

**Untersuchungen zur Biosynthese der  
Methylthiolincosaminid (MTL) Untereinheit des Antibiotikums  
Lincomycin A aus *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936**

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 Antje Arnold

Wuppertal  
im Januar 2000

## Danksagung

### Danken möchte ich:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Piepersberg für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit und die umfassende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. G. Vogel für die Übernahme des Korreferats,

Herrn Prof. Dr. H.-J. Altenbach für die Unterstützung während der chemischen Synthese,

Herrn Dr. Udo Wehmeier für die vielen guten Ideen und Anregungen,

Herrn Dr. G. Sprenger und Dr. Uli Schörken für die Bereitstellung der aufgereinigten *E. coli*-Enzyme Transketolase und Transaldolase und für die Unterstützung bei den Enzymtests,

Malte für die äußerst kooperative Zusammenarbeit innerhalb des MTL-Projekts,

desweiteren Marta, Petra, Yvonne, Lina, Elisabeth, Martin, Chang Sheng, Dietmar, Malte, Holger, Christoph, und allen ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises, die auf ihre Weise ihren Beitrag für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre geleistet haben,

ganz besonders meinen Eltern, die die Grundlage für dies alles geschaffen haben, und Dir Lars.

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen

## Zusammenfassung

## Summary

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Merkmale der Streptomyceten	1
1.2	Lincomycin A	2
1.2.1	Struktur, Vorkommen und Wirkung von Lincomycin A	2
1.2.2	Lincomycin-Biosynthese	4
1.2.3	Charakteristische Merkmale der postulierten MTL-Biosyntheseenzyme	10
1.2.3.1	Transaldolase-Enzymfamilie	10
1.2.3.2	Heptulose-Isomerasen	11
1.2.3.3	Kinasen	11
1.2.3.4	Nucleotidyltransferasen	12
1.2.3.5	Dehydratasen	13
1.2.3.6	Die Familie der Aminotransferasen	13
1.3	Zielsetzung der Arbeit	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Chemikalien, Enzyme und Kits	17
2.2	Medien und Lösungen	19
2.2.1	Nährmedien	19
2.2.2	Sprühreagenzien für DC-Entwicklung	20
2.2.3	Antibiotika	21
2.3	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	21
2.4	Vektoren und rekombinante Plasmide	22
2.5	Verwendete Oligonucleotide	28
2.6	Anzucht und Lagerung von Bakterien	29
2.6.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	29
2.6.2	Anzucht von <i>Micrococcus luteus/ Micrococcus luteus</i> DN218	30
2.6.3	Anzucht und Lagerung von <i>Streptomyces sp.</i>	30
2.7	Lincomycin-Bioassay	30

---

2.8	Molekularbiologische Methoden	30
2.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA	30
2.8.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus Streptomyceten	31
2.8.3	Isolierung von RNA aus <i>S. lincolnensis</i> 2936	31
2.8.4	Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten und RNA	31
2.8.5	<i>In vitro</i> Manipulation von Nucleinsäuren	32
2.8.6	Markierung von DNA-Fragmenten	32
2.8.7	Hybridisierung an immobilisierten Nucleinsäuren und deren Detektion	32
2.8.8	Autoradiographie	33
2.8.9	DNA-Sequenzierung	33
2.8.10	DNA- und Aminosäuresequenzanalysen	33
2.8.11	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.8.12	Transformation von <i>E. coli</i> , <i>S. lividans</i> und <i>S. lincolnensis</i>	35
2.8.13	Integration von DNA in das Genom von <i>S. lincolnensis</i>	36
2.8.14	Komplementation erzeugter Mutanten	36
2.8.15	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pLysS und <i>E. coli</i> JM109	37
2.8.16	Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i>	37
2.9	Biochemische Methoden	37
2.9.1	Proteinbestimmung	37
2.9.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.9.3	Reinigung von His-tag-LmbR und His-tag-LmbO mittels Ni-NTA-Agarose	38
2.9.4	Gewinnung von LmbR- und LmbO-Antiserum	38
2.9.5	Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)	39
2.9.6	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine	39
2.9.7	Bestimmung von Promotoraktivität durch Melaninproduktion	40
2.9.8	Bestimmung der Catecholdioxygenase-Aktivität	40
2.9.9	Bestimmung der MTL-, PPL- und Lincomycin A-Produktion mittels HPLC	41
2.10	Chemische Synthesen	41
2.10.1	Selektive Schützung der $\alpha$ -D-Galactose	41
2.10.2	Oxidation der 1,2:3,4-di- <i>O</i> -Isopropyliden- $\alpha$ -D-galacto-pyranose	42
2.10.3	Darstellung des Wittig-Reagenzes Methoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran	43
2.10.4	Kettenverlängerung: Wittig-Reaktion	43
2.10.5	Reduktion mit $\text{LiAlH}_4$	44
2.10.6	Oxidation der Doppelbindung der <i>Z</i> -Octenopyranose mit $\text{OsO}_4$	44
2.10.7	Darstellung von $\alpha$ -D-erythro-D-galacto-Octose	45

