

**Genetische und biochemische Untersuchungen von StrR -  
dem „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktivator  
von Genen der Streptomycin-Biosynthese in  
*Streptomyces griseus* N2-3-11**

Dem Fachbereich Naturwissenschaften II (Chemie/Biologie) an der  
Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal vorgelegte Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Eingereicht von  
Sven Thamm

Wuppertal  
im Februar 1999

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Wolfgang Piepersberg für die Überlassung des Themas und sein Interesse an den Ergebnissen dieser Arbeit danken.

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jürgen Distler für sein stetiges Interesse an meiner Arbeit, seine vielen Anregungen und wertvollen Hinweise, sowie für seine umfassende Unterstützung und Förderung meiner universitären Laufbahn.

Herrn Dr. Colin Smith, Frau Dr. Giselda Bucca sowie allen Mitarbeitern des Arbeitskreises „*Streptomyces genetics*“ danke ich für die Gastfreundschaft und Unterstützung während meines Forschungsaufenthaltes in Manchester (GB).

Den Frauen Sabine Stratmann, Nicole Cremer, Petra Kolkhoff, Elisabeth Sauerbier und Yvonne Rockser danke ich vor allem für ihre Hilfe bei der DNA-Sequenzierung.

Meinem Freund und Kollegen Dietmar Neußer danke ich für seine stets kameradschaftliche Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für chemische Mikrobiologie für die immer gute Arbeitsatmosphäre und kooperative Zusammenarbeit.

Allen Freunden unserer Familie, die nicht unmittelbar an meiner Arbeit beteiligt waren, danke ich für Ihr Interesse und den Ausgleich, den sie zum Laboralltag geschaffen haben.

Meiner Frau Jacqueline danke ich für das mir entgegengebrachte Verständnis und für alles, was sie für mich getan hat.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der DFG (Bonn) und der EMBO (Heidelberg).

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

**Thamm, S. und Distler, J. (1997)** Properties of C-terminal truncated derivatives of the activator, StrR, of the streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. FEMS Microbiol. Lett. **149**, 265-272.

---

# INHALTSVERZEICHNIS

**Abkürzungen****Zusammenfassung****Summary**

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 STREPTOMYCIN UND SEINE BIOSYNTHESE.....	2
1.1.1 Struktur und Wirkung von Streptomycin .....	2
1.1.2 Biosynthese von Streptomycin.....	3
1.1.3 Genetik der Streptomycin-Biosynthese .....	4
1.2 REGULATION DER STREPTOMYCIN-BIOSYNTHESE.....	5
1.2.1 Regulation durch Medienkomponenten.....	6
1.2.2 Globale Regulationsvorgänge – A-Faktor .....	7
1.2.3 „Pathway“-spezifische Regulationsvorgänge - StrR.....	10
1.2.4 Vergleich von StrR mit anderen „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktiva- toren in Streptomyceten.....	12
1.3 RNA-POLYMERASEN, PROMOTORSTRUKTUREN UND TRANSKRIPTIONSAKTIVIERUNG IN PROKARYOTEN.....	15
1.4 RNA-POLYMERASEN IN STREPTOMYCETEN .....	20
1.5 AUFGABENSTELLUNG.....	21
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
2.1 CHEMIKALIEN, ENZYME UND KITS .....	22
2.2 MEDIEN UND LÖSUNGEN .....	23
2.2.1 Nährmedien .....	23
2.2.2 Antibiotika .....	25
2.2.3 Verwendete Puffer und Lösungen.....	25
2.3 BAKTERIEN UND PLASMIDE.....	28
2.4 OLIGONUKLEOTIDE.....	34
2.5 ANZUCHT UND LAGERUNG VON BAKTERIEN .....	36
2.5.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	36
2.5.2 Anzucht und Lagerung von <i>B. subtilis</i> .....	37
2.5.3 Anzucht und Lagerung von <i>Streptomyces</i> sp.....	37
2.5.4 Bestimmung des Wachstums von <i>S. griseus</i> .....	37
2.5.5 Fermentation von <i>S. griseus</i> .....	37

2.6	STREPTOMYCIN-BIOASSAYS .....	38
2.7	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	38
2.7.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus Streptomycceten.....	38
2.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	38
2.7.3	<i>In vitro</i> Manipulation von Nukleinsäuren.....	39
2.7.4	Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten.....	39
2.7.5	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	39
2.7.6	Autoradiographie .....	39
2.7.7	DNA-Sequenzierung.....	40
2.7.8	DNA- und Aminosäuresequenzanalysen.....	40
2.7.9	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	40
2.7.10	Gerichtete Mutagenese mittels PCR.....	41
2.7.11	Ungerichtete Mutagenese von DNA.....	42
2.7.12	Transformation von <i>E. coli</i> und <i>S. lividans</i> .....	42
2.7.13	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS.....	42
2.7.14	Heterologe Genexpression und radioaktive Markierung von Proteinen.....	43
2.7.15	Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i> .....	44
2.7.16	Integration von Plasmid-DNA in das Genom von <i>S. lividans</i> .....	44
2.8	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	44
2.8.1	Herstellung zellfreier Extrakte von <i>E. coli</i> und <i>S. lividans</i> .....	44
2.8.2	Proteinbestimmungen, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie Färbung.....	45
2.8.3	Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot) .....	45
2.8.4	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine .....	45
2.8.5	Native Gelelektrophorese .....	46
2.8.6	Gelretardierungsassays .....	46
2.8.7	Anreicherung von RNA-Polymerase aus <i>S. griseus</i> .....	47
2.8.8	Reinigung von His-tag-StrR mittels Ni-NTA-Agarose .....	48
2.8.9	„Refolding“ von denaturierend gereinigtem His-tag-StrR.....	48
2.8.10	<i>In vitro</i> Transkriptionsassays .....	49
2.8.11	Bestimmung der Catechol-2,3-Dioxygenase (XyleA-Aktivität) .....	49
2.8.12	Screening von potentiellen StrR-Mutanten auf Agarplatten.....	50
2.8.13	Bestimmung der StrB1-Amidino-transferase-Aktivität.....	51
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>52</b>
3.1	WACHSTUMSKINETIK VON <i>S. GRISEUS</i> IN TSB-MEDIUM.....	52
3.1.1	Untersuchungen zur wachstumsphasenabhängigen StrB1-Aktivität und Produktion von StrR in <i>S. griseus</i> .....	52
3.2	VERSUCHE ZUM AUFBAU EINES STRR-ABHÄNGIGEN <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTIONS- SYSTEMS.....	55
3.2.1	Fermentation von <i>S. griseus</i> DSM40236.....	55
3.2.2	Anreicherung von RNA-Polymerase aus <i>S. griseus</i> DSM40236.....	56
3.2.3	Analyse der <i>in vitro</i> Transkriptionsassays mit den <i>dagp1-p4</i> und <i>dnaKp</i> Fragmenten .....	58
3.2.4	Präparation von His-tag-StrR: Heterologe Produktion in <i>E. coli</i> und native sowie denaturierende Reinigung .....	61

3.2.5	<i>In vitro</i> Transkriptionsassay mit dem <i>strB1p</i> Promotorfragment .....	63
3.2.6	Heterologe Produktion von His-tag-StrR in <i>S. lividans</i> sowie Tests auf <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Transkriptionsaktivierung.....	65
3.3	AUFBAU EINES TESTSYSTEMS ZUM SCREENING VON STRR-MUTANTEN.....	68
3.3.1	Allgemeine Strategie.....	68
3.3.2	Das Testsystem.....	71
3.4	UNGERICHTETE <i>IN VIVO</i> MUTAGENESE DES STRR-GENS UND SCREENING VON STRR-PROTEIN-MUTANTEN .....	73
3.5	CHARAKTERISIERUNG VON C-TERMINAL VERKÜRZTEN STRR-PROTEINEN.....	77
3.5.1	Herstellung, heterologe Produktion in <i>E. coli</i> und Tests auf DNA-Bindeaktivität	77
3.5.2	Heterologe Produktion in <i>S. lividans</i> und Überprüfung der Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung.....	79
3.6	CHARAKTERISIERUNG VON HTH-MUTANTEN DES STRR-PROTEINS .....	81
3.6.1	Herstellung, heterologe Produktion in <i>E. coli</i> und Tests auf DNA-Bindeaktivität	81
3.6.2	Heterologe Produktion in <i>S. lividans</i> und Überprüfung der Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung.....	82
3.7	STRR-ÄHNLICHE PROTEINE IN <i>S. GLAUCESCENS</i> UND <i>S. FLAVOPERSICUS</i> .....	83
3.7.1	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen.....	83
3.7.2	Heterologe Produktion der StrR-ähnlichen Proteine HstR und SpcR in <i>E. coli</i> ....	85
3.7.3	Herstellung der Mutante SpcRM1 und heterologe Produktion in <i>E. coli</i> .....	87
3.7.4	Herstellung von [ <sup>35</sup> S]-markierten StrR-, HstR- und SpcR-Proteinen in <i>E. coli</i> ....	87
3.7.5	Versuche zur DNA-Bindeaktivität von HstR und SpcR.....	88
3.7.6	Heterologe Produktion von HstR, SpcR und SpcRM1 in <i>S. lividans</i> sowie Versuche zur Transkriptionsaktivierung .....	90
3.8	UNTERSUCHUNGEN ZUR DNA-BINDUNG UND OLIGOMERISIERUNG VON STRR.....	91
3.8.1	Veränderungen der StrR-Bindestelle innerhalb des <i>strB1p</i> -Operators .....	91
3.8.2	Untersuchungen zur Oligomerisierung von StrR und C-terminal verkürzten StrR-Proteinen.....	94
3.8.3	Untersuchungen zur Oligomerisierung von StrR-Protein-Mutanten.....	96
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>99</b>
4.1	UNTERSUCHUNGEN DER PHYSIOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN VON STRR UND STRB1 IN <i>S. GRISEUS</i> UND VERSUCH DES AUFBAUS EINES STRR- ABHÄNGIGEN <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTIONSSYSTEMS .....	100
4.2	VARIATION VON STRR UND VERGLEICH MIT STRR-ÄHNLICHEN PROTEINEN .....	109
<b>5</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>129</b>
	<b>Anhang 1</b> Konstruktion von pSTW3.31His.....	139

<b>Anhang 2</b>	Konstruktion der StrR-Expressionsplasmide ( <i>S. lividans</i> ) der pSTW-Serie.....	140
<b>Anhang 3</b>	Konstruktion der <i>E. coli</i> -Streptomyces-„Shuttle“-Plasmide pSTW1 und pSTW3.21.....	141
<b>Anhang 4</b>	Konstruktion des „Reporter-gen-Plasmids“ pSTW13.2.....	142
<b>Anhang 5</b>	Konstruktion der StrR-Expressionsplasmide ( <i>E. coli</i> ) der pSTR-Serie..	143
<b>Anhang 6</b>	Konstruktion der SpcR- und HstR-Expressionsplasmide ( <i>E.coli</i> ) pTFL und pTGL.....	144
<b>Anhang 7</b>	Konstruktion der HstR-, SpcR- und SpcRM1-Expressionsplasmide ( <i>S. lividans</i> ) pSTW22.1, pSTW24 und pSTW24.1.....	145

## Abkürzungsverzeichnis

AGA	Aminoglycosid-Antibiotika	MW	Molekulargewicht
As	Aminosäure(n)	mRNA	messenger RNA
bp	Basenpaare	NTP	Nucleosidtriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm und 1 cm Schichtdicke
ATP	Adenosintriphosphat	<i>p</i>	Promotor
BSA	Rinderserumalbumin	p. a.	pro analysi
ca	circa	PAA	Polyacrylamid
Ci	Curie	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
cpm	gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute	PEG	Polyethylenglycol
CTP	Cytidintriphosphat	pers.	persönliche
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn	PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	psi	“pounds per square inch“
DNA	Desoxyribonucleinsäure	PVDF	Polyvinylidendifluorid
DNase	Desoxyribonuclease	R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate	RNA	Ribonucleinsäure
DSM	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig	RNase	Ribonuclease
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	s.	siehe
EMBO	European Molecular Biology Organi- zation, Heidelberg	sec	Sekunde
GTP	Guanosintriphosphat	S	Svedberg-Einheit
h	Stunde(n)	SDS	Natriumdodecylsulfat
HTH	Helix-Turn-Helix	SM	Streptomycin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid	TCA	Trichloressigsäure
IR	Infrarot	TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2- aminoethansulfonsäure
kat	katalytische Aktivität	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
kb	Kilobasen(paare)	tRNA	transfer Ribonucleinsäure
kDa	Kilodalton	UAS	“upstream activating sequence(s)”
λ	Wellenlänge	ÜN	über Nacht
max	maximal	ÜNK	Übernachtkultur
min	Minuten	Upm	Umdrehungen pro Minute
M <sub>r</sub>	relatives Molekulargewicht	UTP	Uridintriphosphat
		UV	Ultraviolettes Licht
		V	Volt
		vgl	vergleiche
		X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D- Galactosi

## Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die genetische und biochemische Analyse des „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktivators von Genen der Streptomycin-Biosynthese, StrR aus *Streptomyces griseus*. Durch den Aufbau eines Testsystems zum Screening von StrR-Protein-Mutanten wurden die Voraussetzungen geschaffen, die funktionellen Domänen von StrR für die DNA-Bindung, Oligomerisierung und Transkriptionsaktivierung nach gerichteter und ungerichteter Mutagenese zu identifizieren und zu analysieren. Folgende Eigenschaften und funktionelle Domänen konnten dem StrR-Protein zugeordnet werden:

1. Das relativ zentral im StrR-Protein gelegene Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv ist für die sequenz-spezifische DNA-Bindeaktivität von StrR verantwortlich. Bereits die Deletion einer Aminosäure innerhalb dieses HTH-Motivs führt zum Verlust der DNA-Bindeaktivität.
2. StrR bindet als Tetramer an die palindrome Bindestelle des *strB1p*-Operators. Auch mit nur einer Hälfte dieser Bindestelle kann StrR noch als tetramerer Proteinkomplex interagieren.
3. Die Domäne zur Tetramerisierung von StrR befindet sich im C-Terminus des Proteins. Punktmutanten von StrR mit veränderten Aminosäuren im C-Terminus verloren ebenso ihre Fähigkeit zur Tetramerisierung wie C-terminal verkürzte StrR-Proteine.
4. Der C-Terminus von StrR ist für die DNA-Bindung nicht notwendig. Die Deletion der C-terminal vom HTH-Motiv gelegenen Aminosäuren führte nicht zum Verlust der DNA-Bindeaktivität solcher C-terminal verkürzter StrR-Proteine.
5. Es wurden keine StrR-Protein-Mutanten isoliert, die nicht mehr zur Dimerisierung fähig waren. Jedoch kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die Zuordnung der Dimerisierungs-Domäne zum N-Terminus von StrR getroffen werden, weil C-terminal vom HTH-Motiv verkürzte StrR-Proteine als dimere Proteinkomplexe an die DNA gebunden waren.
6. Ausschließlich für die Transkriptionsaktivierung essentielle Aminosäuren wurden sowohl im N- als auch im C-Terminus des StrR-Proteins gefunden.

Auch das Protein HstR aus *S. glaucescens* ist ein DNA-Bindeprotein und Transkriptionsaktivator der StrR-Familie. Mit seinem HTH-Motiv besitzt HstR die gleiche DNA-Sequenzspezifität wie StrR. Diese Zuordnung konnte für das hier ebenfalls untersuchte Protein SpcR aus *S. flavopersicus* bisher noch nicht verifiziert werden.

Ein StrR-abhängiges *in vitro* Transkriptionssystem konnte trotz erfolgreicher Anreicherung von aktiver *S. griseus*-RNA-Polymerase und His-tag-StrR nicht etabliert werden. Vor dem Hintergrund des versuchten Aufbaus dieses *in vitro* Transkriptionssystems wurde die wachstumsphasenabhängige Produktion von StrR und die StrR-abhängige StrB1-Aktivität in zwei *S. griseus*-Stämmen untersucht. Dabei wurden Unterschiede sowohl in der Quantität als auch im zeitlichen Verlauf der StrR-Produktion festgestellt. Ein sprunghafter Anstieg der StrB1-Aktivitäten wurde dagegen in beiden *S. griseus*-Stämmen zeitgleich während des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase beobachtet.

## Summary

This work was focussed on the genetical and biochemical analysis of the pathway-specific transcriptional activator of genes of the streptomycin biosynthesis of *S. griseus*, StrR. A testsystem for screening of StrR-protein-mutants following site-directed and random mutagenesis was established. The functional domains for DNA-binding, oligomerization and transcriptional activation were identified and analyzed and the following properties and functional domains could be assigned to the StrR-protein:

1. The relatively central located helix-turn-helix (HTH)-motif of StrR was found to be responsible for the sequence-specific DNA-binding-activity. The deletion of merely one amino acid of the HTH-motif led to the loss of the DNA-binding activity.
2. StrR binds as a tetramer to the palindromic binding-site of the *strB1p*-operator. StrR still interacts as a tetramer if only one half-site of the palindrome is present.
3. The tetramerization-domain of StrR is located in the C-terminus of the protein. Point mutants of StrR harboring altered amino acids within the C-terminus as well as C-terminally truncated StrR-proteins lost their ability for tetramerization.
4. The C-terminus of StrR is not necessary for the DNA-binding. The deletion of amino acids located C-terminally to the HTH-motif did not cause the loss of the DNA-binding-activity.
5. StrR-point-mutants defective in the dimerization were not isolated. However, the dimerization-domain must be located within the N-terminus of StrR because C-terminally truncated StrR-proteins still bound to DNA as dimeric protein-complexes.
6. Amino acids responsible for transcriptional activation were found in the N- and C-terminus of the StrR-protein.

The HstR-protein of *S. glaucescens* is a DNA-binding-protein and transcriptional activator of the StrR-family. Its HTH-motif exhibits the same DNA-specificity as StrR. However, this assignment could not be verified for the investigated SpcR-protein of *S. flavopersicus*.

Even though *S. griseus*-RNA-polymerase and His-tag-StrR were successfully purified, no StrR-dependent *in vitro* transcriptional system could be established. In course of the development of this *in vitro* transcriptional system the growth phase-dependent production of StrR and the StrR-dependent StrB1-activity of two *S. griseus* strains were investigated. Although there were apparent differences in the quantity and the time-scale of the StrR-production, the StrB1-activities occurred simultaneously in both strains at the entry into the stationary growth phase.

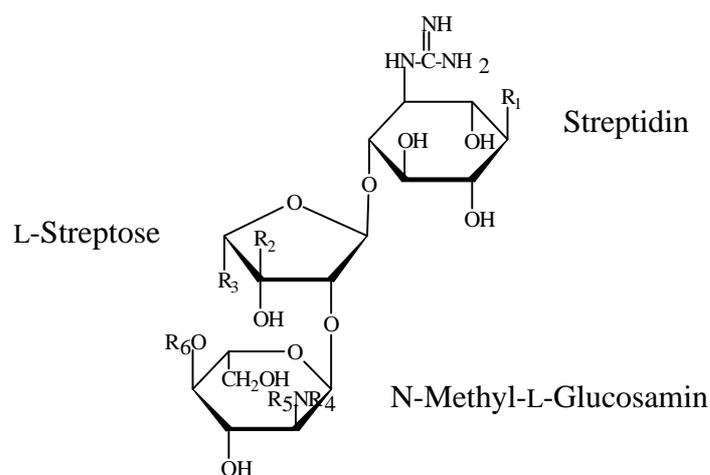
## 1. Einleitung

Streptomyceten gehören zur Ordnung der Actinomycetales und sind weit verbreitete, filamentöse, Gram-positive Bodenbakterien. Der komplexe Lebenszyklus von Streptomyceten beginnt mit dem Auskeimen von Sporen auf nährstoffhaltigem Medium. Nach der Auskeimung bildet sich ein Substratmycel mit verzweigten Hyphen. Gegen Ende der vegetativen Wachstumsphase nimmt der Verzweigungsgrad des Mycels ab, und es kommt zur Ausbildung eines Luftmycels. Durch Einführung von Septen schnüren die Hyphen des Luftmycels Arthrosporen ab (Enquist und Bradley, 1971; Chater, 1993, 1998; Champness und Chater, 1994). Begleitend zu diesem morphologischen Differenzierungsvermögen tritt eine sukzessive Veränderung der Zellphysiologie ein, die zur Biosynthese von Antibiotika und weiterer Sekundärmetabolite wie Geruchsstoffe (z. B. Geosmin) und Pigmente (z. B. Melanin) führt. Antibiotika sind Substanzen, die bereits in geringen Konzentrationen Wachstumshemmungen bei den dafür empfänglichen Organismen hervorrufen. Über 70 % der heute weltweit über 10000 beschriebenen Antibiotika werden von Actinomyceten produziert (Omura, 1992; Gräfe, 1992; Piepersberg und Zeek, 1994; Piepersberg, 1997). Dieser hohe Anteil an biologisch wirksamen Substanzen macht die große Bedeutung der Streptomyceten in der Medizin und Biotechnologie deutlich. Heutzutage werden Streptomyceten-Hochleistungsstämme zur Gewinnung von Antibiotika bereits im 100 m<sup>3</sup> Maßstab fermentiert. Es ist deshalb auch nicht verwunderlich, daß nahezu alle Studien in Bezug auf die Biosynthesewege von Antibiotika in Actinomyceten durchgeführt werden (Piepersberg, 1994). Die Kenntnis aller an der Biosynthese eines Antibiotikums beteiligten Enzyme und Proteine liefert die Möglichkeit, entweder durch gezielten Einsatz und Kombination verschiedener Biosynthese-Enzyme neue Antibiotika zu generieren, oder durch gezielte Beeinflussung der Regulationsmechanismen die Ausbeute eines Antibiotikums in seinem Wirtsstamm zu erhöhen.

## 1.1 Streptomycin und seine Biosynthese

### 1.1.1 Struktur und Wirkung von Streptomycin

Streptomycin (SM) wurde als erstes Aminoglycosid-Antibiotikum (AGA) entdeckt (Schatz et al., 1944). AGA sind Pseudooligosaccharide, die aus unterschiedlichen Zuckern und Aminocyclitolen bestehen (Abb. 1.1; Tab. 1-1; Piepersberg, 1994). Diese können variierende Substituenten besitzen, wobei die Zucker meist Amino- oder Methylaminosubstituenten, die Aminocyclitole Mono- oder Di-Guanidino- bzw. Carbamoylsubstituenten tragen. Die Gruppe der Streptomycine ist nur eine von vielen innerhalb der AGA und hat heute auch nur noch eine geringe Bedeutung (Piepersberg, 1997). Der bekannteste Vertreter, SM, inhibiert die Proteinbiosynthese vieler Gram-positiver und Gram-negativer (einschließlich  $\beta$ -Lactamase-bildender) Bakterien, sowie *Mycobacterium tuberculosis*. Es wirkt jedoch nicht nur auf Prokaryoten toxisch, sondern es besitzt auch erhebliche oto- bzw. nephrotoxische Eigenschaften (Gräfe, 1992). Die Wirkung von SM lässt sich auf die Inhibition der bakteriellen Proteinbiosynthese zurückführen. Der primäre Wirkort ist die 30 S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen (Nierhaus et al., 1973; Moazed und Noller, 1987). Das an die kleine Untereinheit der Ribosomen gebundene SM destabilisiert den  $^f$ Met-tRNA-30 S Initiationskomplex (Modollel und Davies, 1970; Vazquez, 1979). Die relativ kleine Anzahl an Streptomycin-ähnlichen Substanzen besitzt eine hohe Varianz ihrer Substituenten, die sich auf die Untereinheiten Streptidin, L-Streptose und N-Methyl-L-Glucosamin verteilen. In Abb. 1.1 ist die Grundstruktur der zur Gruppe der Streptomycine gehörenden Antibiotika dargestellt.



**Abb. 1.1: Strukturformel des Streptomycin-Grundgerüsts** (aus Piepersberg, 1997). Die drei Bestandteile von Streptomycin sind N-Methyl-L-Glucosamin, L-Streptose und Streptidin. Die Zuordnung der Substituenten R<sub>1</sub>-R<sub>6</sub> erfolgt in Tab. 1-1.

**Tab. 1-1:** Zuordnung der Substituenten im Streptomycin zu Streptomycin-Derivaten.

Derivat	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
Streptomycin	HN–CNH–NH <sub>2</sub>	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
Dihydro- streptomycin	HN–CNH–NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
5'-Hydroxy- streptomycin	HN–CNH–NH <sub>2</sub>	CHO	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	H	H
N-Demethyl- streptomycin	HN–CNH–NH <sub>2</sub>	CHO	CH <sub>3</sub>	H	H	H
Mannosido- hydroxy- streptomycin	HN–CNH–NH <sub>2</sub>	CHO	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	H	α-D-Mannose
Dimannosido- streptomycin	HN–CNH–NH <sub>2</sub>	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	α-D-Mannose- 1,6-α-D-Mannose
Bluensomycin	O-CO-NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
Ashimycin A	HN–CNH–NH <sub>2</sub>	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	2'''-Carboxy- xylo-furanose
Ashimycin B	HN–CNH–NH <sub>2</sub>	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CO-CH <sub>2</sub> OH	α-D-Mannose- 1,6-α-D-Mannose

### 1.1.2 Biosynthese von Streptomycin

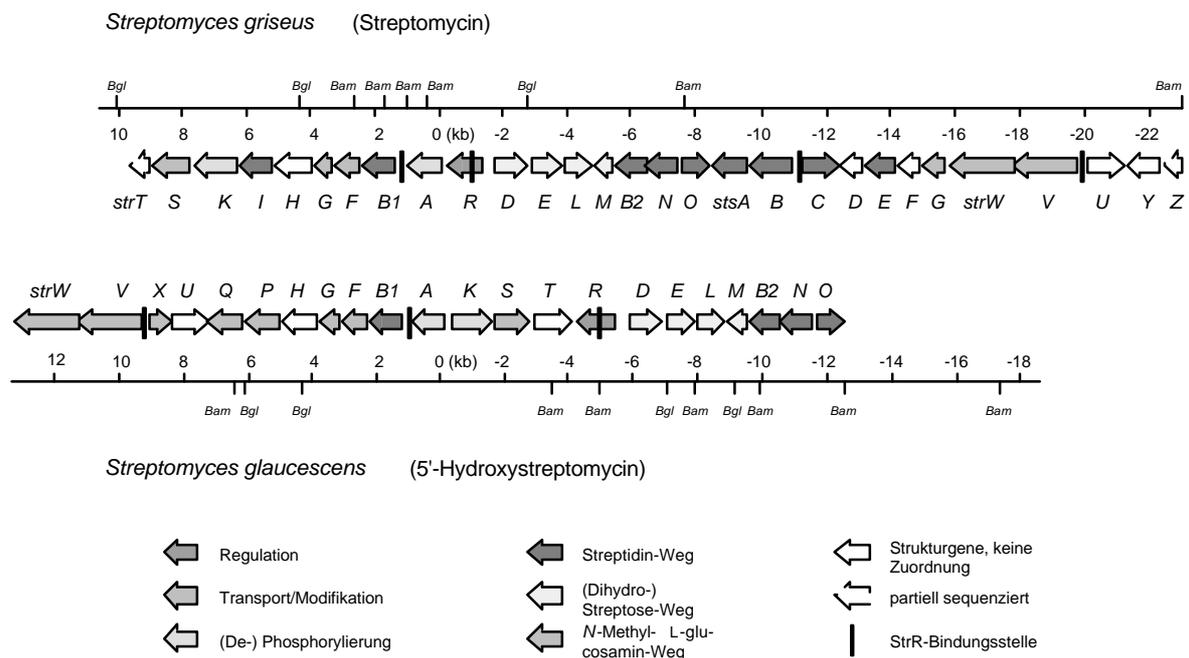
Streptomycin-Produzenten werden aufgrund taxonomischer Systematisierung hauptsächlich durch *S. griseus*, *S. hygroscopicus* und *Streptoverticillium mashuense* repräsentiert (Phillips et al. 1992; Marsh und Wellington 1994; Mehling et al. 1995). Bisher wurde noch keine systematische Einordnung für den 5'-Hydroxy-Streptomycin-Bildner *S. glaucescens* GLA.0 vorgenommen.

Die Biosynthese von Streptomycinen wurde durch Fütterungsstudien mit radioaktiv markierten Vorstufen intensiv untersucht (Demain und Inamine, 1970; Munro et al., 1975; Walker, 1975a, b, 1976; Grisebach, 1978; Rinehart, 1980; Okuda und Ito, 1982; Piepersberg, 1995). Isotopen-Einbauversuche zeigten, daß die drei Untereinheiten von SM aus D-Glucose abgeleitet und über drei Biosynthesewege („pathways“) gebildet werden (Karow et al., 1952; Hunter und Hockenhull, 1955; Horner, 1967). Die drei Untereinheiten N-Methyl-L-Glucosamin, L-Streptose und Streptidin (vgl. Abb. 1.1) werden durch zwei unterschiedliche Glycosyltransferasen miteinander verknüpft (Kniep und Grisebach, 1980a, b). Es entsteht Dihydrostreptomycin-6-phosphat, welches wahrscheinlich während des Exports durch die Zellmembran zum Streptomycin-6-phosphat oxidiert wird (Maier und Grisebach, 1979). Diese Verbindung wird anschließend im Kulturmedium durch eine extrazelluläre alkalische Phosphatase in die biologisch aktive Form überführt (Miller und Walker, 1970, Nimi et al., 1970, Piepersberg, 1994).

### 1.1.3 Genetik der Streptomycin-Biosynthese

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß die SM-Biosynthese von komplexen und chromosomal gelegenen Genclustern codiert wird. Die genetischen Untersuchungen der Streptomycin-Biosynthese in verschiedenen Produzenten begann mit der Klonierung der Streptomycinresistenzgene aus *S. griseus* und *S. glaucescens* (Distler und Piepersberg, 1985; Vögtli und Hütter, 1987; Distler et al., 1987a). Durch Komplementation von Streptomycin-idiotrophen Mutanten und „chromosome walking“ wurden bisher 30 Gene für die Biosynthese von (5'-Hydroxy)-Streptomycin, Bluensomycin und Spectinomycin aus *S. griseus*, *S. glaucescens* und anderen *Streptomyces* spp. kloniert und analysiert (Distler et al., 1987a, b; Mansouri et al., 1991; Distler et al., 1990; Retzlaff et al., 1993; Piepersberg, 1995; Distler und Piepersberg, 1997; Lyutzkanova et al., 1997). In Abb. 1.2 sind die Biosynthesegencluster von *S. griseus* und *S. glaucescens* miteinander verglichen. Aufgrund der Funktion ihrer Genprodukte unterscheidet man vier Klassen von Genen: Biosynthese- (z. B. *strBIFG*, *strDEM*), Regulations- (*strR*), Resistenz- (*strA*) und mögliche Transportgene (z. B. *strVW*). Das zentrale Element in beiden Biosynthesegenclustern ist das Resistenzgen *strA*, um welches sich alle anderen Gene gruppieren. Unterschiede zwischen beiden Clustern basieren nicht auf der Verschiebung einzelner Gene sondern ganzer Gengruppen, die

ihre Seite als Transkriptionseinheit in variabler Länge und Orientierung vorkommen. Bisher konnten noch nicht alle Gene identifiziert werden, die an der 5'-Hydroxy-SM-Biosynthese beteiligt sind. In *S. griseus* konnte außerdem ein weiteres Resistenz-vermittelndes Gen (*aphE*) identifiziert werden, welches außerhalb dieses Genclusters lokalisiert ist (Heinzel et al., 1988). Desweiteren sind sowohl in *S. griseus* als auch in *S. glaucescens* innerhalb der SM-Biosynthesegencluster Leserahmen vorhanden, die im jeweils anderen Organismus bisher nicht identifiziert werden konnten (z. B. *strI*, *strY*, *strZ*, *strP*, *strQ*, *strX*).



**Abb. 1.2: Biosynthesegencluster für Streptomycin aus *S. griseus* und 5'-Hydroxystreptomycin aus *S. glaucescens*.** Darstellung der an Biosynthese, Transport und Regulation beteiligten Gene (Pfeilsymbole). Wichtige Restriktionsschnittstellen sowie Entfernung relativ zum zentral gelegenen Resistenzgen *strA* sind angegeben: Bgl, *Bgl*III; Bam, *Bam*HI.

## 1.2 Regulation der Streptomycin-Biosynthese

Die Regulation von Antibiotika-Biosynthesen wurde weitestgehend in zwei Modellspezies, *S. griseus* (Horinouchi und Beppu, 1994; Distler und Piepersberg, 1997) und *S. coelicolor* A3(2) (Chater, 1993; Chater und Bibb, 1997) untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, daß neben den Nährstoffkomponenten auch Stoffwechselweg-spezifische Regulatoren sowie

übergeordnete (pleiotrope) Regulationsprozesse von essentieller Bedeutung für die Sekundärstoffsynthese sind. Ähnlich eukaryotischen Systemen scheinen zeitlich determinierte, hintereinander geschaltete, komplexe Regulationsprozesse abzulaufen, an denen Hormon-ähnliche Moleküle, Proteinkinasen, spezifische Rezeptoren, und Effektorproteine beteiligt sind (Chater und Bibb, 1997). Ein wichtiger physiologischer Aspekt der Antibiotikasyntese bei Streptomyceten ist, daß sie Antibiotika in der stationären Wachstumsphase oder bei geringen Wachstumsraten produzieren. Dies ist nicht nur auf das Wachstum in Submerskulturen beschränkt, sondern auch auf festen Medien ist die Antibiotikasyntese Wachstumsphasen-abhängig (z.B. Olandomycin-Syntese in *S. antibioticus*; Méndez et al., 1985). In vielen anderen Fällen findet man eine zeitliche Korrelation zwischen Antibiotikasyntese und morphologischer Differenzierung. Deshalb wurden bereits auch sogenannte pleiotrope Gene (z. B. *bld*, *afsR*) in *Streptomyces* spp. identifiziert, die sowohl die Antibiotikasyntese als auch die Sporulation beeinflussen (Chater und Bibb, 1997).

### 1.2.1 Regulation durch Medienkomponenten

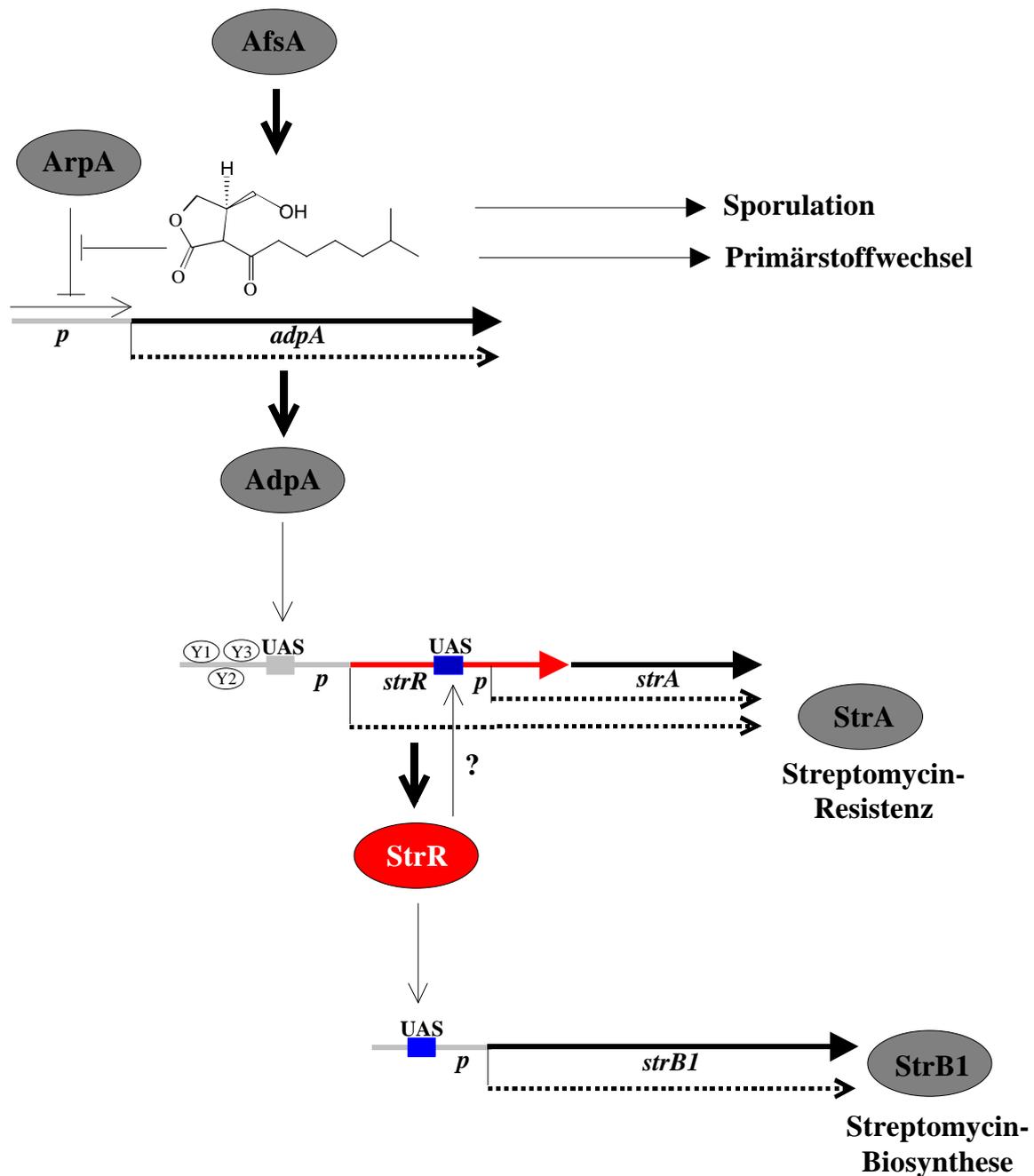
Medienkomponenten wie Phosphat, Ammonium als N-Quelle und Glucose als C-Quelle beeinflussen durch ihre Konzentrationen die Menge an produziertem SM (Shapiro, 1989). So inhibiert eine hohe Phosphatkonzentration im Medium die extrazelluläre alkalische Aminoglycosidphosphat-Phosphatase, welche die Dephosphorylierung von SM-Phosphat zum biologisch aktiven SM katalysiert. Das Ergebnis ist die Anreicherung von biologisch inaktivem SM-Phosphat im Nährmedium (Mansouri und Piepersberg, 1991). Bisher gibt es keinen Nachweis dafür, daß cAMP bzw. Glucose die SM-Produktion in *S. griseus* direkt, d. h. über Repression der *str*- bzw. *sts*-Gene, beeinflußt (Neumann et al., 1996). Der Einfluß von cAMP ist bei Gram-negativen Bakterien schon beschrieben worden (Lange und Hengge-Arronis, 1994). Es gibt jedoch Hinweise, daß die Glucose-Kinase in Streptomyceten eine entscheidende Rolle bei der Katabolit-Repression spielt (Kwakmann und Postma, 1994). Die Funktion der Glucose-Kinase in der SM-Produktion wurde bisher noch nicht detailliert untersucht, und die molekularen Mechanismen der Glucose-Repression sind in Streptomyceten noch unklar. In wenigen Beispielen konnte eine Repression der Transkription spezifischer Biosynthesegene durch Glucose (Phenoxazinon Synthase in *S. antibioticus*;

Jones, 1985) oder Phosphat (Candicidin-Synthese in *S. griseus*; Asturias et al., 1990; Actinorhodin-Synthese in *S. coelicolor*; Hobbs et al., 1992) nachgewiesen werden. Allerdings ist der Anteil der Nährstoffverfügbarkeit an der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Sekundärmetabolitsynthese nur schwer abzuschätzen, da die das Wachstum limitierenden Faktoren nur anhand weniger Beispiele bestimmt wurden. Gleichzeitig wird selbst in einer Spezies die Synthese unterschiedlicher Metabolite (z. B. Melanin-, Cephamycin C- und Thienamycin-Synthese in *S. cattleya*) durch die Limitierung unterschiedlicher Nährstoffe induziert und ist außerdem von den Fermentationsbedingungen („Batch“- oder „Chemostat“-Kultur) abhängig. Der Verbrauch eines Nährstoffes im Medium reduziert nicht nur die Wachstumsrate, sondern führt auch zu einem Ungleichgewicht im Metabolismus. Der Einfluß von N-Quellen auf die SM-Produktion wurde ebenfalls schon untersucht. Ammonium hemmt die Synthese von SM (Shapiro, 1989), wohingegen Nitrat und einige Aminosäuren wie Asparagin und Prolin dessen Produktion fördern (Basak und Majumdar, 1973; Shapiro, 1989). Dagegen führt Valin zur Repression der SM-Biosynthese (Ensign et al., 1988; Neumann et al., 1996). An der Induktion der Streptomycinbiosynthese könnten auch Proteinkinasen beteiligt sein. Zumindest verhindern Proteinkinaseinhibitoren wie Staurosporin die Synthese von SM, ohne das Wachstum von *S. griseus* zu beeinflussen (Neumann et al., 1996).

### 1.2.2 Globale Regulationsvorgänge – A-Faktor

Im Jahr 1967 wurde aus dem Kulturüberstand von *S. griseus* eine niedermolekulare Substanz identifiziert, welche als A-Faktor bezeichnet wurde (Abb. 1.3; Khokhlov et al., 1967). A-Faktor ist ein  $\gamma$ -Butyrolacton-Derivat (2-(6'-Methylheptanoyl)-3R-hydroxymethyl-4-butanolid). A-Faktor ist ein Hormon-ähnlicher Autoinduktor, der nicht nur essentiell für die Differenzierung ist, Synthese und Resistenz von Streptomycin, sondern auch eine Vielzahl weiterer Phänotypen, wie z. B. die Bildung von Luftmycel und die Sporulation, in *S. griseus* beeinflusst. A-Faktor-ähnliche Moleküle spielen auch in anderen Organismen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von verschiedenen Stoffwechselprozessen wie Differenzierung und Produktion von Sekundärmetaboliten in Streptomyceten, Biolumineszenz bei *Vibrio* spp., Virulenz bei *Pseudomonas aeruginosa* und Konjugation bei *Agrobacterium tumefaciens* (Beppu, 1995). Der Einfluß von A-Faktor auf Enzyme des Primärstoffwechsels (PEP-Carboxylase) in *S. griseus* wurde kürzlich ebenfalls nachgewiesen

(H. Thomas, pers. Mitteilung). Beppu und Horinouchi konnten zeigen, daß für die Synthese von A-Faktor das *afsA*-Genprodukt notwendig ist (Horinouchi und Beppu, 1984; Horinouchi et al., 1989). Anscheinend ist AfsA die einzige Komponente für die A-Faktor-Biosynthese, die aus einem Glycerinderivat und einer  $\beta$ -Ketosäure, die sich möglicherweise aus dem Leucin- oder Isoleucinstoffwechsel ableitet, besteht (Sakuda et al., 1992). Gleiches wurde auch für die Biosynthese der A-Faktor-ähnlichen Virginabutylolide in *S. virginiae* gefunden (Okamoto et al., 1995). Durch die Arbeiten von Onaka et al. (1995) wurde das A-Faktor-Rezeptorgen identifiziert und analysiert. Dieses Gen, *arpA*, codiert für das sog. A-Faktor-Rezeptorprotein. ArpA ist der Ausgangspunkt der von Beppu und Horinouchi postulierten A-Faktor-abhängigen Regulationskaskade zur Differenzierung und SM-Produktion in *S. griseus* (Horinouchi und Beppu, 1994; Beppu, 1995). Das Schema der Regulationskaskade wurde erst kürzlich durch Horinouchi berichtigt (vgl. Abb. 1.3; S. Horinouchi, pers. Mitteilung). Bei Abwesenheit von A-Faktor bindet ArpA als Repressor an die Promotorregion eines Gens, welches für den A-Faktor-abhängigen Transkriptionsaktivator AdpA codiert. Die stromaufwärts des *adpAp*-Promotors gelegene DNA-Sequenz für die Bindung von ArpA wurde von Onaka et al. (1997) veröffentlicht und ist ein 24 bp langer „inverted repeat“. Molekulare Mengen von 1 nM A-Faktor genügen bereits, um für die Ablösung von ArpA von der *adpAp*-Promotorregion zu sorgen, womit die Transkription des *adpA*-Gens in Gang gesetzt wird und letztlich das AdpA-Protein gebildet werden kann. Die Bildung von AdpA bewirkt schließlich dessen DNA-Bindung an die stromaufwärts der *strRp*-Promotorregion gelegene DNA-Bindestelle (UAS – „upstream activating sequence“) und die Expression des *strR*-Gens. Durch Gelretardierungsassays mit Proteinextrakten aus *S. griseus* wurde die Existenz von drei weiteren, in der Nähe der *strRp*-Promotorregion bindenden Proteinen (Y1-Y3) nachgewiesen, deren Produktion in *S. griseus* jedoch A-Faktor-unabhängig ist (Vujaklija et al., 1993). Diese Proteine beeinflussen möglicherweise im Zusammenspiel mit AdpA die Aktivierung der Expression des *strR*-Gens als bicistronisches Transkript zusammen mit dem Resistenzgen *strA*. StrR schließlich bindet an die UAS von Promotoren verschiedener, jedoch nicht aller, SM-Biosynthesegene (z. B. *strB1*, Amidinotransferasegen) und aktiviert deren Expression.



**Abb. 1.3: Modell der A-Faktor-abhängigen Regulationskaskade für die Aktivierung der Expression von *strB1* und *strA* durch StrR** (modifiziert nach Horinouchi und Beppu, 1994; S. Horinouchi, pers. Mitteilung). Das Genprodukt von *afsA* (AfsA) erzeugt die Synthese von A-Faktor, welcher an das Repressorprotein ArpA bindet und damit die Derepression des *adpAp*-Promotors (*p*) bewirkt. A-Faktor hat ebenso einen Einfluß auf die Sporulation und den Primärstoffwechsel von *S. griseus*. Das Genprodukt von *adpA* (AdpA) ist ein Transkriptionsaktivator, der gemeinsam mit den Proteinen Y1-Y3 an die stromaufwärts des *strRp*-Promotors gelegene „upstream activating sequence“ (UAS) die Transkription des bicistronischen *strR-strA*-Transkripts bewirkt. Es entstehen die Proteine StrR und StrA. StrA vermittelt die Resistenz des Organismus gegen Streptomycin. Das Protein StrR wirkt als „pathway“-spezifischer Transkriptionsaktivator durch DNA-Bindung an die UAS einiger Promotoren von Streptomycin-Biosynthesegenen (z. B. *strB1p*). Die DNA-Bindung von StrR an die UAS stromaufwärts des innerhalb des *strR*-Gens gelegenen *strAp*-Promotors wurde bereits experimentell bewiesen (Retzlaff und Distler, 1995). Die physiologische Funktion dieser DNA-Bindung ist noch unklar. Auch ein monocistronisches *strA*-Transkript wurde nachgewiesen, seine Abhängigkeit von StrR jedoch nicht (Distler et al., 1987b).

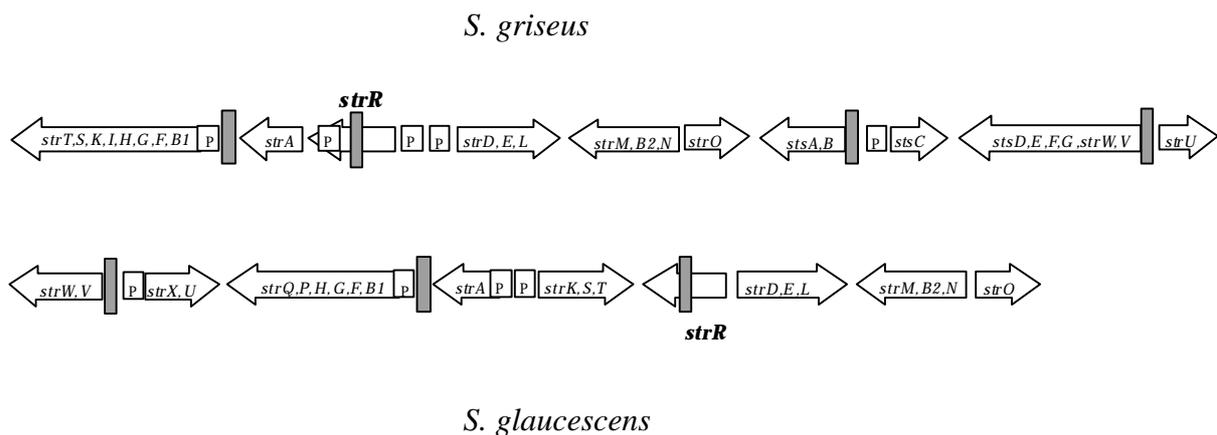
### 1.2.3 „Pathway“-spezifische Regulationsvorgänge - StrR

Der „pathway“-spezifische Regulator der Streptomycin-Biosynthese, StrR, wird von dem zentral im Streptomycin-Biosynthesegencluster gelegenen *strR*-Gen kodiert (vgl. Abb. 1.2). In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß die Transkription des *strR*-Gens von A-Faktor abhängig ist (Distler et al., 1987b; Vujaklija et al., 1991, 1993). Das *strR*-Gen ist bisher das einzige identifizierte *str/sts*-Gen, dessen Expression direkt durch A-Faktor induziert wird (vgl. Abb. 1.3). Northern-Analysen lieferten außerdem die Tatsache, daß das *strR*-Gen allein oder zusammen mit dem benachbarten Streptomycin-Resistenzgen, *strA*, von einem einzigen Promotor (*strRp*) transkribiert wird (vgl. Abb. 3.1; Distler et al., 1987b).

Die Funktion von StrR als Aktivator der Streptomycinbiosynthese wurde zunächst basierend auf Komplementations- und Kreuzfütterungsexperimenten von Streptomycin-idotrophen *S. griseus* Mutanten postuliert (Ohnuki et al., 1985). In S1-mapping-Experimenten von Distler et al. (1987b) war nur ein *strBI*-Transkript nachzuweisen, wenn gleichzeitig ein funktioneller StrR-Aktivator synthetisiert wurde. Damit konnten alte Ergebnisse, die lediglich eine StrR-abhängige Aktivität der Amidinotransferase StrB1 zeigten (Distler et al., 1985b), auf *strBI*-Transkriptionsebene bestätigt werden. Obwohl zunächst, basierend auf *in vivo strBIp*-Promotorstudien, ein Antiterminationsmechanismus für die Aktivierung der *strBI*-Genexpression vermutet wurde (Distler et al., 1990; Peschke et al., 1991), zeigten die Untersuchungen von Retzlaff (Retzlaff und Distler, 1995), daß StrR ein DNA-bindendes Protein ist, welches durch Interaktion mit der *strBIp*-Promotorregionen die Transkription des *strBI*-Gens aktiviert. StrR ist somit ein Transkriptionsaktivator. Die für die Aktivierung des *strBIp*-Promotors verantwortliche DNA-Region wurde in „Promotor-probe“-Experimenten eingehend analysiert. Es konnte dadurch gezeigt werden, daß ein DNA-Element stromaufwärts von Position -61 des *strBI*-Genstarts für die Aktivierung des *strBIp*-Promotors verantwortlich ist (Retzlaff und Distler, 1995). Elemente stromabwärts des Promotors *strBIp* scheinen keinen signifikanten Einfluß auf diesen Prozess zu haben. Es wurden DNaseI „footprinting“-Experimente mit partiell gereinigtem StrR-Protein (aus heterologer Produktion in *E. coli*) am kodierenden Strang von *strBIp* durchgeführt. In Abhängigkeit der eingesetzten DNaseI-Konzentration schützte StrR stromaufwärts des *strBIp*-Promotors die Region von -81 bis -109 oder -70 bis -140 vor Hydrolyse (Retzlaff und Distler, 1995). Durch Gelretardierungsexperimente mit in *E. coli* heterolog produziertem StrR-Protein konnte auch gezeigt werden, daß für dessen Interaktion mit dem *strBIp*-Fragment keine weiteren

Streptomyceten-spezifischen nieder- oder hochmolekularen Faktoren für die StrR/DNA-Interaktion notwendig sind. Gelretardierungsexperimente mit in *E. coli* heterolog produziertem His-tag-StrR zeigten zusätzlich, daß ein N-terminal fusioniertes, insgesamt 21 As (davon 12 Histidine) enthaltendes Peptid für die DNA-Bindeaktivität von StrR nicht störend wirkt (Retzlaff und Distler, 1995).

Bisher konnten 7 StrR-Bindestellen in den *str/sts* Genclustern von *S. griseus* und *S. glaucescens* identifiziert und ihre Interaktion mit StrR durch Gelretardierungs- und/oder „DNaseI-footprinting“-Experimente nachgewiesen werden (Beyer et al., 1996; Retzlaff und Distler, 1995). Mit Ausnahme von zwei Bindestellen befinden sich die StrR-Bindestellen in intercistronischen DNA-Bereichen und stromaufwärts von *str/sts*-Promotoren der Gene *strB1*, *strU*, *stsC*, und *stsB* (*S. griseus*) sowie *strX* und *strV* (*S. glaucescens*) (Abb 1.4). Auch für die *S. griseus*-Promotoren *stsCp*, *stsBp* und den Promotor *strVp* aus *S. glaucescens* wurde mittels „Promotor-probe“-Vektoren eine StrR-Aktivierung *in trans* nachgewiesen (Ahlert et al., 1997; Beyer et al., 1996). Diese Daten zeigten, daß die StrR-Bindestellen auch bidirektional wirken können, da durch Bindung von StrR an eine UAS die Transkription zweier divergent angeordneter Promotoren (*stsCp/stsBp* und *strVp/strXp*) aktiviert wird. Die Ergebnisse mit *strVp* führten zusätzlich zu der Erkenntnis, daß das StrR-Protein aus *S. griseus* in der Lage ist, heterologe Promotoren aus *S. glaucescens* zu aktivieren.



**Abb. 1.4: StrR-Bindestellen im SM-Biosynthesegencluster von *S. griseus* und 5'-Hydroxy-SM-Biosynthesegencluster von *S. glaucescens*** (aus Retzlaff und Distler, 1995). Das *strR*-Gen ist jeweils fett herausgestellt, die StrR-Bindestellen sind durch schraffierte Rechtecke und in der Nähe dieser Bindestellen befindliche Promotoren für Biosynthesegene durch „P“ gekennzeichnet.

Interessanterweise konnten zwei StrR-Bindestellen innerhalb der *strR*-Gene in *S. griseus* und *S. glaucescens* identifiziert und ihre Interaktion mit dem StrR-Protein durch Gel-Retardierungsexperimente bewiesen werden (Retzlaff und Distler, 1995; diese Arbeit). Über die Funktion dieser StrR-Bindestellen wird allerdings noch spekuliert. Möglicherweise dienen diese internen StrR-Bindestellen einer „feed back“-Regulation der *strR*-Expression. Bisher konnten jedoch diesbezüglich noch keine Hinweise gefunden werden (L. Retzlaff, pers. Mitteilung). In *S. griseus* ist auch die Aktivierung der Transkription des stromabwärts gelegenen Streptomycin-Resistenzgens *strA* möglich (vgl. Abb. 1.3; Abb. 1.4). Dort wurde 340 bp stromabwärts dieser *strR*-internen StrR-Bindestelle der Promotor für die monocistronische *strA*-Expression gefunden. Jedoch konnte durch die zugehörigen Arbeiten mit „Promotor-probe“-Vektoren von Distler et al. (1987b) keine direkte Abhängigkeit der *strA*-Transkription von StrR nachgewiesen werden. Auch die Arbeitsgruppe Beppu fand bei ihren Untersuchungen der Promotoren *strAp(aphDp2)* und *strRp* in *S. griseus* keine Hinweise auf eine Regulation durch StrR (Vujaklija et al., 1991). Für eine Aktivierung der *strA*-Expression durch StrR sprechen jedoch die Ergebnisse von Ohnuki et al. (1985). Die Streptomycin-idiotrophe Mutante SM196 zeigt gleichzeitig keine Streptomycin-Phosphotransferase-(StrA)-Aktivität. Beide Phänotypen, Streptomycinproduktion und StrA-Aktivität konnten in SM196 durch ein intaktes *strR* wiederhergestellt werden, was wiederum für eine StrR-abhängige Expression des *strA*-Gens spricht. Während in *S. griseus* die Funktion der *strR*-internen StrR-Bindestelle zur Aktivierung des stromabwärts gelegenen *strA*-Gens immerhin noch denkbar wäre, stellt sich in *S. glaucescens* jedoch die Situation anders dar. Hier ist eine Beteiligung der *strR*-internen StrR-Bindestelle an der Aktivierung eines stromabwärts gelegenen Promotors sehr unwahrscheinlich, da das stromabwärts gelegene Gen (*strT*) konvergent zu *strR* orientiert ist (vgl. Abb. 1.4).

#### **1.2.4 Vergleich von StrR mit anderen „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktivatoren in Streptomyceten**

Die Klasse der „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktivatoren in Streptomyceten unterteilt sich im wesentlichen nach Vorhandensein und Lage des für die DNA-Bindung verantwortlichen Helix-Turn-Helix-(HTH)-Motivs in drei Unterklassen. In Tab. 1-2 sind in *Streptomyces* spp. identifizierte „pathway“-spezifische Transkriptionsaktivatoren sowie deren typische Eigenschaften aufgezählt. Die größte Unterklasse bilden die SARP-Proteine

(„Streptomyces antibiotic regulatory proteins“; Wietzorrek und Bibb, 1997). Die SARP-Proteine sind dadurch gekennzeichnet, daß sie als Transkriptionsaktivatoren von Antibiotika-Biosynthesegenen keine definierten HTH-Motive besitzen. Die Regionen dieser Proteine, welche für die DNA-Bindung und Wechselwirkung mit RNA-Polymerase verantwortlich sind, wurden im C-Terminus postuliert. Der Vergleich der As-Sequenzen ist sehr heterogen und eindeutige Zuordnungen zu funktionellen Domänen dieser Proteine sind sehr schwierig (Wietzorrek und Bibb, 1997). Sowohl im Actinorhodin- wie auch im Daunorubicin-Biosynthesegencluster wurden stromaufwärts von Promotoren für die aktivierten Biosynthesegene heptamere repetitive DNA-Sequenzen („direct repeats“) als mögliche DNA-Bindestellen für ActII-ORFIV und DnrI postuliert (Chater und Bibb, 1997). Die charakteristischen Vertreter der SARP-Familie, ActII-ORFIV und RedD, wurden auch in Hinblick auf die wachstumsphasen-abhängige Expression ihrer Gene untersucht. In S1-mapping-Experimenten wurde gezeigt, daß *actII-ORFIV* bereits während der mittleren exponentiellen Wachstumsphase von *S. coelicolor* transkribiert wird (Gramajo et al., 1993). Währenddessen wurde mRNA von *redD* erst zum Übergang in die stationäre Wachstumsphase nachgewiesen (Takano et al., 1992). Die durch RedD aktivierte Antibiotika-Produktion wurde ebenfalls zum Zeitpunkt des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase nachgewiesen. Im Falle von ActII-ORFIV korrelierte jedoch die Bildung des Transkriptionsaktivators zeitlich nicht mit der Actinorhodin-Produktion. Die Ursache für die zeitliche Diskrepanz zwischen der frühen Bildung von ActII-ORFIV und dem erst späteren Nachweis des produzierten Antibiotikums konnte bisher noch nicht gefunden werden (M. Bibb, pers. Mitteilung).

