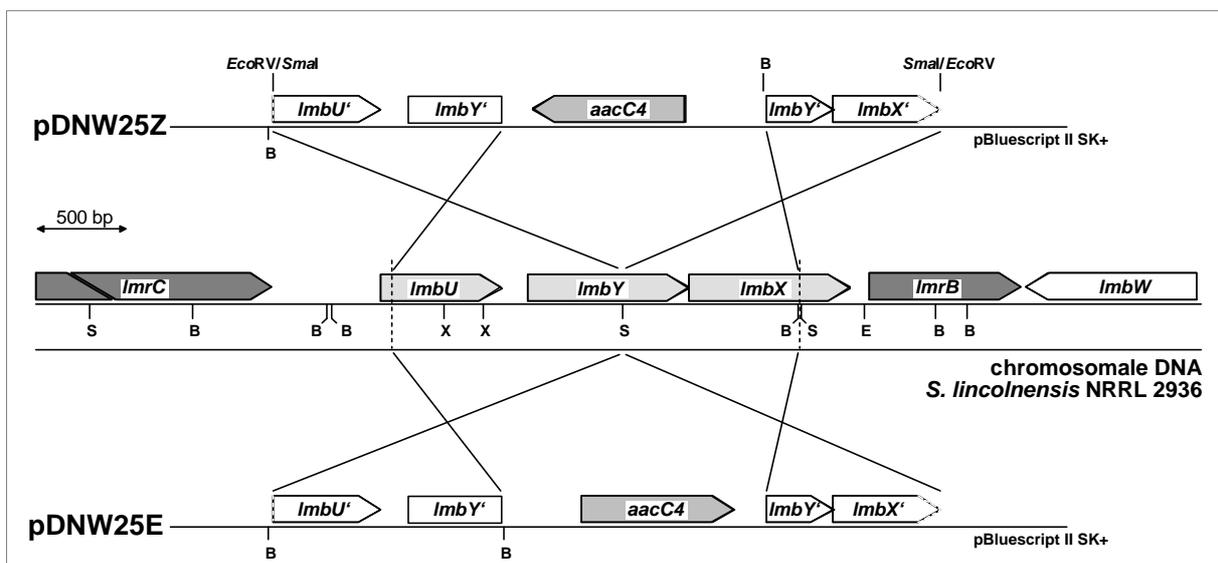
<sup>a</sup> Die theoretischen Werte in den eckigen Klammern sind von der DNA-Sequenz ableitet und gelten dementsprechend nur für *S. lincolnsensis* NRRL 2936 und 78-11 (Peschke *et al.*, 1995; EMBL Zugangsnummer X79146). <sup>b</sup> sehr schwaches zusätzliches Signal.

### 3.2.3 Herstellung einer *lmbY*-Insertionsmutante von *S. lincolnsensis* NRRL 2936

Die gezielte Mutation des Gens *lmbY* wurde im Wildtypstamm *S. lincolnsensis* NRRL 2936 durchgeführt, weil im Überproduktionsstamm 78-11 die gesamten *lmb/lmr*-Gene doppelt vorlagen (Peschke *et al.*, 1995). Als Träger der Gene für die homologe Rekombination wurden die »Suicide-Plasmide« pDNW25Z bzw. pDNW25E (s. Anhang 3) konstruiert. Die Bezeichnung »Suicide-Plasmid« bezeichnet die Unfähigkeit der Plasmide, sich in Streptomyceten zu replizieren, weil der entsprechende *ori* fehlt. Für die Konstruktion dieser beiden Plasmide wurde das 2,1 kb *Sma*I Fragment aus pTU661-98 (Zhang, 1993; s. Anhang 3) in die

*EcoRV*-Schnittstelle des Vektors pBluescript II SK+ ligiert. Anschließend wurde das entstandene rekombinante Plasmid mit *SphI* hydrolysiert und die *SphI*-Schnittstelle, die innerhalb des Gens *ImbY* lag, mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I behandelt, um ein glattes Ende (»blunt end«) zu erhalten. Das 1,3 kb *SmaI/EcoRV* Fragment aus pEFBA (vgl. Anhang 3), welches das Resistenzgen *aacC4* mit natürlichem Promotor enthielt, wurde in diese Schnittstelle ligiert (Schema der Klonierung vgl. Anhang 2-5). Da es sich hierbei um eine Ligation handelte, bei der glatte Enden miteinander verknüpft wurden, konnte das Gen *aacC4* in zwei Orientierungen vorliegen, die aus Abb. 3-15 ersichtlich sind. Durch die zweifache Orientierung des *aacC4* Gens konnten noch weitere Mutanten mit unterschiedlichen genetischen Eigenschaften erhalten werden.

Protoplasten von *S. lincolnensis* NRRL 2936 wurden für den Vorgang der homologen Rekombination mit den rekombinanten Plasmiden pDNW25Z und pDNW25E transformiert und auf SPMR-Agarplatten mit 25 µg/ml Am inkubiert. Dadurch konnten insgesamt 58 auf Am wachsende Kolonien isoliert werden.



**Abb. 3-15.** Zerstörung der genomischen Genstruktur von *S. lincolnensis* NRRL 2936 durch homologe Rekombination nach Transformation mit den rekombinanten Plasmiden pDNW25Z und pDNW25E. In der Mitte ist der Bereich der ursprünglichen chromosomalen DNA von *S. lincolnensis* NRRL 2936 dargestellt. Die beiden mit »pDNW25Z« und »pDNW25E« bezeichneten DNA-Fragmente oberhalb und unterhalb der chromosomalen DNA stellen die Teile der rekombinanten Plasmide pDNW25Z und pDNW25E dar, die homologe Rekombinationsereignisse verursachen könnten. Die Plasmide wurden auf der Basis von pBluescript II SK+ konstruiert. Die vier großen Kreuze markieren die homologen Bereiche der rekombinanten Plasmide pDNW25Z/E und der genomischen DNA. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; S, *Sph*I; X, *Xba*I.

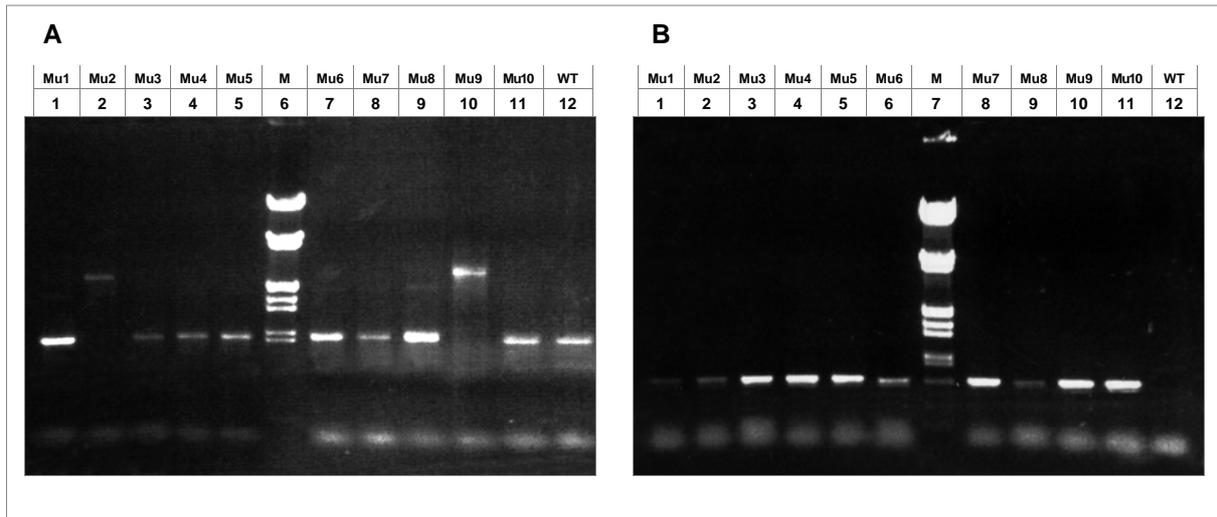
### 3.2.4 Analyse der erzeugten Mutanten

#### *Nachweis von Lincomycin mittels Plattendiffusionstests*

Die Am<sup>R</sup>-Mutanten wurden durch Plattendiffusionstests mittels des Lm<sup>S</sup>-, aber Am<sup>R</sup>-Indikatorstammes *Micrococcus luteus* auf Lm-Produktion getestet. Es stellte sich heraus, daß alle 58 Am<sup>R</sup>-Mutanten kein Lm mehr produzierten. Transformanten, die nicht sporulierten oder kein Melanin mehr produzierten, wurden verworfen, da bei diesen noch andere, nicht beabsichtigte, spontane Mutationen aufgetreten waren.

#### *Polymerasekettenreaktion (PCR)*

Eine weitere Analyse der Am<sup>R</sup>-Mutanten von *S. lincolnensis* NRRL 2936 wurde mit Hilfe der PCR durchgeführt. Als Matrize (»template«) für die Reaktionen wurde die chromosomale DNA von zehn willkürlich ausgewählten Mutanten eingesetzt. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die sich an den Genstart und an das Ende einerseits von *lmbY* (*lmbY*-a und *lmbY*-e) und andererseits von *aacC4* anlagern konnten (*aacC4*-a und *aacC4*-e). Die Sequenzen und Anlagerungstemperaturen können Tab. 2-4 entnommen werden. Die Primer wurden in den Kombinationen *lmbY*-a/*lmbY*-e und *aacC4*-a/*aacC4*-e in einem Standardansatz (vgl. Abschnitt 2.2.9) eingesetzt. Die Anlagerungstemperatur betrug in allen Ansätzen 60 °C. Anschließend wurden die PCR-Produkte einer AGE zugeführt. In Abb. 3-16 sind die Photos der Agarosegele dargestellt. Bei den PCR-Produkten, die mit der Oligonukleotidkombination *lmbY*-a/*lmbY*-e gewonnen wurden, war zu erkennen, daß sich die Mutanten 2 und 9 von den anderen durch die Größe der PCR-Produkte unterschieden. Das konnte damit erklärt werden, daß bei diesen beiden Mutanten ein doppeltes Rekombinationsereignis (»crossover«) stattgefunden haben mußte. Wie in den Abb. 3-16 und 3-17 zu erkennen ist, war sowohl die experimentelle als auch die theoretische Fragmentgröße des PCR-Produktes beim Wildtyp und bei Mutanten mit einem einfachen »crossover« 888 bp, welches genau der Größe vom *lmbY* entsprach. Die Mutanten mit einem doppelten »crossover« erzeugten PCR-Produkte mit einer Größe von 2,4 kb. Bei der Auftragung der PCR-Produkte mit der Primerkombination *aacC4*-a/*aacC4*-e ließen sich Mutanten mit einfachem und doppeltem »crossover« nicht unterscheiden. In allen DNA-Präparationen der untersuchten Mutanten konnte das *aacC4* Gen durch die Anwesenheit der charakteristischen Bande bei 609 bp nachgewiesen werden.

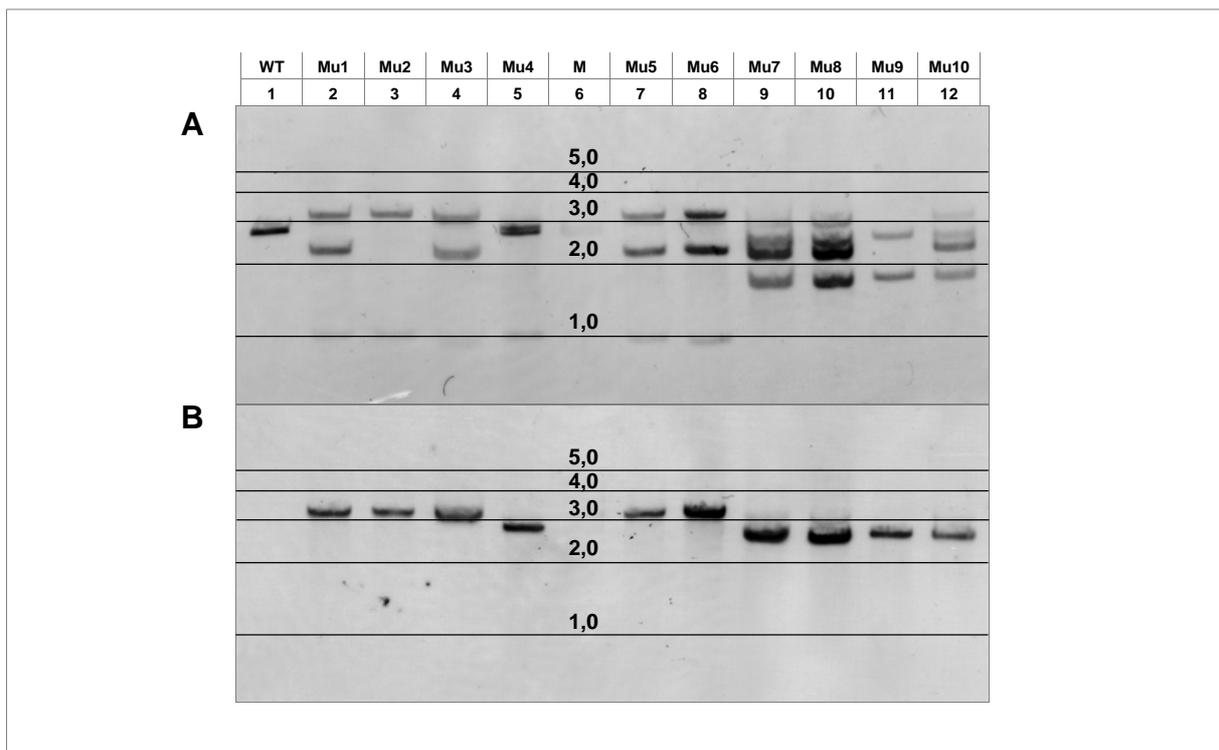


**Abb. 3-16.** Darstellung der PCR-Produkte aus genomischer DNA der *lmbY*-Insertionsmutanten in Agarosegelen. Spuren 1 - 5 und 7 (»Mu1 - 6«): Mutanten 1 - 6 (erzeugt durch pDNW25Z); Spuren 8 - 11 (»Mu7 - 10«): Mutanten 7 - 10 (erzeugt durch pDNW25E); Spur 12 (»WT«): Wildtyp; Spur 6 (»M«):  $\lambda$  *EcoRI/HindIII*-DNA-Größenmarker. **A.** PCR-Produkte, die mit den Oligonukleotiden *lmbY*-a und *lmbY*-e erzeugt wurden. **B.** PCR-Produkte, die mit den Oligonukleotiden *aacC4*-a und *aacC4*-e erzeugt wurden.

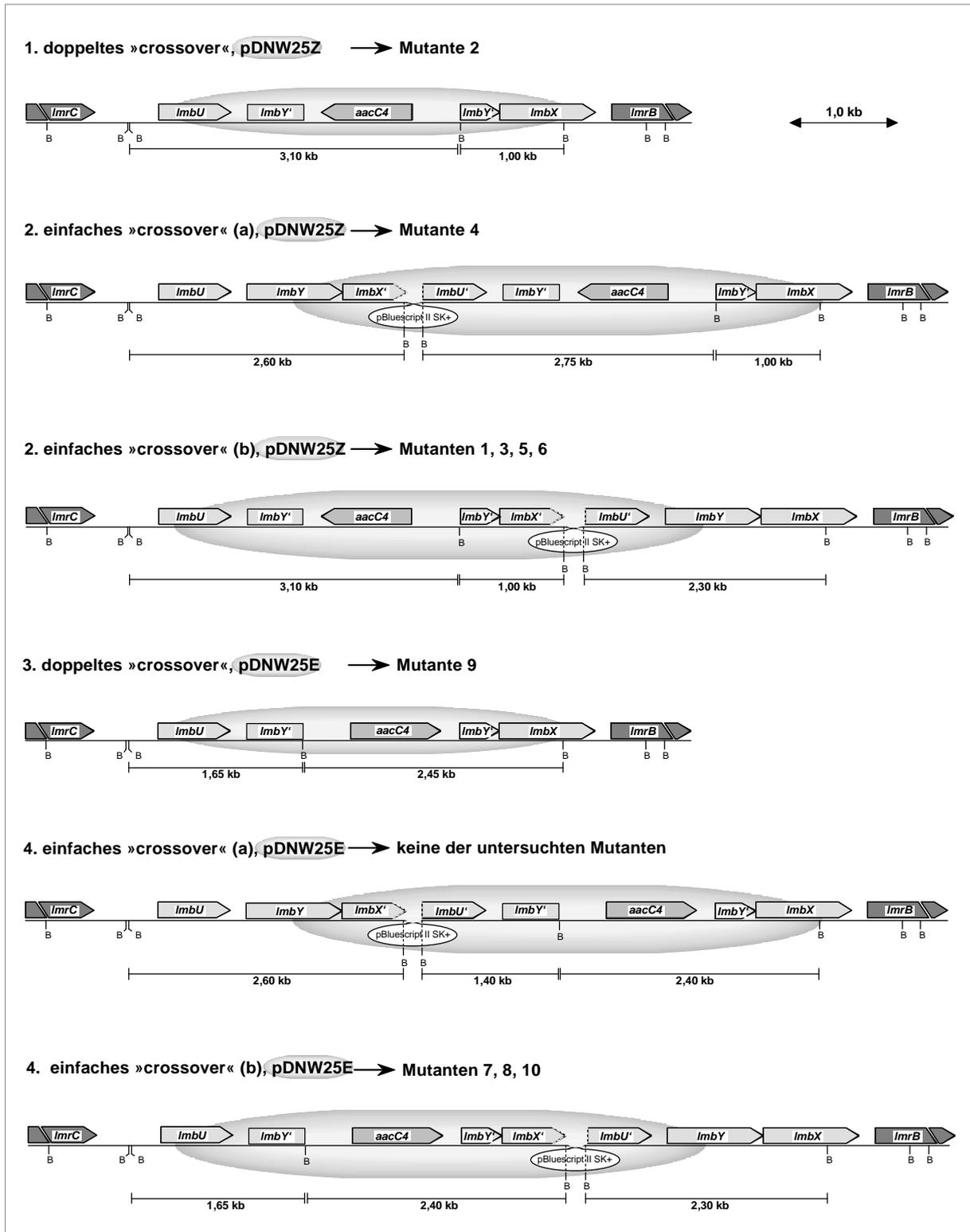
#### DNA-DNA (»Southern«)-Hybridisierung

Für die Genomanalyse der Mutanten mittels »Southern« Hybridisierung wurde mit *Bam*HI hydrolysierte chromosomale DNA verwendet. Als Sonden wurden das 0,9 kb *Ava*I/*Sal*I Fragment aus pSZW755 (enthielt *lmbY*, am Anfang um 30 bp deletiert, s. Anhang 3) und das 1,5 kb *Pst*I Fragment aus pEFBA (enthielt *aacC4*, s. Anhang 3) eingesetzt. Die Markierung der DNA-Sonden, die Hybridisierung und anschließende Detektion erfolgten nicht-radioaktiv (s. Abschnitt 2.2.7). Die Signale, die nach ca. 15 min zu sehen waren (vgl. Abb. 3-17), wurden mit den in Abb. 3-18 gezeigten theoretischen Fragmentgrößen verglichen. Dabei konnten alle in der »Southern« Analyse erzeugten Fragmentmuster der einzelnen Mutanten den theoretisch berechneten Mustern zugeordnet werden. Es wurde zwischen den Mutanten, die mit den beiden verschiedenen rekombinanten Plasmiden erzeugt wurden und einfachen bzw. doppelten Rekombinationsereignissen unterschieden. Zusätzlich mußte bei dem einfachen »crossover« zwischen zwei Mutantentypen differenziert werden, je nachdem, ob die Insertion links oder rechts von *aacC4* stattfand (vgl. Abb. 3-15). In beiden Fällen wurde der Vektoranteil des Plasmids mit ins *S. lincolnensis*-Genom integriert. In der Summe konnten somit sechs verschiedene chromosomale Strukturen entstehen, die in Abb. 3-18

wiedergegeben sind. Die *S. lincolnensis*-Mutanten 1, 3, 5 und 6 entstanden durch einfaches »crossover« der genomischen DNA mit pDNW25Z im Bereich von *lmbYX* (»rechts« des *aacC4* Gens, vgl. Abb. 3-15 mit Abb. 3-18 [2. (a)]), während die Mutante 4 durch einfaches »crossover« mit pDNW25Z im Bereich von *lmbUY* gebildet wurde (»links« des *aacC4* Gens, vgl. Abb. 3-15 mit Abb. 3-18 [2. (b)]). Die Mutanten 2 und 9 wurden durch doppeltes »crossover« erzeugt, was aufgrund der PCR-Analyse bereits postuliert worden war (vgl. Abb. 3-16 A, Spuren 2 und 10). Die restlichen der zehn untersuchten Mutanten, 7, 8 und 10, entstanden durch Rekombination mit pDNW25E im Bereich von *lmbUY* (vgl. Abb. 3-15 mit Abb. 3-18 [4. (b)]). Keine der untersuchten Mutanten hatte die genomische Struktur, die bei einem einfachen Rekombinationsereignis mit pDNW25E im Bereich von *lmbYX* zu erwarten gewesen wäre. Alle möglichen und tatsächlichen Rekombinationsereignisse sind nochmals in Abb. 3-18 zusammengefaßt.



**Abb. 3-17.** Nicht-radioaktive »Southern« Analyse von zehn *S. lincolnensis* *lmbY*-Insertionsmutanten. Die *Bam*HI-hydrolysierte genomische DNA wurde mit zwei Sonden hybridisiert. **A.** Hybridisierung mit einem 0,9 kb *lmbY* Fragment. **B.** Hybridisierung mit einem 1,5 kb *aacC4* Fragment. Die Spuren (**A** und **B**) wurden wie folgt belegt: Spur 1 (»WT«): Wildtyp; Spuren 2 - 5, 7 und 8 (»Mu1 - 6«): Mutanten 1 - 6 (erzeugt durch pDNW25Z); Spuren 9 - 12 (»Mu7 - 10«): Mutanten 7 - 10 (erzeugt durch pDNW25E); Spur 6 (»M«) i.V.m. den schwarzen waagerechten Linien: aus einem  $\lambda$  *Eco*RI/*Hind*III-DNA-Größenmarker extrapolierte DNA-Größen.



**Abb. 3-18.** Mögliche und tatsächliche Rekombinationsereignisse der genomischen DNA von *S. lincolnensis* NRRL 2936 mit den rekombinanten Plasmiden pDNW25Z und pDNW25E. Die grauen Ovale markieren die Bereiche, in die DNA aus den Plasmiden integriert wurde. Unter den Abbildungen der chromosomalen DNA sind die *Bam*HI Fragmente hervorgehoben, die mit einer der Sonden (*lmbY* oder *aacC4* Fragment) hybridisierte. Die Ovale mit der Bezeichnung »pBluescript II SK+« kennzeichnen die Stellen, an der Vektoranteil mit integriert wurde. B, *Bam*HI.

### 3.2.5 Komplementation der erzeugten Insertionsmutanten

Nachdem die Art der genetischen Veränderung im Genom der Mutanten bekannt war, konnte durch die folgenden Experimente die Lokalisation des Promotors stromaufwärts von *lmbY* bestimmt werden. Dazu wurden die unten beschriebenen rekombinanten Plasmide konstruiert, die zur Komplementation der Mutanten eingesetzt werden sollten. Das Plasmid pDNW27, welches die Gene *lmbY* und *lmbX* mit Hilfe des postulierten natürlichen Promotors exprimieren sollte, entstand in zwei Schritten. Das 2,1 kb *XhoI/EcoRI* Fragment aus pTU661-98 wurde in pUC18 kloniert. Das resultierende Plasmid pUC-YX wurde mit *EcoRI* und *HindIII* hydrolysiert und das 2,1 kb Fragment mit pUWL218 zu pDNW27 ligiert. Das rekombinante Plasmid pDNW28 konnte durch Ligation des 2,95 kb *BglII/EcoRI* Fragments aus pTU661-98 in pUWL218 (*BamHI/EcoRI*) gewonnen werden und sollte die Gene *lmbUYX* durch ihre(n) eigenen Promotor(en) exprimieren.

In ersten Versuchen wurden die *S. lincolnensis*-Mutanten 1, 2, 4, 7, 9 und der Wildtyp mit den beiden Plasmiden bzw. dem Vektor pUWL218 transformiert. Alle Transformanten zeigten in einem Plattendiffusionstest einen Hemmhof, auch diejenigen, die mit pUWL218 transformiert waren. Es stellte sich heraus, daß der Indikatorstamm *Micrococcus luteus* zwar  $Am^R$ , aber gleichzeitig auch  $Ts^S$  war. Es wurde erst versucht, mit einer sehr niedrigen  $Ts$ -Konzentration ( $< 0,25 \mu\text{g/ml}$ ) zu arbeiten, um durch  $Ts$  keine Hemmhöfe zu erhalten. Es konnte aber beobachtet werden, daß in den Transformanten unter diesen Bedingungen das Plasmid nicht stabil war, was durch das Ausbleiben des Wachstums bei anschließendem Transfer auf Platten mit  $25 \mu\text{g/ml}$   $Ts$  deutlich wurde. Als weitere Alternative konnte *S. lividans*/pUWL201 als Indikatorstamm verwendet werden. Ein Nachteil bestand darin, daß *S. lividans* 2 - 3 d wachsen mußte, bis ein geschlossener Bakterienrasen entstanden war, in dem man durch  $Lm$  verursachte Hemmhöfe hätte erkennen können. Als dritte Alternative wurde ein  $Ts^R$ -*M. luteus*-Stamm generiert, denn der in dieser Arbeit verwendete Stamm *M. luteus* DSM 348 war u.a. sensitiv gegenüber  $Lm$  (MIC  $3 \mu\text{g/ml}$ ),  $Ts$  (MIC  $3 \mu\text{g/ml}$ ) und  $Er$  (MIC nicht exakt bestimmt). Dagegen wurde der Stamm in Anwesenheit von  $Am$  ( $> 25 \mu\text{g/ml}$ ) und  $Hy$  ( $> 250 \mu\text{g/ml}$ ) nicht im Wachstum beeinträchtigt. Um diesen Stamm in Plattendiffusionstests auf Produktion von  $Lm$  in Gegenwart des zur Selektion verwendeten  $Ts$  einsetzen zu können, wurde *M. luteus* DSM 348 wie folgt mutagenisiert. Die angewandte Methode ist an das PEG-induzierte Transformationsverfahren für Streptomyceten nach Hopwood *et al.* (1985) angelehnt (vgl. Abschnitt 2.2.15). Die  $Ts$ -Resistenz der fünf dabei entstanden noch  $Lm^S$ -*M. luteus*-Mutanten (*M. luteus* DN218) entstand spontan durch die

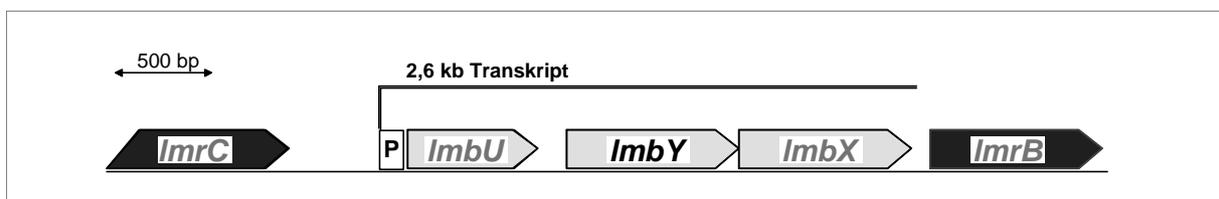
Behandlung der Zellen, da weder ein Plasmid isoliert werden konnte, noch die *tsr*-Kassette des eingesetzten Vektors pUWL218 durch »Southern« Hybridisierung (mit dem 1 kb *Bcl*I Fragment aus pGM102 als Sonde) in der chromosomalen DNA der Mutanten wiedergefunden werden konnte (nicht gezeigt).

Bei der Prozedur, die erhaltenen *S. lincolnensis*-Transformanten auf frische Platten zu überimpfen, stellte sich heraus, daß sich die Hemmstoffkombination von Ts und Am als Selektionsbedingung stark wachstumshemmend auswirkte. Es konnte kein Bakterienrasen erzeugt werden, der aber für den Nachweis der Lm-Produktion in *S. lincolnensis* NRRL 2936 bzw. in den komplementierten Mutanten notwendig gewesen wäre.

Optimales Wachstum konnte beobachtet werden, wenn man die Protoplasten der Mutanten Mu2 und Mu9 bzw. des Wildstammes als Kontrolle, statt mit den bisher verwendeten Plasmiden pDNW27 und pDNW28, mit pDNW27J und pDNW28J transformierte. Diese beiden Plasmide wurden durch Überführung der *ImbUYX* bzw. *ImbYX* Genkassetten in den Vektor pJOE837 geschaffen. Die Konstruktion von pDNW27J und pDNW28J kann Anhang 2-7 entnommen werden, die Plasmide sind in Anhang 3 abgebildet.

Die Antibiotika Hy und Am beeinflussten in Kombination das Wachstum der Transformanten nicht. Deshalb wurden die Komplementationen nur mit den Hy<sup>R</sup>-vermittelnden Plasmiden beendet. Die erhaltenen Transformanten wurden auf SPMR Hy und SPMR Am Hy angezogen und dreimal auf weitere Platten überimpft, um die Stabilität des Chromosoms und der Plasmide zu gewährleisten, was sich in einem konstanten Phänotyp ausdrückte.

Nicht alle transformierten Mutanten zeigten in einem Plattendiffusionstest mit *M. luteus* den erwarteten Phänotyp und produzierten wieder Lm. Es war offensichtlich, daß nur das Plasmid pDNW28J, welches die drei Gene *ImbUYX* unter der Kontrolle des natürlichen Promotors und der eigenen RBS exprimierte, die Kompetenz zur Lm-Produktion zurück-



**Abb. 3-19.** Das *Imb/Imr*-Gencluster im Bereich von *ImbY*. Die Linie, die mit »2,6 kb Transkript« bezeichnet ist, markiert die Transkriptionseinheit, auf der *ImbY* liegt. **P** markiert den putativen Promotor stromaufwärts von *ImbU*.

**Tab. 3-7.** Ergebnisse der Komplementationen der *S. lincolnensis lmbY*-Insertionsmutanten 2 und 9 durch Transformation mit den Plasmiden pDNW27J und pDNW28J.

| Transformante \ Nr. | <sup>a</sup> 1a | b  | c  | 2a | b  | c  | 3a | b  | c  |
|---------------------|-----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 2936/pJOE837        | +               | +  | ++ | +  | +  | ++ | +  | +  | ++ |
| 2936/pDNW27J        | +               | ++ | ++ | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| 2936/pDNW28J        | ++              | +  | ++ | ++ | +  | ++ | ++ | +  | ++ |
| Mu2/pJOE837         | -               | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| Mu2/pDNW27J         | -               | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| Mu2/pDNW28J         | +               | ++ | ++ | +  | +  | ++ | +  | +  | ++ |
| Mu9/pJOE837         | -               | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| Mu9/pDNW27J         | -               | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| Mu9/pDNW28J         | +               | +  | +  | +  | ++ | ++ | ++ | ++ | +  |

<sup>a</sup> Die drei Hauptspalten »1«, »2« und »3« bezeichnen drei verschiedene repräsentative Transformanten von dem entsprechenden Stamm oder den Mutanten. In den einzelnen Spalten sind die Ergebnisse der Hemmhoftests nach einmal Überimpfen (a), nach zweimal Überimpfen (b) und nach dreimal Überimpfen (c) gezeigt. -, kein Hemmhof; +, ø Hemmhof 15 - 25 mm ( $\hat{=}$  15 - 25 µg/ml); ++, ø Hemmhof > 25 mm ( $\hat{=}$  > 25 µg/ml).