---

2.11	Versuche zur enzymologischen Charakterisierung von LmbR und LmbP	46
2.11.1	LmbR: Enzymtest auf Transaldolase-Aktivität	46
2.11.2	LmbR: Versuche zum Nachweis einer möglichen Aldolase-Aktivität	48
2.11.3	LmbP: Enzymtest auf Kinase-Aktivität	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1	Heterologe Expression von MTL-Genen	53
3.1.1	Expression in <i>E. coli</i>	53
3.1.2	Expression in Streptomycceten	60
3.1.2.1	Konstruktion zweier bifunktioneller Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Promotoren zur Expression von <i>S. lincolnensis</i> -Genen in <i>S. lividans</i>	60
3.1.2.2	Herstellung polyklonaler Antisera gegen LmbR und LmbO zum spezifischen Nachweis der Expression	63
3.1.2.3	Heterologe Expressionsstudien zu MTL-Biosynthesegenen	66
3.1.2.4	Expression des vollständigen, postulierten MTL-Genclusters in <i>S. lividans</i> 66TK23 und Überprüfung der MTL-Produktion	70
3.1.3	Zusammenfassende Darstellung der Expressionsergebnisse	73
3.2	Versuche zur biochemischen Charakterisierung der Lmb-Proteine	75
3.2.1	LmbR	75
3.2.1.1	Versuche zum Nachweis der postulierten Transaldolaseaktivität von LmbR	75
3.2.1.2	Versuche zum Nachweis einer möglichen Aldolaseaktivität von LmbR	76
3.2.2	LmbP	78
3.2.2.1	Chemische Substratsynthese	79
3.2.2.2	Versuche zum Nachweis der postulierten Kinaseaktivität von LmbP	79
3.3	Generierung und Untersuchung verschiedener MTL-Mutanten	81
3.3.1	Komplementation einer <i>lmbR</i> -Mutante	82
3.3.2	Isolierung, Charakterisierung und Komplementierung von <i>lmbS</i> -Mutanten	82
3.3.3	Isolierung, Charakterisierung und Komplementierung von <i>lmbK</i> -Mutanten	87
3.3.4	Isolierung und Charakterisierung von <i>lmbW</i> -Mutanten	90
3.4	Promotoranalyse von MTL-Biosynthesegenen	92
3.4.1	»Northern«-Blot-Analysen	92
3.4.2	Nachweis von Promotoren innerhalb verschiedener Bereiche des MTL-Biosynthesegenclusters	93
3.4.2.1	Promotor <i>lmbRp</i>	93
3.4.2.2	Promotor <i>lmbNp</i>	94

---

		Inhalt
3.4.2.3	Promotor <i>lmbKp</i>	97
3.4.2.4	Promotor <i>lmbW/Vp</i>	99
3.4.2.5	Zusammenfassende Interpretation der Promotortest-Experimente im Bereich des MTL-Genclusters	101
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>102</b>
4.1	Heterologe Überproduktion von Genen der MTL-Biosynthese	102
4.1.1	Heterologe Expression der Gene <i>lmbR</i> , <i>lmbN</i> , <i>lmbK</i> , <i>lmbP</i> und <i>lmO</i> in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) und <i>E. coli</i> JM109	103
4.1.2	Heterologe Expression der Gene <i>lmbR</i> , <i>lmbN</i> , <i>lmbP</i> und <i>lmO</i> in <i>S. lividans</i> 66 TK23 bzw. <i>S. lividans</i> 66 1326	105
4.3	Enzymfunktionen verschiedener putativer MTL-Enzyme	105
4.3.1	LmbR: Transaldolase oder Aldolase?	105
4.3.2	Die Isomerase LmbN	112
4.3.3	Die Kinase LmbP	114
4.3.4	LmbM: Dehydratase oder 4-Epimerase	116
4.3.5	LmbS: Aminotransferase	117
4.3.6	LmbK: Phosphatase?	118
4.3.7	LmbW: Thiomethyltransferase?	118
4.4	MTL-Biosynthese	120
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>123</b>
	<b>Anhänge</b>	<b>139</b>

---

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Biosynthese des Methylthiolincosaminids (MTL), der Zuckeruntereinheit des Lincomycin A aus *Streptomyces lincolnensis* 2936 durchgeführt.

1. Es wurden die Proteine LmbR (C8-Kondensation), LmbN (Isomerase), LmbO (Nucleotidyltransferase), LmbK (Phosphatase) und LmbP (Kinase), die mögliche Schlüsselpositionen innerhalb der MTL-Biosynthese besetzen, in löslicher Form in *Escherichia coli* bzw. in *Streptomyces lividans* exprimiert. Für die Expression in Streptomyceten wurden zwei bifunktionelle Vektoren mit verschiedenen Promotorsystemen (*tipAp*, *ptrp*) konstruiert und deren Funktionsfähigkeit nachgewiesen. Polyklonale LmbR- bzw. LmbO-spezifische Antikörper wurden erhalten und zum Nachweis der LmbR- bzw. LmbO-Produktion eingesetzt.
2. Das gesamte putative MTL-Gencluster wurde heterolog in *S. lividans* exprimiert. Eine heterologe MTL-Produktion in *S. lividans* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.
3. In Untersuchungen zur enzymatischen Funktion des Proteins LmbR konnte unter Einsatz verschiedener Substrate keine Transaldolase- bzw. Aldolase-Aktivität gemessen werden. Für einen Funktionsnachweis von LmbP wurde das postulierte Octosesubstrat in der *galacto*-Konfiguration chemisch synthetisiert. Im Enzymtest konnte die Phosphorylierung zu Octose-1-phosphat nicht nachgewiesen werden; möglicherweise benötigt LmbP die *gluco*-Konfiguration der Octose als Substrat.
4. Es wurden Mutanten der Gene *lmbS* (Aminotransferase) und *lmbK* mit Doppel-Crossover-Ereignis und für *lmbW* mit Einzel-Crossover-Ereignis, die kein Lincomycin A mehr produzierten, generiert. Durch Komplementationsexperimente konnte die funktionelle Zuweisung der Genprodukte LmbK und LmbS zur MTL-Biosynthese nur indirekt erfolgen, da MTL offensichtlich lediglich in sehr geringen Mengen aufgenommen wurde.
5. Die transkriptionelle Organisation des MTL-Genclusters wurde untersucht. DNA-RNA-Hybridisierungen lieferten einen Hinweis auf die Existenz eines Promotors vor *lmbR*. Promotorprobe-Untersuchungen bestätigten den *lmbR*-Promotor; die Bereiche der jeweiligen Promotoren vor den Genen *lmbK*, *lmbV* und *lmbW* wurden eingegrenzt. Ein zusätzlicher Promotor wurde vor einem wahrscheinlich benutzten, dritten Startcodon des *lmbN*-Leserahmens lokalisiert. Des Weiteren wurden Hinweise für die Existenz von Promotoren vor den Genen *lmbM* und *lmbT* gefunden.
6. Ein stark modifizierter Biosyntheseweg des MTL wird als Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen vorgeschlagen.