Gene, welche für StrR-ähnliche Proteine codieren, wurden im 5'-Hydroxy-Streptomycin-Biosynthesegencluster von *S. glaucescens* (Mayer, 1994) und im Spectinomycin-Biosynthesegencluster von *S. flavopersicus* (Lyutskanova et al., 1997) identifiziert. Die translatierten Genprodukte führen zu einer neuen Unterklasse von Streptomyceten-typischen „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktivatoren, die mit Ausnahme von guten Dodd-Egan-„scores“ (Dodd und Egan, 1990) für ein relativ in der Proteinmitte gelegenes mögliches DNA-bindendes HTH-Motiv keine Ähnlichkeiten zu anderen Regulatorproteinen besitzen. Die Tatsache jedoch, daß die Proteine aus *S. glaucescens* und *S. flavopersicus* „scores“ für HTH-Motive besitzen, legt die Vermutung nahe, daß beide Proteine ebenfalls als „pathway“-spezifische Transkriptionsaktivatoren innerhalb ihrer Biosynthesegencluster wirken. Proteine mit HTH-Motiven sind die typischen Vertreter von DNA-bindenden Proteinen und

interagieren in der Regel mit palindromen DNA-Sequenzen („inverted repeats“) (Matthews et al., 1982; Pabo und Sauer, 1992; Ptashne, 1992). Diese Tatsache gilt ebenfalls für das StrR-Protein (Retzlaff und Distler, 1995). Die StrR-Bindestellen sind 29 bp lange, unvollständige Palindrome („inverted repeats“) und haben die Consensus-Sequenz GTTCgActG-N<sub>11</sub>-CagTcGAAC.

**Tab. 1-2:** Beispiele und Charakteristika von „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktivatoren in Streptomyceten.

<b>Protein- Bezeichnung</b>	<b>Antibiotika- Biosynthese</b>	<b>Protein- Unterklasse</b>	<b>Organismus</b>	<b>Referenz</b>
ActII-ORFIV	Actinorhodin	SARP ( <b>kein HTH Motiv</b> )	<i>S. coelicolor</i>	Fernandez-Moreno et al., 1991
RedD	Undecylprodigiosin	SARP	<i>S. coelicolor</i>	Takano et al., 1992
DnrI	Daunorubicin	SARP	<i>S. peuceticus</i>	Tang et al., 1996
SnoA	Nogalamycin	SARP	<i>S. nogalater</i>	Ylihonko et al., 1996
CcaR	Cephamicin „clavulanic acid“	SARP	<i>S. clavigulerus</i>	Perez-Llarena et al., 1997  Alexander und Jensen, 1998
StrR	Streptomycin	StrR-Familie <b>(relativ zentral liegendes HTH- Motiv)</b>	<i>S. griseus</i>	Retzlaff und Distler, 1995  diese Arbeit
HstR	5'-OH-Streptomycin	StrR-Familie	<i>S. glaucescens</i>	diese Arbeit
SpcR	Spectinomycin	StrR-Familie	<i>S. flavopersicus</i>	diese Arbeit
BrpA	Bialaphos	LysR-Familie <b>(HTH-Motiv im C-Terminus)</b>	<i>S. hygrosopicus</i>	Raibaud et al., 1991

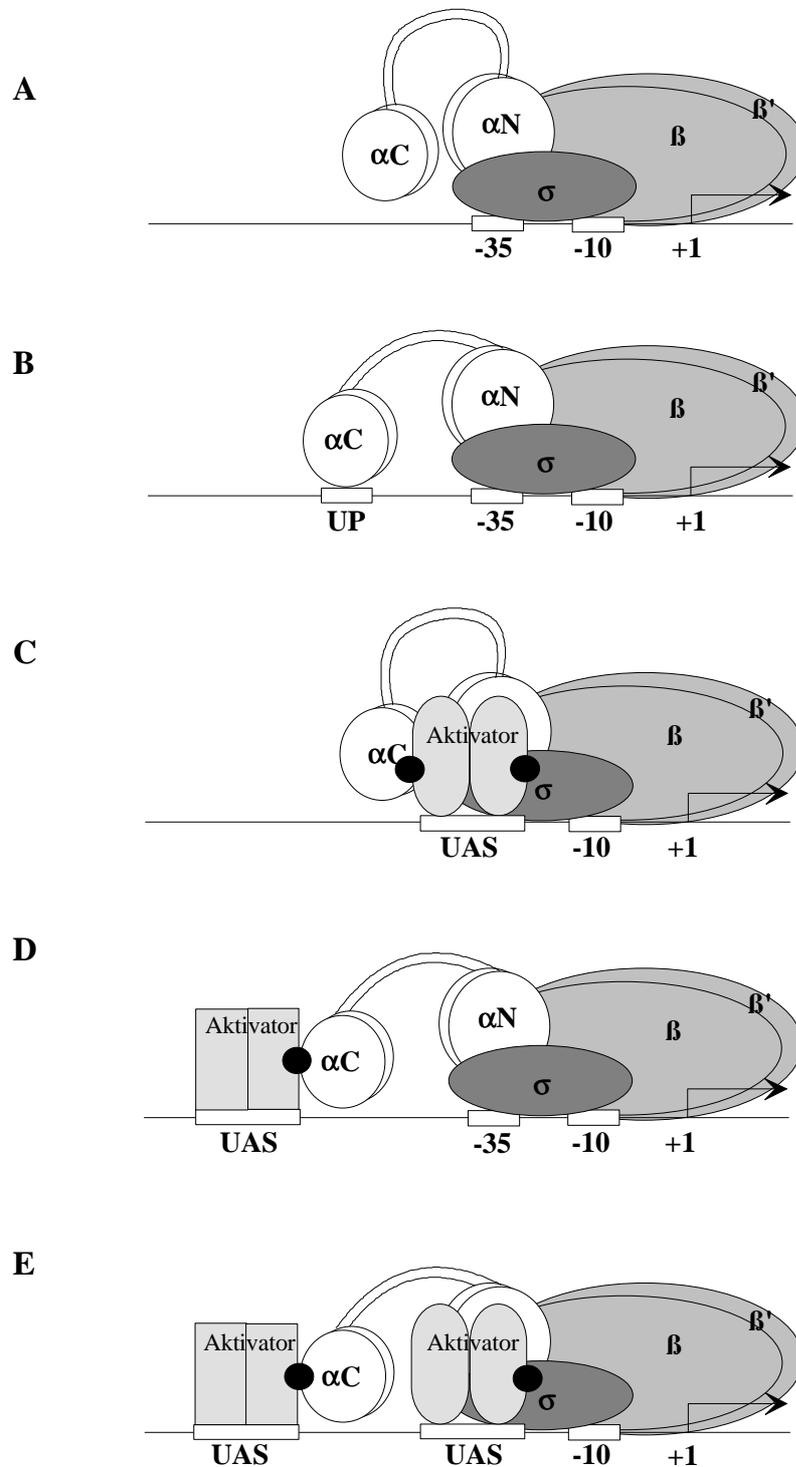
Erst kürzlich wurde der Transfer des Streptomycin-Biosynthesegenclusters, oder zumindest Teile davon, in Isolaten von *Streptomyces* spp. beschrieben (Egan et al., 1998). Diese Isolate besitzen neben den Genen *strB1*, *strF* und *strN* auch ein *strR*-ähnliches Gen („*strR*“). Interessanterweise werden in einigen dieser Stämme deren „*strR*“-Gene auch exprimiert (D. Kallifidas, pers. Mitteilung). Die Sequenzdaten der „*strR*“-Gene sind noch nicht vollständig, jedoch zeigen die bisher sequenzierten Bereiche Identitäten zwischen 92 - 100 % zu *strR* aus *S. griseus* N2-3-11 (D. Kallifidas, pers. Mitteilung). Möglicherweise sind nach der vollständigen Sequenzierung der „*strR*“-Gene und deren Translation in die entsprechenden Genprodukte weitere Proteine der StrR-Familie verfügbar, auch wenn diese dann direkt vom StrR aus *S. griseus* abgeleitet sind.

Die dritte Unterklasse der Streptomyceten-typischen „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktivatoren wird durch das Protein BrpA gebildet. Durch die C-terminale Lage seines HTH-Motivs wird es als LysR-typisches Protein (Henikoff et al., 1988) eingeordnet. Im N-Terminus des Proteins wurden drei hydrophobe As-Bereiche identifiziert, welche entweder als Transmembrandomänen oder zur Protein-Protein-Interaktion dienen können (Raibaud et al., 1991).

### **1.3 RNA-Polymerasen, Promotorstrukturen und Transkriptionsaktivierung in Prokaryoten**

Prokaryotische RNA-Polymerasen setzen sich aus fünf polypeptidischen Untereinheiten zusammen (Abb. 1.5; Yager und Hippel, 1987). Das „core“-Enzym wird von zwei  $\alpha$ - sowie einer  $\beta$ - und einer  $\beta'$ -Einheit gebildet. Dabei bildet die  $\beta$ -Untereinheit das aktive Zentrum zur Polymerisation von RNA aus Nucleosidtriphosphaten (NTPs), während die  $\beta'$ -Untereinheit unspezifisch an die DNA bindet (Ishihama, 1993). Die zwei  $\alpha$ -Untereinheiten sorgen für eine Stabilisierung des „core“-Enzyms, wobei der C-terminale Bereich ( $\alpha C$ ) außerdem noch Funktionen zur Regulation der Transkriptionsinitiation, entweder durch Kontakt mit der DNA oder durch Wechselwirkungen mit Transkriptionsaktivatoren, übernehmen kann. Das fünfte Polypeptid in RNA-Polymerasen wird durch die  $\sigma$ -Untereinheit ( $\sigma$ -Faktor) gebildet, welche

für die spezifische Erkennung von Promotoren sowie die Initiation der Transkription verantwortlich ist (Helmann und Chamberlain, 1988).



**Abb 1.5: Modell zur Transkriptionsaktivierung durch RNA-Polymerase und Transkriptionsaktivatoren in *E. coli*** (aus Busby und Ebright, 1994). Erklärungen und Abkürzungen sind im Text enthalten.

Der Zusammenhang zwischen Promotorstruktur und Transkriptionsaktivierung wurde vor allem in *E. coli* intensiv untersucht und in einem Modell beschrieben (Busby und Ebright, 1994). Die typische *E. coli*-Promotorstruktur einer -35 (Consensus-Sequenz: 5'-TTGACA-3') und -10 (Consensus-Sequenz: 5'-TATAAT-3') Region (Gross et al., 1992), wird vom Hauptsigma-Faktor ( $\sigma$ ) der RNA-Polymerase,  $\sigma^{70}$  erkannt (vgl. Abb. 1.5 A).

Zusätzlich zu dieser Promotorstruktur wurde in jüngster Vergangenheit ein drittes, stromaufwärts der -35 Region gelegenes Element (UP-Element) entdeckt, welches in einigen *E. coli* Promotoren zu finden ist (Newlands et al., 1992; Ross et al., 1993; Rao et al., 1994). Es wurde festgestellt, daß bei zusätzlichem Vorhandensein eines solchen UP-Elements die Transkription des stromabwärts gelegenen Gens drastisch erhöht ist. Gleichzeitig wurde postuliert, daß die *E. coli*-RNA-Polymerase alle drei Elemente eines solchen Promotors erkennen kann (Busby und Ebright, 1994). Durch die Experimente von Ross und Blatter wurde bewiesen, daß nur die C-terminale Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit der *E. coli*-RNA-Polymerase an der Erkennung von UP-Elementen beteiligt ist (vgl. Abb. 1.5 B; Ross et al., 1993; Blatter et al., 1994). Der N-terminale Teil der  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha$ N) bildet mit den beiden Einheiten  $\beta$ ,  $\beta'$  das „core“-Enzym der RNA-Polymerase (vgl. Abb. 1.5 B). Die Stärke eines Promotors regelt sich nach diesen Erkenntnissen nach dem Vorhandensein eines solchen UP-Elements und gleichzeitig nach der Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz für die -35 und/oder -10 Regionen. Viele Promotoren in *E. coli* sind jedoch durch Transkriptionsaktivatoren reguliert (Gralla und Collado-Vides, 1996). Transkriptionsaktivatoren binden an zusätzlichen, stromaufwärts der Promotor-Elemente gelegenen, DNA-Bindestellen (UAS; Ishihama et al., 1993). Die Entfernung der UAS in solchen Promotoren differiert jedoch und kann sowohl innerhalb der -35 Region (Gralla und Collado-Vides, 1996) als auch mehrere kb stromaufwärts der jeweiligen Promotoren liegen (Wedel et al., 1990). Transkriptionsaktivatoren, welche innerhalb der -35 Region eines Promotors an die DNA binden, interagieren (●-Symbole in Abb. 1.5) in der Regel mit dem  $\sigma$ -Faktor der RNA-Polymerase. Die Untersuchungen von Wing et al. (1995) mit dem FNR-Protein aus *E. coli* zeigten jedoch, daß in der -35 Region gebundenes FNR-Protein gleichzeitig sowohl mit dem  $\sigma$ -Faktor als auch mit der  $\alpha$ -Untereinheit der *E. coli*-RNA-Polymerase interagieren kann (vgl. Abb. 1.5 C). Stromaufwärts der -35 Region bindende Transkriptionsaktivatoren interagieren ausschließlich mit der C-terminalen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase (vgl. Abb. 1.5 D; Busby und Ebright, 1994). Außerdem wurden bereits verschiedene artifizielle Promotoren mit UAS für zwei unabhängige Transkriptionsaktivatoren hergestellt, wobei sich eine UAS

innerhalb der -35 Region und gleichzeitig die zweite UAS stromaufwärts der -35 Region befindet (vgl. Abb. 1.5 E; Joung et al., 1994). Der Abstand der UAS zum Promotor und damit zur RNA-Polymerase scheint jedoch nicht völlig frei zu variieren. Experimente mit dem FNR-Protein aus *E. coli* zeigten, daß die Transkriptionsaktivierung durch FNR immer nur dann gegeben war, wenn der Abstand der FNR-UAS zum Promotor ein Vielfaches einer DNA-Helixwindung (-41,5; -61,5; -71,5; -82,5 bp bezüglich des Transkriptionsstartes (+1)) betrug (Wing et al., 1995). Entsprechende Ergebnisse lieferten die Experimente von Zhou et al. (1994). Hier wurde immer dann eine Transkriptionsaktivierung durch das CAP-Protein aus *E. coli* gemessen, wenn der Abstand zwischen Transkriptionsstart und CAP-UAS 61,5; 71,5; 82,5 oder 92,5 Nucleotide betrug. Dieses Phänomen wird dadurch erklärt, daß sich zur Gewährleistung einer Transkriptionsaktivierung sowohl Aktivator als auch RNA-Polymerase auf der gleichen Seite der DNA befinden müssen, um miteinander in Kontakt zu kommen (Wing et al., 1995).

Der Mechanismus der Aktivierung von RNA-Polymerase durch Transkriptionsaktivatoren wurde vor allem für das CAP-Protein aus *E. coli* intensiv untersucht. Für die Biochemie der Transkriptionsaktivierung durch RNA-Polymerase ohne Transkriptionsaktivatoren (vgl. Abb. 1.5 A) wurden aber zunächst die Arbeiten von Chamberlin (1974) und McClure (1985) zugrunde gelegt. Demzufolge wird die Initiation der Transkription durch RNA-Polymerase wie folgt beschrieben:



Zunächst erkennt die RNA-Polymerase (RNAP) den Promotor (P) und bildet durch Bindung an diesen einen geschlossenen Komplex ((RNAP-P)<sub>c</sub>). Die Komplexbildungskonstante ist K<sub>B</sub> und die von der RNA-Polymerase gebundene DNA liegt hier noch als Doppelhelix vor. Danach wird ein offener Komplex ausgebildet ((RNAP-P)<sub>o</sub>), welcher im Gegensatz zu (RNAP-P)<sub>c</sub> keiner kompetitiven Hemmung mehr unterliegen kann. Man spricht beim Übergang von (RNAP-P)<sub>c</sub> zu (RNAP-P)<sub>o</sub> von einer Isomerisierung der RNA-Polymerase. Während der Ausbildung des offenen Komplexes wird die von der RNA-Polymerase gebundene DNA aufgeschmolzen und die entstehenden DNA-Einzelstränge stabilisiert (deHaseth und Helmann, 1995). Insgesamt überlappt die RNA-Polymerase einen DNA-Bereich von 6 Helixwindungen (ca. 60 bp; Ptashne, 1992). Das Aufschmelzen der DNA und das Vorhandensein von verfügbaren NTPs bewirkt schließlich den irreversiblen Start der

Transkription und die Bildung von RNA. Es wird angenommen, daß aktivierbare Promotoren eine fehlende Information für wenigstens einen dieser Schritte beinhalten (Adhya und Garges, 1990). Das Maß der Aktivierung des *lacp*-Promotors durch das CAP-Protein wurde schließlich durch das Messen der Komplexbildungskonstanten in An- und Abwesenheit des Aktivator-Proteins ermittelt (Malan et al., 1984). So wurde bei Anwesenheit des CAP-Proteins der Wert für  $K_B$  um den Faktor 20 erhöht. Eine 10-fache Erhöhung von  $k_f$  wurde durch die Arbeiten mit dem  $\lambda$ cI-Protein ermittelt (Shi und Gussin, 1983). Demzufolge wirken Transkriptionsaktivatoren entweder auf die Ausbildung des geschlossenen RNA-Polymerase-Promotor-Komplexes und/oder auf die Isomerisierung der RNA-Polymerase. Worin besteht aber letztlich mechanistisch die Wirkung von Transkriptionsaktivatoren? Für das CAP-Protein wurde ein Modell etabliert, das eine allosterische Veränderung der DNA-Struktur im Bereich zwischen der CAP-Bindestelle und Promotorbereich (Bindestelle für RNA-Polymerase) fordert (Weber und Steitz, 1984). Die Arbeiten von Schultz et al. (1991) ergaben mittels Röntgenstrukturanalyse ein „bending“ der Operator-DNA um  $90^\circ$ , wenn das CAP-Protein an diese gebunden war. Dieses „bending“ bewirkt, so das Modell, eine adäquatere Promotorstruktur für die RNA-Polymerase und demzufolge eine erhöhte Affinität der RNA-Polymerase zum Promotor, was sich auf eine Erhöhung des Wertes für  $K_B$  auswirkt (Adhya und Garges, 1990). Das Modell der Transkriptionsaktivierung beschreibt ebenfalls die Notwendigkeit einer direkten Wechselwirkung zwischen Transkriptionsaktivator und RNA-Polymerase, welche bis zur Ausbildung des offenen Komplexes ((RNAP-P)<sub>o</sub>) bestehen bleibt, danach aber nicht mehr notwendig ist (Zinkel und Crothers, 1991). Die heterologe Protein/Protein-Wechselwirkung zwischen Transkriptionsaktivator und RNA-Polymerase bewirkt einen kooperativen Effekt in der DNA-Bindung beider Proteine (Johnson et al., 1979; Hochschild und Ptashne, 1986; Ren et al., 1988).

Bisher sind keine Ergebnisse in Bezug auf weiterführende Protein-Charakteristika von Streptomycceten-typischen „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktivatoren bekannt. Es gibt für diese Proteine (vgl. Tab. 1-2) bisher keine Untersuchungen über heterologe Protein-RNA-Polymerase-Interaktionen oder über homologe Protein-Protein-Interaktionen. Vor allem für DNA-bindende Proteine sind Multimerisierungen sowohl an „inverted repeats“ als auch an „direct repeats“ charakteristisch. So wurde z. B. eine Dimerisierung für das DNA-gebundene CAP-Protein aus *E. coli* (Freemont et al., 1991) und eine Tetramerisierung für den Lac-Repressor aus *E. coli* identifiziert (Gilbert und Müller-Hill, 1966; Schmitz et al., 1976; Alberti et al., 1991, 1993; Suckow et al., 1996). Andere DNA-bindende Proteine, wie z. B. das NtrC-

Protein aus *E. coli* bilden bereits in Lösung dimere Komplexe aus und sind als Oktamer an die DNA gebunden (Wyman et al., 1997). Die Oktamerisierung ist im Falle von NtrC zwingende Voraussetzung des Proteins, um als Transkriptionsaktivator zu wirken. Für Streptomyceten-typische „pathway“-spezifische Transkriptionsaktivatoren sind bisher ebenso keine experimentellen Daten über Proteindomänen zur Transkriptionsaktivierung verfügbar. Die Aktivierungsdomäne zur direkten Wechselwirkung mit RNA-Polymerase des CAP-Proteins wurde durch Mutantanalyse identifiziert (Zhou et al., 1993; Niu et al., 1994). Diese Domäne umfaßt insgesamt 7 As und befindet sich im Bereich eines „surface-loops“ am C-Terminus des Proteins (As-Bereich 156 - 162). Vor allem für die As Threonin an Position 158 der 209 As langen Proteinkette wurde eine direkte Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase postuliert (Zhou et al., 1994). Im Aktivatorprotein  $\lambda$ cI des  $\lambda$ -Phagen wurde eine aus 10 meist basischen As bestehende Proteindomäne (As-Position 34 - 43) als Aktivierungsdomäne gefunden (Hochschild et al., 1983). Eine Mutante dieses Proteins mit dem As-Austausch D38N zeigte keine Transkriptionsaktivierung mehr (Hochschild et al., 1983). Die Wechselwirkung des Aktivatorproteins erfolgt mit dem  $\sigma$ -Faktor der *E. coli*-RNA-Polymerase (Liu et al., 1994).

## 1.4 RNA-Polymerasen in Streptomyceten

In Streptomyceten wurden RNA-Polymerasen vor allem in den Organismen *S. coelicolor* (Buttner und Brown, 1985; Buttner, 1989), *S. aureofaciens* (Kormanec et al., 1992) und *S. griseus* (Shinkawa et al., 1995a, b, 1996) untersucht. Die molekularen Massen für Polypeptide des „core“-Enzyms differieren im Vergleich zu denen von *E. coli*-RNA-Polymerase und liegen bei 150 - 160 kDa ( $\beta$ ,  $\beta'$ ) und 47 kDa ( $\alpha$ ) (Buttner und Brown, 1985). Streptomyceten zeigen eine hohe Heterogenität bezüglich ihrer  $\sigma$ -Faktoren. Insgesamt wurden bisher in *S. coelicolor* acht verschiedene  $\sigma$ -Faktoren identifiziert. Vier der acht  $\sigma$ -Faktoren ( $\sigma^{\text{hrdA}}$ - $\sigma^{\text{hrdD}}$ ; Westpheling et al., 1985; Tanaka et al., 1988, 1991) sind dem Haupt- $\sigma$ -Faktor ( $\sigma^{70}$ ) von *E. coli* ähnlich. Es wird angenommen, daß zumindest  $\sigma^{\text{hrdB}}$  für die Promotorerkennung von „house-keeping“-Genen in *S. coelicolor* verantwortlich ist (Buttner, 1989). Zumindest ist die Disruption des Gens von  $\sigma^{\text{hrdB}}$  letal für den Organismus. Desweiteren zeigten *in vitro* Transkriptionsexperimente von Fuji et al. (1996), daß die Promotoren für die Gene *redD* und *actII-ORFIV* ebenfalls von  $\sigma^{\text{hrdB}}$  erkannt werden. Die Gene *hrdA*, *hrdB* und *hrdD* aus dem

A-Faktor unabhängigen Streptomycin-Produzenten *S. griseus* 2247 wurden bereits ebenfalls kloniert und deren Genprodukte charakterisiert (Shinkawa et al., 1995b, 1996). Die resultierenden  $\sigma$ -Faktoren werden aufgrund von Sequenzidentitäten zur  $\sigma^{70}$ -Familie gezählt. Die Funktion der drei  $\sigma$ -Faktoren in *S. griseus* ist bisher jedoch noch nicht geklärt. Es wird davon ausgegangen, daß alternative  $\sigma$ -Faktoren ihre Funktion in der Wachstumsphasen-abhängigen Differenzierung oder Antibiotika-Synthese ausüben (Buttner, 1990; Potuckova et al., 1995; Chater, 1998). Welche Rolle  $\sigma$ -Faktoren in der Streptomycin-Biosynthese in *S. griseus* spielen, ist jedoch noch nicht bekannt. Allerdings wird der *strB1p*-Promotor aufgrund von Sequenzanalysen zur Familie der „*E. coli*  $\sigma^{70}$ -like“-Promotoren gezählt (Distler et al., 1990; Strohl, 1992), was auf eine Beteiligung eines zur  $\sigma^{70}$ -Familie gehörenden  $\sigma$ -Faktors an der Transkription des *strB1*-Gens schließen läßt.

## 1.5 Aufgabenstellung

Die Induktion der Naturstoffbiosynthesegene in Streptomyceten ist ein komplexer Prozess, an dem übergeordnete und „pathway“-spezifische Regulationsprozesse beteiligt sind. Die SM-Biosynthese in *S. griseus* ist eines der am besten untersuchten Modellsysteme für die Regulation der Naturstoffsynthese in Actinomyceten. In dieser Arbeit sollte ein Beitrag zur Charakterisierung „pathway“-spezifischer Regulationsprozesse der SM-Biosynthesegenexpression in *S. griseus* geleistet werden. Im Mittelpunkt stand die genetische und biochemische Analyse des Transkriptionsaktivators StrR. Durch die Charakterisierung von StrR-Protein-Mutanten sollten die funktionellen Domänen von StrR für die DNA-Bindung, Oligomerisierung und Transkriptionsaktivierung identifiziert und analysiert werden. Die Eigenschaften von StrR und StrR-Protein-Mutanten sollten sowohl über *in vitro* Experimente zur DNA-Bindung und Oligomerisierung als auch über *in vivo* Experimente zur Transkriptionsaktivierung bestimmt werden. Aufbauend auf den Arbeiten von Retzlaff (1996) sollte versucht werden, zusätzlich ein StrR-abhängiges *in vitro* Transkriptionssystem zu etablieren, um die direkte und alleinige Abhängigkeit der Aktivierung der Transkription des *strB1p*-Promotors von StrR nachzuweisen und Einblicke in den molekularen Mechanismus der Transkriptionsaktivierung zu erhalten. Desweiteren war zu überprüfen, ob die Proteine HstR und SpcR tatsächlich zur StrR-Familie gehören. Zu diesem Zweck sollten deren Eigenschaften mit denen des StrR-Proteins verglichen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Wenn nicht anders vermerkt, wurde nur demineralisiertes doppelt destilliertes Wasser verwendet. Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien, Enzyme und Kits wurden von folgenden Firmen bezogen:

#### Chemikalien:

Agarose	Boehringer, Mannheim
Antibiotika	Serva, Heidelberg; Squibb and Sons, Princeton (USA); Sigma, Deisenhofen
Chemikalien, p.a. Qualität	Fluka, Buchs (Schweiz); Merck, Darmstadt; Roth, Kalsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen
dNTP	Boehringer, Mannheim
PVDF-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Medienbestandteile	Difco, Detroit (USA); Gibco BRL, Eggenstein; Merck, Darmstadt; Oxoid, Wesel; Roth, Karlsruhe
Radiochemikalien, Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

#### Enzyme:

Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
DNA Polymerase I Klenow Fragment	Gibco BRL, Eggenstein
DNaseI (RNase-frei)	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	Biolabs, Schwalbach; Boehringer, Mannheim; Gibco BRL, Eggenstein
T4-DNA Ligase (einschl. Puffer)	Gibco BRL, Eggenstein
T4-Polynukleotidkinase (einschl. Puffer)	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Taq DNA-Polymerase (einschl. Puffer)	Gibco BRL, Eggenstein
Vent DNA-Polymerase (einschl. Puffer)	Biolabs, Schwalbach

**Kits:**

Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
Expand™ Long Template DNA PCR Kit	Boehringer, Mannheim
BM Chromogenic Western Blotting Kit	Boehringer, Mannheim
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
T7-Sequenzase 7-deaza-dGTP DNA sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermosequenzase Cycle-Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

**2.2 Medien und Lösungen**

Alle eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung autoklaviert. Nicht hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Sartorius Membranfilter, 0,45 µm Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium oder Puffer nach dem Erkalten zugesetzt. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle prozentualen Angaben bei Feststoffen auf Gewichtsprozent (w/v), bei Flüssigkeiten auf Volumenprozent (v/v).

**2.2.1 Nährmedien****Medien für *E. coli*****LB-Medium** (Miller 1972)

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l*

**LB-Agar** (Miller 1972)

LB-Medium	
Agar	15 g/l

\*Bei Selektion von *E. coli* auf HygromycinB wurden dem Medium nur 5 g/l zugefügt.

**SOB-Medium** (Hanahan 1983)

Bacto-Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
nach dem Autoklavieren	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

**SOC-Medium** (Hanahan 1983)

SOB-Medium	
nach dem Autoklavieren	
Glucose (sterilfiltriert)	20 mM

**Medien für *Bacillus subtilis*****NB-Medium**

Nutrient-Broth (Difco)	8 g/l
MnSO <sub>4</sub>	5 mg/l

**NB-Agar**

NB-Medium	
Agar	15 g/l

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

Sojamehl (entfettet)	20 g/l
Mannit	20 g/l
Agar	22 g/l
Leitungswasser	

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

Saccharose	103 g/l
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	10 g/l
Glucose	5 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
TES-Puffer pH 7,6	20 mM
Bacto-Agar (Difco)	22 g/l
Spurenelemente	2 ml/l
nach dem Autoklavieren	
CaCl <sub>2</sub> (5 M)	2 ml

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

Tryptone Soy Broth (Oxoid)	30 g/l
-------------------------------	--------

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

Tryptone Soy Broth	30 g/l
PEG 8000	50 g/l
nach dem Autoklavieren	
Glycin	5 g/l
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	5 ml

### 2.2.2 Antibiotika

Wenn erforderlich wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol* (in Ethanol)	30 µg/ml
HygromycinB	200 µg/ml
Gentamicin	4 µg/ml
Rifampicin* (in Methanol)	400 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Thiostrepton* (in DMSO)	25 µg/ml

\* Zur Herstellung der Stammlösungen wurde kein Wasser, sondern das angegebene Lösungsmittel verwendet.

### 2.2.3 Verwendete Puffer und Lösungen

#### **Aufschlußpuffer** (Retzlaff und Distler, 1995)

(Herstellung zellfreier Extrakte)

Tris/HCl (pH 8,0)	100 mM
EDTA	0,5 mM
DTT	0,3 mM

#### **Bindungspuffer** (Retzlaff und Distler, 1995)

(Gelretardierungsassays)

Tris/HCl (pH 7,5)	12,5 mM
KCl	62,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
DTT	0,75 mM
Glycerin	5 %

#### **„Folding“-Puffer** (G. Bucca, pers. Mitteilung)

(„Refolding“ von His-tag-StrR)

Tris/HCl (pH 7,7)	100 mM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
ATP	2 mM
DTT	5 mM

#### **FSB-Puffer** (Hanahan, 1983)

(Herstellung kompetenter Zellen)

Kaliumacetat (pH 7,0)	10 mM
KCl	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	45 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> CoCl <sub>3</sub>	3 mM
Glycerin	10 %
pH	6,4
Sterilfiltration	

**Gelfiltrationspuffer** (Buttner und Brown, 1985)

(Anreicherung von RNA-Polymerase)

Na-Phosphat (pH7,0)	50 mM
NaCl	0,5 M
EDTA	0,1 mM
Glycerin	5 %
DTT	0,1 mM

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

(Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten)

Saccharose	103 g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g/l
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	2,02 g/l
Spurenelemente	2 ml
nach dem Autoklavieren	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 %)	10 ml
CaCl <sub>2</sub> (3,68 %)	100 ml
TES (5,73 %; pH 7,2)	10 ml

**Reaktions-Mix** (Bucca et al., 1997)*(in vitro* Transkriptionsassays)

Tris/HCl (pH 7,9)	40 mM
NaCl	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EDTA	6 mM
K-Phosphat (pH 7,5)	0,4 mM
Glycerin	20 %
BSA	0,75 mg/ml
DTT	1,5 mM

**RNAP-Crack-Puffer** (Buttner und Brown, 1985)

(Anreicherung von RNA-Polymerase)

Tris/HCl (pH 7,9)	50 mM
NaCl	233 mM
EDTA	2 mM
Glycerin	5 %
β-Mercaptoethanol	1 mM
DTT	0,1 mM
PMSF	23 mg/ml

**Lagerpuffer** (Buttner und Brown, 1985)

(Lagerung angereicherter RNA-Polymerase)

Tris/HCl (pH7,9)	10 mM
NaCl	0,5 M
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EDTA	0,1 mM
Glycerin	50 %
DTT	0,5 mM

**Probenauftragspuffer** (Laemmli, 1970)

(SDS/PAA-Gelelektrophorese)

SDS (20 %)	2 ml
β-Mercaptoethanol	4 ml
Glycerin	2 ml
Bromphenolblau (1 g/l)	2 ml

**Reaktionspuffer** (Walker, 1975a)(Bestimmung der StrB1-Aktivität von *S. griseus*)

L-Arginin	0,2 M
NH <sub>2</sub> OH	1 M
K-Phosphat (pH 7,4)	0,2 M

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

(Herstellung von SPMR-Agar)

CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	200 mg/l
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
ZnCl <sub>2</sub>	40 mg/l

**SDS-Laufpuffer (10 ×)** (Laemmli, 1970)

(SDS/PAA-Gelelektrophorese)

Tris	30 g/l
Glycin	144 g/l
SDS	1 %

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

(Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten)

Saccharose (10,3 %)	25 ml
H <sub>2</sub> O	75 ml
Spurenelemente	0,2 ml
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2,5 %)	1 ml

nach Autoklavieren zu je 9,3 ml der Lösung Zugabe von

Tris/Maleinsäure (1 M; pH 8,0)	0,5 ml
CaCl <sub>2</sub> (5 M)	0,2 ml

**TBST**

(immunologischer StrR-Nachweis)

Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM
NaCl	150 mM
Tween80	0,2 %

**TGED** (Buttner und Brown, 1985)

(Anreicherung von RNA-Polymerase)

Tris/HCl (pH 7,9)	10 mM
NaCl	200 mM
EDTA	0,1 mM
Glycerin	5 %
DTT	0,1 mM
PMSF (in Ethanol)	23 mg/ml

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

(Agarosegelelektrophorese)

Tris	242 g/l
Eisessig	57 ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	100 ml

**TBE (10 ×)** (Sambrook et al., 1989)

(native Gelelektrophorese)

Tris	108 g/l
Borsäure	55 g/l
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	80 ml

**TBS** (immunologischer StrR-Nachweis)

Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM
NaCl	150 mM

**TE (10 ×)** (Sambrook et al., 1989)

(Lagerung von Plasmid-DNA)

Tris/HCl (pH 8,0)	100 mM
EDTA	10 mM

**Transfer-Puffer (10 ×)**

(Western-Blot)

Tris	10 g/l
Glycin	48 g/l
SDS	1 %

**Werkmann-Salze** (radioaktive Markierung von Proteinen bei heterologer Genexpression)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2 %

## 2.3 Bakterien und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2-1, die Klonierungsvektoren in Tab. 2-2, und die neu konstruierten rekombinanten Plasmide in Tab. 2-3 aufgelistet.

**Tab. 2-1:** Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

<b>Stamm</b>	<b>relevante genetische und phänotypische Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
<i>Bacillus subtilis</i> DSM437	SM <sup>S</sup>	DSM, Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)/pLysS	λ(DE3), pLysS, Cm <sup>R</sup>	Studier et al., 1990
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i>	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> JM110	<i>dam</i> <sup>-</sup> , <i>dcm</i> <sup>-</sup>	Promega, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>lacZ</i> ΔM15, <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , <i>recA1</i>	Stratagene, Heidelberg Bullock et al., 1987
<i>Escherichia coli</i> XL1-Red	<i>mutD5</i> , <i>mutS</i> , <i>mutT</i> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup>	Stratagene, Heidelberg
<i>Streptomyces flavopersicus</i> DSM40093	Spektionmycinproduzent	DSM, Braunschweig
<i>Streptomyces lividans</i> 66 TK23	<i>spc-1</i>	John Innes Institute Hopwood et al., 1985
<i>Streptomyces griseus</i> DSM40236	Streptomycinproduzent, SM <sup>R</sup>	DSM, Braunschweig
<i>Streptomyces griseus</i> N2-3-11	Streptomycinproduzent, SM <sup>R</sup>	Kaken Chem. Co., Tokyo

**Tab. 2-2:** Übersicht über verwendete Klonierungsvektoren

<b>Klonierungsvektoren</b>	<b>Genotyp, Eigenschaften</b>	<b>Herkunft, Referenz</b>
pBluescriptII KS-	<i>bla</i> , <i>lacZ</i> a, <i>lacp</i>	Stratagene, Heidelberg
pET11a	<i>bla</i> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , <i>laco</i> , <i>T7F10p</i>	Studier et al., 1990
pGM102	<i>tsr</i> , <i>cat</i> , <i>aphII</i>	Muth et al., 1988

Fortsetzung Tab. 2-2

Klonierungsvektoren	Genotyp, Eigenschaften	Herkunft, Referenz
<b>pGM160</b>	<i>aacC1, bla, tsr</i>	Muth et al., 1989
<b>pGMM2</b>	<i>strSTRD(E)</i> ( <i>S. glaucescens</i> GLA.0), <i>bla</i>	Mayer, 1994
<b>pHM8a</b>	<i>hyg, ermEp</i> , mini-circle	Motamedi et al., 1995
<b>pIJ2027</b>	<i>bla, lacI<sup>Q</sup>, dagp1-p4</i> ( <i>S. coelicolor</i> A3(2))	Buttner et al., 1988
<b>pIJ4070</b>	<i>bla, lacI<sup>Q</sup>, ermEp</i>	Bibb und Jannssen, 1986
<b>pIJ6021</b>	<i>kan, tsr</i>	John Innes Institute, Norwich Takano et al., 1995
<b>pJAW72</b>	<i>bla, stsBCp</i> ( <i>S. griseus</i> N2-3-11), <i>xylE</i>	Ahlert et al., 1997
<b>pJDM4001</b>	<i>bla, lacI<sup>Q</sup>, strB1p</i> ( <i>S. griseus</i> N2-3-11)	Retzlaff und Distler, 1995
<b>pJDM4121</b>	<i>aacC1, strRp-strR</i> ( <i>S. griseus</i> N2-3-11)	Retzlaff und Distler, 1995
<b>pKU205</b>	<i>tsr, bla, cos</i>	Kakinuma et al., 1991
<b>pLRB1024</b>	<i>tsr, neo, strB1p</i> (-274/+16; <i>S. griseus</i> N2-3-11) L. Retzlaff, unveröffentlicht <i>xylE</i>	
<b>pRBD13</b>	<i>bla, strB1p</i> (-274/+16; <i>S. griseus</i> N2-3-11)	Retzlaff und Distler, 1995
<b>pRKW1</b>	<i>bla, tsr, strB1p</i> (-274/+16; <i>S. griseus</i> N2-3-11) <i>xylE</i>	Retzlaff und Distler, 1995
<b>pSTR11</b>	<i>bla, lacI<sup>Q</sup>, laco, T7F10p, strR, (strA)</i> ( <i>S. griseus</i> N2-3-11)	Retzlaff und Distler, 1995
<b>pSTR16</b>	<i>bla, lacI<sup>Q</sup>, laco, T7F10p his-tag-strR, (strA)</i> ( <i>S. griseus</i> N2-3-11)	Retzlaff und Distler, 1995
<b>pUC18</b>	<i>bla, lacZ<math>\alpha</math>, lacp</i>	Vieira und Messing, 1982
<b>pUCBM21III623-18</b>	<i>bla, lacZ<math>\alpha</math>, lacp, strR, (strA)</i> ( <i>S. griseus</i> N2-3-11)	L. Retzlaff, unveröffentlicht

Tab. 2-3: Übersicht über neukonstruierte rekombinante Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Wirtsstamm
<b>pB1p</b>	138 bp PCR-Produkt aus pRKW1 und Primer-Paar ST23/ST24 in pUC18 ( <i>Sma</i> I)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
<b>pB1p/2</b>	118 bp PCR-Produkt aus pRKW1 und Primer-Paar ST25/ST24 in pUC18 ( <i>Sma</i> I)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
<b>pBM199</b>	410 bp <i>Sph</i> I/ <i>Kpn</i> I Fragment aus pPVK199 in pUCBM21III623-18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
<b>pBM231</b>	500 bp <i>Sph</i> I/ <i>Kpn</i> I Fragment aus pPVK231 in pUCBM21III623-18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
<b>pBM299</b>	685 bp <i>Sph</i> I/ <i>Kpn</i> I Fragment aus pPVK299 in pUCBM21III623-18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
<b>pETM1</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pETM3</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pETM4</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pETM7</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pETM14</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pETM15</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pETM16</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pETM20</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pETM23</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pETM31</b>	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus mutagenisiertem pSTW350/0 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
<b>pFLA</b>	1 kb PCR-Produkt aus genomischer DNA von <i>S. flavopersicus</i> und Primer-Paar ST11/ST12 in pUC18 ( <i>Hinc</i> II)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
<b>pFLAM1</b>	„long range“ PCR-Produkt von pFLA mit Primer-Paar ST21.1/ST22.1, religiert	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
<b>pGLA</b>	1,26 kb PCR-Produkt aus pGMM2 und Primer-Paar ST15/ST16 in pUC18 ( <i>Hinc</i> II)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$

Fortsetzung Tab. 2-3

Plasmid	Eigenschaften	Wirtsstamm
pGLB	248 bp <i>SalI</i> Fragment aus pGMM2 in pUC18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pPVK199	385 bp PCR-Fragment aus pSTR11 und Primer-Paar ST7/ST8 in pUC18 ( <i>SmaI</i> )	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pPVK231	478 bp PCR-Fragment aus pSTR11 und Primer-Paar ST7/ST9 in pUC18 ( <i>HincII</i> )	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pPVK299	662 bp PCR-Fragment aus pSTR11 und Primer-Paar ST7/ST10 in pUC18 ( <i>HincII</i> )	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pPVK349	„long range“ PCR von pSTW5.2 mit Primer-Paar ST1/ST2, religiert	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pPVK350/2	„long range“ PCR von pSTW5.2 mit Primer-Paar ST1/ST2, religiert	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pPVK350/3	„long range“ PCR von pSTW5.2 mit Primer-Paar ST1/ST2.3, religiert	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pPVK350/4	„long range“ PCR von pSTW5.2 mit Primer-Paar ST1/ST2.4, religiert	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pPVK350/5	„long range“ PCR von pSTW5.2 mit Primer-Paar ST1/ST2.1, religiert	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTR199	630 bp <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pBM199 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pSTR231	720 bp <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pBM231 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pSTR299	900 bp <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pBM299 in pET11a	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pSTR349	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK349 in pET11a <i>NdeI/BamHI</i>	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pSTR350/2	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK350/2 in pET11a <i>NdeI/BamHI</i>	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pSTR350/3	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK350/3 in pET11a <i>NdeI/BamHI</i>	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pSTR350/4	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK350/4 in pET11a <i>NdeI/BamHI</i>	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pSTR350/5	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK350/5 in pET11a <i>NdeI/BamHI</i>	<i>E. coli</i> XL-Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pSTW1	3,1 kb Fragment <i>EcoRV/BglIII</i> aus pGM102 und 4,4 kb Fragment aus pIJ6021	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23

Fortsetzung Tab. 2-3

Plasmid	Konstruktion	Wirtsstamm
pSTW2	4,2 kb Fragment <i>EcoRI/BamHI</i> aus pGM160 und 5,5 kb Fragment aus pKU205	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW3.2	1,75 kb <i>BglIII</i> Fragment aus pSTW5.2 in pSTW1	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW3.21	wie pSTW3.2, jedoch Fragment in entgegengesetzter Orientierung	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW3.31His	2,49 <i>HindIII/BamHI</i> Fragment aus pSTW32.2 in pSTW1 <i>HindIII/BglIII</i>	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW4	1,8 kb <i>BglIII</i> Fragment aus pLRB1024 in pSTW2	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW5.2	pSTW19-350/0 <i>SalI</i> hydrolysiert und Religation des 4,49 kb Restplasmids	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW13-X	pHM8a <i>BamHI</i> und <i>BglIII</i> -Partialhydrolyse und Religation des Restplasmids	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW13.2	1,4 kb <i>PstI</i> Fragment aus pSTW4 in pSTW13-X	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW15	1,9 kb <i>EcoRI/HindIII</i> Fragment aus pJAW72 in pIJ4070	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW16	780 bp PCR-Fragment aus genomischer DNA von <i>S. griseus</i> N2-3-11 und Primer-Paar ST19/ST20 in pUC18 ( <i>SmaI</i> )	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW17	800 bp <i>EcoRI/SstI</i> Fragment aus pSTW16 in pBluescript KS II-	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW18	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pSTW5.2 in pSTW17	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW18-199	1,15 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pSTW19-199 in pSTW17	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW18-231	1,24 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pSTW19-231 in pSTW17	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW18-299	1,45 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pSTW19-299 in pSTW17	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW18-349	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK349 in pSTW18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW18-350/2	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK350/2 in pSTW18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$

Fortsetzung Tab. 2-3

Plasmid	Konstruktion	Wirtsstamm
pSTW18-350/3	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK350/3 in pSTW18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW18-350/4	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK350/4 in pSTW18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW18-350/5	1,4 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pPVK350/5 in pSTW18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW19-199	1,15 kb <i>NdeI/HindIII</i> Fragment aus pSTR199 in pIJ4070	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW19-231	1,24 kb <i>NdeI/HindIII</i> Fragment aus pSTR231 in pIJ4070	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW19-299	1,45 kb <i>NdeI/HindIII</i> Fragment aus pSTR299 in pIJ4070	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW19-350/0	1,9 kb <i>NdeI/BamHI</i> DNA-Fragment aus pSTR11 in pIJ4070	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW20	1,3 kb <i>NdeI/HindIII</i> Fragment aus pGLA in pSTW15	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW21	1,3 kb <i>NdeI/BglIII</i> Fragment aus pSTW20 in pSTW18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW22.1	2,1 kb <i>HindIII</i> Fragment aus pSTW21 in pSTW350/0	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW23.1	780 bp PCR-Fragment aus genomischer DNA von <i>S. griseus</i> N2-3-11 und Primer-Paar ST19.1/ST20.1 in pUC18 ( <i>SmaI</i> )	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW23.2	1,7 kb <i>NcoI</i> Fragment aus pSTR16 in pSTW23.1	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
pSTW24	1,0 kb <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pFLA in pSTW22.1 <i>NdeI/BglIII</i>	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW24.1	1,0 kb <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pFLAM1 in pSTW22.1 <i>NdeI/BglIII</i>	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW199	2,0 kb <i>HindIII</i> Fragment aus pSTW18-199/0 in pSTW3.21	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW231	2,1 kb <i>HindIII</i> Fragment aus pSTW18-231/0 in pSTW3.21	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW299	2,3 kb <i>HindIII</i> Fragment aus pSTW18-300/0 in pSTW3.21	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23

Fortsetzung Tab. 2-3

Plasmid	Konstruktion	Wirtsstamm
pSTW349	2,2 kb <i>Hind</i> III Fragment aus pSTW18-349 in pSTW3.21	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW350/0	2,2 kb <i>Hind</i> III Fragment aus pSTW18 in pSTW3.21	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW350/2	2,2 kb <i>Hind</i> III Fragment aus pSTW18-350/2 in pSTW3.21	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW350/3	2,2 kb <i>Hind</i> III Fragment aus pSTW18-350/3 in pSTW3.21	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW350/4	2,2 kb <i>Hind</i> III Fragment aus pSTW18-350/4 in pSTW3.21	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pSTW350/5	2,2 kb <i>Hind</i> III Fragment aus pSTW18-350/4 in pSTW3.21	<i>E. coli</i> JM110, <i>S. lividans</i> TK23
pTFL	1 kb <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI Fragment aus pFLA in pET11a	<i>E. coli</i> XL1Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pTFLM1	1 kb <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI Fragment aus pFLAM1 in pET11a	<i>E. coli</i> XL1Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS
pTGL	1,4 kb <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus pGLA in pET11a	<i>E. coli</i> XL1Blue <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS

## 2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit als PCR- oder Sequenzierungs-Primer verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2-4 aufgeführt. Sie wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Gibco BRL (Eggenstein) bezogen. Die fett geschriebenen Basen kennzeichnen entweder eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen oder charakteristische Basenaustausche.

**Tab. 2-4:** Übersicht über die verwendeten Oligonucleotide

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz
ST1	„long range“ PCR zur gerichteten Mutagenese von <i>strR</i>	5'-GGAGACGCCGGCCTGTGC-3'

Fortsetzung Tab. 2-4

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz
ST2	„long range“ PCR zur gerichteten Mutagenese von <i>strR</i> (M350/2)	5'-CCGAGCACGGCCGCGACGTCC-3'
ST2.1	„long range“ PCR zur gerichteten Mutagenese von <i>strR</i> (M350/5)	5'-CCGAGCACCGCCCGCGACGTCC-3'
ST2.3	„long range“ PCR zur gerichteten Mutagenese von <i>strR</i> (M350/3)	5'-CCGAGCACCGCCTCCGCCGT-3'
ST2.4	„long range“ PCR zur gerichteten Mutagenese von <i>strR</i> (M350/4)	5'-CCGAGCACCGCCTGCGACGTC-3'
ST7	Herstellung C-terminal verkürzter StrR-Proteine	5'-CCACGAAGCGCGTCATCGAC-3'
ST8	Herstellung C-terminal verkürzter StrR-Proteine (M199)	5'-GGGGTTCTCCTAGAGCAGCCGGCT-3'
ST9	Herstellung C-terminal verkürzter StrR-Proteine (M231)	5'-CGGGCTCTAACCACGGCTCAGCC-3'
ST10	Herstellung C-terminal verkürzter StrR-Proteine (M299)	5'-GGAGGCGGTCCTAGTCCTGGTTGCT-3'
ST11	Amplifikation des <i>spcR</i> -Gens aus <i>S. flavopersicus</i> , Genstart mit <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'-GGTGGTGGTCTCCATATGACGACGGTGAAA-3'
ST12	Amplifikation des <i>spcR</i> -Gens aus <i>S. flavopersicus</i> , Genstopp	5'-GAAGCGTTCGGGATCCACAGACA-3'
ST15	Amplifikation des <i>hstR</i> -Gens aus <i>S. glaucescens</i> , Genstart mit <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'-AGGTGTCATATGGAGCTCAGTTCCCGTCGT-3'
ST16	Amplifikation des <i>hstR</i> -Gens aus <i>S. glaucescens</i> , Genstopp	5'-GCCCCGCTCTCCGGTCA-3'
ST19	Amplifikation des <i>strRp</i> -Bereiches aus <i>S. griseus</i> , stromaufwärts	5'-TCGAAAGCTTGGTGAGGGAATTCC-3'
ST19.1	Amplifikation des <i>strRp</i> -Bereiches aus <i>S. griseus</i> , stromaufwärts	5'-TCGAAAGCTTGGTGAGGGAATTCCTCACC-3'
ST20	Amplifikation des <i>strRp</i> -Bereiches aus <i>S. griseus</i> , stromabwärts, zur Fusion mit <i>strR</i>	5'-AGATCTCATATGACACCCTTCAATCACGGG-3'
ST20.1	Amplifikation des <i>strRp</i> -Bereiches aus <i>S. griseus</i> , stromabwärts, zur Fusion mit <i>his-tag-strR</i>	5'-GGATCCTCCATGGCACACCCTTCAATCACG-3'

Fortsetzung Tab. 2-4

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz
ST21.1	„long range“ PCR zur gerichteten Mutagenese von <i>spcR</i> (SpcRM1)	5'-AGCACGGTGTCTCGGATGTCCGGAACAGAACC-3'
ST22.1	„long range“ PCR zur gerichteten Mutagenese von <i>spcR</i> (SpcRM1)	5'-CGGGGAGATGCCCCGCGAC-3'
ST23	Amplifikation des <i>strB1p</i> -Bereiches mit vollem Palindrom der StrR-Bindestelle	5'-GCCGCACCTCCGATGC-3'
ST24	Amplifikation des <i>strB1p</i> -Bereiches mit vollem oder halbem Palindrom der StrR-Bindestelle	5'-CTGCTCTCCCGTACTCATCGC-3'
ST25	Amplifikation des <i>strB1p</i> -Bereiches mit halbem Palindrom der StrR-Bindestelle	5'-CACACGCAGTCGAACGCAT-3'
ST26.1	Sequenzier-Primer zum Screening von <i>strR</i> -Mutanten in pSTW350/*, Genstart	5'-AGCATTGCTCTTTATCGCCG-3'
ST27.3	Sequenzier-Primer zum Screening von <i>strR</i> -Mutanten in pSTW350/*, Genmitte	5'-GTGAAGTCCAACGTCACCCAC-3'
ST28.3	Sequenzier-Primer zum Screening von <i>strR</i> -Mutanten in pSTW350/*, Genstopp	5'-GACGCTCCTCAACTCCGTCG-3'

## 2.5 Anzucht und Lagerung von Bakterien

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

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten. Plasmidtragende Stämme wurden dabei immer unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (vgl. 2.2.2). Dem LB-Agar wurde zur Selektion rekombinanter pUC18- und pBluescript-Derivate 40 µg/ml X-Gal zugesetzt. Stammkulturen wurden durch Abschwemmen von über Nacht angezogenen LB-Agar-Kulturen mit 40 % Glycerin in LB-Medium gewonnen und bei -20 °C aufbewahrt. Als Übernachtskulturen (ÜNK) wurden Ansätze bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden.

### **2.5.2 Anzucht und Lagerung von *B. subtilis***

*Bacillus subtilis* wurde in NB-Medium bei 37 °C kultiviert. Die gebildeten Sporen von 3 Tage gewachsenen Kulturen wurden bei 4 °C aufbewahrt und als Inokulum für ÜNK benutzt.

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

Streptomyceten wurden in TSB-Flüssigmedium auf einem Rotationsschüttler bei 200 Upm bzw. auf SMA-Agarplatten bei jeweils bei 28 °C inkubiert. Plasmid-tragende Stämme wurden dabei immer unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (vgl. 2.2.2). Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4 °C auf SMA-Agarplatten. Für die Herstellung von Sporensuspensionen wurden die Stämme auf SMA-Agarplatten bebrütet und die gebildeten Sporen mit 20 %igem Glycerin abgeschwemmt, durch sterile Baumwollwatte filtriert und das Sporenfiltrat bei -20 °C gelagert.

### **2.5.4 Bestimmung des Wachstums von *S. griseus***

*S. griseus* wurde von SMA-Agarplatten in TSB-Flüssigmedium angeimpft (5 ml-Kulturen in 50 ml-Inkubationsröhrchen mit Stahlfedern) und für 36 h bei 200 Upm geschüttelt. Von dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur so angeimpft, daß der Wert für die Start-OD<sub>595</sub> jeweils zwischen 0,1 und 0,2 lag (Verdünnungsfaktor 1:50 - 1:100). Als Hauptkulturen wurden 50 ml-Kulturen in 1 l Schikanekolben verwendet. Das Wachstum von *S. griseus* wurde routinemäßig durch Probenentnahme und Bestimmung der OD<sub>595</sub> verfolgt. Proben, deren OD<sub>595</sub>-Werte höher als 0,3 lagen, wurden vor dem Messen entsprechend verdünnt.

### **2.5.5 Fermentation von *S. griseus***

Die Fermentation wurde in einem 3 l Tischfermenter (New Brunswick, New Jersey, USA) in 3 l TSB-Medium bei 28 °C durchgeführt. Die Inokulation der Hauptkultur erfolgte wie unter 2.5.4 beschrieben. Die Belüftungsrate betrug 1 l/min Luft bei 750 Upm Rührgeschwindigkeit.

Die Werte für die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft, O<sub>2</sub> im Medium und pH wurden „online“ über IR- bzw. Massenspektrometrie und pH-Elektrode verfolgt.

## 2.6 Streptomycin-Bioassays

Der Nachweis der Streptomycinproduktion erfolgte auf NB-Agarplatten, die mit einem Gemisch aus 100 µl *Bacillus subtilis* Sporen und 100 µl NB-Flüssigmedium beimpft wurden. Nach dem Trocknen der Platten wurden sterile Rundfilter (Schleicher und Schuell, Ø 1 cm) aufgelegt und diese mit 10 - 30 µl des zu testenden Überstandes der Streptomyceten-Flüssigkultur versetzt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet und die entstandenen Hemmhöfe ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Kalibrierungsgeraden mit Hilfe von wässrigen Streptomycin-Lösungen definierter Konzentration (1 - 25 µg/µl).

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus Streptomyceten

Streptomyceten-Gesamt-DNA wurde entsprechend der von Mehling et al. (1995) beschriebenen Methode isoliert.

### 2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mittels Kochpräparation (Sambrock et al., 1989) und alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Die Isolation von Plasmiden aus Streptomyceten und von Plasmiden aus *E. coli* für DNA-Sequenzierreaktionen wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

### 2.7.3 *In vitro* Manipulation von Nukleinsäuren

Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatase (CIP), T4-Polynukleotidkinase und T4-DNA Ligase wurden gemäß den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller verwendet. Entsprechendes galt für die Entfernung von 3'-Überhängen von DNA-Fragmenten mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I.

### 2.7.4 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden durch horizontale, submerse Agarosegelelektrophorese mit 5 - 10 V/cm Laufstrecke in  $1 \times$  TAE-Puffer aufgetrennt (Sambrock et al., 1989). Den Proben wurde 1/10 Volumenanteile Probenauftragspuffer (0,4 g/ml Saccharose; 2,5 mg/ml Bromphenolblau) zugegeben. Zur Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht (366 nm) enthielt die Agarose 0,1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid.

### 2.7.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit 150  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (5000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durch T4-Polynukleotidkinase entsprechend den Angaben des Herstellers. Nicht eingebautes  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP wurde durch Benutzung des QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) abgetrennt. Die Einbaurrate von [<sup>32</sup>P] wurde in einem Szintillationszähler (Wallac LSC 1409; Turku, Finnland) nach Sambrock et al. (1989) bestimmt.

### 2.7.6 Autoradiographie

Die Detektion von [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Fragmenten erfolgte mit „Hybond MP“-Röntgenfilmen unter Verwendung von Röntgen-Verstärkerfolien Special 200 (Dr. Goos Suprema, Heidelberg) nach Inkubation bei -70 °C oder RT in „DuPont Lightning Plus“ Exponierboxen.

### 2.7.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte nach dem von Sanger et al. (1977) beschriebenen Dideoxy-Nukleotid-Kettenabbruchverfahren. Die Sequenzierung mit Fluorescein- oder CY5-markierten Primern erfolgte mit dem Thermosequense Cycle-Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und dem T7-Sequense 7-deaza-dGTP DNA 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“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) detektiert. Die Umsetzung der gemessenen Fluoreszenzspitzen zu einer DNA-Sequenz erfolgte durch das Computerprogramm *A.L.F. Manager 2.5* bzw. *A.L.F. Win 1.1*.

### 2.7.8 DNA- und Aminosäuresequenzanalysen

DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit den Programmen *DNA-Strider* (Marck, 1989), *Brufene* (Vara), *BLAST* (Altschul et al., 1990), *FASTA 1.4x2* (Pearson und Lippman, 1988) und *Clustal V* (Higgins, 1991) durchgeführt. Aminosäuresequenzen wurden per Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) als BLAST-Suche mit den aktuellsten verfügbaren Datenbanken verglichen.

### 2.7.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde nach Bej et al. (1991) in Thermocyclern (Biometra, Göttingen) mit einer Heizrate von 1 °C/sec durchgeführt. Es wurde Taq- und Vent-DNA-Polymerase mit den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen verwendet. Die für die Amplifizierung eines Zielgens entsprechenden optimalen Primerpaare wurden mit dem Programm *PrimerFind 3.0* (Fröbel Labor Geräte, Lindau) ermittelt. Die für die Amplifikation der entsprechenden Gene bzw. intercistronischen DNA-Bereiche verwendeten Primerpaare (vgl. 2.4) und „annealing“-Temperaturen sowie die als „Template“ verwendete DNA sind in Tab. 2-5 aufgeführt.