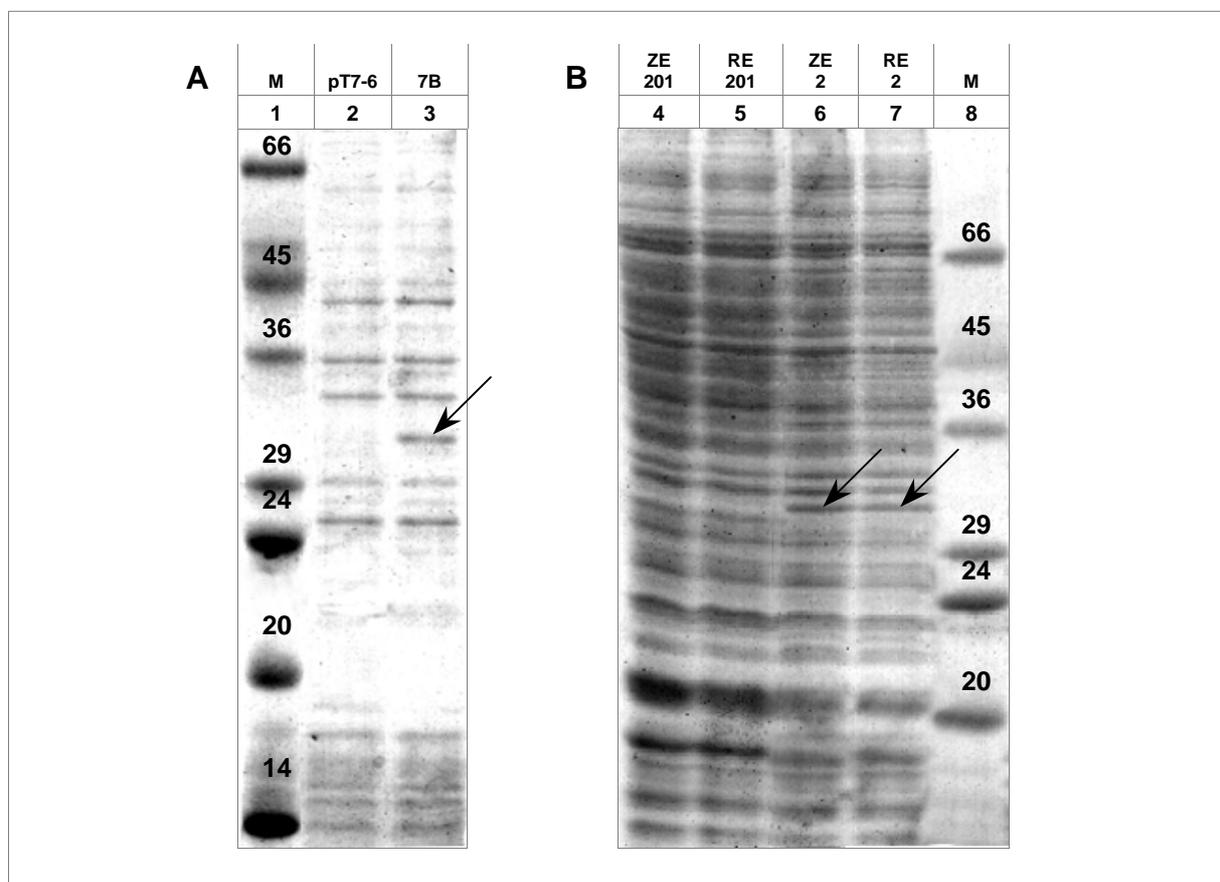
brachte. Die Tatsache, daß die Mutanten mit pDNW27J weiterhin kein Lm produzieren konnten, ließ darauf schließen, daß ein Promotor stromaufwärts von *lmbU* lokalisiert ist und nicht, wie auch vermutet wurde, vor *lmbY* (vgl. Abb. 3-14 A mit Abb. 3-19). Die Ergebnisse der Plattendiffusionstests aller transformierten Mutanten und des Wildtyps als Kontrolle sind in Tab. 3-7 wiedergegeben.

### 3.2.6 Produktion von löslichem LmbY und His-tag•LmbY

Eine erhöhte Expression von *lmbY* konnte in *E. coli* und in *S. lividans* erreicht werden (Neußer, 1995). Durch die Plasmide pDNW7B und pDNW16 (s. Abb. 3-21 A) konnten die Proteine LmbY und His-tag•LmbY in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS oder JM109 (DE3) nur als unlösliche Einschlusskörper (»inclusion bodies«) produziert werden (s. Abb. 3-20 A; His-tag•LmbY nicht gezeigt). Auch Anzuchten bei verschiedenen Temperaturen (18, 25 und 30 °C) lieferten kein lösliches LmbY. Dies wurde jedoch in *S. lividans* TK23/pDNW2

erreicht, in dem *lmbY* mittels des *ermE*-Promotors und der natürlichen RBS exprimiert wurde (vgl. Abb. 3-20 B).

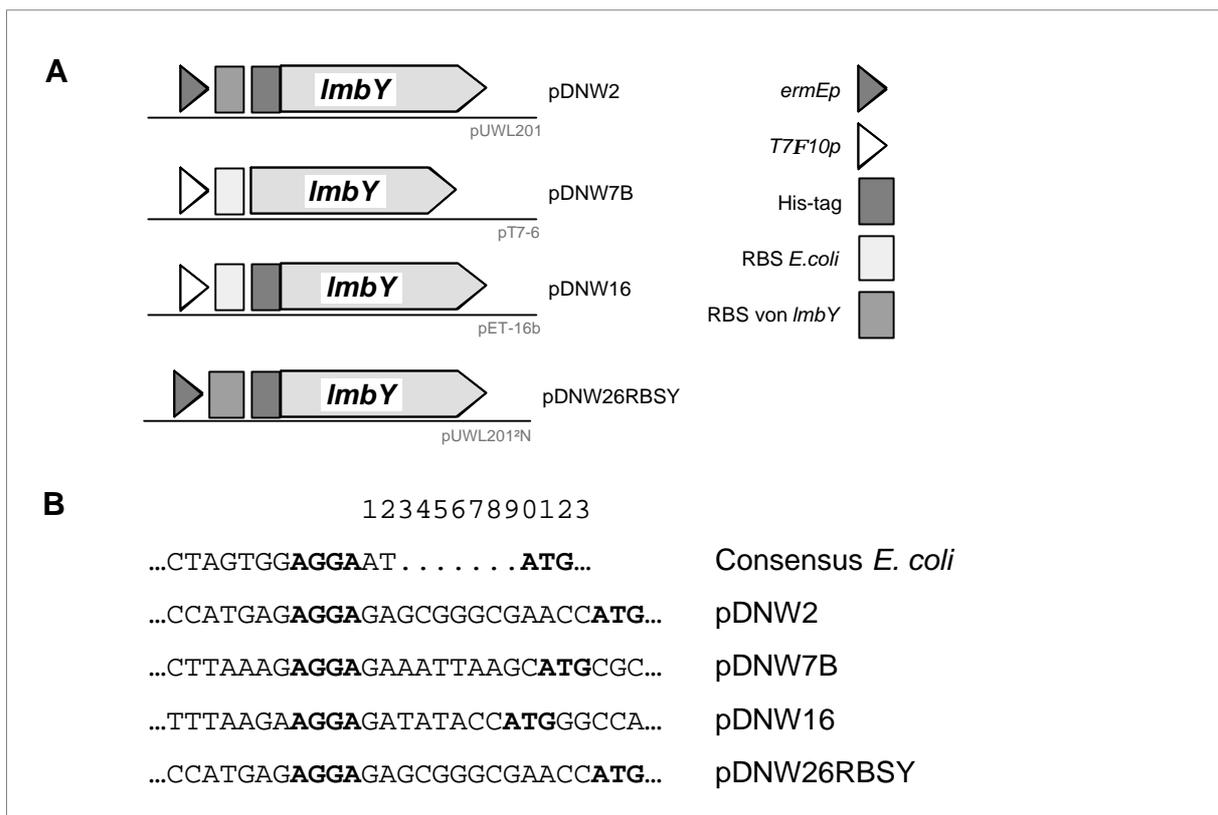
Für eine Reinigung und einen Enzymtest sollte ebenfalls das Poly-Histidin-Fusionsprotein von LmbY in *S. lividans* produziert werden. Es wurde zunächst versucht, eine Expression zu erreichen, indem das *XbaI/BamHI lmbY* Fragment aus pDNW16 mit RBS und His-tag aus pET-16b in pUWL201 umkloniert wurde (pDNW26, Plasmid nicht gezeigt). In diesem Fall konnte in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen keine Produktion von His-tag•LmbY nachgewiesen werden. Wahrscheinlich war die RBS aus dem Vektor pET-16b, genau



**Abb. 3-20.** Darstellung des *S. lincolnensis* LmbY-Proteins in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli. Das zusätzlich produzierte Protein hat eine Größe von 32 kDa (siehe Pfeile). M, Proteingelmarker, Größen (in kDa) sind auf dem Gel angegeben. **A.** Das Gel (12 % Trenngel, ca. 20 µg Protein/Spur) zeigt die Auftrennung der Gesamtzellextrakte von *E. coli* JM109 (DE3) pGP1-2/pT7-6 und -/pDNW7B, die 90 min nach Induktion (Spuren 2 und 3) hergestellt wurden. **B.** Das Gel (12 % Trenngel, ca. 30 µg Protein/Spur) zeigt die Auftrennung der Gesamtzellextrakte (Spuren 4 (»ZE 201«) und 6 (»ZE 2«) und der Rohextrakte (Spuren 5 (»RE 201«) und 7 (»RE 2«)) von *S. lividans* TK23/pUWL201 bzw. -/pDNW2, die nach 3 d Wachstum in TSB Ts hergestellt wurden.

wie die aus pQE60 und pET-11a, für eine Expression von *lmbY* in *S. lividans* TK23 ungeeignet und wurde nicht erkannt. Bei einer genaueren Betrachtung der Shine-Dalgarno-Sequenzen (Shine und Dalgarno, 1974) der einzelnen *lmbY* Expressionsplasmide (s. Abb. 3-21 B) fiel auf, daß die Abstände der vier übereinstimmenden Basen AGGA zum Startcodon ATG in den *E. coli* Plasmiden (pDNW7B, pDNW16) 3 - 5 bp kürzer waren als in den Plasmiden für eine *lmbY*-Expression in Streptomycceten (pDNW2, pDNW26RBSY). Dies konnte unter anderem der Grund gewesen sein, daß die *E. coli* RBS in Streptomycceten nicht erkannt wurden.

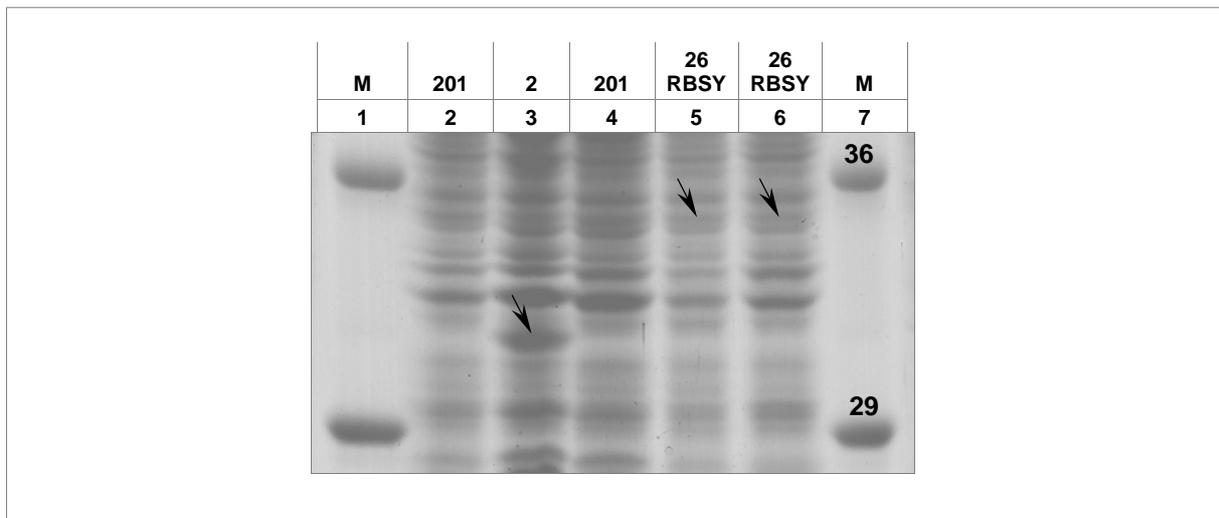
Wie oben erwähnt, war eine Expression von *lmbY* in *S. lividans* mit der eigenen RBS möglich. Die im folgenden beschriebene Klonierungsstrategie für das rekombinante Plasmid pDNW26RBSY ist im Anhang 2 schematisch wiedergegeben. Die RBS vor *lmbY* aus pDNW2 K wurde mittels PCR (Oligonukleotide RBSY-KpnI und RBSY-NcoI; Anlagerungstemperatur 66,5 °C) amplifiziert und stromaufwärts des His-tag aus pSPDN16



**Abb. 3-21. A.** Schematische Darstellung des unterschiedlichen Aufbaus der *lmbY*-Expressionsplasmide. **B.** Vergleich der *lmbY* Shine-Dalgarno-Sequenzen der verwendeten Plasmide mit der Consensus-Sequenz von *E. coli* (Gold und Stormo, 1987). Die fett gedruckten Buchstaben stellen die RBS bzw. die Startcodons dar. Der optimale Abstand zwischen RBS und Startcodon beträgt in *E. coli* 7 bis 10 bp und in Streptomycceten in diesem Fall 13 bp.

zwischen die *Nco*I- und die *Kpn*I-Schnittstelle fusioniert. Das Produkt (pSPDN16RBSY) wurde mit *Kpn*I und *Bam*HI hydrolysiert und das entstandene 1,3 kb Fragment mit pUWL201 N zu pDNW26RBSY ligiert.

*S. lividans* wurde mit pDNW26RBSY transformiert und Transformanten in TSB Ts kultiviert. Die Produktion von löslichem His-tag•LmbY war nicht so stark wie die von LmbY in *S. lividans* TK23/pDNW2, konnte aber in einem Coomassie-gefärbten PAA-Gel dargestellt werden (s. Abb. 3-22; Abb. 3-23).

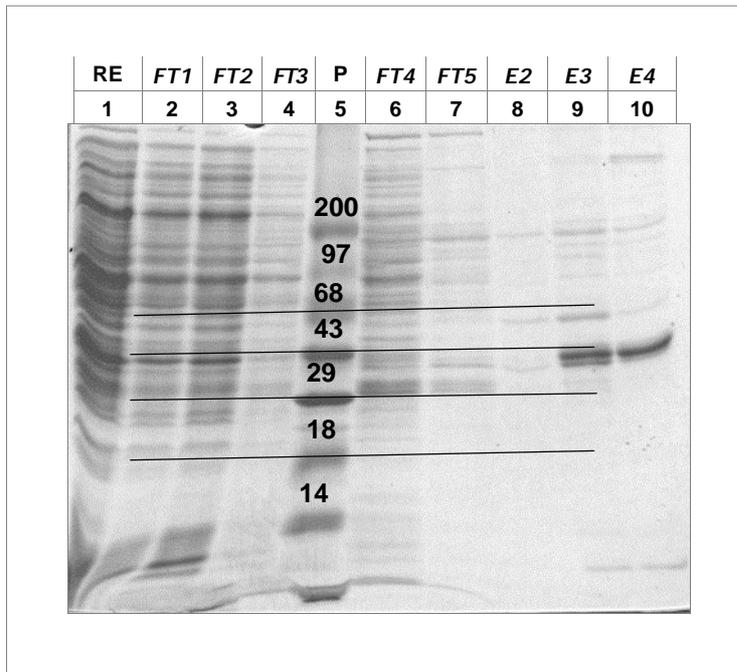


**Abb. 3-22.** Expression von *lmbY* und *his-tag*•*lmbY* in *S. lividans* TK23. Die Darstellung zeigt die heterolog exprimierte LmbY- und His-tag•LmbY-Proteine in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel (12 % Trenngel, ca. 30 µg Protein/Spur). Die zusätzlich produzierten Proteine (siehe Pfeile) hatten eine Größe von 32 kDa (LmbY, linker Pfeil) bzw. 35 kDa (His-tag•LmbY). Letzteres verbirgt sich in den mit den rechten beiden Pfeilen markierten Banden (deutlicher in Abb. 3-23 zu sehen). Spuren 2 und 4 (»201«): RE von *S. lividans* TK23/pUWL201 (Nullkontrolle.); Spur 3 (»2«): RE von *S. lividans* TK23/pDNW2; Spuren 5 und 6 (»26RBSY«): RE von *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY. Spuren 1 und 7 (»M«) = Proteingelmarker, Größen (in kDa) sind auf dem Gel angegeben. Die einzelnen RE wurden nach 3 d Wachstum in TSB Ts hergestellt.

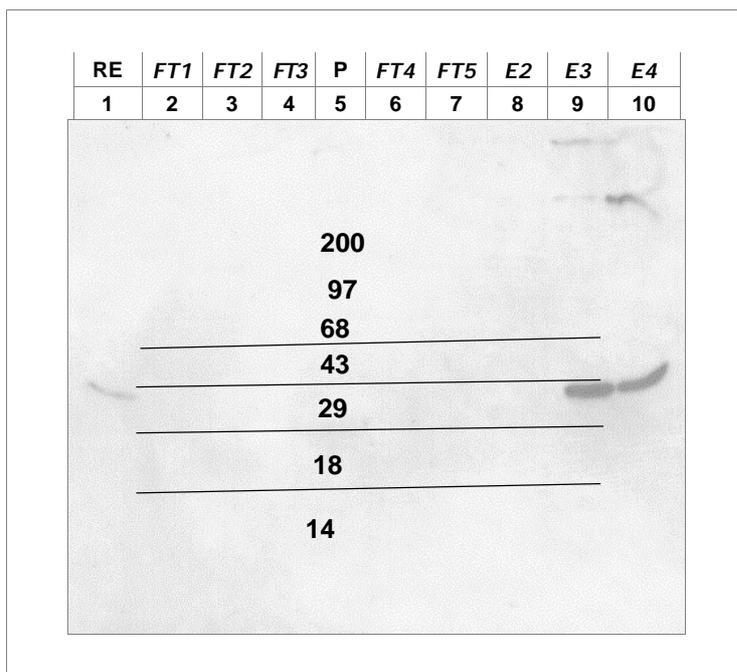
### 3.2.7 Reinigung und Nachweis von His-tag•LmbY

Die Expression von His-tag•LmbY in *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY (vgl. Abb. 3-22) war nicht stark genug, um eine zusätzliche Proteinbande vom Hintergrund unterscheiden zu können. Deshalb wurde His-tag•LmbY mittels Ni-NTA-Agarose von den übrigen Proteinen eines zellfreien Extrakts getrennt. Dazu wurden 2,1 g *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY-

Zellen in 3 ml Lysepuffer (Qiagen, 1997) suspendiert und nach Lysozymbehandlung durch Ultraschall aufgeschlossen. Dieser Extrakt wurde nach der Vorschrift des Herstellers der Ni-NTA-Agarose (Qiagen, 1997) weiter behandelt. Durch das Waschen des Säulenmaterials beginnend mit Waschpuffer (Eluate wurden mit *FT1* bis *FT5* bezeichnet) und abschließend



**Abb. 3-23.** Reinigung von His-tag $\bullet$ LmbY. Die Darstellung erfolgte in einem Coomassie-gefärbten PAA-Gel (12 %iges Trenngel nach Laemmli). Spur 1 (»RE«): Zellfreier Extrakt *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY, Spuren 2 - 4, 6 und 7 (»FT1 - FT5«): Eluate FT1 bis FT5, die durch Behandeln der mit RE beladenen Ni-NTA-Agarose-Säule mit Waschpuffer entstanden, Spur 5 (»P«): Vorgefärbter Proteinstandard mit eingezeichneten Hilfslinien (Größenangaben auf dem Gel in kDa), Spuren 8 - 10 (»E2 - E4«): Eluate E2 bis E4, die durch Waschen der Säule mit Elutionspuffer entstanden.



**Abb. 3-24.** »Western« Analyse von His-tag $\bullet$ LmbY. Der Nachweis von His-tag-fusionierten Proteinen erfolgte in Extrakten aus *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY. Die Proteine wurden nach SDS-PAGE auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit einem Anti-Penta-His-Antiserum nachgewiesen. Die Auftragung der Proteinextrakte und die Durchführung der PAGE erfolgte wie in Abb. 3-23 beschrieben. Der Proteinstandard in Spur 5 mit den Hilfslinien entspricht genau dem aus Abb. 3-23 und wurde deshalb übernommen.

mit Elutionspuffer (*E1* bis *E5*) wurden die folgenden Proteinlösungen erhalten: *FT1* (6,06 mg Protein/ml), *FT2* (2,23 mg/ml), *FT3* (1,84 mg/ml), *FT4* (0,97 mg/ml), *FT5* (0,62 mg/ml), *E1* (0,14 mg/ml), *E2* (0,17 mg/ml), *E3* (0,76 mg/ml), *E4* (0,56 mg/ml) und *E5* (0,19 mg/ml). Eine Auswahl der wichtigsten Extrakte wurde einer PAGE unterworfen, deren Ergebnis in Abb. 3-23 wiedergegeben ist. Aus der Laufeigenschaft der angereicherten Proteinbande (vgl. Abb. 3-23, Spuren 9 und 10) ließ sich eine molekulare Masse von ca. 36 kDa ableiten (errechnet:  $M_r = 34,9$  kDa).

Um nachzuweisen, ob das gereinigte Protein auch das gewünschte His-tag•LmbY ist, wurde eine »Western« Analyse mit einem Anti-Penta-His-Antiserum und den vorher immobilisierten Proteinextrakten durchgeführt. Die Auftragung der Extrakte war identisch mit der zuvor durchgeführten PAGE. Wie erwartet, traten deutlich spezifische Antikörperreaktionen in den Spuren 1, 9 und 10 auf Höhe des angereicherten Proteins aus Abb. 3-23 auf (s. Abb. 3-24).

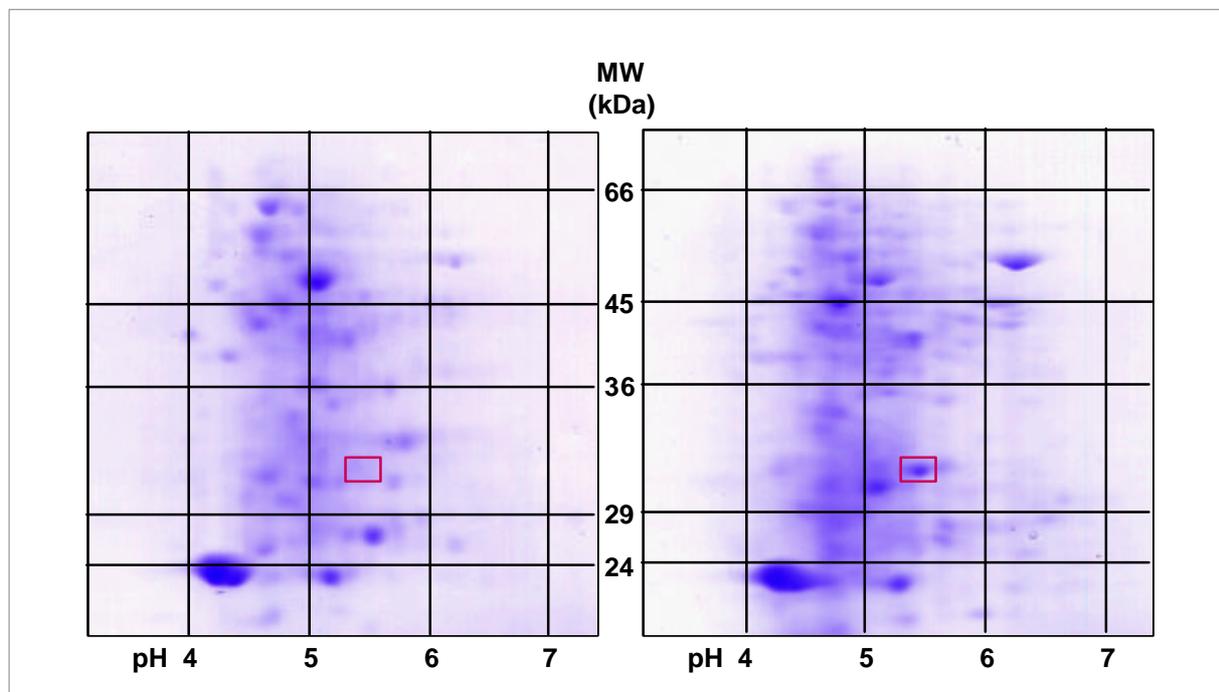
### 3.2.8 Versuch der Durchführung einer zweidimensionalen PAGE von LmbY

Mittels zweidimensionaler PAGE (2D-PAGE) gelingt die gleichzeitige Analyse einer großen Anzahl individuell aufgelöster Proteinflecken in Gesamtzellextrakten (Proteomanalysen). In einigen Fällen (z.B. die in dieser Arbeit durchgeführte PAGE von *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY; vgl. Abb. 3-22) ist sie besser geeignet als die reguläre, eindimensionale PAGE, die durch ihre begrenzte Auflösung den geforderten Ansprüchen nicht immer genügt.

Zur Ermöglichung der wachstumsabhängigen Analyse des LmbY-Proteins wurde eine 2D-PAGE des Rohextrakts des Stammes *S. lividans* TK23/pDNW2, der lösliches LmbY enthielt, durchgeführt. Als Referenz diente RE aus *S. lividans* TK23/pUWL201. Die ganze Prozedur erfolgte nach der Vorschrift von Görg (1997) mit den für Streptomyceten optimierten Änderungen von Haase (M. Haase, BUGH Wuppertal, persönliche Mitteilung). In der ersten Dimension wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP) aufgetrennt. Die zweite Dimension war eine SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Die theoretische molekulare Masse von LmbY betrug 32398 Da und der berechnete IP lag bei 5,92. Die experimentellen Daten wichen nur wenig von den berechneten Werten ab. Die molekulare Masse von LmbY wurde auf 32,5 kDa und der IP auf 5,4 bestimmt (vgl. Abb. 3-25).

Es war weiterhin zu erkennen, daß bei einem Vergleich der beiden Gele in Abb. 3-25, die Intensitäten der einzelnen Proteinflecken (»Spots«) links und rechts voneinander abwichen.

Dies kam zustande, weil sich die beiden *S. lividans*-Kulturen zum Zeitpunkt des Zellaufschlusses in verschiedenen Wachstumsphasen befanden. Ein anderer Grund für die mangelnde Identität der Fleckenmuster auf den beiden Gelen war die Tatsache, daß Streptomyceten offensichtlich starke zelleigene Proteaseaktivitäten besitzen, die trotz der Verwendung geeigneter Agenzien zur Hemmung von Proteasen (z.B. Harnstoff, Pefabloc®SC (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid · HCl), Chaps (3-[(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat)) nicht vollständig inhibiert wurden. Dennoch konnten die meisten Proteine auf dem linken Gel (*S. lividans*/pUWL201) einem »Spot« auf dem rechten Gel (*S. lividans*/pDNW2) zugeordnet werden.

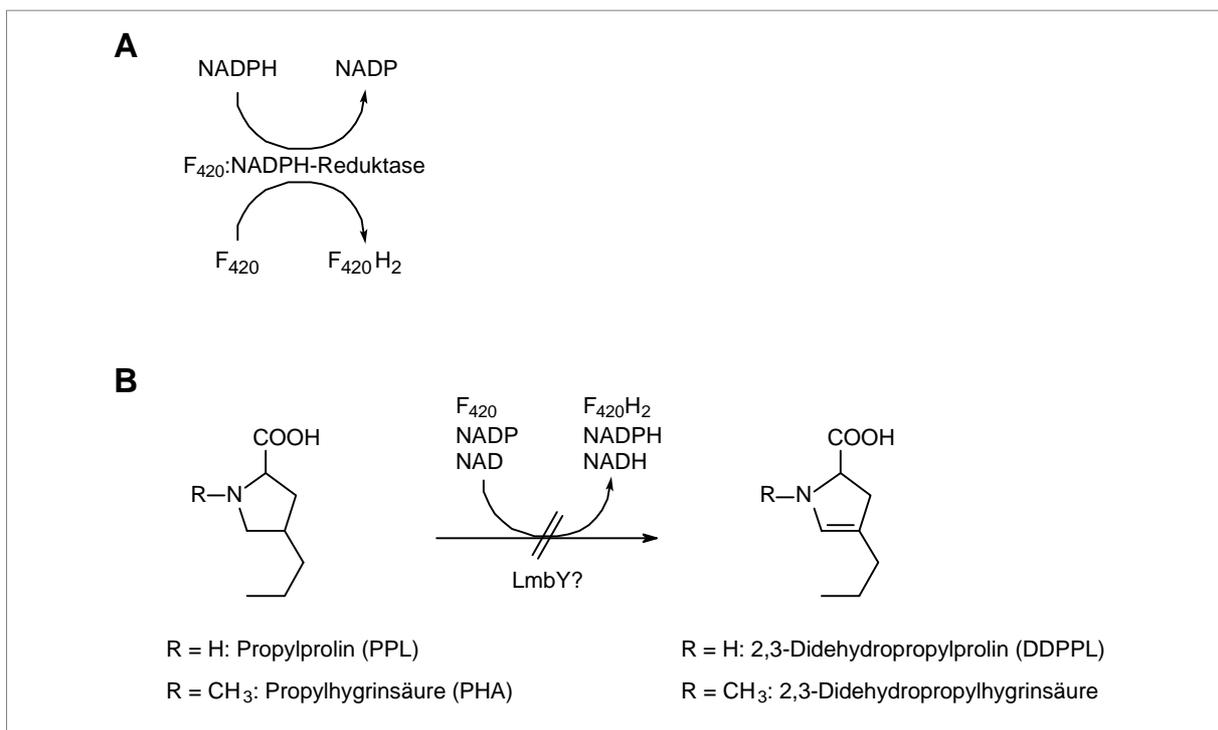


**Abb. 3-25.** Proteomanalysen von *S. lividans* TK23/pUWL201 (links) und *S. lividans* TK23/pDNW2 (rechts) durch zweidimensionale Gelelektrophorese. Es sind nur die relevanten Gelausschnitte gezeigt. In der Mitte sind die Größen des verwendeten Proteinstandards angegeben. Die Kästen markieren das LmbY-Protein auf der rechten Seite und die entsprechende Position auf der linken Seite. Die molekulare Masse von LmbY konnte auf 32,5 kDa und der IP auf 5,4 festgelegt werden.