## Summary

In this study analyses concerning the biosynthesis of methylthiolincosaminide (MTL), the sugar subunit of the antibiotic lincomycin A from *S. lincolnensis*, were carried out.

1. The proteins LmbR (C8-condensation), LmbN (isomerase), LmbO (nucleotidyltransferase), LmbK (phosphatase) and LmbP (kinase), which possibly catalyse key steps during the biosynthesis of MTL, were expressed solubly in *Escherichia coli* and in *Streptomyces lividans*. For expression in streptomycetes two additional shuttle vectors with different promoters (*tipAp*, *ptrp*) were constructed and used for expression experiments. Polyclonal LmbR- and LmbO-specific antibodies were obtained and were used for detection of LmbR- or LmbO-production respectively.
2. The complete putative MTL-gene cluster was expressed in *S. lividans*. Attempts to prove heterologous production of MTL failed.
3. The transaldolase- or aldolase function of LmbR could not be demonstrated experimentally. The postulated substrate for the LmbP enzyme assay octose was synthesized chemically in its *galacto* configuration. However, the enzyme did not phosphorylate this component; possibly the *gluco*-configuration of the substrate is more likely used by LmbP.
4. Lincomycin A-negative mutants with double cross-over events were generated in the genes *lmbS* (aminotransferase) and *lmbK* and with single cross-over events in gene *lmbW*. Complementation experiments showed indirectly that all three gene products are likely involved in the biosynthesis of MTL.
5. The transcriptional organisation of the MTL-gene cluster was analyzed. DNA-RNA-hybridisation experiments indicated a promoter in front of the *lmbR* gene. Promoter probe experiments confirmed the existence of a promoter upstream of *lmbR*; the promoter regions upstream of *lmbK*, *lmbV* and *lmbW* were defined. An additional promoter was localized upstream of a shorter, i. e. starting at a third start codon, reading frame of *lmbN*. Furthermore, there seem to be promoters upstream of *lmbM* and *lmbT*.
6. A new biosynthetic pathway of MTL is proposed as a working hypothesis.



## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	GC	Gaschromatographie
Abb.	Abbildung	G-3-P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
Abk.	Abkürzung	HP	Hydroxypyruvat
acc	(gene bank) accession number	HPLC	Hochdruckflüssigkeitschroma- tographie
AL	Aldolase	IPTG	Isopropylthiogalactosid
AS	Aminosäure	kat	Katal
ADP	Adenosindiphosphat	kb	Kilobasen
ATP	Adenosintriphosphat	kDa	Kilodalton
bp	Basenpaar	KDOP	Phospho-2-keto-3- desoxyoctonoat
BSA	Rinderserumalbumin	L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
ca.	circa	LPS	Lipopolysaccharid
CIP	calf intestinal phosphatase	M	Marker
Ci	Curie	M <sub>r</sub>	molekulare Masse
CDP	Cytosindinucleotid	MLS	Makrolid-, Lincosamid- und Streptogramin B-Antibiotika
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute	MTL	Methylthiolincosaminid
C	Cytosin	MOPS	3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure
Da	Dalton	NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
DC	Dünnschichtchromatographie	NADP	Nicotinamidadenindinucleotid- phosphat
DDPPL	2,3-Didehydropropylprolin	NDP	Nucleotiddiphosphat
dTDP	Desoxythymidintriphosphat	O-8-P	Octulose-8-phosphat
DHA	Dihydroxyaceton	OD	optische Dichte
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat	ORF	offener Leserahmen
DMSO	Dimethylsulfoxid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonucleinsäure	PAA	Polyacrylamid
DNase	Desoxyribonuclease	PCC	Pyridiniumchlorochromat
dNTP	Desoxynucleotidintriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat/ Dinatriumsalz		
E-4-P	Erythrose-4-phosphat		
F-6-P	Fructose-6-phosphat		
G	Guanin		