**Tab. 2-5:** Verwendete Primerpaare, „annealing“-Temperaturen und „Template“-DNA für PCR.

Gen / DNA-Bereich	Primerpaar	„annealing“-Temperatur	„Template“-DNA
<i>strR</i> (M199)	ST7, ST8	60 °C	pSTR11
<i>strR</i> (M231)	ST7, ST9	60 °C	pSTR11
<i>strR</i> (M299)	ST7, ST10	60 °C	pSTR11
<i>spcR</i>	ST11, ST12	55 °C	<i>S. flavopersicus</i>
<i>hstR</i>	ST15, ST16	55 °C	pGMM2
<i>strRp</i> [ <i>Nde</i> I]	ST19, ST20	40 °C	<i>S. griseus</i> N2-3-11
<i>strRp</i> [ <i>Nco</i> I]	ST19.1, ST20.1	55 °C	<i>S. griseus</i> N2-3-11
<i>strB1p</i> (B1p)	ST23, ST24	60 °C	pRKW1
<i>strB1p</i> (B1p/2)	ST24, ST25	60 °C	pRKW1

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

„Template“-DNA	100 ng
DMSO	10 µl
Taq- oder Vent-	
Polymerase-Puffer (10 ×)	10 µl
dNTP (je)	0,2 mM
Primer (je)	0,2 µM
MgCl <sub>2</sub> oder MgSO <sub>4</sub>	1,5 mM
Taq- oder Vent-	
DNA-Polymerase	2 U
H <sub>2</sub> O	auf 100 µl
Mineralöl	50 µl

Amplifikationsprogramm:

Schritt	1	98 °C	2 min
	2	95 °C	1 min
	3	variabel	30 sec
	4	72 °C	45 sec/kb
	5	72 °C	5 min

Die Zugabe der DNA-Polymerasen erfolgte bei Schritt 2. Die Schritte 2 - 4 wurden 30 × durchlaufen. Die „annealing“-Temperaturen für Schritt 3 sind in Tab. 2-5 aufgelistet.

**2.7.10 Gerichtete Mutagenese mittels PCR**

Die gerichtete Mutagenese des *strR*- bzw. *spcR*-Gens erfolgte unter Benutzung des Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR Kit von Boehringer (Mannheim) nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen. Als „Template“-DNA dienten die Plasmide pSTW5.2 (*strR*) und pFLA (*spcR*).

Es wurden die Primerpaare ST1/ST2, ST1/ST2.1, ST1/ST2.3 und ST1/ST2.4 für die Veränderungen im *strR*-Gen sowie die Kombination der Primer ST21.1/ST22.1 für die Veränderung des *spcR*-Gens benutzt (vgl. 2.4). Jeweils 50 pmol jedes Primers, 360 pmol jedes Nukleotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 250 ng „Template“-DNA und 5 µl des vom Hersteller mitgelieferten Puffers (Puffer 1) wurden in einer 50 µl-Gesamtreaktion vermischt und die PCR in dünnwandigen 200 µl-Reaktionsgefäßen (Biozym, Hessisch Oldendorf) durchgeführt. Die „annealing“-Temperatur betrug in allen Fällen jeweils 65 °C.

### **2.7.11 Ungerichtete Mutagenese von DNA**

Zur ungerichteten Mutagenese des Plasmids pSTW350/0 wurde *E. coli* XL1-Red (vgl. 2.3) mit diesem Plasmid transformiert (vgl. 2.7.12). Nach Regeneration der Transformanten wurden ca. 200 Kolonien mittels LB-Medium von den Regenerationsplatten geschwemmt und als Inokulum für eine ÜNK benutzt. Die ÜNK wurde in LB-Medium unter entsprechendem Selektionsdruck (vgl. 2.2.2) bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurde eine Plasmidpräparation von 5 ml dieser ÜNK durchgeführt. Auf diese Weise gewonnene Plasmid-DNA wurde als mutagenisiert betrachtet, mit pSTW350/\* bezeichnet und zum Screening von StrR-Mutanten eingesetzt (vgl. 2.8.11).

### **2.7.12 Transformation von *E. coli* und *S. lividans***

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Streptomyceten wurden nach dem Protokoll von Babcock und Kendrick (1988) protoplastiert und transformiert. Zur Erreichung hoher Transformationsraten wurden die Protoplasten mit unmethylierter Plasmid-DNA (aus *E. coli* JM110 präpariert) transformiert.

### **2.7.13 Heterologe Genexpression in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS**

Zur heterologen Protein-Produktion wurde *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS mit den entsprechenden Expressionsplasmiden (pETM-, pSTR-Derivate, pTGL, pTFL, pTFLM1; vgl. 2.3,

Tab. 2-3) eingesetzt. 50 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol) wurden mit 1 ml einer ÜNK beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bei 200 Upm kultiviert. Beim Erreichen der  $OD_{560} = 0,5$  wurde die Expression des Gens für die T7-RNA-Polymerase durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration = 1 mM) induziert und für weitere 90 min inkubiert. Zur Überprüfung der Überexpression der Zielgene wurden danach 1 ml Kultur entnommen, die Zellen in 50 µl Probenauftragspuffer resuspendiert und in einer SDS-PAA-Gelelektrophorese (vgl. 2.8.2) analysiert. Die verbleibende Kultur wurde geerntet, zweimal mit Aufschlußpuffer gewaschen und zur Herstellung von zellfreiem Extrakt (vgl. 2.8.1) verwendet.

#### **2.7.14 Heterologe Genexpression und radioaktive Markierung von Proteinen**

50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer ÜNK des *E. coli* Expressionsstammes (vgl. 2.7.13) angeimpft und bei 37 °C bis zu einer  $OD_{560} = 0,5$  inkubiert. Danach wurde 1 ml Kultur entnommen und die Zellen durch Zentrifugation für 1 min bei 4000 Upm geerntet. Anschließend erfolgte das Waschen der Zellen mit 1,3 ml Werkmann (WM)-Salzen. Das Sediment wurde in 1 ml WM-Medium (WM-Salze + 0,4 % Glucose) resuspendiert und zu 4 ml WM-Medium gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl Aminosäure-Mix (alle nativen L-Aminosäuren außer L-Cystein und L-Methionin, je 100 µg/ml) und eine Inkubation bei 37 °C für 60 min. Danach wurde die Expression des Gens für die T7-RNA-Polymerase durch Zugabe von IPTG (vgl. 2.7.13) induziert und für weitere 10 min inkubiert. Die *E. coli*-RNA-Polymerase wurde danach durch Rifampicin-Zugabe (Endkonzentration = 0,04 %) gehemmt und der Ansatz für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden 10 µCi [<sup>35</sup>S]-Pro-Mix (Amersham Paharmacia Biotech, Freiburg) zum Ansatz gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Einbau der markierten Aminosäuren wurde durch zweimaliges Waschen mit 10 mM Tris (pH 7,5), 5 mM β-Mercaptoethanol, und Aufnehmen des Zellpellets in Probenauftragspuffer gestoppt.

### **2.7.15 Heterologe Genexpression in *S. lividans***

*S. lividans* TK23/pSTW13.2i (vgl. 2.7.16) wurde mit den entsprechenden Expressionsplasmiden (pSTW-Derivate, pSTW3.31His, pSTW22.1, pSTW24, pSTW24.1; vgl. 2.3) transformiert. Die jeweiligen *S. lividans*-Doppeltransformanten wurden in TSB-Medium unter entsprechendem Selektionsdruck (vgl. 2.2.2) kultiviert (5 ml-Kultur in 50 ml-Inkubationsröhrchen mit Stahlfedern, 200 Upm). Die Hauptkultur (gleiches Volumen wie Vorkultur) wurde durch 1:100 Verdünnung einer 3 Tage alten Vorkultur angeimpft und bei 28 °C unter Schütteln bei 200 Upm inkubiert. Die Expression der Zielgene erfolgte in diesem System konstitutiv. Die Kulturen wurden nach 24 - 72 h geerntet, zweimal mit Aufschlußpuffer gewaschen und zur Herstellung von zellfreiem Extrakt verwendet (vgl. 2.8.1). Zur Überprüfung der Expression der Zielgene wurden die zellfreien Extrakte dem immunologischen Nachweis zugeführt (vgl. 2.8.4).

### **2.7.16 Integration von Plasmid-DNA in das Genom von *S. lividans***

Die Integration von Plasmid-DNA (pSTW13.2, vgl. 2.3) in das Genom von *S. lividans* TK23 wurde nach der von Motamedi et al. (1995) beschriebenen Methode durchgeführt. Als Medium dienten SPMR- und SMA-Agarplatten mit und ohne Hygromycin B (vgl. 2.2.2) als Selektionsmarker. Nach Durchlaufen der Integrationsprozedur wurde dieser Stamm als *S. lividans*/pSTW13.2i bezeichnet.

## **2.8 Biochemische Methoden**

### **2.8.1 Herstellung zellfreier Extrakte von *E. coli* und *S. lividans***

Zum Zellaufschluß wurde 1 ml Aufschlußpuffer pro 1 g Zellnaßgewicht verwendet. Kleine Volumina bis 5 ml wurden mittels Ultraschall („Bandelin Sonoplus UW60“ mit 5 mm Mikrospritze und Spannungsquelle „HD60“; Bandelin, Berlin) auf Eis für 4 - 10 × 20 sec in 10 sec-Abständen mit 70 % Intensität und 20 % Zyklus aufgeschlossen. Größere Volumina wurden durch zwei- bis dreimalige Passage in einer „French Pressure Cell“ (American

Instruments Company, Silverspring, USA) bei einem Druck von 20000 psi aufgebrochen. Zelldebris wurde anschließend durch Zentrifugation (30 min, 30000 g, 4 °C) abgetrennt. Zellfreie Extrakte wurden entweder sofort weiterverwendet oder in N<sub>2</sub> (fl.) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.8.2 Proteinbestimmungen, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie Färbung**

Die Proteinkonzentration von zellfreiem Extrakt wurde nach Bradford (1976) mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Kit und BSA als Standard ermittelt. Die denaturierende Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen (10 - 12,5 % PAA) sowie deren Anfärbung mit Coomassie-Brilliant Blue G250 erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Für die Abschätzung von Proteinmolekulargewichten wurde das Proteinstandard-Gemisch VII-L von Sigma (Deisenhofen) verwendet.

### **2.8.3 Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)**

Proteine wurden nach analytischer SDS-PAGE mittels Semidry-Blotapparatur (Fastblot B33; Biometra, Göttingen) auf PVDF-Membranen („Hybond P“; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Der Transfer erfolgte 10 - 20 min bei konstanter Stromstärke von 250 mA in Transferpuffer. Die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch reversible Ponceau S-Färbung (0,2 % Ponceau S in 1 % Essigsäure) mit anschließender Hintergrundentfärbung durch H<sub>2</sub>O überprüft. Durch Inkubation in TBS konnte die Färbung rückgängig gemacht werden.

### **2.8.4 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine**

Zum Nachweis immobilisierter Proteine (vgl. 2.8.3) wurde die Membran 2 h bei RT oder ÜN bei 4 °C mit „Blocking-Reagenz“ (TBS + 3 % BSA) blockiert und anschließend für 30 min bei RT mit polyklonalem StrR-Antiserum inkubiert (Verdünnungsfaktor = 1:4000). Danach

wurde die Membran dreimal mit TBST für 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation bei RT für 30 min mit dem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat; Boehringer, Mannheim), der 1:2500 in „Blocking-Reagenz“ verdünnt war. Ungebundener sekundärer Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen (10 min, RT) mit TBST entfernt. Nach Zugabe von NBT/BCIP (Boehringer, Mannheim) als Substrat für die alkalische Phosphatase erfolgte der indirekte Nachweis des Erstantikörpers gegen StrR-Derivate. Alternativ wurde der Erstantikörper mit dem BM Chromogenic Western Blotting Kit (Boehringer, Mannheim) nachgewiesen.

### **2.8.5 Native Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Protein/DNA-Komplexen nach Gelretardierungsassays erfolgte in kontinuierlichen nativen 5 % PAA/0,5 × TBE-Gelen (Acrylamid:N,N'-Bisacrylamid = 28:2, Gelgröße ca. 15 × 15 × 0,1 cm) in 0,5 × TBE als Laufpuffer. Die Spannung von 120 - 140 V wurde während des Laufes konstant gehalten. Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel in Fixierlösung (10 % Essigsäure, 5 % Glycerin) für 20 min inkubiert, auf einem beheizbaren Geltrockner (PH-t40; Biotec-Fisher, Reiskirchen) unter Vakuum getrocknet und der Autoradiographie (vgl. 2.7.6) zugeführt. Die gleichzeitige Auftrennung von Standardproteinen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und Protein/DNA-Komplexen zur Bestimmung der Oligomerisierung von StrR erfolgte wie bei Orchard und May (1993) beschrieben bei 100 V in 0,25 × TBE-Gelen (Gelgröße 15 × 15 × 0,1 cm) mit verschiedenen PAA-Konzentrationen zwischen 5 - 10 % PAA. Zur Bestimmung der R<sub>F</sub>-Werte für Standardproteine oder Protein/DNA-Komplexe diente 0,02 % Bromphenolblau. Nach der Fixierung der Gele in 10 % Essigsäure wurden diese zur Sichtbarmachung der Standardproteine zusätzlich einer Coomassie-Färbung (vgl. 2.8.2) unterworfen, danach unter Vakuum getrocknet und der Autoradiographie zugeführt.

### **2.8.6 Gelretardierungsassays**

Gelretardierungsassays wurden in abgewandelter Form nach der von Baldwin (1990) beschriebenen Methode durchgeführt. 5µl Kompetitor-DNA (Gemisch aus 3 - 5 µg/µl

gescherter Heringssperma-DNA und 1 - 2 µg Poly[d(IC)•d(IC)] (Boehringer, Mannheim) wurden mit 5 µl 4 × Bindungspuffer und 5 µl radioaktiv markiertem DNA-Fragment (ca. 3 ng, ca. 30000 cpm; vgl. 2.7.5) versetzt. Zu diesem Gemisch wurde anschließend 5 µl zellfreier Extrakt (vgl. 2.8.1) hinzupipettiert, für 2 min bei 20 °C inkubiert und auf ein natives PAA-Gel (vgl. 2.8.5) aufgetragen. Als DNA-Fragmente dienten das 290 bp *EcoRI* Fragment aus pRBD13, das 368 bp *PstI/XhoI* aus pJDM4001, das 156 bp *EcoRI/BamHI* Fragment aus pB1p und das 156 bp *EcoRI/HindIII* Fragment aus pB1p/2 (vgl. 2.3, Tab. 2-2 und 2-3). In Experimenten zur Bestimmung der Oligomerisierung von StrR (vgl. 2.8.5) wurde das 156 bp *EcoRI/HindIII* Fragment aus pB1p/2 nach der radioaktiven Markierung (vgl. 2.7.5) zusätzlich mit *NdeI* hydrolysiert.

### **2.8.7 Anreicherung von RNA-Polymerase aus *S. griseus***

RNA-Polymerase aus *S. griseus* wurden in Anlehnung an die von Buttner und Brown (1985) beschriebene Methode über selektive Präzipitation mit Polyethylenimin und Ammoniumsulfat, DNA-Cellulose-Affinitätschromatographie und Gelfiltrationschromatographie angereichert. Zellen aus 1,5 l einer Fermentation von *S. griseus* (vgl. 2.5.5) wurden durch Zentrifugation geerntet, mit Crackpuffer gewaschen und in 120 ml des selben Puffers resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch zweimalige Passage in einer French Pressure Zelle (vgl. 2.8.1) aufgebrochen. 130 ml TGED/0,2 M NaCl wurden den aufgebrochenen Zellen hinzugefügt und Zelldebris durch anschließende Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor, 12000 Upm, 20 min, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde unter Rühren auf eine Polyethylenimin-Endkonzentration von 0,35 % gebracht (10 % Polyethylenimin-Lösung, pH 7,9). Polyethylenimin/DNA/Protein-Komplexe wurden durch anschließende Zentrifugation (GSA-Rotor, 5000 Upm, 90 sec, 4 °C) sedimentiert und mit 200 ml TGED/0,5 M NaCl gewaschen und in der gleichen Menge TGED/0,5 M NaCl resuspendiert. Daraufhin wurde eine selektive Ammoniumsulfat-Präzipitation durchgeführt (50 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und erneut zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SS34-Rotor, 17000 Upm, 30 min, 4 °C). Das Präzipitat wurde in 80 ml TGED resuspendiert und mit weiteren ca. 300 ml TGED versetzt, bis die Leitfähigkeit der von TGED/50 mM NaCl entsprach. Anschließend wurden die Proteine mit einer Flußrate von 1,5 ml/min auf eine mit TGED/50 mM NaCl äquilibrierte DNA-Cellulose-Säule gebracht, welche an die Einheit eines „Econo“-Systems

(Bio-Rad, München) angeschlossen war. An DNA-Cellulose gebundene RNA-Polymerasen wurden schließlich mit einem NaCl-Gradienten von 50 mM bis 2 M wiedergewonnen und die eluierten, Protein-enthaltenden Fraktionen vereinigt. Nach erneuter Ammoniumsulfat-Präzipitation (50 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) wurde zentrifugiert (SS34-Rotor, 17000 Upm, 30 min, 4 °C) und das Ammoniumsulfat-Präzipitat in 800  $\mu\text{l}$  Gelfiltrationspuffer gelöst. Die abschließende Gelfiltration wurde mit einer „Bio-Select SEC 400-5“-Säule (BioRad, München) bei einer Flußrate von 1 ml/min in Gelfiltrationspuffer durchgeführt. RNA Polymerase-enthaltende Fraktionen wurden danach gegen Lagerpuffer dialysiert und bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.8.8 Reinigung von His-tag-StrR mittels Ni-NTA-Agarose**

His-tag-StrR wurde mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) in selbst gepackten Säulen sowohl unter nativen wie auch unter denaturierenden Bedingungen nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Die an die Ni-NTA-Agarose-Matrix gebundenen Proteine wurden durch einen Gradienten von 20 - 250 mM Imidazol eluiert.

### **2.8.9 „Refolding“ von denaturierend gereinigtem His-tag-StrR**

Zum „Refolding“ von denaturierend aufgereinigtem His-tag-StrR (vgl. 2.8.8) wurden zunächst die molekularen Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE (aus *S. coelicolor* A3(2); G. Bucca, pers. Mitteilung) in den molekularen Verhältnissen 4,25:0,25:0,5 in „Folding“-Puffer gemischt. Zu 99  $\mu\text{l}$  dieses Gemisches wurden danach 45 pmol (1  $\mu\text{l}$ ) von denaturierend gereinigtem His-tag-StrR zugegeben und 1 h bei 25 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente der gleiche Ansatz ohne Zugabe von molekularen Chaperonen. Die Qualität der Rückfaltung von His-tag-StrR (rHis-tag-StrR) wurde anschließend in Gelretardierungsassays (vgl. 2.8.6) bestimmt. Die Lagerung von rHis-tag-StrR erfolgte bei 4 °C.

### 2.8.10 *In vitro* Transkriptionsassays

*In vitro* Transkriptionsassays wurden in Anlehnung an die von Bucca et al. (1997) publizierte Methode durchgeführt. Als „Template“-DNA diente das 380 bp *SacII/SalI dnaKp* Fragment (G. Bucca, pers. Mitteilung), das 598 bp *SmaI/AvaII dagp1-p4* Fragment von pIJ2027 und das 368 bp *PstI/XhoI strB1p* Fragment von pJDM4001. In einem 40 µl-Standard-Assay wurden zunächst 0,1 pmol „Template“-DNA im Reaktions-Mix für 5 min bei RT vorinkubiert. Wurden StrR-abhängige *in vitro*-Transkriptionsassays durchgeführt, so wurden an dieser Stelle zusätzlich 2,5 - 10 pmol rHis-tag-StrR (vgl. 2.8.9) hinzugefügt. Der Assay wurde durch Zugabe von 2 pmol von angereicherten RNA-Polymerasen (vgl. 2.8.7) gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden dem Ansatz 5 µl NTP-Mix (enthält je 0,4 mM ATP, GTP, UTP und 10 µCi  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-CTP, spezifische Aktivität 400 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) hinzugefügt und nach weiteren 2 min wurde 1 µl Heparinlösung (5 µg/µl) hinzupipettiert. Der Ansatz wurde für weitere 5 min inkubiert, anschließend mit 2 µl CTP (100 mM) ergänzt und für weitere 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Terminationslösung (0,5 mg/ml tRNA, 2 M Natriumacetat (pH 6,0)) gestoppt und die Transkripte durch Zugabe von 70 µl Isopropanol und Abkühlung auf -20 °C für 2 h sowie anschließende Zentrifugation (13000 Upm, 20 min, RT) präzipitiert. Nach dem Waschen des Präzipitats mit 70 % Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in Auftragspuffer (38 % Formamid, 8 mM EDTA, 0,02 % Bromphenolblau, 0,02 % Xylen-Cyanol) gelöst. Vor dem Auftrag auf ein denaturierendes 6 % PAA-8 M Harnstoffgel (Heinrich, 1986) mit 0,5 × TBE als Laufpuffer wurde der Reaktionsansatz und der Molekulargewichtsstandard für 3 min auf 98 °C erhitzt. Als Molekulargewichtsstandard dienten 9000 cpm von mit *HpaI* hydrolysiertem Plasmid pBR322 (Boehringer, Mannheim).

### 2.8.11 Bestimmung der Catechol-2,3-Dioxygenase (XylE-Aktivität)

Zur Bestimmung der StrR-abhängigen XylE-Aktivität wurden *S. lividans*/pSTW13.2i-Doppeltransformanten (*xylE*-Reporter gen; vgl. 2.7.16) benutzt, die mit dem entsprechenden „*strR*-Plasmid“ transformiert waren (vgl. 3.3.2). Die Messung der XylE-Aktivität (Umsetzung von Brenzkatechin (Catechol) zum gelb gefärbten 2-Hydroxy-muconsäuresemialdehyd) erfolgte in Anlehnung an die von Ingram et al. (1989) publizierte

Methode. Abweichend von dieser Vorschrift wurden die Zellen in Aufschlußpuffer aufgeschlossen und der daraus gewonnene zellfreie Extrakt (vgl. 2.8.1) im Enzymtest eingesetzt. Durch Zugabe von 1 - 5  $\mu\text{l}$  des zellfreien Extraktes zu 999  $\mu\text{l}$  bzw. 995  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (0,2 mM Brenzcatechin in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) wurde die Reaktion gestartet und die Extinktionsänderung bei  $\lambda = 375 \text{ nm}$  über einen Zeitraum von 5 min verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Xyle-Aktivität wurden die Werte des linearen Bereiches der Substratumsetzung nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spez. Aktivität [kat} \cdot (\text{mg Gesamtprotein})^{-1}] = \frac{\Delta E \times V_1 \times 10^{-3}}{t \times d \times \epsilon \times V_2 \times c_{\text{Gesamtprotein}}}$$

$\Delta E$  = linearer Bereich der Extinktionsänderung bei 375 nm

$V_1$  = Volumen des Gesamtansatzes [ml]

$V_2$  = Volumen der eingesetzten Probe [ml]

$t$  = Zeit [sec]

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient [33000 l/(mol  $\times$  cm)]

$d$  = Schichtdicke der Küvette [cm]

$c_{\text{Gesamtprotein}}$  = eingestzte Gesamtproteinmenge im zellfreien Extrakt [mg/ml]

### 2.8.12 Screening von potentiellen StrR-Mutanten auf Agarplatten

*S. lividans*/pSTW13.2i-Protoplasten (vgl. 2.7.12) wurden mit ca. 1  $\mu\text{g}$  mutagenisierter Plasmid-DNA (pSTW350/\*; vgl. 2.7.11) transformiert. Anschließend wurden die *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW350/\*-Doppeltransformanten auf SPMR-Agarplatten unter Selektionsdruck (vgl. 2.2.2) regeneriert und nach 3 - 5 Tagen analysiert. Dafür wurden die Agarplatten mit einer 0,1 M wäßrigen Brenzkatechinlösung überschichtet und die Gelbfärbung der Kolonien (Xyle-Aktivität, vgl. 3.3.2; Abb. 3.12) nach 3 - 10 min nach Überschichtung qualitativ abgeschätzt. Solche Doppeltransformanten mit ausbleibender, oder im Vergleich mit der Positivkontrolle geringerer Gelbfärbung wurden als potenitelle StrR-Mutanten betrachtet. Als Positivkontrolle dienten *S. lividans*/pSTW13.2i-Doppeltransformanten mit nicht mutagenisiertem Plasmid pSTW350/0, als Negativkontrolle solche, welche mit dem Vektor pSTW1 transformiert waren.

### 2.8.13 Bestimmung der StrB1-Amidinotransferase-Aktivität

Der Enzymtest wurde nach der Methode III von Walker (1975a) durchgeführt. 80 µl Reaktionspuffer wurden mit 20 µl zellfreiem *S. griseus*-Extrakt versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl 15 %iger TCA-Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Nach Inkubation bei RT für 10 min wurde der Überstand durch Zentrifugation (13000 Upm, 10 min) gewonnen. 300 µl des Überstandes wurden mit 500 µl 1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) versetzt. Danach wurden 60 µl Aceton und 60 µl Komplexbildungs-Lösung (1 %  $\text{Na}_3(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3)$ ) zum Ansatz pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 480 nm bestimmt. Als Nullkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von zellfreiem *S. griseus*-Extrakt.

## 3 Ergebnisse

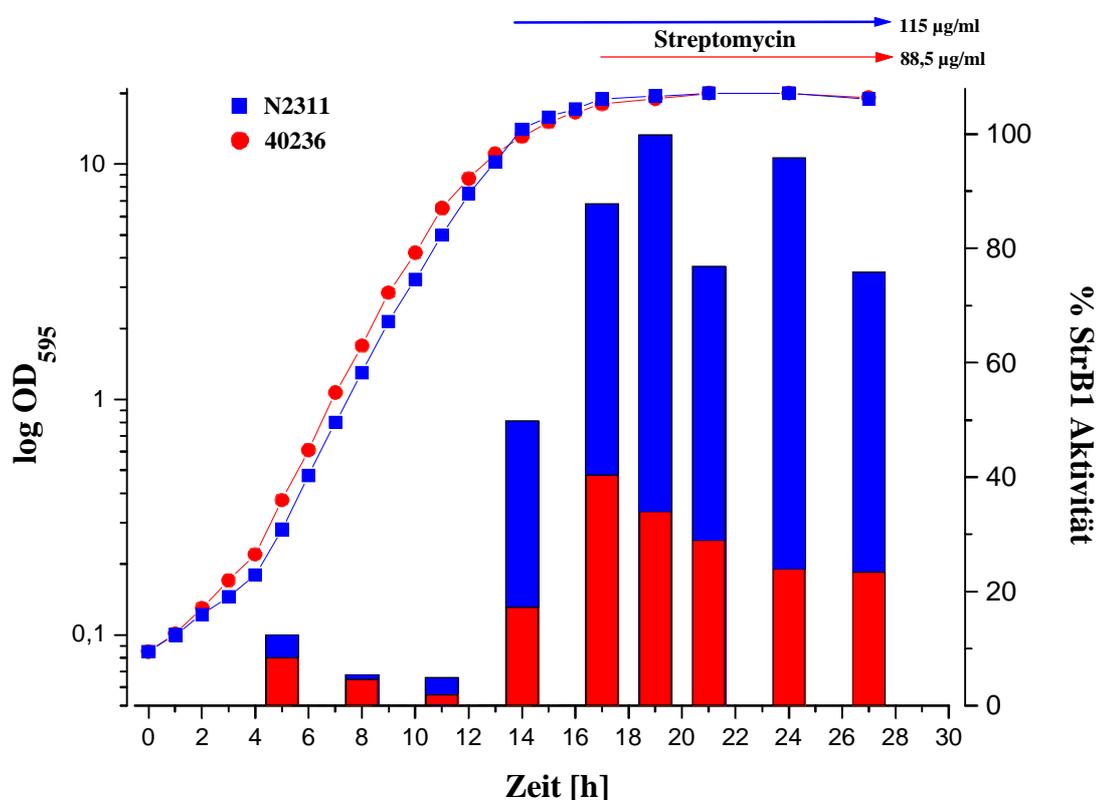
### 3.1 Wachstumskinetik von *S. griseus* in TSB-Medium

#### 3.1.1 Untersuchungen zur wachstumsphasenabhängigen StrB1-Aktivität und Produktion von StrR in *S. griseus*

Die Wachstumsbedingungen, unter denen *S. griseus* SM produziert, wurden durch vorherige Arbeiten von Neumann (1996) bereits intensiv untersucht. Die höchste Zelldichte und SM-Produktion wurde dabei in TSB-Medium erreicht. Die in dieser Arbeit durchgeführten zusätzlichen Experimente zur Wachstumskinetik und SM-Produktion waren für den optimalen Aufbau eines StrR-abhängigen *in vitro* Transkriptionssystems notwendig. Für ein solches *in vitro* Transkriptionssystem mußte am *strB1p*-Promotor aktive *S. griseus*-RNA-Polymerase angereichert werden. Aufgrund der Kenntnis, daß StrR die Transkription von *strB1* aktiviert (Retzlaff und Distler, 1995), wurden die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsexperimente zusätzlich mit Untersuchungen zur StrR-Kinetik und wachstumsphasenabhängigen StrB1-Aktivität gekoppelt. Es wurde davon ausgegangen, daß zu dem Zeitpunkt, an welchem sowohl StrR als auch der größte Zuwachs an StrB1-Aktivität in *S. griseus* meßbar sein würden, auch die *S. griseus*-RNA-Polymerase *in vivo* am *strB1p*-Promotor aktiv sein muß. In dem später zu etablierenden *in vitro* Transkriptionssystem sollte dann solche RNA-Polymerase zusammen mit gereinigtem StrR-Protein auch *in vitro* am *strB1p*-Promotor ein spezifisches, StrR-abhängiges Transkript liefern.

Das Wachstumsverhalten des SM-Überproduzenten *S. griseus* N2-3-11 und des Wildstammes *S. griseus* DSM40236 zeigte in TSB-Medium keinerlei signifikante Unterschiede (Abb. 3.1). Beide Stämme zeigten zwei exponentielle Wachstumsphasen zwischen 1 - 5 h und 5 - 13 h, was dem biphasischen Verhalten in Minimalmedium entspricht (Neumann et al., 1996). Eine lag-Phase zwischen diesen beiden exponentiellen Wachstumsphasen konnte jedoch bei keinem der beiden untersuchten Stämme detektiert werden. Nach einer Wachstumszeit von 13 - 14 h erfolgte der Übergang zur stationären Wachstumsphase. Beide Stämme produzierten in gleichem Umfang Biomasse; die OD am Ende des Meßzeitraums nach 27 h lag bei  $OD_{595} = 18$ . Nach 5, 8, und 11 h Wachstum konnte in beiden Stämmen nur eine sehr geringe StrB1-Aktivität nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.1). Beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase nach 14 h erfolgte in beiden Stämmen ein sprunghafter Anstieg der StrB1-Aktivität. Die StrB1-Aktivität des Wildstammes war dabei um ca. 60 % geringer als die des

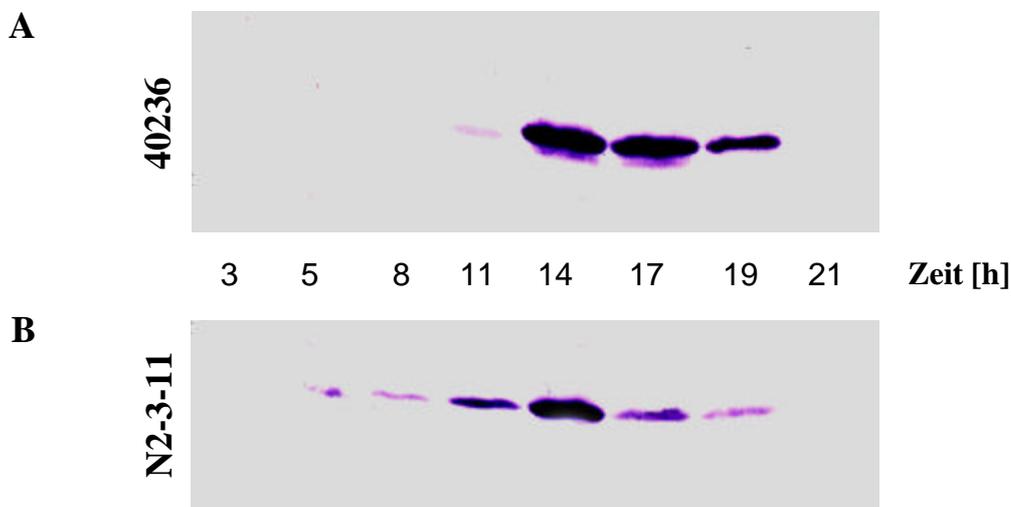
SM-Überproduzenten, *S. griseus* N2-3-11. Die StrB1-Aktivität erhöhte sich bei beiden Stämmen im weiteren Wachstumsverlauf und erreichte ihr Maximum nach 17 h (*S. griseus* DSM40236) bzw. nach 19 h (*S. griseus* N2-3-11), um nach 27 h Wachstum in beiden Stämmen auf ca. 80 % der maximalen Aktivität abzufallen. Streptomycin konnte mit dem Stamm *S. griseus* N2-3-11 erstmals nach einer Wachstumszeit von 14 h nachgewiesen werden. Der Stamm erreichte nach 27 h ein Maximum mit einer SM-Konzentration von 115 µg/ml (vgl. Abb. 3.1). Beim Wildstamm dagegen konnte SM erst nach einer Wachstumszeit von 17 h nachgewiesen werden, und die maximal produzierte SM-Menge wurde ebenfalls nach 27 h mit 88,5 µg/ml ermittelt.



**Abb. 3.1: Wachstum, StrB1-Aktivität und Streptomycin-Produktion von *S. griseus* in TSB-Medium.** Dargestellt ist, in halblogarithmischer Auftragung, die Produktion der Biomasse ( $OD_{595}$ ) für *S. griseus* DSM40236 (Wildstamm, 40236, rot) und für *S. griseus* N2-3-11 (Streptomycin-überproduzierender Stamm, N2311, blau). Die zeitabhängigen relativen StrB1-Aktivitäten beider Stämme sind im Balkendiagramm dargestellt (StrB1 von *S. griseus* N2-3-11 nach 19 h entspricht 100 %). Der Zeitraum der meßbaren Streptomycin-Produktion beider Stämme ist durch Pfeile gekennzeichnet und die nach 27 h ermittelten Werte sind angegeben.

Die StrR-Produktion in beiden Stämme wurde durch Western-Experimente analysiert (Abb. 3.2). Das StrR-Protein wurde in *S. griseus* DSM40236 erstmals nach 11 h nachgewiesen, wenn auch in sehr geringen Mengen (vgl. Abb. 3.2 A). Nach 14 h Wachstum, also während des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase und parallel zur Zunahme der StrB1-

Aktivität, war StrR in einer hohen Konzentration nachweisbar. Die StrR-Menge zu diesem Zeitpunkt stellte auch das Maximum der StrR-Produktion dar und nahm im weiteren Wachstumsverlauf wieder rasch und signifikant ab (vgl. Abb. 3.2 A). Nach 21 h war kein StrR-Protein mehr zu detektieren. Im Unterschied dazu konnte im SM-Überproduzenten, *S. griseus* N2-3-11, StrR bereits in der zweiten exponentiellen Wachstumsphase nach 5 und 8 h detektiert werden (vgl. Abb. 3.2 B). Die höchste StrR-Menge wurde in *S. griseus* N2-3-11, genau wie beim Wildstamm, nach 14 h Wachstum gefunden (vgl. Abb. 3.2 B). Jedoch war die auf diese Weise meßbare Menge an StrR geringer als im Wildstamm (vgl. Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Analyse der zeitabhängigen Produktion von StrR in *S. griseus*.** Dargestellt ist eine Western-Analyse von *S. griseus*-Gesamtzellextrakten nach Wachstum in TSB-Medium (vgl. Abb. 3.1) mit StrR-Antiserum. Die Zeitpunkte der Probenahmen sind angegeben. Jeweils 50 µg Protein wurden nach SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) auf PVDF-Membranen immobilisiert. (A) *S. griseus* DSM40236; (B) *S. griseus* N2-3-11.

Durch densitometrische Auswertung der Western-Analysen wurden die relativen StrR-Mengen beider Stämme miteinander verglichen und sind in Tab. 3-1 zusammengefaßt. Der 14 h-Wert von *S. griseus* DSM40236 wurde dabei zu 100 % gesetzt. Als unmittelbares Ergebnis ließ sich aus diesen Versuchen interpretieren, daß unter den verwendeten Bedingungen sowohl StrR als auch StrB1 sukzessive nur in einem sehr geringen Zeitfenster am Ende der vegetativen Wachstumsphase in signifikanten Mengen produziert wurden. Dabei unterlag das StrR-Protein einem wesentlich rascheren Abbau als StrB1.

Tab. 3-1: Relative Quantifizierung der StrR-Produktion in *S. griseus* DSM40236 und *S. griseus* N2-3-11.

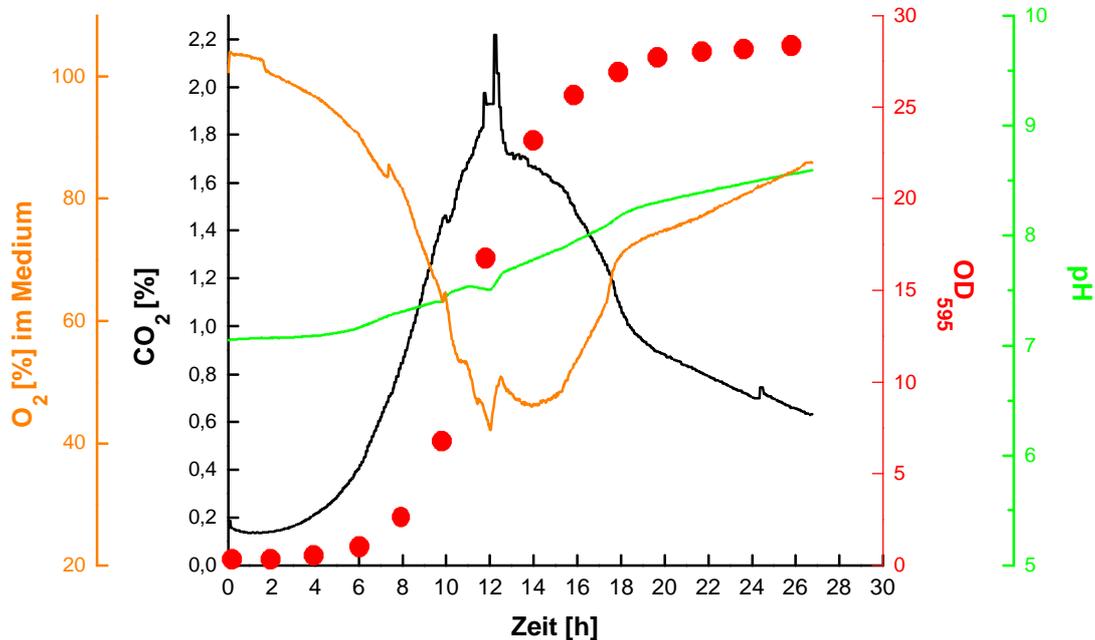
<i>S. griseus</i> - Stamm	Wachstumszeit [h]						
	5	8	11	14	17	19	21
40236 [%]	0	0	1	100	87	41	0
N2-3-11 [%]	2	3	22	66	15	5	0

## 3.2 Versuche zum Aufbau eines StrR-abhängigen *in vitro* Transkriptionssystem

### 3.2.1 Fermentation von *S. griseus* DSM40236

Zur Gewinnung von großen Mengen an Zellmasse für die Anreicherung von aktiver RNA-Polymerase wurden die *S. griseus* Stämme N2-3-11 und DSM40236 in TSB-Medium im 3 l Maßstab fermentiert. Zunächst galt es, die Ergebnisse der StrB1-Aktivität und StrR-Produktion aus den Schüttelkolben-Experimenten (vgl. 3.1.1) qualitativ zu verifizieren. In Abb. 3.3 ist die Fermentationskinetik von *S. griseus* DSM40236 gezeigt. Der Verlauf der Biomasseakkumulation war mit den Ergebnissen der Schüttelkolben-Experimente weitgehend identisch. Lediglich eine höhere Produktion an Biomasse bei Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde detektiert ( $OD_{595} = 28$  nach 27 h). Der Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase zwischen 13 und 17 h wurde durch die abfallende  $CO_2$ -Produktion sichtbar. Gleichzeitig stieg ab 14 h die  $O_2$ -Konzentration im Medium wieder deutlich an. Zu den Zeitpunkten von 8 h und 11 h konnte weder eine StrB1-Aktivität noch eine StrR-Produktion nachgewiesen werden, was die Ergebnisse der Schüttelkolben-Experimente bestätigte (vgl. 3.1.1). Nach 14 h Wachstum wurde zum ersten Mal die StrB1-Aktivität, sowie das StrR-Protein nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Es wurde deshalb davon ausgegangen, daß die *S. griseus*-RNA-Polymerase zu diesem Zeitpunkt im Zusammenspiel mit StrR das *strB1*-Gen vom *strB1p*-Promotor transkribierte. Deshalb wurden die Zellen zur Anreicherung der RNA-Polymerase zu diesem Zeitpunkt geerntet. Um die Aktivität der RNA-Polymerase am *strB1p*-Promotor mit derjenigen aus der exponentiellen

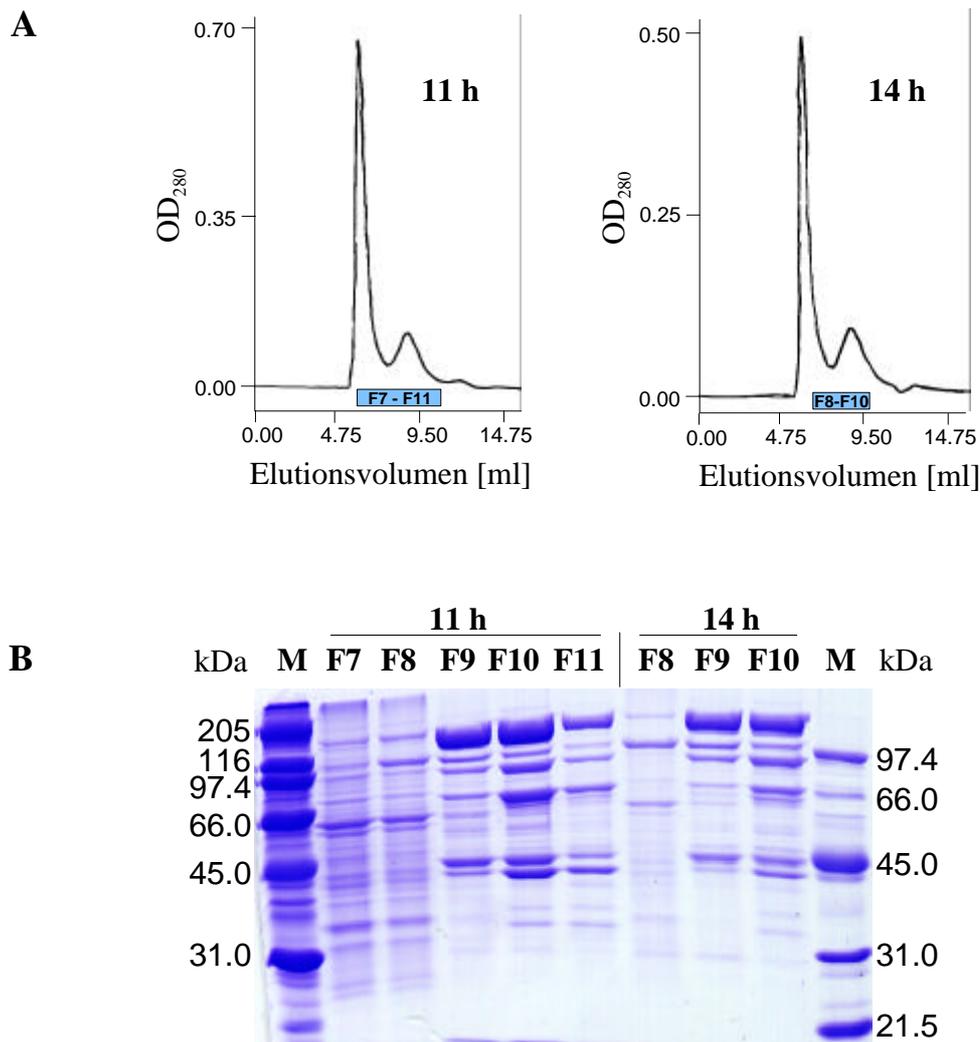
Wachstumsphase vergleichen zu können, wurde eine Vergleichskultur von *S. griseus* DSM40236 nach 11 h geerntet.



**Abb. 3.3: Fermentation von *S. griseus* DSM40236 in TSB-Medium.** Dargestellt sind der zeitliche Verlauf der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft (schwarz), der O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium (orange) sowie des pH-Wertes (grün). Diese Werte wurden „online“ kontinuierlich während der gesamten Fermentation analysiert. Die Änderung der OD<sub>595</sub> (rot) wurde in zeitlichen Abständen von 2 h bestimmt.

### 3.2.2 Anreicherung von RNA-Polymerase aus *S. griseus* DSM40236

RNA-Polymerasen der exponentiellen Wachstumsphase (11 h) und des Übergangs zur stationären Wachstumsphase (14 h) wurden aus Mycel der Fermentation von *S. griseus* DSM40236 (vgl. 3.2.1) gewonnen. Die Anreicherung der RNA-Polymerasen erfolgte über eine selektive Fällung mit Polymin und Ammoniumsulfat, DNA-Cellulose-Affinitätschromatographie und abschließende Gelfiltration. Das Anreicherungsprotokoll ist unter 2.8.7 beschrieben und wurde abschließend mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese und *in vitro* Transkriptionsassays mit den *dagp1-p4*- und *dnaKp*-Promotoren aus *S. coelicolor* überprüft (vgl. 3.2.3). Das OD<sub>280</sub>-Elutionsprofil der abschließenden Gelfiltration zeigte keinerlei Unterschiede im Vergleich der Präparationen aus beiden Wachstumszeiten (Abb. 3.4 A). Ein Maximum nach einem Elutionsvolumen von 6,5 ml wurde gefolgt von einem breiteren Maximum geringerer Intensität nach einem Elutionsvolumen zwischen 8,5 - 11,5 ml.



**Abb. 3.4: Anreicherung von RNA-Polymerase aus *S. griseus* DSM40236.** (A) Chromatogramme der abschließenden Gelfiltrationen der Präparationen von nach 11 h und nach 14 h geernteten *S. griseus* DSM40236 Zellen. Die zur Analyse der SDS-PAA-Gelelektrophorese benutzten Fraktionen sind blau hinterlegt. (B) SDS-PAA-Gelelektrophorese (10 % PAA) der Fraktionen der abschließenden Gelfiltration. Folgende Fraktionen wurden aufgetragen: 11 h: F7 - F11; 14 h: F8 - F10; M Molekulargewichtsstandard, Größe in kDa angegeben.

Die analytische SDS-PAA-Gelelektrophorese der Gelfiltrationsfraktionen 7 - 11 für die nach 11 h geernteten Zellen zeigte in den Fraktionen 9, 10 und 11 (8,5 - 11,5 ml) mehrere für RNA-Polymerasen signifikante Banden (Abb. 3.4 B). So wurden im molekularen Bereich von  $M_r = 140 - 150$  kDa und  $M_r = 47$  kDa Proteinbanden identifiziert, deren apparentes Molekulargewicht mit den theoretischen Molekulargewichten der  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\alpha$ -Untereinheiten von *S. coelicolor*-RNA-Polymerasen (Buttner und Brown, 1985) übereinstimmte. Neben diesen Banden für das „core“ der RNA-Polymerase wurde noch eine weitere prominente Bande im Bereich von  $M_r = 66$  kDa identifiziert. Diese Proteingröße entspricht der Größe des

Hauptsigma-Faktors  $\sigma^{\text{hrdB}}$  aus *S. coelicolor* (Buttner et al., 1989). Desweiteren wurden schwächere Proteinbanden im Bereich zwischen  $M_r = 31 - 100$  kDa identifiziert, welche alternative  $\sigma$ -Faktor-Populationen aber auch kontaminierende Proteine darstellen konnten. Die SDS-PAA-Gelelektrophorese zeigte, daß die Gelfiltrationsfraktionen F8 - F10 der nach 14 h geernteten *S. griseus*-Zellen und die Fraktionen F8 - F10 der nach 11 h geernteten *S. griseus*-Zellen identische Bandenmuster aufwiesen (vgl. Abb. 3.4 B).

### 3.2.3 Analyse der *in vitro* Transkriptionsassays mit den *dagp1-p4* und *dnaKp* Fragmenten

Die Pufferbedingungen für die bisher durchgeführten *in vitro* Transkriptionsassays (Buttner und Brown, 1985) und für die DNA-Bindetests mit StrR-Proteinen (Retzlaff und Distler, 1995) unterschieden sich in einigen wesentlichen Bestandteilen (Tab. 3-2).

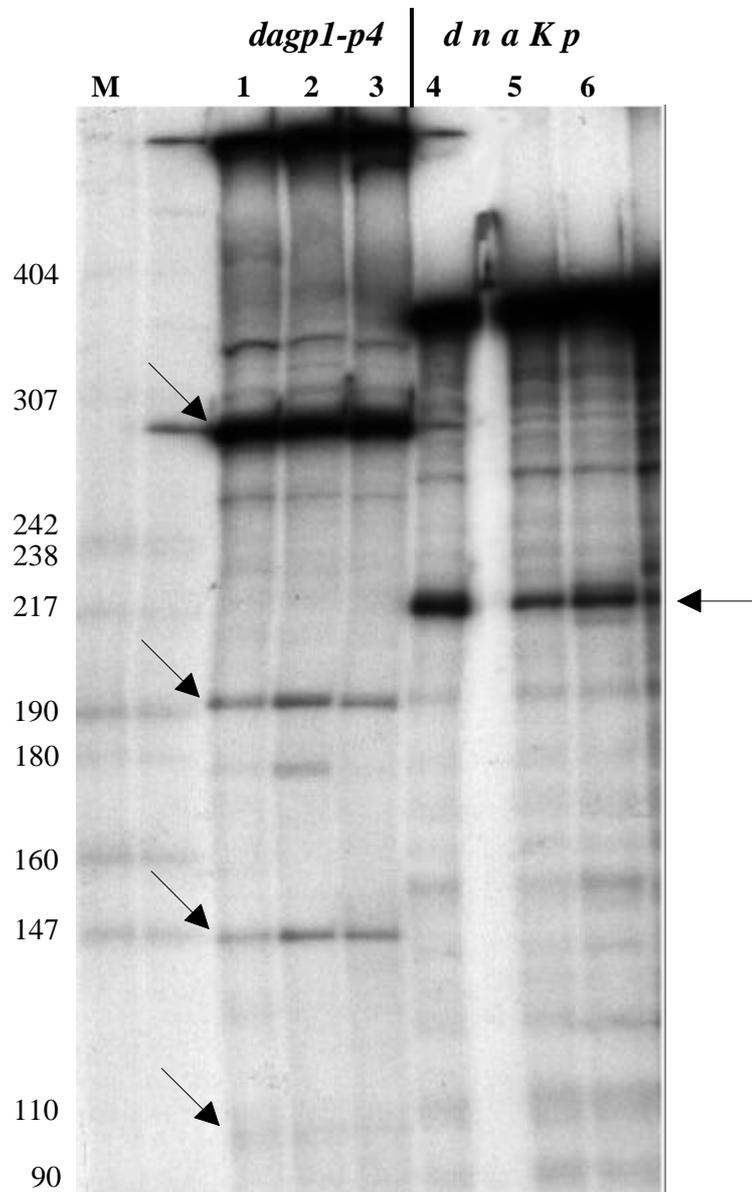
Tab. 3-2: Vergleich der Pufferbedingungen für *in vitro* Transkriptionsassays und Gelretardierungsassays sowie neu definierte Pufferbedingungen für StrR-abhängige *in vitro* Transkriptionsassays.

„Master-Mix“ <i>in vitro</i> Transkriptionsassays	„Bindungs-Mix“ StrR-abhängige <i>in vitro</i> Transkriptionsassays	„Bindungs-Puffer“ <i>in vitro</i> Gelretardierungs-assays
RNA Polymerase	RNA Polymerase + His-tag-StrR	His-tag-StrR
40 mM Tris/HCl (pH 7,9)	12,5 mM Tris/HCl (pH 7,9)	12,5 mM Tris/HCl (pH 7,9)
20 mM NaCl	5 mM NaCl	-----
-----	62,5 mM KCl	62,5 mM KCl
10 mM MgCl <sub>2</sub>	6,25 mM MgCl <sub>2</sub>	7,5 mM MgCl <sub>2</sub> (max.)
6 mM EDTA	-----	-----
0,4 mM K-Phosphat (pH 7.5)	-----	-----
1,5 mM DTT	1,5 mM DTT	0,75 mM DTT
0,75 mg/ml BSA	0,75 mg/ml BSA	-----
20 % Glycerin	12,5 % Glycerin	12,5 % Glycerin

Es galt deshalb zunächst herauszufinden, unter welchen Pufferbedingungen die Aktivitäten von RNA-Polymerase und StrR gleichzeitig gemessen werden können. Kritisch war insbesondere die Konzentration des MgCl<sub>2</sub>. Diese durfte im Falle der StrR/DNA-Interaktion max. 7,5 mM sein (L. Retzlaff, pers. Mitteilung). Im „Master-Mix“ für *in vitro* Transkriptionsassays ist die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration jedoch 10 mM. Weitere Differenzen lagen für die Komponenten KCl, EDTA, Phosphat, BSA und Glycerin vor (vgl. Tab. 3-2). Es wurde schließlich ein Puffer optimiert („Bindungs-Mix“; vgl. Tab. 3-2), der sowohl die DNA-Bindung von StrR als auch die *in vitro* Transkription durch angereicherte RNA-Polymerasen ermöglichte.

Die Aktivität der angereicherten RNA-Polymerasen wurde direkt in *in vitro* Transkriptionsassays mit dem 598 bp *SmaI/AvaII* *dagp1-p4*-Fragment aus pIJ2027 und dem 380 bp *SacII/SalI* *dnaKp*-Fragment (G. Bucca, pers. Mitteilung) überprüft (Abb. 3.5). Diese Experimente wurden nur mit der RNA-Polymerase-Präparation der nach 14 h geernteten *S. griseus*-Zellen (vgl. 3.2.2) durchgeführt. Als Positivkontrolle in diesen Experimenten diente RNA-Polymerase, welche aus *S. coelicolor* angereichert wurde (G. Bucca, pers. Mitteilung). Die vier auf dem *dagp1-p4*-Fragment befindlichen Promotoren werden in *S. coelicolor* in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen abgelesen, wobei mindestens drei alternative  $\sigma$ -Faktoren an der Promotorerkennung beteiligt sind (Buttner et al., 1988). Der Promotor des *dnaK*-Operons wird dagegen nur vom Haupt- $\sigma$ -Faktor ( $\sigma^{\text{hrdB}}$ ) erkannt (G. Bucca, persönliche Mitteilung). Somit war die Durchführung dieser *in vitro* Transkriptionsassays gleichzeitig ein Maß für die Anreicherung der RNA-Polymerase-Holoenzyme mit Haupt- und alternativen  $\sigma$ -Faktor(en). Vier spezifische Transkripte der Längen von 289, 194, 148 und 102 Nukleotiden wurden bei Einsatz des *dagp1-p4* Fragmentes detektiert (vgl. Abb. 3.5; Spur 1 - 3). Dabei waren die Transkriptlängen, welche durch die *S. griseus*-RNA-Polymerase verursacht wurden (vgl. Abb. 3.5; Spur 2, 3) identisch mit denen von RNA-Polymerase aus *S. coelicolor* (vgl. Abb. 3.5; Spur 1). Die unterschiedliche Intensität der vier spezifischen Transkripte ist wahrscheinlich auf die abnehmende Transkriptlänge und damit auf die abnehmende Stabilität der Transkripte zurückzuführen. Das Transkript der Länge von 102 Nukleotiden war nur noch als schwache Bande detektierbar. Zusätzlich wurde jeweils ein viertes Transkript von 598 Nukleotiden detektiert, welches der Länge des eingesetzten Fragmentes entsprach und durch eine „end-to-end“-Transkription zu erklären ist. Beim Vergleich der Aktivität der RNA-Polymerasen wurde kein signifikanter Unterschied in der Stärke der Transkripte festgestellt, wenn die Reaktion im „Master-Mix“ oder im „Bindungs-Mix“ durchgeführt wurde. Bei

Durchführung des Experimentes mit *S. griseus*-RNA-Polymerase im „Master-Mix“ wurde ein zusätzliches Transkript von ca. 180 Nukleotiden detektiert. Dieses Transkript war allerdings weder bei Einsatz der *S. coelicolor*-RNA-Polymerase im gleichen Puffer, noch bei Einsatz der *S. griseus*-RNA-Polymerase im optimierten „Bindungs-Mix“ detektierbar.



**Abb. 3.5:** *In vitro* Transkriptionsversuche mit RNA-Polymerase aus *S. griseus* und *S. coelicolor*. Autoradiogramm eines 0,8 % PAA-8 M Harnstoff-Sequenzgels zu den *in vitro* Transkriptionsversuchen, bei denen das 598 bp *SmaI/AvaII* *dagp1-p4* Fragment und das 380 bp *SacII/SalI* *dnaKp* Fragment eingesetzt wurden. Es wurden jeweils ca. 0,1 - 0,3 pmol „Template“-DNA und ca. 2 pmol RNA-Polymerase eingesetzt. Transkripte der Größen von 598 Nukleotiden (1 - 3) und 380 Nukleotiden (4 - 6) entsprechen den Größen der eingesetzten Fragmente. Spezifische Transkripte der vier *dagp*-Promotoren mit Längen von 289 (*dagp4*), 194 (*dagp3*), 148 (*dagp2*) und 102 Nukleotiden (*dagp1*) sowie des *dnaKp*-Promoters (217 Nucleotide) sind durch Pfeile gekennzeichnet. (1) *S. coelicolor*-RNA-Polymerase in „Master-Mix“ (vgl. Tab. 3-2); (2) *S. griseus*-RNA-Polymerase in „Master-Mix“; (3) *S. griseus*-RNA-Polymerase in „Bindungs-Mix“ (vgl. Tab. 3-2); (4) *S. coelicolor*-RNA-Polymerase in „Master-Mix“; (5) *S. griseus*-RNA-Polymerase in „Bindungs-Mix“; (6) *S. griseus*-RNA-Polymerase in „Master-Mix“; (M) Plasmid pBR322 hydrolysiert mit *HpaI*, Größenstandards sind als Nukleotidlänge angegeben.

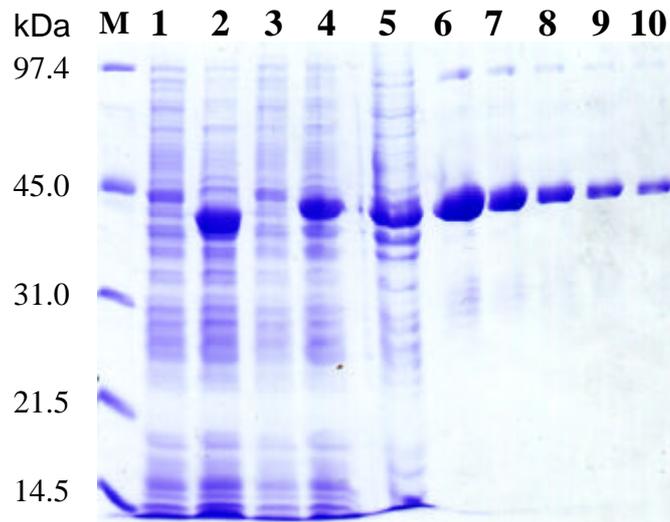
Bei Einsatz des *dnaKp*-Fragmentes wurde das erwartete spezifische Transkript von 217 Nukleotiden (Bucca et al., 1997), sowohl bei Einsatz von *S. coelicolor*- wie auch von *S. griseus*-RNA-Polymerase, identifiziert (vgl. Abb. 3.5). Das „end-to-end“-Transkript von 380 Nukleotiden wurde ebenfalls von beiden RNA-Polymerasen gebildet. Das spezifische Transkript, welches im „Bindungs-Mix“ von *S. griseus*-RNA-Polymerase gebildet wurde, war in seiner Intensität nur unwesentlich geringer als dasjenige, welches bei Einsatz von „Master-Mix“ gebildet wurde.