3.2.9 Enzymtests auf NADPH:F<sub>420</sub>- und F<sub>420</sub>:PPL-Reduktase-Aktivität

Im folgenden wurden (a) die zellfreien Extrakte von *S. lincolnensis* NRRL 2936, *S. lincolnensis* Mu1, -Mu2, -Mu4, -Mu7, -Mu9, *S. griseus* N2-3-11, *S. lividans* TK23/pUWL201, *S. lividans* TK23/pDNW2 und *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY auf NADPH:F<sub>420</sub>-Reduktase-Aktivität überprüft (vgl. Abb. 3-26 A). Nach den Angaben von Eker *et al.* (1989) und Neußer (1995) besitzen *S. griseus*, *S. lividans*, *S. lincolnensis* und andere *Streptomyces*-Stämme NADPH:F<sub>420</sub>-Reduktase-Aktivität. Es galt zusätzlich festzustellen, ob die Extrakte der neuen *lmbY*-Insertions-mutanten noch diese Aktivität aufwiesen. Darüber hinaus wurden (b) die Rohextrakte von *S. lincolnensis* NRRL 2936 und *S. lividans* TK23/pDNW2 auf F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>:DDPPL-Reduktase-Aktivität (vgl. Abb. 1-5) geprüft. Da kein Substrat (DDPPL) zur Verfügung stand, wurde versucht, die Rückreaktion zu messen (s. Abb. 3-26 B). Als Substrate sollten PHA bzw. PPL dienen.

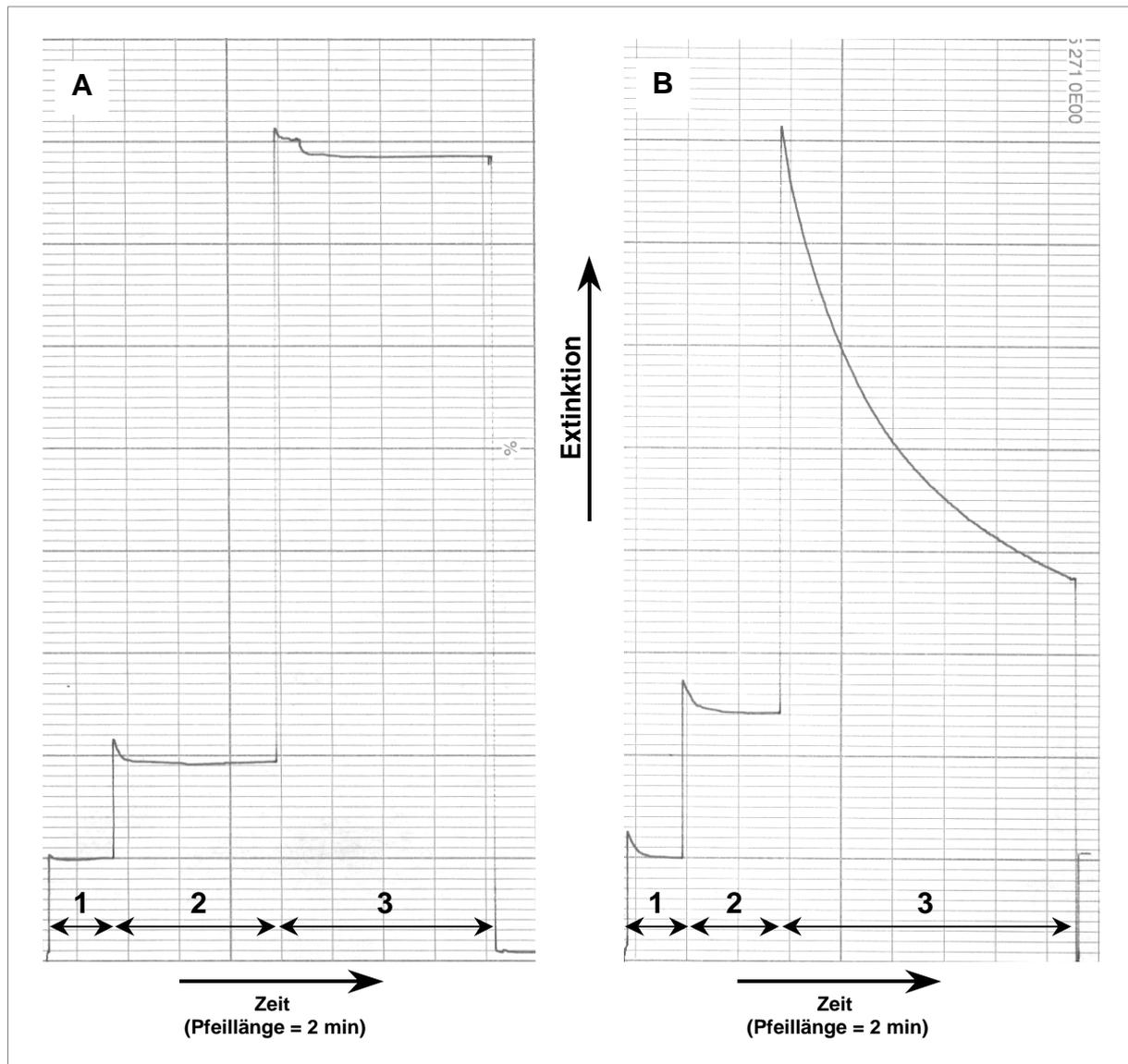
Es wurden zunächst NaCl, Kaliumphosphatpuffer, 2-Mercaptoethanol, der Cofaktor (siehe



**Abb. 3-26.** Mögliche Enzymaktivitäten von *LmbY*. **A.** NADPH:F<sub>420</sub>-Reduktase-Aktivität, die in vielen *Streptomyces*-Stämmen gefunden werden kann. **B.** Überprüfung der Annahme, ob *LmbY* eine F<sub>420</sub>:DDPPL-Reduktase ist. In diesem Fall wurde versucht, die Rückreaktion der postulierten Funktion zu messen, da keine Substrat für die »normale« Reaktionsrichtung zur Verfügung stand. DDPPL, 2,3-Didehydropropylprolin; PPL, Propylprolin.

Tab. 3-8) und Rohextrakt der zu untersuchenden Stämme vorgelegt. Der Faktor  $F_{420}$  (Absorptionsmaximum  $\lambda = 399$  nm), der die Reaktionslösung fluoreszierend-gelb färbte, wurde zum Schluß zugegeben und die Extinktionsänderung photometrisch bei 399 nm 5 - 10 min verfolgt. Die Reduktion von  $F_{420}$  zu  $F_{420}H_2$  machte sich durch Extinktionsabnahme bemerkbar (s. Abb. 3-27 B). Es wurden zusätzlich Nullkontrollen durchgeführt, bei denen aktive *Streptomyces*-Rohextrakte ohne NADPH-Zugabe oder ein durch Erhitzen inaktivierter *S. griseus* N2-3-11-Zellextrakt eingesetzt wurden (s. Abb. 3-27 A).

Aus den gewonnenen Ergebnissen der einzelnen Enzymtests, die in Tab. 3-8 zusammengestellt sind, ist zu entnehmen, daß alle *lmbY*-Insertionsmutanten, genau wie die anderen *Streptomyces*-Stämme, NADPH-abhängige  $F_{420}$ -Reduktase-Aktivität aufwiesen. Darüber hinaus konnten *lmbY*-haltige Extrakte PHA bzw. PPL unter Zugabe der Cofaktoren  $F_{420}$ , NAD bzw. NADPH nicht zu den entsprechenden ungesättigten Verbindungen umsetzen. Da es sich bei dieser Messung um eine Rückreaktion handelte, wurde ebenfalls getestet, ob eine Veränderung des pH-Werts von 6 auf 8 Einfluß hatte (nur PHA als Substrat getestet), was aber nicht der Fall war.



**Abb. 3-27.** Messung der Aktivität der NADPH-abhängigen  $F_{420}$ -Reduktase. NaCl, Kaliumphosphatpuffer, 2-Mercaptoethanol und NADPH wurden vorgelegt (Abschnitt 1). Der zu untersuchende Rohextrakt wurde zu Beginn des Abschnittes 2 zum Ansatz pipettiert. Der Abschnitt 3 gibt den Verlauf der Enzymkinetik wieder, da hier das Substrat  $F_{420}$  zugegeben wurde. **A.** Messung der Aktivität eines Rohextraktes von *S. lincolnensis* NRRL 2936 ohne NADPH-Zugabe oder eines durch Erhitzen inaktivierten *S. griseus* N2-3-11-Zellextraktes. **B.** Messung der NADPH-abhängigen  $F_{420}$ -Reduktase mit zellfreiem Extrakt von *S. lincolnensis* NRRL 2936, *S. lincolnensis* Mu1, -Mu2, -Mu4, -Mu7, -Mu9, *S. griseus* N2-3-11, *S. lividans* TK23/pUWL201, *S. lividans* TK23/pDNW2 oder *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY. Die Extinktion hatte bei allen untersuchten Streptomycceten-Stämmen einen ähnlichen Verlauf.

**Tab. 3-8.** Enzymtests auf NADPH:F<sub>420</sub>- bzw. F<sub>420</sub>:DDPPL-Reduktase-Aktivität.

| Rohextrakt                          | Substrat         | Cofaktor         | pH | Aktivität      |
|-------------------------------------|------------------|------------------|----|----------------|
| <i>S. griseus</i> N2-3-11 (gekocht) | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | – <sup>a</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pUWL201     | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936    | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lincolnensis</i> Mu1          | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lincolnensis</i> Mu2          | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lincolnensis</i> Mu4          | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lincolnensis</i> Mu7          | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lincolnensis</i> Mu9          | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. griseus</i> N2-3-11           | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pUWL201     | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW26RBSY  | F <sub>420</sub> | NADPH            | 6  | + <sup>a</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | PPL              | F <sub>420</sub> | 6  | – <sup>a</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | PPL              | NAD              | 6  | – <sup>b</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | PPL              | NADP             | 6  | – <sup>b</sup> |
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936    | PHA              | F <sub>420</sub> | 6  | – <sup>a</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | PHA              | F <sub>420</sub> | 6  | – <sup>a</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | PHA              | NAD              | 6  | – <sup>b</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | PHA              | NADP             | 6  | – <sup>b</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | PHA              | F <sub>420</sub> | 8  | – <sup>a</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | PHA              | NAD              | 8  | – <sup>b</sup> |
| <i>S. lividans</i> TK23/pDNW2       | PHA              | NADP             | 8  | – <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> +, Extinktionsabnahme bei  $\lambda = 399$  nm; –, keine Extinktionsänderung bei  $\lambda = 399$  nm;

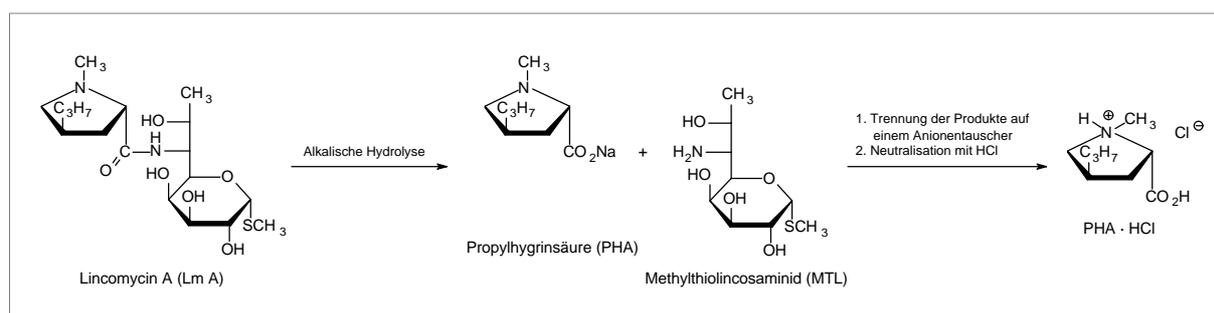
<sup>b</sup> –, keine Extinktionsänderung bei  $\lambda = 340$  nm

3.2.10 Substratkomplementation der *ImbY*-Insertionsmutanten von *S. lincolnensis**Präparation von Propylhygrinsäure (PHA)*

Die Herstellung von PHA aus Lm nach Brahme *et al.* (1984a) verlief in zwei Schritten (s. Abb. 3-28). Im ersten Schritt wurde Lm durch alkalische Hydrolyse in MTL und PHA gespalten. Dabei wurden 100 % der eingesetzten 2 g Lm umgesetzt. In einer dünnschichtchromatographischen Analyse waren im Produkt nur zwei Substanzen sichtbar (nicht gezeigt). Im zweiten Schritt wurde MTL mit Hilfe eines Anionentauschers von PHA getrennt. PHA konnte anschließend mit Salzsäure als PHA · HCl mit einer Ausbeute von 87,8 % vom Anionentauscher entfernt werden.

*PHA- und PPL-Komplementation*

Die erzeugten *ImbY*-Insertionsmutanten wurden wie unter Abschnitt 2.2.14 beschrieben in einem kombinierten Komplementation/Plattendiffusionstest mit PHA, PPL und TES-Puffer als Nullkontrolle gefüttert und anschließend auf die Produktion von Lm getestet. Bei einer Anzucht mit bzw. ohne PHA-Fütterung konnte keine Lm-Produktion festgestellt werden. Durch die Supplementierung des Agars mit PPL wurde die Lm-Produktion in allen untersuchten Mutanten wiederhergestellt. In Tab. 3-9 ist eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse dargestellt.



**Abb. 3-28.** Darstellung von PHA · HCl aus Lm A. Die einzelnen Produkte der alkalische Hydrolyse des Lincomycins im ersten Schritt wurden durch anschließende Trennung mit einem Anionentauscher im zweiten Schritt isoliert (nach Brahme *et al.*, 1984a). PHA · HCl, Propylhygrinsäurehydrochlorid.

**Tab. 3-9.** Substratkomplementation der erzeugten *lmbY*-Insertionsmutanten. Die Ergebnisse sind wie folgt eingeordnet: ++, »normale« Lm-Produktion des Wildtyps; +, leicht reduzierte Lm-Produktion in Bezug auf den Wildtyp (ca. 50 - 75 %); –, keine sichtbare Lm-Produktion.

| Stamm <sup>a</sup>          | 2939 | Mu1 | Mu2 | Mu3 | Mu4 | Mu5 | Mu7 | Mu9 |
|-----------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>Substrat<sup>b</sup></b> |      |     |     |     |     |     |     |     |
| TES-Puffer                  | ++   | –   | –   | –   | –   | –   | –   | –   |
| PPL in TES-Puffer           | ++   | +   | ++  | ++  | +   | ++  | +   | ++  |
| PHA in TES-Puffer           | ++   | –   | –   | –   | –   | –   | –   | –   |

<sup>a</sup> 2936, *S. lincolnensis* NRRL 2936 (Wildtyp); Mu1 - Mu5/Mu7/Mu9, *S. lincolnensis-lmbY*-Insertionsmutanten 1 bis 5, 7 und 9 (s. auch Abb. 3-19). <sup>b</sup> PPL, Propylprolin; PHA, Propylhygrinsäure.

### 3.2.11 Versuche zur Bestimmung von Promotoraktivitäten oberhalb von *lmbY* und zur Transkriptanalyse

Aufgrund der Tatsache, daß sich die Lm-Produktion in den *lmbY*-Insertionsmutanten nur durch Transformation mit pDNW28J (*lmbUYX*) und nicht mit pDNW27J (*lmbYX*) wieder herstellen ließ, wurde der Promotor, der für die Transkription der DNA-Region, auf dem *lmbY* liegt, verantwortlich ist, stromaufwärts von *lmbU* vermutet. Verschiedene stromaufwärts des *lmbU* Gens gelegene DNA-Bereiche wurden mit dem promotorlosen *xyle* Gen in dem Vektor pWKD13II fusioniert (Tab. 3-10, Klonierungsstrategie s. Anhang 2-8). Nach Transformation von *S. lividans* TK23 mit den so konstruierten rekombinanten Plasmiden pDNW31II, pDNW32II und pDNW33II sowie dem Kontrollplasmid pWKD13II wurde die Brenz-katechin-2,3-Dioxygenase (Xyle)-Aktivität von zellfreien Extrakten dieser Stämme und von *S. lividans* TK23/pSTW13.2i/pSTW350/0 (Positivkontrolle) bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.25). Der Stamm *S. lividans* TK23/pSTW13.2i/pSTW350/0 enthielt das ins Genom integrierte sog. »Reporter-gen-Plasmid pSTW13.2«, welches den durch StrR aktivierbaren Promotor *strB1p* aus *S. griseus* N2-3-11 stromaufwärts des *xyle* Gens kloniert hatte; pSTW350/0 enthielt das *strR* Gen mit dem eigenen Promotor *strRp* aus *S. griseus* N2-3-11 (für weitere Informationen s. Thamm, 1999). Xyle-Aktivität konnte nur in den Extrakten *S. lividans* TK23/pSTW13.2i/pSTW350/0 (Positivkontrolle) und *S. lividans* TK23/pDNW32II detektiert werden. Die Xyle-Aktivität in den anderen Extrakten, wenn vorhanden, war so niedrig, daß sie photometrisch nicht erfaßt werden konnte (vgl. Tab. 3-10). Somit konnte eine Region mit Promotoraktivität auf einem DNA-Fragment zwischen -286 bp (*Bam*HI) und -113 bp (*Cl*aI) stromaufwärts von *lmbU* lokalisiert werden.

Die Promotoraktivität oberhalb von *lmbU* war 49mal schwächer als die des StrR-aktivierten *strB1p* in der Positivkontrolle, deren Wert dem Literaturwert von  $2,650 \text{ nkat} \cdot (\text{mg Gesamtprotein})^{-1}$  entsprach (Thamm, 1999). Die Restaktivität der Nullkontrolle hatte einen siebenmal kleineren Wert, als die von *lmbUp*. Diese Daten zeigen, daß der Promotor stromaufwärts von *lmbU* sehr schwach war. »Northern« Analysen mit verschiedenen RNA-Präparationen (es wurden Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen präpariert, die in verschiedenen Medien [TSB, SPMR, SPMR mit  $1/10$  der normalen Menge Suc] kultiviert wurden) und einem 1,0 kb *lmbY* Fragment als Sonde brachten unter keiner Bedingung ein Hybridisierungssignal (Autoradiogramme nicht gezeigt).

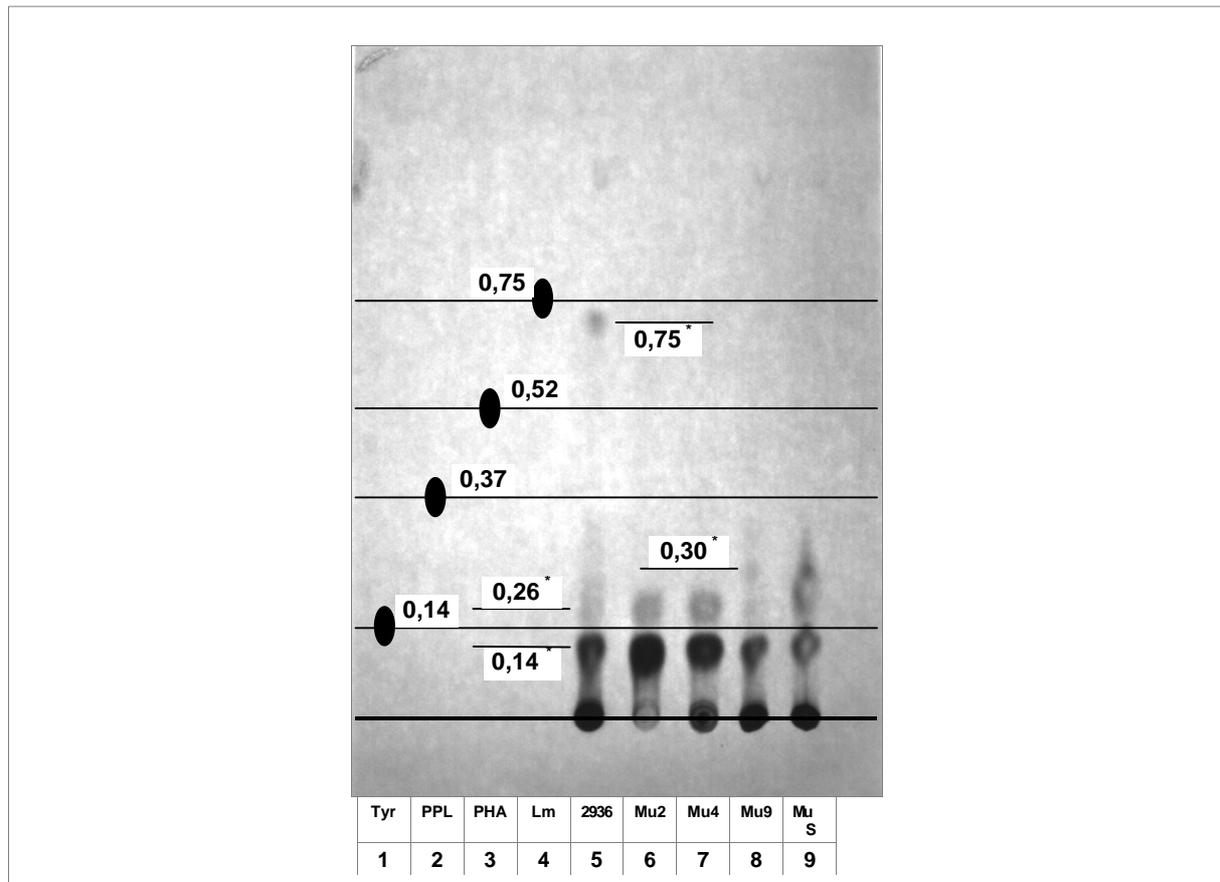
**Tab. 3-10.** Promotoraktivität stromaufwärts des *lmbY* Gens gelegener DNA-Bereiche. Zwei verschiedene Restriktionsfragmente aus dem stromaufwärts des *lmbY* Gens liegenden DNA-Bereich wurden in den Vektor pWKD13II kloniert. Die Expression des auf dem Vektor kodierten promotorlosen *xylE* Gens stand damit unter Kontrolle eines putativen *lmbU* Promotors. Das *xylE* Gen ist durch einen hellgrauen Pfeil dargestellt und der auf den Restriktionsfragmenten enthaltene *lmbU* kodierende Bereich durch hellgraue Balken. Die schwarzen Balken repräsentieren die Restriktionsfragmente.

| Darstellung der Promotortestkonstrukte | Plasmid   | XylE-Aktivität <sup>b</sup><br>( $\text{nkat} \cdot (\text{mg Ges.-Protein})^{-1}$ ) |
|--|---|--|
|  | pSTW13.2i/pSTW350/0<br>(Positivkontrolle <sup>a</sup> ) | 2,875  |
|  | pWKD13II (Negativkontrolle)                             | $9 \cdot 10^{-3}$  |
|  | pDNW31II  | 0  |
|  | pDNW32II  | $59 \cdot 10^{-3}$   |
|  | pDNW33II  | 0  |

<sup>a</sup> Der Stamm *S. lividans* TK23/pSTW13.2i/pSTW350/0 wurde zu Vergleichszwecken freundlicherweise von Sven Thamm (BUGH Wuppertal) zur Verfügung gestellt. <sup>b</sup> Die Daten stellen den Mittelwert aus vier Messungen dar.

### 3.2.12 Fütterungsexperimente mit $^{14}\text{C}$ -markiertem Tyrosin

Die in dieser Arbeit erzeugten *S. lincolnensis*-Mutanten waren in ihrer Lm-Biosynthese gehemmt. Durch die Komplementation mit PPL konnte gezeigt werden, daß ein Defekt in dem zu PPL führenden Biosyntheseweg bestand. Die Mutanten sollten also während der Lm-Produktion ein Zwischenprodukt anhäufen, welches eine PPL-ähnliche chemische Struktur hatte und durch LmbY zu einem Folgeprodukt umgesetzt werden konnte. In Anlehnung an die von Witz *et al.* (1971) publizierte Methode, wurden *S. lincolnensis* NRRL 2936, die *S. lincolnensis* Mutanten 2, 4, 9 und S (Mutante S war eine im MTL-Biosyntheseweg gehemmte *S. lincolnensis*-Mutante erzeugt von A. Arnold, BUGH Wuppertal) angezogen und mit L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Tyrosin versetzt. Die Kulturextrakte (aufgeschlossene Zellen und Kulturbrühe im Verhältnis 1:1) wurden anschließend dünnenschichtchromatographisch untersucht. Außerdem wurden noch Standardsubstanzen (Tyrosin, PPL, PHA, Lm) mit auf die DC-Platte aufgebracht (vgl. Legende Abb. 3-29). Auffällig war, daß alle Substanzen aus den aufgetragenen Kulturextrakten im Vergleich zu den Reinsubstanzen etwas retardiert liefen, d.h. sie hatten um ca. 0,06 kleinere  $R_f$ -Werte (vgl. Spuren 1 (Lm) und 4 (Tyrosin) mit Spur 5 in Abb. 3-29). Dies könnte durch Wechselwirkungen mit anderen Medienkomponenten verursacht worden sein. Bei den Mutanten 2 und 4 (Spuren 6 und 7) liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei den  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanz(en), die einen  $R_f$ -Wert von 0,20 aufwiesen, um das gesuchte Substrat von LmbY oder LmbX (TDPPL oder DDPPL) handelte. Es hatte einen  $R_f$ -Wert, der zwischen denen von Tyrosin und PPL lag. Der entsprechende Fleck war bei der Mutante 9 (Spur 8) nicht zu finden. Der Wildtypextrakt (Spur 5) zeigte in dieser Region einige sehr schwache und diffuse Signale, was nicht anders zu erwarten war, da die Radioaktivität in Lm eingebaut wurde. Der Kulturextrakt der Mutante S in Spur 9 erzeugte bei dem  $R_f$ -Wert von 0,20 und höher mehrere Signale, die von PPL oder dessen Vorläufern stammen könnten.



**Abb. 3-29.** Versuche zum Einbau von  $^{14}\text{C}$ -markiertem L-Tyrosin. Dargestellt ist die Autoradiographie einer dünnenschichtchromatographischen (DC-) Analyse von *S. lincolnensis*-Anzuchten (Zellen und Medium), die unter Zugabe von L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Tyrosin kultiviert wurden. DC-Parameter: Trennmittel, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>; Lösungsmittel, 40 VT Methanol/56 VT Chloroform/4 VT Ammoniak. Das Photo in der Abbildung zeigt nur das Autoradiogramm mit Signalen in den Spuren 5 - 9. Aufgetragen sind in Spur 5 (»2936«): *S. lincolnensis* NRRL 2936, Spur 6 (»Mu2«): *S. lincolnensis* Mu2, Spur 7 (»Mu4«): *S. lincolnensis* Mu4, Spur 8 (»Mu9«): *S. lincolnensis* Mu9, Spur 9 (»Mu S«): *S. lincolnensis* Mu S (eine im MTL-Biosyntheseweg gehemmte *S. lincolnensis*-Mutante erzeugt von A. Arnold, BUGH Wuppertal). Die schwarzen Ovale in den Spuren 1 - 4 und die vier dünnen schwarzen Linien verdeutlichen das Laufverhalten ( $R_f$ -Werte sind auf den Linien abgebildet) der entsprechend angegebenen Standardsubstanzen (Spur 1: L-Tyrosin; Spur 2: PPL; Spur 3: PHA; Spur 4: Lm), die auf der Original DC-Platte mit Ioddampf vorübergehend sichtbar gemacht werden konnten. Die Laufstrecken des  $^{14}\text{C}$ -markierten Lm (Spur 5) und des Tyrosins (Spuren 5 - 9) sind zusätzlich mit der Angabe der  $R_f$ -Werte (0,75 und 0,14) verdeutlicht. Erklärungen zur Substanz mit dem  $R_f$ -Wert 0,26 im Text.  $R_f$ -Werte, die mit \* gekennzeichnet sind, wurden um 0,06 an diejenigen der Referenzsubstanzen angeglichen.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten Beiträge zur Klärung der Genetik und Regulation der Biosynthese des therapeutisch genutzten Antibiotikums Lm geleistet werden. Dabei wurde besonderer Wert auf die Charakterisierung der bei der Herstellung der PPL-Untereinheit mitwirkenden Gene *lmbB1*, *lmbB2* und *lmbY* und auf biochemische Untersuchungen ihrer Genprodukte gelegt. Die neu gewonnenen Kenntnisse können für mehrere Ziele von Nutzen sein:

- Optimierung der Verträglichkeit des Antibiotikums durch Veränderung der chemischen Struktur *in vitro* und *in vivo*;
- Schaffung neuer Antibiotika durch Kombination der bekannten Wirkstoffuntereinheiten (Biokombinatorik);
- Verbesserung der Lm-Produktion durch gezielte Änderung der Biosyntheseregulation.

### 4.1 Identifizierung der Funktionen von LmbB1 und LmbB2

PPL wird ausgehend von L-Tyrosin über L-DOPA synthetisiert (Witz *et al.*, 1971). Vorausgegangene Arbeiten erlaubten die Hypothese, daß dabei die Enzyme LmbA, LmbB1 bzw. LmbB2 involviert sind (Schmidt, 1994). Da bis zu diesem Zeitpunkt für die beiden Leserahmen *lmbB1* und *lmbB2* bei einem Vergleich der abgeleiteten As-Sequenzen noch keine Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen gefunden wurden und für LmbB1 ohne gleichzeitige Anwesenheit von LmbB2 keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, ging man davon aus, daß LmbB1 und LmbB2 (1) Untereinheiten eines Holoenzym sind oder (2) zwei aufeinanderfolgende und direkt voneinander abhängige Schritte katalysieren oder (3) Aktivator und eigentliches Enzym darstellen.

### ***In vivo* Experimente zeigten, daß LmbB1 ein unabhängiges Enzym ist.**

Die *in vivo* Experimente von Schmidt (1994) konnten durch den Einsatz der PCR-Technologie fortgesetzt werden. Es war nun möglich, die einzelnen Gene unter Einführung geeigneter Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen zu amplifizieren und für die heterologe Expression in geeignete Vektoren zu klonieren. Dies wurde sowohl mit *lmbB1* als auch *lmbB2* erreicht (s. Tab. 3-1). Es sei vorweggenommen, daß bei einem direkten Vergleich der Aktivitäten der produzierten Proteine kein Unterschied festgestellt werden konnte, wenn man als DNA-Matrize bei der Amplifikation die chromosomale DNA entweder aus *S. lincolnensis* NRRL 2936 oder aus *S. lincolnensis* 78-11 verwendet hatte. Dies wurde durch die *in vitro* gemessene Aktivität von LmbB1-enthaltenden RE und durch die nachfolgend diskutierten *in vivo*-Tests festgestellt (s. Tab. 3-2).