PGP	Phosphoglycolatphosphatase	ÜNK	Übernachtskultur
PLH	Propyl-L-Hygrinsäure	vgl.	vergleiche
PEG	Polyethylenglycol	X-Gal	5'-Bromo-4-Chloro-3-Inolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
pers.	persönliche		
PLP	Pyridoxalphosphat		
Pos.	Position		
PTS	Phosphotransferasesystem		
PVDF	Polyvinylidifluorid		
PPL	Propylprolin		
R-5-P	Ribose-5-phosphat		
RBS	Ribosomenbindestelle		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Umdrehung pro Minute		
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure		
SAM	S-Adenosyl-Methionin		
S-7-P	Sedoheptulose-7-phosphat		
SMAT	Sekundärmetabolit-Aminotransferase		
S	Svedberg-Einheit		
s.	siehe		
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>		
<i>Sa.</i>	<i>Saccharopolyspora</i>		
SDS	Sodiumdodecylsulfat		
T	Thymidin		
Tab.	Tabelle		
TAF	Transaldolasefamilie		
TAL	Transaldolase		
TDPPL	1,2,3,6-Tetrahydropropylprolin		
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin		
TES	Trishydroxymethylaminoethansulfonsäure		
THF	Tetrahydrofuran		
TPP	Thiaminpyrophosphat		
Tris	Trishydroxymethylaminomethan		
ü.N.	über Nacht		

# 1 Einleitung

## 1.1 Merkmale der Streptomyceten

Bei der Gattung *Streptomyces* handelt es sich um Gram-positive, überwiegend obligat aerobe, weit verbreitete Bodenbakterien, die zur Ordnung der *Actinomycetales* gezählt werden. Ihr Genom ist bei einem linearen Aufbau (Lin et al., 1993) mit  $8 - 10 \times 10^6$  bp mindestens 1,5 mal so groß wie das von *Escherichia coli* und besitzt einen hohen G/C-Gehalt von typischerweise 70 - 78% (Gladek und Zakrezewska, 1984). Signifikant hoch ist der G/C-Anteil in der dritten Kodonposition mit ca. 90% (Bibb et al., 1984; Baltz, 1986).

Mit der Auskeimung der Sporen beginnt der komplexe morphologische Differenzierungsprozess auf festen Nährböden. Das durch verzweigte Hyphen entstehende Substratmycel wächst fest verbunden mit dem Medium (Chater, 1984). Gegen Ende des vegetativen Wachstums bildet sich das charakteristische Luftmycel, welches durch einfache vertikale Verzweigung der Hyphen entsteht (Chater, 1993; Champness und Chater, 1998). Nach der Einstellung des Längenwachstums beginnt die Sporenbildung durch Einführung von Septen an den Hyphenenden. Erfolgt die Anzucht in submerser Kultur, können jedoch außer einer Sporenbildung diese charakteristischen Entwicklungsstadien oftmals nicht beobachtet werden (Blanco et al., 1994). Statt dessen findet das Wachstum untergliedert in eine »lag«-, logarithmische und stationäre Phase statt. Begleitend zu diesen morphologischen Differenzierungsprozessen tritt eine physiologische Differenzierung auf, die zu einer Aktivierung anderer Biosynthesewege führt. Dabei werden Intermediate des Primärstoffwechsels in Sekundärmetabolite umgewandelt (Holt et al., 1992). In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um die Biosynthese von antibiotisch, antiviral und zytostatisch bzw. zytotoxisch wirkenden Naturstoffen oder Geruchsstoffen wie Geosmin und Pigmenten (z.B.: Melanin).

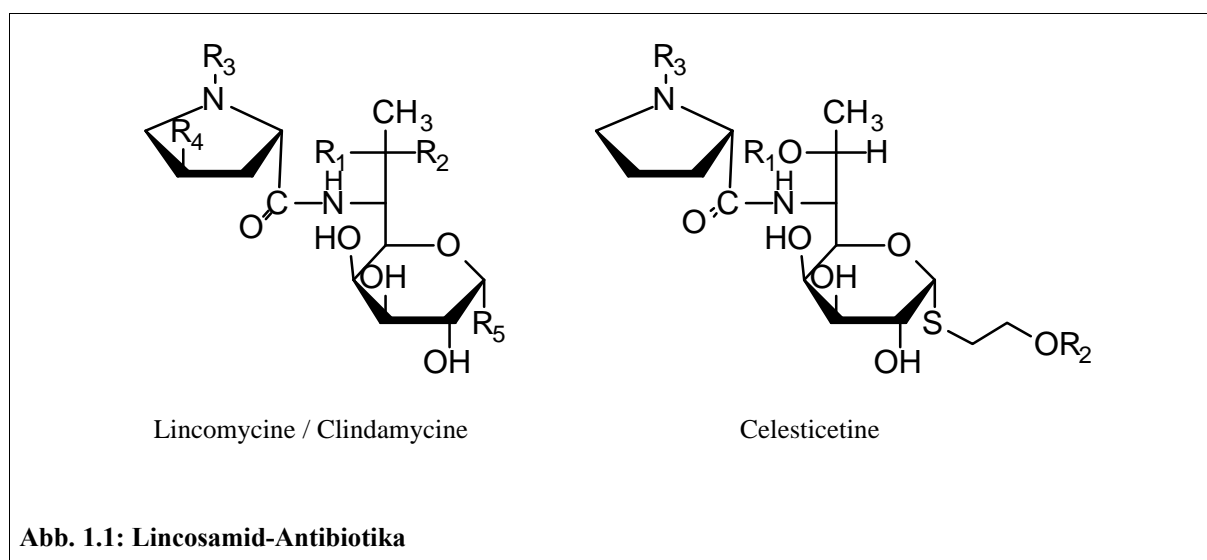
Da Streptomyceten ca. 2/3 aller bekannten Antibiotika produzieren, spielen sie eine herausragende Rolle bei der biotechnologischen Gewinnung dieser wirksamen Naturstoffe (Weber et al., 1985; Omura 1992; Piepersberg und Zeck, 1994; Piepersberg, 1997).