Mit Hilfe dieser Experimente wurde gezeigt, daß die RNA-Polymerase aus *S. griseus* DSM40236 erfolgreich angereichert wurde. Die RNA-Polymerase-Präparation war an 4 verschiedenen Promotoren aktiv, zu deren Erkennung mindestens drei unterschiedliche  $\sigma$ -Faktoren (Haupt- und alternative  $\sigma$ -Faktoren) benötigt werden. Bei Einsatz von „Bindungs-Mix“ wurden die erwarteten spezifischen- und „end-to-end“-Transkripte detektiert wie unter den Originalbedingungen. Da im „Bindungs-Mix“ auch eine StrR/DNA-Interaktion detektierbar war (vgl. 3.2.4), schien dieser Puffer für die Durchführung von StrR-abhängigen *in vitro* Transkriptionsassays (vgl. 3.2.5) geeignet zu sein.

### **3.2.4 Präparation von His-tag-StrR: Heterologe Produktion in *E. coli* und native sowie denaturierende Reinigung**

Das His-tag-StrR wurde in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pSTR16 in heterolog und in löslicher Form produziert (Retzlaff und Distler, 1995; Abb. 3.6). Da das Plasmid pSTR16 auf der Fusion des *strR*-Gens mit dem Vektor pET16b basiert, wurde ein im N-Terminus um 21 As-Reste, darunter 12 Histidin-Reste, verlängertes StrR-Protein (His-tag-StrR) als Genprodukt erwartet. Die SDS/PAA-Gelelektrophorese zeigte schließlich, daß nach der Induktion mit IPTG ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von 39,1 kDa in *E. coli* angereichert wurde. Als Vergleich wurde ebenfalls das native StrR-Protein überproduziert (*E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pSTR11), was durch eine zusätzliche Proteinbande mit dem Molekulargewicht von ca. 37,6 kDa zu erkennen war. Das His-tag-StrR Protein wurde zunächst unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt (Daten nicht gezeigt). Gelretardierungsassays mit nativ gereinigtem His-tag-StrR am 290 bp *EcoRI strB1p*-Fragment zeigten jedoch, daß das eingesetzte His-tag-StrR keine DNA-Bindeaktivität mehr besaß (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte die DNA-Bindeaktivität des mit Imidazol von der

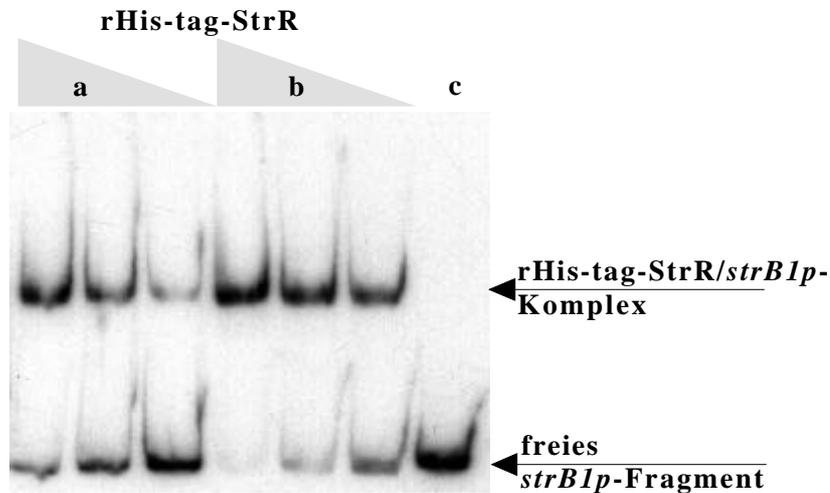
Ni-NTA-Agarose eluierten His-tag-StrR-Proteins auch nicht durch eine Dialyse gegen Aufschlußpuffer (vgl. 2.2.3) zurückgewonnen werden. Deshalb wurde His-tag-StrR anschließend unter denaturierenden Bedingungen mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt (vgl. Abb. 3.6, Spuren 6 - 10). Die einzelnen Fraktionen der denaturierenden Reinigung enthielten Proteinmengen zwischen 3,6 mg/ml und 0,9 mg/ml.



**Abb. 3.6: Heterologe Produktion von StrR und His-tag-StrR in *E. coli* sowie denaturierende Reinigung von His-tag-StrR.** Analyse einer SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) von *E. coli* BL21(DE3)/pLysS-Gesamtzellextrakten (50 µg Protein pro Spur, vor oder 120 min nach IPTG-Induktion) und Fraktionen der denaturierenden Ni-NTA-Agarose-Reinigung des His-tag-StrR Proteins. Folgende Proben wurden aufgetragen: (M) Molekulargewichtsstandard, Proteingrößen sind in kDa angegeben; (1) pSTR11, vor IPTG-Induktion; (2) pSTR11 (StrR); (3) pSTR16, vor IPTG-Induktion; (4) pSTR16, (His-tag-StrR); (5) pSTR16, (His-tag-StrR), lösliche Fraktion nach Abtrennung unlöslicher- und Membranbestandteile; (6) - (10) Fraktionen der Ni-NTA-Agarose-Reinigung von His-tag-StrR aus induzierten *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pSTR16 Gesamtzellextrakten.

100 pmol von denaturierend gereinigtem His-tag-StrR wurden mittels molekularer Chaperone aus *S. coelicolor* DnaK, DnaJ und GrpE (G. Bucca, pers. Mitteilung) „refolded“. Um die Aktivität des „refolded“ His-tag-StrR Proteins (rHis-tag-StrR) zu überprüfen, wurden Gelretardierungsassays mit dem 290 bp *strB1p* *Eco*RI Fragment aus pRBD13 durchgeführt (Abb. 3.7). Der Einsatz von abnehmenden Mengen an rHis-tag-StrR (10, 5 und 2,5 pmol) mit 0,01 pmol des *strB1p*-Fragmentes zeigte, daß sowohl im „Bindungs-Puffer“ (vgl. Abb. 3.7 a) als auch im „Bindungs-Mix“ (vgl. Abb. 3.7 b) die DNA-Bindeaktivität des denaturierend gereinigten His-tag-StrR-Proteins durch das „refolding“ zurückgewonnen werden konnte. Die Protein/DNA-Komplexe mit rHis-tag-StrR zeigten auf PAA-Gelen zu den Retardierungsversuchen im Vergleich zum freien *strB1p*-Fragment eine verlangsamte Mobilität. Wurde

denaturierend gereinigtes His-tag-StrR ohne Chaperon-Behandlung eingesetzt, erfolgte keine Retardierung des *strB1p*-Fragmentes (vgl. Abb. 3.7 c).

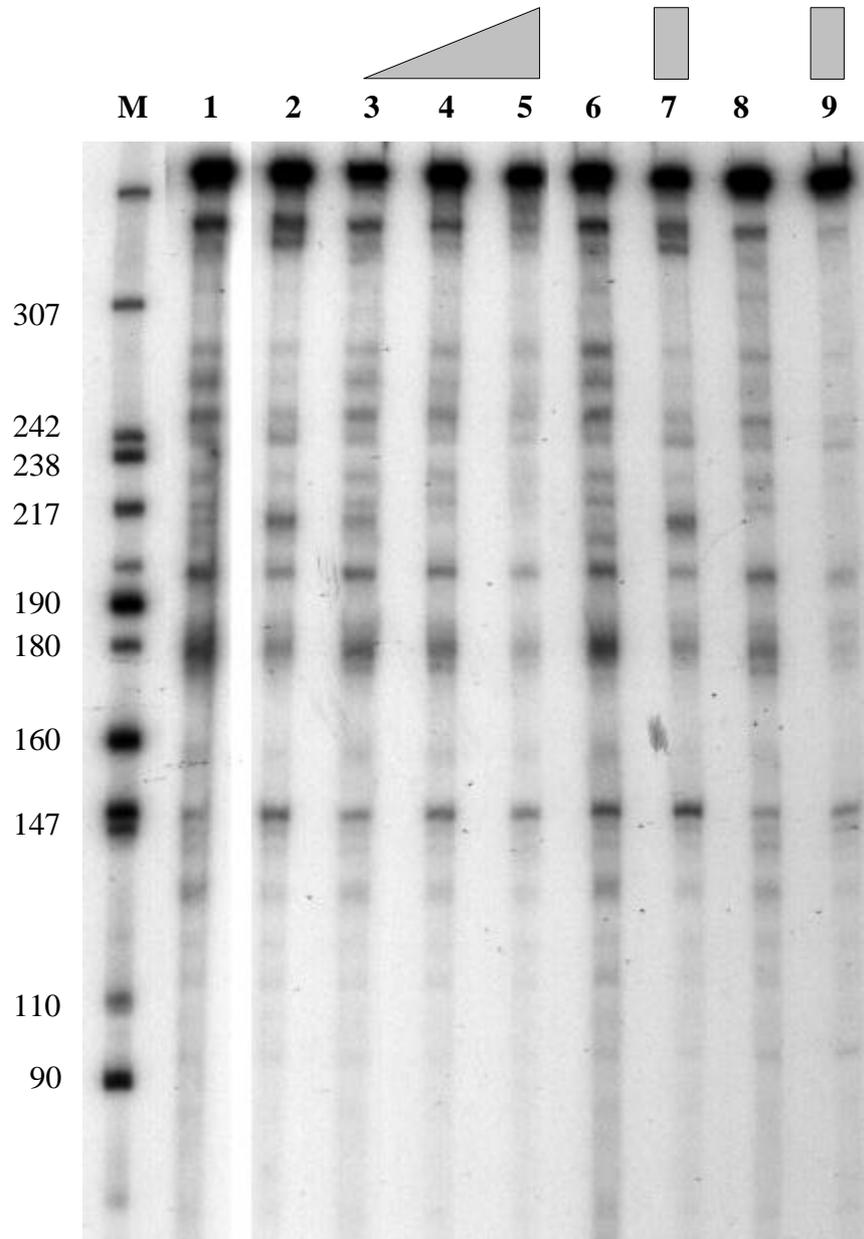


**Abb. 3.7:** Analyse der DNA-bindenden Eigenschaften von „refolded“ His-tag-StrR (rHis-tag-StrR). Autoradiogramm der Gelretardierungsassays mit rHis-tag-StrR (10, 5, 2,5 pmol, durch graue Dreiecke gekennzeichnet) und dem radioaktiv markierten *EcoRI strB1p*-Fragment aus pRBD13 (290 Basenpaare, ca. 3 ng DNA pro Assay) unter verschiedenen Pufferbedingungen. (a) Abnehmende Mengen an rHis-tag-StrR in „Bindungs-Puffer“ (vgl. Tab. 3-6); (b) abnehmende Mengen an rHis-tag-StrR in „Bindungs-Mix“ (vgl. Tab. 3-6); (c) 10 pmol von His-tag-StrR (denaturierend gereinigt, nicht „refolded“) in „Bindungs-Puffer“. Die retardierten rHis-tag-StrR/*strB1p*-Komplexe und die freien *strB1p*-Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet.

### 3.2.5 *In vitro* Transkriptionsassay mit dem *strB1p* Promotorfragment

Nach der erfolgreichen Anreicherung von aktiver RNA-Polymerase aus *S. griseus* und der Reinigung und dem „refolding“ von His-tag-StrR aus *E. coli* sollte anschließend die StrR-abhängige Aktivierung der Transkription am *strB1p*-Promotor *in vitro* untersucht werden. Dazu wurde das 368 bp *PstI/XhoI* Fragment aus pJDM4001 eingesetzt, wobei ein Transkript von 96 Nukleotiden erwartet wurde (Abb. 3.8). Es wurde RNA-Polymerase aus *S. coelicolor* und aus *S. griseus* (11 h und 14 h Präparation; vgl. 3.2.2) eingesetzt. Aufgrund der positiven Ergebnisse der *in vitro* Transkriptionsassays mit den *dagp1-p4* und *dnaKp*-Fragmenten und der Gelretardierungsassays mit rHis-tag-StrR wurden die Versuche mit dem *strB1p*-Fragment ebenfalls in „Bindungs-Mix“ durchgeführt. Das „end-to-end“-Transkript von 368 Nukleotiden wurde unter allen gewählten Reaktionsbedingungen von beiden RNA-Polymerasen gebildet. Die Zugabe von steigenden Mengen rHis-tag-StrR (2,5, 5 und 10 pmol) bewirkte jedoch weder bei den beiden eingesetzten Präparationen der *S. griseus*-RNA-Polymerase noch bei

der *S. coelicolor*-RNA-Polymerase ein signifikantes Signal eines spezifischen Transkriptes von 94 Nucleotiden. Somit konnte eine His-tag-StrR-abhängige *in vitro* Transkription am *strB1p*-Promotor in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden.



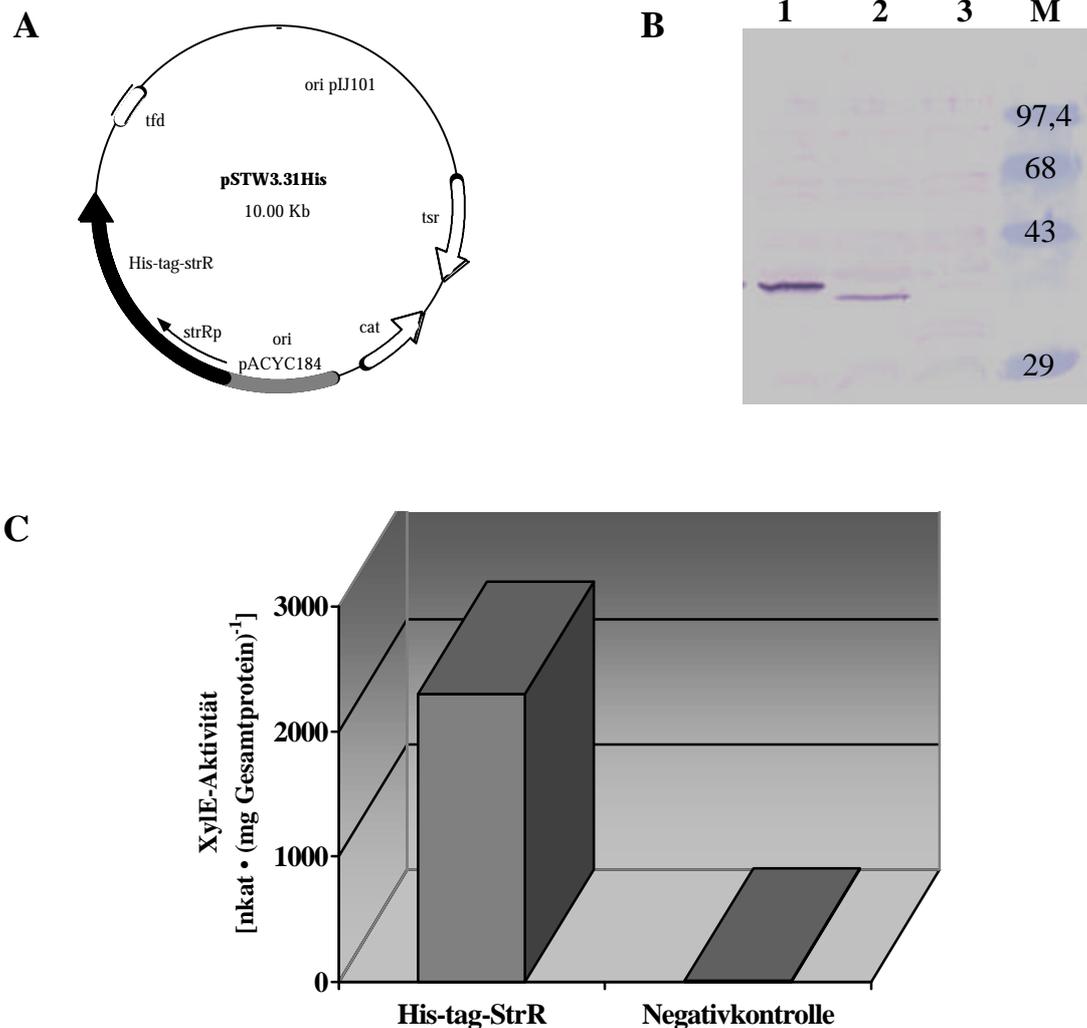
**Abb. 3.8: His-tag-StrR-abhängige *in vitro* Transkriptionsassays mit RNA-Polymerase aus *S. griseus* und *S. coelicolor*.** Autoradiogramm eines 0,8 % PAA-8 M Harnstoff-Sequenzgels zu den *in vitro* Transkriptionsassays, bei denen das 368 bp *PstI/XhoI strB1p*-Fragment eingesetzt wurde. Es wurden jeweils 0,1 - 0,3 pmol „Template“-DNA, 2 pmol RNA-Polymerase sowie 10, 5 und 2,5 pmol rHis-tag-StrR eingesetzt. Alle Versuche wurden in „Bindungs-Mix“ (vgl. Tab. 3-6) durchgeführt. *S. coelicolor*- (Spur 8 - 9) sowie *S. griseus*-RNA-Polymerasen der 14 h- (Spur 1 - 5) und 11 h-Präparation (Spur 6 - 7) wurden eingesetzt (vgl. 3.2.2). Transkripte der Größen von 368 Nucleotiden entsprechen der Größe des eingesetzten Fragmentes. Die Zugabe sowie die relative Menge von rHis-tag-StrR ist durch graue Kästen gekennzeichnet. Im Reaktionsansatz 2 (Spur 2) wurden zusätzlich molekulare Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE (vgl. 3.2.4) zugegeben. (M) Plasmid pBR322 hydrolysiert mit *HpaI*, Größenstandards sind als Nucleotidlänge angegeben.

Auch wenn kein rHis-tag-StrR zum Reaktionsansatz zugegeben wurde, konnte weder bei Einsatz von *S. griseus*- noch von *S. coelicolor*-RNA-Polymerase ein spezifisches Transkript von 94 Nukleotiden detektiert werden. Auch bei Zugabe von molekularen Chaperonen (DnaK, DnaJ, GrpE; vgl. 3.2.4) zum Reaktionsansatz wurde kein solches spezifisches Transkript detektiert. In allen Experimenten war jedoch ein unerwartet hoher Anteil von Transkripten der Längen zwischen 147 und 350 Nukleotiden nachweisbar, was auf eine Fragment-bedingte hohe Hintergrundaktivität der eingesetzten RNA-Polymerasen hinwies. Auch war kein signifikanter Unterschied in diesen (Hintergrund-) Transkriptmustern oder deren Intensitäten zwischen Reaktionsansätzen mit und ohne rHis-tag-StrR detektierbar, so daß jegliche Promotor-spezifische Transkriptionsaktivität in diesen Ansätzen unwahrscheinlich war.

### 3.2.6 Heterologe Produktion von His-tag-StrR in *S. lividans* sowie Tests auf *in vivo* und *in vitro* Transkriptionsaktivierung

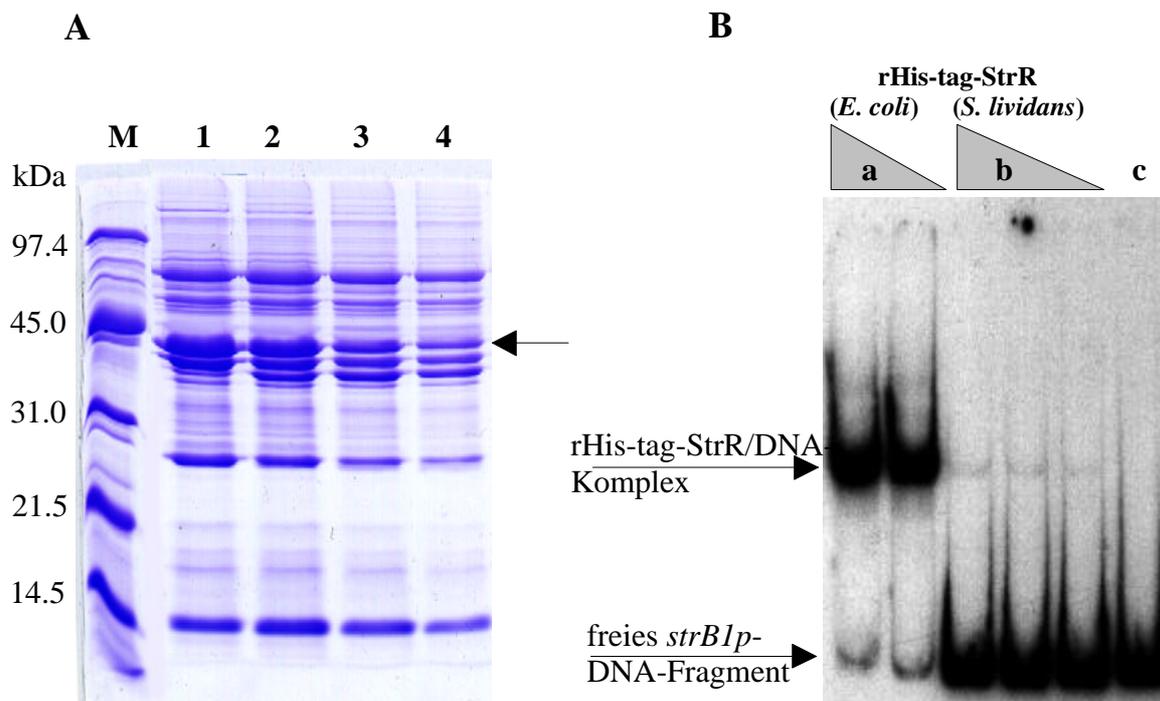
Durch die Arbeiten von Retzlaff war nur gezeigt worden, daß auch His-tag-StrR in der Lage ist, *in vitro* an das *strB1p*-Promotorfragment mit der sich darauf befindenden StrR-Bindestelle zu binden (Retzlaff und Distler, 1995). Jedoch war bisher noch nicht bestätigt, daß His-tag-StrR auch in der Lage ist, die Transkription *in vivo* zu aktivieren. Deshalb wurde zunächst durch die Konstruktion des Plasmids pSTW3.31His (Abb. 3.9 A; Anhang 1) die Produktion von His-tag-StrR in *S. lividans* ermöglicht. Der *strRp*-Promotorbereich aus *S. griseus* N2-3-11 wurde mittels PCR (Primer ST19.1/ST20.1) amplifiziert, am Genstart mit einer *NcoI* Schnittstelle versehen und das resultierende 780 bp Fragment „blunt-ended“ in pUC18 (*SmaI*) kloniert. In das dadurch entstandene rekombinante Plasmid pSTW23.1 wurde nachfolgend das 1,7 kb *NcoI* Fragment mit dem His-tag-*strR*-Leserahmen aus pSTR16 kloniert. Aus dem resultierenden rekombinanten Plasmid pSTW23.2 wurde schließlich das 2,49 kb *HindIII/BamHI strRp*-His-tag-*strR*-Fragment in das Plasmid pSTW1 (vgl. 3.3.2) *HindIII/BglII* kloniert und es entstand das rekombinante Plasmid pSTW3.31His. Anschließend wurde *S. lividans*/pSTW13.2i (vgl. 3.3.2) mit pSTW3.31His transformiert und die Produktion von His-tag-StrR sowie dessen Fähigkeit zur *in vivo* Transkriptionsaktivierung überprüft (Abb. 3.9 B und C). In der Western-Analyse wurde eine spezifische Reaktion des StrR-Antiserums detektiert (Spur 1). Die Laufhöhe der detektierten Bande entsprach dabei dem erwarteten Molekulargewicht von  $M_r = 39,1$  kDa. Die Kontrollreaktion mit dem nativen StrR-Protein

(vgl. 3.3.2) ergab ebenfalls eine spezifische Reaktion des StrR-Antiserums in der erwarteten Laufhöhe von  $M_r = 36,7$  kDa (Spur 2). Bei Einsatz der Negativkontrolle (pSTW1) wurde keine spezifische Reaktion detektiert (Spur 3). Die Quantifizierung der durch das His-tag-StrR in *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW3.31His verursachte Xyle-Aktivität ergab einen Wert von  $2000 \text{ nkat} \cdot (\text{mg Gesamtprotein})^{-1}$  (Abb. 3.9 C). Im Vergleich dazu zeigte die Kontrolle mit *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW1 eine Xyle-Aktivität von  $3,5 \text{ nkat} \cdot (\text{mg Gesamtprotein})^{-1}$ .



**Abb. 3.9: Plasmid zur heterologen Produktion von His-tag-StrR, immunologischer Nachweis der heterologen Produktion in *S. lividans* und Untersuchung der *in vivo* Transkriptionsaktivierung.** (A) Rekombinantes Plasmid pSTW3.31His zur Genexpression von His-tag-*strR* in *S. lividans*. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: *strRp*, *strR*-Promotor; *his-strR*, His-tag-*strR*-Gen; (*strA*) unvollständiges *strA*-Gen; *tfd*, fd-Terminator; ori pIJ101, Replikationsursprung in *Streptomyces* sp.; *tsr*, Thiostrepton-Resistenzgen; *cat*, Chloramphenicol-Resistenzgen; ori pACYC184, Replikationsursprung (p15A) in *E. coli*. (B) Western-Analyse von StrR und His-tag-StrR. Jeweils 50  $\mu\text{g}$  Gesamtzellextrakte von *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW3.31His (His-tag-StrR), pSTW13.2i/pSTW350/0 (StrR; vgl. 3.3.2) und pSTW13.2i/pSTW1 (Negativkontrolle) Doppeltransformaten wurden nach SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) auf PVDF-Membranen immobilisiert. (C) Xyle-Enzymaktivitäten in Gesamtzellextrakten von *S. lividans*-Doppeltransformaten mit und ohne His-tag-StrR-Produktion. Die Western-Analyse und Tests auf Xyle-Aktivität wurden nach 36 h des Wachstums der *S. lividans*-Doppeltransformaten durchgeführt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Produktion von His-tag-StrR in *S. lividans* sowie dessen Fähigkeit zur *in vivo* Transkriptionsaktivierung bewiesen. Deshalb wurde das His-tag-StrR aus *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW3.31His-Doppeltransformanten denaturierend mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt (Abb. 3.10). Die einzelnen Fraktionen dieser Reinigung enthielten zwar mehrere kontaminierende Proteine, jedoch konnte die Anreicherung des His-tag-StrR Proteins bei der Analyse des PAA-Gels bestätigt werden. Das angereicherte His-tag-StrR (100 pmol Gesamtprotein der Elution; vgl. Abb. 3.10 A, Spur 2) wurde danach, genau wie das denaturierend gereinigte His-tag-StrR aus *E. coli* (vgl. 3.2.4), mittels molekularer Chaperone „refolded“ und in Gelretardierungsassays mit dem 368 bp *PstI/XhoI strB1p*-Promotorfragment aus pJDM4001 eingesetzt (vgl. Abb. 3.10 B). Im Gegensatz zum rHis-tag-StrR aus *E. coli* (vgl. Abb. 3.10 B, a) konnte beim rHis-tag-StrR aus *S. lividans* nur eine schwache Rückgewinnung seiner DNA-Bindeaktivität erzielt werden (vgl. Abb. 3.10 B, b).



**Abb. 3.10: Denaturierende Ni-NTA-Agarose-Reinigung von His-tag-StrR aus *S. lividans* und Analyse der DNA-bindenden Eigenschaften von „refolded“ His-tag-StrR (rHis-tag-StrR).** (A) Analyse einer SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) der denaturierenden Reinigung von His-tag-StrR aus Gesamtzellextrakten von *S. lividans* /pSTW13.2i/pSTW3.31His mittels Ni-NTA-Agarose. Folgende Proben wurden aufgetragen: (M) Molekulargewichtsstandard; (1) - (4) Fraktionen der Imidazol-Elution (50 - 250 mM) des His-tag-StrR Proteins. Der Pfeil deutet auf angereichertes His-tag-StrR Protein hin. (B) Autoradiogramm der Gelretardierungsassays mit rHis-tag-StrR (*S. lividans*) und dem radioaktiv markiertem *EcoRI strB1p*-Fragment aus pRBD13 (290 Basenpaare, ca. 3 ng DNA pro Assay) und Vergleich mit DNA-bindenden Eigenschaften von rHis-tag-StrR aus *E. coli*. (a) Abnehmende Mengen an rHis-tag-StrR aus *E. coli* (10 und 5 pmol; vgl. 3.2.4); (b) abnehmende Mengen an rHis-tag-StrR (*S. lividans*) (30 - 10 pmol Gesamtprotein der His-tag-StrR-Elution; vgl. Spur 2); (c) 30 pmol Gesamtprotein der denaturieren Aufreinigung von His-tag-StrR aus *S. lividans*, nicht „refolded“ (vgl. Spur 2). Die retardierten rHis-tag-StrR/*strB1p*-Komplexe und die freien *strB1p*-Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Trotz der kaum detektierbaren DNA-Bindeaktivität von rHis-tag-StrR (*S. lividans*) wurde dessen Fähigkeit zur *in vitro* Transkriptionsaktivierung überprüft. Dazu wurde, wie unter 3.2.5 für das rHis-tag-StrR aus *E. coli* beschrieben, das 368 bp *PstI/XhoI strB1p*-Fragment aus pJDM4001 sowie die beiden Präparationen der *S. griseus*-RNA-Polymerase (11 h und 14 h; vgl. 3.2.2) mit steigenden Mengen rHis-tag-StrR aus *S. lividans* in *in vitro* Transkriptionsassays eingesetzt. Jedoch konnte das erwartete StrR-abhängige spezifische Transkript von 94 Nucleotiden auch unter diesen Bedingungen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Es mußte deshalb nach einer anderen Strategie zur Messung biochemischer Parameter mit dem StrR-Protein gesucht werden.

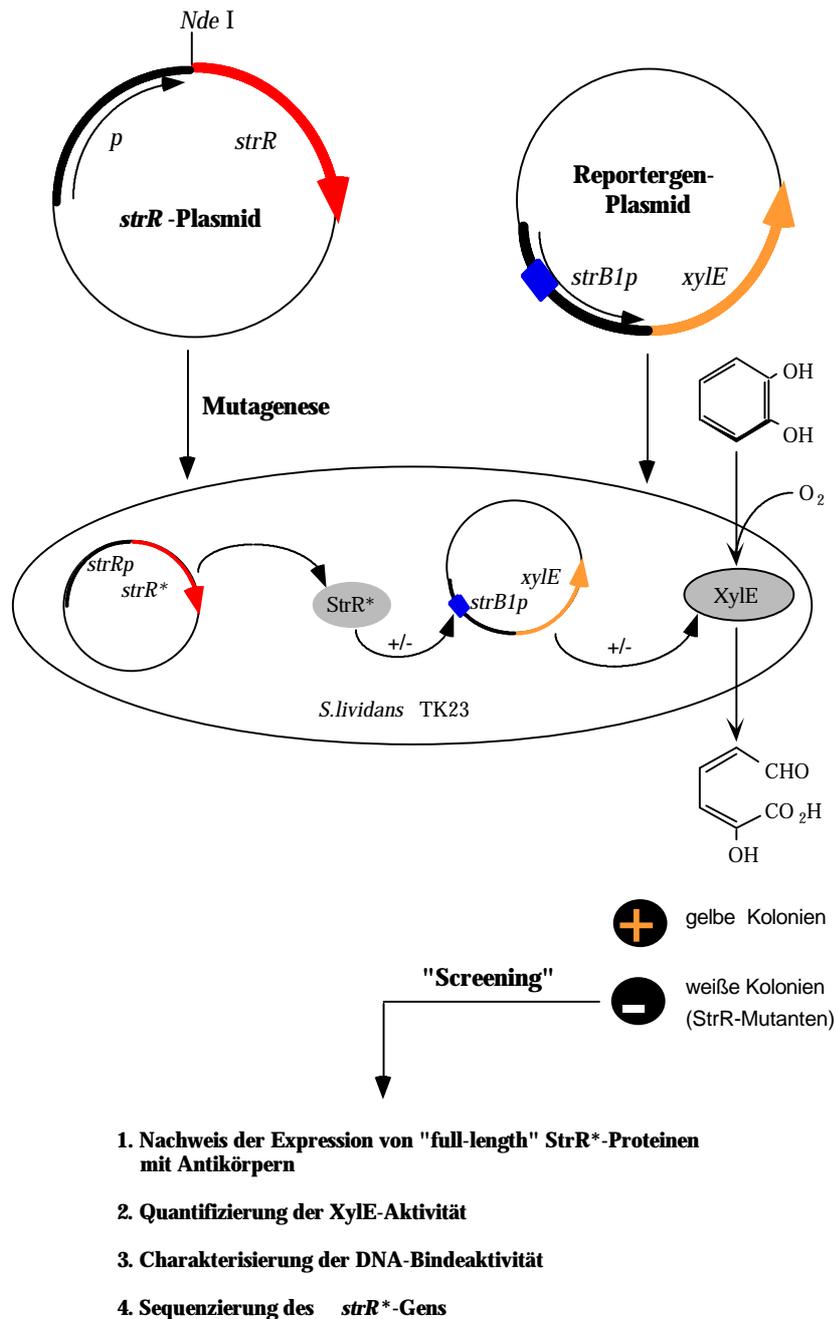
### **3.3 Aufbau eines Testsystems zum Screening von StrR-Mutanten**

#### **3.3.1 Allgemeine Strategie**

Die in meiner Diplomarbeit begonnenen Arbeiten zum Aufbau eines Testsystems zum Screening und zur Charakterisierung von StrR-Mutanten wurden fortgeführt und abgeschlossen. Die allgemeine Strategie zum Screening von StrR-Mutanten nach einer ungerichteten Mutagenese erforderte die Etablierung eines Testsystems, das auf zwei kompatiblen Plasmiden basierte. Diese Plasmide wurden allgemein als „*strR*-Plasmid“ und „Reporter-gen-Plasmid“ bezeichnet. Durch die Arbeiten von Retzlaff und Distler (1995) konnte bereits gezeigt werden, daß das StrR-Protein in der Lage ist, die Transkription des *xylE*-Reportergens zu aktivieren, wenn dieses unter der Kontrolle des *strB1p*-Operators (*strB1p*-Promotor sowie stromaufwärts gelegene palindrome StrR-Bindestelle) steht. Jedoch war das von L. Retzlaff konstruierte System aus folgenden Gründen zum Zweck des Screenings nach StrR-Mutanten ungeeignet. Das dort verwendete „*strR*-Plasmid“ pJDM4121 ist kein *E. coli-Streptomyces*-„Shuttle“-Plasmid und trägt als Resistenzmarker die Gentamicin-Kassette. Die Selektion von Gentamicin-resistenten *S. lividans*-Transformanten erwies sich jedoch als schwierig, insofern, als ca. 10 - 20 % falsch resistente Kolonien nach Transformation von *S. lividans* auf Regenerations-Agarplatten wuchsen. Dieser hohe Anteil an falsch resistenten Kolonien hätte bei einem Mutanten-Screening gestört, da die effektive Selektion von StrR-Mutanten die höchstmögliche Rate an positiven Transformanten erfordert.

Außerdem war das *strR*-Gen im Plasmid pJDM4121 nicht mit geeigneten Restriktionsschnittstellen (z. B. singuläre *NdeI* am Genstart) verfügbar, was für weitere Analysen nach dem Screening von StrR-Mutanten notwendig gewesen wäre. Um mutierte *strR*\*-Gene nach dem Screening in geeignete Vektoren (z. B. pET11a; Überexpression in *E. coli*) klonieren zu können, war es deshalb notwendig, das *strR*-Gen über eine *NdeI*-Schnittstelle mit einem geeigneten Promotor zu fusionieren und in einen Klonierungsvektor mit effektivem Selektionsmarker zu klonieren. Da als Selektionsmarker aufgrund der Verfügbarkeit von Klonierungsvektoren nur die Thiostrepton-Resistenz in Frage kam, diese im System von *L. Retzlaff* jedoch für das „Reporter-Gen-Plasmid“ pRKW1 benutzt wurde, mußte für das eigene Testsystem konsequenterweise auch ein neues kompatibles „Reporter-Gen-Plasmid“ für die *strB1p-xylE*-Kassette gefunden werden.

In Abb. 3.11 sind die allgemeine Strategie zum Aufbau des Testsystems und die Durchführung des Mutanten-Screenings schematisch dargestellt. Nach der Konstruktion der beiden Plasmide („*strR*-Plasmid“ und „Reporter-Gen-Plasmid“) sollte zunächst *S. lividans* mit dem „Reporter-Gen-Plasmid“ transformiert werden. Anschließend sollte das „*strR*-Plasmid“ *in vivo* oder *in vitro* mutagenisiert und *S. lividans*/„Reporter-Gen-Plasmid“/„*strR*-Plasmid“-Doppeltransformanten mit mutagenisiertem „*strR*-Plasmid“ (enthält mutiertes *strR*-Gen; im folgenden mit *strR*\* bezeichnet) hergestellt werden. Nach Regeneration dieser Doppeltransformanten sollte zunächst ein visuelles Screening auf Regenerationsagar durch Überschichtung mit Brenzkatechin-Lösung durchgeführt werden. Diejenigen *S. lividans*-Doppeltransformanten mit veränderter oder ausbleibender XylE-Aktivität enthielten dann möglicherweise ein verändertes StrR-Protein (StrR\*). Die weitere Analyse der möglichen StrR-Mutanten sollte die Quantifizierung der XylE-Aktivität, die Detektion von „full-length“ StrR-Proteinen mittels Western-Analyse, die Fähigkeit zur DNA-Bindung an den *strB1p*-Operator mittels Gelretardierungsassays sowie die Sequenzierung der mutierten *strR*\*-Gene umfassen.

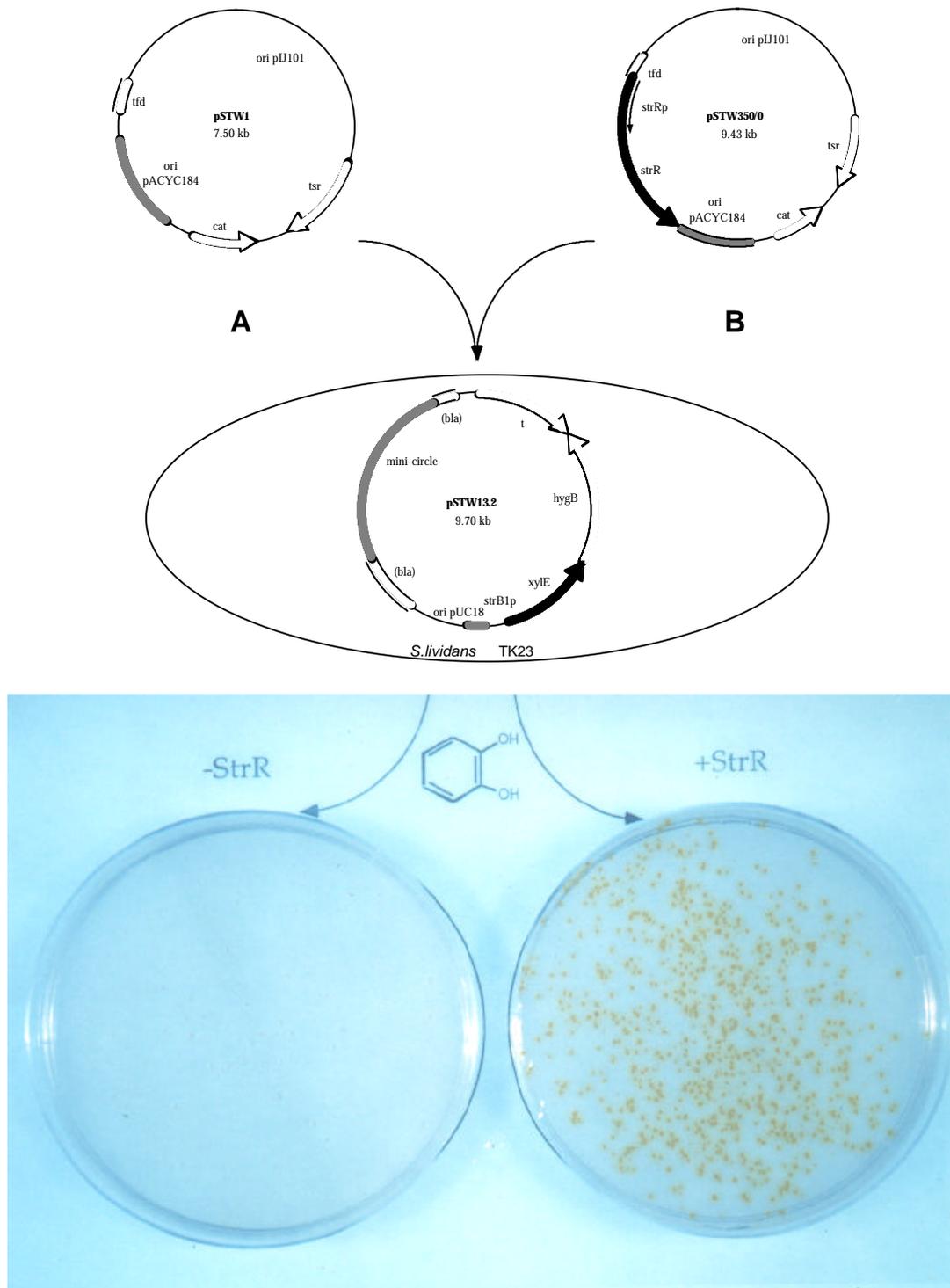


**Abb. 3.11: Schematische Darstellung des Anforderungsprofils an das Testsystem und Ablauf des Screenings von StrR-Mutanten.** Dargestellt sind die genetischen Elemente des „*strR*-Plasmids“ und des „Reporterplasmids“ (*p*, *strR*-Promotor; *strR*, *strR*-Gen; *NdeI*, Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuclease *NdeI*; *strB1p*, *strB1p*-Operator mit stromaufwärts gelegener StrR-Bindestelle (blau); *xylE*, Gen für die Catechol-2,3-dioxygenase). Zunächst wird *S. lividans* mit dem „Reporterplasmid“ transformiert. Im Anschluß an die Mutagenese des „*strR*-Plasmids“ erfolgt das Screening von *S. lividans*-Doppeltransformaten über die Umsetzung von Brenzkatechin zu 2-Hydroxy-muconsäuresemialdehyd durch die Catechol-2,3-dioxygenase (XylE). Die Aktivität von XylE wird dabei als direktes Maß der Transkriptionsaktivierung durch das StrR-Protein sowie dessen Mutanten (StrR\*) am *strB1p*-Operator angesehen. Solche *S. lividans*-Doppeltransformaten mit ausbleibender oder geringerer XylE-Aktivität (weiße Kolonien) werden als potentielle StrR-Mutanten angesehen und nachfolgenden Analysen zugeführt. Die am Schluß stehende Sequenzierung des mutierten *strR*-Gens (*strR\**) dient der Lokalisation der Mutation im *strR\**-Gen und der Zuordnung des As-Austausches im StrR\*-Protein.

### 3.3.2 Das Testsystem

Das StrR-Testsystem ist in Abb. 3.12 dargestellt. Das „*strR*-Plasmid“ pSTW350/0 enthält ein 780 bp *strRp*-Fragment mit dem nativen Promotor des *strR*-Gens aus *S. griseus* N2-3-11 (Distler et al., 1987a). Das *strRp*-Fragment wurde mittels PCR (Primer ST19/ST20) aus chromosomaler *S. griseus* DNA amplifiziert und „blunt-ended“ in pUC18 (*Sma*I) kloniert. Aus dem entstandenen rekombinanten Plasmid pSTW16 wurde das *strRp*-Fragment als 800 bp *Eco*RI/*Sst*I Fragment in pBluescriptII KS- kloniert und es entstand pSTW17. Das *strR*-Gen wurde aus pSTW5.2 als 1,4 kb Fragment mittels *Nde*I/*Bgl*III in pSTW17 mit dem *strRp*-Promotor über die *Nde*I-Schnittstelle fusioniert und es entstand pSTW18. Das *strRp-strR*-Fragment wurde als 2,2 kb *Hind*III Fragment in das *E. coli-Streptomyces*-„Shuttle“-Plasmid pSTW3.21 kloniert (Anhang 2). Das entstandene rekombinante Plasmid pSTW350/0 lag aufgrund seines pIJ101-Replikationsursprungs in *Streptomyces* sp. in hoher Kopienzahl vor und trug die Genkassette für die Thiostrepton-Resistenz. Aufgrund der Klonierung von pSTW1 (Basis-Plasmid für pSTW3.21; Anhang 3) aus pIJ6021 und pGM102 enthielt das Thiostrepton-Resistenzgen jedoch keine *Nde*I Schnittstelle mehr, weshalb die *Nde*I-Schnittstelle zwischen *strRp* und *strR* singulär war. Eine Bedingung für die Expression von *strR*, die sich aus den Ergebnissen meiner Diplomarbeit ableitete, war ein möglichst geringer zellulärer Anteil an StrR-Protein. Dieser geringe Anteil an StrR konnte durch die Verwendung des nativen *strRp*-Promotors gewährleistet werden. StrR konnte auf PAA-Gelen nicht als zusätzliche Proteinbande, jedoch in Western-Blots mittels polyklonalen StrR-Antiserums nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt; vgl. 3.2.6).

Das „Reporter-gen-Plasmid“ pSTW13.2 wurde basierend auf pHM8a (Motamedi et al., 1995) konstruiert. Das Plasmid ist vor allem dadurch gekennzeichnet, daß es durch seinen „mini-circle“-Anteil an einer spezifischen „att-site“ in das *S. lividans*-Genom integrieren kann. Zunächst wurde der *ermEp*-Promoter durch Hydrolyse mit *Bam*HI/*Bgl*III und anschließende Religation entfernt und es entstand pSTW13-X. Danach wurde das 1,4 kb *Pst*I *strB1p-xylE* Fragment aus pSTW4 in pSTW13-X kloniert und es entstand das rekombinante Plasmid pSTW13.2 (Anhang 4). Die hier verwendete *strB1p*-Region entsprach exakt der von Retzlaff verwendeten DNA-Region von -174 bis +16 bp (Retzlaff und Distler, 1995) und enthielt sowohl den *strB1p*-Promotor als auch die 38 bp stromaufwärts der -35 Region beginnende palindrome StrR-Bindestelle. Nach Integration des Plasmids pSTW13.2 in das *S. lividans*-Genom (*S. lividans*/pSTW13.2i, vgl. 2.7.16) wurde davon ausgegangen, daß die Reporter-gen-Kassette als einzelne Kopie pro *S. lividans*-Chromosom vorlag.



**Abb. 3.12:** Schema des verwendeten Testsystems zum Screening von StrR-Protein-Mutanten und Darstellung der Xyle-Plattentests mit nicht mutagenisiertem „strR-Plasmid“ sowie Negativkontrolle. Nach Integration des „Reportergen-Plasmides“ pSTW13.2 in das Genom wurde *S. lividans*/pSTW13.2i mit dem rekombinanten Plasmid pSTW1 (A, Negativkontrolle) bzw. dem „strR-Plasmid“ pSTW350/0 (B) auf ihre Xyle-Aktivität geprüft. Die dadurch entstandenen Doppeltransformaten wurden 3 - 5 Tage auf SPMR-Agar regeneriert. Die Bildung des gelben Reaktionsproduktes (Xyle-Aktivität) wurde *in situ* nach 20 Minuten der Überschichtung mit einer wässrigen 0,1 M Brenzkatechin-Lösung überprüft. (A) Bei Verwendung von *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW1 wurde keine Xyle-Aktivität detektiert. (B) Bei Verwendung von *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW350/0 wurde bei 99 % der Kolonien eine gleich starke, signifikante Xyle-Aktivität beobachtet.

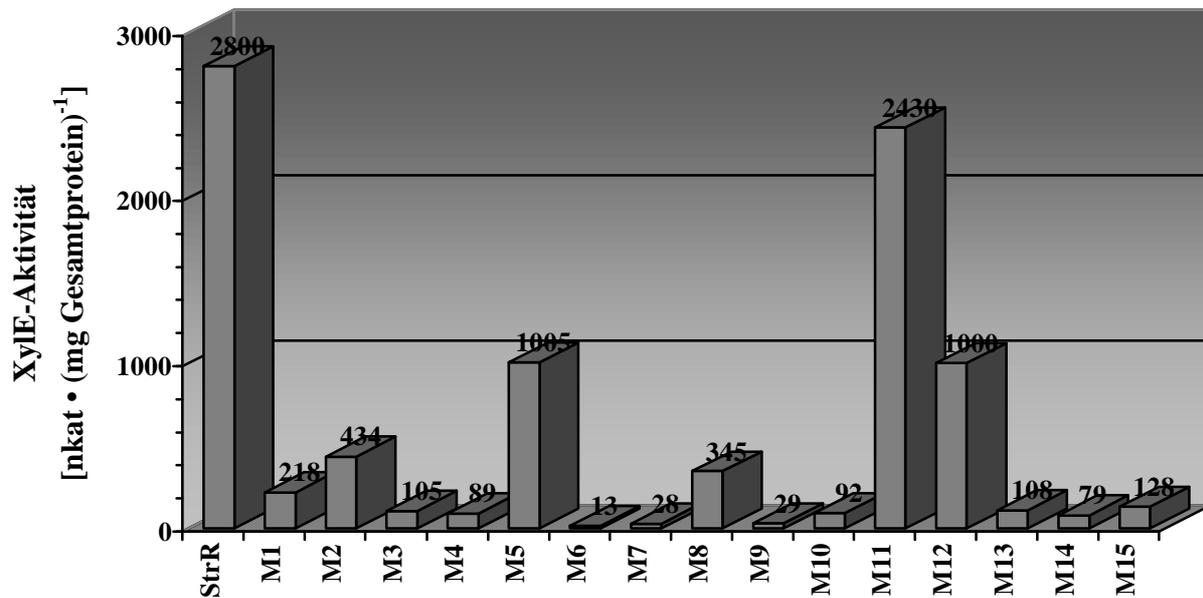
*S. lividans*/pSTW13.2i wurde zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Testsystems mit den Plasmiden pSTW1 (Negativkontrolle) und nicht mutagenisiertem pSTW350/0 (Positivkontrolle) transformiert. *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW1 Doppeltransformanten zeigten auf SPMR-Agar nach Überschichtung mit Brenzkatechin für mehrere Stunden keine Substratumsetzung (Abb. 3.12 A). Nahezu alle *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW350/0-Doppeltransformanten zeigten bereits eine Minute nach Überschichtung mit Brenzkatechin eine Substratumsetzung, was an der Gelbfärbung der Kolonien zu erkennen war (Abb. 3.12 B).

Da ca. 99 % der Kolonien der Positivkontrolle die gleiche Xyle-Aktivität aufwiesen und 100 % der Kolonien der Negativkontrolle keine Xyle-Hintergrundaktivität besaßen, war dieses Testsystems für das Screening von StrR-Mutanten einsetzbar.

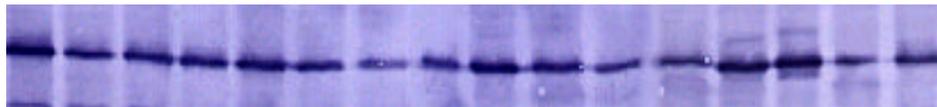
### **3.4 Ungerichtete *in vivo* Mutagenese des *strR*-Gens und Screening von StrR-Protein-Mutanten**

Das Plasmid pSTW350/0 wurde einer ungerichteten *in vivo* Mutagenese unterzogen (vgl. 2.7.11). Das Screening erfolgte in mehreren Stufen. Zunächst wurde von ca. 10.000 *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW350/\*-Doppeltransformanten die Xyle-Aktivität visuell auf SPMR-Agar überprüft. Insgesamt wurden 48 Klone (M1 - M48) aufgrund ihrer im Vergleich zu *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW350/0-Doppeltransformanten (Wildtyp-StrR-Protein) reduzierten Xyle-Aktivität ausgewählt. Die Xyle-Aktivität der in Frage kommenden 48 Klone wurde in der zweiten Stufe des Screenings quantifiziert. Die dritte Stufe des Screenings umfaßte die Überprüfung der heterologen Produktion von „full-length“-StrR-Protein in diesen *S. lividans*-Doppeltransformanten mittels Western-Analyse. Außerdem wurden in Stufe 4 des Screenings die zellfreien Extrakte dieser *S. lividans*-Klone in Gelretardierungsassays mit dem 290 bp *strB1p* *Eco*RI Promotorfragment aus pRBD13 eingesetzt, um deren DNA-Bindeaktivität zu überprüfen. In Abb. 3.13 sind die Ergebnisse der Stufen 2 - 4 des Screenings exemplarisch für 15 der 48 Klone gezeigt und mit dem Wildtyp-StrR-Protein verglichen. Insgesamt 11 der 48 Klone besaßen vergleichbar hohe Xyle-Aktivitäten zwischen 2400 und 3100 nkat • (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> wie *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW350/0-Doppeltransformanten (z. B. M11; vgl. Abb. 3.13 A).

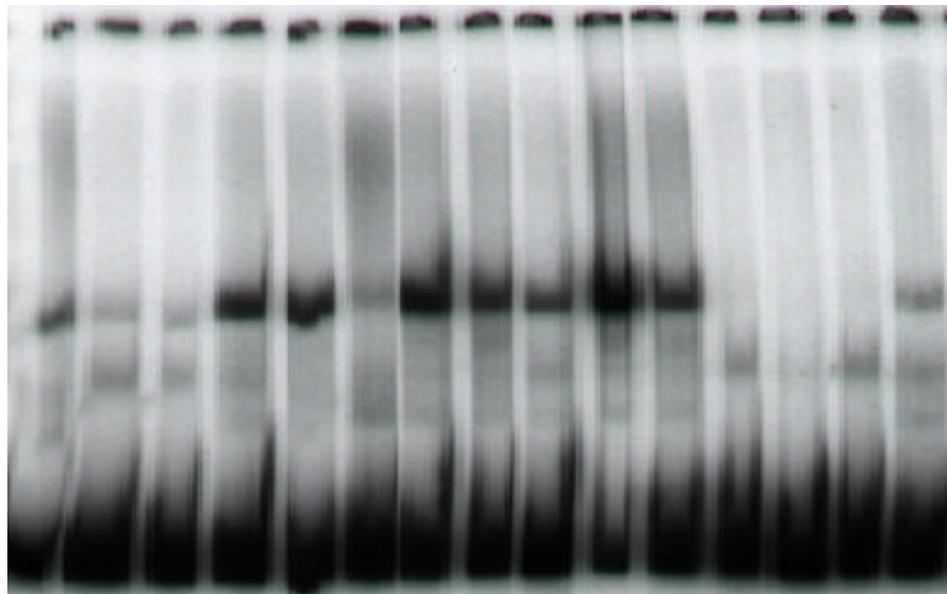
A



B



C



**Abb. 3.13: Teilergebnisse des Screenings von potentiellen StrR-Protein-Mutanten nach ungerichteter Mutagenese.** Dargestellt sind die Ergebnisse für nicht mutagenisiertes Wildtyp-StrR und 15 potentielle StrR-Mutanten (M1 - M15). Es wurden jeweils *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW350\*-Gesamtzellextrakte nach 36 h Wachstum getestet. **(A)** Quantifizierung der Xylem-Aktivitäten. **(B)** Western-Analyse mittels StrR-Antiserum. Jeweils 50 µg Gesamtprotein wurden nach SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) auf PVDF-Membranen immobilisiert. **(C)** Autoradiogramm der Gelretardierungsassays. Jeweils 50 µg Gesamtprotein und ca. 3 ng DNA von radioaktiv markiertem *EcoRI strB1p*-Fragment aus pRBD13 (290 Basenpaare) wurden auf das native PAA-Gel (6 % PAA) aufgetragen.

Desweiteren war bei insgesamt 10 der 48 Klone der StrR-Anteil in der Western-Analyse deutlich verringert (Daten nicht gezeigt). Diese Klone hatten somit nachweislich eine verminderte StrR-Produktion, obwohl in all diesen Doppeltransformanten „full-length“ StrR-Proteine nachgewiesen werden konnten. Die Xyle-Aktivitäten in den 10 Klonen mit verringerter StrR-Produktion war ebenfalls reduziert und lagen zwischen 0 und 2400 nkat • (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> (Daten nicht gezeigt). Diese 10 *S. lividans*-Klone waren offensichtlich in der *strR*-Expression gestört und neben den 11 Klonen mit unverminderter Xyle-Aktivität für weitere Untersuchungen uninteressant.

Die letzte Stufe des Screenings von StrR-Protein-Mutanten umfaßte die Sequenzierung der mutierten *strR*\*-Gene in den relevanten pSTW350/\*-Plasmiden. Von den verbliebenen 27 *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW350/\*-Doppeltransformanten wurde die pSTW350/\*-Plasmid-DNA präpariert. *E. coli* ließ sich, außer mit dem Plasmid pSTW350/M6 (M6; vgl. Abb. 3.13), mit den restlichen 26 Plasmiden transformieren. Insgesamt wurden 26 *strR*\*-Gene der Sequenzanalyse zugeführt, wobei 10 *strR*-Mutanten zugeordnet werden konnten (Tab. 3-3). Bei den verbleibenden 16 *strR*\*-Genen konnte, trotz signifikant verminderter Xyle-Aktivität der *S. lividans*-Klone und bei 2 dieser 16 Klone auch ausbleibender Retardierung des *strB1p*-Promotorfragmentes (M12 und M13; vgl. Abb. 3.13 C), keine Mutation gefunden werden.

Die Eigenschaften der bei diesem Screening gefundenen Mutanten sind in Tab. 3-3 zusammengefaßt. Die Zuordnung der gefundenen Nukleotidaustausche innerhalb der *strR*\*-Gene zur StrR-As-Sequenz ergab, daß es sich bei 9 der 10 Mutanten um StrR-Punktmutanten handelte. Die Mutante M14 jedoch besaß zwei As-Austausche. Die As-Austausche wurden im N- und C-Terminus der Proteine sowie auch innerhalb des HTH-Motivs lokalisiert.

**Tab. 3-3:** Ergebnisse des Screenings von StrR-Mutanten nach ungerichteter Mutagenese.

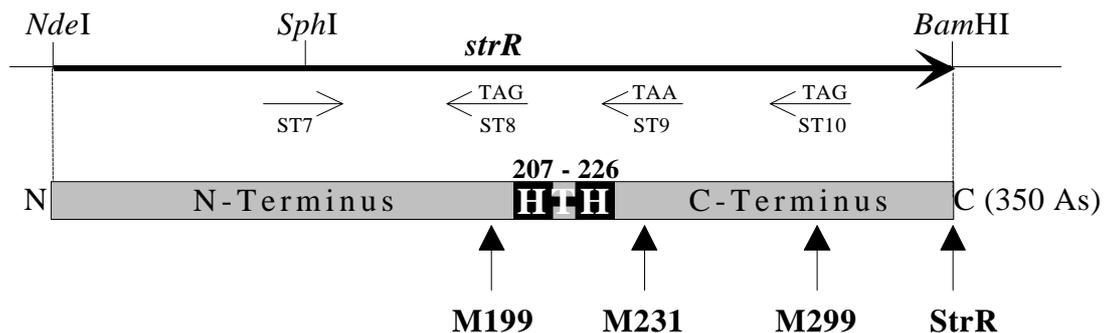
<b>Mutante Nr.</b>	<b>Basenaustausch Codonwechsel</b>	<b>As-Austausch</b>	<b>Western-Analyse*</b>	<b>Xyle-Aktivität*</b> [nkat • (mg Gesamtprotein) <sup>-1</sup> ]	<b>DNA-Bindeaktivität*</b>
<b>Wildtyp-StrR</b>	—	—	+	2650 ± 350	+
<b>M1</b>	368 C ⇒ G CCG ⇒ CGG	P123R	+	218	+
<b>M3</b>	659 C ⇒ T ACC ⇒ ATC	T220I	+	105	±
<b>M4</b>	446 G ⇒ A GGC ⇒ GAC	G148D	+	89	+
<b>M7</b>	821 A ⇒ C GAC ⇒ GCC	D274A	+	28	+
<b>M14</b>	622 C ⇒ T CGT ⇒ TGT 671 T ⇒ C GTC ⇒ GCC	R208C  V224A	+	79	-
<b>M15</b>	551 G ⇒ A CGG ⇒ CAG	R184Q	+	128	+
<b>M16</b>	341 T ⇒ G GTG ⇒ GGG	V114G	+	380	+
<b>M20</b>	530 T ⇒ A ATC ⇒ AAC	I177N	+	73	+
<b>M23</b>	986 T ⇒ C GTG ⇒ GCG	V329A	+	53	+
<b>M31</b>	811 C ⇒ T CTC ⇒ TTC	L271F	+	30	±

\* Die Angaben beziehen sich auf die Ergebnisse, wie sie in Abb. 3.13 exemplarisch für M1 - M15 gezeigt sind.