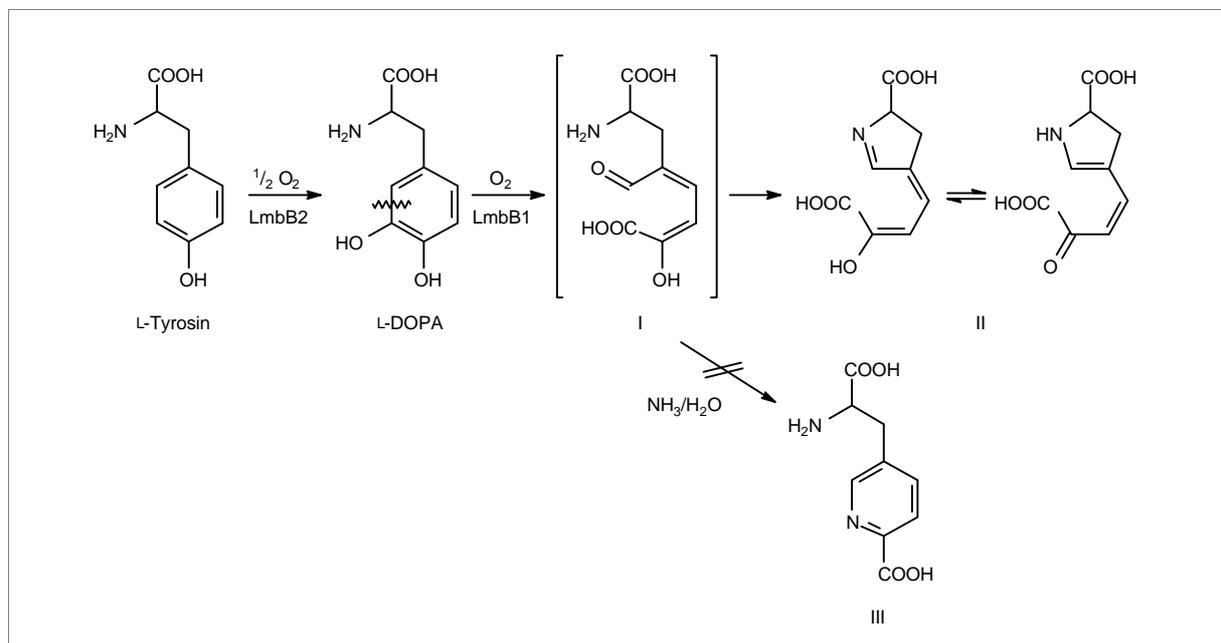
Ein erster Hinweis, daß die L-DOPA-umwandelnde Aktivität nur von LmbB1 allein ausgeht, war die Tatsache, daß eine mit IPTG induzierte Kultur von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, transformiert mit einem *lmbB1*-exprimierenden Plasmid (pET16B1, pDNW13.1 oder pDNW15.1), in der Lage war, L-DOPA in eine gelbe Substanz umzuwandeln. Dies wurde durch entsprechende Nullkontrollen abgesichert, d.h. bei Anwesenheit von L-DOPA wurden folgende Kulturen nicht gelb: (a) nicht mit IPTG induzierte *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Kulturen mit einem *lmbB1*-exprimierenden Plasmid und (b) mit IPTG induzierte *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Kulturen mit Leervektor (pET-16b, pT7-7).

Wenn LmbB1 die gesuchte L-DOPA-umwandelnde Aktivität aufwies, welche Aufgabe hatte dann LmbB2? Um eine Antwort zu erhalten, wurden mit *lmbB2* die gleichen Experimente durchgeführt wie mit *lmbB1*. Aber eine mit IPTG induzierte Kultur von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, transformiert mit einem *lmbB2*-exprimierenden Plasmid (pET16B2, pDNW13.2 oder pDNW15.2) färbte sich in Anwesenheit von L-DOPA nicht gelb, was auch nach Erhalt der Ergebnisse mit *lmbB1* nicht mehr zu erwarten war. Es wurde ein neues Plasmid konstruiert, mit dem es möglich war, beide Gene (*lmbB1* und *lmbB2*) gleichzeitig zu exprimieren (pET16B1B2). Eine entsprechend transformierte *E. coli*-Kultur färbte das umgebende Medium gelb, wenn L-DOPA oder L-Tyrosin zugegeben wurde. Daraus konnte geschlossen werden, daß LmbB2 in der Lage war, L-Tyrosin zu L-DOPA zu oxidieren, welches wiederum von LmbB1 umgesetzt werden konnte und im zweiten Schritt sich erst das Medium gelb färbte. Ein anderer Hinweis darauf, daß LmbB2 L-Tyrosin zu L-DOPA zu oxidiert, war die Braunfärbung von LB-Agar im Bereich *lmbB2*-exprimierender *E. coli*-Kolonien. Diese Färbung ließ sich durch zwei Fakten erklären: (1) frisch angesetzte L-DOPA-

Lösungen färbten sich nach ein paar Stunden, spätestens nach einem Tag, braun; (2) das verwendete LB-Medium enthielt eine Reihe von freien AAs, darunter auch Tyrosin, welches von LmbB2 zu L-DOPA umgewandelt wurde. Das entstandene L-DOPA reagierte anschließend, vermutlich in Verbindung mit Luftsauerstoff, zu einem braunen Feststoff.

**LmbB1 ist eine spezifische L-DOPA-2,3-Dioxygenase und  
LmbB2 eine L-Tyrosin-3-Hydroxylase.**

In einer anderen, mit dieser Arbeit verflochtenen Studie (Neusser *et al.*, 1998), wurde versucht, das zuerst entstehende Produkt der L-DOPA-Spaltung (Abb. 4-1 I) mit Hilfe von Ammoniak abzufangen und als 3-(2-Carboxy-5-pyridyl)-L-alanin (III) zu derivatisieren. Da dies nicht gelang, wurde der Rückschluß gezogen, daß die Zirkularisierung des putativen Heterozyklus (I) zum gelben Produkt (II) sich sehr schnell vollzieht oder vom LmbB1-Protein selbst katalysiert wird.



**Abb. 4-1.** Einleitende Schritte des postulierten PPL-Biosyntheseweges. Die chemischen Strukturen der Verbindungen sind dargestellt, ausgehend von L-Tyrosin über L-DOPA. Die Verbindung I stellt einen hypothetischen Übergangszustand dar, der direkt zur Verbindung II umgelagert wird. Die Umlagerung wird als sehr schnell angenommen, da die Verbindung III aus einer Reaktionsmischung von L-DOPA mit LmbB1 mit Ammoniak nicht isoliert werden konnte.

Die Proteine LmbB1 und LmbB2 wurden einzeln und in Kombination auch in *S. lividans* produziert, weil die Erfahrung bei der Arbeit mit Streptomycetengen gezeigt hatte, daß die bei einer heterologen Expression in *E. coli* gebildeten Proteine oft zu einem großen Teil oder vollständig als unlösliche und inaktive »inclusion bodies« vorlagen (vgl. Abschnitt 4.2). Bei Anzucht eines *lmbB1*-exprimierenden *S. lividans*-Stammes (*S. lividans* TK23/pDNW14.1 oder pUWL201-lmbB1) konnte nur bei Zugabe von L-DOPA eine Gelbfärbung des Mediums beobachtet werden. Die in *lmbB2*-exprimierenden *E. coli*-Kulturen beobachtete braune Färbung bei Anzucht auf LB-Agar, fand in *S. lividans* (*lmbB2*) eine Entsprechung bei einer Anzucht in TSB-Flüssigmedium (vgl. Tab. 3-3).

Für die gleichzeitige Expression der Gene *lmbB1* und *lmbB2* in *E. coli* mußte jedes der beiden Gene seine eigene *E. coli*-spezifische RBS besitzen (s. Tab. 3-2 pET16B1B2), denn die vermutete translationale Kopplung zwischen *lmbB1* und *lmbB2* wurde offensichtlich in *E. coli* nicht vollzogen. Andererseits konnte die tatsächliche translationale Kopplung zwischen *lmbB1* und *lmbB2* durch Expression der beiden Gene in *S. lividans*/pDNW14.12 nachgewiesen werden. Die Gelbfärbung des SPMR-Agars im Bereich der Kolonien wies die Aktivität und damit die Produktion beider Enzyme nach (Abb. 3-3 C). Eine Erklärung für diesen Unterschied, der auch durch die Topologie oder Stabilität der mRNA begründet sein könnte, kann derzeit nicht gegeben werden.

LmbB1 wies eine hohe Substratspezifität auf. Mehrere andere mögliche Substratanaloga (L-Tyrosin, D-DOPA, L-Phenylalanin, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, Brenzkatechin und L-Tryptophan; s. Abb. 3-8) wurden nicht umgesetzt.

Alle bisherigen Ergebnisse wiesen klar darauf hin, daß LmbB1 eine Dioxygenase war und folglich molekularer Sauerstoff als zweites Substrat diente. Der Sauerstoffverbrauch eines *lmbB1*-exprimierenden *E. coli*-Extrakts unter Zugabe von L-DOPA konnte auch tatsächlich mittels einer Sauerstoffelektrode nachgewiesen werden.

Die geringe, aber signifikante Sequenzähnlichkeit von LmbB1 zu bekannten ringspaltenden Extradiol-Dioxygenasen, z.B. der Metapyrocatechase II (Catechol-2,3-Dioxygenase) aus *Alcaligenes eutrophus*, zeigte, daß LmbB1 (18 kDa) im Gegensatz zu den Untereinheiten anderer Dioxygenasen (ca. 22 - 36 kDa) zwar ein ungewöhnlich kleines Protein darstellt, aber vermutlich – wie viele andere Dioxygenasen (Nozaki, 1979) – ebenfalls ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten bildet, denn Neusser *et al.* (1998) hatten bei Behandlung einer nativen PAGE von LmbB1-enthaltenden *E. coli*-Extrakten mit L-DOPA-Lösung Enzymaktivität in einer Proteinbande feststellen können, die etwa einer molekularen Masse von 66 kDa entsprach. Darüber hinaus besitzt LmbB1 insbesondere am C-Terminus

Sequenzmotive, die denjenigen anderer Dioxygenasen ähnlich sind. LmbB1 beinhaltet sechs Histidin-Reste, wovon vier im Vergleich zu MpcII konserviert sind (vgl. Abb. 3-13). In vielen anderen Catechol-2,3-Dioxygenasen werden ebenfalls entsprechend angeordnete Histidin-Reste gefunden, sog. HH#-Motive (H, Histidin; #, hydrophober Rest), die zwei- bis dreimal pro Protein vorkommen und vermutlich für die Bindung von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen oder anderer bivalenter Metallionen verantwortlich sind. Es ist ebenso wahrscheinlich, daß sie zumindest teilweise mit in die katalytische Aktivität des jeweiligen Enzyms involviert sind. Es konnte zwar nicht nachgewiesen werden, daß LmbB1  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen bindet, dennoch ist es möglich, daß die vier konservierten Histidin-Reste in dieser oder ähnlicher Weise Einfluß auf die katalytische Aktivität haben.

Die *in vivo* nachgewiesene L-Tyrosin-oxidierende Aktivität von LmbB2 ist vergleichbar mit einer von Michalik *et al.* (1975) gefundenen intrazellulären L-Tyrosin-Monooxygenase-Aktivität, die nur bei Melanin-negativen, Lm-überproduzierenden *S. lincolnensis*-Stämmen während der stationären Phase gefunden wurde. Obwohl in der Studie von Michalik *et al.* (1975) die Erfordernis von Cofaktoren, wie Eisen (II) oder Tetrahydrobiopterin, für die Reaktion nicht getestet wurde, so ist doch bekannt, daß solche Cofaktoren für andere L-Tyrosin-Hydroxylasen oder Monooxygenasen nötig sind (Walsh, 1978; 1979; Nozaki, 1979). Die Summe der vorliegenden Daten über LmbB2 geben trotzdem zu erkennen, daß LmbB2 zur Familie der Monooxygenasen gehört. Der Nachweis, daß das Enzym *in vitro* vermutlich andere als die getesteten Cofaktoren (Eisen (II), Tetrahydrobiopterin) benötigt, um aktiv zu sein, muß noch erbracht werden.

Die vorliegenden Daten der *in vivo* Experimente, die Sauerstoffverbrauchsmessung, die gezeigten As-Sequenzvergleiche und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Brahme *et al.*, 1984a; Kuo *et al.*, 1992; Chung *et al.*, 1997) ließen insgesamt die Schlußfolgerung zu, daß LmbB1 eine L-DOPA-2,3-Dioxygenase und LmbB2 eine L-Tyrosin-3-Hydroxylase ist.

**LmbB1 wurde als His-tag-Fusionsprotein in *E. coli* heterolog produziert, gereinigt und der  $K_M$ -Wert mit L-DOPA als Substrat zu 258  $\mu\text{M}$  bestimmt.**

Es war von Interesse, einen enzymatischen Test für LmbB1 bzw. His-tag•LmbB1 zu entwickeln, um charakteristische Eigenschaften (Funktion,  $K_M$ -Wert, Stabilität, etc.) aufzudecken. Dazu waren mehrere Faktoren Voraussetzung:

- (1) Das Enzym mußte löslich und aktiv produziert werden;

- (2) die Aufbereitung der Zellen zu einem zellfreien Extrakt, die Lagerung desselben und die Reinigung bis zur Homogenität durfte die Aktivität des Enzyms möglichst nicht beeinträchtigen;
- (3) der enzymatische Test zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes sollte möglichst einfach sein und reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Die Expressionen der *S. lincolnensis lmbB1* und *lmbB2* Gene wurden schon *in vivo* durch den Nachweis der L-DOPA- und L-Tyrosin-umwandelnden Aktivität nachgewiesen (s. Abschnitt 3.1.3). Durch geeignete PAGE konnten beide Proteine in den zellfreien Extrakten der dort kultivierten Anzuchten dargestellt werden (vgl. Abb. 3-4). Das vermehrt produzierte und lösliche His-tag•LmbB1 zeigte direkt nach dem Aufschluß der *E. coli*-Zellen in Tris-Puffer (pH 8) seine höchste Aktivität, die sich in einem direkten Vergleich mit derjenigen des LmbB1-Proteins ohne His-tag nicht unterschied (vgl. Abb. 3-7 B). Für die kurzfristige Lagerung des LmbB1-Enzyms im Rahmen der Aufnahme von Umsatzraten in enzymatischen Tests war die gemessene Aktivitätsabnahme in Tris-Puffer (pH 8 - 9) von ca. 5 %/6 h akzeptabel. Für eine längere Lagerung des Enzyms bei -20 °C wurde der frische Rohextrakt mit 10 - 20 % Saccharose als Stabilisator versetzt. Dies verringerte zwar stark die Anfangsaktivität, die Restaktivität blieb aber dann über mehrere Tage nahezu konstant.

Für die Reinigung des His-tag•LmbB1 konnte die Standardmethode nicht angewandt werden, da das zur Elution verwendete Imidazol und der Phosphatpuffer die Aktivität von LmbB1 stark beeinträchtigte (vgl. Abb. 3-7 A und D). Daher wurde eine neue Methode entwickelt, bei der die Tatsache ausgenutzt wurde, daß der verwendete Tris-Puffer die Adsorption von Proteinen an die Ni-NTA-Matrix erschwerte, so daß nur Proteine mit multiplen His-Resten an der Säule adsorbierten. Die Dissoziation unspezifischer Proteine wurde durch Anlegen eines Tris-Gradienten noch forciert. His-tag•LmbB1 wurde anschließend mit Histidin von der Säule eluiert. Histidin hatte als Elutionsmittel gegenüber Imidazol den weiteren Vorteil, daß es nicht bei 280 nm absorbierte. Andererseits bestand ein Nachteil darin, daß die Ni-NTA-Agarose durch Ablösung der  $Ni^{2+}$ -Ionen von der Agarose verbraucht wurde. Auf diese Weise dargestelltes LmbB1-Protein erwies sich auf einem PAA-Gel (s. Abb. 3-9) als rein und war bezüglich der spezifischen Aktivität gegenüber dem RE ca. dreifach angereichert. Dies entsprach der Konzentration von LmbB1 im RE, die zu etwa einem Drittel bis einem Viertel des Gesamtproteins abgeschätzt wurde (vgl. Abb. 3-9, Spur 4). Der mehrfach bestimmte  $K_M$ -Wert des gereinigten His-tag•LmbB1-Proteins mit L-DOPA als Substrat betrug 258  $\mu M$ . Dieser Wert liegt im Rahmen derjenigen anderer proximal

extradiolspaltender Dioxygenasen, deren  $K_M$ -Werte zwischen  $3,0 \mu\text{M}$  (Catechol-2,3-Dioxygenase; EC 1.13.11.2; *Pseudomonas arvilla*) und  $370 \mu\text{M}$  (Steroid-4,5-Dioxygenase; EC 1.13.11.25; *Nocardia restrictus*) betragen können (Nozaki, 1979).

Die von LmbB1 katalysierte Reaktion wurde von äquimolaren Mengen L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan nicht gehemmt. Dies deutete an, daß die zwei benachbarten Hydroxylgruppen des L-DOPA, insbesondere die metaständige OH-Gruppe, den Hauptbeitrag bei der spezifischen Substraterkennung/-bindung lieferten.

Die Medien zweier *lmbB1B2*-exprimierender Kulturen wurden einerseits mit L-Tyrosin und andererseits mit L-DOPA versetzt. Nach erfolgter Umsetzung der Substrate wurden die Überstände mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie verglichen (s. Abb. 3-12). Beide Spektren wiesen bei  $413 \text{ nm}$  Maxima auf, welche charakteristisch für die gelbe Substanz waren, die durch LmbB1 aus L-DOPA entsteht (Neusser *et al.*, 1998). Da beide Spektren unterhalb von  $350 \text{ nm}$  jedoch voneinander abwichen, konnte nicht eindeutig festgelegt werden, ob die beiden entstandenen gelben Substanzen tatsächlich identisch waren. Eine Analyse durch Aufnahme eines NMR-Spektrums von der gelben Substanz erwies sich als unmöglich, da sich bei einer präparativen Dünnschichtchromatographie durch Verringerung des Lösungsmittelvolumens die ursprünglich fluoreszierende gelbe Substanz nach braun umfärbte. Es ließ sich daher annehmen, daß unter diesen Bedingungen ebenfalls eine Polymerisation des Produkts eintrat. Eine Reinigung der Substanz durch Ausschütteln oder Umkristallisation scheiterte an der Tatsache, daß sich die Substanz nur in Wasser löste, wie das Edukt und die meisten Medienbestandteile auch. Als erfolgversprechend erwies sich eine Trennung über Zellulose mit einer Isopropanol/Wasser-Mischung als Lösungsmittel. Auf der analytischen DC-Zellulose-Platte konnte aber nicht erkannt werden, ob eine vollständige Trennung von den Nebenprodukten erfolgt war. Die Reinigung der gelben Substanz aus einem größeren Reaktionsansatz über eine Zellose säule mit anschließender NMR-Analyse könnte zukünftig Aufschluß über die Struktur der Verbindung geben.

## 4.2 Untersuchungen zur Charakterisierung von *lmbY*

Der weitere Verlauf der PPL-Biosynthese ist praktisch unbekannt. Der einzige konkrete Hinweis ergab sich aus der Anhäufung einer Substanz, TDPPL (vgl. Abb. 4-4), in einer  $F_{420}$ -negativen Mutante von *S. lincolnensis* (Kuo *et al.*, 1992). Die vermutlich letzten beiden

Schritte der PPL-Biosynthese gehen von TDPPL aus und umfassen zwei Reduktionen an den beiden Doppelbindungen (Brahme *et al.*, 1984a; Kuo *et al.*, 1992). Mindestens eine oder beide Reduktionsschritte sollten folglich abhängig von Coenzym F<sub>420</sub> sein (vgl. Abschnitt 1.4). Da für den Leserahmen von *lmbY* bei einem Vergleich der abgeleiteten As-Sequenzen Ähnlichkeiten zu F<sub>420</sub>-abhängigen N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylentetrahydromethanopterin-Reduktasen und einigen F<sub>420</sub>-abhängigen Dehydrogenasen gefunden wurden, konnte postuliert werden, daß *LmbY* ebenfalls eine F<sub>420</sub>-bindende Reduktase darstellte. Diese Hypothese sollte u.a. durch Mutagenese des Gens und heterologe Produktion des Genprodukts mit anschließenden Enzymtests untersucht werden.

Hybridisierungsversuche mit *lmbY* sollten zunächst das eventuelle Vorkommen des Gens in Nichtproduzenten aufklären. In *Streptomyces*-Stämmen, die kein Lm produzieren, wurde kein signifikantes Hybridisierungssignal mit der *lmbY*-spezifischen Probe gefunden. Im Gegensatz dazu zeigten alle Lm-Produzenten distinkte Signale in der genomischen DNA. Bei der Betrachtung der Größen der hybridisierenden Restriktionsfragmente fiel auf, daß die *S. lincolnensis*-Stämme eine Gruppe bildeten, da sie sich in den Hybridisierungsmustern nicht unterschieden. Ferner waren die Muster der beiden Stämme *S. sp. (espinosus)* NRRL 3890 und *S. espinosus* NRRL 5729 identisch. Die beiden übrigen Lm-Produzenten, *S. pseudogriseolus* NRRL 3985 und *S. vellosus* NRRL 8037, bildeten je eine eigene Gruppe. Ihre Muster waren zwar bei der Verwendung von *SphI/BamHI* und *NcoI/BamHI* ebenfalls identisch, unterschieden sich jedoch bei Verwendung der anderen vier Enzyme bzw. Enzymkombinationen (vgl. Tab. 3-6). Der Befund, daß *lmbY* außer in *S. lincolnensis* bei den vier anderen Lm-Produzenten ebenfalls im *lmb/lmr*-Gencluster gefunden wurde, erhärtet die Annahme, daß *lmbY* nicht das in Streptomyceten weit verbreitete Enzym F<sub>420</sub>/NAD(P)H Oxidoreduktase kodiert, sondern wahrscheinlich ein Lm-Biosyntheseenzym.

**Durch homologe Rekombination wurden *lmbY*-Insertionsmutanten von *S. lincolnensis* NRRL 2936 erzeugt.**

Die gezielte Mutagenese des *S. lincolnensis lmbY* Gens wurde im Wildtyp NRRL 2936 durchgeführt. Der Überproduktionsstamm *S. lincolnensis* 78-11 war für eine Mutagenese durch Rekombination ungeeignet, da in diesem Stamm das *lmb/lmr*-Cluster doppelt vorlag und für eine gezielte Zerstörung eines Gens auch doppelt so viele Rekombinationsereignisse hätten stattfinden müssen. Durch Transformation mit sog. »Suicide-Plasmiden« (Plasmid

ohne *ori* für Streptomyceten) wurde erreicht, daß sich die eingebrachte DNA nur durch Rekombination ins Chromosom in der Zelle vermehren und ausprägen konnte. Als Selektionsmarker für die erfolgreiche Rekombination wurde zunächst das Gentamicinresistenzvermittelnde *aacC1* Gen verwendet, das sich jedoch als ungeeignet herausstellte, weil eine hoher Prozentsatz spontan Gentamicin<sup>R</sup>-Kolonien auftraten, die noch Lm produzierten und keine Transformation erfuhren. Für alle weiteren Transformationen wurde deshalb das *aacC4* Gen als Marker verwendet, welches eine nicht zur spontanen Resistenzentwicklung neigende Am-Resistenz vermittelte. Alle so erhaltenen *S. lincolnensis*-Transformanten produzierten kein Lm mehr. Von zehn durch PCR und »Southern« Hybridisierung untersuchten Transformanten hatten zwei Mutanten einen durch ein doppeltes Rekombinationsereignis entstandenen Verlust des nativen *lmbY* Gens durch vollständigen Austausch gegen die *aacC4*-Kassette erfahren. Ebenso konnte bei allen anderen Mutanten mit einem »single crossover« unterschieden werden, ob die Rekombination stromaufwärts oder stromabwärts des *aacC4* Gens stattgefunden hatte (vgl. Abb. 3-17 i.V.m. Abb. 3-18).

Bei Betrachtung der neuen genomischen Strukturen in den Mutanten mit doppelten »crossover«-Ereignissen stellte sich die Frage, ob auch das Gen *lmbX* nicht mehr exprimiert wurde, da es translational mit *lmbY* gekoppelt ist. Im Falle von Mutante 2 war es sehr unwahrscheinlich, daß *lmbX* exprimiert wurde, da das *aacC4* Gen auf der integrierten Kassette eine gegenläufige Anordnung hatte (vgl. Abb. 3-18 Nr. 1 und 3). Dies war bei der Mutante 9 nicht der Fall. Hier war unter der Voraussetzung, daß sich stromabwärts von *aacC4* keine Terminationssignale befanden, durchaus anzunehmen, daß *lmbX* unter der Kontrolle des *aacC4*-Promotors noch exprimiert wurde. Die Mutante 4 hatte ebenfalls einen interessanten Genotyp. Die Gene *lmbU* und *lmbY* wurden sehr wahrscheinlich exprimiert, während das Protein LmbX, trotz der Tatsache, daß das entsprechende Gen intakt auf dem Chromosom zu finden war, nicht produziert wurde. Die anderen Mutanten (1, 3, 5, 6, 7, 8 und 10) waren – durch die translationale Kopplung zwischen *lmbY* und *lmbX* bedingt – vermutlich LmbY<sup>-</sup> und LmbX<sup>-</sup>.

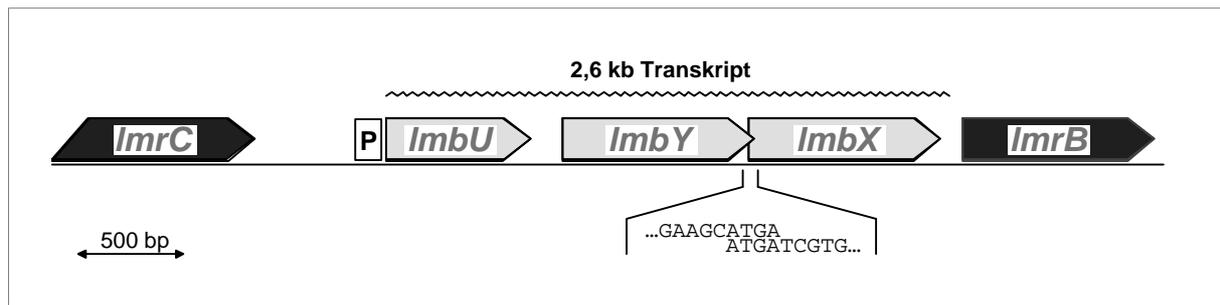
#### **Die *lmbY*-Insertionsmutanten konnten durch PPL-Fütterung komplementiert werden.**

Die Annahme, daß das Gen *lmbY* an der Synthese der PPL-Untereinheit beteiligt ist (Peschke *et al.*, 1995) bestätigte sich mit Hilfe der hergestellten *lmbY*-Mutanten, da diese durch Fütterung mit PPL wieder Lm A produzierten. Dies gelang mit PHA nicht (vgl. Tab. 3-9). Es

war daher wahrscheinlich, daß die zusätzliche Methylgruppe von PHA gegenüber PPL eine Verknüpfung mit der MTL-Untereinheit verhinderte, bzw. daß PHA kein Substrat für das aktivierende Enzym (vermutlich LmbC) war. Zur Kondensation von PPL mit MTL muß wahrscheinlich ein Aminoacyladenylat aus PPL und ATP unter Freisetzung von Pyrophosphat gebildet werden. Dieser Zusammenhang wird vermutet, weil LmbC mit As-aktivierenden Domänen mit dieser Funktion, wie sie in nicht-ribosomalen Pepidsynthetasen vorkommen, große Ähnlichkeit hat. Der weitere Ablauf dieser Transferreaktion (Zwischenakzeptoren und weitere evtl. beteiligte Proteine) sind noch unbekannt (vgl. Chung *et al.*, 1997). Die nach der Kondensation stattfindende *N*-Methylierung durch LmbJ verschiebt möglicherweise das Gleichgewicht der vorangegangenen Kondensation irreversibel zur Produktseite.

#### **Die Komplementation der *lmbY*-Insertionsmutanten ergab Hinweise auf polare Effekte und die Struktur der Transkriptionseinheit.**

Der Nachweis der Komplementation der gewonnenen *lmbY*-negativen Mutanten mittels der Plasmide pDNW27 (*lmbYX*) und pDNW28 (*lmbUYX*) gelang nicht. Hierbei erwies sich die zur Selektion notwendige Antibiotikakombination Ts/Am als hinderlich, da die Transformanten in Gegenwart dieser Hemmstoffe offenbar keine Produktionsphase für Lm erreichten. Das Wachstum der *S. lincolnensis* NRRL 2936-Derivate war dementsprechend stark verzögert und eine Ausbildung des Luftmyzels nicht zu beobachten. Auch eine spontan erzeugte *M. luteus* Ts<sup>R</sup>-Mutante (*M. luteus* DN218) als neuer Indikatorstamm konnte hier keinen Antibiotika-Produktionsnachweis vermitteln. Daher wurden die Genkassetten *lmbYX* bzw. *lmbUYX* aus pDNW27 und pDNW28 in pJOE837 umklontiert, so daß Plasmide (pDNW27J (*lmbYX*) und pDNW28J (*lmbUYX*)) entstanden, die auf der alternativen Antibiotikakombination Hy/Am selektioniert werden konnten. Nur die vollständige vermutete Transkriptionseinheit *lmbUYX* (pDNW28J) verlieh den Mutanten die Fähigkeit, wieder Lm zu synthetisieren. Auf den Phänotyp des Wildtyps wirkte sich dagegen keines der transformierten Plasmide aus. Diese Ergebnisse gaben einen klaren Hinweis auf die Struktur und Größe des Operons bzw. des *lmbY*-Transkripts: Das Ausbleiben der Lm-Produktion im Fall von pDNW27J konnte nur damit erklärt werden, daß die Gene *lmbY* und *lmbX* nicht exprimiert wurden, weil ein entsprechender Promotor zwischen *lmbU* und *lmbY* fehlte. Diese Vermutung läßt die Schlußfolgerung zu, daß stromaufwärts von *lmbU* ein Promotor lokalisiert sein mußte, der die Expression aller drei Gene *lmbUYX* regulierte. Ein polarer Effekt auf das Gen



**Abb. 4-2.** Das *lmb/lmr*-Gencluster im Bereich von *lmbY*. Die mit »2,6 kb Transkript« bezeichnete gezackte Linie markiert das *lmbUYX*-Operon. **P** markiert den Promotor stromaufwärts von *lmbU*. Die überlappenden Basen der Gene *lmbY* und *lmbX* (translationale Kopplung) sind unterhalb der Genpfeile verdeutlicht.

*lmbX* mußte angenommen werden, da dieser durch Überlappung des Startcodons (von *lmbX*) mit dem Stopcodon von *lmbY* translational koppelt (vgl. Abb. 4-2). Das Resistenzgen *lmrB* besitzt dagegen seinen eigenen Promotor (Zhang *et al.*, 1992; Zhang, 1993). Aus diesen Ergebnissen konnte auch geschlossen werden, daß *lmbX* entweder auch für die PPL-Biosynthese benötigt wird oder ein Ausfall des Gens keine Veränderung des Phänotyps verursacht. *lmbX* ist stark ähnlich zu einem Pyocyanin-Biosyntheseenzym in verschiedenen *Pseudomonas* sp. (z.B. *P. aeruginosa* PhzF; EMBL Zugangsnummer AF005404; 39 % identische und 57 % ähnliche Aminosäuren in einem Bereich von 53 Aminosäuren). PhzF aus *P. fluorescens* 2-79 (ähnlich PhzF aus *P. aeruginosa*; vgl. Abb. 4-3) ist zusammen mit PhzC, PhzD und PhzE, die Ähnlichkeiten zu Enzymen des Shikimat/Chorismat Metabolismus aufweisen, verantwortlich für die Biosynthese des Antibiotikums Phenazin-1-Carbonsäure (Mavrodi *et al.*, 1998). Daher ist es wahrscheinlich, daß *lmbX* ein PPL-Biosynthesegen ist. *lmbX*-ähnliche Gene kommen auch in *S. coelicolor* (StF55 Protein; 33 % identische und 119 % ähnliche Aminosäuren in einem Bereich von 272 Aminosäuren) und Cyanobakterium *Synechocystis* sp. (hypothetisches Protein; 42 % identische und 57 % ähnliche Aminosäuren in einem Bereich von 89 Aminosäuren) vor (nicht gezeigt).