Im Hinblick auf zunehmende Resistenzen gegen gängige Antibiotika, gewinnen durch ein »pathway engineering« generierte Hybridantibiotika immer mehr an Bedeutung (Piepersberg, 1994). Grundvoraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist jedoch die genaue Kenntnis der an der Biosynthese beteiligten Proteine und Enzyme, um durch einen gezielten Einsatz und Kombination verschiedener Biosynthese-Enzyme neue Antibiotika gewinnen zu können.

## 1.2 Lincomycin A

### 1.2.1 Struktur, Vorkommen und Wirkung von Lincomycin A

Lincomycin A zählt zur Gruppe der Lincosamide (s. Abb. 1.1) und besteht aus einer in der Natur einzigartigen Aminooctose-Einheit  $\alpha$ -Methylthiolincosaminid (MTL), die über eine Amidbindung mit der ebenfalls ungewöhnlichen Aminosäure Propyl-L-Hygrinsäure (PLH) verknüpft ist (Hoeksema et al., 1964; Magerlein et al., 1967; Slomp und McKellar, 1967). Nahe verwandt ist das Celesticetin, das bereits 1955 entdeckt wurde (Hoeksema et al., 1955); (s. Abb. 1.1). Von beiden Leitstrukturen ausgehend gibt es eine Vielzahl von Derivaten, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind. Bei Clindamycin handelt es sich um ein chemisch verändertes Lincomycin, bei dem an Position C7 des MTL die Hydroxygruppe durch Chlor unter Inversion substituiert wurde.



**Tabelle 1.1: Lincomycin- und Celesticetinderivate.** Die Reste (R) beziehen sich auf Abb. 1.1.

<b>Lincomycine</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>
Lincomycin A	OH	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	SCH <sub>3</sub>
Lincomycin B	OH	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	SCH <sub>3</sub>
Lincomycin C	OH	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Lincomycin D	OH	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	SCH <sub>3</sub>
Lincomycin K	OH	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Lincomycin S	OH	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Lincomycinsulfoxid	OH	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	S(O)CH <sub>3</sub>
Hydroxylincomycin	OH	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OH
Pentyllincomycin	OH	H	H	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	SCH <sub>3</sub>
Acetatlincomycin	OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	SCH <sub>3</sub>

<b>Clindamycine</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>
Clindamycin	H	Cl	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	SCH <sub>3</sub>
Ethylclindamycin	H	Cl	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	SCH <sub>3</sub>
Butylclindamycin	H	Cl	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	SCH <sub>3</sub>
Pentylclindamycin	H	Cl	H	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	SCH <sub>3</sub>
Hexylclindamycin	H	Cl	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	SCH <sub>3</sub>
Demethylclindamycin	H	Cl	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	SCH <sub>3</sub>
Epiclindamycin	Cl	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	SCH <sub>3</sub>

<b>Celesticetine</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
Celesticetin A	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Salicylyl
Celesticetin B	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Isobutyryl
Celesticetin C	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Anthranilyl
Celesticetin D	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Acetyl
Desalicyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
<i>O</i> -Demethylcelesticetin	H	CH <sub>3</sub>	Salicylyl
<i>N</i> -Demethylcelesticetin	CH <sub>3</sub>	H	Salicylyl
Dedimethylcelesticetin	H	H	Salicylyl
<i>O</i> -Demethylsalicyl	H	CH <sub>3</sub>	H
Desalicylsalicylat	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	<i>p</i> -Aminosalicylyl

Lincomycin wurde zuerst in *Streptomyces lincolnensis* NRRL2936 entdeckt. Neben dem Lincomycin A, das als Hauptanteil isoliert wurde, konnte in geringen Mengen Lincomycin B gewonnen werden. Beide Lincomycine werden gleichfalls von einer Vielzahl anderer Actinomyceten produziert. Des weiteren wurde von Argoudelis et al. (1964) ein weiteres Lincomycin-Derivat C bei Fermentation unter Standardbedingungen von *Streptomyces umbrinus* var. *cyaneoninger* isoliert. Dagegen konnten die Lincomycine D und S ausschließlich nach einer Supplementation des Kulturmediums mit Hemmstoffen wie Ethioninen, Sulfonamiden oder Sulfanilamiden nachgewiesen werden (Argoudelis und Coats, 1973).

Eine Lincomycin A-überproduzierende, phagenresistente Mutante wurde durch eine mehrstufige Mutagenese mittels UV-Licht und Neutronenstrahlung hergestellt und mit *S. lincolnensis* 78-11 bezeichnet (G. Tang, pers. Mitteilung). Sie kann in geeignetem Fermentationsmedium eine bis zu 100-mal höhere Produktionsrate aufweisen. Diskutiert wurde, daß diese Überproduktion unter anderem durch die Verdoppelung des *lmr/lmb*-Genclusters genetisch bedingt ist (Peschke et al., 1995).