### 3.5 Charakterisierung von C-terminal verkürzten StrR-Proteinen

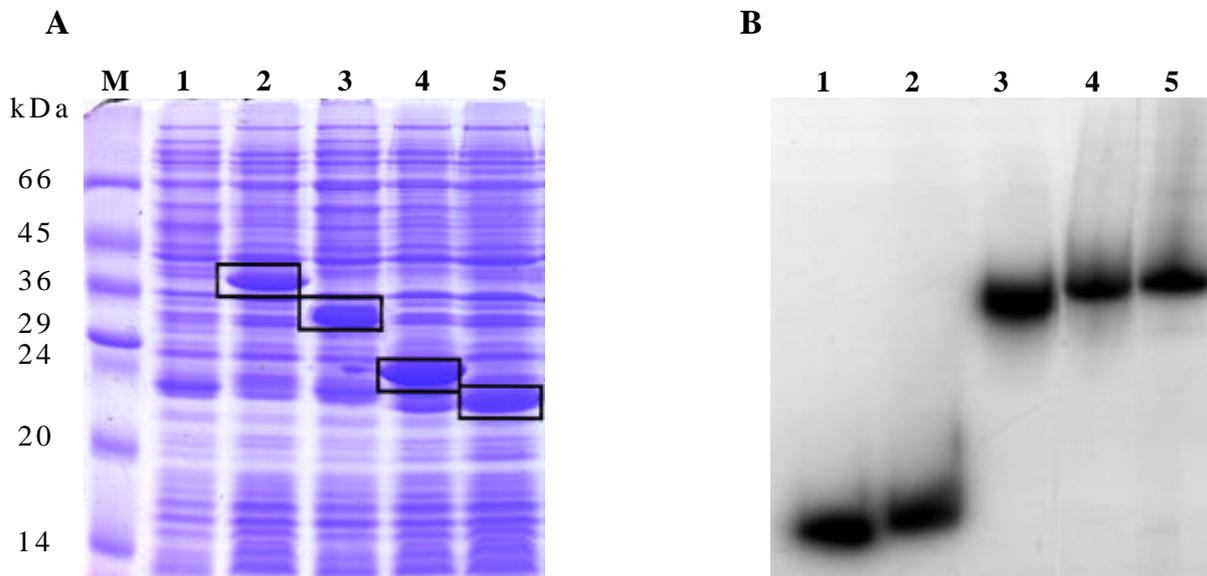
#### 3.5.1 Herstellung, heterologe Produktion in *E. coli* und Tests auf DNA-Bindeaktivität

Innerhalb des *strR*-Leserahmens sollten Stoppcodons eingefügt werden, wodurch in *E. coli* die C-terminal verkürzten StrR-Derivate mit 299 (M299), 231 (M231) und 199 (M199) As hergestellt werden sollten (Abb. 3.14). Mit Hilfe der PCR-„Primer“ (ST7 - ST10) entstanden zunächst die PCR-Amplifikate M199, M231 und M299. Diese wurden „blunt ended“ in pUC18 (*Sma*I) (M199) bzw. (*Hinc*II) (M231, M299) kloniert. Aus den entstandenen rekombinanten Plasmiden pPVK199-pPVK299 wurden die Fragmente *Sph*I/*Kpn*I in pUCBM21III6-18 kloniert, so daß letztlich die *strR*-Verkürzungssequenzen im *strR*-Leserahmen über die vorhandene singuläre *Sph*I-Schnittstelle mit dem stromaufwärts gelegenen Sequenzbereich der *strR*-Originalsequenz zusammengesetzt wurden. Aus den so entstandenen Plasmiden pBM199, pBM231, und pBM299 wurden die *strR*-Leserahmenverkürzungsfragmente *Nde*I/*Bam*HI in den Überexpressionsvektor pET11a kloniert (Anhang 5). Mit den daraus resultierenden rekombinanten Plasmiden pSTR299, pSTR231 und pSTR199 wurde jeweils eine Überexpressionen in *E. coli* durchgeführt. Die entsprechenden Proteine M299, M231 und M199 wurden nach IPTG-Induktion der Genexpression erfolgreich in *E. coli* synthetisiert (Abb. 3.15).



**Abb. 3.14: Schematische Darstellung der Herstellung von C-terminal verkürzten StrR-Proteinen.** Die Lage der verwendeten Primer (ST7 - ST10), Stoppcodons (TAG, TAA) und klonierungsrelevanten Restriktionsschnittstellen im *strR*-Gen ist angegeben. Die Lage des HTH-Motivs (HTH) im Protein ist durch schwarze Boxen unter Angabe der Aminosäureposition (207 - 226) gezeigt. Die Größe von StrR und der C-terminal verkürzten StrR-Proteine (M199, M231, M299) ist durch schwarze Pfeile markiert. Charakteristische Bereiche des StrR-Proteins (N-Terminus, C-Terminus) sind gekennzeichnet.

In IPTG-induzierten *E. coli*-Zellen wurde jeweils eine zusätzliche Proteinbande der molekularen Masse von  $M_r = 36,7$  kDa (pSTR11; Retzlaff und Distler, 1995),  $M_r = 32$  kDa (pSTR299),  $M_r = 24,5$  kDa (pSTR231) und  $M_r = 21$  kDa (pSTR199) identifiziert (Abb. 3.15 A). Die Größe dieser Proteinbanden entsprach den berechneten Molekulargewichten für StrR, M299, M231 und M199. Mit diesen in *E. coli* heterolog produzierten C-terminal verkürzten StrR-Proteinen wurden DNA-Bindetests am 290 bp *strB1p* *Eco*RI Fragment aus pRBD13 durchgeführt (Abb. 3.15 B). Die Gelretardierungsversuche zeigten, daß die StrR-Derivate mit HTH-Motiv (M299, M231) eine mit dem „full-length“ StrR-Protein vergleichbare DNA-Bindeaktivität besaßen (Spur 3 - 5). Die Mutante M199 jedoch zeigte keine DNA-Bindeaktivität mehr (Spur 2).



**Abb. 3.15: Heterologe Produktion von StrR und C-terminal verkürzter StrR-Proteine in *E. coli*, sowie Analyse ihrer DNA-bindenden Eigenschaften.** (A) Analyse einer SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) von induzierten *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS-Gesamtzellextrakten (50 µg Protein pro Spur, 120 min nach IPTG-Induktion). Folgende Proben wurden aufgetragen: (M) Molekulargewichtsstandard, Proteingrößen sind in kDa angegeben; (1) pET11a (Negativkontrolle); (2) pSTR11; (3) pSTR299; (4) pSTR231; (5) pSTR199. Die Proteinbanden von StrR, M299, M231 und M199 sind markiert. (B) Autoradiogramm der Gelretardierungsassays mit den induzierten *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS-Gesamtzellextrakten (50 µg Protein pro Assay) mit radioaktiv markiertem *Eco*RI *strB1p*-Fragment aus pRBD13 (290 Basenpaare; ca. 3 ng DNA pro Assay). Folgende Proben wurden auf ein natives PAA-Gel (6 % PAA) aufgetragen: (1) kein Gesamtzellextrakt (Negativkontrolle); (2) pSTR199 (M199-Protein), (3) pSTR231 (M231-Protein); (4) pSTR299 (M299-Protein); (5) pSTR11 (StrR).

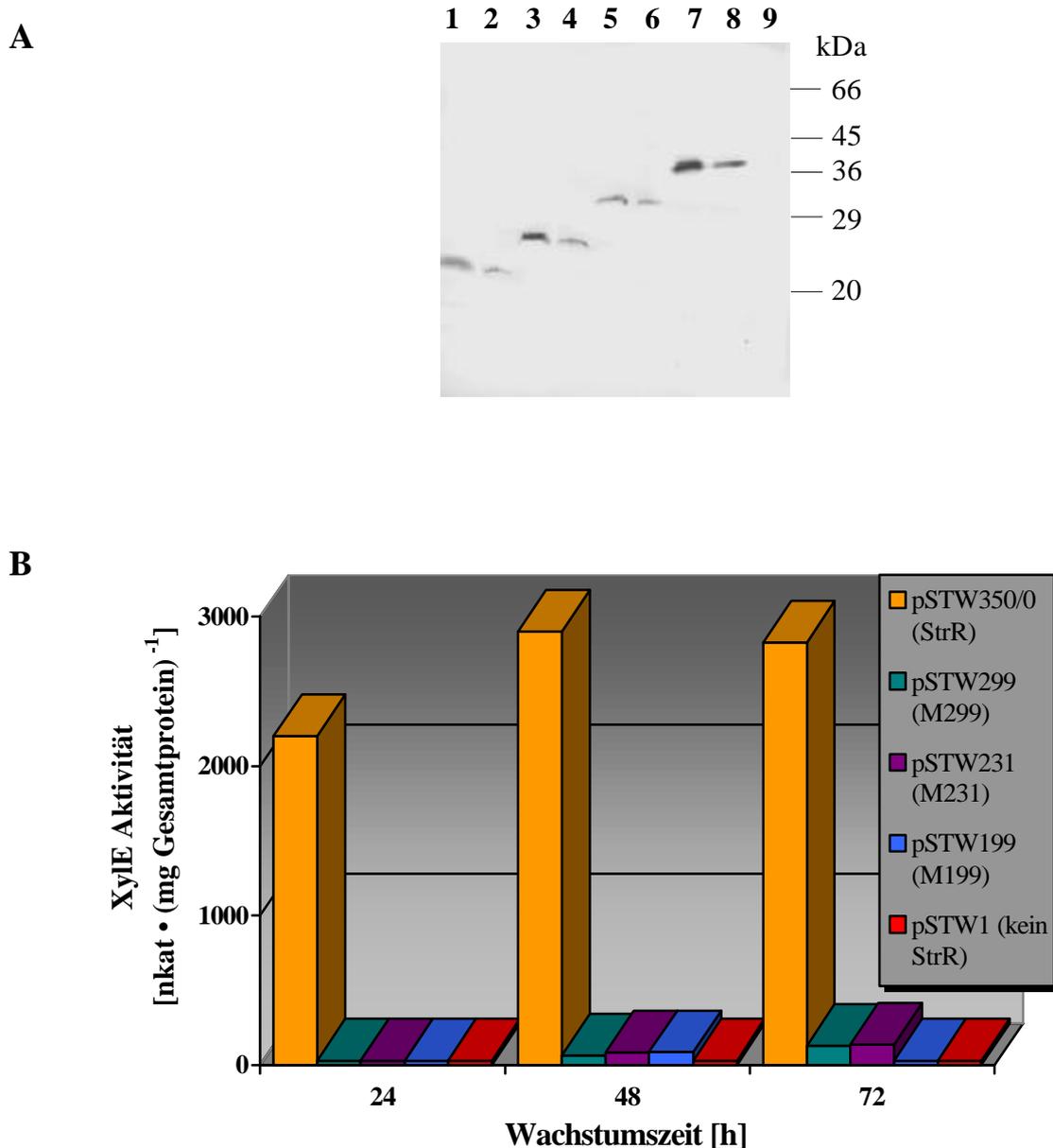
### 3.5.2 Heterologe Produktion in *S. lividans* und Überprüfung der Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung

Um die Fähigkeit der StrR-Derivate M299, M231 und M199 zur Transkriptionsaktivierung zu überprüfen, mußten deren Leserahmen zunächst in das unter 3.3.2 beschriebene Testsystem kloniert werden. Dazu wurden die 1,45 kb, 1,24 kb und 1,15 kb *NdeI/HindIII* Fragmente aus den Plasmiden pSTR299, pSTR231 und pSTR199 in den Vektor pIJ4070 kloniert und von dort als *NdeI/BglIII*-Fragmente in das Plasmid pSTW17 kloniert, welches den *strRp*-Promotor mit einer *NdeI*-Schnittstelle am *strR*-Genstart enthielt. Die daraus resultierenden rekombinanten Plasmide pSTW18-299, pSTW18-231 und pSTW18-199 enthielten die über eine *NdeI*-Schnittstelle mit dem *strRp*-Promotorregion fusionierten Leserahmen für die Expression der verkürzten *strR*-Gene. Aus diesen Plasmiden wurden schließlich die 2,3 kb, 2,1 kb und 2,0 kb *HindIII* Fragmente in das Plasmid pSTW3.21 kloniert (Anhang 2). Mit den entstandenen *E. coli-Streptomyces*-„Shuttle“-Plasmiden pSTW299, pSTW231 und pSTW199 wurde *S. lividans*/pSTW13.2i transformiert. Die resultierenden *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW-Serie-Doppeltransformanten wurden zur Produktion der C-terminal verkürzten StrR-Proteine sowie zur Überprüfung ihrer transkriptionsaktivierenden Eigenschaften benutzt.

Die heterologe Produktion der StrR-Derivate in *S. lividans* wurde mittels Western-Analyse überprüft (Abb. 3.16 A). Die Analyse der Proben nach 24 und 72 h Wachstum ergab, daß alle C-terminal verkürzten StrR-Proteine zu diesen Wachstumszeiten gebildet waren (Spur 1 - 6). Im Vergleich mit der Produktion des nativen StrR-Proteins (Spur 7 - 8) wurde zum Zeitpunkt von 24 h ein nahezu gleich hoher Anteil, nach 72 h jedoch ein reduzierter Anteil der C-terminal verkürzten Proteine detektiert. Bei Einsatz der Negativkontrolle (pSTW1) wurde keine spezifische immunologische Reaktion mit dem StrR-Antiserum detektiert (Spur 9).

Um die biologische Aktivität der C-terminal verkürzten StrR-Derivate M299, M231 und M199 zu überprüfen, wurden die Xyle-Aktivitäten der zellfreien Extrakte der jeweiligen *S. lividans*-Doppeltransformanten (pSTW13.2i/pSTW-Serie) durchgeführt und mit der des nativen StrR-Proteins (pSTW13.2i/pSTW350/0) verglichen (Abb. 3.16 B). Die Quantifizierung der Xyle-Aktivitäten erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums (24, 48 und 72 h). Die Xyle-Aktivitäten, verursacht durch das native StrR-Protein, betragen zu diesen Zeitpunkten 2200, 2900 bzw. 2830 nkat • (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup>. Die Negativkontrolle (pSTW13.2i/pSTW1) verursachte zu allen Zeitpunkten sehr geringe Xyle-Aktivitäten von max. 6,5 nkat • (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup>. Damit wurde eine 450fach höhere Xyle-Aktivität gemessen, wenn das native StrR-Protein vorhanden war. Keine oder stark verringerte Xyle-

Aktivitäten zwischen  $6,5 - 140 \text{ nkat} \cdot (\text{mg Gesamtprotein})^{-1}$  wurden in den *S. lividans*-Doppeltransformanten der C-terminal verkürzten StrR-Derivate gemessen.

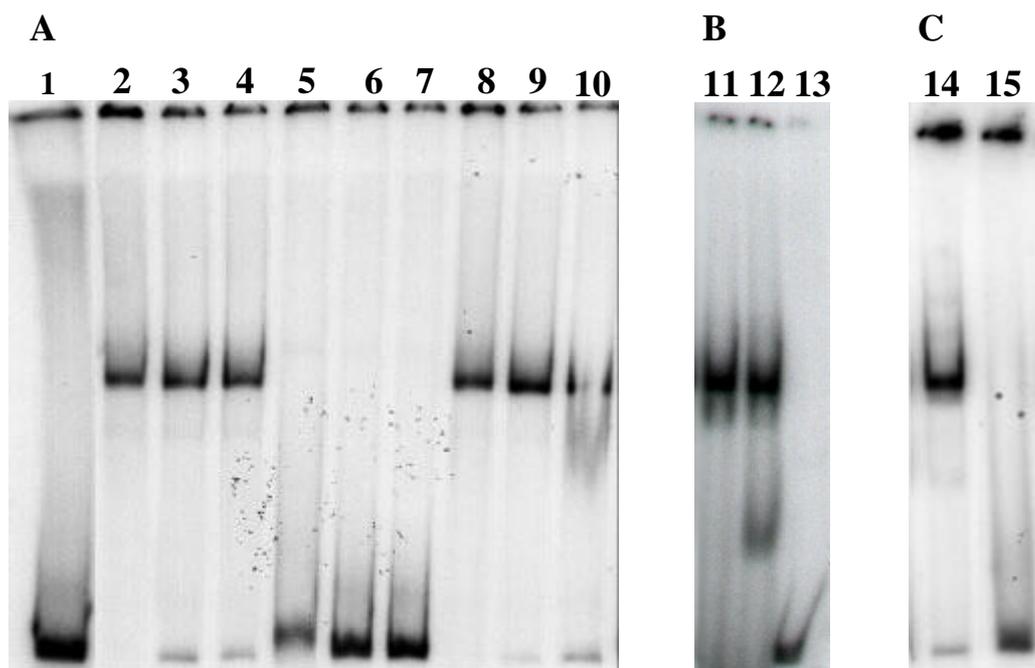


**Abb. 3.16: Nachweis der heterologen Produktion von StrR und C-terminal verkürzter StrR-Proteine in *S. lividans* sowie Untersuchungen zur *in vivo* Transkriptionsaktivierung.** (A) Western-Analyse von *S. lividans*-Gesamtzellextrakten mittels StrR-Antiserums. Doppeltransformanten der *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW-Serie wurden nach 24 h und 72 h Wachstum analysiert. Jeweils 50  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden nach SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) auf PVDF-Membranen immobilisiert. Folgende Proben wurden aufgetragen: (1), (2): 24 h und 72 h von pSTW199 (M199-Protein); (3), (4): 24 h und 72 h von pSTW231 (M231-Protein); (5), (6): 24 h und 72 h von pSTW299 (M299-Protein); (7), (8) 24 h und 72 h von pSTW350/0 (Wildtyp-StrR-Protein); (9): 24 h von pSTW1 (Negativkontrolle). Die Größe der verwendeten Standardproteine (kDa) ist angegeben. (B) Xyle-Enzymaktivitäten in Gesamtzellextrakten von Doppeltransformanten der *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW-Serie. Die Xyle-Aktivitäten wurden zu den angegebenen Wachstumszeiten bestimmt.

### 3.6 Charakterisierung von HTH-Mutanten des StrR-Proteins

#### 3.6.1 Herstellung, heterologe Produktion in *E. coli* und Tests auf DNA-Bindeaktivität

Durch PCR wurde eine gerichtete Mutagenese des HTH-Motivs des StrR-Proteins durchgeführt. Die Leserahmen mit den zugehörigen Nukleotidaustauschen für die Erzeugung dieser HTH-Mutanten wurden nach der Durchführung des „long-range“-PCR (vgl. 2.4 und 2.7.10) aus den rekombinanten Plasmiden pPVK349, pPVK350/2, pPVK350/3, pPVK350/4 und pPVK350/5 als 1,4 kb *NdeI/BglIII* Fragmente in den *E. coli* Überexpressionsvektor pET11a *NdeI/BamHI* kloniert (Anhang 5) und in *E. coli* erfolgreich überexprimiert (Daten nicht gezeigt). Mit den StrR-HTH-Mutanten M349 ( $\Delta$ S217, S222A), M350/2 (S222A), M350/3 (D223A), M350/4 (S222C) und M350/5 (S222R) wurden DNA-Bindetests am 290 bp *strB1p EcoRI* Fragment aus pRBD13 durchgeführt (Abb. 3.17).

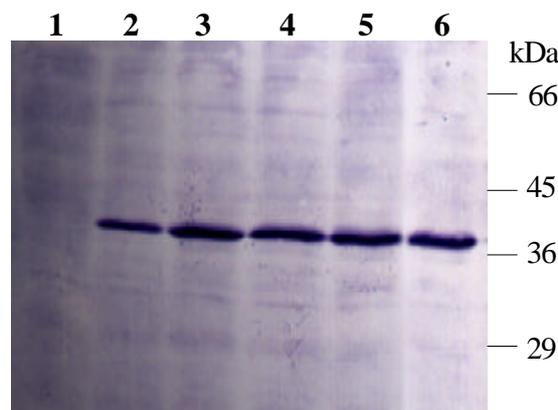


**Abb. 3.17: DNA-bindende Eigenschaften von StrR-HTH-Mutanten.** Autoradiogramm der Gelretardierungsassays mit den induzierten *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS-Gesamtzellextrakten und radioaktiv markiertem *EcoRI strB1p*-Fragment aus pRBD13 (290 Basenpaare; ca. 3 ng DNA pro Assay). Folgende Proben wurden auf ein natives PAA-Gel (6 % PAA) aufgetragen: **(A)** (1) kein Gesamtzellextrakt (Negativkontrolle); (2), (3), (4) StrR (50, 25 und 10 µg Gesamtzellextrakt); (5), (6), (7) M349 ( $\Delta$ S217, S222A; 50, 25 und 10 µg Gesamtzellextrakt); (8), (9), (10) M350/2 (S222A; 50, 25 und 10 µg Gesamtzellextrakt); **(B)** (11) M350/3 (D223A; 50 µg Gesamtzellextrakt); (12) M350/4 (S222C; 50 µg Gesamtzellextrakt); (13) kein Gesamtzellextrakt; **(C)** (14) M350/5 (S222R; 50 µg Gesamtzellextrakt); (15) kein Gesamtzellextrakt.

Die Mutante M350/2 zeigte dabei eine vergleichbare DNA-Bindeaktivität wie das native StrR-Protein (Spur 1 - 3 und 8 - 10). Die HTH-Mutante M349 jedoch, die neben dem S222A Austausch zusätzlich durch eine Deletion des S217 ( $\Delta$ S217) charakterisiert ist, zeigte keine DNA-Bindeaktivität mehr (Spur 5 - 7). Die HTH-Mutanten M350/3, M350/4 und M350/5 besaßen noch DNA-Bindeaktivität, wenn auch im Vergleich zu StrR mit teilweise geringerer Effizienz (Spuren 11, 12 und 14).

### 3.6.2 Heterologe Produktion in *S. lividans* und Überprüfung der Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung

Um die Transkriptionsaktivierung der StrR-HTH-Mutanten zu quantifizieren, wurden die Leserahmen der entsprechenden Gene mittels *NdeI/BglIII* mit dem *strRp*-Promotorbereich (pSTW18) fusioniert und in den rekombinanten Plasmiden pSTW350/2, pSTW350/3, pSTW350/4, pSTW350/5 und pSTW349 (Anhang 2) innerhalb des StrR-Testsystems (vgl. 3.3.2) zur Expression gebracht. Die heterologe Produktion der Proteine in *S. lividans* wurde mittels Western-Analyse überprüft (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: Nachweis der heterologen Produktion von StrR-HTH-Mutanten in *S. lividans*.** Western-Analyse von *S. lividans*-Gesamtzellextrakten mittels StrR-Antiserum. Doppeltransformanten der *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW-Serie wurden nach 48 h Wachstum analysiert. Jeweils 50  $\mu$ g Gesamtprotein wurden nach SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) auf PVDF-Membranen immobilisiert. Folgende Proben wurden aufgetragen: (1) pSTW1 (Negativkontrolle); (2) pSTW350/2 (S222A); (3) pSTW350/3 (D223A); (4) pSTW350/4 (S222C); (5) pSTW350/5 (S222R); (6) pSTW349 ( $\Delta$ S217, S222A). Die Größe der eingesetzten Markerproteine (kDa) ist angegeben.

Alle erzeugten StrR-HTH-Mutanten wurden nach 48 h Wachstum in *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW-Serie-Doppeltransformanten detektiert (Spur 2 - 6). Die relativen Molekulargewichte der detektierten Proteine entsprachen dem theoretischen Molekulargewicht von StrR (MW = 36,7 kDa). Bei Einsatz der Negativkontrolle (pSTW1) wurde keine spezifische immunologische Reaktion mit dem StrR-Antiserum detektiert (Spur 1). Die biologische Aktivität dieser Proteine wurde durch die Quantifizierung der Xyle-Aktivitäten der jeweiligen *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW-Serie-Doppeltransformanten überprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-4 zusammengefaßt.

**Tab. 3-4: Eigenschaften der durch gerichtete Mutagenese erzeugten StrR-HTH-Mutanten.**

<b>Protein / Mutation</b>	<b>As-Sequenz des HTH-Motivs<sup>1</sup></b>	<b>Xyle-Aktivität<sup>2</sup></b> [nkat • (mg Gesamtprotein) <sup>-1</sup> ]
<b>StrR</b>	207-LRQIAAQAGVSPSTASDVRK-226	2650 ± 350
<b>M350/2</b> (S222A)	207-LRQIAAQAGVSPSTA <u>A</u> DVRK-226	2033 ± 250
<b>M350/3</b> (D223A)	207-LRQIAAQAGVSPSTAS <u>A</u> VRK-226	644 ± 50
<b>M350/4</b> (S222C)	207-LRQIAAQAGVSPSTAC <u>D</u> VRK-226	468 ± 50
<b>M350/5</b> (S222R)	207-LRQIAAQAGVSPSTAR <u>D</u> VRK-226	1128 ± 100
<b>M349</b> ( $\Delta$ S217, S222A)	207-LRQIAAQAGV- <u>P</u> STA <u>A</u> DVRK-226	34 ± 10

1: Veränderungen der As-Sequenz gegenüber StrR innerhalb des HTH-Motifs sind unterstrichen.

2: Die Quantifizierung der Xyle-Aktivität erfolgte aus Gesamtzellextrakten der jeweiligen *S. lividans*/pSTW13.2i/pSTW-Serie-Doppeltransformanten nach 48 h Wachstum in TSB-Medium.

### 3.7 StrR-ähnliche Proteine in *S. glaucescens* und *S. flavopersicus*

#### 3.7.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen

In *S. glaucescens* GLA.0 (Mayer, 1994; Piepersberg, 1994) sowie in *S. flavopersicus* (Lyutskanova et al., 1997) wurden DNA-Sequenzen identifiziert, deren abgeleitete As-

Sequenzen Ähnlichkeiten zum StrR-Protein aufweisen. Die physikalischen Eigenschaften von StrR sowie der abgeleiteten StrR-ähnlichen Proteine HstR (*S. glaucescens*) sowie SpcR (*S. flavopersicus*) sind in Tab. 3-5 zusammengefaßt. Auffällig dabei ist, daß es sich bei allen drei Proteinen um relativ basische Proteine mit theoretischen pI-Werten von 8,66 (StrR), 9,94 (HstR) und 9,87 (SpcR) handelt. Die Sequenzidentität von StrR zu HstR beträgt 60%, die von SpcR zu StrR beträgt 56%.

**Tab. 3-5:** Eigenschaften StrR-ähnlicher Proteine.

	<b>StrR</b> <i>S. griseus</i>	<b>HstR</b> <i>S. glaucescens</i>	<b>SpcR</b> <i>S. flavopersicus</i>
Länge (As)	350	424	330
Molekulargewicht (kDa)	37,6	45,6	35,7
pI-Wert (theoretisch)	8,66	9,94	9,87
As-Identität zu StrR (%)	100	60	56

In Abb. 3.19 ist ein As-Sequenzvergleich aller drei Proteine gezeigt. Es gibt hochkonservierte Proteinbereiche, welche über fast die gesamte Proteinelänge verteilt sind. Charakteristisch für alle drei Proteine ist, daß sich relativ zentral die As-Sequenz für ein mögliches Helix-Turn-Helix-Motiv befindet. Die Berechnung der „scores“ (SD) in der Dodd-Egan-Matrix ergab Werte von  $SD_{(StrR)} = 4,45$  (As 205 - 226),  $SD_{(HstR)} = 3,74$  (As 204 - 225) und  $SD_{(SpcR)} = 4,99$  (As 180 - 202). Ausgehend von diesen Werten ist die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei diesen As-Sequenzen um HTH-Motive handelt, 100 % für SpcR und StrR sowie ca. 75 % für HstR (Dodd und Egan, 1990). Das HTH-Motiv von HstR besitzt drei Unterschiede in der As-Sequenz zu StrR. Diese Unterschiede befinden sich ausschließlich innerhalb der zweiten Helix. Das SpcR-Protein dagegen besitzt im Vergleich mit StrR insgesamt 8 und im Vergleich mit HstR 9 As-Unterschiede im selben Abschnitt. Diese sind jedoch über beide Helices des HTH-Motivs verteilt (vgl. Abb. 3.19).

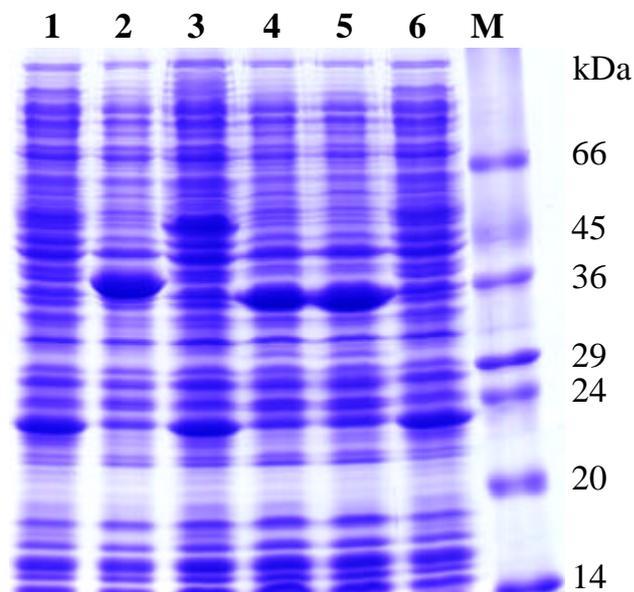
<i>S. griseus</i>	MEHISGNSPEQVRERSAAVTGAVEESELKLSAVTMVPVESLLPSDSPRSA	50
<i>S. glaucescens</i>	ME-LSSRRQFDMHDLSSRGVSELNGNSAKLSGVVMVPIASLRPSDSPRSA	49
<i>S. flavopersicus</i>	MTTVKG-----ACVSVPISKLLLLADSPRSR	25
<i>S. griseus</i>	GEDVEHIRTLLAASGAELPAIVVMPPTTKRVIDGMHRLRATKMRGATEIAVR	100
<i>S. glaucescens</i>	GEDPEHIRALAESGAELPPIIVMASTMRVVDGMHRLRAAELRGESLAVR	99
<i>S. flavopersicus</i>	AVDSSHVELLAQLEEVLPPIITVHRDSMRVVDGVHRLEAAKARGATEINVV	75
<i>S. griseus</i>	YFEGGEEAFIFAVKSNVTHGLPLSLDDRKAATRVLETHPSWSDRAIGL	150
<i>S. glaucescens</i>	FFEGDEKEAFVLAVEANITHGLPLGLQDRKDAARILRSHPMWSDRAIGT	149
<i>S. flavopersicus</i>	FFEGTLEDAFAHAVEKNVRHGLPLTLQERTDAAARIMASIADWSDRRVAA	125
<i>S. griseus</i>	ATGLSAKTVGTLRSCSTAGVPQSNVRIGRDGRARPLDPTEGRKLASRLLQ	200
<i>S. glaucescens</i>	ATGLSAKTVAALRARSTEGLPQSNVRIGRDGRARVPDPAEGRRLAGRLMQ	199
<i>S. flavopersicus</i>	TAGLSRKAVAAIRRMSADGRAGEAVRTGRDGRVRPVSSAAGREHAARVLR	175
	H            T            H	
<i>S. griseus</i>	ENPSASLRQIAAQAGVSPSTASDVRKRLSRGESPLPERDRQQEVPVAVART	250
<i>S. glaucescens</i>	ENPSAPLRQIAAQAGVSLGTVSDVRKRLQRGEGPVPERGRARTEPGTNPE	249
<i>S. flavopersicus</i>	ENPGASLREVARVAGISPSTVVRDVRNRRTASGEDVPVVRQRPPDRRPPVPG	225
<i>S. griseus</i>	PARVSR-----ADGSWAPH-----TVALRHLSRDPSVRLTEDEGRALLRWL	290
<i>S. glaucescens</i>	PAHTPERPYDEAEAERPTR-----ALILRHLSRDPSVRLTEDEGRLLRWL	294
<i>S. flavopersicus</i>	PATPGTVRLAAAREQRMADCSRRYANLLHGLKSDPSVRLTESGRLLVLRLL	275
<i>S. griseus</i>	NVVAVRNQDWRLLGNVPPHCVKVIAELARGCADIWHRVAEELDQAGIDE	340
<i>S. glaucescens</i>	TVAAVRPQDWERLLRNVPAPHRVGAVAELARGCSQTWQLVAEQLEERARGSG	344
<i>S. flavopersicus</i>	ETRLILIGERDRLQLAIPQHCVPNLSAAVRCQAEAWDEFQHLLETFEAAE	325
<i>S. griseus</i>	AAGRSLSDVG	350
<i>S. glaucescens</i>	AEQETGGAPGRQEAEGAGQSAAGMPRRAAALESRRRTGGEVTVQVPDAPDRP	394
<i>S. flavopersicus</i>	ELGAG	330
<i>S. glaucescens</i>	VPPADPCCDTVLRGPASAGAPGRRTPRAGR	424

**Fig. 3.19: Vergleich StrR-ähnlicher Proteine.** Dargestellt sind die As-Sequenzen von StrR aus *S. griseus*, HstR aus *S. glaucescens* sowie SpcR aus *S. flavopersicus*. In allen Sequenzen identische Aminosäuren wurden rot hervorgehoben. Die Lokalisation der möglichen Helix-Turn-Helix-Motive (HTH) ist durch einen Kasten gekennzeichnet.

### 3.7.2 Heterologe Produktion der StrR-ähnlichen Proteine HstR und SpcR in *E. coli*

Um zu überprüfen, ob die abgeleiteten StrR-ähnlichen Proteine die gleichen funktionellen Eigenschaften wie das StrR-Protein besitzen, sollten die jeweiligen Gene amplifiziert, kloniert und sowohl in *E. coli* als auch in *S. lividans* heterolog exprimiert werden. Das Plasmid

pGMM1 (Mayer, 1994) und genomische DNA von *S. flavopersicus* wurden als PCR-„Template“ benutzt. Die Gene *hstR* (*S. glaucescens*) und *spcR* (*S. flavopersicus*) wurden mit Hilfe der PCR-Primer ST15/ST16 und ST11/ST12 amplifiziert und „blunt ended“ in den Vektor pUC18 (*Sma*I) kloniert. Es entstanden die rekombinanten Plasmide pGLA (*hstR*) und pFLA (*spcR*) (Anhang 6). Dabei wurde in beiden Fällen am Translationsstartpunkt der Gene die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Nde*I eingefügt. Anschließend wurde das Gen *hstR* als 1,4 kb *Nde*I/*Hind*III Fragment und das Gen *spcR* als 1,0 kb *Nde*I/*Bam*HI Fragment in den T7-Expressionsvektor pET11a kloniert und es entstanden die Plasmide pTGL (*hstR*) und pTFL (*spcR*). Die heterologe Produktion der Proteine HstR und SpcR in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pTGL bzw. -/pTFL wurde zeitabhängig nach IPTG-Induktion der Genexpression verfolgt. Als Kontrolle diente die Expression des *strR*-Gens in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pSTR11 unter den gleichen Bedingungen (Retzlaff und Distler, 1995). Die Gesamtzellextrakte der *strR*-, *hstR*- und *spcR*- exprimierenden *E. coli*-Stämme wurden durch SDS-PAA-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 3.20). Alle drei Proteine (StrR:  $M_r = 37,6$  kDa; HstR:  $M_r = 45,6$  kDa; SpcR:  $M_r = 35,7$  kDa) konnten als zusätzliche Proteinbanden identifiziert werden und lagen in löslicher Form in *E. coli*-Gesamtzellextrakten vor (Spur 2 - 4).



**Abb. 3.20: Heterologe Produktion von StrR, HstR, SpcR und SpcRM1 in *E. coli*.** Analyse einer SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) von induzierten *E. coli* BL21 (DE3)pLysS-Gesamtzellextrakten (50 µg Protein pro Spur, 120 min nach IPTG-Induktion). Folgende Proben wurden aufgetragen: (1) pET11a (Negativkontrolle); (2) pSTR11 (StrR); (3) pTGL (HstR); (4) pTFL (SpcR); (5) pTFLM1 (SpcRM1; s. 3.7.3); (M) Molekulargewichtsstandard, Proteingrößen sind in kDa angegeben.

### 3.7.3 Herstellung der Mutante SpcRM1 und heterologe Produktion in *E. coli*

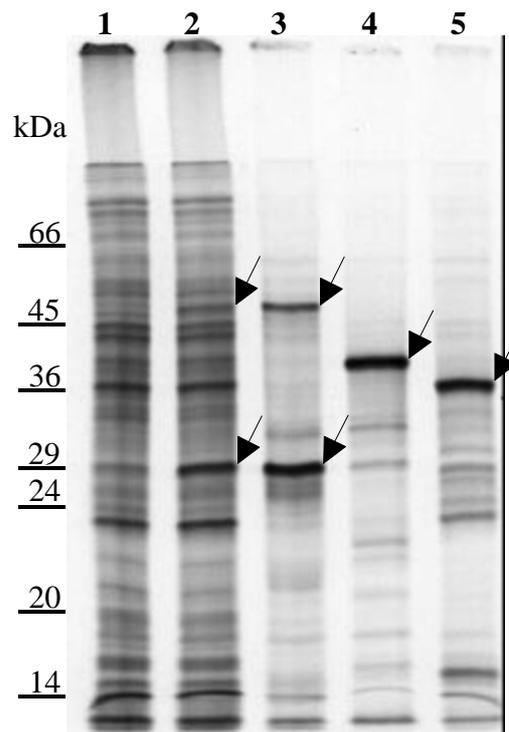
Der Sequenzvergleich der HTH-Motive von SpcR, HstR und StrR zeigte, daß in der zweiten Helix von SpcR nur zwei wesentliche As-Austausche, R197 und N202 bestehen (vgl. Abb. 3.19). Vor allem der Unterschied R197, relativ zu S222 in StrR und S221 in HstR, könnte dabei entscheidend für die Veränderung der Sequenzspezifität der DNA-Bindung von SpcR sein. Bisher wurden keine potentiellen DNA-Bindestellen für das SpcR-Protein gefunden (J. Altenbuchner, pers. Mitteilung). Deshalb konnten somit DNA-Bindetests für SpcR nur mit den DNA-Bindestellen aus dem Streptomycin- (*strB1p*) bzw. 5'-Hydroxystreptomycincluster (interne *strR*-Bindestelle) durchgeführt werden (s. 3.7.5). Zur Erhöhung der Spezifität der DNA-Bindung von SpcR an diesen StrR-Bindestellen sollte deshalb die zweite, sog. Erkennungshelix, des HTH-Motifs von SpcR weitgehend an die zweite Helix des HTH-Motivs von StrR angepaßt werden.

Mit Hilfe von PCR wurde die gerichtete Mutagenese des *spcR*-Gens durchgeführt. Dabei wurde das Plasmid pFLA mit den PCR-Primern ST21.1/ST22.1 amplifiziert und ligiert. Es entstand das rekombinante Plasmid pFLAM1. Das in diesem Plasmid verändert vorliegende Gen *spcRml* wurde als 1,0 kb Fragment *NdeI/BamHI* in pET11a kloniert und in *E. coli* erfolgreich überexprimiert. In SDS-PAA-Gelen wurde SpcRM1 als zusätzliche Proteinbande des Molekulargewichtes von  $M_r = 35,7$  kDa identifiziert und lag in löslicher Form in den *E. coli*-Gesamtzellextrakten vor (vgl. Abb. 3.20; Spur 5).

### 3.7.4 Herstellung von [<sup>35</sup>S]-markierten StrR-, HstR- und SpcR-Proteinen in *E. coli*

Nach Transformation der Expressionsplasmide für die heterologe Produktion von StrR, HstR und SpcR (vgl. 3.7.2) in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS wurden die Zellen wie unter 2.7.14 beschrieben inkubiert und die Gesamtzellextrakte durch SDS-PAA-Gelelektrophorese und anschließende Autoradiographie analysiert (Abb. 3.21). Es wurden zusätzliche Proteinbanden in induzierten *E. coli*-Gesamtzellextrakten detektiert, welche in ihrem Laufverhalten den berechneten Molekulargewichten (vgl. Tab. 3-5) der Proteine HstR, StrR und SpcR entsprachen. In HstR produzierenden *E. coli*-Gesamtzellextrakten wurde ein weiteres zusätzliches Protein mit einem Molekulargewicht von  $M_r = 29$  kDa identifiziert. Banden gleicher Proteingröße wurden sowohl in den IPTG-induzierten Zellextrakten mit und ohne

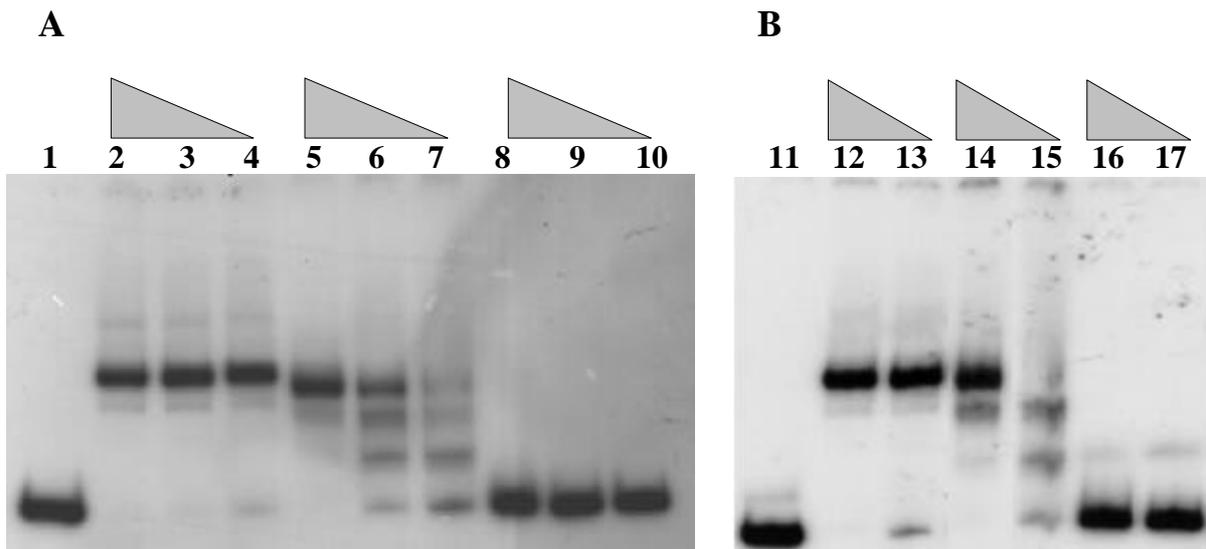
Rifampicin-Zugabe detektiert (Spuren 2 und 3). Da die Proteinbande mit dem Molekulargewicht von 29 kDa sehr prominent war, wurde davon ausgegangen, daß es sich hier um ein verkürztes HstR-Derivat handelte. Auch bei der induzierten Expression von StrR und SpcR traten verschiedene Muster kürzerer Proteine auf, die ebenfalls auf einen verstärkten proteolytischen Abbau in *E. coli* unter diesen Bedingungen hinwiesen (Spuren 4 und 5). Diese Proteinmuster waren jedoch relativ schwächer als das verkürzte 29 kDa-Protein im Falle von HstR.



**Abb. 3.21: Radioaktiver Nachweis der heterologen Produktion von StrR, HstR und SpcR in *E. coli*.** Dargestellt ist das Autoradiogramm der Analyse einer SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) von *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS-Gesamtzellextrakten (60 min nach IPTG-Induktion). Nach Induktion zusätzlich produzierte Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Folgende Proben wurden aufgetragen: (1) pET11a (Negativkontrolle), ohne Zugabe von Rifampicin; (2) pTGL (HstR), ohne Zugabe von Rifampicin; (3) pTGL (HstR), Zugabe von Rifampicin, HstR; (4) pSTR11 (StrR), Zugabe von Rifampicin; (5) pTFL (SpcR), Zugabe von Rifampicin. Die Größe der eingesetzten Markerproteine (kDa) ist angegeben.

### 3.7.5 Versuche zur DNA-Bindeaktivität von HstR und SpcR

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Proteinen HstR und StrR ebenfalls um DNA-bindende Proteine mit ähnlicher Spezifität wie StrR handelte, wurden mit den in *E. coli* heterolog produzierten Proteinen (vgl. 3.7.2) DNA-Bindetests am 290 bp *strB1p* *Eco*RI Fragment aus pRBD13 und am 248 bp *hstR* (intern) *Sal*I Fragment aus pGLB durchgeführt (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Analyse der DNA-bindenden Eigenschaften von StrR, HstR und SpcR an DNA-Bindestellen aus *S. griseus* und aus *S. glaucescens*.** Autoradiogramme der Gelretardierungsassays mit den induzierten *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS-Gesamtzellextrakten (50, 25 oder 10 µg Gesamtprotein pro Assay) mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten (ca. 3 ng DNA pro Assay). Abnehmende Mengen an Gesamtprotein sind durch graue Dreiecke gekennzeichnet. **(A)** *EcoRI strB1p*-Fragment (*S. griseus*) aus pRBD13 (290 Basenpaare). **(B)** *SalI strR*-Fragment (*S. glaucescens*) aus pGLB (242 Basenpaare). Folgende Proben wurden auf native PAA-Gele (6 % PAA) aufgetragen: (1) und (11) kein Gesamtzellextrakt (Negativkontrolle); (2) bis (4), (12), (13) pSTR11 (StrR); (5) bis (7), (14), (15) pTGL (HstR); (8) bis (10), (16), (17) pTFL (SpcR).

Die Gelretardierungsversuche zeigten zunächst, daß das StrR-Protein in der Lage war, sowohl *in vitro* an das *strB1p*-Fragment als auch an das *hstR*-Fragment zu binden (Spuren 2 - 4 und 12 - 13). Beide eingesetzten Fragmente wurden auch bei Einsatz abnehmender Mengen von StrR als einzelner retardierter StrR/DNA-Komplex detektiert. Bei Einsatz von HstR-enthaltendem *E. coli*-Gesamtzellextrakt wurden ebenfalls beide Fragmente retardiert (Spuren 5 - 7 und 14 - 15). Allerdings wurden hier noch zwei zusätzliche Banden höherer Mobilität detektiert, die ihrerseits jedoch auch eine Retardierung der eingesetzten Fragmente darstellten. Insgesamt wurden bei Einsatz von HstR drei retardierte HstR/DNA-Komplexe pro Fragment detektiert. Versuche mit SpcR-enthaltendem *E. coli*-Gesamtzellextrakt zeigten bei beiden eingesetzten Fragmenten keine retardierten SpcR/DNA-Komplexe. In diesen Assays wurde lediglich eine Bande detektiert, welche durch das jeweils freie eingesetzte Fragment hervorgerufen wurde (Spuren 8 - 10 und 16 - 17). Das SpcR-Protein zeigte unter den hier durchgeführten Bedingungen daher keine DNA-Bindeaktivität.

### 3.7.6 Heterologe Produktion von HstR, SpcR und SpcRM1 in *S. lividans* sowie Versuche zur Transkriptionsaktivierung

Wie oben gezeigt (vgl. 3.7.5), konnte für HstR eine *in vitro* DNA-Bindung an die *strB1p* Promoterregion aus *S. griseus* nachgewiesen werden, wohingegen diese Versuche mit SpcR scheiterten. Um nun zu überprüfen, ob HstR auch *in vivo* als Transkriptionsaktivator fungiert, wurde dessen Gen mit dem *strRp*-Promotor fusioniert und in *S. lividans*/pSTW13.2i zur Expression gebracht. Um auszutesten, ob das SpcR- oder SpcRM1-Protein (vgl. 3.7.3) *in vivo* Aktivitäten besaßen, wurden auch deren Gene mit dem *strRp*-Promotor fusioniert und in *S. lividans*/pSTW13.2i exprimiert. Durch das Einbringen dieser Gene in das Testsystem zum Screening von StrR-Mutanten (vgl. 3.3.2) sollten letztlich quantitative Aussagen über die Xyle-Aktivität als Maß für die Qualität der Transkriptionsaktivierung gemacht werden können.

Für die Konstruktion des *S. lividans-hstR*-Expressionsplasmides (pSTW22.1) wurde das 1,3 kb *NdeI/HindIII* Fragment aus pGLA in pSTW15 und von dort (pSTW20) als 1,3 kb *NdeI/BglIII* in pSTW18 kloniert. Aus dem so entstandenen rekombinanten Plasmid pSTW21 wurde das 2,1 kb *HindIII* Fragment (*strRp-hstR*) in pSTW350/0 kloniert und es entstand pSTW22.1 (Anhang 7). Die Plasmide für die Expression des *spcR*- bzw. des *spcRm1*-Gens in *S. lividans* wurden durch Klonierung des 1,0 kb *NdeI/BamHI* Fragmentes aus pFLA und pFLAM1 in pSTW22.1 (*NdeI/BglIII*) erzeugt und es entstanden die rekombinanten Plasmide pSTW24 (*spcR*-Expression) und pSTW24.1 (*spcRm1*-Expression) (Anhang 7).

*S. lividans*/pSTW13.2i wurde mit den Plasmiden pSTW1 (Negativkontrolle), pSTW350/0 (StrR-Positivkontrolle), pSTW22.1 (HstR), pSTW24 (SpcR) und pSTW24.1 (SpcRM1) transformiert. Die zunächst qualitativen Tests auf Xyle-Aktivität in den entstandenen *S. lividans*/pSTW13.2i-Doppeltransformanten ergaben, daß nur für StrR und HstR eine signifikante Aktivität des Xyle-Reporterproteins auf SPMR-Agar detektierbar war. Dadurch konnte die Funktion des HstR-Proteins sowohl als DNA-Bindeprotein als auch als Transkriptionsaktivator bestätigt werden. Für das SpcR-Protein sowie dessen HTH-Mutante, SpcRM1, wurden jedoch diese Funktionen unter den hier verwendeten Bedingungen nicht bestätigt. Die zunächst qualitativ bestimmte Xyle-Aktivität wurde im folgenden noch quantifiziert (Tab. 3-6). Desweiteren wurden die zur Quantifizierung der Xyle-Aktivität benutzten zellfreien Extrakte der *S. lividans*-Doppeltransformanten einer Western-Analyse mittels StrR-Antiserums zugeführt. Jedoch konnte keine Kreuzreaktion des verwendeten Serums mit HstR, SpcR oder SpcRM1 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die

Ergebnisse der *in vitro* DNA-Bindetests (vgl. 3.7.5), der Quantifizierung der *in vivo* Xyle-Aktivitäten sowie der Western-Analysen sind in Tab. 3-6 zusammengefaßt.

**Tab. 3-6: Eigenschaften und Ergebnisse der Untersuchungen von StrR und der StrR-ähnlichen Proteine HstR, SpcR und SpcRM1.**

Protein sowie As-Sequenz des HTH-Motifs <sup>1</sup>	<i>in vivo</i> Xyle-Aktivität <sup>2</sup>	Western Analyse <sup>3</sup>	<i>in vitro</i> DNA-Bindung <sup>4</sup>
<b>StrR</b> 207-LRQIAAQAGVSPSTASDV <sup>u</sup> RK-226	2650 ± 350	+	+
<b>HstR</b> 206-LRQIAAQAGVSL <sup>u</sup> GT <sup>u</sup> VS <sup>u</sup> DV <sup>u</sup> RK-225	1980 ± 200	-	+
<b>SpcR</b> 182-LRE <sup>u</sup> VAR <sup>u</sup> VAG <sup>u</sup> I <sup>u</sup> SPST <sup>u</sup> VR <sup>u</sup> DV <sup>u</sup> RN-201	34	-	-
<b>SpcRM1</b> 182-LRE <sup>u</sup> VAR <sup>u</sup> VAG <sup>u</sup> I <sup>u</sup> SPST <sup>u</sup> VS <sup>u</sup> DV <sup>u</sup> RN-201	55	-	-

1: Veränderungen der As-Sequenz gegenüber StrR innerhalb des HTH-Motifs sind unterstrichen.

2: Die Quantifizierung der Xyle-Aktivität erfolgte aus Gesamtzellextrakten der jeweiligen

*S. lividans*-Doppeltransformanten nach 48 h Wachstum in TSB-Medium und ist in [nkat • (Gesamtprotein)<sup>-1</sup>] angegeben.

3: Die Western-Analyse der Proteine erfolgte mit StrR-Antiserum und mit den gleichen Gesamtzellextrakten wie sie für die Quantifizierung der Xyle-Aktivität benutzt wurden.

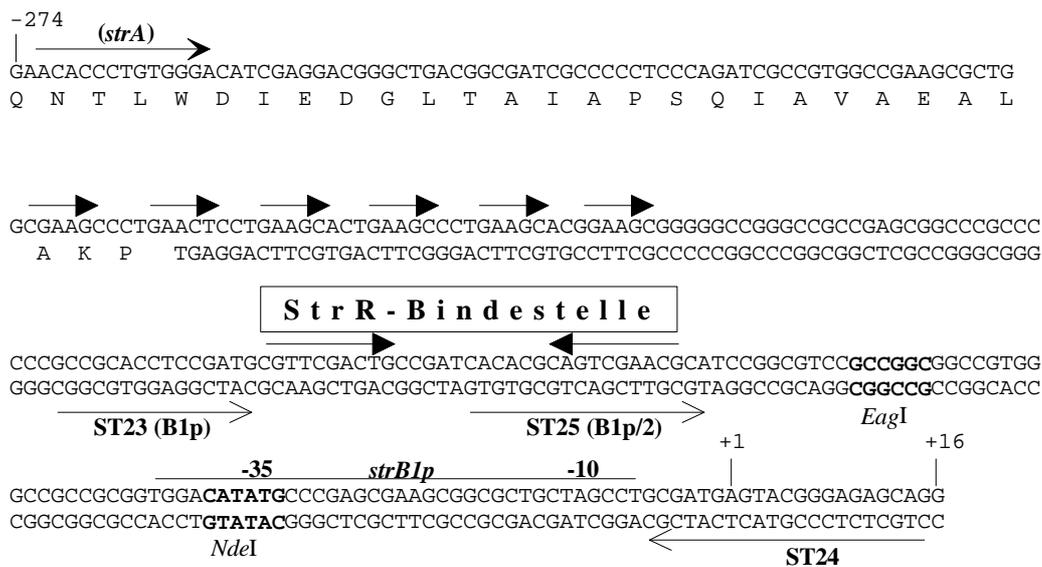
4: Die Tests auf DNA-Bindung der Proteine wurde mit induzierten *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS-Gesamtzell-extrakten durchgeführt (vgl. 3.7.2; 3.7.3).

## 3.8 Untersuchungen zur DNA-Bindung und Oligomerisierung von StrR

### 3.8.1 Veränderungen der StrR-Bindestelle innerhalb des *strB1p*-Operators

Durch die Untersuchungen von L. Retzlaff zur DNA-Bindeaktivität von StrR wurde gezeigt, daß das StrR-Protein in der Lage ist, an das 290 bp *strB1p*-Operatorfragment zu binden (Retzlaff und Distler, 1995). Dieses Fragment (DNA-Region -274 bis +16) besitzt 38 bp stromaufwärts der -35-Region des *strB1p*-Promotors eine palindrome StrR-Bindestelle (Abb. 3.23). Weitere 45 bp stromaufwärts dieser StrR-Bindestelle befinden sich 6 sogenannte „direct repeats“. Es sollte deshalb zunächst überprüft werden, ob diese „direct repeats“ eventuell auch essentiell für eine Bindung von StrR an die DNA waren, oder aber, ob StrR nur mit der palindromen StrR-Bindestelle interagiert. Außerdem sollte parallel überprüft werden, ob das StrR-Protein in der Lage ist, nur eine Halbseite der palindromen StrR-

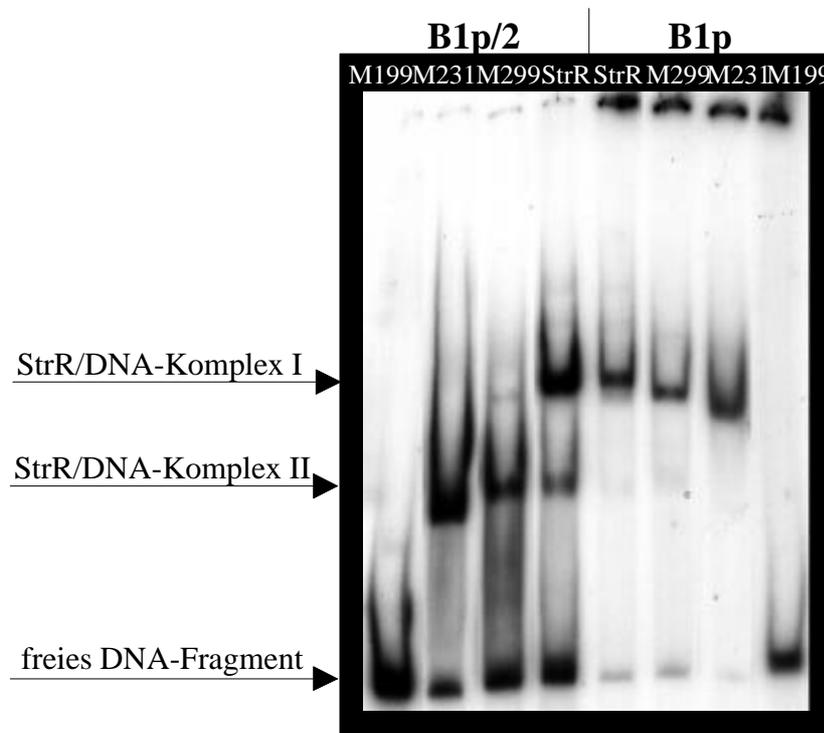
Bindestelle zu besetzen. Es wurden deshalb zunächst mittels PCR aus chromosomaler DNA von *S. griseus* N2-3-11 und den PCR-Primern ST23/ST24 und ST25/ST24 zwei Fragmente (B1p und B1p/2) amplifiziert, welche die stromaufwärts gelegenen „direct repeats“ nicht mehr besaßen (vgl. Abb. 3.23). Desweiteren enthielt das Fragment B1p das volle Palindrom der StrR-Bindestelle, wohingegen das Fragment B1p/2 nur eine Hälfte der StrR-Bindestelle besaß. Beide Fragmente wurden anschließend in pUC18 (*Sma*I) kloniert und es entstanden die rekombinanten Plasmide pB1p und pB1p/2.



**Abb. 3.23: Struktur und Sequenz des *strB1p*-Operators.** Der DNA-Bereich von -274 bis +16, vom *strB1p*-Transkriptionsstart (+1) aus gesehen, sind dargestellt. Das Ende des *strA*-Leserahmens ist gekennzeichnet. Der *strB1p*-Promotor mit seiner -35- und -10-Region, die StrR-Bindestelle und die stromaufwärts dieser Bindestelle gelegenen „direct repeats“ sind eingezeichnet. Die für die Versuche zur DNA-Bindung von StrR, C-terminal verkürzten StrR-Proteinen und StrR-Mutanten an vollem und halbem Palindrom benutzten DNA-Fragmente wurden durch PCR mit den Primer-Kombinationen ST23/ST24 (B1p) und ST25/ST24 (B1p/2) hergestellt. Die benutzten Primer sowie die sich daraus abgeleiteten DNA-Fragmente sind markiert. Für die Berechnung der Oligomerisierung von StrR wurde das Fragment B1p/2 durch Hydrolyse mit *Nde*I gespalten und in den Gelretardierungsassays eingesetzt. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind fett markiert und angegeben.