#### **Stromaufwärts von *lmbU* wurde ein schwacher Promotor gefunden.**

Eine weitere Analyse der postulierten Transkriptionseinheit *lmbUYX* konnte durch »Northern« Analysen und/oder die Kartierung eines Promotors geschehen. Es erwies sich unter allen getesteten Bedingungen als nicht möglich, mit einer *lmbY* Sonde ein mRNA-Signal zu erhalten. Die Ursache hierfür ließ sich nicht eindeutig klären. Daher wurde der Bereich stromaufwärts von *lmbU* mit Hilfe des Xyle-Promotorprobesystems (vgl. Abschnitt

|         |   |
|---------|---|
| LmbXSli | MIVVPFEMVDMFAHEPFSGSQLTVVPDADGLTDAAMEALAREVNTPETAFVLPPADPGAT  |
| PhzFPae | M--HRYVVIDAFASEPLQGNPVAVFFDCDDLSGERMQRMAREMNLSESTFVLRPQQDGD-  |
| PhzFPfl | M--HNYVIIDAFASVPLEGNPVAVFFDADDLPPAQMQRIAREMNLSESTFVLKPRNGGD-  |
| PhzCPau | M--EHYVIIDAFASVPLEGNPVAVFFDADDLSAEQMQRAREMNLSETTFVLKPRNCGD-   |
|         | * : ::* ** *:.*. ::* .*.*. *: :***** .*:**** * : *            |
| LmbXSli | YRVRVFTLAGETPFGGHSSLGTAVTLVRLGRVAPGAVAQECGSRRLHSLSVGPKGTVTAE  |
| PhzFPae | ARIRIFTPVNELPFAGHPLLGTAIALG--AETDKDRLFLETRMGTVPFALERQDGKVVAC  |
| PhzFPfl | ALIRIFTPVNELPFAGHPLLGTAIALG--AHTDNHRLYLETQMGTIAFELERQNGSVIAA  |
| PhzCPau | ALIRIFTPVNELPFAGHPLLGTDIALG--ARTDNHRLFLETQMGTIAFELERQNGSVIAA  |
|         | :*:* ..* **.*. *** ::* ... : * .: : :.*.* *                   |
| LmbXSli | KPVEAREPDLRLLTAAAGVDPADVVEA--PVRTAGFGPAFHYLQVREGVVPGARADLELM  |
| PhzFPae | SMQQPIPTWEHF SRPAELLAALGLKGSTFPIEVYRNGPRHVFGLES--VAALSALHPDHR |
| PhzFPfl | SMDQPIPTWTALGRDAELLKALGISDSTFPIEYHNGPRHVFGVGLPS--IDALSALHPDHR |
| PhzCPau | SMDQPIPTWTALGRDAELLKALGISDSTFPIEYHNGPRHVFGVGLPS--IAALSALHPDHR |
|         | . :. . : * : . .: : *:. ** . : : . : . : . :                  |
| LmbXSli | ARRDLPDVMVFSWDPRTRQATARVFAPGYGMPEDPACASNALGLGEWLVAAGRLPAADGT  |
| PhzFPae | ALCDFPDLAVNCFAGAGRHRWSRMFSPAYGVVEDAATGSAAGPLAIHLARHRQIPYGQ-Q  |
| PhzFPfl | ALSNFHDMAINCFAGAGRRWSRMFSPAYGVVEDAATGSAAGPLAIHLARHGQIEFGQ-P   |
| PhzCPau | ALYSFHDMAINCFAGAGRRWSRMFSPAYGVVEDAATGSAAGPLAIHLARHGQIEFGQ-Q   |
|         | * .: * : : .: * : :*:*:*.** :*. * * * . * . : : . :           |
| LmbXSli | YEYLIRQVGSPRVGTVECSVTVDSGCAVRASATGSVVPVARGEFLGPDLATAVASV      |
| PhzFPae | IEILQGVEIGRPSRMYARAEGAGERVSAVEVSGNG--AAFAEGRAYL-----          |
| PhzFPfl | VEILQGVEIGRPSLMFAKAEGRAEQLTRVEVSGNG--VTFGRGTIVL-----          |
| PhzCPau | IEILQGVEIGRPSLMFARAEGRADQLTRVEVSGNG--ITFGRGTIVL-----          |
|         | * * :* * .... : *..*..* ....* *                               |

**Abb. 4-3.** Vergleich der As-Sequenz von LmbX (*S. lincolnensis*) mit den Sequenzen von PhzF (*Pseudomonas aeruginosa*), PhzF (*Pseudomonas fluorescens*) und PhzC (*Pseudomonas aurofaciens*). [\*], identische As; [:], sehr ähnliche As; [.] , weitgehend ähnliche As.

2.2.25) analysiert. Der Einsatz zweier DNA-Fragmente grenzte die gefundene Promotoraktivität auf einen DNA-Abschnitt zwischen -286 bp und -113 bp vor *lmbU* ein. Die dabei gemessenen Werte zeigten, daß es sich um einen sehr schwachen Promotor handelte, denn die Aktivität war nur siebenmal höher als diejenige in der Negativkontrolle. Der vergleichsweise

starke StrR-aktivierte Promotor *strB1p* aus *S. griseus* N2-3-11, der zur Kontrolle getestet wurde, induzierte die Transkription ca. 49mal stärker als *lmbUp*. Die schwache Aktivität des *lmbUp* könnte folgende Gründe haben:

- (1) Es ist möglich, daß *lmbUp* durch spezifische Faktoren, z.B. ein Aktivatorprotein, aktiviert werden muß und daß bei den Xyle-Tests nur die Basalaktivität gemessen wurde, weil die Aktivierung in *S. lividans* nicht stattfand.
- (2) Die Stabilität der mRNA war in *S. lividans* so gering, daß sie eine sehr kurze Halbwertszeit hatte.
- (3) Die Gene *lmbU*, *lmbY* und *lmbX* werden nicht stärker exprimiert und regulieren somit die PPL-Synthese durch die niedrige Kopienzahl ihrer entsprechenden Proteine.

### **LmbY wurde als His-tag-Fusionsprotein in *S. lividans* TK23 löslich produziert und gereinigt.**

Die heterologe Expression des *S. lincolnensis lmbY* Gens wurde bereits während der Diplomarbeit erfolgreich in *E. coli* und in *S. lividans* durchgeführt (Neußer, 1995). Es wurde aufgrund des Laufverhaltens (bei ca. 32,7 kDa) davon ausgegangen, daß es sich bei den zusätzlich produzierten Genprodukten (vgl. Abb. 3-20 A und B) um das gewünschte Protein LmbY handelte. Das Vorliegen des überexprimierten LmbY als unlösliche »inclusion bodies« in *E. coli* überraschte nicht, da viele andere Versuche zur Überproduktion von Streptomycetenproteinen in *E. coli* ähnliche Ergebnisse lieferten (z.B. LmbA aus *S. lincolnensis*, Schmidt (1994); StrQ aus *S. griseus*, Beyer (1996)). Dafür kann es eine Reihe von Gründen geben. Die heterolog produzierten Proteine werden zu schnell und in so großer Menge gebildet, so daß eine korrekte Proteinfaltung durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den vielen gleichen Proteinketten verhindert wird. Zusätzlich ist möglich, daß die zellulären Faltungsenzyme (Chaperone; z.B. SecB, GroES/GroEL oder DnaK), die der neu synthetisierten Polypeptidkette katalytisch die Möglichkeit verschaffen, sich zu falten, nicht auf die Struktur der Streptomycetenproteine angepaßt sind oder daß die Menge an Chaperonen für die große Anzahl der zu faltenden Proteine nicht ausreicht. Es ist auch nicht auszuschließen, daß die Chaperone nicht korrekt mit dem Translationsapparat interagieren können, da der hohe G+C-Gehalt der mRNA die Struktur des 70 S-Ribosoms verändern könnte. Hinzu kommen allgemeine chemisch-physikalische Unterschiede des Cytoplasmas in *E. coli* und Streptomyceten, die ebenfalls zu falschen Proteinfaltungen führen können.

Da die »inclusion bodies« aus *E. coli* nur unter Aufwand reaktiviert und gelöst werden können (Renaturierung mittels Harnstoff oder Detergenzien, etc.) und daher für Enzymtests unbrauchbar waren, mußten andere Expressionsmethoden angewandt werden. Es gelang nicht, lösliches LmbY-Protein zu erhalten, wenn die Anzucht der *E. coli*-Expressionsstämme bei niedrigeren Temperaturen (18, 25 oder 30 °C) stattfand, wie es z.B. bei StrQ aus *S. griseus* der Fall war (Beyer, 1996). Die Synthese von löslichem LmbY gelang erstmals in *S. lividans* TK23/pDNW2 (*lmbY*). Ob dieses Enzym in aktiver Form produziert wird, kann zukünftig nur mit einem Enzymtest oder mit einer geeigneten *S. lincolnensis-lmbY*-Mutante nachgewiesen werden. Um LmbY für einen Enzymtest zu reinigen, wurde versucht, eine His-tag-Version des Enzyms herzustellen. Es bot sich zunächst an, das DNA-Fragment aus pDNW16 zu verwenden – in welchem eine *E. coli*-RBS vor *his-tag•lmbY* positioniert war – und in den *E. coli*/Streptomycceten-Shuttlevektor pUWL201 umzuklonieren, aber das Ausbleiben der erwarteten Expression in einer Transformante von *S. lividans* könnte dadurch erklärt werden, daß die RBS nicht im optimalen Abstand zum Startcodon lag und keine geeignete Struktur besaß, um in *S. lividans* die Translation zu initiieren (vgl. Abb. 3-21 B). Deshalb wurde im Plasmid pDNW26RBSY die Region vor dem *lmbY* Startcodon an die optimalen Erfordernisse eines Streptomycceten-Translationsstarts angepasst, indem – wie in pDNW2 – die *lmbY*-eigene RBS verwendet wurde. Bei der Darstellung der Proteine LmbY und His-tag•LmbY in den zellfreien Extrakten durch eine PAGE konnte nur LmbY wiedergefunden werden, da die zu erwartende Bande von His-tag•LmbY auf der Höhe von ca. 35 kDa durch ein anderes Protein überlagert wurde (vgl. Abb. 3-22). Erst durch die Entfernung von 96 - 98 % unspezifischer Proteine und anschließender »Western« Analyse konnte erkannt werden, daß His-tag•LmbY produziert wurde und daß die Expression durch pDNW26RBSY (*his-tag•lmbY*) schwächer war als die durch pDNW2 (*lmbY*).

In einer Proteomanalyse der Gesamtzellextrakte von *S. lividans* TK23/pUWL201 (Nullkontrolle) und *S. lividans* TK23/pDNW2 (LmbY) konnte das rekombinant produzierte Protein LmbY nachgewiesen werden. Die berechnete molekulare Masse wich um 0,3 % von dem experimentellen Ergebnis ab (32,5 kDa). Der experimentelle Wert für den IP (5,4) hatte jedoch einen um 8,8 % niedrigeren Wert als der berechnete IP (5,92). Diese relativ hohe Abweichung auf der *x*-Achse könnte durch verschiedene Faktoren begründet sein. Es fehlte ein Standard, der das Laufverhalten der nach dem IP aufgetrennten Proteine meßbar gemacht hätte. Auch traten offenbar Artefakte auf, die u.a. durch hohe Salzkonzentration in den aufgetragenen Extrakten verursacht wurden. Es konnten nur ca. 60 - 75 % der Proteinflecken auf beiden Gelen wiedergefunden werden. Diese vergleichbaren Flecken wiesen zum Teil

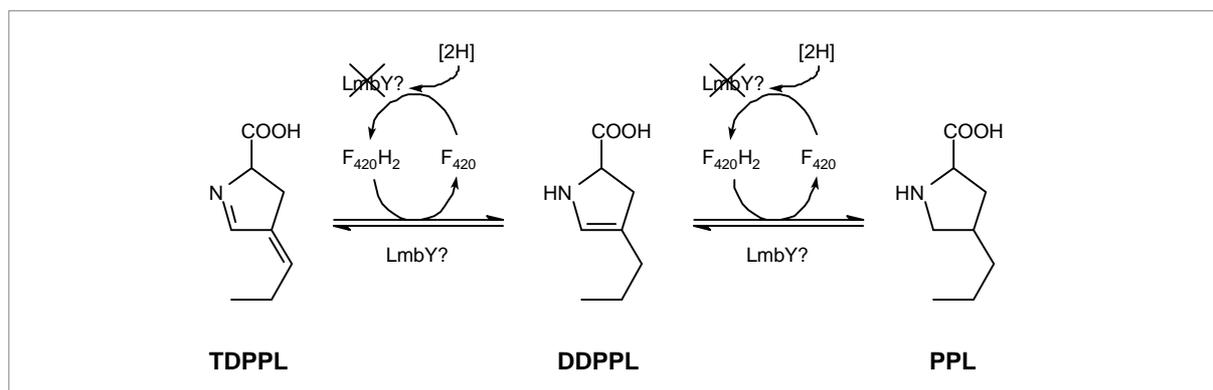
Wanderungsunterschiede auf, die dadurch begründet werden konnten, daß sich die Zellen in unterschiedlicher Wachstumsphase befanden. Hinzu kommt noch, daß Streptomyceten starke zelleigene Proteaseaktivitäten besitzen, die besonders große und basische Proteine schnell abzubauen vermögen (M. Haase, persönliche Mitteilung). Für die Proteomanalyse von *Streptomyces*-Stämmen muß deshalb eine Protease-unterdrückende Aufschlußmethode weiter optimiert werden.

### **LmbY ist ein PPL-Biosyntheseenzym, aber keine NADPH:F<sub>420</sub>-Reduktase**

Das ursprüngliche Postulat von Peschke *et al.* (1995), welches LmbY u.a. die NADPH-abhängige F<sub>420</sub>-Reduktase-Funktion zuordnete, die von Eker *et al.* (1989) in *S. griseus* nachgewiesen wurde, sollte mit Hilfe der *lmbY*-Mutanten geprüft werden. Eker *et al.* hatten die in *S. griseus* gefundene 8-Hydroxy-5-deazaflavin:NADPH Oxidoreduktase mit einer molekularen Masse von 42 kDa (vermutlich bestehend aus zwei Untereinheiten) gereinigt und damit 7 von 11 untersuchten Substraten, darunter F<sub>420</sub>(H<sub>2</sub>) und F<sub>0</sub>(H<sub>2</sub>) mit NADPH bzw. NADP als Cofaktoren, umgesetzt. Das pH-Optimum betrug für die Reduktion der beiden Substrate mit den niedrigsten  $K_M$ -Werten (F<sub>420</sub>,  $K_M$ -Wert = 3,4 µM bzw. F<sub>0</sub>,  $K_M$ -Wert = 5,7 µM) 5,9 und für die Rückreaktion 7,9. Jedoch haben offenbar nicht alle Streptomyceten ein F<sub>420</sub>-abhängiges Redoxsystem, da einige getestete Stämme keinen F<sub>0</sub>-Anteil als Abbauprodukt bilden (Kuo *et al.*, 1989; Coats *et al.*, 1989; Le Van *et al.*, 1985). Für den Aufbau eines Testsystems für LmbY wurde zunächst mit den Versuchsbedingungen von Eker *et al.* (1989) eine F<sub>420</sub>-reduzierende Aktivität nachgewiesen. In *S. lincolnensis* NRRL 2936, *S. lincolnensis* Mutante 1, -2, -4, -7, -9, *S. griseus* N2-3-11, *S. lividans* TK23/pUWL201, *S. lividans* TK23/pDNW2 und *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY konnte jeweils eine NADPH-abhängige Entfärbung des eingesetzten Coenzym F<sub>420</sub> nachgewiesen werden.

Es gab daher mehrere Hinweise, daß LmbY ein für die PPL-Biosynthese spezifisches (F<sub>420</sub>-abhängiges) Enzym war und keine NADPH:F<sub>420</sub>-Reduktase darstellte:

- (1) Die *S. lincolnensis*-Mutanten mit LmbY<sup>-</sup>-Phänotyp zeigten immer noch NADPH:F<sub>420</sub>-Reduktaseaktivität.
- (2) Die Extrakte von *S. lividans* TK23/pDNW2 und *S. lividans* TK23/pDNW26RBSY zeigten keine Steigerung der Reduktaseaktivität gegenüber den anderen Streptomycetenextrakten.
- (3) Die LmbY<sup>-</sup> *S. lincolnensis*-Mutanten konnten mit PPL komplementiert werden.



**Abb. 4-4.** Postulierte Funktionen von *LmbY* (Peschke *et al.*, 1995). In dieser Arbeit konnte ausgeschlossen werden, daß *LmbY* eine NADPH: $F_{420}$ -Reduktase ist. Eine Beteiligung von *LmbY* an einer oder beiden dargestellten Reaktionen konnte nicht nachgewiesen werden. TDPPL, 1,2,3,6-Tetrahydropropylprolin; DDPPL, 2,3-Didehydropropylprolin; PPL, Propylprolin.

- (4) Das LCF-synthetisierende Enzym, welches in der *S. lincolnensis*-Mutante NTG-3 von Coats *et al.* (1988) ausgefallen war, gehörte nicht zum Enzympool der *Lm*-Biosynthese.  $F_{420}$  (= LCF-Derivat) war aber direkt an der Reduktion von TDPPL (vgl. Abb. 4-4) beteiligt, und ein Fehlen des Cofaktors äußerte sich durch Ausbleiben der PPL-Synthese in *S. lincolnensis* NTG-3.

Es gab mehrere Ansätze, die Funktion von *LmbY* zu testen. Das vermutete Substrat, d.h. TDPPL oder DDPPL könnte (a) auf klassischem organisch-chemischem Weg hergestellt werden. Zudem bestand die Möglichkeit (b) durch Anzucht der *lmbY*-Mutanten die angehäuften Produkte für eine Umsetzung mit *LmbY* zu isolieren (s.u.). Unter den Voraussetzungen, daß die durch *LmbY* katalysierte reversible Reaktion im Gleichgewicht eine deutliche Konzentration Edukt zurückließ und PPL das Produkt war (vgl. Abb. 4-4), sollte es möglich gewesen sein, (c) die Rückreaktionen von PPL in Richtung TDPPL zu messen. Da PPL zur Verfügung stand, konnte Möglichkeit (c) untersucht werden. Der *LmbY*-enthaltende *S. lividans* TK23/pDNW2 (*lmbY*)-Extrakt zeigte aber keinerlei  $F_{420}$ -umsetzende Eigenschaften, wenn PPL zum Reaktionsansatz gegeben wurde. Anstatt  $F_{420}$  wurden auch andere Cofaktoren wie NAD oder NADP getestet, die aber nicht reduziert wurden. Für diese Ergebnisse fanden sich mehrere Erklärungen:

- Das Gleichgewicht der Reaktion lag stark auf der Seite der reduzierten Produkte DDPPL und PPL.
- PPL war kein Substrat von *LmbY*, weil dieses Enzym nur die Oxidoreduktase-Reaktion zwischen TDPPL und DDPPL katalysierte.

**Tab. 4-1.**  $R_f$ -Werte relevanter  $^{14}\text{C}$ -markierter Substanzen. Verschiedene *S. lincolnensis*-Anzuchten wurden unter Zugabe von L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Tyrosin kultiviert und anschließend dünn-schichtchromatographisch untersucht. Radioaktive Anhäufungsprodukte wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht (vgl. Abb. 3-29).

| Mutante                          | vermuteter Phänotyp                   | Signal bei $R_f$ -Wert von |
|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 | –                                     | 0,75                       |
| <i>S. lincolnensis</i> Mu2       | LmbY <sup>-</sup> , LmbX <sup>-</sup> | 0,26                       |
| <i>S. lincolnensis</i> Mu4       | LmbX <sup>-</sup>                     | 0,26                       |
| <i>S. lincolnensis</i> Mu9       | LmbY <sup>-</sup>                     | 0,30                       |

- Die Enzymtestbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Puffer, etc.) waren nicht geeignet.
- LmbY verwendet weder  $\text{F}_{420}(\text{H}_2)$  noch NAD(H) oder NADP(H) als Cofaktor.

Die oben angesprochene Möglichkeit (b), das Substrat von LmbY aus den *lmbY*-Mutanten zu isolieren, war z.B. nach  $^{14}\text{C}$ -Markierung möglich. *S. lincolnensis* NRRL 2936, die *S. lincolnensis*-Mutanten 2, 4, 9 und S wurden in Anlehnung an die von Witz *et al.* (1971) praktizierte Methode in L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Tyrosin-versetztem Medium angezogen und sowohl das Medium, als auch die Zellen dünn-schichtchromatographisch untersucht. Die  $R_f$ -Werte der radioaktiven Substanzen wurden mit denen der Standardsubstanzen verglichen (vgl. Abb. 3-29).

Interessant waren die Substanzen mit einem  $R_f$ -Wert von 0,26, die bei den Mutanten 2 und 4 gebildet wurden (vgl. Tab. 4-1). Das Laufverhalten dieser Substanz mit einem  $R_f$ -Wert, der zwischen denen von Tyrosin (0,14) und PPL (0,37) lag, könnte unter anderem das angehäuften Substrat von LmbY sein. Da in diesen Mutanten (LmbY<sup>-</sup>X<sup>-</sup>) evtl. jedoch auch das mögliche PPL-Biosynthesenzym LmbX ausgefallen war (s. oben), war es auch möglich, daß es sich bei diesen Mutanten um das Substrat von LmbX handelte, das dann noch vor LmbY in der Synthesefolge der PPL-Untereinheit benutzt wurde. Dieser Fleck (0,26) war beim Wildtyp und bei der Mutante 9 und S nicht zu beobachten. Der Wildtyp produzierte stattdessen das zu erwartende Lm A ( $R_f$ -Wert = 0,75). Die Mutante 9 (LmbY<sup>-</sup>), die evtl. *lmbX* noch exprimierte (s. oben), produzierte die Substanz mit dem  $R_f$ -Wert von 0,26 nicht. Diese Tatsache könnte als eine Bestätigung dieser Vermutung interpretiert werden. Ein weiteres Signal, welches dann möglicherweise dem Substrat von LmbY entspräche, war nur sehr schwach ausgebildet und hatte einen  $R_f$ -Wert von 0,30 (vgl. Abb. 3-29, Tab. 4-1).

Diese Versuche sind als Vorversuche für zukünftige Untersuchungen zu werten und bedürfen einer erheblichen Optimierungsarbeit, um eindeutige zuzuordnende Meßergebnisse und Zwischenprodukte zu erzielen.

## 5 Literatur

- ALTENBUCHNER J (1988) A new *E. coli* cloning vector containing a melanin marker for insertion screening. *Nucleic Acids Res* 16: 8710
- ARGOUEDELIS AD, COATS JH (1973) Process for producing lincomycin. US Pat 3,726,766
- ARGOUEDELIS AD, EBLE TE, FOX JA, MASON DJ (1969) Studies on the biosynthesis of lincomycin. IV. The origin of methyl groups. *Biochemistry* 8: 3408~3411
- ARGOUEDELIS AD, EBLE TE, MASON DJ (1970) Effect of methionine on fermentations of *S. lincolnensis*. *J Antibiot* 23: 1~8
- ARGOUEDELIS AD, FOX JA, MASON DJ, EBLE TE (1964) New lincomycin related antibiotics. *J Am Chem Soc* 86: 5044~5045
- ARGOUEDELIS AD, JOHNSON LE, PYKE TR (1973) Effect of methylation inhibitors on fermentations of *S. lincolnensis* - production of *N*-demethylincomycin. *J Antibiot* 26: 429~436
- BABCOCK MJ, KENDRICK KE (1988) Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 170: 2802~2808
- BATTEIGER B, NEWHALL WJ 5TH, JONES RB (1982) The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immunol Meth* 55: 297~307
- BEHRMANN I, HILLEMANN D, PÜHLER A, STRAUCH E, WOHLLEBEN W (1990) Overexpression of a *Streptomyces viridochromogenes* gene *glnII* encoding a glutamine synthetase similar to those of eucaryotes confers resistance against the antibiotic phosphinothricyl-alanyl-alanine. *J Bacteriol* 172: 5326~5334
- BERGY E, HERR RR, MASON DJ (1963) Antibiotic lincolnensin and method of production. US Pat 3,086,912
- BEYER S (1996) Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von 5'-Hydroxystreptomycin in *Streptomyces glaucescens* GLA.0. Dissertation, BUGH Wuppertal
- BIBIKOVA MV, SINGAL EM, IVANITSKAJA LP, ZDANOVICH IV (1989) Production of

- lincomycin by *Micromonospora halophytica* culture. *Antibiot Kimioter* 34: 723~726
- BIRNBOIM C, DOLY J (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7: 1513~1523
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248~254
- BRAHME NM, GONZALEZ JE, ROLLS JR, HESSLER EJ, MIZSAK S, HURLEY LH (1984a) Biosynthesis of the lincomycins. 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycin A and B. *J Am Chem Soc* 106: 7873~7878
- BRAHME NM, GONZALEZ JE, ROLLS JR, HESSLER EJ, MIZSAK S, HURLEY LH (1984b) Biosynthesis of the lincomycins. 2. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of Methylthiolincosaminide moiety of lincomycin A. *J Am Chem Soc* 106: 7878~7883
- CHATER KF, BRUTON CJ (1985) Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. *EMBO J* 4: 1893~1897
- CHOMCZYNSKI P (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* 201: 134~139
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 162:156~159
- CHUNG ST, CROSE LL (1990) Transposon Tn4556-mediated DNA insertion and site-directed mutagenesis. In: HESLOT H, DAVIES J, FLORENT J, BOBICHON L, DURAND G, PENASSE L (EDS.) *Proceedings GIM 1990*. Vol. I, pp. 207~218, Société Française de Microbiologie, Paris
- CHUNG ST, MANIS JJ, MCWETHY SJ, PATTE, WITZ DF, WOLF HJ, WOVCHA MG (1997) Fermentation, biosynthesis, and molecular genetics of lincomycin. In: STROHL W R (ED.) *Biotechnology of Antibiotics*. 2<sup>nd</sup> edition, pp. 207~218, Marcel Dekker, New York
- COATS JH, LI GP, KUO M-ST, YUREK DA (1989) Discovery, production, and biological assays of an unusual flavenoid cofactor involved in lincomycin biosynthesis. *J Antibiot* 3: 472~474
- COX KL, FISHMAN SE, LARSON JL, STANZAK R, REYNOLDS PA, YEH WK, VAN FRANK RM, BIRMINGHAM VA, HERSHBERGER CL, SENO ET (1985)

- Cloning and characterization of genes involved in tyrosin biosynthesis. In: ALACEVIC M, HRANUELI D, TOMAN Z (EDS.) Genetics of Industrial Microorganisms *Proceedings*. Part B (1987) pp. 337~346, Split, Yugoslavia
- CUNDLIFFE E (1989) How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* 43: 207~233
- CUNDLIFFE E (1990) Recognition sites for antibiotics within rRNA. In: HILL WE, DAHLBERG A, GARRETT RA, MOORE PB, SCHLESSINGER D, WARNER JR (EDS.) The Ribosome. Structure, Function, and Evolution. American Society for Microbiology, pp. 479~490, Washington, DC
- DEWIT LEA, EKER APM (1987) 8-Hydroxy-5-deazaflavin-dependent electron transfer in the extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. *FEMS Microbiol Lett* 48: 121~125
- DISTLER J, KLIER K, PIENDL W, WERBITZKI O, BÖCK A, KRESZE G, PIEPERSBERG W (1985) Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* I: Characterization of streptomycin-idiotrophic mutants. *FEMS Microbiol Lett* 30: 145~150
- EIRICH LD, DUGGER RS (1984) Purification and properties of an F<sub>420</sub>-dependent NADP reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochim Biophys Acta* 802: 454~458
- EKER APM, HESSELS JKC, MEERWALDT R (1989) Characterization of an 8-hydroxy-5-deazaflavin:NADPH oxidoreductase from *Streptomyces griseus*. *Biochim Biophys Acta* 990: 80~86
- EKER APM, POL A, VAN DER MEYDEN P, VOGELS GD (1980) Purification and properties of 8-hydroxy-5-deazaflavin derivatives from *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol Lett* 8: 161~166
- ENQUIST LW, BRADLEY SG (1971) Characterization of deoxyribonucleotide acid from *Streptomyces venezuelae* species. *Develop Ind Microbiol* 12: 225~236
- FEINBERG AP, VOGELSTEIN B (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6~13
- FIERRO JF, HARDISSON C, SALAS JA (1988) Involvement of cell impermeability in resistance to macrolides in some producer streptomycetes. *J Antibiot* 41: 142~144
- GATIGNOL A, DURAND H, TIRABY G (1988) Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett* 230: 171~175
- GÖRG A (1997) Two-dimensional Electrophoresis of Proteins using

- Immobilized pH Gradients - A laboratory manual, Technical University of Munich
- GOLD L, STORMO G (1987) Translational Initiation. In: NEIDHARDT F C (ED.) *Escherichia coli* and *Samonella typhimurium*. American Society for Microbiology, pp. 1302~1307, Washington DC
- GRÄFE U (1992) Biochemie der Antibiotika. Struktur - Biosynthese - Wirkmechanismus. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin - New York
- HANAHAH D (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557~580
- HARAYAMA S, REKIK M (1989) Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. J Biol Chem 264: 15328~15333
- HENIKOFF S, HENIKOFF JG (1991) Automated assembly of protein blocks for database searching. Nucleic Acids Res 19: 6565~6572
- HOEKSEMA H (1968) Celesticetin V. The structure of celesticetin. J Am Chem Soc 90: 755~757
- HOEKSEMA H, CRUM GF, DEVRIES WH (1955) Isolation and purification of celesticetin. Antibiot Ann 2: 837~841
- HOLMES DS, QUIGLEY M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analyt Biochem 114: 193~197
- HOPWOOD DA, BIBB MJ, CHATER KF, KIESER T, BRUTON CJ, KIESER HM, LYDIATE DJ, SMITH CP, WARD JM, SCHREMPF H (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich
- INGRAM C, BRAWNER M, YOUNGMAN P, WESTPHELING J (1989) XylE functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: use for the study of *galp1*, a catabolite-controlled promoter. J Bacteriol 171: 6617~6624.
- JAENCHEN R, SCHÖNHEIT P, THAUER RK (1984) Studies on the biosynthesis of coenzyme F<sub>420</sub> in methanogenic bacteria. Arch Microbiol 137: 362~365
- KABISCH M, FORTNAGEL P (1990) Nucleotide sequence of the metapyrocatechase II (catechol-2,3-oxygenase II) gene *mpcII* from *Alcaligenes eutrophus* JMP 222. Nucleic Acids Res 18: 5543~5543
- KATZ L, DONADIO S (1992) Macrolides. In: VINING L, STUTTARD C (EDS.) Biochemistry and Genetics of Antibiotic biosynthesis. (1994) Newton, Butterworth-Heinemann