Das Resistenzverhalten gegenüber Lincomycin entspricht dem MLS-Phänotyp. Zur MLS-Familie werden alle Makrolid-, Lincosamid- und Streptogramin B-Antibiotika gerechnet, da sie trotz struktureller Unterschiede gleiches Resistenzverhalten aufweisen (Skinner et al., 1983; Cundliffe, 1989). Allen gemeinsam ist eine S-Adenosyl-Methionin (SAM)-abhängige Methyltransferase, die in Eubakterien das N<sup>6</sup> des Adenin in Position 2058 der 23S-rRNA methyliert oder dimethyliert (Weisblum, 1985). Das hat zur Folge, daß der Wirkort vor dem Antibiotikum geschützt ist und keine Inhibierung der Peptidyltransferase stattfinden kann. Im Gegensatz zu anderen resistenzerzeugenden Methyltransferasen der MLS-Familie katalysiert LmrB aus Lincosamid-produzierenden Stämmen lediglich eine Monomethylierung des Adeninrestes in der 23S rRNA, das zwar zu einer verminderten Bindungsfähigkeit am Wirkort von beispielsweise Erythromycin, jedoch nicht von Chloramphenicol führt (Skinner et al., 1983). Zusätzlich zu diesem weit verbreiteten Resistenzmechanismus wurde in *S. lincolnensis* 78-11 ein aktiver Export des Antibiotikums durch LmrA und LmrC nachgewiesen (Schmidt, 1989; Zhang et al., 1992; Zhang, 1993).

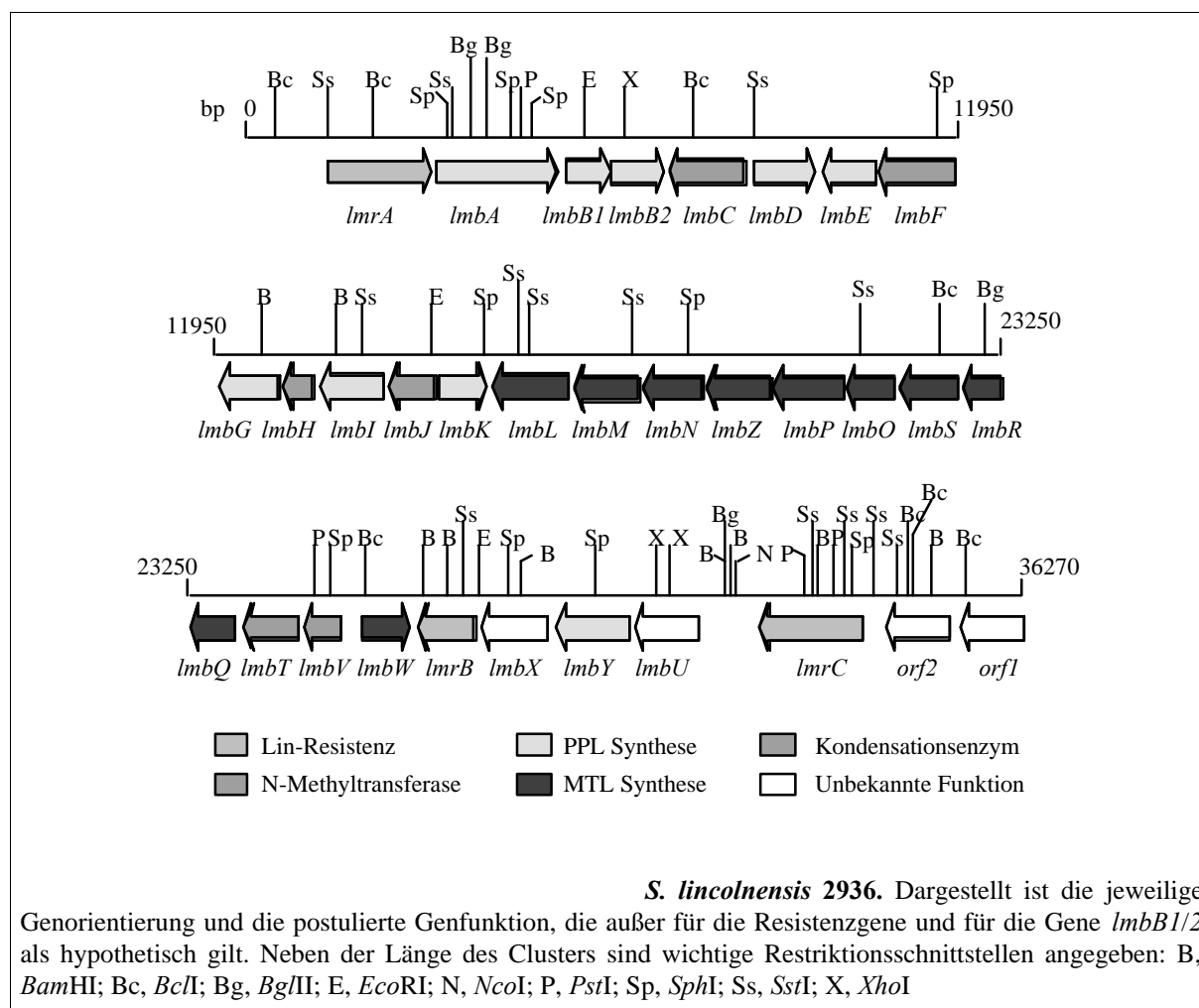
Antibiotika der MLS-Gruppe wirken translationsinhibitorisch. Ihr Wirkmechanismus beruht auf einer Bindung des Antibiotikums an die Zentralschleife der 50S-Untereinheit des Bakterienribosoms und blockiert somit das Peptidyltransferasezentrum (Cundliffe, 1990).