Für den Einsatz in Gelretardierungsassays wurden die gleich langen 156 bp *Eco*RI/*Bam*HI (B1p) bzw. *Eco*RI/*Hind*III (B1p/2) Fragmente sowie die *E. coli*-Gesamtzellextrakte der heterologen Produktion von StrR und der C-terminal verkürzten StrR-Proteine (vgl. 3.5.1) benutzt. Das Fragment B1p wurde sowohl von StrR als auch von den C-terminal verkürzten StrR-Proteinen M299 und M231 retardiert (Abb. 3.24 A). Die auf dem Autoradiogramm detektierten retardierten Banden wurden als StrR/DNA-Komplex I bezeichnet. Bei Einsatz des M199-Proteins erfolgte keine Retardierung von B1p, hier wurde nur das freie, nicht

retardierte B1p-Fragment detektiert. Wurde das Fragment B1p/2 eingesetzt, so erfolgte sowohl durch StrR als auch durch M299 und M231, nicht aber durch M199, eine Retardierung des eingesetzten Fragmentes (Abb. 3.24 B). Bei Einsatz von StrR jedoch wurden, im Gegensatz zum Experiment mit B1p, zwei retardierte Banden detektiert. Die Laufhöhe der ersten Bande entsprach derjenigen von StrR/DNA-Komplex I. Die zweite retardierte Bande wurde als StrR/DNA-Komplex II bezeichnet. Bei Einsatz von M299 war die Bande der Laufhöhe von StrR/DNA-Komplex I nur sehr schwach detektierbar, währenddessen die Bande der Laufhöhe von StrR/DNA-Komplex II deutlich sichtbar war. Wurde das Protein M231 benutzt, so fehlte die Bande von StrR/DNA-Komplex I vollständig und nur die Bande von StrR/DNA-Komplex II konnte detektiert werden.



**Abb. 3.24: Untersuchungen zur DNA-Bindung von StrR und C-terminal verkürzten StrR-Proteinen am vollen und halben Palindrom der StrR-Bindestelle.** Autoradiogramm der Gelretardierungsassays mit den induzierten *E. coli*-Gesamtzell-extrakten der heterolog produzierten Proteine StrR, M299, M231 und M199 (ca. 50 µg Protein pro Assay) und den radioaktiv markierten DNA-Fragmenten (ca. 3 ng DNA pro Assay) B1p aus pB1p (*EcoRI/BamHI*; 156 Basenpaare) und B1p/2 aus pB1p/2 (*EcoRI/HindIII*; 156 Basenpaare). Die retardierten StrR/DNA-Komplexe und die freien B1p- bzw. B1p/2-Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet. Retardierte DNA-Fragmente wurden als StrR/DNA-Komplex I und StrR/DNA-Komplex II bezeichnet.

### 3.8.2 Untersuchungen zur Oligomerisierung von StrR und C-terminal verkürzten StrR-Proteinen

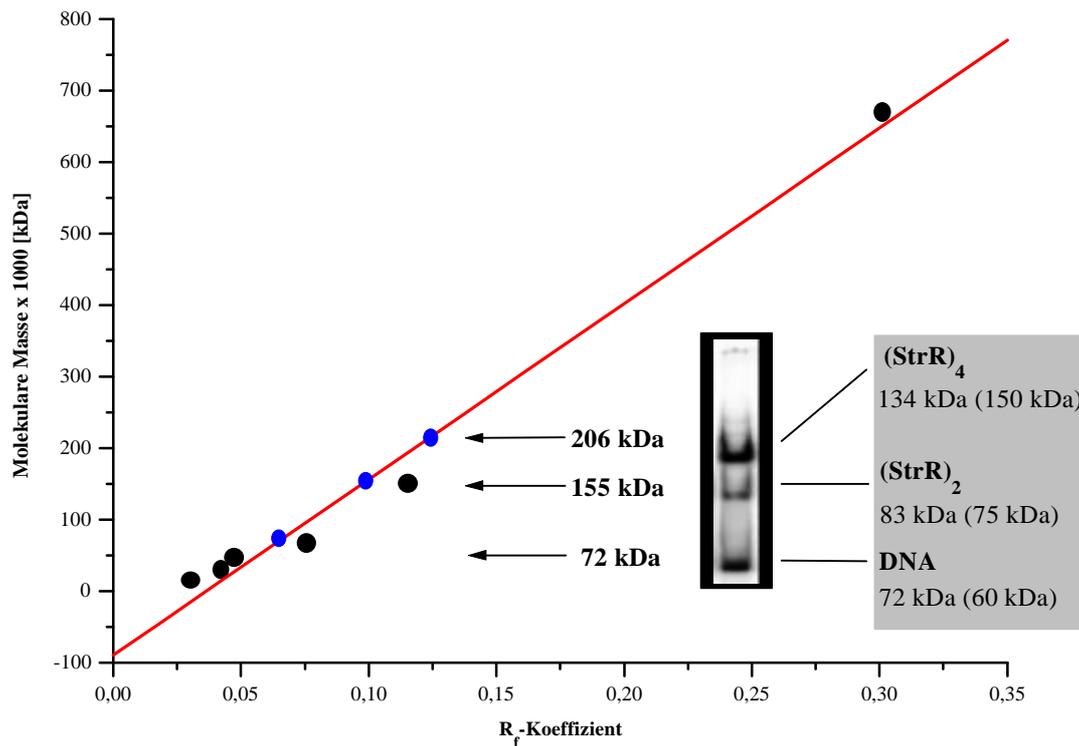
Es wurde vermutet, daß die größere Mobilität von StrR/DNA-Komplex II durch eine geringere molekulare Masse dieses Komplexes verursacht wurde. Deshalb sollte in den darauffolgenden Untersuchungen herausgefunden werden, welche molekularen Massen den in den Experimenten mit B1p und B1p/2 gefundenen DNA/StrR-Komplexen entsprachen. Die hierfür notwendigen Experimente basierten auf der Kombination von Gelretardierungsassays und nativer Gelelektrophorese von Standardproteinen definierter molekularer Masse (Orchard und May, 1993). Für diese Experimente wurde das 92 bp lange DNA-Fragment benutzt, welches durch die Hydrolyse des 156 bp langen B1p/2 *EcoRI/HindIII* Fragmentes mittels *NdeI* entstand (vgl. Abb. 3.23). Die Gelretardierungsassays wurden in nativen PAA-Gelen verschiedener Gelkonzentrationen (5 - 10 % PAA) aufgetrennt und deren Laufverhalten mit dem von Standardproteinen verglichen. Für die gleichzeitige Detektion von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten und Standardproteinen wurden die Gele zuerst mit Coomassie Färbelösung behandelt und anschließend zur Autoradiographie gebracht (vgl. 2.8.5). Die  $R_f$ -Werte der eingesetzten Standardproteine sowie der retardierten Banden und der freien Fragmente wurden ermittelt. Die logarithmische Auftragung der  $R_f$ -Werte gegen die PAA-Konzentration ergab Eichgeraden mit für das jeweilige Molekulargewicht spezifischen  $R_f$ -Koeffizienten (Tab. 3-7).

Die  $R_f$ -Koeffizienten wurden anschließend gegen die Größe der eingesetzten Standardproteine aufgetragen (Abb. 3.25). Mit Hilfe der daraus entstandenen Kalibrierungsgeraden wurden die molekularen Massen der StrR/DNA-Komplexe sowie der freien Fragmente berechnet. Für StrR/DNA-Komplex I (vgl. Abb. 3.24) wurde eine molekulare Masse von  $M_r = 206$  kDa berechnet, wohingegen die Berechnung für StrR/DNA-Komplex II eine molekulare Masse von  $M_r = 155$  kDa ergab. Die Berechnung des freien DNA-Fragmentes ergab eine molekulare Masse von  $M_r = 72$  kDa. Subtrahierte man die berechnete molekulare für das freie DNA-Fragment, so ergab sich für die StrR-Proteine in StrR/DNA-Komplex I eine molekulare Masse von  $M_r = 134$  kDa, in StrR/DNA-Komplex II  $M_r = 86$  kDa. Aufgrund der theoretischen molekularen Masse des StrR-Monomers ( $MW = 37,6$  kDa) mußte es sich in diesen StrR/DNA-Komplexen um 4 (StrR/DNA-Komplex I) bzw. 2 (StrR/DNA-Komplex II) StrR-Moleküle handeln, die an die DNA gebunden waren.

**Tab. 3-7:** Kalibrierungswerte für Standardproteine aus nativen Gelelektrophoresen verschiedener PAA-Konzentrationen sowie für StrR/DNA-Komplexe.

<b>PAA-Konz [%]</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>Rf- Koeffizient</b>
<b>Protein [kDa]</b>	<b>log (Rf • 100)</b>						
<b><math>\alpha</math>-Lactalbumin [14,2]</b>	1,7653	1,7558	1,7465	1,7088	1,6469	1,6222	<b>0,0309</b>
<b>C-Anhydrase [29]</b>	1,3094	1,2867	1,2526	1,2017	1,1433	1,1092	<b>0,0423</b>
<b>Ovalbumin [45]</b>	1,7468	1,7127	1,685	1,6409	1,5625	1,5103	<b>0,0479</b>
<b>BSA-Monomer [66]</b>	1,7392	1,69425	1,6243	1,5674	1,4305	1,37675	<b>0,0760</b>
<b>Alkohol- Dehydrogenase [150]</b>	1,499	1,4294	1,3232	1,2314	1,0531	0,9330	<b>0,1157</b>
<b>Thyroglobulin [669]</b>	1,0663	0,7716	0,4993	0,1523	n.d.	n.d.	<b>0,3014</b>
<b>DNA/StrR- Komplex I DNA/StrR- Komplex II DNA freies Fragment [60]</b>	1,5122	1,3739	1,277	1,152	1,0185	0,908	<b>0,1203</b>
	1,6640	1,5499	1,4694	1,3671	1,2294	0,1169	<b>0,1011</b>
	1,9062	1,8744	1,8046	1,7315	1,6569	1,5919	<b>0,0656</b>

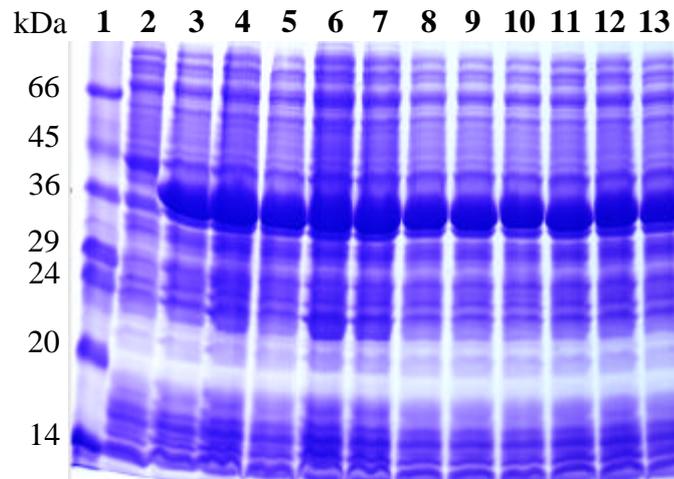
Die Kombination dieses Ergebnisses mit den Ergebnissen der Gelretardierungsassays mit den C-terminal verkürzten StrR-Derivaten zeigte (vgl. 3.8.1), daß das StrR-Protein mit der palindromen StrR-Bindestelle des *strB1p*-Operators als Tetramer interagiert. Bei Einsatz des halben Palindroms dieser StrR-Bindestelle band sowohl ein StrR-Tetramer als auch ein StrR-Dimer an das DNA-Fragment. Die C-terminal verkürzten StrR-Derivate M299 und M231 konnten offensichtlich sehr schlecht bzw. nicht mehr als tetramere Proteinkomplexe mit dem halben Palindrom der StrR-Bindestelle interagieren. Offensichtlich banden diese Proteine bei Einsatz von B1p/2 nur als dimere Komplexe und bei Einsatz von B1p als pseudo-tetramere Komplexe (Dimer + Dimer).



**Abb. 3.25: Berechnung der molekularen Massen von StrR/DNA-Komplexen.** Aufgetragen sind die  $R_f$ -Koeffizienten aus den nativen Gelelektrophoresen unterschiedlicher PAA-Konzentrationen gegen die Größen der verwendeten Standardproteine (vgl. Tab. 3-7). Die Kalibrierungsgerade (rot) wurde durch lineare Regression ermittelt und für die Berechnung der molekularen Massen der retardierten StrR/DNA-Komplexe I und II sowie des freien DNA-Fragmentes (blaue Punkte) verwendet. Die berechneten molekularen Massen sind angegeben (206, 155 und 72 kDa). Ebenfalls dargestellt ist ein Autoradiogramm eines Gelretardierungsassays von StrR am DNA-Fragment, B1p/2 (vgl. 3.8.1), und die abzüglich der ermittelten molekularen Masse für das freie DNA-Fragment berechneten molekularen Massen für StrR-Proteine der StrR/DNA-Komplexe I und II ( $(StrR)_4$ , 134 kDa und  $(StrR)_2$ , 83 kDa). Die theoretischen molekularen Massen für 4 und 2 StrR-Moleküle sowie für das eingesetzte DNA-Fragment sind in Klammern angegeben.

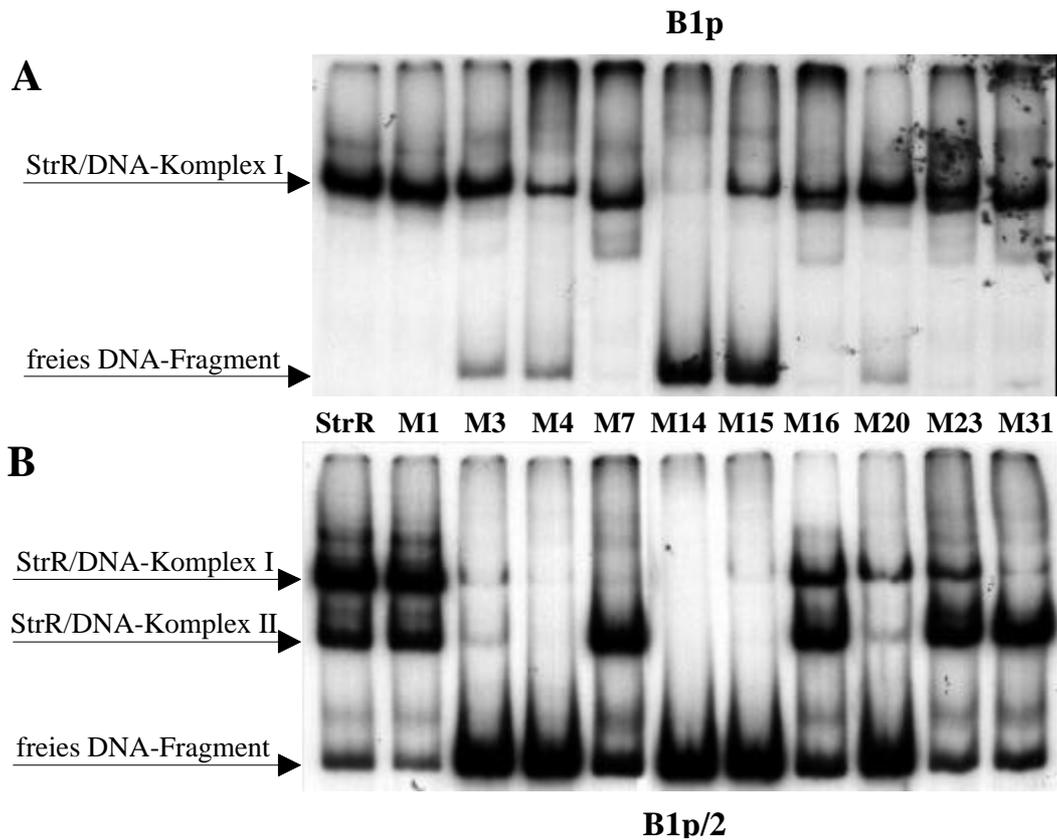
### 3.8.3 Untersuchungen zur Oligomerisierung von StrR-Protein-Mutanten

Zur Untersuchung der Oligomerisierung von StrR wurden auch die StrR-Mutanten eingesetzt, welche durch das Screening nach der ungerichteten Mutagenese identifiziert wurden (vgl. 3.4; Tab. 3-3). Zunächst wurden die mutierten *strR*\*-Gene aus den pSTW350\*-Plasmiden nach Hydrolyse mit *NdeI/HindIII* in pET11a kloniert und es entstanden die rekombinanten Plasmide der pETM-Serie (M1, M3, M4, M7, M14, M15, M16, M20, M23, M31). Die Zuordnung der Zahlen entspricht dabei der in Tab. 3-3 getroffenen Numerierung der StrR-Mutanten. Alle StrR-Mutanten wurden nach Transformation von *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS erfolgreich in löslicher Form produziert (Abb. 3.26).



**Abb. 3.26: Heterologe Produktion von StrR und StrR-Protein-Mutanten in *E. coli*.** Analyse einer SDS-PAA-Gelelektrophorese (12 % PAA) von induzierten *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS-Gesamtzellextrakten (75 µg Protein pro Spur, 120 min nach IPTG-Induktion). Folgende Proben wurden aufgetragen: (1) Molekulargewichtsstandard, Proteingrößen sind in kDa angegeben; (2) pET11a (Negativkontrolle); (3) pSTR11 (Wildtyp-StrR); (4) pETM1 (P123R); (5) pETM3 (T220I); (6) pETM4 (G148D); (7) pETM7 (D274A); (8) pETM14 (R208C; V224A); (9) pETM15 (R184Q); (10) pETM16 (V114G); (11) pETM20 (I177N); (12) pETM23 (V329A); (13) pETM31 (L271F).

Der Anteil an StrR-Mutanten-Proteinen in allen *E. coli*-Gesamtzellextrakten war gleich hoch und betrug ca. 20 % des *E. coli*-Gesamtproteins. Dieser prozentuale Anteil war vergleichbar mit dem vom Wildtyp-StrR, dessen Gen durch pSTR11 exprimiert wurde. Die Überprüfung der DNA-Bindeaktivitäten dieser StrR-Mutanten-Proteine wurde zunächst in Gelretardierungsassays mit dem 156 bp *EcoRI/BamHI* B1p-Fragment (vgl. 3.8.1) durchgeführt (Abb. 3.27 A). Alle Proteine, außer M14, besaßen noch DNA-Bindeaktivität. Die Qualität der DNA-Bindung war bei den Proteinen M1, M7, M16 und M23 vergleichbar mit der des Wildtyp-StrR-Proteins. Die Proteine M3, M4, M15, M20 und M31 besaßen dagegen eine geringere DNA-Bindeaktivität als das Wildtyp-StrR, was am größeren prozentualen Anteil des freien, nicht gebundenen DNA-Fragmentes zu erkennen war. Aufgrund der Laufhöhe der retardierten Fragmente und der Ergebnisse von 3.8.1 wurden die detektierten retardierten Banden dem StrR/DNA-Komplex I zugeordnet (vgl. Abb. 3.24).



**Abb. 3.27: Untersuchungen zur DNA-Bindung und Oligomerisierung von StrR-Protein-Mutanten.** Autoradiogramme der Gelretardierungsassays mit den induzierten *E. coli* BL21(DE3)/pLysS-Gesamtzell-extrakten von heterolog produzierten StrR-Mutanten-Proteine (je 50 µg Protein pro Assay) und radioaktiv markierten DNA-Fragmenten (ca. 3 ng DNA pro Assay). Folgende Proben wurden aufgetragen: StrR (Wildtyp-StrR); M1 (P123R); M3 (T220I); M4 (G148D); M7 (D274A); M14 (R208C; V224A); M15 (R184Q); M16 (V114G); M20 (I177N); M23 (V329A); M31 (L271F). **(A)** Fragment B1p aus pB1p (*EcoRI/BamHI*, 156 Basenpaare). **(B)** Fragment B1p/2 aus pB1p/2 (*EcoRI/HindIII*, 156 Basenpaare). Die retardierten StrR/DNA-Komplexe und die freien B1p- bzw. B1p/2-Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet. Retardierte DNA-Fragmente wurden als StrR/DNA-Komplex I und StrR/DNA-Komplex II bezeichnet.

Da bei Einsatz des B1p-Fragmentes zwar die DNA-Bindeaktivität, jedoch nicht die Oligomerisierung der StrR-Mutanten-Proteine überprüfbar war, wurden diese Proteine ebenfalls in Gelretardierungsassays mit dem Fragment B1p/2 eingesetzt (Abb. 3.27 B). Die Proteine M1, M16 und M23 besaßen im Vergleich mit Wildtyp-StrR die gleichen Eigenschaften. Es wurden retardierte Banden entsprechend StrR/DNA-Komplex I und II detektiert. Die Proteine M3, M4, M15 und M20, welche bei Einsatz des Fragmentes B1p bereits eine schwächere DNA-Bindeaktivität besaßen, retardierten das Fragment B1p/2 nicht mehr oder zum Teil nur in sehr geringen Mengen. Protein M7 bewirkte lediglich die Bildung von StrR/DNA-Komplex II. Bei Protein M31 wurde nur eine sehr schwache Ausbildung von StrR/DNA-Komplex I, aber eine starke Ausbildung von StrR/DNA-Komplex II detektiert.

## 4 Diskussion

StrR ist ein DNA-Bindeprotein und fungiert in *S. griseus* als Transkriptionsaktivator für Gene der SM-Biosynthese (Retzlaff und Distler, 1995). Auf der Basis dieses Wissens war es das Ziel dieser Arbeit, die Physiologie und Biochemie der Aktivierung von *str/sts*-Genen durch StrR näher zu untersuchen. Hauptsächlich galt es, die funktionellen Proteindomänen des StrR-Proteins zur DNA-Bindung, Oligomerisierung und Transkriptionsaktivierung zu finden und ihre Eigenschaften zu bestimmen. Im Zusammenhang mit dem Aufbau eines *in vitro* Transkriptionssystems sollte zusätzlich die wachstumsphysiologische Kinetik der StrR-Bildung und StrR-abhängigen StrB1-Aktivität in *S. griseus* aufgeklärt werden. Die folgenden Punkte verdeutlichen, auf welchen Wegen das angestrebte Ziel erreicht werden sollte:

### 1. Untersuchungen der physiologischen Eigenschaften von StrR und StrB1 in *S. griseus*:

- wurden im Zusammenhang mit dem Versuch des Aufbaus eines Systems zur Messung der *in vitro* Transkriptionsaktivierung durchgeführt.

### 2. Variation von StrR und Vergleich mit StrR-ähnlichen Proteinen durch:

- Aufbau eines Testsystems zum Screening von StrR-Protein-Mutanten nach ungerichteter Mutagenese.
- Erzeugung und Charakterisierung C-terminal verkürzter StrR-Proteine.
- gerichtete Mutagenese des postulierten HTH-Motivs und Untersuchung der *in vitro* DNA-Bindung und *in vivo* Transkriptionsaktivierung solcher StrR-HTH-Mutanten.
- Nutzbarmachung und Charakterisierung der StrR-ähnlichen Proteine HstR und SpcR.

### Die folgenden Meßsysteme zur Charakterisierung von Partialfunktionen des StrR-Proteins und seiner Mutanten sollten genutzt werden:

- *in vitro* DNA-Bindung: war bereits durch die Arbeiten von L. Retzlaff etabliert.
- *in vitro* Transkriptionsaktivierung: mußte neu aufgebaut.
- *in vivo* Transkriptionsaktivierung: quantitative Analyse wurde mit dem Aufbau des Testsystems zum Screening von StrR-Protein-Mutanten möglich.
- *in vitro* Oligomerisierung: wurde durch Variation des Meßsystems zur *in vitro* DNA-Bindung aufgebaut.

#### **4.1 Untersuchungen der physiologischen Eigenschaften von StrR und StrB1 in *S. griseus* und Versuch des Aufbaus eines StrR-abhängigen *in vitro* Transkriptionssystems**

Betrachtet man das Wachstumsverhalten der beiden in dieser Arbeit verwendeten *S. griseus* Stämme DSM40236 und N2-3-11 in TSB-Medium (komplexes Vollmedium), so erkennt man, daß beide Stämme ein nahezu identisches Wachstumsverhalten zeigen. Eine erste exponentielle Wachstumsphase wird nach etwa 4 h von der zweiten exponentiellen Wachstumsphase abgelöst und beide Kulturen gehen nach ca. 13 - 14 h in die stationäre Wachstumsphase über (vgl. Abb. 3.1). Damit korrelieren diese Werte mit dem von T. Neumann gefundenen Wachstumsverhalten derselben Stämme von *S. griseus* in TSB-Medium (Neumann, 1996). Dort endete die erste exponentielle Wachstumsphase nach 5 h, während die stationäre Wachstumsphase nach 12 h begann. Eine „decision-lag-Phase“, wie sie beim Wachstum von *S. griseus* in einem standardisierten Minimalmedium von Neumann beschrieben wurde, konnte jedoch in dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Möglicherweise war diese „decision-lag-Phase“, die durch ein kurzzeitig verlangsamtes Wachstum von *S. griseus* nach der ersten exponentiellen Wachstumsphase gekennzeichnet ist, unter den hier angewendeten Bedingungen zu kurz oder nicht signifikant ausgeprägt. Nach der Fermentation von *S. griseus* DSM40236 konnte jedoch generell die Zeitachse mit derjenigen der Wachstumskurve aus den Schüttelkolben-Experimenten bestätigt und präzisiert werden (vgl. Abb 3.1 und 3.3). Die stationäre Wachstumsphase beginnt schon nach 13 h, was deutlich am drastischen Abfall der CO<sub>2</sub>-Produktion und gleichzeitig beginnender Erhöhung der O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium zu diesem Zeitpunkt sichtbar war.

**Der SM-Überproduzent *S. griseus* N2-3-11 beginnt zu einem früheren Zeitpunkt mit der StrR-Bildung, erreicht insgesamt jedoch ein geringeres Expressionsniveau für StrR als *S. griseus* DSM40236.**

Die Produktion von StrR mittels 2D-Gelelektrophorese konnte bisher noch nicht zeitabhängig verfolgt werden, was wahrscheinlich aufgrund des relativ basischen pI (8,66) zurückzuführen war. In dieser Arbeit wurde die zeitabhängige Produktion von StrR in *S. griseus* deshalb

immunologisch verfolgt. Dabei ergaben sich zwischen den beiden in dieser Arbeit untersuchten Stämmen Unterschiede sowohl in der zeitlichen Abhängigkeit als auch in der Quantität des akkumulierten StrR-Proteins. In *S. griseus* DSM40236 wurden geringe Mengen an StrR erstmals zum Ende der vegetativen Wachstumsphase nach 11 h, das Maximum der StrR-Produktion jedoch erst während des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase nach 14 h detektiert (vgl. Abb. 3.2 A). Diese Kinetik der StrR-Produktion in *S. griseus* DSM40236 in TSB-Medium gleicht somit der Kinetik der Produktion des Transkriptionsaktivators RedD der Undecylprodigiosin-Biosynthese gene in *S. coelicolor* (Takano et al., 1992). Northern-Experimente von Takano zeigten, daß die mRNA von *redD* erstmals zum Zeitpunkt des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase detektiert werden konnte. Eine ganz andere Kinetik der Bildung von StrR wurde in *S. griseus* N2-3-11 beobachtet. Hier wurde das StrR-Protein schon früher, nämlich zu Beginn der zweiten exponentiellen Wachstumsphase nach 5 h beobachtet (s. Abb. 3.2 B). Es muß sich bei dieser relativ frühen StrR-Produktion um eine *de novo* StrR-Synthese handeln, da im Inokulum für die *S. griseus*-Hauptkultur nachweislich kein StrR-Protein detektierbar war. Die Menge an StrR stieg dann kontinuierlich an und erreichte ihren höchsten Wert ebenfalls nach 14 h. Jedoch wurde nur 66 % der StrR-Konzentration von *S. griseus* DSM40236 erreicht. Die Kinetik der StrR-Produktion entspricht in *S. griseus* N2-3-11 daher eher derjenigen des Transkriptionsaktivators der Actinorhodin-Biosynthese in *S. coelicolor*, ActII-ORFIV (Gramajo et al., 1993). Es wurden von diesen Autoren ebenfalls Northern-Experimente zur Detektion der mRNA von *actII-ORFIV* durchgeführt. Der Vorteil der in dieser Arbeit durchgeführten Western-Analysen für StrR bestand darin, daß die Möglichkeit zur vergleichenden Quantifizierung der gebildeten StrR-Proteinmengen in beiden *S. griseus*-Stämmen gegeben war. Um so erstaunlicher war es, daß der höchste StrR-Wert im *S. griseus* Wildstamm (DSM40236) gefunden wurde, da in diesem Stamm die Menge an produziertem SM geringer war als in *S. griseus* N2-3-11. Ein erster Befund von Aiba et al. (1985) bei der Entdeckung des *strR*-Gens war, daß die Menge (Aktivität) an StrR in direktem Zusammenhang mit der Menge an gebildeten SM stand. Dieser Befund unterstützte die Hypothese, daß die Konzentration von StrR in der Zelle in direktem Zusammenhang mit der Stärke der Aktivierung der SM-Biosynthesegene stehen sollte. Die im Verlauf dieser Arbeit gefundenen SM-Mengen standen aber in umgekehrtem Verhältnis zur StrR-Menge. *S. griseus* DSM40236 produzierte zwar mehr StrR, jedoch nur 76 % der SM-Menge von *S. griseus* N2-3-11. Allerdings muß in Betracht gezogen werden, daß hier StrR-Proteine von zwei verschiedenen *S. griseus*-Stämmen miteinander verglichen werden, während Aiba seine Beobachtungen nur in einem *S. griseus*-Stamm (ATCC 10237)

machte. Die StrR-Proteinsequenz von *S. griseus* DSM40236 sollte zwar mit derjenigen von Stamm N2-3-11 identisch sein (in überlappend und unabhängig bestimmten DNA-Sequenzen des *str/sts*-Genclusters aus verschiedenen *S. griseus* Stämmen besteht praktisch Identität), wurde aber nicht noch einmal durch Sequenzierung bestätigt. Einzelne As-Austausche könnten also auch noch für phänotypische Unterschiede in Frage kommen. Deshalb können die in dieser Arbeit gemessenen Effekte der zeitlich unterschiedlichen StrR-Produktionen und der nicht logischen Verhältnisse zwischen höchster StrR-Menge und SM-Produktion hier nur als Fakten aufgeführt und verglichen werden. Um einen direkten Vergleich dieser Daten zu ermöglichen, müßte zunächst das *strR*-Gen aus *S. griseus* DSM40236 nochmals separat kloniert und mit demjenigen von *S. griseus* N2-3-11 auf As-Identität geprüft werden. Bei Abweichung müßten die spezifischen Aktivitäten beider StrR-Proteine in einem geeigneten Meßsystem (z. B. *in vitro* Transkriptionssystem) bestimmt werden. Es gibt allerdings nicht nur Unterschiede, sondern auch Gemeinsamkeiten in der Physiologie der StrR-Produktion. So wurden die jeweiligen Höchstmengen an StrR-Proteinen in beiden *S. griseus*-Stämmen zum Zeitpunkt des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase gemessen. Außerdem konnte in beiden Stämmen nach einem Wachstum von 21 h kein StrR-Protein mehr gefunden werden, was auf den spezifischen Abbau von StrR in den *S. griseus*-Zellen durch Proteasen hindeutet.

**Ein sprunghafter Anstieg der StrB1-Aktivität erfolgt in beiden *S. griseus*-Stämmen zum gleichen Zeitpunkt, jedoch ist diese Aktivität in *S. griseus* N2-3-11 höher als in *S. griseus* DSM40236.**

Im Gegensatz zur im Zeitverlauf unterschiedlichen StrR-Produktion wurde ein sprunghafter Anstieg der StrB1-Aktivitäten in beiden untersuchten *S. griseus*-Stämmen zum gleichen Zeitpunkt während des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase nach 14 h beobachtet (vgl. Abb. 3.1). Dieser Zeitpunkt korrelierte exakt mit demjenigen der höchsten StrR-Mengen in beiden *S. griseus*-Stämmen. Die StrB1-Aktivitäten beider *S. griseus*-Stämme waren dann nach diesem Anstieg während des gesamten weiteren Wachstumsverlaufes nur geringfügig rückläufig. Im Gegensatz zu StrR scheint StrB1 keinem wesentlichen proteolytischen Abbau zu unterliegen und bleibt in enzymatisch aktiver Form in den *S. griseus*-Zellen bestehen. Deshalb werden auch die relativ geringen StrB1-Aktivitäten während der zweiten exponentiellen Wachstumsphase der Akkumulation von aktivem StrB1 im für die *S. griseus*-Hauptkultur verwendeten Inokulum zugeschrieben. Die relativen StrB1-Aktivitäten beider

*S. griseus*-Stämme entsprechen, im Gegensatz zu den gefundenen StrR-Mengen, zumindest in ihrer Tendenz den gefunden SM-Konzentrationen. So wurde im SM-Überproduzenten *S. griseus* N2-3-11 auch die höhere StrB1-Aktivität beobachtet. Ein direkter Vergleich der absoluten StrB1-Aktivitätswerte beider Stämme ist wiederum nicht möglich, da auch hier, wie im Falle von StrR, nur die StrB1-Proteinsequenz von *S. griseus* N2-3-11 bekannt ist.

Von Neumann et al. (1996) wurde bereits die Produktion der SM-Biosyntheseenzyme StrS, StsA und StsC in *S. griseus* N2-3-11 mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß das *strS*-Gen Bestandteil der selben StrR-abhängigen Transkriptionseinheit ist, die mit dem *strB1*-Gen beginnt. Das *stsA*-Gen befindet sich mit dem *stsB*-Gen auf einer Transkriptionseinheit, während das *stsC*-Gen eine eigenständige Transkriptionseinheit bildet (vgl. Abb. 1. 2). Die Produktion von StsC und StrS wurde in den Experimenten von T. Neumann bereits zu Beginn der zweiten exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen, während StsA erst während des Übergangs zur stationären Wachstumsphase beobachtet werden konnte. Von Ahlert et al. (1996) wurde durch „Promotor-Probe“-Experimente gezeigt, daß auch die Transkription von *stsC* und *stsB* direkt StrR-abhängig ist. Somit stellt sich im Falle des in dieser Arbeit untersuchten StrB1, dessen Transkription ebenfalls StrR-abhängig ist, im Gegensatz zu den von T. Neumann untersuchten Proteinen teilweise eine zeitlich veränderte Situation dar. Festzustellen ist, daß zwei direkt StrR-abhängige SM-Biosyntheseenzyme, StrB1 und StsC, in *S. griseus* N2-3-11 zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Wachstums nachgewiesen wurden. Allerdings wurde im Falle von StsC dessen Produktion und im Falle von StrB1 dessen Aktivität gemessen. Beide Meßmethoden lassen ein zeitliches Fenster zwischen der StrR-abhängigen Transkription der beiden Gene und der Messung ihrer Enzymaktivität zu. Da das StrR-Protein in *S. griseus* N2-3-11 sehr früh beobachtet wurde, könnte auch StrB1 bereits zum gleichen Zeitpunkt wie StsC gebildet werden, jedoch noch inaktiv sein. Northern-Untersuchungen der *strB1*-mRNA wurden bisher lediglich mit *S. griseus* N2-3-11-Kulturen aus der stationären Wachstumsphase durchgeführt (Distler et al., 1987b, 1990). Die in dieser Arbeit gefundenen StrB1-Aktivitäten in *S. griseus* N2-3-11 aus der stationären Wachstumsphase korrelieren somit zwar mit den von J. Distler beobachteten *strB1*-Transkripten, jedoch würde die Kenntnis der Bildungskinetik der *strB1*-mRNA die Interpretation der gefundenen Ergebnisse erleichtern. Eine posttranslationale Modifikation von StrB1 zur Aktivierung der enzymatischen Aktivität ist denkbar. So sind Serin/Threonin-Proteinkinasen auch in Streptomyceten weit verbreitet

(Waters et al., 1994). In *S. griseus* wurden insgesamt mindestens 31 phosphorylierte Proteine in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 10 und 120 kDa identifiziert (Neumann, 1996).

Eine Modulation der Aktivität von StrR, z. B. posttranslationale kovalente Proteinmodifikation, ist allerdings aufgrund der vorliegenden Daten ebenso denkbar wie die Notwendigkeit eines spezifischen  $\sigma$ -Faktors zur Erkennung des *strB1p*-Promoters. Diese beiden Möglichkeiten würden die zeitliche Diskrepanz zwischen dem ersten Auftauchen von StrR nach 5 h und dem Beginn der StrB1-Aktivität nach 14 h in *S. griseus* N2-3-11 erklären. Jedoch sprechen die Ergebnisse der frühen Detektion von StsC im selben Stamm (Neumann et al., 1996) zumindest gegen die Notwendigkeit der Aktivierung von StrR durch posttranslationale Modifikation. Eine solche Modifikation zur Aktivierung des StrR-Proteins müßte dann schon sehr früh erfolgen, was wiederum nicht die zeitliche Diskrepanz zwischen StrR-Produktion und StrB1-Aktivität erklärt. Andererseits könnte ein spezifischer  $\sigma$ -Faktor erst mit dem Eintritt von *S. griseus* in die stationäre Wachstumsphase verfügbar sein und damit die Transkription des *strB1*-Gens und die Aktivität von StrB1 zeitlich steuern. Die Gene dreier unterschiedlicher  $\sigma^{70}$ -Faktoren wurden bereits in einem anderen SM-produzierenden Stamm, *S. griseus* IMRU3570, und in dem A-Faktor unabhängigen SM-Produzenten *S. griseus* 2247 nachgewiesen (Marcos et al., 1995; Shinkawa et al., 1995b, 1996). Die abgeleiteten Proteine HrdB, HrdD und HrdT besitzen funktionelle Domänen, die dem *E. coli*  $\sigma^{70}$ -Faktor ähnlich sind. Der *strB1p*-Promotor wird aufgrund seiner Sequenzdaten (-10 und -35 Regionen) zu den „*E. coli*  $\sigma^{70}$ -like“ Promotoren gezählt (Distler et al., 1990; Strohl, 1992). Deshalb ist es auch naheliegend, daß ein zur  $\sigma^{70}$ -Familie gehörender  $\sigma$ -Faktor für die Erkennung des *strB1p*-Promotors verantwortlich ist. Allerdings sind Promotorspezifitäten, Regulationsverhalten und die Zahl weiterer  $\sigma$ -Faktoren in den untereinander eng verwandten *S. griseus*-SM-Produzenten noch völlig unbekannt. Für präzise Aussagen über die *strB1p*-Promotor/ $\sigma$ -Faktor-Beziehung müßte der zur Erkennung des *strB1p*-Promotors notwendige  $\sigma$ -Faktor auf direktem Wege bestimmt werden. Solche RNA-Polymerase-Rekonstitutionsexperimente wurden von Buttner et al. (1988, 1989) in Zusammenhang mit der Erkennung der *dagp1-p4*-Promotoren aus *S. coelicolor* (Buttner et al., 1987) durchgeführt. Als Folge dessen wurde herausgefunden, daß der Promotor *dagp4* vom Haupt- $\sigma^{\text{hrdB}}$ -Faktor (MW = 66 kDa), die Promotoren *dagp2* und *dagp3* von zwei weiteren, den sog. alternativen  $\sigma$ -Faktoren  $\sigma^{28}$  (MW = 28 kDa) und  $\sigma^{49}$  (MW = 49 kDa) erkannt werden.

---

**Ein Zusammenspiel zwischen RNA-Polymerase aus *S. griseus* DSM40236 und His-tag-StrR am *strB1p*-Promotor war *in vitro* nicht nachweisbar, obwohl beide Proteinkomponenten in aktiver Form angereichert wurden.**

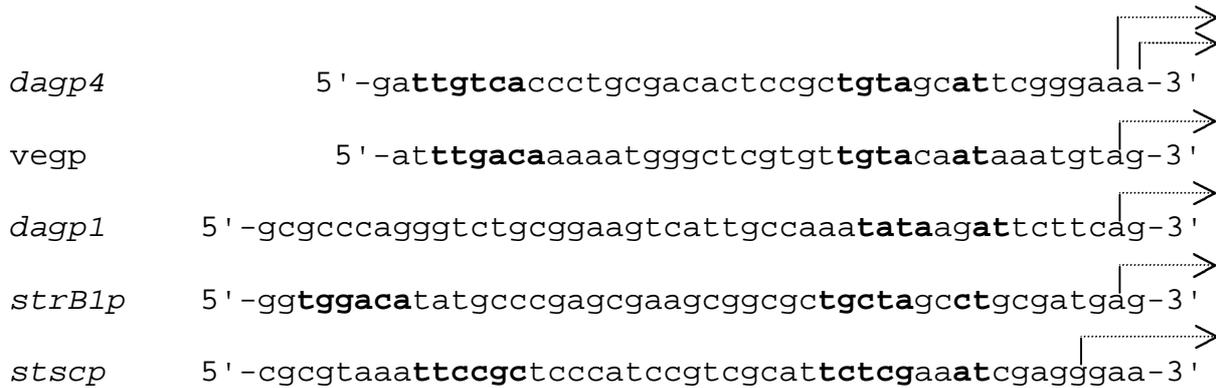
Mit der Isolierung von RNA-Polymerasen sowohl aus der exponentiellen als auch aus dem Beginn der stationären Wachstumsphase und dem Aufbau eines StrR-abhängigen *in vitro* Transkriptionssystems sollte zunächst gezeigt werden, daß allein StrR im Zusammenspiel mit RNA-Polymerase für die Aktivierung des *strB1p*-Promotors verantwortlich ist. Die Arbeiten von L. Retzlaff (1996) zeigten, daß eine gleichzeitige Anreicherung von StrR und RNA-Polymerase aus *S. griseus* nicht möglich ist. Deshalb wurde das StrR-Protein in dieser Arbeit nicht aus *S. griseus*, sondern in seiner His-tag-Version zunächst aus zellfreien *E. coli*-Extrakten angereichert und in StrR-abhängigen *in vitro* Transkriptionsassays eingesetzt. Es wurde früher bereits gezeigt (Retzlaff und Distler, 1995), daß die N-terminale His-tag-Verlängerung am StrR-Protein für dessen *in vitro* DNA-Bindeaktivität nicht störend ist. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, daß die gleiche His-tag-Version des StrR-Proteins auch *in vivo* transkriptionsaktivierend wirken kann (vgl. Abb. 3.9). Allerdings konnte letztlich *in vitro* das postulierte StrR-abhängige *strB1p*-Transkript nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.8). Es kann folglich nicht ausgeschlossen werden, daß der für die Erkennung des *strB1p*-Promotors verantwortliche  $\sigma$ -Faktor inaktiv bzw. nicht in den angereicherten RNA-Polymerase-Fractionen enthalten war, obwohl angereicherte *S. griseus*-RNA-Polymerasen aus zwei unterschiedlichen Wachstumsphasen an den verwendeten Testpromotoren (*dagp1-p1* und *dnaKp*) aktiv waren. In der abschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der angereicherten Proteine wurden die charakteristischen Proteinbanden des RNA-Polymerase-„core“-Enzyms  $\beta$ ,  $\beta'$  ( $M_r = 140 - 150$  kDa) und  $\alpha$  ( $M_r = 45$  kDa) gefunden (vgl. Abb. 3.4 B). Zusätzlich konnte die auf den Haupt- $\sigma^{\text{hrdB}}$ -Faktor ( $M_r = 66$  kDa) hinweisende Proteinbande detektiert werden. Die gleichen Proteinbanden wurden von Shinkawa et al. (1995) nach der Anreicherung von RNA-Polymerase aus *S. griseus* 108-11 gefunden. Daß es sich dort bei der Proteinbande von  $M_r = 66$  kDa um den Haupt- $\sigma^{\text{hrdB}}$ -Faktor handelte, konnte durch die Western-Analyse mit *S. coelicolor*- $\sigma^{\text{hrdB}}$ -Antiserum nachgewiesen. Deshalb wurde bei der in dieser Arbeit identifizierten Proteinbande der gleichen Größe ebenfalls davon ausgegangen, daß es sich um  $\sigma^{\text{hrdB}}$  handelte. Die Gene für die  $\sigma$ -Faktoren aus *S. griseus* 2247,  $\sigma^{\text{hrdA}}$  und  $\sigma^{\text{hrdD}}$ , wurden ebenfalls bereits kloniert (Shinkawa et al., 1996). Die resultierenden Proteine besitzen molekulare Massen von MW = 40,5 kDa (HrdA) und MW = 37,2 kDa (HrdD).

Proteine ähnlicher Größen wurden auch bei den hier beschriebenen Versuchen gefunden (vgl. Abb. 3.4). Es konnte sich jedoch hierbei auch um degradierte Proteine mit ursprünglich größerer molekularer Masse handeln. Das Vorhandensein mehrerer  $\sigma$ -Faktoren mit unterschiedlicher Erkennungsspezifität in der in dieser Arbeit benutzten RNA-Polymerase-Präparation wurde jedoch durch die *in vitro* Transkriptionsassays mit dem *dagp1-p4*-Fragment bestätigt. Hier konnten, im Unterschied zu den Ergebnissen von Retzlaff (1996), spezifische Transkripte von allen vier *dagp*-Promotoren nachgewiesen werden. Mindestens drei verschiedene  $\sigma$ -Faktoren sind an der Erkennung der *dagp*-Promotoren beteiligt (Buttner et al., 1988). Der *dagp4*-Promotor wurde, wie bereits für *S. coelicolor*-RNA-Polymerase von Buttner gezeigt, auch in den Arbeiten von Shinkawa et al. (1995) vom *S. griseus*- $\sigma^{\text{hrdB}}$ -Faktor erkannt. Shinkawa konnte zusätzlich zeigen, daß der *S. griseus*- $\sigma^{\text{hrdB}}$ -Faktor auch den *dagp1*-Promotor erkennt. Deshalb sollte das in dieser Arbeit nachgewiesene spezifische Transkript von *dagp1* ebenfalls durch  $\sigma^{\text{hrdB}}$  verursacht worden sein. Daraus läßt sich schließen, daß für die Erkennung der beiden Promotoren *dagp2* und *dagp3* in der verwendeten RNA-Polymerase-Präparation mindestens zwei weitere  $\sigma$ -Faktoren vorhanden waren. Allerdings ist das Vorhandensein der für die Erkennung der *dagp*-Promotoren verantwortlichen  $\sigma$ -Faktoren kein verlässlicher Anhaltspunkt für das gleichzeitige Vorhandensein des für die Erkennung des *strB1p*-Promotors verantwortlichen  $\sigma$ -Faktors in aktiver Form.

Als zusätzliche Absicherung der Anreicherung von aktivem  $\sigma^{\text{hrdB}}$ -Faktor wurden *in vitro* Transkriptionsassays mit dem *dnaKp*-Fragment durchgeführt und mit denen einer RNA-Polymerase-Präparation aus *S. coelicolor* verglichen. Die Kombination *dnaKp/S. coelicolor*-RNA-Polymerase wurde bereits erfolgreich angewendet (Bucca et al., 1997). Im Vergleich zu den *in vitro* Transkriptionsassays mit den *S. griseus*-RNA-Polymerase-Präparationen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. RNA-Polymerasen aus beiden Stämmen lieferten das gleiche spezifische Transkript in vergleichbarer Ausbeute (vgl. Abb. 3.5). Andererseits lieferten *S. coelicolor*-RNA-Polymerasen auch kein spezifisches StrR-abhängiges Transkript vom *strB1p*-Promotor.

Insgesamt ist es jedoch nur selten möglich, aufgrund von Promotorstrukturen Rückschlüsse auf benötigte  $\sigma$ -Faktoren zu bekommen. Insbesondere die  $\sigma^{\text{hrdB}}$ -Spezifität ist in Streptomycceten noch zu schwach definiert. So wurde zwar von Brown et al. (1992) aufgrund der identischen Bereiche zwischen dem *dagp4*-Promotor aus *S. coelicolor* und dem *vegP*-Promotor aus *Bacillus subtilis* die Möglichkeit der Voraussage von Promotoren mit  $\sigma^{\text{hrdB}}$ -

Spezifität postuliert und in diesem Falle auch *in vitro* nachgewiesen. Jedoch kann dieses Postulat aufgrund der großen Heterogenität von Streptomyceten-Promotoren nicht ohne weiteres auf *dagp1* oder *strB1p* angewendet werden. Als Beispiel für die Varianz von Promotorstrukturen in Streptomyceten seien hier die Promotoren von *dagp4*, *dagp1*, *vegp*, *strB1p* und *stsCp* in Abb. 4.1 gegenübergestellt:



**Abb. 4.1: Vergleich von Promotorstrukturen.** Dargestellt sind die Promotoren von *dagp4* und *dagp1* aus *S. coelicolor* A3(2) (Buttner et al., 1987), *vegp* aus *Bacillus subtilis* (Brown et al., 1992) sowie *strB1p* (Retzlaff und Distler, 1995) und *stsCp* (Ahlert et al., 1997) aus *S. griseus* N2-3-11. Die -10 und -35 Regionen sind fett dargestellt und die experimentell ermittelten Transkriptionsstartpunkte durch Pfeile gekennzeichnet.

Zusammenfassend in Bezug auf die Anreicherung von RNA-Polymerasen aus *S. griseus* kann jedoch festgestellt werden, daß diese erfolgreich und aktiv angereichert werden konnten und daß die *in vitro* Transkriptionsassays an den konstitutiven (*dagp1-p4*) bzw. reprimierten (*dnaKp*) Promotoren die gleichen positiven Ergebnisse brachten wie vergleichende *in vitro* Transkriptionsassays mit RNA-Polymerasen von *S. coelicolor*.

Eine mögliche Erklärung für die *in vitro* nicht nachweisbaren spezifischen StrR-abhängigen Transkripte am *strB1p*-Promotor könnte auch im StrR-Protein begründet sein. Zwar wirkte die His-tag-Version von StrR in *S. lividans in vivo* transkriptionsaktivierend, jedoch wurde das für die *in vitro* Transkriptionsassays verwendete His-tag-StrR aus *E. coli* angereichert. Nach der erfolgreichen denaturierenden Anreicherung des His-tag-StrR-Proteins wurde dieses mittels molekularer Chaperone „refolded“ (rHis-tag-StrR). Die Überprüfung der Rückgewinnung seiner Aktivität erfolgte dabei allerdings stets nur mittels DNA-Bindetests, die jedoch positiv waren. Da sich die Pufferbedingungen für die *in vitro* Transkriptionsassays und *in vitro* DNA-Bindetests unterschieden, wurde zusätzlich ein optimierter Puffer

zusammengestellt, in welchem sowohl die angereicherten RNA-Polymerase-Präparationen spezifische Transkripte lieferten (vgl. Abb. 3.5) und auch rHis-tag-StrR DNA-Bindeaktivität besaß (vgl. Abb. 3.7). Der Vergleich der DNA-Bindeaktivität ergab sogar einen erhöhten Anteil an retardiertem *strB1p*-Fragment in dem modifizierten Puffersystem. Somit waren für die StrR-abhängigen *in vitro* Transkriptionsassays die Versuchsbedingungen für ein positives Ergebnis geschaffen. Jedoch konnte auch dann kein spezifisches, StrR-abhängiges *strB1p*-Transkript gefunden werden. Da das verwendete rHis-tag-StrR aus *E. coli* kam, wurde anschließend versucht, dieses aus *S. lividans* anzureichern. Früher erzielte Ergebnisse (Retzlaff und Distler, 1995) zeigten zwar, daß His-tag-StrR aus *E. coli* noch DNA-bindende Aktivität besaß, jedoch konnte bisher ein *in vivo* System zur Transkriptionsaktivierung in *E. coli* nicht etabliert werden. Der Nachweis steht noch aus, daß *E. coli*-(His-tag-)StrR auch transkriptionsaktivierend wirken kann. Eine spezifische posttranslationale Modifikation des StrR-Proteins in *E. coli* scheint jedoch nicht wahrscheinlich. Wenn eine solche Modifikation zur Aktivierung von StrR stattfinden muß, so findet diese aufgrund der positiven *in vivo* Ergebnisse zur Transkriptionsaktivierung jedoch auch in *S. lividans* statt (vgl. Abb. 3.9). Da *S. lividans* verwandtschaftlich wesentlich näher zum StrR-Wirt *S. griseus* steht als *E. coli*, könnten in *S. lividans* die notwendigen StrR-modifizierenden Faktoren vorhanden sein. Als Beispiel für die Notwendigkeit einer posttranslationalen Modifikation zur Differenzierung zwischen DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung sei hier der Transkriptionsaktivator NtrC aus *E. coli* genannt. Die Abhängigkeit der biologischen Aktivität des NtrC-Proteins von einer posttranslationalen Phosphorylierung wurde von Wyman et al. (1997) beschrieben. Das nicht phosphorylierte NtrC-Protein bindet zwar als Tetramer an seine Bindestelle, aber es kann nicht mehr die Transkription des stromabwärts gelegenen Promotors aktivieren. Die phosphorylierte Form von NtrC kann jedoch durch DNA-Bindung und zusätzliche Wechselwirkung mit einem weiteren, nicht an die DNA gebundenen NtrC-Tetramer mit der RNA-Polymerase über ein DNA-„looping“ wechselwirken und die Transkription aktivieren. Ein solcher oder ähnlicher Mechanismus könnte aufgrund der bisherigen Ergebnisse für das StrR-Protein in Betracht gezogen werden. Die Tatsache allerdings, daß in *S. lividans* produziertes und denaturierend gereinigtes His-tag-StrR durch das anschließende „refolding“ kaum DNA-Bindeaktivität zeigte (vgl. Abb. 3.10 B), macht die Interpretation der *in vitro* Transkriptionsassays mit dem *strB1p*-Promotor und *S. lividans*-rHis-tag-StrR schwierig. Es kann zum gegenwärtigen Erkenntnisstand nicht beurteilt werden, ob die Menge an reaktiviertem *S. lividans*-His-tag-StrR für die durchgeführten *in vitro* Transkriptionsassays ausreichend für ein spezifisches StrR-abhängiges Transkript war. Wenn die Hypothese der

Notwendigkeit einer posttranslationalen Modifikation von StrR richtig ist, sollten Versuche mit höheren Mengen an aktivem *S. lividans*-His-tag-StrR zu einem positiven Ergebnis führen. Sollten auch diese Experimente nicht das gewünschte StrR-abhängige spezifische *strB1p*-Transkript liefern, muß die Diskussion über mögliche Ursachen auf dem Gebiet der Notwendigkeit von niedermolekularen Aktivatorsubstanzen oder zusätzlichen Proteinen geführt werden. In *E. coli* werden einige Transkriptionsaktivatoren (z. B. NifA) nur im Zusammenspiel mit einem zusätzlichen, als „integration host factor“ (IHF) bezeichneten Protein aktiv (Weiß et al., 1992). Dieser IHF wirkt als Mediator zwischen Transkriptionsaktivator und RNA-Polymerase und ist für die transkriptionsaktivierende Funktion von NifA essentiell.

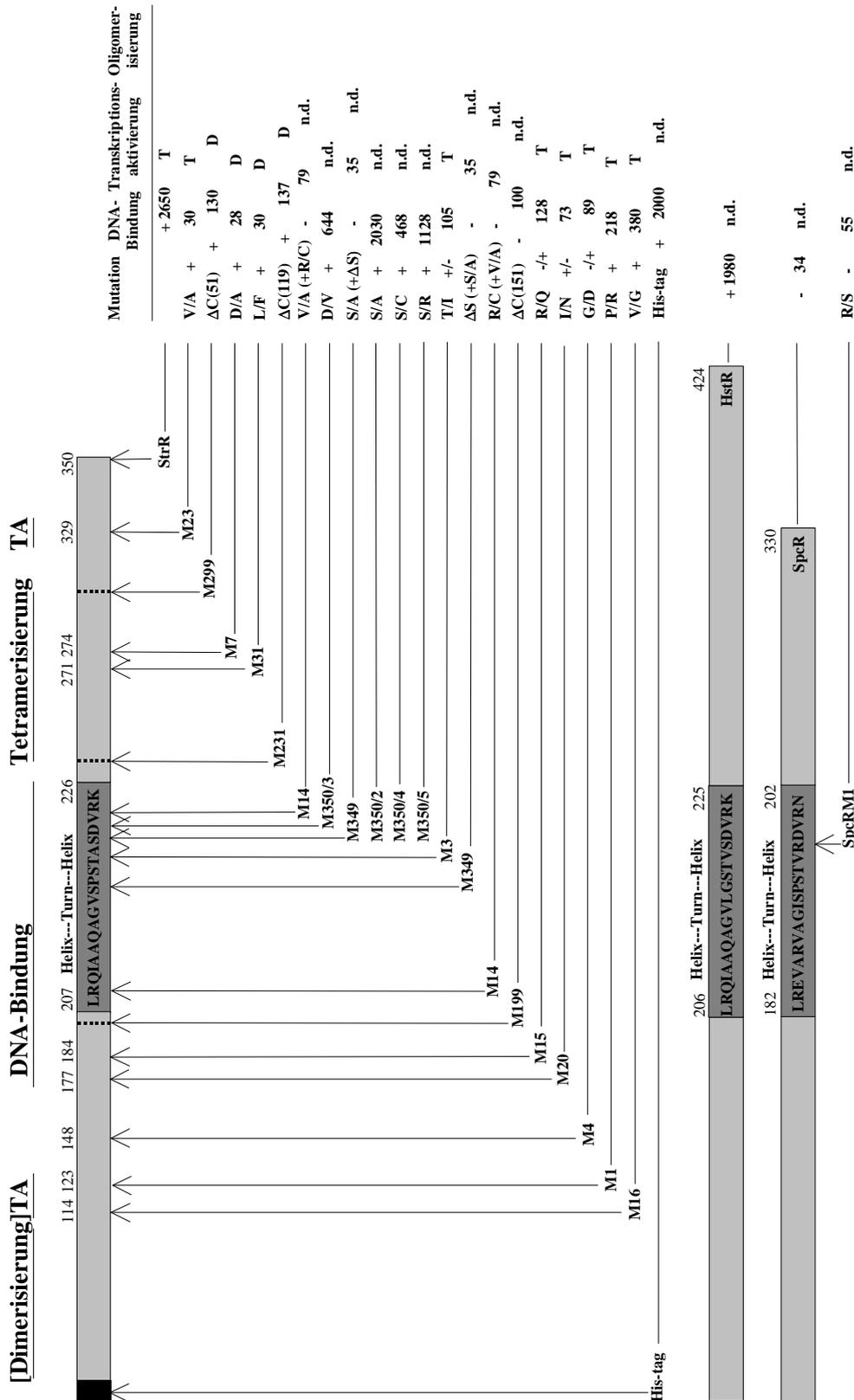
## 4.2 Variation von StrR und Vergleich mit StrR-ähnlichen Proteinen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze zum Studium der funktionellen Topographie des StrR-Proteins und seiner Varianten benutzt. Dafür wurden einerseits StrR-Protein-Mutanten durch gerichtete und ungerichtete Mutagenese erzeugt, andererseits die StrR-ähnlichen Proteine HstR und SpcR nutzbar gemacht und charakterisiert. Die erzielten Ergebnisse sind in Abb. 4.2 zusammengefaßt und werden im folgenden diskutiert.