- KIESER H, KIESER T, HOPWOOD DA (1992) A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J Bacteriol* 174: 5496~5507
- KÜTTLER T (1990) Pharmakologie und Toxikologie. 13. Auflage, Exa-med-Kurzlehrbuch, Jungjohann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm
- KUNOW J, SCHWÖRER B, STETTER KO, THAUER R K (1993) A  $F_{420}$ -dependent NADP reductase in the extremely thermophilic sulfate-reducing *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch Microbiol* 160: 199~205
- KUO M-ST, YUREK DA, COATS JH, CHUNG ST, LI GP (1992) Isolation and identification of 3-propylidene-<sup>1</sup>-pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *J Antibiot* 45: 1773~1777
- KUO M-ST, YUREK DA, COATS JH, LI GP (1989) Isolation and identification of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin, an unusual cosynthetic factor in Streptomyces, from *Streptomyces lincolnensis*. *J Antibiot* 3: 475~478
- KUTZNER JH, KROPFENSTEDT MR, KORNWENDISCH F (1984) Methoden zur Untersuchung von Streptomyces und einigen anderen Actinomyceten. Labormanual DSM
- LACALLE RA, PULIDO D, VARA J, ZALACAIN M, JIMINEZ A (1989) Molecular analysis of the *pac* gene encoding a puromycin *N*-acetyl transferase from *Streptomyces alboniger*. *Gene* 79: 375~380
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 309: 462~464
- LEBLOND P, REDENBACH M, CULLUM J (1993) Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 175: 3422~3429
- LE VAN Q, SCHWARZKOPF B, BACHER A, KELLER PJ, LEE S, FLOSS HG (1985) Biosynthesis of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin, the chromophoric moiety of coenzyme  $F_{420}$ . *J Am Chem Soc* 107: 8300~8301
- MARTIN JF, LIRAS P (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann Rev Microbiol* 43: 173~206
- MAVRODI DV, KSENZENKO VN, BONSALE RF, COOK RJ, BORONIN AM, THOMASHOW LS (1998) A Seven-Gene Locus for Synthesis of Phenazine-1-Carboxylic Acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol* 180: 2541~2548

- MCDOWALL KJ, DOYLE D, BUTLER MJ, BINNIE C, WARREN M, HUNTER IS (1991) Molecular genetics of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus*. In: BAUMBERG S, KRÜGEL H, NOVAK D (EDS.) Genetics and product formation in *Streptomyces*. pp. 105~116, Plenum press, New York
- MERRIL CR (1990) Gel-staining techniques. Meth Enzymol 182: 477~488
- MICHALIK J, EMILIANOWCZ-CZERSKA W, SWITALSKI L, RACZYNSKA-BOJANOWSKA K (1975) Monophenol monooxygenase and lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. Antimicrob Agents Chemother 8: 526~531
- MILLER JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- MUTH G, WOHLLEBEN W, PÜHLER A (1988) The minimal replicon of the *Streptomyces ghanaensis* plasmid pSG5 identified by subcloning and Tn5 mutagenesis. Mol Gen Genet 211: 424~429
- NEAL RJ, CHATER KF (1987) Nucleotide sequence analysis reveals similarities between proteins determining methlenomycin A-resistance in *Streptomyces* and tetracycline resistance in eubacteria. Gene 58: 229~241
- NEUSSER D (1995) Lincomycin-Biosynthese in *Streptomyces lincolnensis* 78-11 – Analyse des Biosynthesegens *lmbY*. Diplomarbeit, BUGH Wuppertal
- NEUSSER D, SCHMIDT H, SPIZÈK J, NOVOTNÀ J, PESCHKE U, KASCHABECK S, TICHY P, PIEPERSBERG W (1998) The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. Arch Microbiol 169: 322~332
- NOZAKI M (1979) Oxygenases and dioxygenases. Top Curr Chem 78: 145~186
- O'HARA K, KANDA T, OHMIYA K, EBISU T, KONO M (1989) Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of *Escherichia coli* that is highly resistant to erythromycin. Antimicrob Agents Chemother 33: 1354~1357
- OH S-H, CHATER KF (1997) Denaturation of Circular or Linear DNA Facilitates Targeted Integrative Transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): Possible Relevance to Other Organisms. J Bacteriol 179: 122~127
- OHNUKI T, IMANAKA T, KATOH T, AIBA S (1985) Molecular cloning of tetracycline resistance genes from *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces griseus* and characterization

- of the cloned genes. *J Bacteriol* 161: 1010~1016
- OMURA S (1992) The expand horizon for microbial metabolites - a review. *Gene* 115: 141~149.
- PATTERSON EL, Hash JH, Lincks M, Miller PA, Bohonos N (1964) Ethylation: biological formation of an S-ethyl homolog of lincomycin. *Science* 146: 1691~1692
- PEARSON WR, LIPMAN DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci* 85 (8): 2444~2448
- PECK MW, ARCHER DB (1987) Improved assay of coenzyme F<sub>420</sub> analogues from Methanogenic Bacteria. *Biotech Tech* 4: 279~284
- PECZYNSKA-CZOCZ W, MORDARSKI M (1988) Actinomycete enzymes. In: GOODFELLOW M, WILLIAMS ST, MORDARSKI M (EDS.) *Actinomycetes in Biotechnology*. pp. 219~283, Academic Press, London
- PERNODET JL, BOCCARD F, ALEGRE MT, BLONDELET-ROUAULT MH, GUÉRINEAU M (1988) Resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics due to a mutation in a rRNA operon of *Streptomyces ambofaciens*. *EMBO* 7: 277~282
- PESCHKE U, SCHMIDT H, ZHANG HZ, PIEPERSBERG W (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* 16: 1137~1156
- PIENDL W, BÖCK A, CUNDLIFFE E (1984) Involvement of 16S ribosomal RNA in resistance of the aminoglycoside-producers *Streptomyces tenjimarinensis*, *Streptomyces tenebrarius* and *Micromonospora purpurea*. *Mol Gen Genet* 197: 24~29
- PIEPERSBERG W (1993) *Streptomyces* and *Corynebacteria*. In: REHM HJ, REED G, PÜHLER A, STADLER P (EDS.) *Biotechnology*. 2<sup>nd</sup> edition, Vol. I, pp. 433~468, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- PIEPERSBERG W, ZEEK A (1994) Mikrobieller Stoffwechsel. In: PRÄVE P, FAUST U, SITIG W, SUKATSCH DA (EDS.) *Handbuch der Biotechnologie*. 4. Auflage, S. 141~177, R. Oldenburg Verlag, München
- POSPIECH A, NEUMANN B (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *TIG* 11: 217~218
- QIAGEN GMBH (1997) *The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*, Third Edition (March 1997), pp. 66~67, Protocol 11: Batch purification under native conditions.

- REDENBACH M, KIESER HM, DENAPAITE D, EICHNER A, CULLUM J, KINASHI H, HOPWOOD DA (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol* 21(1): 77~96
- RETZLAFF L, DISTLER J (1995) The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol Microbiol* 18: 151~162
- RETZLAFF L, MAYER G, BEYER S, AHLERT J, VERSECK S, DISTLER J, PIEPERSBERG W (1993) Streptomycin production in streptomycetes: a progress report. In: HEGEMAN GD, BALTZ RH, SKATRUD PL (EDS.) *Industrial microorganisms - Basic and Applied Molecular Genetics*, pp. 183~194, American Society for Microbiology, Washington, DC
- SAIKI R, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS K B, HORN GT, EHRLICH HA, ARNHEIM N (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction sites of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350~1354
- SAMBROOK J, FRITCH EF, MANIATIS T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463~5467
- SCHÄGGER H, 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: 368~379
- SCHMIDT H (1994) *Lincomycin-Biosynthese in Streptomyces lincolnensis* 78-11. Analyse von zwölf Genen mit vermuteter Beteiligung an der Synthese der Propylprolinuntereinheit. Dissertation, BUGH Wuppertal
- SCHÖNHEIT P, KEWELOH H, THAUER RK (1981) Factor F<sub>420</sub> degradation in *Methanobacterium thermoautotrophicum* during exposure to oxygen. *FEMS Microbiol Lett* 12: 347~349
- SHINE J, DALGARNO L (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 1342~1346
- SKINNER RH, CUNDLIFFE E (1980) Resistance to the antibiotics viomycin and capreomycin in the *Streptomyces* species which produce them. *J Gen Microbiol* 120: 95~104
- SKINNER RH, CUNDLIFFE E, SCHMIDT FJ (1983) Site of action of a ribosomal RNA-methylase responsible for resistance to

- erythromycin and other antibiotics. *J Biol Chem* 258: 12702~12706
- STUDIER FW, ROSENBERG AH, DUNN JJ, DUBENDORFF JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 61~89
- SYKES RB, MATTHEW M (1976) The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2: 115~157
- TABOR S, RICHARDSON CC (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1074~1078
- THAMM S (1999) Genetische und biochemische Untersuchungen von StrR - dem »pathway«-spezifischen Transkriptionsaktivator von Genen der Streptomycin-Biosynthese in *Streptomyces griseus* N2-3-11. Dissertation, BUGH Wuppertal
- THOMPSON J, SKEGGS PA, CUNDLIFFE E (1985) Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to the aminoglycoside antibiotics gentamicin and kanamycin determined by DNA from the gentamicin-producer *Micromonospora purpurea*. *Mol Gen Genet* 201: 168~173
- VIEIRA J, MESSING J (1982) The pUC plasmids and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259~268
- VINING L, STUTTARD C (1994) *Biochemistry and Genetics of Antibiotic Biosynthesis*. Newton: Butterworth-Heinemann
- WAKSMAN SA, LECHEVALIER HA (EDS.) (1962) *The Actinomycetes*. Vol. I-III, 339 AL. Baltimore: Williams & Wilkins
- WALKER JE, SARASTE M, RUNSWICK MJ, GAY NJ (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: 945~951
- WALSH C (1978) Chemical approaches to the study of enzymes catalysing redox transformations. *Ann Rev Biochem* 46: 881~931
- WALSH C (1979) *Enzymatic reaction mechanisms*. W.H. Freeman & Comp., New York
- WEBER M, WIERMAN CK, HUTCHINSON RR (1985) Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythraeus*. *J Bacteriol* 164: 425~433
- WEHMEIER, UF (1991) Das *sor*-Operon aus *Klebsiella pneumoniae*. Molekulargenetische Analysen zur Struktur

- und Funktion der Gene und Genprodukte.  
Dissertation, Universität Osnabrück
- WEHMEIER, UF (1995) New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors allowing blue-white screening von Xgal plates. *Gene* 165: 149~150
- WEISBLUM B (1985) Inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity, and structural elements that regulate expression - a review. *J Antimicrob Chemother* 16 (Suppl. A): 63~90
- WILLIAMS ST, GOODFELLOW M, ALDERSON G (1989) Genus *Streptomyces*. Waksman und Henrici 1943, 339 AL. Baltimore. In: WILLIAMS ST, SHARPE ME, HOLT JG, MURRAY RGE, BRENNER DJ, KRIEG NR, MOULDER JM, PFENNIG N, SNEATH PHA, STALEY JT (EDS.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. IV, pp. 2452~2492, Williams & Wilkins
- WISE EM, ABOU-DONIA MM (1975) Sulfonamide resistance mechanisms in *Escherichia coli* R plasmids can determine sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2621~2625
- WITZ DF, HESSLER EJ, MILLER TL (1971) Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry* 10: 1128~1133
- ZHANG HZ (1993) Genetik und Biochemie der Lincomycin-Biosynthese in *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Klonierung und Analyse der Produktions- und Resistenzgene. Dissertation, BUGH Wuppertal
- ZHANG HZ, SCHMIDT H, PIEPERSBERG W (1992) Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* 6: 2147~2157

# Anhänge

| <i>Übersicht</i>  | <i>Seite</i> |
|---|--------------|
| <b>Anhang 1</b> DNA-Sequenzen .....   | 120          |
| Anhang 1-1. DNA-Sequenz im Bereich von <i>lmbAB1B2</i> . .....  | 120          |
| Anhang 1-2. DNA-Sequenz im Bereich von <i>lmbUYX</i> . .....  | 126          |
| <b>Anhang 2</b> Klonierungsstrategien .....   | 131          |
| Anhang 2-1. Konstruktion der <i>S. lincolnensis</i> 78-11 <i>lmbB1</i> - und <i>lmbB2</i> -<br>Expressionsplasmide pDNW13.1, pDNW13.2 und pDNW13.12. ....                     | 131          |
| Anhang 2-2. Konstruktion der <i>S. lincolnensis</i> 78-11 <i>lmbB1</i> - und <i>lmbB2</i> -<br>Expressionsplasmide pDNW14.1, pDNW14.2 und pDNW14.12. ....                     | 132          |
| Anhang 2-3. Konstruktion der <i>S. lincolnensis</i> 78-11 <i>lmbB1</i> - und <i>lmbB2</i> -<br>Expressionsplasmide pDNW15.1, pDNW15.2. ....                                   | 133          |
| Anhang 2-4. Konstruktion der <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 <i>lmbB1</i> - und <i>lmbB2</i> -<br>Expressionsplasmide pUWL201- <i>lmbB1</i> und pUWL201- <i>lmbB2</i> . .... | 134          |
| Anhang 2-5. Konstruktion der rekombinanten Plasmide pDNW25Z und pDNW25E. ....   | 135          |
| Anhang 2-6. Konstruktion des rekombinanten Plasmids pDNW26RBSY. ....  | 136          |
| Anhang 2-7. Konstruktion der rekombinanten Plasmide pDNW27, pDNW27J,<br>pDNW28 und pDNW28J. ....  | 137          |
| Anhang 2-8. Konstruktion der Promotortestplasmide pDNW31II, pDNW32II<br>und pDNW33II. ....  | 138          |
| <b>Anhang 3</b> Plasmidkarten.....  | 139          |
| pDNW1, pDNW1ΔK, pDNW2, pDNW2ΔK, pDNW3, pDNW13.1 .....   | 139          |
| pDNW13.2, pDNW13.12, pDNW14.1, pDNW14.2,<br>pDNW14.12, pET16B1/pDNW15.1 .....   | 140          |
| pET16B2/pDNW15.2, pET16B1B2, pDNW16, pDNW25E,<br>pDNW25Z, pDNW26RBSY .....  | 141          |
| pDNW27, pDNW27J, pDNW28, pDNW28J, pDNW31II, pDNW32II ..   | 142          |
| pDNW33II, pEFBA, pSZW755, pTU661-98 .....   | 143          |

## Anhang 1: DNA-Sequenzen

### Zeichenerklärungen

|                  |   |
|------------------|---|
| . und Zahlen     | Der dargestellte DNA-Bereich ist oberhalb der Sequenz durchnumeriert, unabhängig von den einzelnen Genen. Ein Punkt (.) alle 10 nt; alle 60 nt die entsprechende fortlaufende Zahl. |
| - <i>lmb</i> #-> | Gen <i>lmb</i> # beginnt am senkrechten Strich.   |
| - <i>lmb</i> #-> | Gen <i>lmb</i> # endet am senkrechten Strich.   |
| <- ICB (n nt) -> | Intercistronischer Bereich mit einer Länge von n Nukleotiden.   |
| *                | Stopcodon eines kodierenden Gens.   |

**Anhang 1-1.** DNA-Sequenz im Bereich von *lmbAB1B2*. Einige wichtige Erkennungsstellen von Restriktionsendonukleasen sind nur im Bereich von *lmbB1B2* eingetragen. Die Orientierung der einzelsträngig dargestellten Sequenz entspricht der in der Genbank (EMBL Zugangsnummer X79146). Die einzelnen As der kodierenden Proteine sind unter der Sequenz im Einbuchstabencode angegeben.

*lmbA*: 1806 bp; Genprodukt: 602 As; 63,4 kDa; pI = 5,71

*lmbB1*: 477 bp; Genprodukt: 159 As; 17,9 kDa; pI = 5,45

*lmbB2*: 954 bp; Genprodukt: 318 As; 34,9 kDa; pI = 7,78

```

          .           .           | -lmbA->           .           .           60
ACAACACAGTTATGGTGGTGGACGCATGCTTCCATCGAAGCCGGAGCTCAGTGGAAACAAT
          M L P S K P E L S G T I

          .           .           .           .           .           120
TGGCGCCGTTTCCGCCACGCATTGGCTGGCGTCCAATGCGGGCATGAGAATCCTTGAGAA
G A V S A T H W L A S N A G M R I L E N

          .           .           .           .           .           180
CGGAGGCAACGCCTTCGACGCCGCTGTCGCCCGGCTTCGTCCTCCAGGTCGTGGAACC
G G N A F D A A V A A G F V L Q V V E P

          .           .           .           .           .           240
CCACTTCAACGGGCGGGCGGCGACGTCTCCATCGGTGCGCACTGCCCGCCGGGCGCAGGA
H F N G P G G D V S I G R T A R R A Q D

          .           .           .           .           .           300
CGCCGCCGAGATCTGCGGCCAGGGCCCCATGCCCCGCGCCGCGACACCGCAAGCCTTCTC
A A E I C G Q G P M P R A A T P Q A F S

```

CGATCTCGGACTGGAGCACATCCCGGGCTCCGGTCTGCTGCCCCGCCTGTGTGCCCGGCGC  
D L G L E H I P G S G L L P A C V P G A

GTTCGGTGGCTGGCTGCGGTTGCTCGCGGAGTTCGGCACCCCTGCGCCTCGCGGACGTCCT  
F G G W L R L L A E F G T L R L A D V L

CGCACCGCCATCACCTACGCGGAAGAGGGCTATCCGCTGCTGCCGAGACCGCCCACGC  
A P A I T Y A E E G Y P L L P E T A H A

CGCCGATGTGCTCGCCCCGCTCTTCCGCACCGAGTGGACCGGTTCCGGGGCAGATCTACCT  
A D V L A P L F R T E W T G S G Q I Y L

GGCGAACGGCGCCGCCCGAAAAGCCGGTTCGCTTCCGCAACCCCGCGCGGCCAGAC  
A N G A A P K A G S R F R N P A R A Q T

CTACCGGCAGCTCCTCAAAGAGGCCGAGGCCGCGTCCGGCGACCGCGAGGCCAGATCGA  
Y R Q L L K E A E A A S A D R E A Q I E

GGCCGCGCACCCAGGCCTTCTACCAGGGCTTCTGCGCGGAGGCAGTCCAGCGCTTCTCGGA  
A A H Q A F Y Q G F C A E A V Q R F L D

CGGCGGGCCCCGGTTGGACGCCACCGGCGGGGCCACAGCGCGCTGCTGACCGCTGATGA  
G G P R L D A T G A G H S A L L T A D D

CCTGGCCGCCTGGACCCCGTCCGTGACCACGGCGACGTCCCGCCCCTACGGCGCCTACCG  
L A A W T P S V T T A T S R P Y G A Y R

CGTCCACAAGCCGGGACCTTGGTCCCAAGGCCCGGTCTTCTCCAGCAGTTGGCGCTCCT  
V H K P G P W S Q G P V F L Q Q L A L L

GGAGGGGTTTCGACCTCGCCGGCATGCGCCCCGACAGCGCCGACTACCTGCACACCGTGGT  
E G F D L A G M R P D S A A D Y L H T V V

GGAGTGCGCCAAGCTCGCCTTCGCGGACCGCGACGCTGGTACGGCGACCCGGCGTTTCC  
E C A K L A F A D R D A W Y G D P A F T

CGACATACCGCTGGCGGACCTGCTCAGCGACACTACACCCGCGAGCGGCGCCGCTGGT 1080  
D I P L A D L L S D D Y T R E R R R L V

GGGGCCCCGAGGCCGTCAACGAGCTGCAGCCCCGGCACTCCCGGCGGCCGCTCGTCGTGGCT 1140  
G P E A V N E L Q P G T P G G R S S W L

GCCGGGGCGGCGCCCGAGCCGGAGCCCGACCTCTCCGGCCACACGGACGAGTGGATGGG 1200  
P G A A P E P E P D L S G H T D E W M G

GCAGCTCCGCAACGGCCTGCCACCATCCTCAAGGCCACTACGGCCAAGGGCGACACCTG 1260  
Q L R N G L P T I L K A T T A K G D T C

CTGCGTCACCGTGACCGACCGGCACGGCAACACGGTGGCCGCGACAGCCAGCGGGCGGCTG 1320  
C V T V T D R H G N T V A A T A S G G W

GCTCAAGAGCTCGCCGGCCATCGCGGAGCTGGGCTTCCCGCTCGGCACCCGGGGCCAGAC 1380  
L K S S P A I A E L G F P L G T R G Q T

GATGTACCTGGCCGAGGGACACCCCAACTCCCTCGCCGGCGGCAAGCGCCCGCGCACCAC 1440  
M Y L A E G H P N S L A G G K R P R T T

GCTCAGCCCCACCGTGGTCCAGCGCGACGGGCAGCCCCACCTGGCGTTCGGCACTCCCGG 1500  
L S P T V V Q R D G Q P H L A F G T P G

CGGCGACCGGCAGGACCAGTGGACCCTCCAGTTCTTCCTCGGGGTCACCGCGTTCGGCCT 1560  
G D R Q D Q W T L Q F F L G V T A F G L

CGACCTACAGCGGCGACGGAGACCCCTCGCGTTCACACCGACCAGGTACCCGCCTCCTT 1620  
D L Q A A T E T L A F H T D Q V P A S F

CACGCCCCACAGTCGCGGCCCGGCGTAGTGGTGGTGGAGGAGAACTGCGCGGCCGCGAC 1680  
T P H Q S R P G V V V V E E N C A A A T

CGTGGCGGAGCTGACCCGCGCGGCCACCCGCTCGAGCGCGTGCCCGCCTACTCCCTTGG 1740  
V A E L T R R G H R V E R V P A Y S L G

```

. . . . . 1800
CCGAGTCTGCGCGACGGGTCTGGGCACGGACGGCCTCGTCCGCGCCGCCCGCTGCCCGCG
R V C A T G L G T D G L V R A A A C P R

. . . . . 1860
. . . -lmbA->| . . .
CGGCCCGCCAGCCCTACGCGATCTGCGGATGACGCCACGCCACACGCGCGAACCACCGGAG
G R Q P Y A I C G *

<- ICB (89 nt) -> . . . . . StuI
. . . . . | 1920
AGACGCCCCGACGTTCCCGTACTCCGACCCGCCCAAGCAACAGTGAGGGAGGCCTCC

|-lmbB1->. . . . . 1980
ATGCCGTGTCAGTAAAGTCAATGCCGCCCGTATCGGTGCACCATGTCGGTGTGCAGACCGCC
M P S V K S M P P V S V H H V G V Q T A

. . . . . KpnI EcoRI
. . . . . | . | . . . . . 2040
GATCTGGATAAATTCGATCTCCTGGTACCAGGAATTCCTCGGATGTACCGTTTCCTGGACC
D L D N S I S W Y Q E F F G C T V S W T

. . . . . 2100
CTCGACACATTCTCCGCACTCACCCACTCACGGCTTCCGGAATCGAGCGTCTCGCGGAG
L D T F S A L T H S R L P G I E R L A E

. . . . . 2160
CTGCGATACGGCGATGTGCGCTTCCACCACATCGGTGTGAAATCCGGTGCCGCGGAACGC
L R Y G D V R F H H I G V K S G A A E R

. . . . . 2220
TCTCCGCGCCGAGGCGAATCAGTTTCAGCACGTCTGCTTCGCGGTGGGCAGCCCCACGGAA
S P A E A N Q F Q H V C F A V G S P T E

. . . . . 2280
CTCGAAGCGTGGCGGTTCGCGCTGGCTGGAGCTGTACGCCCGTGGGCGCTGGACGTTTCGCC
L E A W R S R W L E L Y A R G R W T F A

. . . . . Sali
. . . . . | . . . . . 2340
GTGCCGAGCGGGCCACGGACATCGACGTCGACAAGGACGGCGTGCGGTCCTTCTACGCA
V P E R A T D I D V D K D G V R S F Y A

. . . . . -lmbB1->|
. . . . . |-lmbB2->
. . . . . 2400
CTCGACCCGAACGGCCTGGAGTACGAGTTACCTACGTTCCGGACGGCCCCCGATGAGTT
L D P N G L E Y E F T Y V P D G P R *
M S S

```

*Xho*I  
 |  
 CACTCGAGGCACGCCGACCCGACCCGACCTGCCCTGCCCGCGGCGGGCGACTGGG 2460  
 L E A R R T D R T D L P L P A A G D W E  
  
 AGTACGGCGGCTATCCCTACGGCCTGGAGCCGCTCACGCTGCCCTCGCCTCCCCGGCT 2520  
 Y G G Y P Y G L E P L T L P L A S P G S  
  
 CTTCCCCCGCCGCGCACCGCCGGTTCGGACGGTTCGCCGCGCCCTGGCCGGGCACCTGG 2580  
 S P A A H R V G R F P A A L A G H L A D  
  
*Sal*I  
 CGGACCCCGTCGCCGGAGTTCGCCGGAACGCCGCGGTGGACCTGACGGACCCGCTCGGGG 2640  
 P V A G V P G E N A A V D L T D P L G V  
  
 TCGACCGCCTCTTCTGGTTCGGCTGGATCACCGGCCACCAAGTCACCTTCGTACTCTGGC 2700  
 D R L F W F R W I T G H Q V T F V L W Q  
  
 AGTTACTGGCCTCGGTACTCGCCGAGAGCGCGGAGGGCCAGGCGGAGAGGCGGGGCGG 2760  
 L L A S V L A E S A E G P G G E A R A A  
  
 CGGAGCGGGCCCGCCGCTACGTGCGCGGCTACTCCCTGATGCTCCTGTACACCAGCTCCT 2820  
 E R A R R Y V R G Y S L M L L Y T S S C  
  
 GCCCGCGGTTCGGTGTACGACCCGGCTGATCCGGCCCCACCTGGCGCTCCAGCACCGGCACC 2880  
 P R S V Y D R L I R P H L A L Q H R H L  
  
*Sma*I  
 |  
 TCAGCGGCGCCTGGGCCCCGGGACTACCACCCGGTGCGGTTCGCTGCTGCGCGGCGCTCTGC 2940  
 S G A W A R D Y H P V R S L L R G R L P  
  
 CGGCCGGGCTCGACGACGCGCCGTTGCGCGAGGAGTGCCGGCTCAACCACCACGTCCACG 3000  
 A G L D D A P L R E E C R L N H H V H E  
  
 AGGGCATCGCCCAAGCTGGTGCCGTCCGGGGTCTCGCTGCTCCAGCAGACGAACCAGC 3060  
 G I A A K L V P S G V S L L Q Q T N Q H  
  
 ACCAGGAACAACGGTTCCTCCACCGCGACCGGCTCTCGTTCGCTGTACGACTGCGTCTTCC 3120  
 Q E Q R F L H R D R L S S L Y D C V F L

TCACCGTGCGGGCGCCCGCCTCGTACGAGCAGGTCGTCACCCAGCTGGTGCGACGCCTGC 3180  
T V R A P A S Y E Q V V T Q L V R R L H

ACGCCATCGGCCAGGACCTGGCGGCCAACGGGCTCTACCCCGCGTACGCGCCAGCGGCC 3240  
A I G Q D L A A N G L Y P A Y A P S G H

ACGAGGAGCCCGCCGAGCTGCGCGCCCCGGACGTGGCGCGGTGCAAGGAGACGCTTCTGC 3300  
E E P A E L R A P D V A R C K E T L L P

CGGACCTGTCCCGTATCTGCGACTCGGCCACCGCGGCGGCGAGTTGAGCCCGCGCGGGCC 3360  
D L S R I C D S A T A A A S \*

GGGCCCCGGGGCGCCCGGTCCGGGTCCGGCCCCGCCCGGGCCCCGGGCGGCCGGGGCGCGGCC 3420

CGCCCCGGGCCCGGGCGGCCCGGGGCGCGGCCCGCCCCGGGGCGCAGGGCTCACTCCCCGCGTG 3480

**Anhang 1-2.** DNA-Sequenz im Bereich von *lmbUYX*. Proteinsequenzen und einige wichtige Erkennungsstellen von Restriktionsendonukleasen sind im ganzen Bereich von *lmbUYX* eingetragen. Die DNA ist nach Interesse dargestellt (einzelsträngig und revers-komplementär in Bezug auf der in der Genbank (EMBL Zugangsnummer X79146) gespeicherten Sequenz).