Lincosamid-Antibiotika besitzen ein Wirkspektrum gegen Gram-positve Keime wie beispielsweise anaerobe Bacillen, Penicillinase-produzierende Stämme von *Staphylococcus aureus* und aerobe Streptococci. Sie finden medizinische Anwendung bei der Behandlung von Bakteriämien und Knochenmarkentzündungen, da sie ein gutes Diffusionsvermögen in der Blutbahn und in die Knochen besitzen.

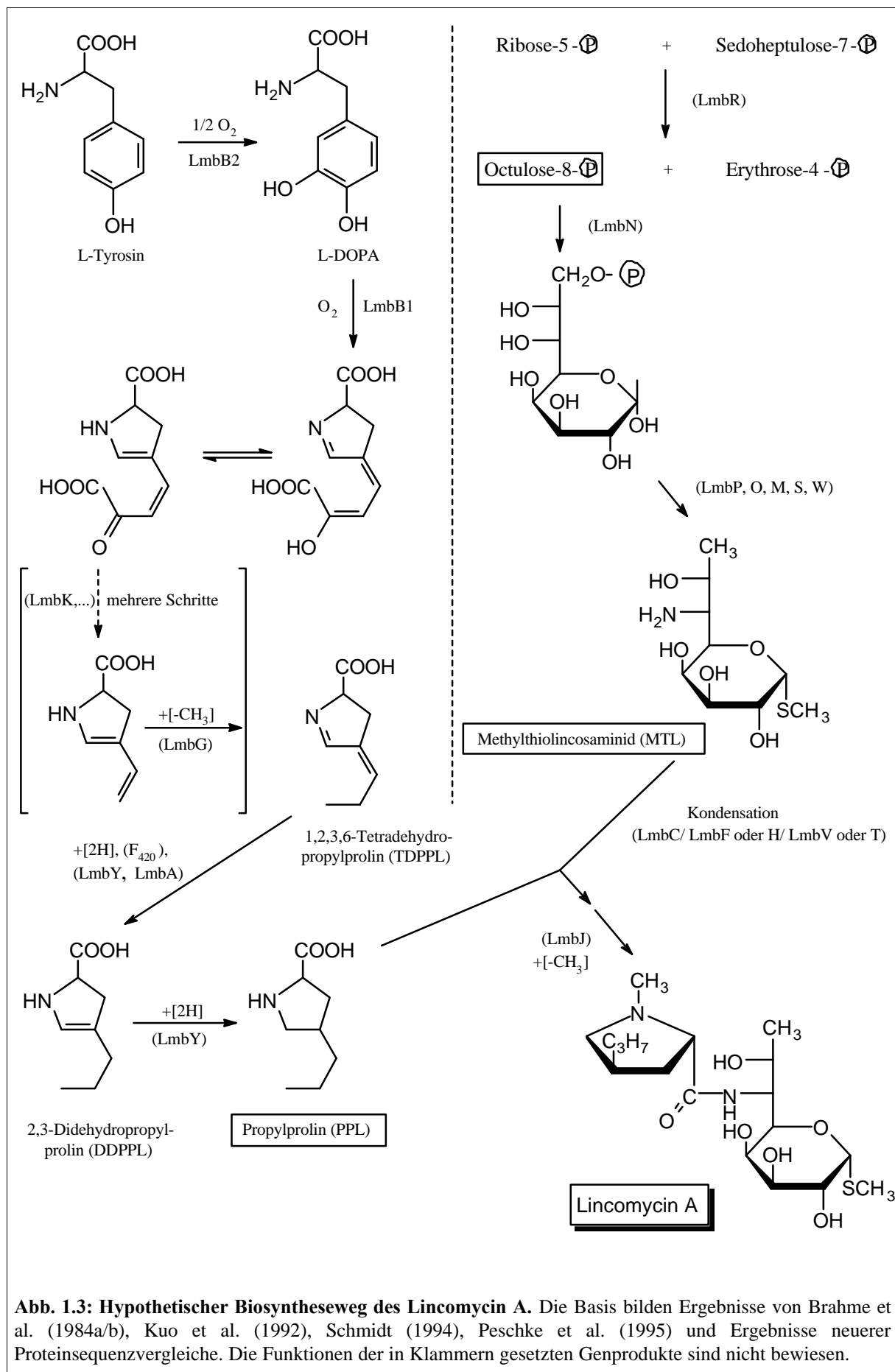
### 1.2.2 Lincomycin-Biosynthese

Die für eine Antibiotikabiosynthese verantwortlichen Gene liegen in der Regel in chromosomal kodierten Clustern mit einer Länge zwischen 15 und 50 kb vor. Diese Cluster enthalten

zusätzlich Regulatorgene und gegen das selbst produzierte Antibiotikum resistenzvermittelnde Gene (Chater und Hopwood, 1993).