### **Der C-Terminus von StrR wird für die DNA-Bindung nicht benötigt.**

Das von L. Retzlaff postulierte HTH-Motiv und der Nachweis der DNA-Bindung über Gelretardierungsassays und DNaseI-footprints (Retzlaff und Distler, 1995) gaben bisher die einzigen Hinweise auf eine mögliche Domänenstruktur des StrR-Proteins. Aufgrund der zentralen Lage des HTH-Motivs im StrR-Protein ließ sich eine grobe Einteilung von StrR in N-Terminus (As 1-206), HTH-Motiv (As 207-226) und C-Terminus (As 227-350) vornehmen (vgl. Abb. 3.14). Bisher fehlte jedoch der Beweis, daß die As des HTH-Motivs tatsächlich für die sequenzspezifische DNA-Bindung von StrR notwendig und verantwortlich sind. Deshalb wurde der C-Terminus des StrR-Proteins sukzessive deletiert, so daß die C-terminal verkürzten StrR-Proteine mit Deletionen von 51 As (M299), 119 As (M231) und 151 As

(M199) entstanden. Die Eigenschaften dieser Proteine im Hinblick auf DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung wurden untersucht.



**Abb. 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse mit Varianten des StrR-Proteins.** Die Proteine StrR, HstR und SpcR sind schematisch dargestellt. Wichtige As sind numeriert, die As-Sequenz der HTH-Motive sind angegeben. Die erzielten Ergebnisse im Hinblick auf Transkriptionsaktivierung, DNA-Bindung und Oligomerisierung sind gezeigt. Das StrR-Protein wurde in seine charakteristischen Bereiche eingeteilt. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: TA, Transkriptionsaktivierung; ΔC, C-terminal verkürzte Deletionsmutanten, das Deletionsende ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet; T, Ausbildung von tetrameren StrR/DNA-Komplexen wurde beobachtet; D, lediglich dimere StrR/DNA-Komplexe wurden beobachtet; +, das Protein besitzt eine zum Wildtyp-StrR vergleichbare DNA-Bindeaktivität; +/-, das Protein tendiert zu guter DNA-Bindeaktivität; -/+ , das Protein tendiert zu schlechter DNA-Bindeaktivität; n.d., nicht detektiert oder nicht detektierbar.

Wird das StrR-Protein um 51 bzw. 119 As gekürzt, so bleibt die sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität für die palindrome StrR-Bindestelle erhalten. Offensichtlich wird der C-Terminus von StrR nicht zur eigentlichen DNA-Bindung benötigt. Das HTH-Motiv scheint daher in seiner Tertiärstruktur ausgebildet zu werden und funktionsfähig zu sein, da die StrR-Proteine M299 und M231 an *strB1p*-Operatorfragment binden. Das C-terminal verkürzte StrR-Protein M199, bei dem durch die Deletion von 151 As sowohl der C-Terminus als auch das HTH-Motiv fehlen, zeigt wie erwartet keine DNA-Bindeaktivität mehr. Die Interpretation dieser Ergebnisse läßt den Schluß zu, daß die Region, welche für die DNA-Bindung von StrR verantwortlich ist, zwischen As 199 und 231 lokalisiert sein muß. Da innerhalb dieser Region das postulierte HTH-Motiv gelegen ist, wurde damit seine Funktion als DNA-Bindedomäne sehr wahrscheinlich gemacht. Desweiteren kann man aus den erhaltenen Ergebnissen schließen, daß ein Fehlen der C-terminal von Position 231 gelegenen As keinen signifikanten Einfluß auf die Sequenzspezifität der DNA-Bindung von StrR hat. Offensichtlich sind die C-terminal verkürzten StrR-Proteine mit HTH-Motiv (M299, M231) noch in der Lage, ihre räumliche Struktur dergestalt auszubilden, daß eine Interaktion mit der DNA stattfinden kann. Ein solcher Effekt wurde auch schon mit dem im N-Terminus des Lac-Repressors gelegenen HTH-Motiv festgestellt. Ein Peptid der Länge von nur 51 bzw. 59 As war noch immer in der Lage, sequenzspezifisch an den *lac*-Operator zu binden (Sadler et al., 1983). Das HTH-Motiv des Lac-Repressors bildet demzufolge eine eigenständige Struktureinheit und kann abgekoppelt vom gesamten restlichen Protein seine Funktion als DNA-Bindedomäne erfüllen. Ein solch abgekoppeltes HTH-Motiv bindet als Monomer an die DNA, währenddessen der gesamte Lac-Repressor als Tetramer an seine Operatorsequenz bindet. Eine Abkopplung des StrR-HTH-Motivs vom restlichen Protein könnte ebenso möglich sein und würde dessen vollständige strukturelle Unabhängigkeit beweisen. Interessant in diesem Zusammenhang wären zunächst Experimente mit N-terminal verkürzten StrR-Proteinen. Durch deren Einsatz in Gelretardierungsassays könnte abgeklärt werden, ob Bereiche im N-Terminus von StrR wichtig für dessen DNA-Bindeaktivität sind. Ausgehend von der Erkenntnis, daß das HTH-Motiv für die spezifische Interaktion mit der DNA verantwortlich ist, würde man durch den Vergleich der C-terminal und N-terminal verkürzten StrR-Proteine auch herausfinden, welche Proteinbereiche für die Stabilisierung des HTH-Motivs mit verantwortlich sind. Allerdings ist im Hinblick auf die Ergebnisse der Experimente zur Oligomerisierung (s. dort) zu beachten, daß eine alleinige Interpretation solcher durch Verkürzungsproteine hervorgerufenen DNA-Bindeeffekte nicht möglich ist. Zusätzliche Experimente zur Oligomerisierung von N-terminal verkürzten StrR-Proteinen müßten ebenso durchgeführt werden. Diese sind

allerdings nur durchführbar, wenn solche N-terminal verkürzten StrR-Proteine noch in der Lage wären, an die DNA zu binden. Ansonsten müßte man sich anderer Methoden zur Strukturaufklärung, wie z. B. der Elektronenmikroskopie oder Röntgenstrukturanalyse, bedienen. Allerdings setzen diese Methoden die Reinigung des zu untersuchenden Proteins voraus. Wie jedoch die Ergebnisse von Retzlaff (1996) zeigten, führte die Reinigung des nativen StrR-Proteins zum Verlust der DNA-Bindeaktivität. Eigene Versuche zur Reinigung von StrR (Daten nicht gezeigt) führten zusätzlich zur Erkenntnis, daß der größte Teil von in *E. coli* heterolog produziertem StrR in inaktiver Form als Proteinkomplex einer molekularen Masse von  $M_r > 6 \cdot 10^6$  vorlag. Nur ein verhältnismäßig geringer Anteil von StrR liegt in Lösung als tetramerer und dimerer StrR-Proteinkomplex vor und zeigt DNA-Bindeaktivität. Zur erfolgreichen Reinigung von StrR bedarf es zukünftig somit als ersten Schritt der Abtrennung von inaktivem StrR, z. B. mittels Gelfiltration oder Ultrazentrifugation.

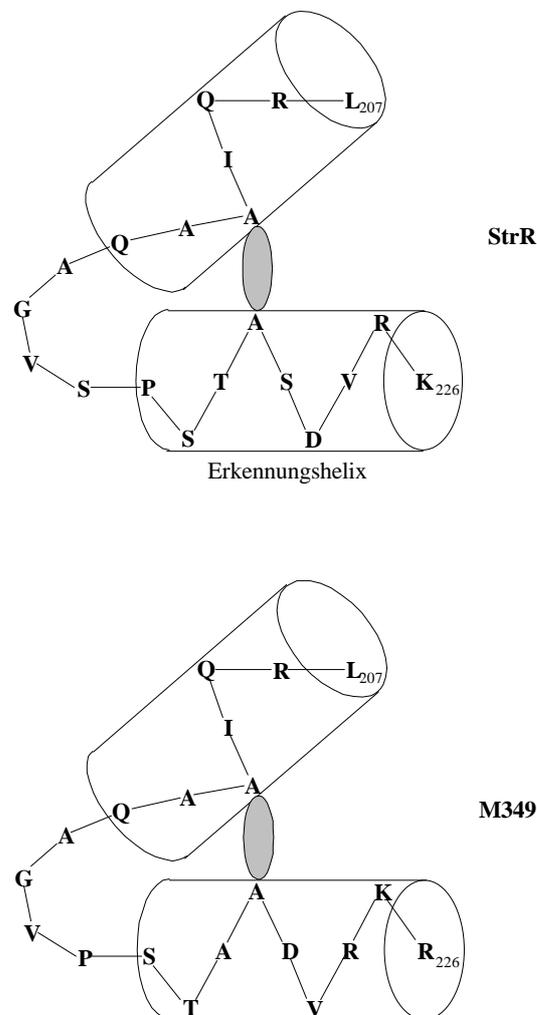
#### **Die Deletion einer As innerhalb des HTH-Motivs von StrR führt zum Verlust der DNA-Bindeaktivität.**

Das HTH-Motiv von StrR genügt den sterischen Voraussetzungen nach Shestopalov (Shestopalov, 1988) und dem „AAC-score“ nach Brennan und Mathews (0,79; Brennan und Mathews, 1989) sowie dem „Dodd-Egan-score“ (4,45; Dodd und Egan, 1990). Durch die Arbeiten von Ptashne (1992) an den zwei HTH-Repressorproteinen des Phagen  $\lambda$ ,  $\lambda$ -Repressor und Cro, wurde das Phänomen der DNA-Bindung durch HTH-Motive detailliert untersucht. HTH-Motive bestehen im wesentlichen aus zwei in bestimmter Weise gefalteten  $\alpha$ -Helices. Beide Helices stehen in einem Winkel von  $120^\circ$  zueinander (Yura et al., 1993). Das HTH-Strukturmotiv wird zusätzlich durch As-Wechselwirkungen mit einer dritten Helix stabilisiert. Diese dritte Helix kann dabei durch direkt benachbarte As ( $\lambda$ -Cro) oder auch durch weiter entfernte As (CAP) ausgebildet werden (Steitz et al., 1982). Das HTH-Modell von Ptashne besagt, daß innerhalb der beiden Helices des HTH-Motivs an den Positionen 4, 5, 15 und 18 hydrophobe As positioniert sein müssen, um durch Wechselwirkungen der hydrophoben Seitenketten der As das HTH-Strukturmotiv aufbauen zu können. Im Turn, welcher beide Helices miteinander verbindet, befinden sich meist hydrophobe und kleine As. Von dieser Regel gibt es aber auch eine Reihe von Ausnahmen (Pabo und Sauer, 1992). Im Falle von StrR treffen die genannten Bedingungen zur Ausbildung eines HTH-Motivs

vollständig zu, so daß das von Ptashne aufgestellte Modell zur Erklärung der StrR-HTH-Mutanten dienen kann (Abb. 4.3). Übertragen auf dieses Modell bilden im StrR-Protein die As zwischen den Positionen 207 bis 213 die erste Helix. Die As zwischen den Positionen 214 bis 217 bilden den Turn und die As zwischen den Positionen 218 bis 226 bilden die zweite, sogenannte Erkennungshelix (vgl. Abb. 4.3; StrR). Die Voraussetzungen nach Ptashne zum Aufbau des HTH-Motivs im StrR-Protein sind durch die hydrophoben As I210, A211, A221 und V224 gegeben. Im Turn von StrR befinden sich A214, G215 und V216. Die Stabilisierung des HTH-Motivs wird bei StrR in Anlehnung an das Modell von Ptashne vor allem durch die Seitenketten der As A211 und A221 bewirkt. Die hydrophobe Wechselwirkung der Methyl-Seitengruppen dieser As ist in Abb. 4.3 grau symbolisiert. Die spezifische Wechselwirkung mit der DNA-Operatorsequenz erfolgt nach dem Modell in der Erkennungshelix vor allem durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen hydrophilen As und den Nukleotidbasen der DNA-Operatorsequenz. Hier spielt die Varianz dieser As eine besondere Rolle bei der Spezifität der Erkennung der jeweiligen Bindestellen des charakteristischen Proteins (Harrison und Agarwal, 1990). Es gibt jedoch keine Festlegung, welche der hydrophilen As mit welchem Basenpaar der DNA-Operatorsequenz interagiert. Hinzu kommt die Tatsache, daß es zusätzlich noch Kontakte zum Phosphat-Grundgerüst der DNA und auch hydrophobe Wechselwirkungen an der Protein/DNA-Bindung beteiligt sein können. Zumindest die Wechselwirkung mit dem Phosphat-Grundgerüst der DNA sollte jedoch nicht sequenzspezifisch sein und somit lediglich eine Bindungs-verstärkende Rolle zwischen Protein und DNA spielen. Insgesamt findet die Protein/DNA-Wechselwirkung in der großen Furche der als B-DNA vorliegenden Operatorsequenz statt (Pabo und Sauer, 1992). Im Falle von StrR kommen demnach für eine spezifische StrR/DNA-Wechselwirkung die As S219, T220, S222, D223, R225 und K226 in Frage. Diese As-Positionen sind es auch, die nach dem Modell von Ptashne der DNA zugewandt sind.

Die StrR-HTH-Mutante M349 ( $\Delta$ S217, S222A) zeigte keine DNA-Bindeaktivität mehr. Die Ursache dafür ist mit Hilfe des Modells von Ptashne leicht zu erklären (vgl. Abb. 4.3; M349). Die fehlende As S217 bewirkt wahrscheinlich eine Änderung der Topographie des Turns und vermutlich auch eine Verschiebung der Positionierung aller folgenden As innerhalb der Erkennungshelix. Das HTH-Strukturprinzip könnte zwar aufgrund der zusätzlichen Mutation von S222A aufrechterhalten werden, da dadurch eine Alanin/Alanin-Wechselwirkung zwischen den beiden Helices weiterhin möglich sein könnte. Jedoch ist die Positionierung der hydrophilen As innerhalb der Erkennungshelix jeweils um eine As in Richtung N-Terminus

verschoben. Dies führt zur Nichterkennung der *strB1p*-Operatorsequenz, da die Spezifität der Sequenzerkennung unter diesen Umständen offensichtlich nicht mehr gegeben ist. Daß die Verschiebung der As P218 (StrR) in den Turn von M349 (neue Position = 217) einen negativen Effekt in Bezug auf die Ausbildung des HTH-Strukturprinzips hat, ist eher unwahrscheinlich. Es wurden bereits mehrere HTH-Proteine beschrieben, welche ein Prolin an dieser Position besitzen (Dodd und Egan, 1990). Die Frage, ob das HTH-Motiv in M349 noch immer ausgebildet werden kann, würde durch die folgenden Mutationen („second-site-Revertanten“) in M349 beantwortet werden können: T219S, A220T, D222S, V223D, K225R, R226K. Das sukzessive Einfügen solcher Austausche sollte veränderte, von M349 abgeleitete StrR-Proteine hervorbringen, welche wieder sequenzspezifisch mit der *strB1p*-Operatorsequenz interagieren können.



**Abb 4.3: HTH-Motive von StrR und M349 als Modell (nach Ptashne, 1992).** Dargestellt sind jeweils die As-Positionen 207 - 226 beider Proteine. Weitere Erklärungen sind im Text enthalten.

Mit Hilfe der StrR-HTH-Punktmutationen S222A, S222C, S222R und D223A wurden zunächst ebenfalls Experimente zur DNA-Bindeaktivität durchgeführt. Hier wurden jedoch beim Vergleich mit dem Wildtyp-StrR keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Bindeaktivität beobachtet (vgl. Abb. 3.17). Lediglich bei Einsatz von M350/4 (S222C) wurde eine zusätzliche retardierte Bande beobachtet. Allerdings wurde bei diesen Experimenten mit einem erheblichen Überschuss des jeweiligen Proteins im Verhältnis zur eingesetzten DNA-Menge gearbeitet. Deshalb war diese semiquantitative Methode nicht geeignet, um kleinere Effekte in Hinblick auf DNA-Bindeaktivität erkennen zu können. Unterschiede in der Xyle-Aktivität als Maß für die Transkriptionsaktivierung in *S. lividans*/pSTW13.2i-Doppeltransformanten zeigten jedoch, daß die eingefügten As-Austausche einen Einfluß auf die Aktivität dieser Proteine hatten. Diese StrR-HTH-Mutanten besaßen lediglich zwischen 25 und 76 % der Xyle-Aktivität des Wildtyp-StrR-Proteins. Die biologischen Aktivitäten dieser StrR-HTH-Mutanten sind insgesamt heterogen und lassen sich schwer in ein Gesamtbild einordnen. Es ist zwar interpretierbar, daß M350/3 (D223A) eine geringere biologische Aktivität besitzt als M350/2 (S222A). Dies könnte bedeuten, daß D223 stärker an der DNA-Bindung beteiligt ist als S222. Allerdings sind relativ dazu die Phänotypen der S222C- und S222R-Mutanten widersprüchlich. Die relativ geringe Veränderung der Seitenkette in M350/4 (S222C) bewirkt eine wesentlich geringere biologische Aktivität als die Einführung der sterisch wesentlich anspruchsvolleren Seitenkette in M350/5 (S222R). Im Fall der S222R-Mutante erstaunt eher, daß noch eine Aktivität *in vivo* und *in vitro* sichtbar war und daß nicht, wie zu erwarten war, eine sterische Hinderung der Proteinfaltung oder der Protein/DNA-Interaktion auftrat. Dies deutet eher auf eine geringe Bedeutung des S222-Restes für die Proteinfaltung und DNA-Bindung im Bereich des HTH-Motivs von StrR hin. Ein direkter Zusammenhang zwischen Veränderung des HTH-Motivs und Verringerung der DNA-Bindeaktivität könnte durch Titrationsexperimente mit den gereinigten Protein-Mutanten verifiziert werden. Die Bestimmung der jeweiligen DNA-Bindungskonstanten dieser Proteine und der Vergleich mit der DNA-Bindungskonstanten des Wildtyp-StrR-Proteins wären u. a. sinnvolle Ergänzungen zu den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Die aus der ungerichteten Mutagenese von *strR* hervorgegangenen Mutanten M3, M14, M15 und M20 lassen sich ebenfalls in das HTH-Modell einordnen. Alle diese Proteine zeigen eine signifikant reduzierte (M3, M15, M20) oder vollständig ausbleibende (M14) DNA-Bindeaktivität (vgl. Abb. 3.27). Offensichtlich ist auch die As T220 relativ stark an der DNA-Bindung von StrR beteiligt. Der Austausch T220I befindet sich in der Erkennungshelix des

HTH-Motivs und an einer nach dem Modell von Ptashne auch für die Interaktion mit der DNA bevorzugten As-Position. Bei der Mutante M14 wurden dagegen zwei As-Austausche beobachtet. Der V224A-Austausch sollte keinen entscheidenden Effekt auf die Sequenzspezifität der DNA-Bindung haben, weil es sich hierbei a) um eine relativ geringfügige Veränderung der As-Seitenkette, b) um einen As-Austausch an einer nach dem Modell von Ptashne für die sequenzspezifische DNA-Bindung unwichtigen Position, und c) um eine As-Veränderung handelt, für die es in der Literatur viele Beispiele von HTH-Proteinen mit einem Alanin an dieser Position gibt (Dodd und Egan, 1990). Der R208C-Austausch in M14 befindet sich jedoch in der ersten der beiden HTH-Helices und hat nach dem Modell nichts mit der sequenzspezifischen DNA-Erkennung von StrR zu tun. Trotzdem interagierte M14 nicht mehr mit dem *strB1*-Operator. Eine Erklärung für diesen Effekt ist, daß der R208C-Austausch einen Einfluß auf die Stabilität des HTH-Motivs hat. Tatsächlich wurde an mutagenisierten Lac-Repressoren gefunden, daß die an dieser Stelle befindliche As einen erheblichen Einfluß auf die DNA-Bindeaktivität des HTH-Motivs besitzt (Matthews et al., 1982). Die im Lac-Repressor an dieser Stelle befindliche As Y7 befindet sich räumlich sehr nahe an der um 10 As-Positionen weiter im C-Terminus positionierte As Y17. Die stabilisierende Wirkung wurde hier durch hydrophobe Wechselwirkungen („ring-stacking“) der Seitenketten beider As erklärt. Ein Austausch von Y7 bewirkte in jedem Falle eine reduzierte oder ausbleibende DNA-Bindeaktivität.

Die teilweise stark reduzierten DNA-Bindeaktivitäten von M15 (R184Q) und M20 (I177N) (vgl. Abb. 3.27) könnten aufgrund folgender Effekte erklärbar sein. Allen HTH-Motiven ist gemeinsam, daß mindestens eine dritte  $\alpha$ -Helix im Protein das eigentliche HTH-Motiv stabilisiert (Pabo und Sauer, 1992). Innerhalb dieser HTH-Stabilisierungshelix gibt es konservierte As, deren Austausch ebenfalls eine Reduktion der DNA-Bindeaktivität hervorruft. Obgleich es keine belegten Fakten dafür gibt, daß die As I177 und R184 Bestandteil einer solchen HTH-Stabilisierungshelix von StrR sind, so könnte die reduzierte DNA-Bindeaktivität von M15 und M20 zumindest ein Hinweis darauf sein. Für diese Interpretation spricht auch, daß sich diese beiden As-Austausche in dem zwischen StrR, HstR und SpcR hoch konservierten As-Bereich 175 - 186 befinden (vgl. Abb. 3.19), der in allen drei Proteinen tatsächlich die gleiche Funktion ausüben sollte. Die StrR-Mutante M4 (G148D) zeigte ebenfalls eine reduzierte DNA-Bindeaktivität. Allerdings befindet sich die mutierte As in diesem Protein 59 As vom HTH-Motiv entfernt. Somit ist es eher unwahrscheinlich, daß die As G148 noch Bestandteil einer möglichen HTH-Stabilisierungshelix von StrR ist. Die Entfernung von HTH-Stabilisierungshelices kann zwar differieren, jedoch beträgt diese im

Falle des Lac-Repressors 6 As (Mathews et al., 1982) und im Falle des CAP-Proteins ca. 18 As (Steitz et al., 1982). Worauf sich die stark reduzierte DNA-Bindeaktivität von M4 jedoch begründet, bleibt spekulativ. Möglicherweise wird durch die Einführung der polaren Seitengruppe von D148 die Ausbildung der Gesamtstruktur des StrR-Proteins gestört und beeinträchtigt damit signifikant die DNA-Bindung.

**Auch das HstR-Protein aus *S. glaucescens* ist ein DNA-Bindeprotein und Transkriptionsaktivator.**

Das postulierte HTH-Motiv von HstR besitzt im Vergleich zum HTH-Motiv von StrR drei As-Austausche innerhalb der zweiten Helix (vgl. Abb. 3.19). Postulierte StrR/HstR-Bindestellen innerhalb des 5'-Hydroxy-SM-Genclusters aus *S. glaucescens* besitzen ebenfalls eine sehr hohe Homologie zu den äquivalenten StrR-Bindestellen aus dem SM-Gencluster von *S. griseus*. Zusätzlich wurde bereits durch die Arbeiten von Beyer et al. (1996) gezeigt, daß StrR durch DNA-Bindung an den intercistronischen *strVp/Xp*-Bereich aus dem 5'-Hydroxy-SM-Gencluster die Transkription stromabwärts der Promotoren gelegene Reportergene aktivierte. Deshalb wurde postuliert, daß auch das HstR-Protein ein DNA-Bindeprotein und Transkriptionsaktivator ist. Nach erfolgreicher heterologer Produktion von HstR in *E. coli* wurden zunächst *in vitro* DNA-Bindetests durchgeführt. Dafür wurde sowohl das *strB1p*-Operatorfragment aus *S. griseus* als auch ein innerhalb des *hstR*-Gens gelegenes DNA-Fragment mit einem Palindrom für eine mögliche StrR/HstR-Bindestelle benutzt. Durch frühere Arbeiten war bereits auch gezeigt worden, daß StrR an ein innerhalb seines eigenen Gens gelegenes Palindrom bindet (Retzlaff und Distler, 1995). Die DNA-Sequenzen der verschiedenen Palindrome sind in Abb. 4.4 aufgeführt.

<i>S. griseus</i>	<b>GTTCGACTGCCGATCACACGCAGTCGAAC</b> <b>GTTCGACTGCCGGGTTCCGCAGTCGAAC</b>	<i>strB1p</i> <i>strR</i>
<i>S. glaucescens</i>	<b>GTTCAACTGCTCACTTCCCGCACTCGAAC</b> <b>GTTCGAGTGCGGGAAGTGAGCAGTTGAAC</b> <b>GTTCGACCGAGGGACTTCCTCAATCGAAC</b>	<i>strVp</i> <i>strXp</i> <i>hstR</i>

**Abb. 4.4:** Ausgewählte DNA-Sequenzen palindromer StrR/HstR-Bindestellen aus *S. griseus* und aus *S. glaucescens*. Die identischen DNA-Basen innerhalb des Palindroms sind fett dargestellt. Das Palindrom sowie dessen Inversionszentrum sind durch Pfeile und Punkt symbolisiert.

In dieser Arbeit wurden sowohl durch *in vitro* DNA-Bindetests als auch *in vivo* Experimente zur Transkriptionsaktivierung die folgenden Punkte bestätigt:

- a) Das HstR-Protein ist genauso wie StrR ein DNA-Bindeprotein.
- b) HstR bindet an die gleichen palindromen DNA-Sequenzen wie StrR.
- c) HstR ist ein Transkriptionsaktivator mit im Vergleich zu StrR nur geringfügig reduzierter biologischer Aktivität.
- d) HstR bindet genauso wie StrR sowohl an Bindestellen des SM-Genclusters aus *S. griseus* als auch des 5'-Hydroxy-SM-Genclusters aus *S. glaucescens*.
- e) Auch innerhalb des *hstR*-Gens existiert eine Bindestelle für das HstR-Protein, deren Funktion allerdings bisher noch nicht geklärt werden konnte.

Allerdings zeigte das verwendete HstR-Protein in DNA-Bindetests ein anderes Protein/DNA-Komplex-Muster als das StrR-Protein. Zwar wurde die DNA-Bindeaktivität von HstR sichtbar, jedoch konnten insgesamt drei retardierte HstR/DNA-Komplexe unterschiedlicher Mobilität beobachtet werden (vgl. Abb. 3.22). Auch die relative Wanderungsgeschwindigkeit der HstR/DNA-Komplexe im Gel entsprach nicht derjenigen, welche aufgrund der molekularen Masse von HstR zu erwarten gewesen wäre. Aufgrund der im Vergleich zu StrR größeren molekularen Masse von HstR (vgl. 3.7.1; Tab. 3-5) wurden HstR/DNA-Komplexe mit geringerer Mobilität erwartet, als sie von StrR/DNA-Komplexen beobachtet wurde. Die Abhängigkeit der relativen Mobilität von der molekularen Masse des eingesetzten Proteins wurde durch die vergleichenden Experimente von StrR und C-terminal verkürzten StrR-Proteinen (geringerer molekularer Masse) deutlich gezeigt (vgl. 3.8.1; Abb. 3.24). Die Ergebnisse der radioaktiven heterologen Produktion von HstR in *E. coli* (vgl. Abb. 3.21) könnten die Erklärung für die beobachtete geringere Mobilität von HstR/DNA-Komplexen geben. Nur ein relativ kleiner Anteil wurde als „full-length“-HstR ( $M_r = 45,6$  kDa) von *E. coli* produziert. Der weitaus größte Anteil wurde als HstR-Protein einer molekularen Masse von  $M_r = 29$  kDa produziert. Ein Protein dieser Größe entspräche einem HstR-Protein mit einer As-Kettenlänge von ca. 270 As. Ein solches C-terminal verkürztes HstR-Protein würde immer noch das für die DNA-Bindung verantwortliche HTH-Motiv (As 206 - 225) besitzen. Die relativen Mobilitäten der HstR/DNA-Komplexe entsprechen eher denjenigen Mobilitäten, die durch ein verkürztes HstR-Protein verursacht wurden. Die Frage, warum nicht auch „full-length“-HstR/DNA-Komplexe beobachtet wurden, bleibt spekulativ. Möglicherweise ist die spezifische DNA-Bindeaktivität des verkürzten HstR-Proteins wesentlich höher als diejenige

des „full-length“-HstR-Proteins. Aufgrund der Beobachtungen mit dem StrR-Protein, welche darauf basieren, daß in *E. coli* heterolog produziertes StrR in inaktiver Form als Konglomerat einer extrem hohen molekularen Masse vorlag, könnte ein Erklärungsansatz auch in Hinblick auf HstR gegeben werden. Wenn auch beim HstR-Protein eine solche wie für das StrR-Protein geschilderte Situation vorlag, dann wäre der Anteil von aktivem „full-length“-HstR drastisch reduziert gewesen. Im Zusammenspiel mit einer eventuell erhöhten spezifischen DNA-Bindeaktivität des verkürzten HstR-Proteins wären dann nicht beobachtete „full-length“-HstR/DNA-Komplexe über einen Titrationseffekt erklärbar.

Die beobachteten HstR/DNA-Komplexe unterschiedlicher Migrationsgeschwindigkeit könnten durch verschiedene Multimere des C-terminal verkürzten HstR-Proteins verursacht worden sein. Möglicherweise handelt es sich bei den drei retardierten Komplexen um die Tetramere, Dimere und Monomere des Proteins, welche an die DNA gebunden waren.

Ein Vergleich der HTH-Motive von StrR und HstR gibt Aufschluß darüber, welche As der Erkennungshelix offensichtlich keine Rolle bei der sequenzspezifischen DNA-Erkennung spielen (vgl. Abb. 3.19). Die As V220 befindet sich genau an derjenigen As-Position innerhalb des HTH-Motivs, die lediglich für den strukturellen Aufbau des HTH-Motivs durch Wechselwirkung mit A210 verantwortlich ist. In der Literatur findet man für die der V220-Position in HstR entsprechende Position Beispiele für alle As mit aliphatischer hydrophober Seitenkette (Dodd und Egan, 1990). Da sich die DNA-Sequenzen von StrR- und HstR-Bindestellen innerhalb der palindromen Bereiche nicht unterscheiden, spielen L217 und G218 in HstR, genauso wie P218 und S219 in StrR, aufgrund der Ergebnisse keine Rolle bei der sequenzspezifischen DNA-Erkennung. Somit kann die Spezifität der DNA-Bindung nur noch im As-Bereich 220 - 226 (StrR) und 219 - 225 (HstR) determiniert sein.

#### **Die Funktion des SpcR-Proteins aus *S. flavopersicus* ist bisher noch nicht aufgeklärt.**

Der Sequenzunterschiede innerhalb der Erkennungshelix des HTH-Motivs von SpcR zu HstR/StrR beschränken sich auf die As R197 und N201 (vgl. Abb. 3.19). In der Mutante SpcRM1 wurde der As-Austausch R197S vorgenommen, um die Erkennungshelix von SpcR derjenigen von StrR bzw. HstR anzugleichen. Jedoch zeigten weder SpcR noch SpcRM1 *in vitro* DNA-Bindeaktivität am *strB1p*-Operatorfragment. Auch *in vivo* Experimente zur Transkriptionsaktivierung blieben erfolglos. Andererseits hatte der Austausch des S222R in

M350/5 offensichtlich keinen größeren Einfluß auf die DNA-Bindeaktivität dieser StrR-HTH-Mutante. Deshalb muß die zukünftige Strategie für das SpcR-Protein in der Veränderung N201K liegen, um eine spezifische DNA-Bindung an StrR/HstR-Bindestellen zu erreichen. Bis dahin müssen die folgenden Punkte als offene Fragen bestehen bleiben:

1. Sind weitere, sich nicht im HTH-Motiv befindende As für die sequenzspezifische DNA-Bindung des SpcR- (und StrR/HstR-) Proteins notwendig?
2. Sind die Reaktionsbedingungen für *in vitro* Gelretardierungsassays mit SpcR anders zu wählen? Dagegen spricht allerdings die Tatsache, daß auch in *S. lividans*/pSTW13.2i-Doppeltransformanten *in vivo* keine SpcR- oder SpcRM1-abhängige Xyle-Aktivität meßbar war.
3. Ist SpcR kein DNA-Bindeprotein und gehört nicht zur Familie der StrR-ähnlichen „pathway“-spezifischen Transkriptionsaktivatoren? Versuche von J. Altenbuchner und Mitarbeitern zur DNA-Bindung von in *E. coli* heterolog produziertem SpcR an drei intercistronischen Bereichen des Spectinomycin-Biosynthesegencluster führten ebenfalls nicht zur Bindung des Proteins. Andererseits zeigte zellfreier Extrakt von *S. flavopersicus* an zwei der drei getesteten intercistronischen Bereiche eine DNA-Bindeaktivität. Ob diese DNA-Bindung durch das SpcR-Protein hervorgerufen wurde, ist bisher allerdings noch nicht geklärt. Palindrome DNA-Bereiche, die als potentielle DNA-Bindestellen für das SpcR-Protein in Frage kommen, waren auf den verwendeten DNA-Fragmenten nicht auffindbar (J. Altenbuchner, pers. Mitteilung).

### **Der C-Terminus von StrR ist notwendig für die Funktion des Proteins als Transkriptionsaktivator.**

Die Experimente zur DNA-Bindeaktivität von C-terminal verkürzten StrR-Proteinen wurden durch die Experimente zur Transkriptionsaktivierung vervollständigt. Dabei stellte sich heraus, daß die StrR-Proteine M299 und M231 trotz ihrer noch vorhandenen DNA-Bindeaktivität keine Transkriptionsaktivierung mehr bewirken können. Xyle-Aktivitäten zwischen 6,5 und 140 nkat • (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> wurden allerdings von allen C-terminal verkürzten StrR-Proteinen, einschließlich M199 (ohne C-Terminus und HTH-Motiv), verursacht. Daß es sich hierbei jedoch um Xyle-Hintergrundaktivitäten handeln mußte, zeigte die Tatsache, daß die Mutante M199 ebenfalls eine Xyle-Aktivität bis zu 100 nkat • (mg

Gesamtprotein)<sup>-1</sup> aufwies, obwohl M199 keinerlei DNA-bindende Aktivität mehr besaß. Es wird davon ausgegangen, daß die DNA-Bindung von StrR grundlegende Voraussetzung für die Möglichkeit zur Transkriptionsaktivierung ist. Deshalb sollte auch bei M199 aufgrund der ausgebliebenen DNA-Bindeaktivität keine Transkriptionsaktivierung mehr möglich gewesen sein. Aufgrund der Ergebnisse von M299 und M231 wurde zunächst die Arbeitshypothese aufgestellt, daß sich im C-Terminus derjenige As-Bereich befindet, der die Domäne zur Transkriptionsaktivierung durch Wechselwirkung mit RNA-Polymerase bildet. As-Sequenzen der Aktivierungsdomänen von Streptomyceten-typischen Transkriptionsaktivatoren sind bisher nicht bekannt. Auch mit bekannten Aktivierungsdomänen anderer Transkriptionsaktivatoren (z. B. CAP-Protein, Zhou et al., 1994; FNR-Protein, Williams et al., 1997) konnte keinerlei As-Übereinstimmung gefunden werden. Die auf der Basis der *in vivo* Experimente gezogene Schlußfolgerung, daß sich die transkriptionsaktivierende Domäne von StrR ausschließlich im C-Terminus befindet, wurde allerdings zum einen durch die Experimente zur Oligomerisierung von StrR, zum anderen durch die Charakterisierung der StrR-Mutanten der ungerichteten Mutagenese entkräftet (vgl. Abb. 4.2). Tatsache ist, daß bereits die Deletion von 51 As im C-Terminus von StrR (M299) den Verlust der Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung bewirkte, obwohl das derart erzeugte C-terminal verkürzte StrR-Protein M299 noch immer eine sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität zeigte.

**Das StrR-Protein ist in der Lage, mit nur einer Hälfte seiner natürlichen Bindestelle zu interagieren.**

Die Experimente zur DNA-Bindeaktivität von StrR an das volle bzw. halbe Palindrom seiner DNA-Bindestelle dienten zunächst dem Zweck der Klärung der Frage, ob die stromaufwärts der StrR-Bindestelle gelegenen „direct repeats“ für eine DNA-Bindeaktivität von StrR notwendig sind. Dies ist jedoch eindeutig nicht der Fall. StrR bindet auch dann an die palindrome StrR-Bindestelle innerhalb des *strB1p*-Operators, wenn diese stromaufwärts gelegenen „direct repeats“ nicht mehr vorhanden sind. Damit wurden die S1-mapping Experimente von L. Retzlaff (1996) ergänzt, in denen DNaseI-geschützte DNA-Bereiche innerhalb dieser „direct repeats“ gefunden wurden. Ob diese „direct repeats“ jedoch eine Rolle bei der Transkriptionsaktivierung durch das StrR-Protein spielen, müßte noch durch entsprechende „Promotor-probe“-Experimente untersucht werden.

Bei Verwendung der C-terminal verkürzten StrR-Proteine M299 und M231 zu DNA-Bindetests mit dem stromaufwärts der palindromen StrR-Bindestelle verkürzten *strB1p*-Operatorfragment (B1p) wurde eine im Vergleich zu StrR leicht erhöhte Mobilität von Protein/DNA-Komplex I beobachtet (vgl. Abb. 3.24). Die Ursache für diese leicht erhöhte Mobilität wird durch das geringere Molekulargewicht der C-terminal verkürzten StrR-Proteine erklärt. Bestätigt wird diese Vermutung wohl auch dadurch, daß die Differenzen der Mobilitäten zwischen den einzelnen Protein/DNA-Komplexen I in Relation zum Verhältnis der Proteinverkürzungen von M299 und M231 stehen. Sowohl das StrR-Protein als auch die C-terminal verkürzten StrR-Proteine M299 und M231 waren in der Lage, mit einer StrR-Bindestelle zu interagieren, die nur noch eine Hälfte der palindromen DNA-Sequenz enthielt (B1p/2). Jedoch wurde hier außer dem StrR/DNA-Komplex I ein zusätzlicher StrR/DNA-Komplex II mit größerer Mobilität gefunden (vgl. Abb. 3.24). Da das B1p/2-Fragment die gleiche Länge (Molekulargewicht) wie das Fragment B1p besaß und aufgrund der relativen Mobilitäten der durch die C-terminal verkürzten StrR-Proteine verursachten Protein/DNA-Komplexe I, wurde davon ausgegangen, daß der StrR/DNA-Komplex II nur durch eine verringerte molekulare Masse der Proteinkomponente hervorgerufen werden konnte. Es wurde deshalb postuliert, daß es sich hier um verschiedene multimeren Formen des StrR-Proteins handeln mußte, welche mit dem halben Palindrom der StrR-Bindestelle im B1p/2-Fragment interagierten. Durch die Arbeiten von Winterling et al. (1998) wurden ebenfalls mehrere, durch verschiedene multimeren Formen des DinR-Proteins aus *Bacillus subtilis* hervorgerufene, Protein/DNA-Komplexe in Gelretardierungsassays beobachtet. Die Oligomerisierung von StrR würde demnach dadurch bekräftigt, daß das Protein der C-terminal verkürzten StrR-Mutante M299 fast ausschließlich durch das Vorhandensein von StrR/DNA-Komplex II charakterisiert war. Offensichtlich war dieses verkürzte StrR-Protein in seiner Fähigkeit zur Multimerisierung gestört, weshalb nur sehr geringe Mengen an StrR/DNA-Komplex I beobachtet werden konnten. Das C-terminal um 119 As verkürzte Protein der StrR-Mutante M231 konnte hingegen nur noch den StrR/DNA-Komplex II ausbilden. Deshalb wurde davon ausgegangen, daß die Verkürzung im C-Terminus zwar keinen Einfluß auf die Fähigkeit von StrR hat, nur an eine Hälfte der palindromen StrR-Bindestelle zu binden. Jedoch war die Fähigkeit zur Multimerisierung bei diesen verkürzten StrR-Proteinen gestört (M299) bzw. völlig abhanden gekommen (M231). Auch einzelne Austausche in der As-Region zwischen 231 und 299, z. B. in den Mutanten M7 (D274A) und M31 (L271F), die fast ausschließlich zur Bildung von StrR/DNA-Komplex II führten (vgl. Abb. 3.27), unterstützten diese Hypothese.

**StrR bindet an seine natürliche Bindestelle als Tetramer – ein Modell.**

Die mit den C-terminal verkürzten StrR-Proteinen und mutierten StrR-Varianten gemachten Beobachtungen wurden mit der Quantifizierung der Anzahl der an die DNA-Fragmente gebundenen StrR-Moleküle vervollständigt (vgl. Abb. 3.25) und können mit folgendem Modell erklärt werden (Abb. 4.5):

1. StrR bindet an seine natürliche StrR-Bindestelle als Tetramer (vgl. Abb. 4.5 A).
2. Steht nur eine Hälfte dieser StrR-Bindestelle zur Verfügung, so bindet StrR sowohl als Tetramer wie auch als Dimer an die DNA.
3. An jede Halbseite der natürlichen palindromen StrR-Bindestelle bindet je ein StrR-Dimer. Ein HTH-Motiv dieses StrR-Dimers wird zur Bindung an die DNA benutzt, die Funktion des zweiten HTH-Motivs bleibt weiterhin spekulativ.
4. Es gibt zwischen den an jede Halbseite des Palindroms gebundenen StrR-Dimeren auch Dimer/Dimer-Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen können aufgrund der Experimente mit dem halben Palindrom postuliert werden. Bei Einsatz der halben StrR-Bindestelle wurde ebenfalls StrR/DNA-Komplex I beobachtet, welcher einem DNA-gebundenen StrR-Tetramer entsprach. Das StrR-Tetramer kann nur durch die postulierte Dimer/Dimer-Wechselwirkung zustande kommen, da nur eine Halbseite des Palindroms für die DNA-Bindung eines StrR-Dimers zur Verfügung steht. Das zweite, nicht an die DNA gebundene StrR-Dimer kann demzufolge nur über eine Wechselwirkung mit dem an die DNA-gebundenen StrR-Dimer Bestandteil von StrR/DNA-Komplex I sein (vgl. Abb. 4.5 B). Im StrR/DNA-Komplex II tritt diese Dimer/Dimer-Wechselwirkung nicht auf und es bindet nur ein StrR-Dimer allein an die für die DNA-Bindung zur Verfügung stehende Halbseite des Palindroms.
5. Die Proteindomäne zur Tetramerisierung von StrR liegt im C-Terminus. Es wurden bei Verwendung der C-terminal verkürzten StrR-Proteine und des halben

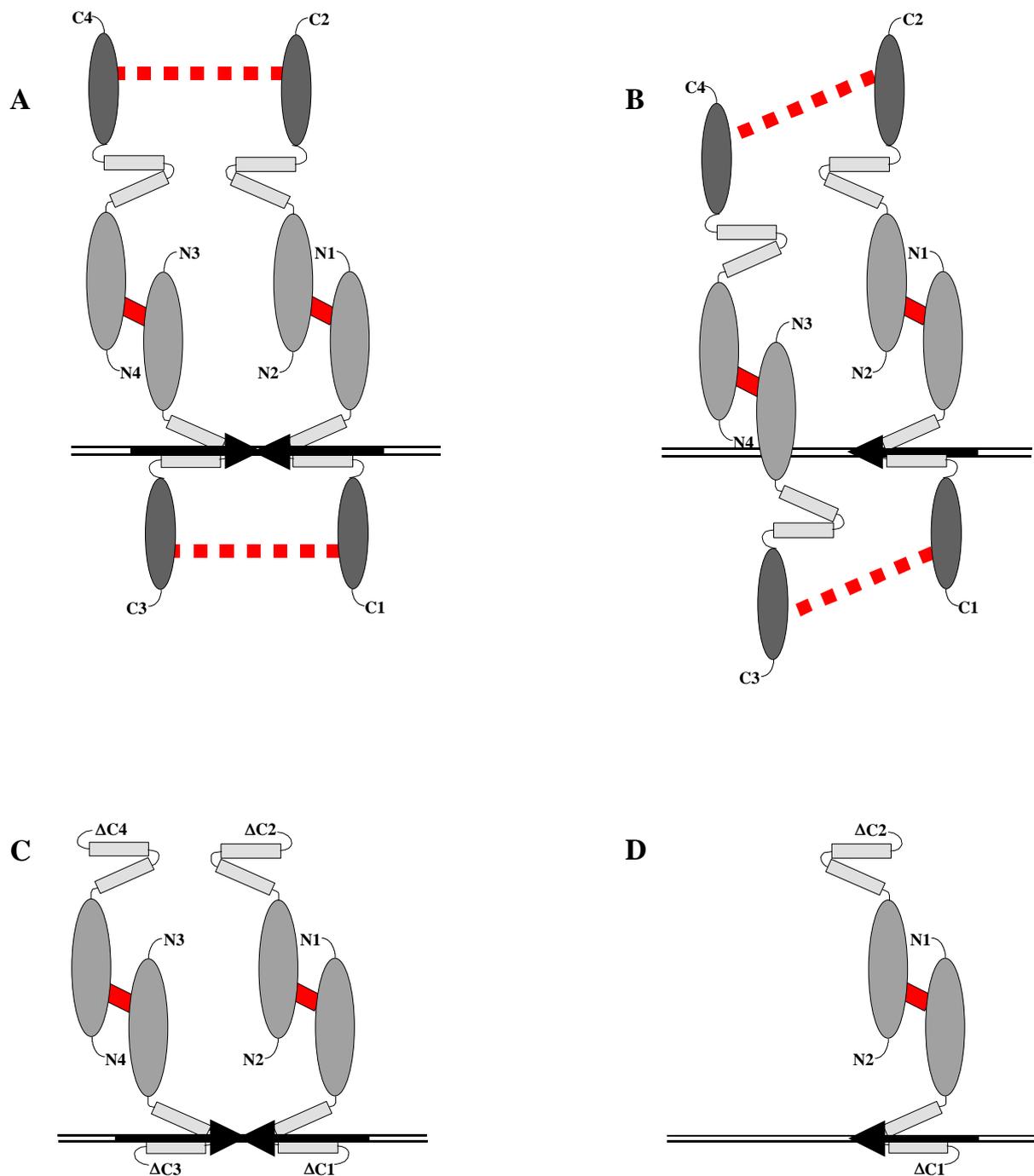
Palindroms der StrR-Bindestelle nur ein sehr schwach ausgeprägter (M299) oder überhaupt kein (M231) StrR/DNA-Komplex I beobachtet (vgl. Abb. 4.5 D). Somit ist eine Tetramerisierung bei diesen verkürzten StrR-Mutanten entweder erschwert (M299) oder überhaupt nicht möglich (M231). Auch die StrR-Protein-Mutanten M7 (D274A) und M31 (L271F) können keinen tetrameren Proteinkomplex mehr ausbilden (vgl. Abb. 3.27 B). Aufgrund der Lage dieser Mutationen im C-Terminus von StrR wird das Modell bestätigt. Möglicherweise wurden mit L271 und D274 zwei derjenigen As innerhalb von StrR gefunden, die durch direkte Beteiligung ihrer Seitenketten zur Protein/Protein-Wechselwirkung beitragen. Im Lac-Repressor trägt ein sog. „Leucin-mini-zipper“ zur Tetramerisierung des Proteins bei (Alberti et al., 1991, 1993). Die in M7 und M31 gefundenen As-Austausche befinden sich ebenfalls in einer zwischen StrR, HstR und SpcR hochkonservierten As-Region mit verhältnismäßig hohem Anteil an Leucin (vgl. Abb. 3.19).

**6.** Die C-terminal verkürzten StrR-Proteine sowie die StrR-Protein-Mutanten M7 und M31 binden als Pseudotetramere an die natürliche palindrome StrR-Bindestelle. Diese Erkenntnis ergibt sich aus den beobachteten Protein/DNA-Komplexen I bei Einsatz des vollen Palindroms der StrR-Bindestelle (vgl. Abb. 3.24, 3.27) und dem Beweis, daß diese Proteine keine Tetramere durch Dimer/Dimer-Wechselwirkung mehr ausbilden können. Deshalb binden bei Einsatz des vollen Palindroms der StrR-Bindestelle zwei Protein-Dimere unabhängig voneinander an je eine Halbseite dieses Palindroms (vgl. Abb. 4.5 C).

**7.** Die Fähigkeit von StrR zur Tetramerisierung ist Bedingung für dessen Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung. Die Experimente zur Transkriptionsaktivierung durch die StrR-Mutanten-Proteine M7 und M31 zeigten, daß diese Proteine trotz der offensichtlich im Vergleich zum Wildtyp-StrR unveränderten DNA-Bindeaktivität und Oligomerisierung (vgl. Abb. 3.27) keine Transkriptionsaktivierung mehr bewirken können. Ein Grund für das Ausbleiben der Transkriptionsaktivierung könnte in der Unfähigkeit zur Dimer/Dimer-Wechselwirkung von M7 und M31 begründet liegen. Möglicherweise ist eine solche Dimer/Dimer-Wechselwirkung Voraussetzung für eine Aktivierung des gesamten StrR/DNA-Komplexes im Hinblick auf Transkriptionsaktivierung und Wechselwirkung mit RNA-Polymerase.

Denkbar wäre auch die Notwendigkeit des „bendings“ der DNA, welches über Dimer/Dimer-Wechselwirkungen gesteuert ist. Durch die Studien am CAP-Protein wurde herausgefunden, daß ein CAP-induziertes „bending“ der DNA Voraussetzung für die Transkriptionsinitiation und die Ausbildung des geschlossenen RNA-Polymerase/Promotor-Komplexes ist (Zinkel und Crothers, 1991). Für den Transkriptionsfaktor MerR wurde sogar beobachtet, daß dessen Funktion als Repressor- oder Aktivator-Protein von der Modulation der DNA-Struktur abhängt (Ansari et al., 1995). MerR wirkt allerdings als Repressor, wenn es durch seine DNA-Bindung das „bending“ der DNA bewirkt und als Aktivator, wenn es die DNA in ihre „relaxed“ Form überführt. Zur Prüfung der These des für die Transkriptionsaktivierung notwendigen StrR-induzierten DNA-„bendings“ über Dimer/Dimer-Wechselwirkungen wären entsprechende DNA-„bending“-Experimente sowie *in vitro* Studien mit den gereinigten Proteinen und RNA-Polymerase durchzuführen.

**8.** Die Protein-Domäne, welche für die Dimerisierung von StrR verantwortlich ist, liegt im N-Terminus des Proteins. Diese Feststellung ergibt sich allein aus der Tatsache, daß das C-terminal verkürzte StrR-Protein M231 noch als Dimer mit einer Hälfte der palindromen StrR-Bindestelle interagiert. Allerdings sind bisher noch keine StrR-Protein-Mutanten gefunden worden, welche defekt in ihrer Fähigkeit zur Dimerisierung waren. Interessant in diesem Zusammenhang wären Untersuchungen mit N-terminal verkürzten StrR-Proteinen. Die Fusion des His-tag-Peptids jedenfalls hat offensichtlich auch keinen negativen Einfluß auf eine solche Dimerisierung. Untersuchungen mit dem HstR-Protein könnten hier ebenfalls einen Informationsgewinn bringen. In den DNA-Bindetests mit dem HstR-Protein wurden drei retardierte HstR/DNA-Komplexe beobachtet. Der am raschesten wandernde dieser drei Komplexe könnte durch ein DNA-gebundenes HstR-Monomer hervorgerufen worden sein.



**Abb. 4.5: Modell der DNA-Bindung und Oligomerisierung von StrR.** Schematisch dargestellt ist die DNA-Bindung und Oligomerisierung von StrR und C-terminal verkürzten StrR-Proteinen an das volle oder das halbe Palindrom der StrR-Bindestelle. Das StrR-Protein ist gezeichnet mit seinem C-Terminus (C1 - C4), HTH-Motiv und N-Terminus (N1 - N4). C-terminale Deletionen von StrR wurden mit  $\Delta C1$  -  $\Delta C4$  bezeichnet. StrR-Bindestellen mit vollem Palindrom wurden mit zwei Pfeilen, solche mit dem halben Palindrom mit einem Pfeil symbolisiert. DNA, welche nicht Bestandteil der palindromen StrR-Bindestelle ist, wurde als Doppellinie dargestellt. Wechselwirkungen zwischen StrR-Proteinen sind mit Balken (Dimerisierung) oder Strichbalken (Tetramerisierung) markiert. (A) StrR-Tetramer, gebunden an volles Palindrom; (B) StrR-Tetramer, gebunden an halbes Palindrom; (C) C-terminal verkürztes StrR-pseudo-Tetramer, gebunden an volles Palindrom; (D) C-terminal verkürztes StrR-Dimer, gebunden an halbes Palindrom.

---

**Die für die Transkriptionsaktivierung verantwortlichen As-Bereiche liegen  
wahrscheinlich im N- und im C-Terminus von StrR.**

Die StrR-Protein-Mutanten M1, M16 und M23 waren offensichtlich weder in ihrer Fähigkeit zur DNA-Bindung noch zur Tetramerisierung gestört. Trotzdem konnten diese Proteine keine Transkriptionsaktivierung mehr bewirken. Deshalb wird vermutet, daß die in diesen StrR-Mutanten gefundenen As-Austausche innerhalb derjenigen Proteinbereiche stattgefunden haben, die für die Interaktion mit der RNA-Polymerase verantwortlich sind. Die As-Austausche befinden sich sowohl im N-Terminus (V114G und P123R) als auch im C-Terminus (V329A) von StrR. Während es sich bei der Mutation P123R (M1) um ein Problem bei der Strukturausbildung der transkriptionsaktivierenden Domäne von StrR handeln könnte, so ist dies bei den anderen beiden Mutationen eher unwahrscheinlich. Bei M16 (V114G) und M23 (V329A) handelt es sich um sehr geringfügige Änderungen in den jeweiligen As-Seitenketten. In beiden Fällen bleibt der unpolare Charakter der As-Seitenketten auch erhalten. Möglicherweise sind V114 und V329 an einer hydrophoben StrR/RNA-Polymerase-Interaktion beteiligt. Das Zusammenspiel der in der Primärstruktur von StrR relativ weit entfernten As könnte durch die Tertiärstrukturausbildung von StrR zustande kommen. Durch die Arbeiten von Williams et al. (1997) wurden Transkriptionsaktivierungsmutanten des FNR-Proteins aus *E. coli* gefunden, deren As-Austausche ebenfalls sowohl im N-Terminus als auch im C-Terminus des Proteins lokalisiert sind. Das FNR-Protein interagiert mit der C-terminalen Domäne der *E. coli*-RNA-Polymerase.

Insgesamt gibt es jedoch keinerlei Ähnlichkeiten zu As-Sequenzen der Aktivierungsdomänen weder des CAP-Proteins (As 156 - 162) noch des FNR-Proteins. Beim CAP-Protein wurde festgestellt, daß die As T158 für den direkten Kontakt mit der RNA-Polymerase verantwortlich ist (Niu et al., 1994). Beim FNR-Protein führten unterschiedliche Austausche der As D43, R72, S73, T118, M120, F181, F186, S187 und F191 jeweils zum Verlust der Transkriptionsaktivierung (Williams et al., 1997). Sowohl im Bereich der postulierten C-terminalen, wie auch der N-terminalen Aktivierungsdomäne von StrR gibt es zwischen StrR, HstR und SpcR konservierte As. Vor allem im N-terminal gelegenen As-Bereich zwischen 102 - 146 existiert ein relativ hoher Anteil an konservierten As (vgl. Abb. 3.19). In unmittelbarer Nachbarschaft der Mutation P123R (M1) befinden sich sogar mehrere nebeneinander gelegene konservierte As. Die Mutation P123R scheint aufgrund der unveränderten DNA-Bindeaktivität und Tetramerisierung von M1 zwar keinen Einfluß auf die

Ausbildung der Gesamtstruktur von StrR, jedoch auf die Funktionsfähigkeit oder die Bildung der Teilstruktur der transkriptionsaktivierenden Domäne zu haben.

Abschließend bleibt festzuhalten, daß in dieser Arbeit vor allem ein Beitrag zur Aufklärung der funktionellen Domänenstruktur des StrR-Proteins geleistet wurde. Im StrR-Protein konnten vier charakteristische Bereiche gefunden werden, die den folgenden Funktionen zuzuordnen sind (vgl. Abb. 4.2): 1. DNA-Bindung,

2. Tetramerisierung,

3. Transkriptionsaktivierung,

4. Dimerisierung.

Obwohl die Interpretation der Ergebnisse eine solche Einteilung erlaubt, ist diese noch sehr unvollständig. In Zukunft muß zur Vervollständigung der Strukturaufklärung des StrR-Proteins mit den vorhandenen und weiteren Methoden, wie z.B. Röntgenstrukturanalyse und/oder Elektronenmikroskopie, noch eine Reihe von Versuchen gemacht werden. Insbesondere die StrR-Domänen zur Dimerisierung und Transkriptionaktivierung sind bisher entweder nur grob definierbar oder unvollständig charakterisiert. Neben der 3D-Strukturaufklärung wäre es sinnvoll, hierfür das Screening von weiteren StrR-Protein-Mutanten und die Charakterisierung von N-terminal verkürzten StrR-Proteinen durchzuführen. Zusätzlich wäre die Etablierung eines funktionsfähigen *in vitro* Transkriptionssystems vor allem für die Charakterisierung von Transkriptionsaktivierungsmutanten des StrR-Proteins sinnvoll einsetzbar.

## 5 Literatur

- Adhya, S. und Garges, S. (1990)** Positive control. *J. Biol. Chem.* **265**, 10797-10800.
- Ahlert, J., Distler, J., Mansouri, K. und Piepersberg, W. (1997)** Identification of *stsC*, the gene encoding the L-glutamine:scyllo-inosose aminotransferase from streptomycin producing streptomycetes. *Arch. Microbiol.* **168**, 102-113.
- Alberti, S., Oehler, S., Wilcken-Bergmann, B. v., Krämer, H. und Müller-Hill, B. (1991)** Dimer-to-tetramer assembly of lac repressor involves a leucine heptad repeat. *New. Biol.* **3**, 57-62.
- Alberti, S., Oehler, S., Wilcken-Bergmann, B. v. und Müller-Hill, B. (1993)** Genetic analysis of the leucine heptad repeats of lac repressor: evidence for a 4-helical bundle. *EMBO J.* **12**, 3227-3236.
- Alexander, D.C. und Jensen, S.E. (1998)** Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein. *J. Bacteriol.* **180**, 4068-4079.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990)** Basic logical alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Ansari, A.Z., Bradner, J.E. und O'Halloran, T.V. (1995)** DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature*, **374**, 371-375.
- Babcock, M.J. und Kendrick, K.E. (1988)** Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **170**, 2802-2808.
- Baldwin, A.S. (1990)** Analysis of sequence-specific DNA-binding proteins by the gel mobility shift assay. *DNA and Protein Engineering Techniques Vol. 2, No. 4*.
- Basak, K. und Majumdar, S.K. (1973)** Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**, 6-11.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H. und Atlas, R.M. (1991)** Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**, 301-334.
- Beppu, T. (1995)** Signal transduction and secondary metabolism: prospects for controlling productivity. *TIBTECH* **13**, 264-269.
- Beyer, S., Distler, J. und Piepersberg, W. (1996)** The *str* gene cluster for the biosynthesis of 5'-hydroxystreptomycin in *Streptomyces glaucescens* GLA.0 (ETH 22794): new operons and evidence for pathway-specific regulation by StrR. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 775-784.
- Bibb, M.J., Janssen, G.R. und Ward, J.M. (1986)** Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* **41**, 357-368.
- Birnboim, C. und Doly, J. (1979)** Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blatter, E.E., Ross, W., Tang, H., Gourse, R.L. und Ebright, R.H. (1994)** Domain organization of RNA polymerase alpha subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell* **78**, 889-896.
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, K.L., Wood, S. und Buttner, M.J. (1992)** Isolation and characterization of the major vegetative RNA polymerase of *Streptomyces coelicolor* A3(2); renaturation of a sigma subunit using GroEL. *Mol. Microbiol.* **6**, 1133-1139.