*lmbU*: 672 bp; Genprodukt: 224 As; 25,3 kDa; pI = 8,93

*lmbY*: 888 bp; Genprodukt: 296 As; 32,4 kDa; pI = 5,71

*lmbX*: 891 bp; Genprodukt: 297 As; 30,7 kDa; pI = 4,79

```

                                SmaI
                                |
. . . . . | . . . . . 60
GAGCTTGCCCCGGATTTGTTCTAGGTAAACGCCCGGGCTCTCAAACAAGGTTAAAAACTT

. . . . . 120
CCACAGTACTGCCCCAAATGCACACATCCAGGCATAAGTGAGAAACGTAGCGGAAGGCAG

. . . . . 180
GGAACGTCATGCTCTAAAGATTTCGTCGCTCCGAAAGGAGGGCGTCTTGCGTGTTAATCGG

. . . . . 240
CCGTTGACATATGCTCATTTCACCTTGCGGAATGAAATGAGCCCAGCTGTTTGCCCGTTG

                                BamHI          BglII          BamHI
                                |              |              |
. . . . . | . . . . . | . . . . . 300
GGTTGCCGCTTTTGATGGTCCGGATCCGGCCGGTTTCAAGATCTCCAGGATCCCCCTGGAT

. . . . . 360
AATTAATTGACCGCCTCCTACACTCTGATCCGTAATTGATACATTGGCCGTTACATGTA

. . . . . 420
TCGGAGTTCCGAGGGGGGGCAATGATGCTGGTTCCGCCAAGCCATTCATGAGCTGCTCGC

                                ClaI
                                |
. . . . . | . . . . . 480
CTGCGCCGCCCTTCGTGGCGGTGGCGCGACATCGATGAGCGTGGTGGGCGCCGAACAACG

. . . . . 540
GGGGTGAATCGCTGCTTTCGATCCCCGTGTCCTGCTCGGTGACCCAAAGGCAAGAG

. . . . . 600
CGTGAGAAAGGGATGGCAGCCGCGTGGTGAGGTCGAATTTATCGGTTGCGGACAGGTGTG
V V R S N L S V A D R C G

```

660  
 GGACGTCGGCTGTGAACGGCCGGGTGAAAACGGGGGAGGATGGTGTACTTGTCACTCGCG  
 T S A V N G R V K T G E D G V L V T R V

NaeI  
 720  
 TCGGGCTCCGCATTCCGGCCGTACTGAATTTTCGACACCTGGGAACGCGCGGGCCGGCACA  
 G L R I P A V L N F D T W E R A G R H I

SmaI  
 780  
 TCGCCCGGGTCCGCGACTCATCGGCCTGGTGTCTGGGCGACTGGATCATCTACGGTCAGA  
 A R V A D S S A W C L G D W I I Y G Q T

KpnI  
 840  
 CCCGGTACAGCGACCGGTACCGCAGAGCGGTGGAGGCGCGCGGTCTGGACTACCAGACGA  
 R Y S D R Y R R A V E A A G L D Y Q T I

XhoI  
 900  
 TCCGCAACTACGCCTGGGTGGCACGGCGGTTTCGACCTCTCCCGCAGCGTGAGGCGCTCGA  
 R N Y A W V A R R F D L S R S V R R S S

960  
 GCTTCCAGCACCACGCCGAGGTGGCCGCGCTGCCGAGGAACAGCAGGACCACTGGCTGG  
 F Q H H A E V A A L P E E Q Q D H W L E

1020  
 AGCAGGCCGAGAGGCACGAGTGGTCCCACAACGAGCTGAGGCGCAACGTTCCGCGGGGCGC  
 Q A E R H E W S R N E L R R N V R G A R

1080  
 GGGGGCAGAAGAAGTCCGACACCGCCGGACGCGACGTTGTCACGCATCACCCCGAGGCCG  
 G Q K K S D T A G R D V V T H H P E A E

XhoI  
 1140  
 AACGTGTTCGAGCGGTGGCGGACCGCCGCGGAGCGCTCGGGCGCCTCCCTCGAGGAGTGG  
 R V E R W R T A A E R S G A S L E E W I

1200  
 TTTGCGCCCGGCTCGACTTCGCCGCGTCCGCTGGTTCTCCAGACGCAGGCGGAGGACGCC  
 C A R L D F A A S L V L Q T Q A E D A R

-lmbU->|  
 1260  
 GTCGTGAGGCCGGGGAGGCCGTCCGGGGCGCCTAACTCTGAGCCCCGCCCTGCCGCC  
 R E A G E A V G G A \*



2040  
 GCCGACTCCCGTCCCCCTGGTCAAGGACCAGGTGGCGGCGCTTCGAGCGGGCCTGCCACGAC  
 A D S V P L V K D Q V A A F E R A C H D

2100  
 GTCGGCCGCGACCCCGCCACCGTGC GGCGGCTTCTCGTCCCGGGCCCTCGATCGGCGGG  
 V G R D P A T V R R L L V A G P S I G G

NaeI  
 2160  
 GTGCTCGATTTCGGCCGGGGCCTTCCAAGACGCGGCCGGGCTGTTCGAAGACGCCGCGCATC  
 V L D S A G A F Q D A A G L F E D A G I

2220  
 AACGACTTCGTCGTCCTCACTGGCCCCGGCCGACTTCCCGTACCGGGGCAGCCCGGCGGT  
 N D F V V H W P R P D F P Y R G S P A V

2280  
 CTCGACGACATCGCGCCATCCTGCACAGCGCACCCGGAGGAAGCATGATCGTGGTCCCCT  
 L D D I A P I L H S A P E E A \*  
 M I V V P F

SalI  
 2340  
 TCGAGATGGTCGACATGTTTCGCCACGAGCCCTTCTCCGGCAGTCAGTTGACGGTGGTGC  
 E M V D M F A H E P F S G S Q L T V V P

NcoI  
 2400  
 CCGACCGGACGGGCTCACCACGCGGCCATGGAGGCCCTGGCACGGGAAGTGAACACAC  
 D A D G L T D A A M E A L A R E V N T P

2460  
 CTGAGACGGCGTTTCGTGCTGCCCCCTGCCGACCCCGGCGCCACCTATCGCGTACGTGTCT  
 E T A F V L P P A D P G A T Y R V R V F

KpnI  
 2520  
 TCACACTGGCCGGGAGACACCGTTCGGCGGTCATTCTCGCTGGGTACCGCCGTGACCC  
 T L A G E T P F G G H S S L G T A V T L

2580  
 TGGTACGGCTCGGCCGGGTTCGCGCCGGGCGCCGTCGCCCAGGAGTGC GGCTCCCGGCTGC  
 V R L G R V A P G A V A Q E C G S R L H

2640  
 ACTCGCTCTCCGTAGGACCCGGACAAGGGCACCGTCACGGCCGAGAAGCCCGTTCGAGGCGC  
 S L S V G P D K G T V T A E K P V E A R

. . . . . *SalI* . . . . . 2700  
 GCGAGCCCGACCTCCGCCTGCTGACGGCGGGCGGGCGTTCGACCCGGCGGACGTGGTTCG  
 E P D L R L L T A A A G V D P A D V V E

. . . . . 2760  
 AGGCACCTGTACGGACCGCCGGGTTTCGGGCCCGCGTTCCACTACCTCCAGGTACGCGAGG  
 A P V R T A G F G P A F H Y L Q V R E G

. . . . . 2820  
 GGGTGGTGCCTCCGGCGCGGGCCGACCTGGAAGTATGGCGCGGGCGGACCTTCCCAGACG  
 V V P G A R A D L E L M A R R D L P D V

. . . . . *BamHI* . . . . . *SmaI* . . . . . 2880  
 TGATGGTCTTCTCCTGGGATCCGCGGACGCGGCAGGCCACGGCCCGGGTCTTCGCGCCCGG  
 M V F S W D P R T R Q A T A R V F A P G

. . . . . *SphI* . . . . . 2940  
 GCTACGGCATGCCCGAGGACCCGGCCTGCGCCTCGAACGCCCTCGGCCTCGGCGAGTGGC  
 Y G M P E D P A C A S N A L G L G E W L

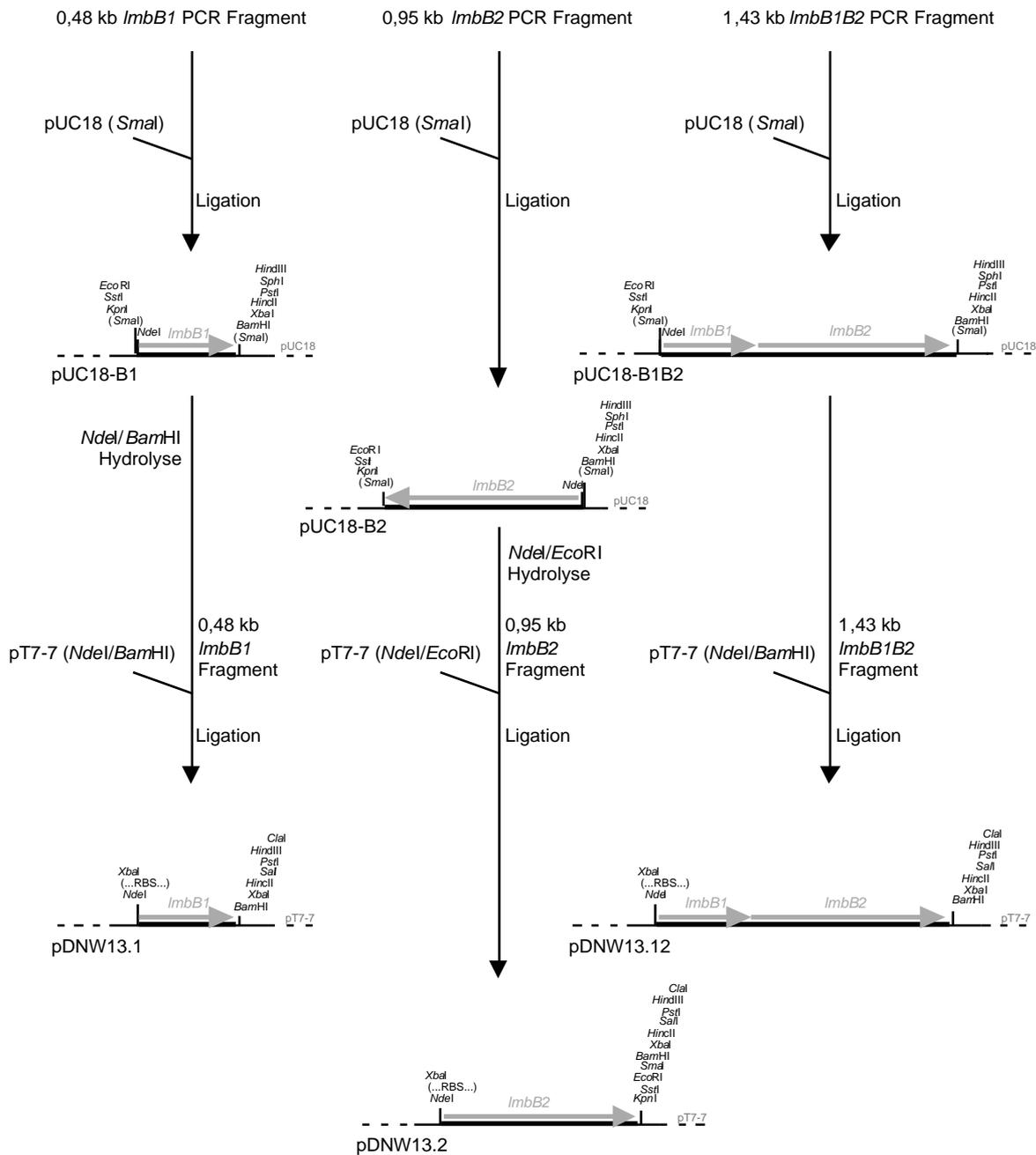
. . . . . 3000  
 TGGTCGCGGGGACGGCTGCCCGCCGCGGACGGCACGTACGAGTACCTGATCCGGCAGG  
 V A A G R L P A A D G T Y E Y L I R Q G

. . . . . *SalI* . . . . . 3000  
 GGGTCGGCTCACCGCGCGTCCGGCACCGTTCGAGTGCCTCGGTGACCGTTCGACTCCGGCTGTG  
 V G S P R V G T V E C S V T V D S G C A

. . . . . *SmaI* . . . . . 3060  
 CGGTGCGGGCCTCGGCGACCGGGAGCGTCCCGGTGGCCCGGGCGAGTTCCTTCTCG  
 V R A S A T G S V V P V A R G E F L L G

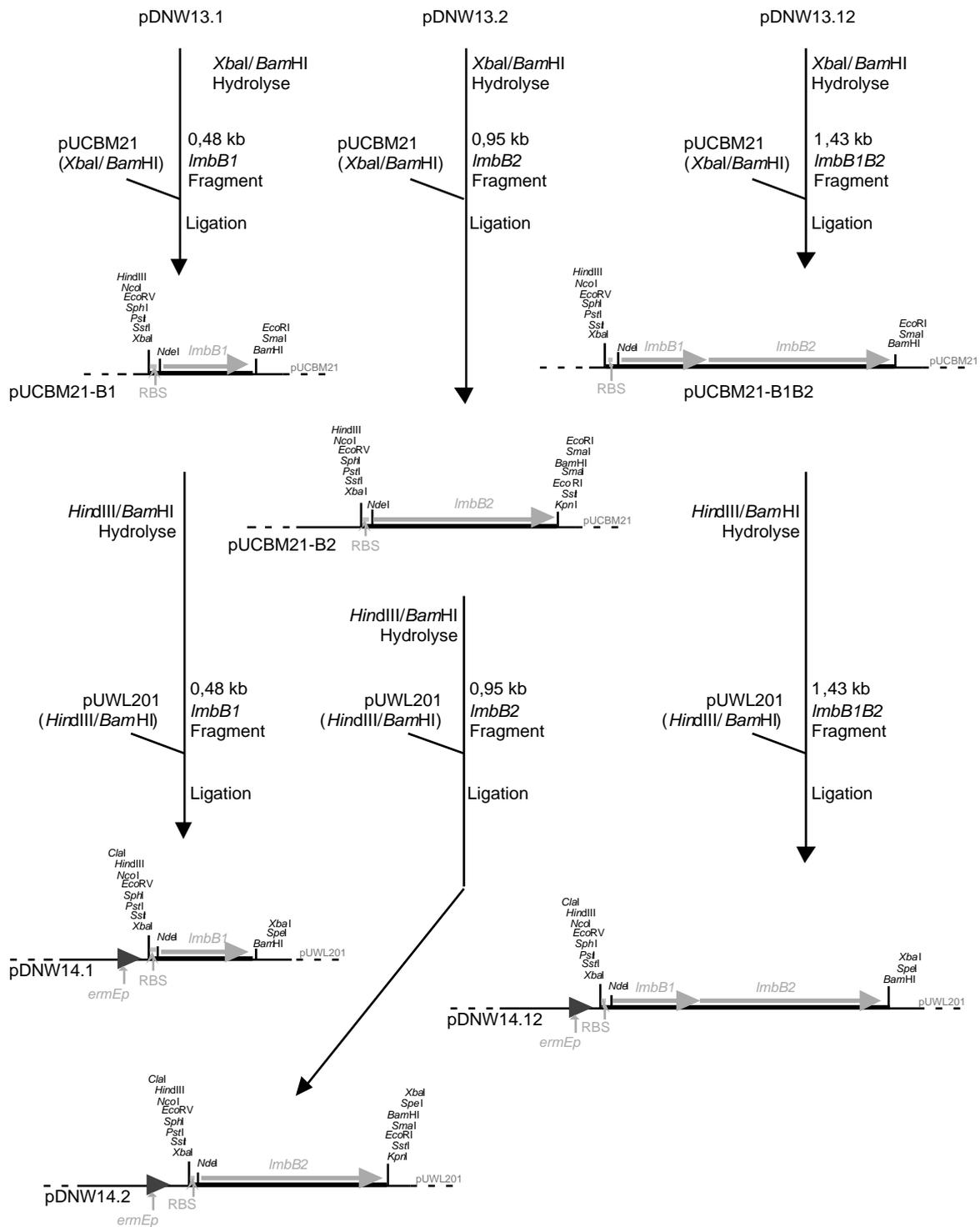
. . . . . *-lmbX->* . . . . . 3120  
 GTCCGACCTGGCCACGGCGGTTCGCTTCCGTGTAGTCGCCGAGGGCCCTTGCCTCAGCG  
 P D L A T A V A S V \*

## Anhang 2: Klonierungsstrategien

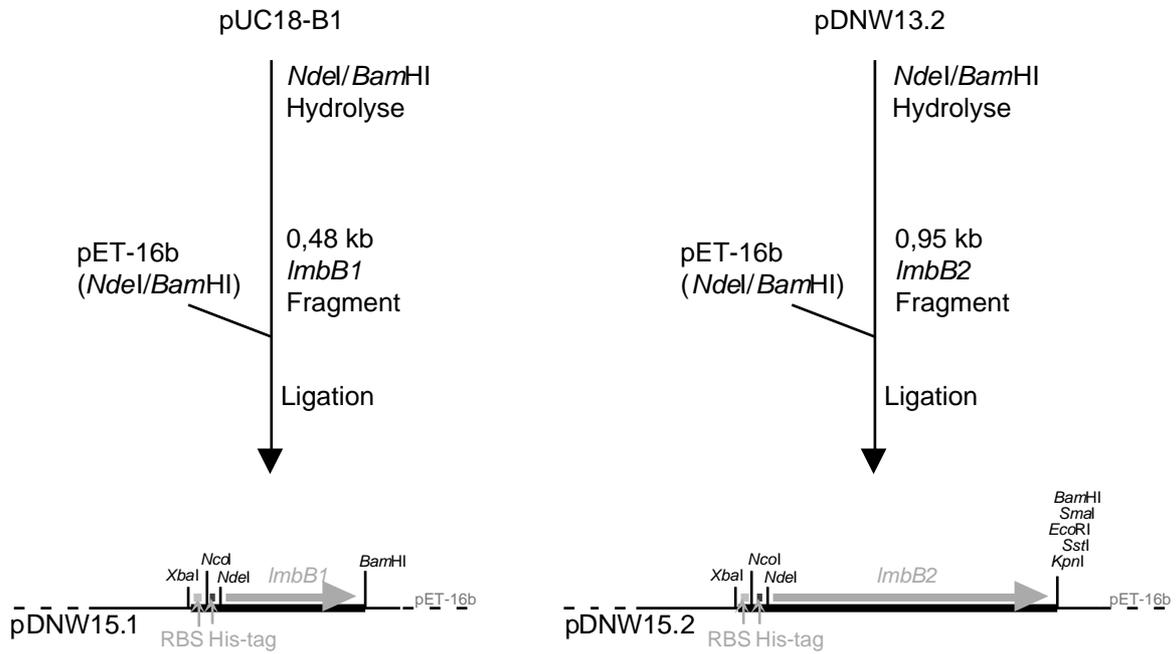


**Anhang 2-1.** Konstruktion der *S. lincolnsensis* 78-11 *ImbB1*- und *ImbB2*-Expressionsplasmide pDNW13.1, pDNW13.2 und pDNW13.12. (*Sma*I) in der MCS: Fusion eines DNA-Fragments mit glatten Enden (»blund end«) in eine *Sma*I-Schnittstelle, die nach Ligation nicht mehr vom *Sma*I-Restriktionsenzym erkannt wird.

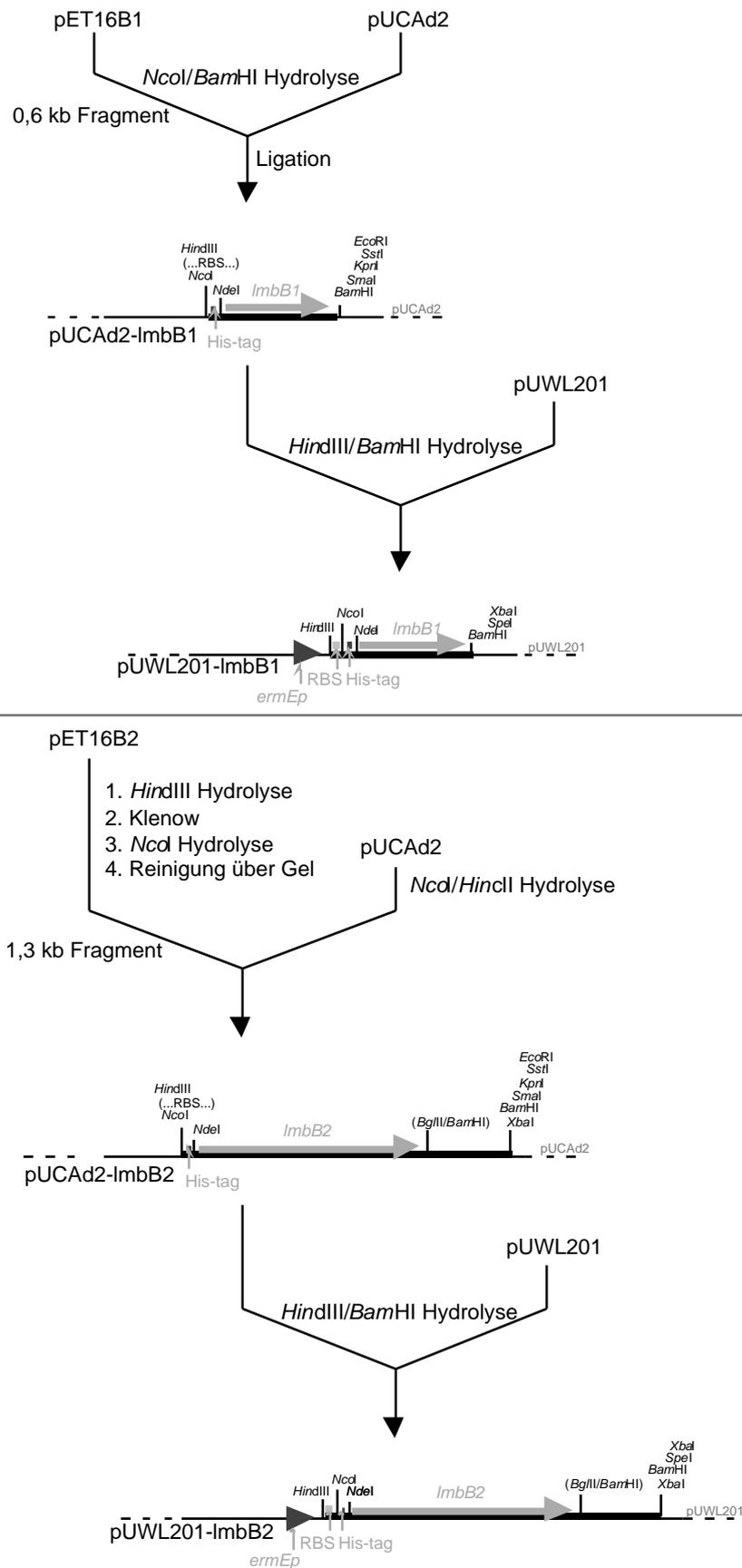
*Allgemeine Bemerkungen:* Die für die Klonierung wichtigen Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen und die MCS sind eingezeichnet. Dünne und gestrichelte Linien markieren den Vektoranteil. Dicke Linien bezeichnen den klonierten oder den zu klonierenden DNA-Abschnitt. Gene sind als graue Pfeile dargestellt. Angaben von Restriktionsendonukleasen in Klammern hinter Vektoren geben an, wie mit welchen Enzymen der Vektor vor der Ligation hydrolysiert wurde.



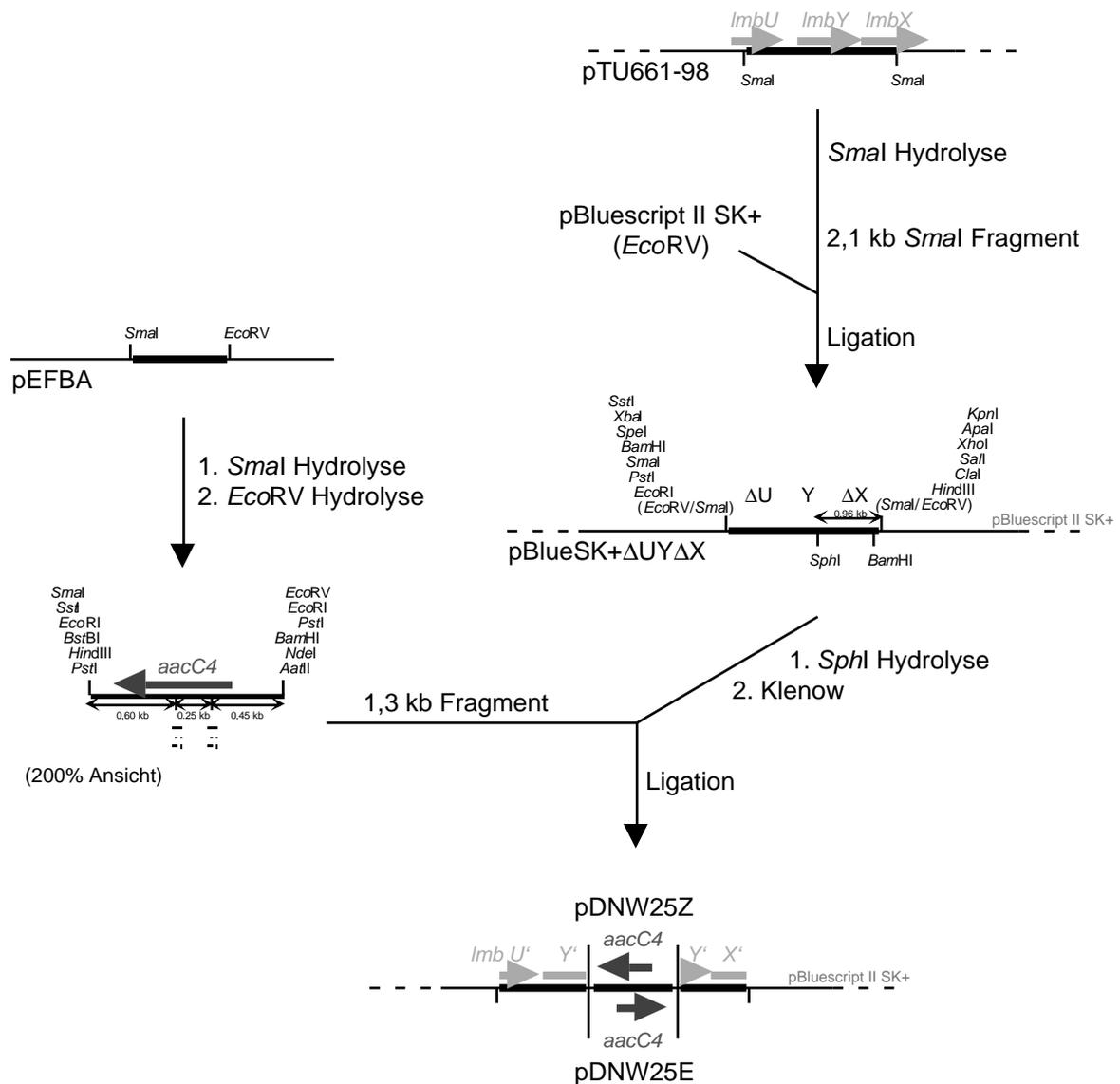
**Anhang 2-2.** Konstruktion der *S. lincolnsensis* 78-11 *ImbB1*- und *ImbB2*-Expressionsplasmide pDNW14.1, pDNW14.2 und pDNW14.12 (Erläuterungen: s. Anhang 2-1).



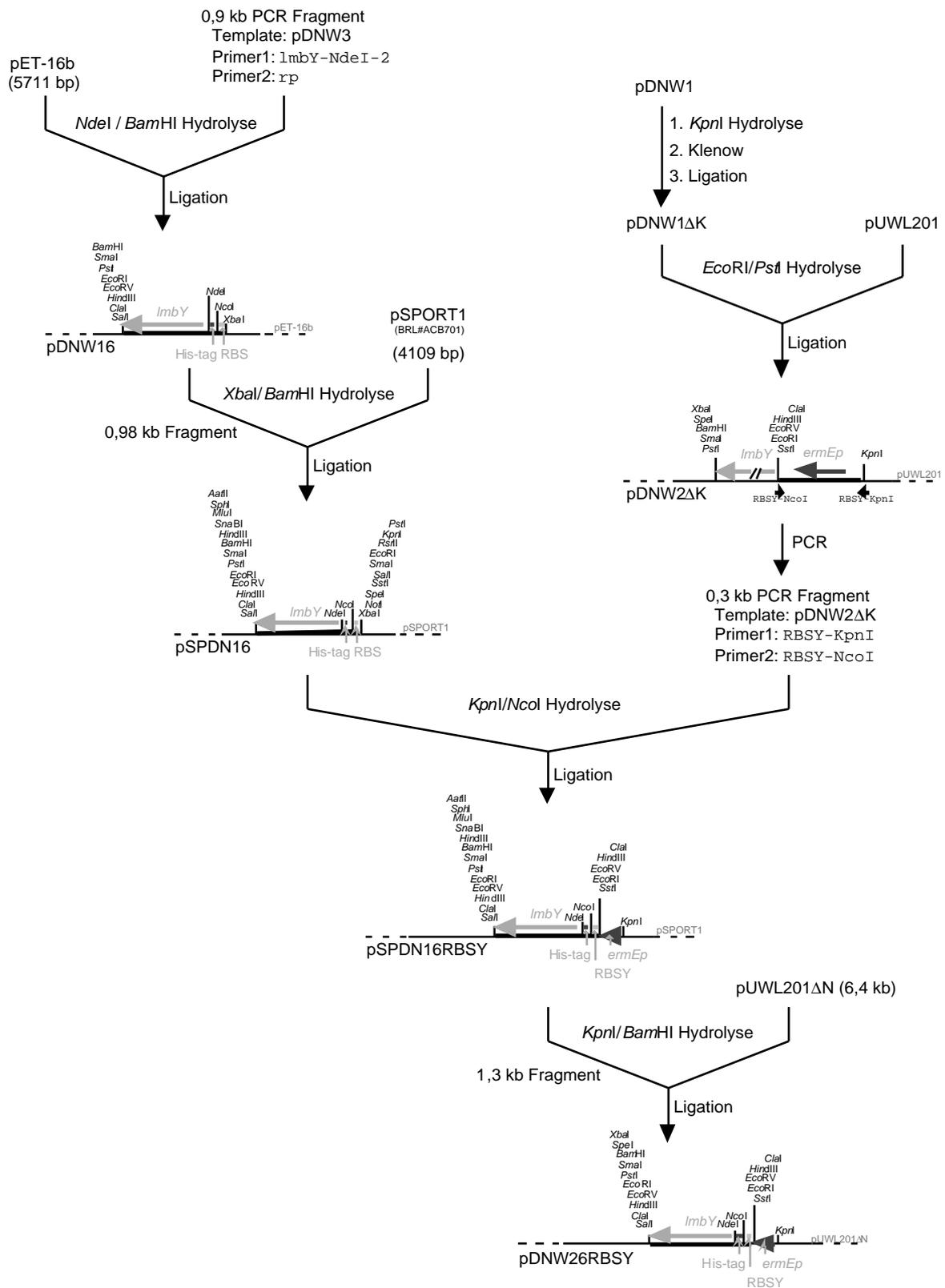
**Anhang 2-3.** Konstruktion der *S. lincolnensis* 78-11 *ImbB1*- und *ImbB2*-Expressionsplasmide pDNW15.1, pDNW15.2 (Erläuterungen: s. Anhang 2-1).



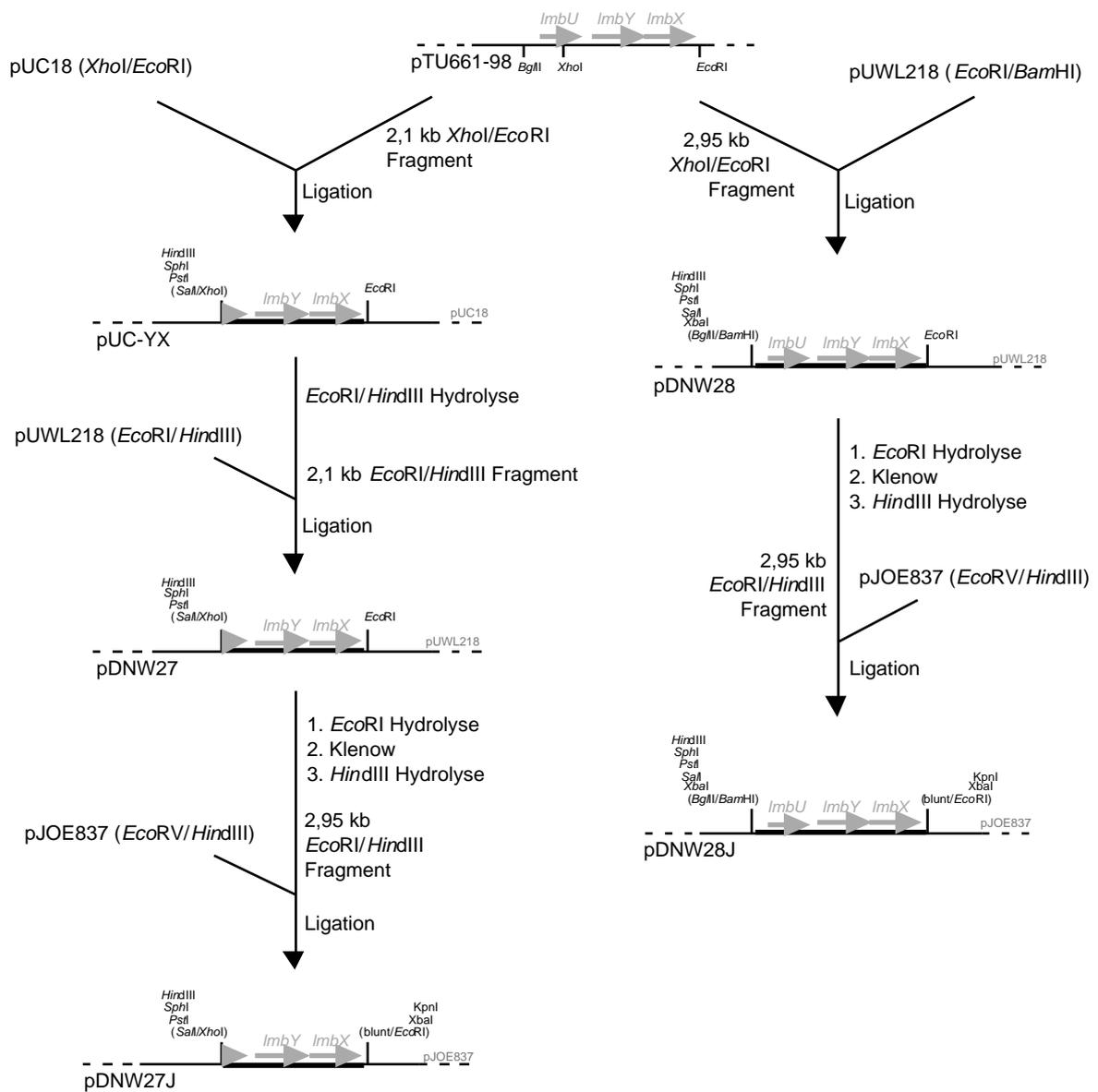
**Anhang 2-4.** Konstruktion der *S. lincolnensis* NRRL 2936 *ImbB1*- und *ImbB2*-Expressionsplasmide pUWL201-*ImbB1* und pUWL201-*ImbB2* (Erläuterungen: s. Anhang 2-1).