- Bucca, G., Hindle, Z. und Smith, C.P. (1997)** Regulation of the *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is governed by HspR, an autoregulatory repressor protein. *J. Bacteriol.* **175**, 5999-6004.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987)** *Biotechniques* **5**, 376-378.
- Busby, S. und Ebricht, R.H. (1994)** Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**, 743-746.
- Buttner, M.J. (1989)** RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **3**, 1653-1659.
- Buttner, M.J. (1990)** Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **172**, 3367-3378.
- Buttner, M.J. und Brown, N.L. (1985)** RNA polymerase-DNA interactions in *Streptomyces*: *In vitro* studies of a *S. lividans* plasmid promoter with *S. coelicolor* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **185**, 177-188.
- Buttner, M.J., Fearnley, I.M. und Bibb, M.J. (1987)** The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 101-109.
- Buttner, M.J., Smith, A.M. und Bibb, M.J. (1988)** At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Cell* **52**, 599-607.
- Chamberlin, M. (1974)** The selectivity of transcription. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 721-775.
- Champness, W.C. und Chater, K.F. (1994)** Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp. In: Piggot, P., Youngman, P. und Moran, C. (Hrsg.) Regulation of bacterial differentiation. S. 61-93, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Chater, K. F. (1993)** Genetics of differentiation in streptomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 685-713.
- Chater, K.F. (1998)** Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* **144**, 1465-1478.
- Chater, K.F. und Bibb, M.J. (1997)** Regulation of bacterial antibiotic production. In: Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P. (Hrsg.) Biotechnology, 2<sup>nd</sup> edition, Vol. 7, Products of Secondary Metabolism. S. 57-96, VCH-Verlag, Weinheim.
- deHaseth P.L. und Helmann J.D. (1995)** Open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. *Mol. Microbiol.* **15**, 817-824.
- Demain, A.L. und Inamine, E. (1970)** Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase ( $\alpha$ -D-mannosidase) formation. *Bacteriol. Rev.* **34**, 1-19.
- Distler, J. und Piepersberg, W. (1985)** Cloning and characterization of a gene coding for a streptomycin-phosphorylating activity from *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**, 113-117.
- Distler, J., Klier, K., Piendl, W., Werbitzki, O., Böck, A., Kresze, G. und Piepersberg, W. (1985a)** Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* I: Charakterization of streptomycin-idiotrophic mutants. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**, 145-150.
- Distler, J., Mansouri, K. und Piepersberg, W. (1985b)** Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. II: Adjacent genomic location of biosynthetic genes and two streptomycin resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**, 151-154.
- Distler, J., Braun, C., Ebert, A. und Piepersberg, W. (1987a)** Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: Analysis of a central region including the major resistance gene. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 204-210.

- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M. und Piepersberg, W. (1987b)** Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucl. Acids Res.* **15**, 8041-8056.
- Distler, J., Mansouri, K. und Piepersberg, W. (1990)** Regulation of biosynthesis of streptomycin. In: Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L., Durand, G. und Penasse, L. (Hrsg.) 64th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Strasbourg, S. 379-392.
- Distler, J., Mansouri, K., Mayer, G., Stockmann, M. und Piepersberg, W. (1992)** Streptomycin biosynthesis and its regulation in streptomycetes. *Gene* **115**, 105-111.
- Dodd, I. und Egan, J.B. (1990)** Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucl. Acids Res.* **18**, 5019-5026.
- Egan, S., Wiener, P., Kallifidas, D. und Wellington, E.M.H. (1998)** Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within streptomycetes isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 5061-5063.
- Enquist, L.W. und Bradley, S.G. (1971)** Characterization of deoxynucleotide acid from *Streptomyces venezuelae* species. *Dev. Ind. Microbiol.* **12**, 225-236.
- Ensign, J.C. (1988)** Physiological regulation of sporulation of *Streptomyces griseus*. In: Okami, Y., Beppu, T. und Ogawara, H. (Hrsg.) *Biology of Actinomycetes* 88. S. 309-315, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Fernandez-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A. und Malpartida, F. (1991)** The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *blaA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* **66**, 769-780.
- Perez-Llarena, F.J., Liras, P., Rodriguez-Garcia, A. und Martin, J. (1997)** A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both  $\beta$ -lactam compounds. *J. Bacteriol.* **179**, 2053-2059.
- Freemont, P.S., Lane, A.N. und Sanderson, M.R. (1991)** Structural aspects of protein-DNA recognition. *Biochem. J.* **278**, 1-23.
- Fuji, T., Gramajo, H.C., Takano, E. und Bibb, M.J. (1996)** *redD* and *actII-ORFIV*, pathway-specific regulatory genes for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), are transcribed *in vitro* by an RNA polymerase holoenzyme containing  $\sigma^{\text{hrdD}}$ . *J. Bacteriol.* **178**, 3402-3405.
- Gilbert, W. und Müller-Hill, B. (1966)** Isolation of lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 1891-1898.
- Gräfe, U. (1992)** In: *Biochemie der Antibiotika*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- Gralla, J.D. und Collado-Vides, J. (1996)** Organization and function of transcription regulatory elements. In: Neidhart, F.C. (Hrsg.) *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*. 2<sup>nd</sup> edition, S. 1232-1245, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Gramajo, H.C., Takano, E. und Bibb, M.J. (1993)** Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Mol. Microbiol.* **7**, 837-845.
- Grisebach, H. (1978)** Biosynthesis of sugar components of antibiotic substances. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **35**, 81-126.
- Gross, C., Lonetto, M. und Losick, R. (1992)** Bacterial sigma factors. In: McKnight, S.L. und Yamamoto, K. (Hrsg.) *Transcriptional Regulation*. Vol. 1. S. 129-176, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

- Heinrich, P. (1986)** Guidelines for quick and simple plasmid sequencing. Laborhandbuch, Boehringer, Mannheim.
- Heinzel, P., Werbitzky, O., Distler, J. und Piepersberg, W. (1988)** A second streptomycin resistance gene from *Streptomyces griseus* codes for streptomycin-3"-phosphotransferase. Relationship between antibiotic and protein kinases. Arch. Microbiol. **150**, 184-192.
- Helmann, J.D. und Chamberlain, M.J. (1988)** Structure and function of bacterial sigma factors. Ann. Rev. Biochem. **57**, 839-872.
- Henikoff, S. (1988)** A large family of bacterial activator proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **85**, 6602-6606.
- Higgins, C.F. (1992)** ABC transporters: from microorganisms to man. Annu. Rev. Cell Biol. **8**, 67-113.
- Hobbs, G., Obanye, A.I., Petty, J., Mason, J.C., Barratt, E., Gardner, D.C., Flett, F., Smith, C.P., Broda, P. and Oliver, S.G. (1992)** An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol. **174**, 1487-1494.
- Hochschild, A., Irwin, N. und Ptashne, M. (1983)** Repressor structure and the mechanism of positive control. Cell **32**, 319-325.
- Hochschild, A. und Ptashne, M. (1986)** Cooperative binding of lambda repressors to sites separated by integral turns of the DNA helix. Cell **44**, 681-687.
- Holt, T.G., Chang, C., Laurent-Winter, C., Murakami, T., Garrels, J.J., Davies, J.E. und Thompson, C.J. (1992)** Global changes in gene expression related to antibiotic synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. Mol. Microbiol. **6**, 969-980.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Bruton, C.J., Chater K. F., Feitelson, J.S. und Gil, J.A., (1983)** Cloning *Streptomyces* genes for antibiotic production, Trends Biotechnol. **1**, 42-48.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Ward, J.M. und Schrempf, H. (1985)** In: Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich.
- Horinouchi, S. und Beppu, T. (1984)** Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. J. Bacteriol. **158**, 481-487.
- Horinouchi, S., Suzuki, H., Nishiyama, M. und Beppu, T. (1989)** Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* gene (*afsA*) responsible for A-factor biosynthesis. J. Bacteriol. **171**, 1206-1210.
- Horinouchi, S. und Beppu, T. (1994)** A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Mol. Microbiol. **12**, 859-864.
- Horner, W.H. (1967)** Streptomycin. In: Gottlieb, D. und Shaw, P.D. (Hrsg.) Antibiotics biosynthesis. Vol. 2, S. 373-399, Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
- Hunter, G.D. und Hockenhull, D.J.D. (1955)** Actinomycete metabolism. Incorporation of <sup>14</sup>C-labelled compounds into streptomycin. Biochem. J. **59**, 268-272.
- Ingram, C., Brawner, M., Youngman, P. und Westpheling, J. (1989)** XylE functions as an efficient reporter gene in *Streptomyces* spp.: use for the study of *galpI*, a catabolite-controlled promoter. J. Bacteriol. **171**, 6617-6624.
- Ishihama, A. (1993)** Protein-protein communication within the transcription apparatus. J. Bacteriol. **175**, 1283-1289.
- Johnson, A., Meyer, B. und Ptashne, M. (1979)** Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by the lambda phage repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5061-5065.

- Kakinuma, S., Takada, Y., Ikeda, H., Tanaka, H., Omura, S. und Hopwood, D.A. (1991)** Cloning of large DNA fragments, which hybridize with actinorhodin biosynthesis genes, from kalafungin and nanaomycin A methyl ester producers and identification of genes for kalafungin biosynthesis of the kalafungin producer. *J. Antibiot.* **44**, 995-1005.
- Karow, E.O., Peck, R.L., Rosenblum, C. und Woodbury, D.T. (1952)** Microbiological synthesis of <sup>14</sup>C-labeled streptomycin. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 3056-3059.
- Khoklov, A.S., Tovarova, I.I., Borisova, L.N., Pliner, S.A., Schevchenko, L.A., Kornitskaya, E.Y., Ivkina, N.S. und Rapoport, I.A. (1967)** A-factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **177**, 232-235.
- Kniep, B. und Grisebach, H. (1980a)** Biosynthesis of streptomycin. Purification and properties of dTDP-L-dihydrostreptose: streptidine-6-phosphate dihydrostreptosyltransferase from *Streptomyces griseus*. *Eur. J. Biochem.* **105**, 139-144.
- Kniep, B. und Grisebach, H. (1980b)** Biosynthesis of streptomycin. Enzymatic formation of dihydrostreptomycin-6-phosphate from dihydrostreptosyl streptidine-6-phosphate. *J. Antibiot.* **33**, 416-419.
- Kormanec, J., Farkasovsky, M. und Potuckova, L. (1992)** Four genes in *Streptomyces aureofaciens* containing a domain characteristic of principal sigma factors. *Gene* **122**, 63-70.
- Kwakmann, J.H. und Postma, P.W. (1994)** Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **176**, 2694-2698.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lange, R. und Hengge-Aronis, R. (1994)** The cellular concentration of the  $\sigma^s$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation and protein stability. *Genes Dev.* **8**, 1600-1612.
- Lyutskanova, D., Distler, J. und Altenbuchner, J. (1997)** A spectinomycin resistance determinant from the spectinomycin producer *Streptomyces flavopersicus*. *Microbiology* **143**, 2135-2143.
- Maier, S. und Grisebach, H. (1979)** Biosynthesis of streptomycin. Enzymatic oxidation of dihydrostreptomycin (6-phosphate) to streptomycin (6-phosphate) with a particulate fraction of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Acta* **586**, 231-241.
- Malan, T., Kolb, A., Buc, H. und McClure, W. (1984)** Mechanism of CRP-cAMP activation of lac operon transcription initiation activation of the P1 promoter. *J. Mol. Biol.* **180**, 881-909.
- Mansouri, K. und Piepersberg, W. (1991)** Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of five genes, *strFGHIK*, including a phosphatase gene. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 459-469.
- Marck, C. (1988)** 'DNA-Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nuc. Acids Res.* **16**, 1829-1836
- Marcos, A.T., Guterrez, S., Diez, B., Fernandez, F.J., Oguiza J.A. und Martin, J.F. (1995)** Three genes *hrdB*, *hrdD* and *hrdT* of *Streptomyces griseus* IMRU 3570, encoding sigma factor-like proteins, are differentially expressed under specific nutritional conditions. *Gene* **153**, 41-48.
- Marsh, P. und Wellington, E.M.H. (1994)** Molecular ecology of filamentous actinomycetes in soil. In: O'Gara, F., Dowling, D.N. und Boesten, B. (Hrsg.) *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. Biotechnology and the release of GMOs.* S. 2133-2149, VCH Verlag. Weinheim.
- Mathews, B. W., Ohlendorf, D.H., Anderson, W.F. und Takeda, Y. (1982)** Structure of the DNA-binding region of *lac* repressor inferred from its homology with *cro* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1428-1432.

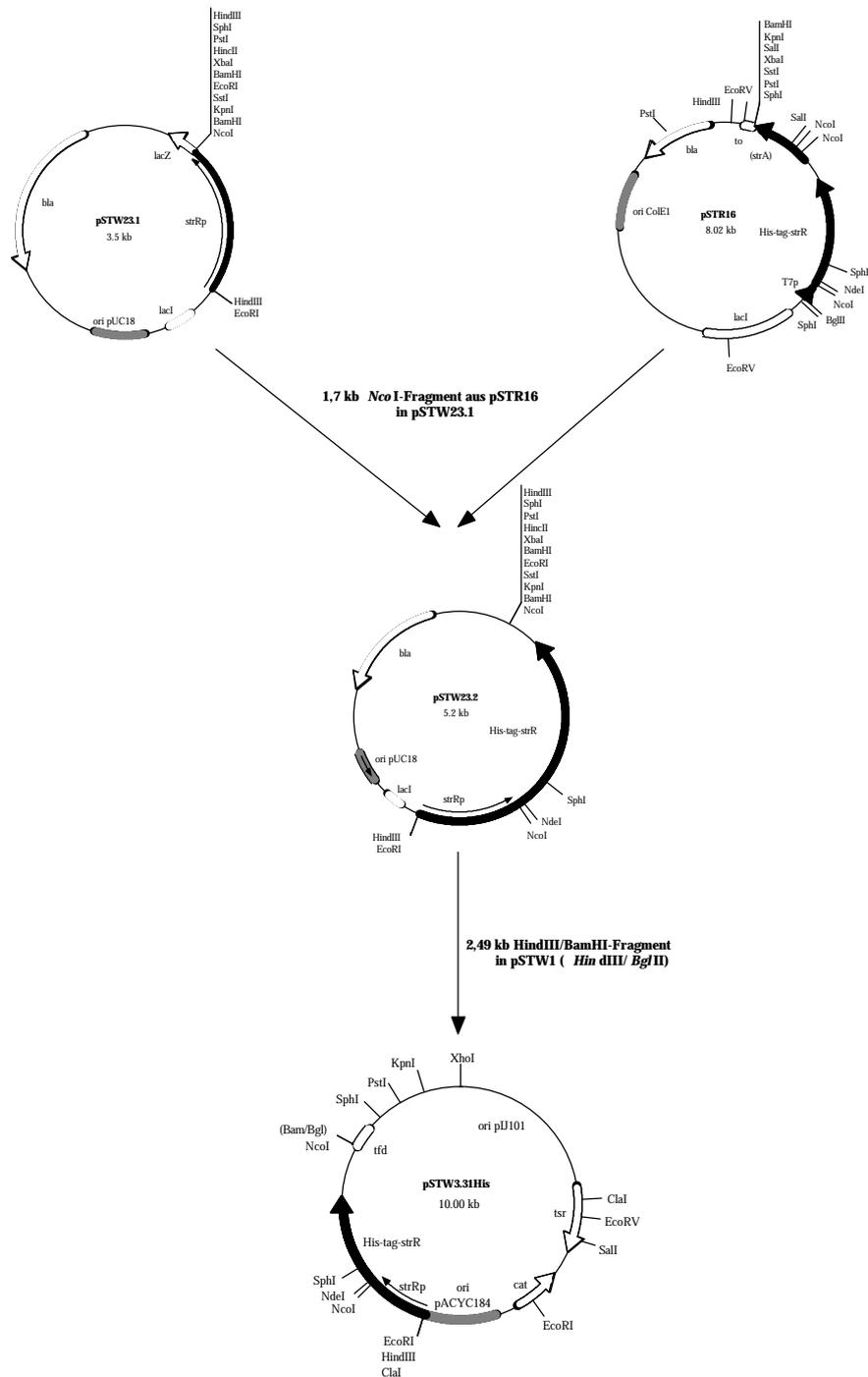
- Mayer, G. (1994)** Molekulare Analyse und Evolution von 5'-Hydroxystreptomycin- und Bluensomycin-Biosynthesegenen aus *Streptomyces glaucescens* GLA.0 und *Streptomyces bluensis* ISP 5564. Dissertation, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal.
- McClure, W. (1985)** Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 171-204.
- Mehling, A., Wehmeier, U.F. und Piepersberg, W. (1995)** Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 119-126.
- Mendez, C., Brana, A.F., Manzanal, M.B. und Hardisson, C. (1985)** Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* **3**, 446-450.
- Miller, A.L. und Walker, J.B. (1970)** Enzymatic phosphorylation of streptomycin by extracts of streptomycin-producing strains of *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* **99**, 401-405.
- Miller, J.H. (1972)** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, S. 433.
- Moazed, D. und Noller, F. (1987)** Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* **327**, 389-394.
- Modollel, J. und Davies, B.D. (1970)** Breakdown by streptomycin of initiation complexes formed on ribosomes of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 1148-1155.
- Motamedi, H., Shafiee, A. und Sheng-Jian, C. (1995)** Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces* spp. *Gene* **165**, 25-31.
- Munro, M.H.G., Taniguchi, M., Rinehart, K.L. Jr., Gottlieb, D., Stoudt, T.H. und Rogers, T.O. (1975)** Carbon-<sup>13</sup>C evidence for the stereochemistry of streptomycin biosynthesis from glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4782-4783.
- Muth, G., Wohlleben, W. und Pühler, A. (1988)** The minimal replicon of the *Streptomyces ghanaensis* plasmid pSG5 identified by subcloning and Tn5 mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* **211**, 424-429.
- Muth, G., Nußbaumer, B., Wohlleben, W. und Pühler, A. (1989)** A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in Streptomycetes. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 341-348.
- Neumann, T. (1996)** „Decision/Execution-Phase“-Modell der Wachstums- und Differenzierungsregulation bei Streptomyceten. Dissertation, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal.
- Neumann, T., Distler, J. und Piepersberg, W. (1996)** Decision phase regulation of streptomycin production in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **142**, 1953-1963.
- Newlands, J., Josaitis, C., Ross, W. und Gourse, R. (1992)** Both fis-dependent and factor-independent upstream activation of the *rrnB* P1 promoter are face of the helix dependent. *Nucl. Acids Res.* **20**, 719-726.
- Nierhaus, K.H., Bordasch, K. und Homann, H.E. (1973)** Ribosomal proteins. XLIII. *In vivo* assembly of *Escherichia coli* ribosomal proteins. *J. Mol. Biol.* **47**, 587-594.
- Nimi, O., Kiyohara, H., Mizoguchi, T., Ohata, Y. und Nomi, R. (1970)** Biosynthesis of streptomycin. Part VII. A specific enzyme responsible for dephosphorylation of phosphorylated streptomycin. *Agr. Biol. Chem.* **34**, 1150-1156.
- Niu, W., Zhou, Y., Qianping, D., Ebright, Y.W. und Ebright, R.H. (1994)** Characterization of the activating region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP). I. Saturation and alanine-scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **243**, 595-602.

- Ohnuki, T., Imanaka, T. und Aiba, S. (1985)** Self-cloning in *Streptomyces griseus* of an *str* gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance. *J. Bacteriol.* **164**, 85-94.
- Okamoto, S., Nakamura, K., Nihira, T. und Yamada, Y. (1995)** Virginiae butanolide binding protein from *Streptomyces virginiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 12319-12326.
- Okuda, T. und Ito, Y. (1982)** Biosynthesis of major aminoglycosides. I. Streptomycin and bluensomycin. In: Umezawa, H. und Hooper, I.R. (Hrsg.) *Aminoglycoside antibiotics*. S. 111-203, Springer Verlag. Berlin.
- Omura, S. (1992)** The expand horizon for microbial metabolites - a review. *Gene* **115**:141-149.
- Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T. und Horinouchi, S. (1995)** Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **177**, 6083-6092.
- Onaka, H. und Horinouchi, S. (1997)** DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequences. *Mol. Microbiol.* **24**, 991-1000.
- Orchard, K. und May, G.E. (1993)** An EMSA-based method for determining the molecular weight of a protein-DNA complex. *Nucl. Acids Res.* **21**, 3335-3336.
- Pabo, C.O. und Sauer, R.T. (1992)** Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Pearson, W.R. und Lipman, D.J. (1988)** Improved tools for biological sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 701-705.
- Peschke, U., O'Neill, M. und Baumberg, S. (1991)** Analysis of the *adh-strBI* intercistronic region and the activation of *strBI* expression by StrR, Posternr. P1-104, University of Wisconsin: Eight International Symposium on the Biology of Actinomycetes.
- Perez-Llarena, F.J., Liras, P., Rodriguez-Garcia, A. und Martin, J.F. (1997)** A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: Amplification results in overproduction of both  $\beta$ -lactam compounds. *J. Bacteriol.* **179**, 2053-2059.
- Piepersberg, W. (1994)** Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**, 251-285.
- Piepersberg, W. (1995)** Streptomycin and related aminoglycosides. In: Vining, L. und Stuttard, C., (Hrsg.) *Biochemistry and Genetics of Antibiotic Biosynthesis*. S. 71-110, Butterworth-Heinemann. Stoneham.
- Piepersberg, W. (1997)** Molecular biology, biochemistry, and fermentation of aminoglycoside antibiotics. In: Strohl, W.R. (Hrsg.) *Biotechnology of antibiotics*. 2<sup>nd</sup> edition, S. 81-163, Marcel Dekker Inc. New York, Basel, Hong Kong.
- Piepersberg, W. und Zeek, A. (1994)** Mikrobieller Stoffwechsel. In: Präve, P., Faust, U., Sittig, W. und Sukatsch, D.A. (Hrsg.) *Handbuch der Biotechnologie*, 4. Auflage, S. 141-177, R. Oldenbourg Verlag. München.
- Piepersberg, W. und Distler, J. (1997)** Aminoglycosides and sugar compounds in other secondary metabolites. In: Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P. (Hrsg.) *Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> edition, Vol. 7, *Products of Secondary Metabolism*. S. 397-488, VCH-Verlag. Weinheim.
- Potuckova, L., Kelemen, G.H., Findlay, K.C., Lonetto, M.A., Buttner, M.J. und Kormanec, J. (1995)** A new RNA polymerase sigma factor,  $\sigma^E$ , is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* ssp. *Mol. Microbiol.* **17**, 37-48.
- Ptashne, M. (1992)** In: *A genetic switch. Phage  $\lambda$  and higher organisms*. 2<sup>nd</sup> edition. Cell press and Blackwell scientific publications. Cambridge, Massachusetts.

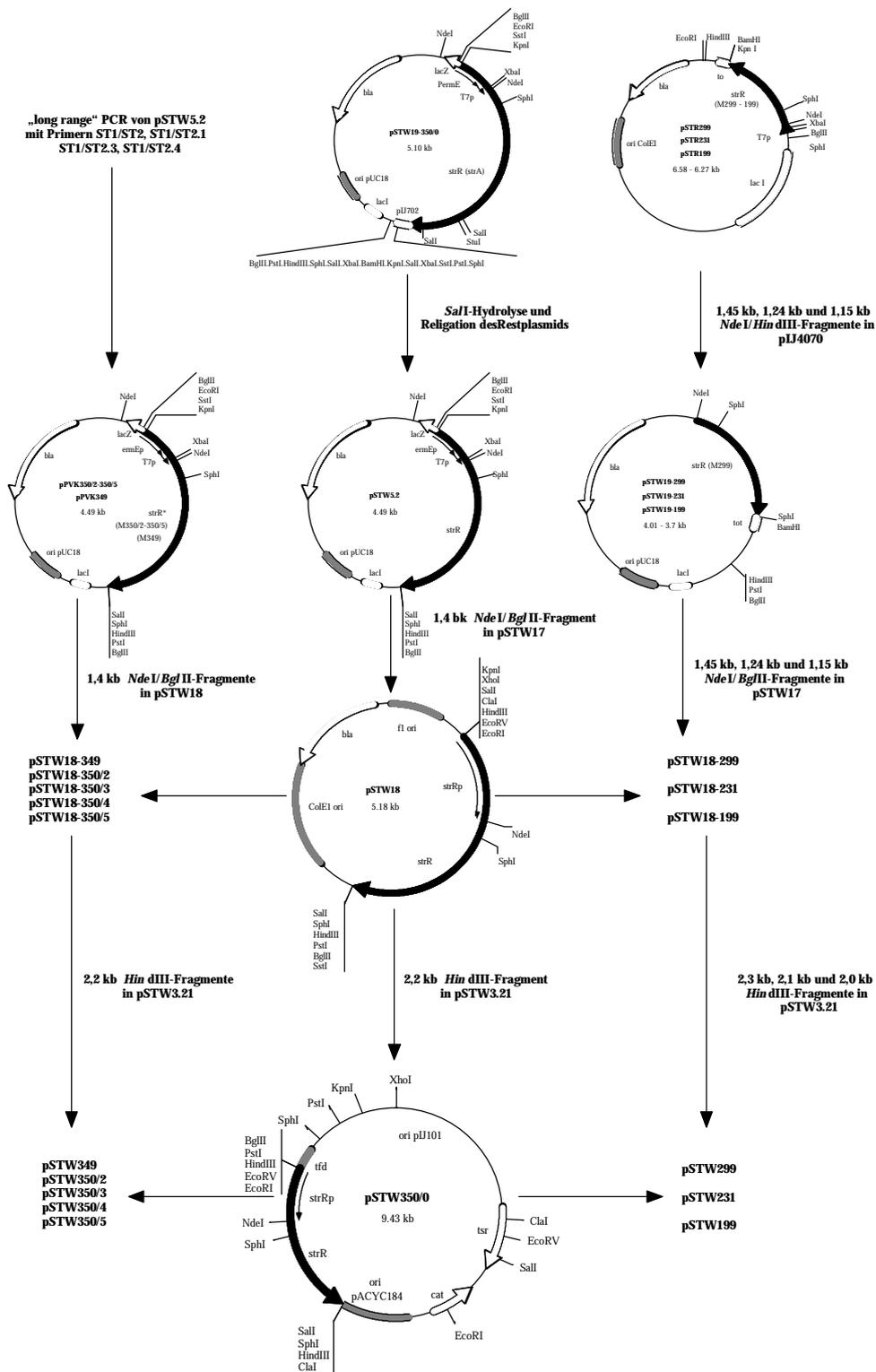
- Raibaud, A., Zalacain, M., Holt, T.G., Tizard, R. und Thompson, C.J. (1991)** Nucleotide sequence analysis reveals linked N-acetyl hydrolase, thioesterase, transport, and regulatory genes encoded by the bialaphos biosynthetic gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Bacteriol.* **173**, 4454-4463.
- Ramos, J.L., Marques, S. und Timmis, K. (1997)** Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 341-373.
- Rao, L., Ross, W., Appleman, J., Gaal, T., Schlax, P., Record, M. und Gourse, R. (1994)** Factor independent activation of *rrnB* P1. An "extended" promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength. *J. Mol. Biol.* **235**, 1421-1435.
- Ren, Y., Garges, S., Adhya, S. und Krakow, J. (1988)** Cooperative DNA binding of heterologous proteins: evidence for contact between the cyclic AMP receptor protein and RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4138-4142.
- Retzlaff, L., Mayer, G., Beyer, S., Ahlert, A., Verseck, S., Distler, J. und Piepersberg, W. (1993)** Streptomycin production in streptomycetes: a Progress Report. In: Hegeman, G. D., Baltz, R. H. und Skatrud, P. L. (Hrsg.) *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular genetics*. S. 183-194. American Society for Microbiology.
- Retzlaff, L. und 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. (1996)** StrR, Aktivator der Streptomycin-Biosynthese in *Streptomyces griseus*. Genetische und biochemische Untersuchungen zum Regulationsmechanismus. Dissertation, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal.
- Rinehart, K.L. Jr. (1980)** Biosynthesis and mutasynthesis of aminocyclitol antibiotics. In: Rinehart, K.L. und Suami, T. (Hrsg.) *Aminocyclitol Antibiotics*, ACS Symposium Series 125. American Chemical Society, Washington D.C.
- Rinehart, K.L. Jr. und Stroshane, R.M. (1976)** Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. *J. Antibiot.* **29**, 319-353.
- Ross, W., Gosink, K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C. Ishihama, A., Severinov, K. und Gourse, R. (1993)** A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* **262**, 1407-1413.
- Sadler, J.R., Sasmor, H. und Betz, J.L. (1983)** A perfectly symmetric lac operator binds the lac repressor very tightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6785-6789.
- Sambrook, J., Fritsch E.F. und Maniatis, T. (1989)** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklan, S. und Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-determination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schatz, A., Bugie, E. und Waksman, S.A. (1944)** Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**, 66-69.
- Schmitz, A., Schmeissner, U., Miller, J.H. und Lu, P. (1976)** Mutations affecting the quaternary structure of the lac repressor. *J. Biol. Chem.* **251**, 3359-3366.
- Schultz, S.C., Shields, G.C. und Steitz, T.A. (1991)** Crystal structure of a CAP-DNA complex: The DNA is bent by 90°. *Science* **253**, 1001-1007.
- Shapiro, S. (1989)** Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. In: Shapiro, S. (Hrsg.) *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycete*. S. 135-211, CRC Press Inc. Boca Raton.

- Shih, M. und Gussin, G. (1983)** Differential effects of mutations on discrete steps in transcription initiation at the lambda PRE promoter. *Cell* **34**, 941-949.
- Shinkawa, H., Fujita, N., Shiina, T., Tanaka, K., Takahashi, H., Ishihama, A. und Nimi, O. (1995a)** Purification and characterization of RNA polymerase holoenzyme ( $E\sigma^B$ ) from vegetative-phase mycelia of *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* **118**, 488-493.
- Shinkawa, H., Hatada, Y., Okada, M., Kinashi, H. und Nimi, O. (1995b)** Nucleotide sequence of a principal sigma factor gene (*hrdB*) of *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* **118**, 494-499.
- Shinkawa, H., Kawamoto, K., Ohmori, Y., Kinashi, H. und Nimi, O. (1996)** Cloning and nucleotide sequence of the genes *hrdA* and *hrdD*: members of *rpoD* family in *Streptomyces griseus*. *Actinomycetol.* **10**, 23-34.
- Steitz, T.A., Ohlendorf, D.H., McKay, D.B., Anderson, W.F. und Matthews, B.W. (1982)** Structural similarity in the DNA-binding domains of catabolite gene activator and cro repressor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3097-3100.
- Strohl, W.R. (1992)** Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucl. Acids Res.* **20**, 961-974.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990)** Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**, 60-89.
- Suckow, J., Markiewicz, P., Kleina, L.G., Miller, J., Kisters-Woike, B. und Müller-Hill, B. (1996)** Genetic studies of the lac repressor  $XV\ddagger$ : 4000 single amino acid substitutions and analysis of the resulting phenotypes on the basis of the protein structure. *J. Mol. Biol.* **261**, 509-523.
- Takano, E., Gramajo, H.C., Strauch, E., Andres, N., White, J. und Bibb, M.J. (1992)** Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **6**, 2797-2804.
- Takano, E., White, J., Thompson, C.J. und Bibb, M.J. (1995)** Construction of thiostreptone-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* **166**, 133-137.
- Tanaka, K., Shiina, T. und Takahashi, H. (1988)** Multiple principle sigma factor homologs in eubacteria: identification of the "rpoD box". *Science* **242**, 1040-1042.
- Tanaka, K., Shiina, T. und Takahashi, H. (1991)** Nucleotide sequence of the genes *hrdA*, *hrdC* and *hrdD* from *Streptomyces coelicolor* A3(2) having similarity to *rpoD* gene. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 334-340.
- Tang, L., Grimm, A., Ying-Xin, Z. und Hutchinson, C.R. (1996)** Purification and characterization of the DNA-binding protein DnrI, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peuceticus*. *Mol. Microbiol.* **22**, 801-813.
- Vazquez, D. (1979)** Progress in pharmacological methodology: active sites of antibiotics that interact with ribosomes. *Arch. Farmacol. Toxicol.* **5**, 187-190.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982)** The pUC plasmids and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
- Vögtli, M. und Hütter, R. (1987)** Characterization of the hydroxystreptomycin phosphotransferase gene (*sph*) of *Streptomyces glaucescens*: nucleotide sequencing and promoter analysis. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 195-203.
- Vujaklija, D., Ueda, K., Hong, S., Beppu, T. und Horinouchi, S. (1991)** Identification of an A-factor-depend promoter in the streptomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 119-128.
- Vujaklija, D., Horinouchi, S. und Beppu, T. (1993)** Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *strR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **175**, 2652-2661.

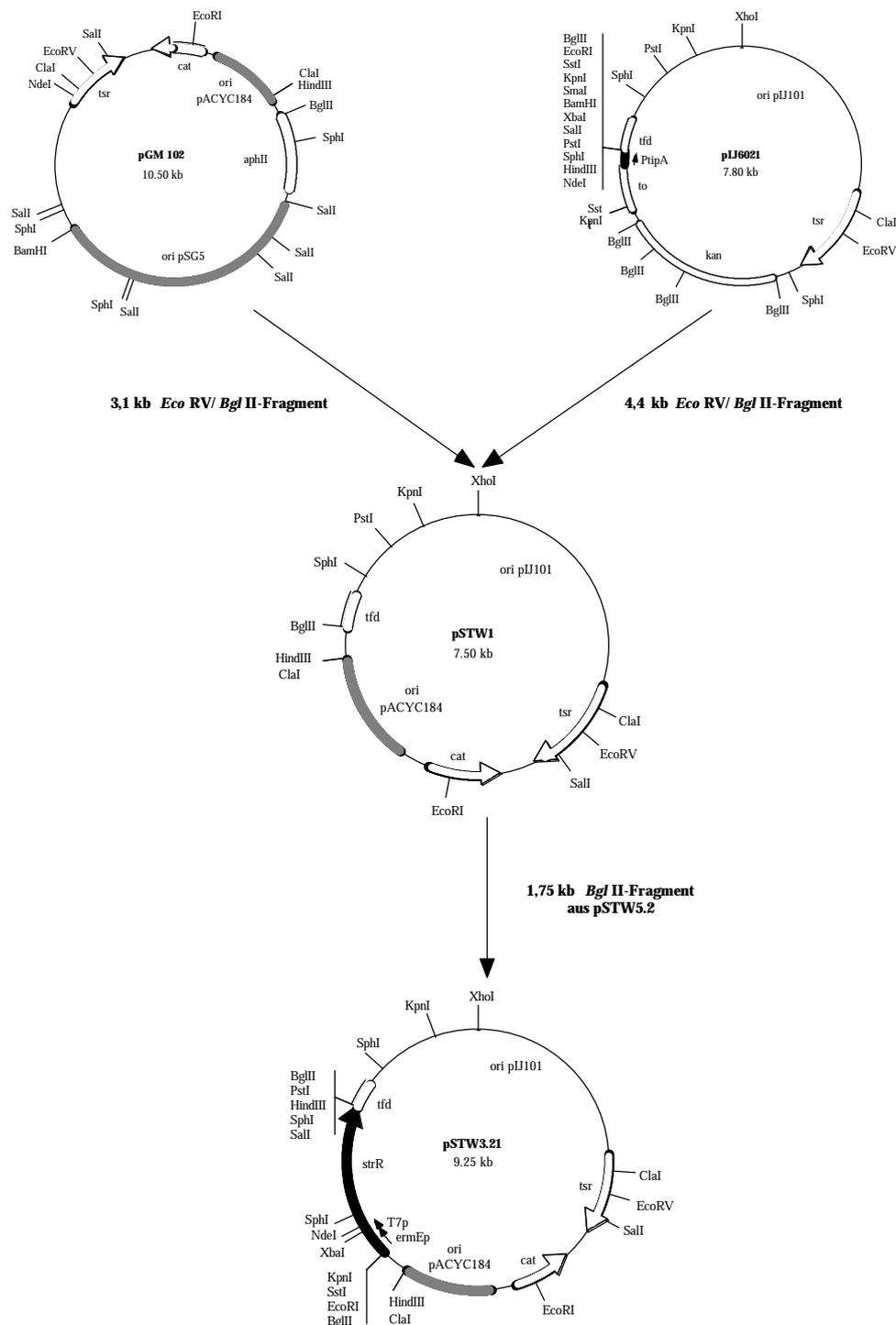
- Walker, J.B. (1975a)** Pathways of biosynthesis of the guanidinated inositol moieties of streptomycin and bluensomycin. *Meth. Enzymol.* **43**, 429-470.
- Walker, J.B. (1975b)** ATP:streptomycin 6-phosphotransferase. *Meth. Enzymol.* **43**, 628-632.
- Weber, I.T. und Steitz, T.A. (1984)** Model of specific complex between catabolite gene activator protein and B-DNA suggested by electrostatic complementarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3973-3977.
- Wedel, A., Weiss, D.S., Popham, D., Dröge, P. und Kustu (1990)** A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. *Science* **248**, 486-489.
- Weiß, D.S., Klose, K.E., Hoover, T.R., North, A.K., Porter, S.C., Wedel, A.B. und Kustu, S. (1992)** Prokaryotic transcriptional enhancers. In: *Transcriptional Regulation*. McKnight, S.L. und Yamamoto, K.R. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, S.667-694.
- Westpheling, J., Raynes, M. und Losick R. (1985)** RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor*. *Nature* **313**, 22-27.
- Wietzorrek, A. und Bibb, M.J. (1997)** A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol. Microbiol.* **25**, 1177-1184.
- Williams, S.M., Savery, N.J., Busby, S.J.W. und Wing, H.J. (1997)** Transcription activation at class I FNR-dependent promoters: identification of the activating surface of FNR and the corresponding contact site in the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4028-4034.
- Wing, H.J., Williams, S.M. und Busby, S.J. (1995)** Spacing requirements for transcriptional activation by *Escherichia coli* FNR protein. *J. Bacteriol.* **177**, 6704-6710.
- Wyman, C., Rombel, I., North, A.K., Bustamante, C. und Kustu, S. (1997)** Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *Science* **275**, 1658-1661.
- Yager, T.D. und Hippel, P.H. (1987)** Transcript elongation and termination. In: Neidhart, F.C. (Hrsg.) *Escherichia coli und Salmonella typhimurium*. S. 1242-1275, American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Ylihonko, K., Tuikkanen J., Jussila, S., Cong, L. und Mantsala, P. (1996)** A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 113-120.
- Yura, K., Tomoda, S. und Go, M., (1993)** Repeat of a helix-turn-helix module in DNA-binding proteins. *Protein Eng.* **6**, 621-628.
- Zhou, Y., Zhang, X. und Ebright, R.H. (1993)** Identification of the activating region of catabolite gene activator protein (CAP): Isolation and characterization of mutants of CAP specifically defective in transcription activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6081-6085.
- Zhou, Y., Merkel, T.J. und Ebright R.H. (1994)** Characterization of the activating region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP). II. Role at class I and class II CAP-dependent promoters. *J. Mol. Biol.* **243**, 603-610.
- Zinkel, S.S. und Crothers, D.M. (1991)** Catabolite activator protein-induced DNA bending in transcription initiation. *J. Mol. Biol.* **219**, 201-215.



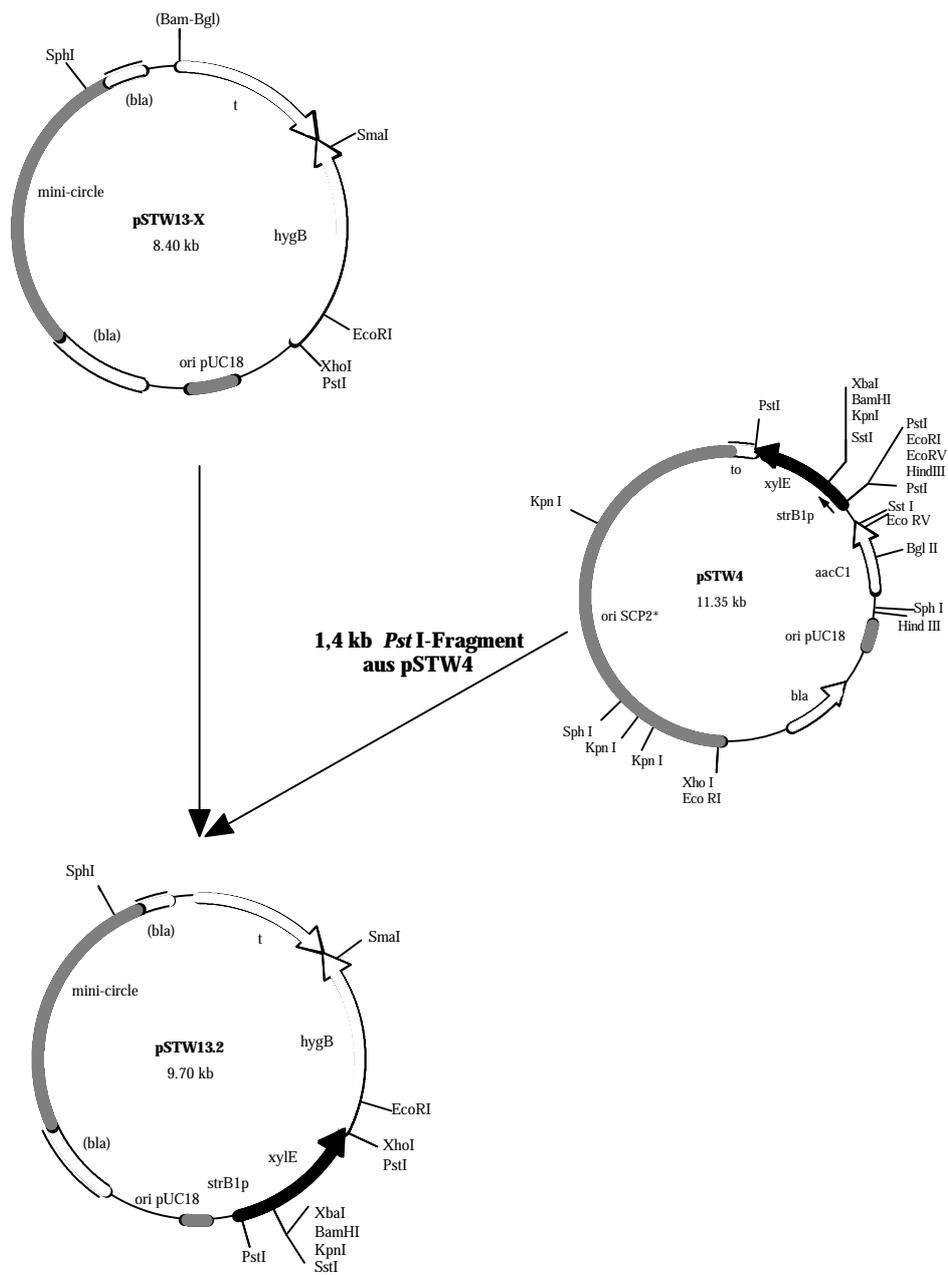
**Anhang 1: Konstruktion von pSTW3.31His.** Folgende Abkürzungen wurden verwendet: (Bam/Bgl), hybride *BamHI/BglII*-DNA-Sequenz; bla, Gen für  $\beta$ -Lactamase; cat, Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase; His-tag-strR, Gen für His-tag-StrR; lacI, Gen für Lac-Repressor; lacZ, Gen für  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase; ori pACYC184, ori pUC18, ori ColE1, Replikationsursprünge in *E. coli*; ori pIJ101, Replikationsursprung von pIJ101 in Streptomyceten („high copy“); (strA), unvollständiges *strA*-Gen; strRp, *strRp*-Promotor; tfd, Transkriptionsterminator des Phagen fd; to, Transkriptionsterminator des  $\lambda$ -Phagen; tsr, Gen für Thiostrepton-Methyltransferase; T7p, *T7F10p*-Promotor.



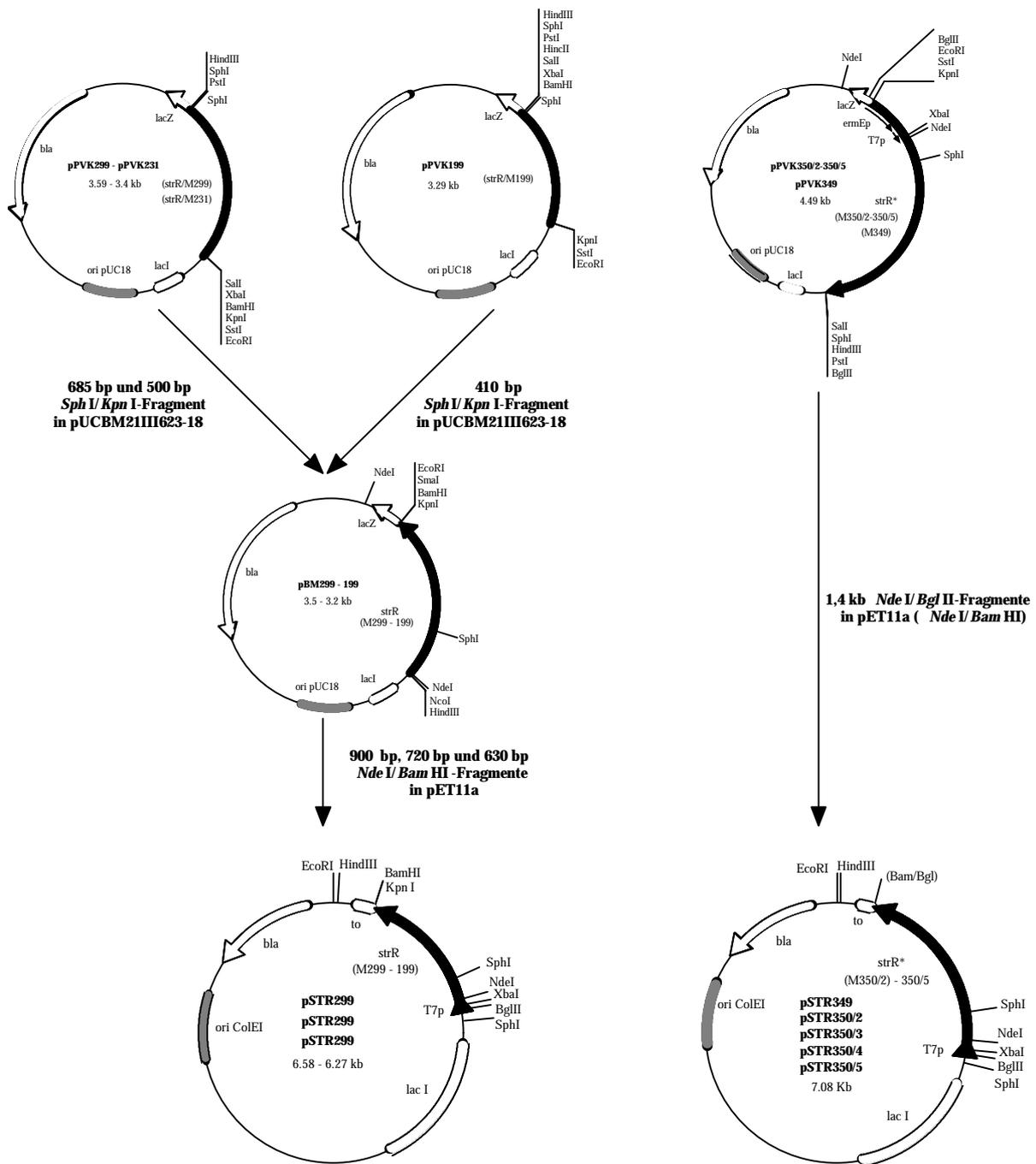
**Anhang 2: Konstruktion der StrR-Expressionsplasmide (*S. lividans*) der pSTW-Serie.** Folgende Abkürzungen wurden verwendet: bla, Gen für  $\beta$ -Lactamase; cat, Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase; ermEp, ermEp-Promotor; lacI, Gen für Lac-Repressor; lacZ, Gen für  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase; ori pACYC184, ori pUC18, ori ColE1, f1 ori, Replikationsursprünge in *E. coli*; ori pIJ101, Replikationsursprung von pIJ101 in Streptomycceten („high copy“); pIJ702, DNA aus Plasmid pIJ702; strR, strR-Gen; strR(M299-199), Leserahmen für C-terminal verkürzte StrR-Proteine M299, M231 und M199; strR(M350/2-350/5, M349), Leserahmen für StrR-HTH-Mutanten M350/2, M350/3, M350/4, M350/5, M349; strR(strA), strR-Gen und unvollständiges strA-Gen; strRp, strRp-Promotor; tfd, Transkriptionsterminator des Phagen fd; to, Transkriptionsterminator des  $\lambda$ -Phagen; tsr, Gen für Thiostrepton-Methyltransferase; T7p, T7F10p-Promotor.



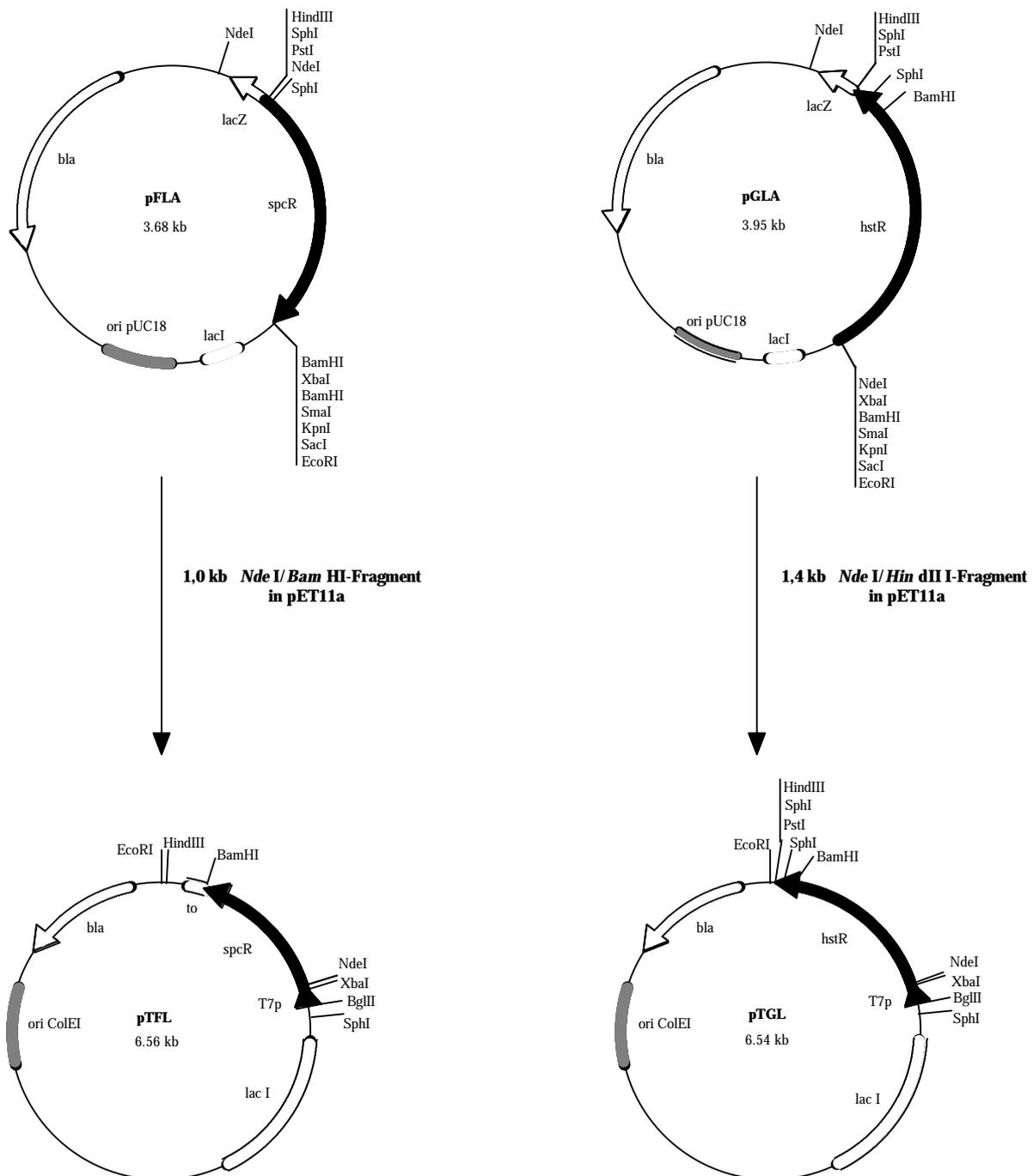
**Anhang 3: Konstruktion der *E. coli*-Streptomyces-„Shuttle“-Plasmide pSTW1 und pSTW3.21.** Folgende Abkürzungen wurden verwendet: aphII, Gen für Kanamycin/Neomycin-Phosphotransferase; cat, Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase; ermEp, *ermEp*-Promotor; kan, Gen für Kanamycin-Acetyltransferase; ori pACYC184, Replikationsursprung in *E. coli*; ori pIJ101, Replikationsursprung von pIJ101 in Streptomyeten („high copy“); ori pSG5 Replikationsursprung in Streptomyeten („medium copy“); strR, *strR*-Gen; tfd, Transkriptionsterminator des Phagen fd; to, Transkriptionsterminator des  $\lambda$ -Phagen; PtipA, *tipAp*-Promotor; tsr, Gen für Thiostrepton-Methyltransferase; T7p, *T7F10p*-Promotor.



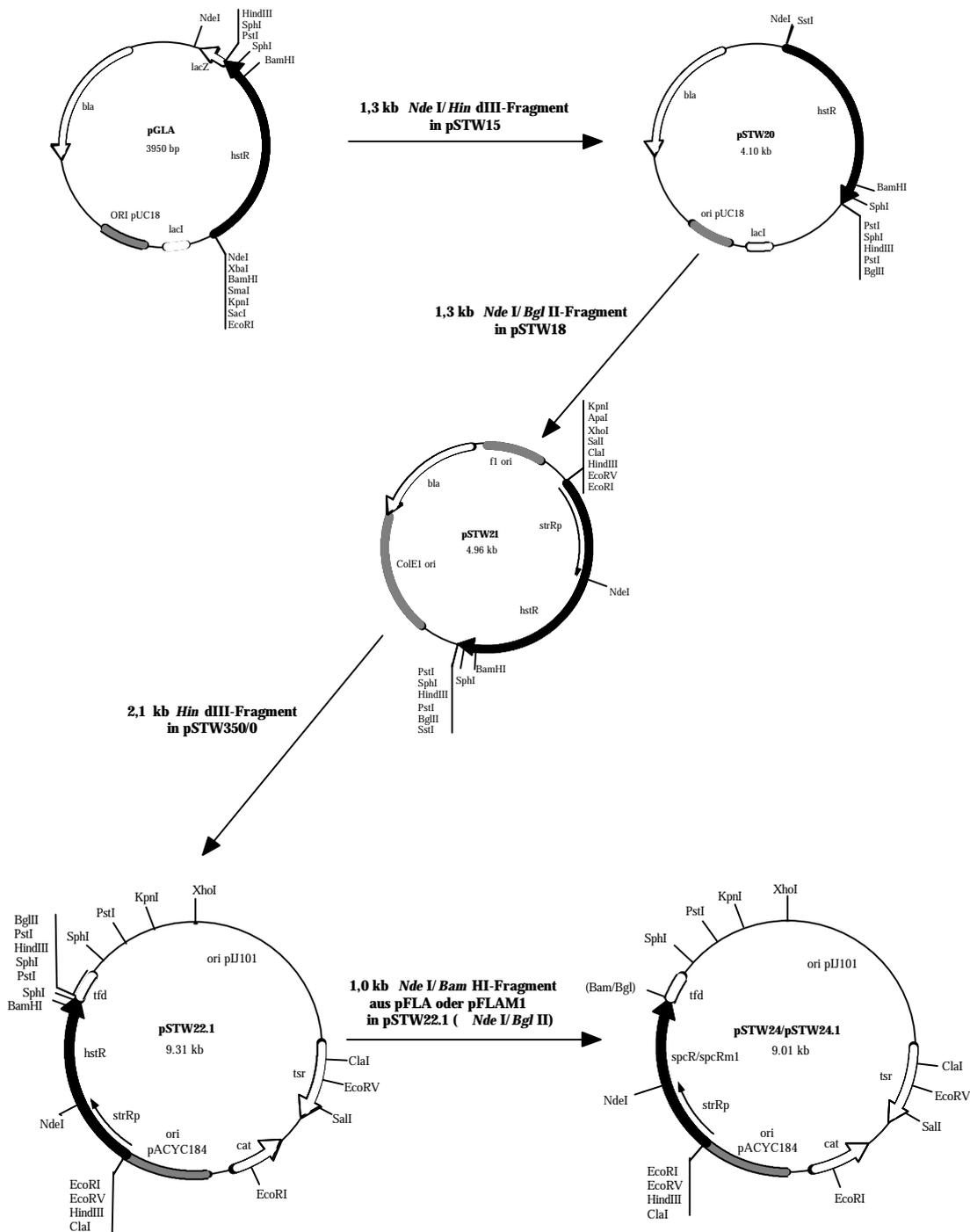
**Anhang 4: Konstruktion des „Reportergen-Plasmids“ pSTW13.2.** Folgende Abkürzungen wurden verwendet: *aacC1*, Gen für Gentamicin-Phosphotransferase; (Bam/Bgl), hybride *Bam*HI/*Bgl*III-DNA-Sequenz; *bla*, Gen für  $\beta$ -Lactamase; (*bla*), unvollständiges Gen für  $\beta$ -Lactamase; *hygB*, Gen für Hygromycin B-Phosphotransferase; mini-circle, mini-circle-DNA aus *S. coelicolor* zur Integration in Streptomyceten-Genome mit „att-site“; *ori pUC18*, Replikationsursprung in *E. coli*; *ori SCP2\**, Replikationsursprung in Streptomyceten („single-copy“); *strB1p*, *strB1p*-Operatorfragment mit *strB1p*-Promotor und StrR-Bindestelle, DNA-Region -274 bis +16, bzgl. Transkriptionsstart (+1); *t*, Transkriptionsterminator aus *Streptomyces* spp. MA6548; *to*, Transkriptionsterminator des  $\lambda$ -Phagen; *xylE*, Gen für Catechol-2,3-dioxygenase.



**Anhang 5: Konstruktion der StrR-Expressionsplasmide (*E. coli*) der pSTR-Serie.** Folgende Abkürzungen wurden verwendet: (Bam/Bgl), hybride *Bam*HI/*Bgl*II-DNA-Sequenz; bla, Gen für  $\beta$ -Lactamase; ermEp, *ermEp*-Promotor; lacI, Gen für Lac-Repressor; lacZ, Gen für  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase; ori pUC18, ori ColE1, Replikationsursprünge in *E. coli*; strR/(M299-199), Leserahmen für C-terminal verkürzte StrR-Proteine M299, M231 und M199; strR\*(M350/2-350/5, M349), Leserahmen für StrR-HTH-Mutanten M350/2, M350/3, M350/4, M350/5, M349; to, Transkriptionsterminator des  $\lambda$ -Phagen; T7p, *T7F10p*-Promotor.



**Anhang 6: Konstruktion der *SpcR*- und *HstR*-Expressionsplasmide (*E.coli*) pTFL und pTGL.** Folgende Abkürzungen wurden verwendet: *bla*, Gen für  $\beta$ -Lactamase; *hstR*, *hstR*-Gen; *lacI*, Gen für Lac-Repressor; *lacZ*, Gen für  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase; *ori pUC18*, *ori ColEI*, Replikationsursprünge in *E. coli*; *spcR*, *spcR*-Gen; *to*, Transkriptionsterminator des  $\lambda$ -Phagen; *T7p*, *T7F10p*-Promotor.



**Anhang 7: Konstruktion der HstR-, SpcR- und SpcRM1-Expressionsplasmide (*S. lividans*) pSTW22.1, pSTW24 und pSTW24.1.** Folgende Abkürzungen wurden verwendet: *bla*, Gen für  $\beta$ -Lactamase; *cat*, Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase; *hstR*, *hstR*-Gen; *lacI*, Gen für Lac-Repressor; *lacZ*, Gen für  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase; *ori pACYC184*, *ori pUC18*, *ori ColE1*, *ori f1*, Replikationsursprünge in *E. coli*; *ori pIJ101*, Replikationsursprung von pIJ101 in Streptomyceten („high copy“); *spcR/spcRm1*, *spcR*- oder *spcRm1*-Gen; *strRp*, *strRp*-Promotor; *tfd*, Transkriptionsterminator des Phagen fd; *tsr*, Gen für Thiostrepton-Methyltransferase.