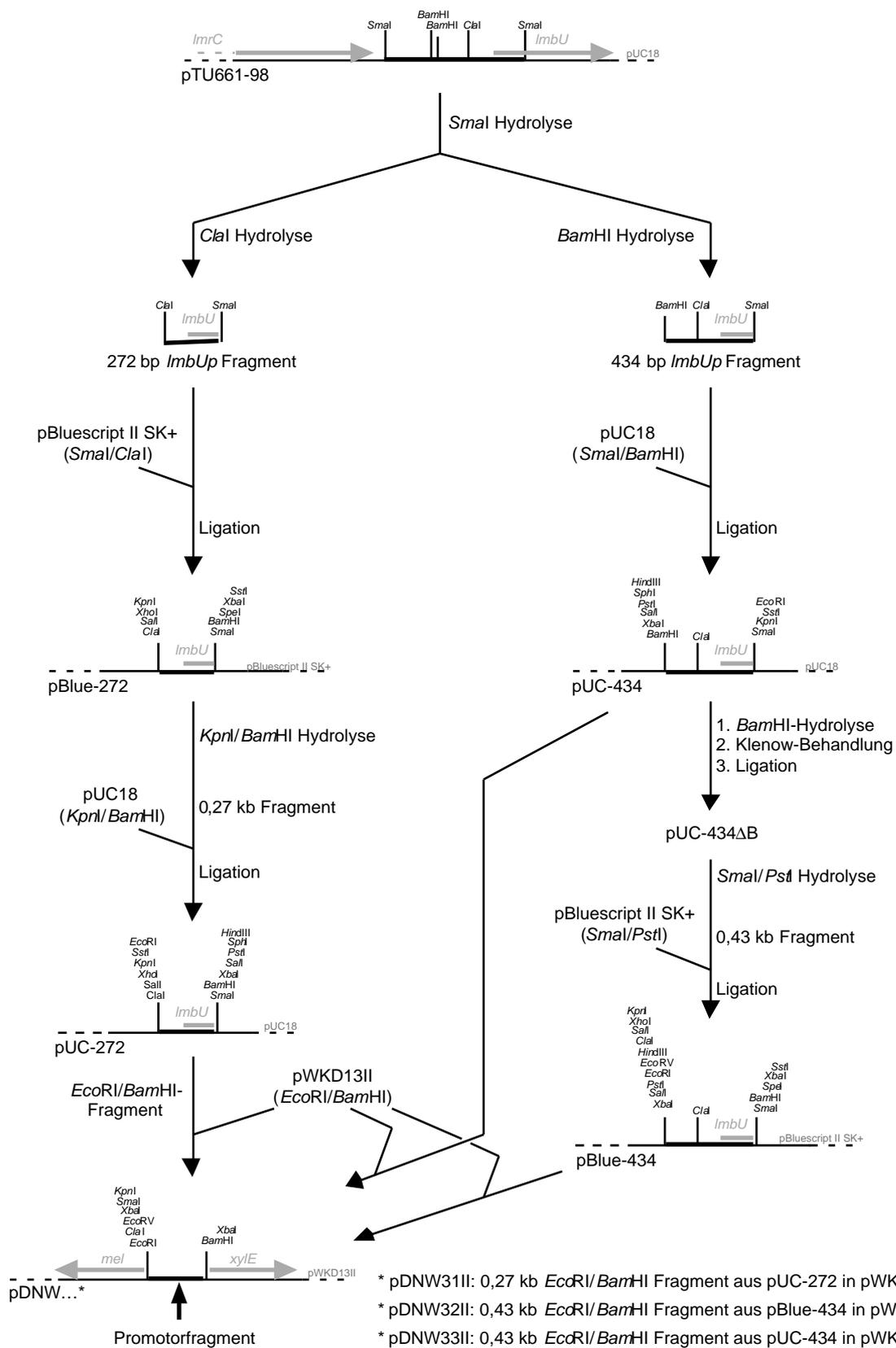
**Anhang 2-5.** Konstruktion der rekombinanten Plasmide pDNW25Z und pDNW25E, die für die Mutagenese des Gens *ImbY* in *S. lincolnensis* NRRL 2936 verwendet wurden. Die beide Pfeile im Endkonstrukt stellen die beiden möglichen Orientierungen des *aacC4*-Gens dar (Erläuterungen: s. Anhang 2-1).



**Anhang 2-6.** Konstruktion des rekombinanten Plasmids pDNW26RBSY zur Produktion von His-tag•LmbY in *S. lividans* TK23 (Erläuterungen: s. Anhang 2-1).

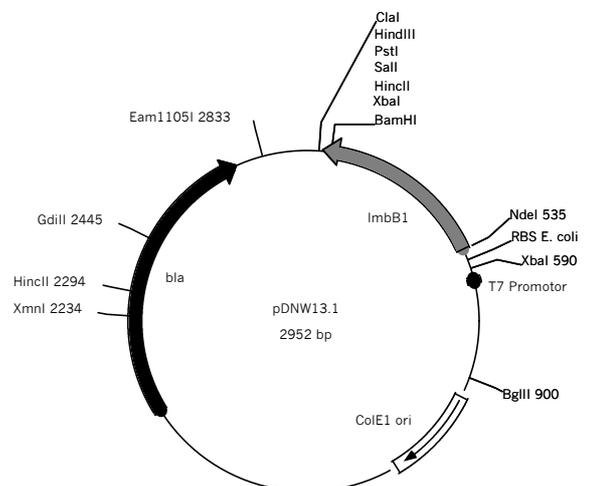
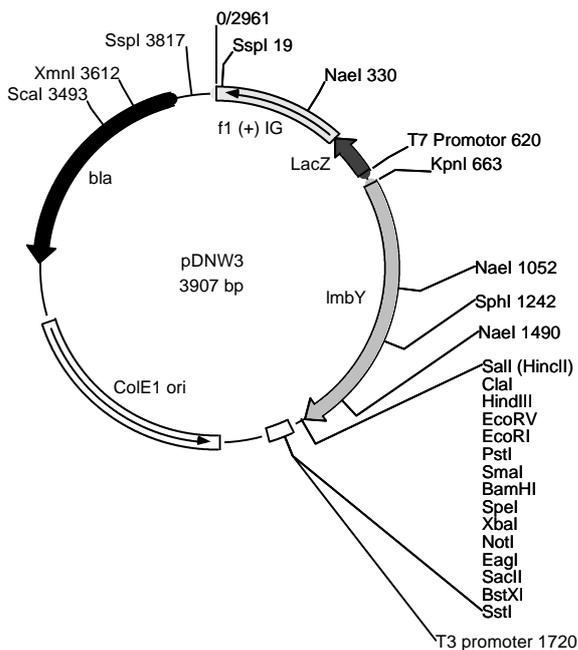
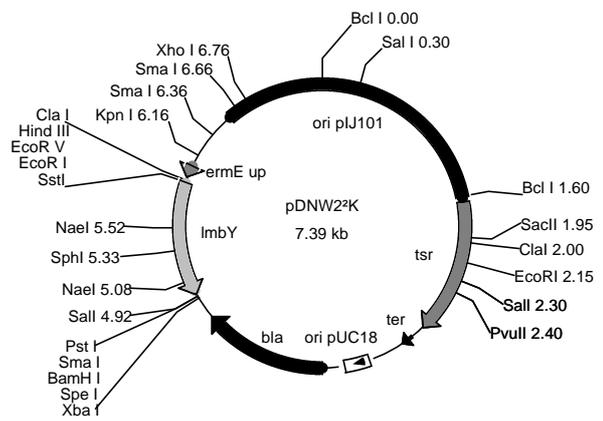
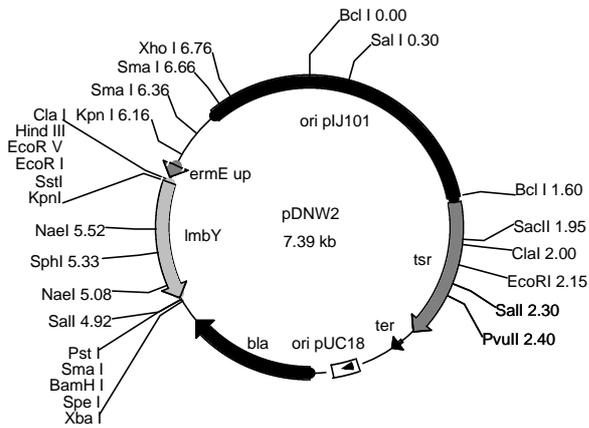
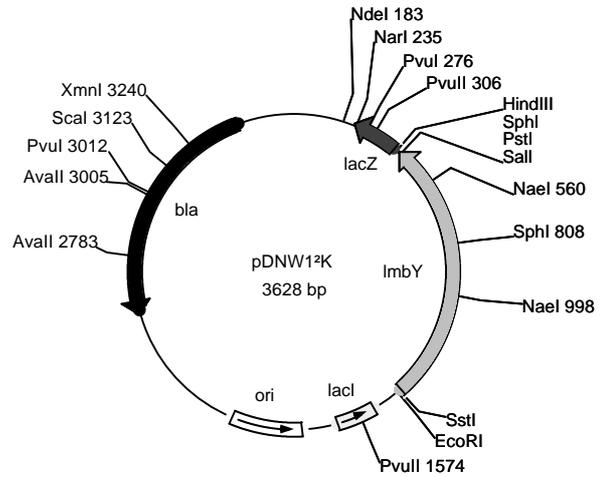
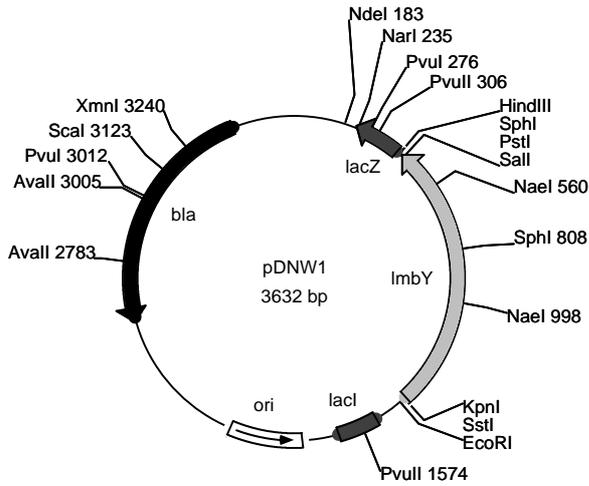


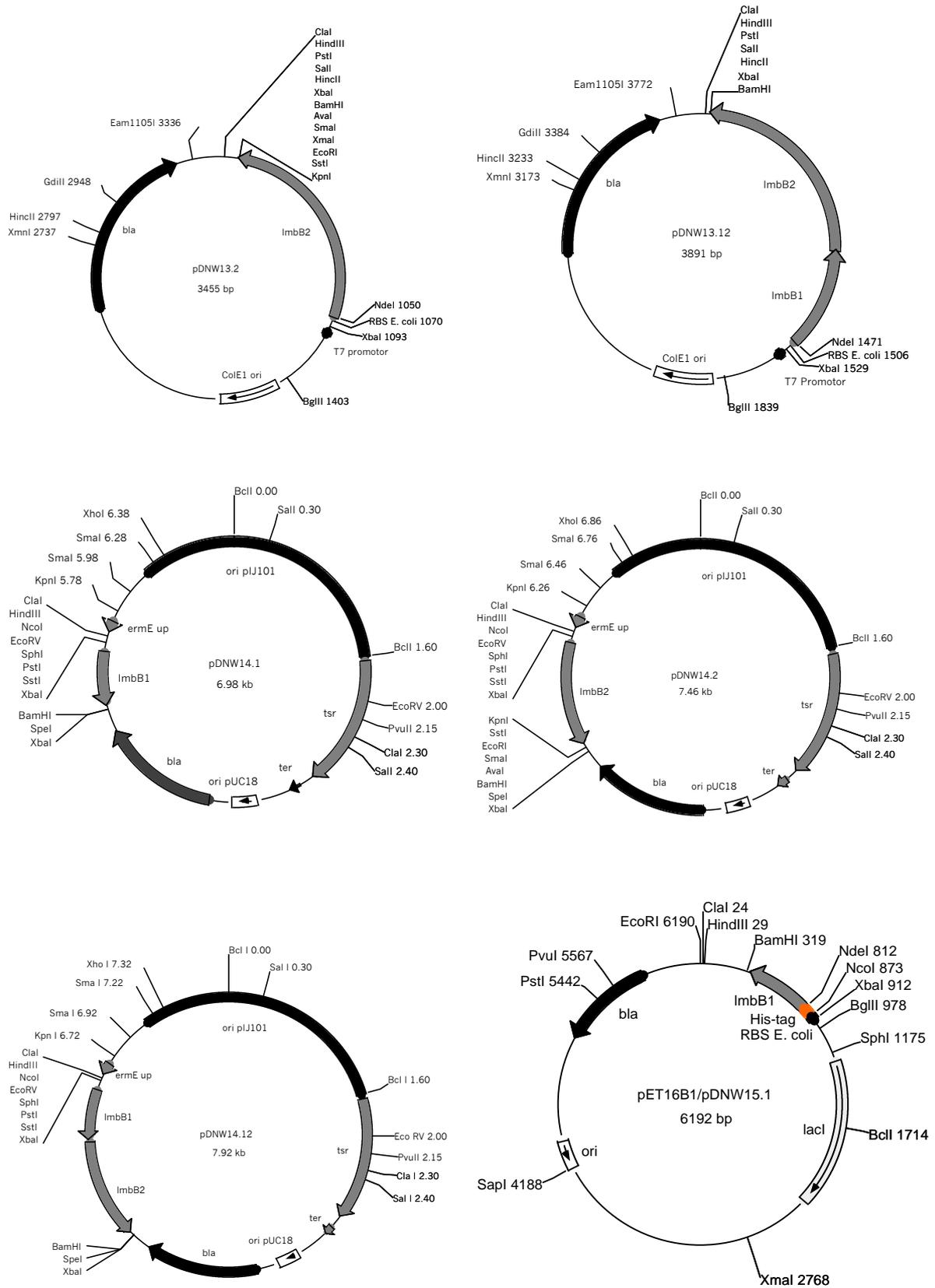
**Anhang 2-7.** Konstruktion der rekombinanten Plasmide pDNW27, pDNW27J, pDNW28 und pDNW28J, die zur Komplementation der hergestellten *S. lincolnensis-ImbY*-Mutanten verwendet wurden (Erläuterungen: s. Anhang 2-1).

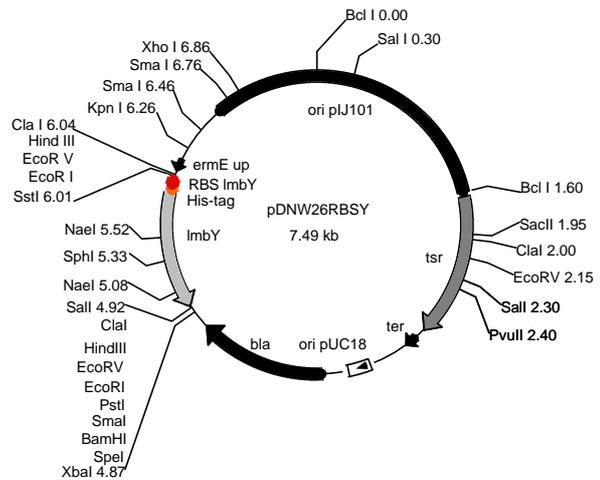
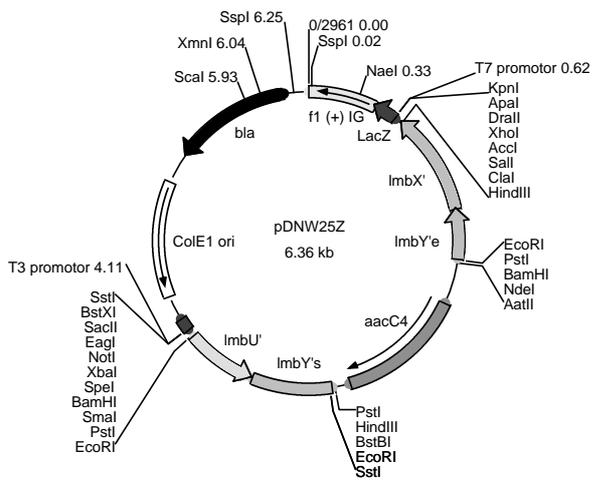
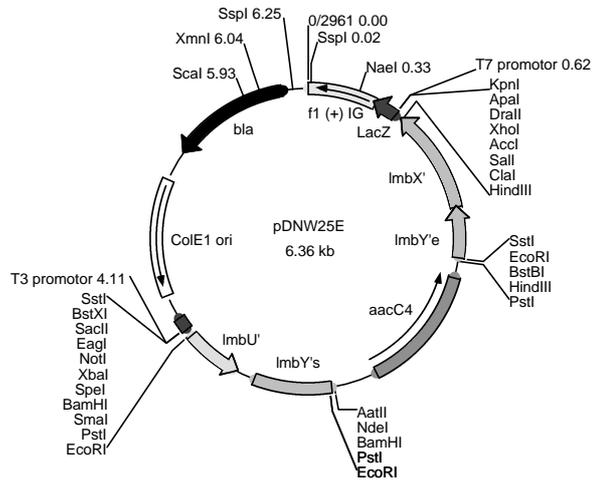
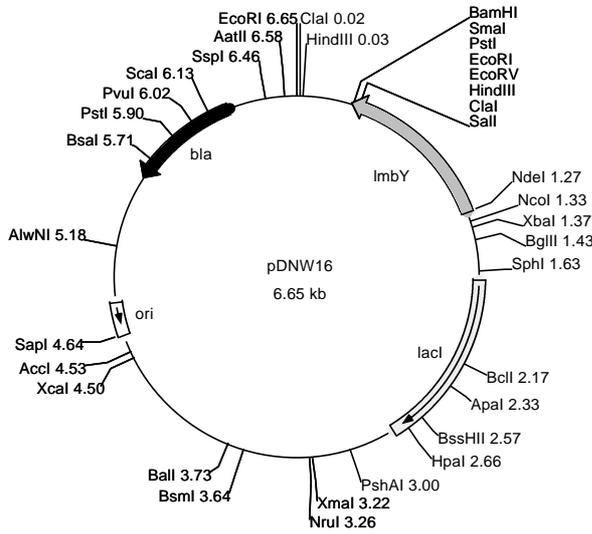
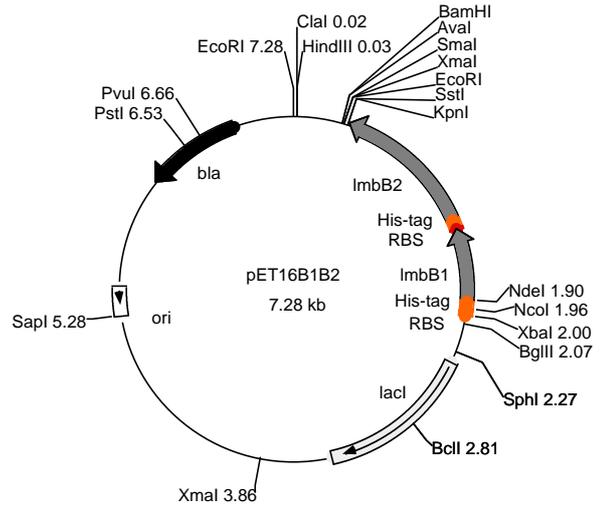
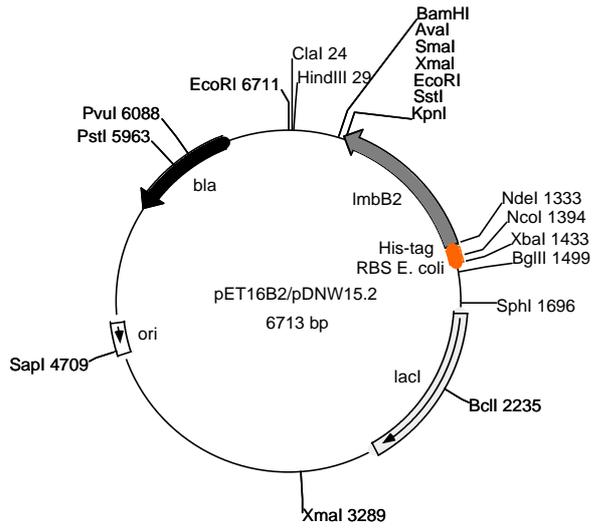


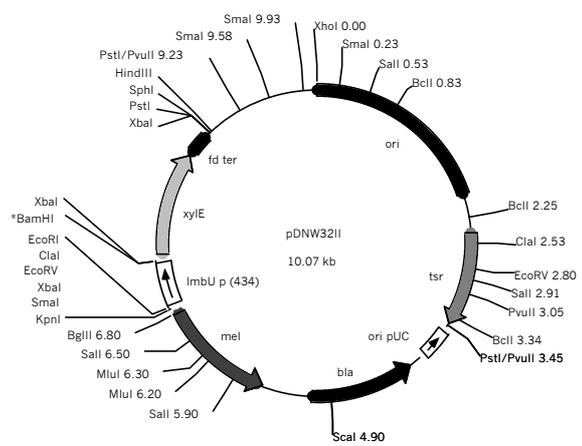
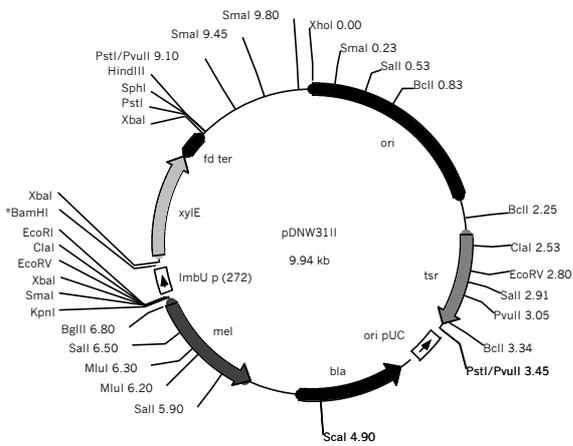
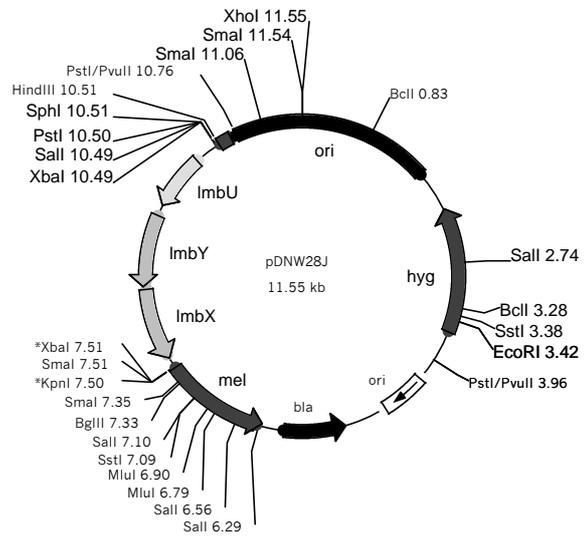
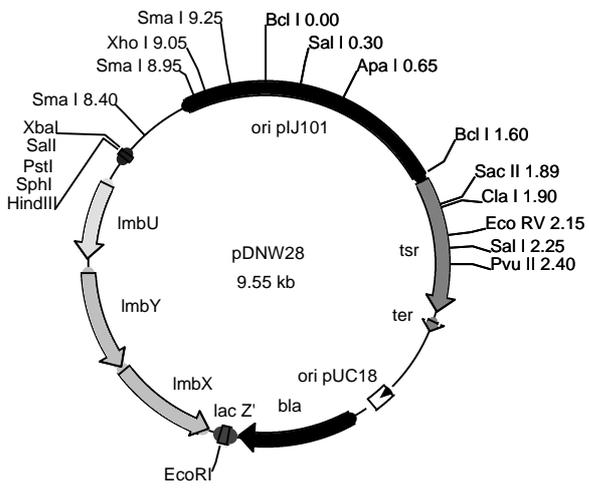
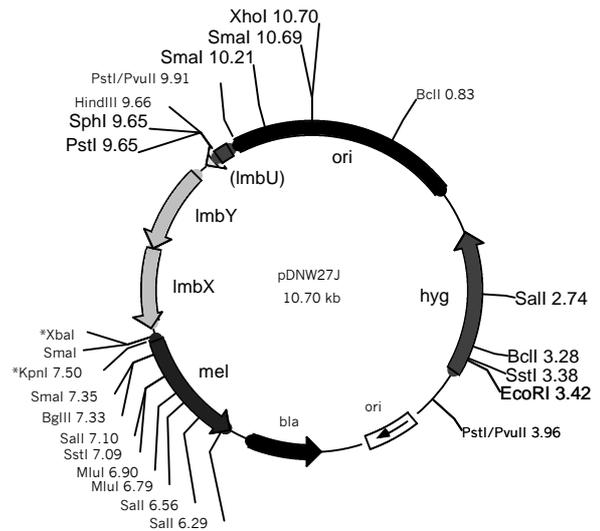
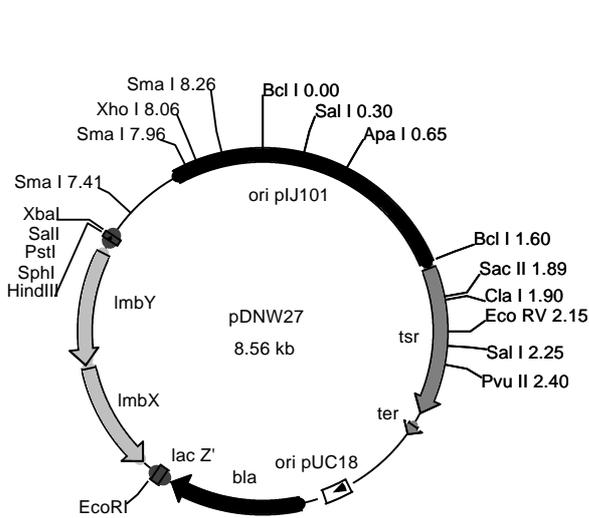
**Anhang 2-8.** Konstruktion der Promotortestplasmide pDNW31II, pDNW32II und pDNW33II (Erläuterungen: s. Anhang 2-1).

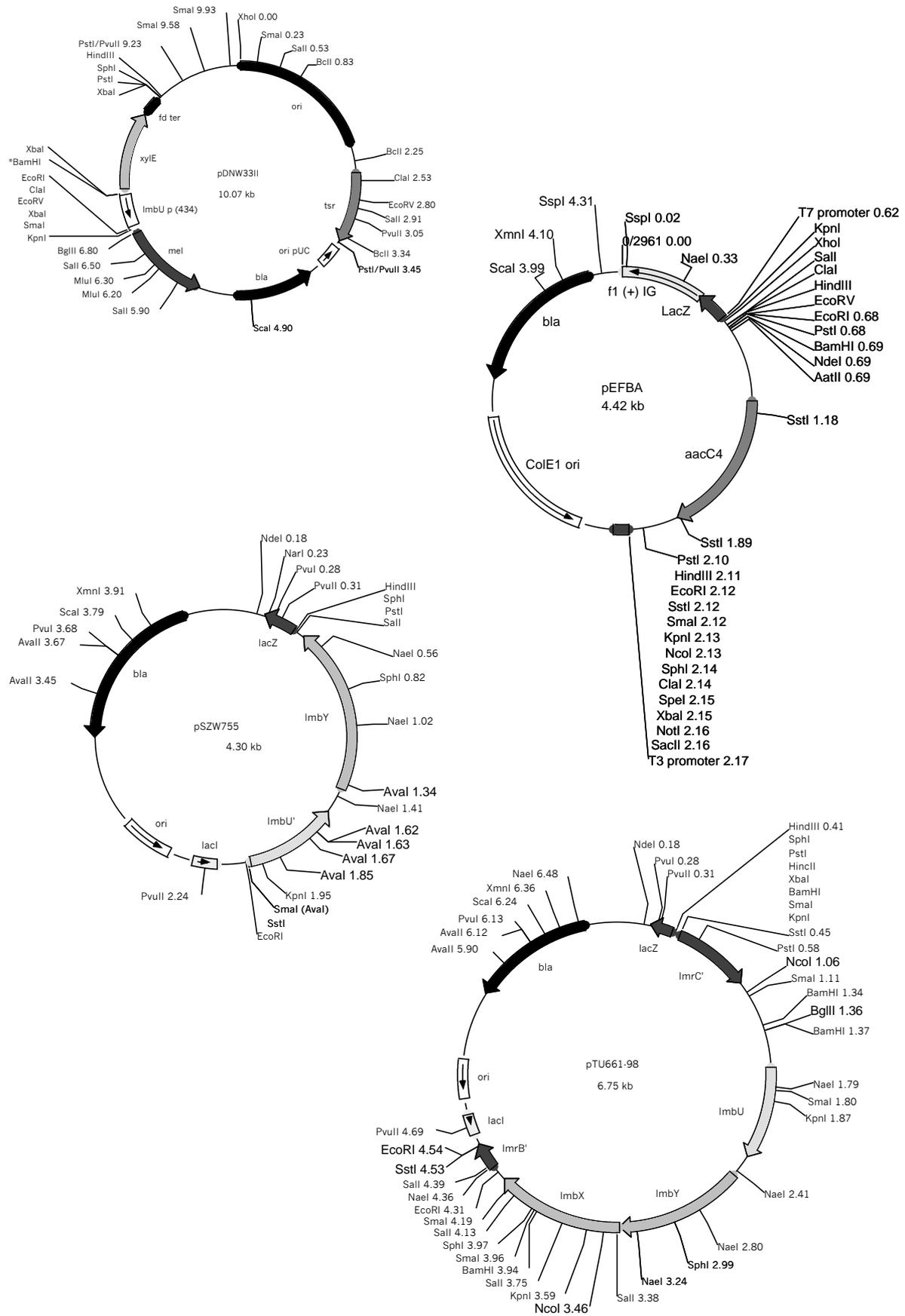
**Anhang 3: Plasmidkarten** (in alphabetischer Reihenfolge)











Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für »Chemische Mikrobiologie« des Fachbereichs 9 (Chemie) der Bergischen Universität Gesamthochschule Wuppertal in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Wolfgang Piepersberg im Zeitraum von November 1995 bis November 1999 angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

NEUSSER D, SCHMIDT H, SPIZÈK J, NOVOTNÀ J, PESCHKE U, KASCHABECK S, TICHY P, PIEPERSBERG W (1998) The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. Arch Microbiol 169: 322~332

---

DIETMAR NEUSSER, HEIKE SCHMIDT, JAROSLAV SPIZÈK, JITKA NOVOTNÀ, URSULA PESCHKE, STEFAN KASCHABECK, PAVEL TICHY, WOLFGANG PIEPERSBERG (1997) The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode oxidases involved in the first two steps in the biosynthesis of the propylproline moiety of the antibiotic lincomycin A.

Vortrag auf der VAAM Herbsttagung »*Biologie der Actinomyceten*«, Wuppertal

DIETMAR NEUSSER, WOLFGANG PIEPERSBERG (1998) Analysis of genes involved in the biosynthesis of the propylproline subunit of lincomycin A.

Poster auf der VAAM Frühjahrstagung, Frankfurt

DIETMAR NEUSSER, WOLFGANG PIEPERSBERG (1998) Generation of Lincomycin non-producing mutants of *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936 by gene disruption of *lmbY*, a gene involved in the biosynthesis of propylproline.

Poster auf der VAAM Herbsttagung »*Biologie der Actinomyceten*«, Kaiserslautern