Die Sequenzierung des Lincomycin A-Biosynthesegenclusters aus *S. lincolnensis* 78-11 durch Peschke et al. (1995) ergab 27-29 Leserahmen für die Biosynthese (*lmb*-Gene) und 3 ORFs (open reading frame) für resistenzvermittelnde Gene (*lmr*-Gene). Flankiert wird das Cluster von zwei Resistenzgenen, *lmrA* und *lmrC*. Das dritte resistenzvermittelnde Gen *lmrB* befindet sich vier Leserahmen stromaufwärts von *lmrC*. Chung und Crose (1990) konnten anhand von Tn4560-Mutanten, die kein Lincomycin A mehr produzierten, und deren Komplementation mit PPL oder MTL zeigen, daß in der »linken Hälfte« des insgesamt ca. 33 kb großen Clusters Gene mit postulierter Beteiligung an der PPL-Synthese lokalisiert sind, wohingegen die »rechte Hälfte« vorwiegend Gene der MTL-Biosynthese beinhaltet (s. Abb. 1.2). Wahrscheinlich sind die dem MTL durch Proteinsequenzvergleich von Peschke et al. (1995) zugeordneten Gene *lmbQRSOPZNM* auf einem Operon lokalisiert, da sie gleiche Orientierung und zum Teil überlappende translationale Stopp- und Startpunkte besitzen. Dieses Zucker-Subcluster befindet



**Abb. 1.3: Hypothetischer Biosyntheseweg des Lincomycin A.** Die Basis bilden Ergebnisse von Brahme et al. (1984a/b), Kuo et al. (1992), Schmidt (1994), Peschke et al. (1995) und Ergebnisse neuerer Proteinsequenzvergleiche. Die Funktionen der in Klammern gesetzten Genprodukte sind nicht bewiesen.



sich in der Nähe des Lincomycin-Resistenzgens *lmrB* im Lincomycin A-Cluster.

Die Biosynthese des Lincomycins verläuft biphasisch, d.h. beide Untereinheiten Propylprolin (PPL) und Methylthiolincosaminid (MTL), werden auf getrennten Wegen synthetisiert und erst in der zweiten Phase miteinander durch eine Amidbindung verknüpft. Zum Schluß erfolgt eine Methylierung am Stickstoffatom des Pyrrolidinringes der Propylprolin-Untereinheit. Einen ersten Ansatz zur Aufklärung der Biosynthese des Lincomycins lieferten Markierungsexperimente von Brahme et al. (1984a/b). Nach Fütterung mit  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose während der Fermentation wurde das Syntheseprodukt Lincomycin A isoliert und in seine Untereinheiten MTL und PPL hydrolytisch gespalten.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten zeigten, daß die PPL-Untereinheit aller Wahrscheinlichkeit nach aus L-Tyrosin über die Metabolite L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) und 1,2,3,6-Tetrahydropropylprolin (TDPPL) entsteht. Vorläufer von MTL stellen möglicherweise Intermediate des Pentosephosphatwegs dar.

#### Biosynthese von PPL

Anhand von Fütterungsexperimenten mit  $^{14}\text{C}$  bzw.  $^{15}\text{N}$  radioaktiv markiertem, für PPL postulierten Vorläufersubstanz L-Tyrosin wurde nachgewiesen, daß sieben der neun C-Atome der Propylhygrinsäureeinheit aus Tyrosin stammen (Witz et al., 1971).

Für die beiden fehlenden C-Atome konnten Argoudelis et al. (1969) mittels radioaktiver Markierung und Massenspektroskopie ihre Herkunft aus Methionin beweisen.

Bestätigt wurde die Rolle des Tyrosins in der PPL- bzw. PLH-Synthese durch  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Spin-Kopplungsmuster (Brahme et al., 1984a). Des weiteren konnte durch radioaktiv markiertes DOPA und Methionin festgestellt werden, daß Tyrosin über L-DOPA zu einem Intermediat verändert wird, das einer aromatischen Ringöffnung höchstwahrscheinlich zwischen Position 2 und 3 unterliegt. Mit dieser Methode wurde ebenfalls nachgewiesen, daß L-DOPA und TDPPL Zwischenprodukte der PPL-Synthese darstellen. Als Grund für die TDPPL-Akkumulation in einer Klasse Lincomycin A-negativer Mutanten erwies sich ein fehlendes Coenzym einer Reduktase, das mit der Deazaflavineinheit des  $\text{F}_{420}$ -Coenzym (F<sub>0</sub>) von methanogenen Bakterien strukturell ist (Coats et al., 1989; Kuo et al., 1989; 1992). Eine PPL-Fütterung bewirkte eine wiederhergestellte Lincomycin A-Produktion, weshalb davon ausgegangen werden konnte, daß dieser Cofaktor für einen Schritt in der PPL-Synthese unerlässlich ist. Diese Substanz wird ebenso als »Cosynthesis Factor« bezeichnet und ist für die Biosynthese weiterer Streptomyceten-Antibiotika, wie beispielsweise Tetrazykline, wichtig. LmbB1 und LmbB2 sind verantwortlich für die Umsetzung von L-DOPA zu einem gelben, nicht näher charakterisierten Produkt (Neusser et al., 1998) Relativ gesichert scheint weiterhin die Annahme, daß LmbY

katalytisch für den letzten, postulierten Schritt der PPL-Biosynthese, der Umsetzung von 2,3-Didehydropropylprolin (DDPPL) zu PPL, verantwortlich ist. Neusser (1999) wies mittels einer *lmbY*-Mutante fehlende Lincomycin A-Produktion nach, die durch PPL-Fütterung aufgehoben werden konnte.

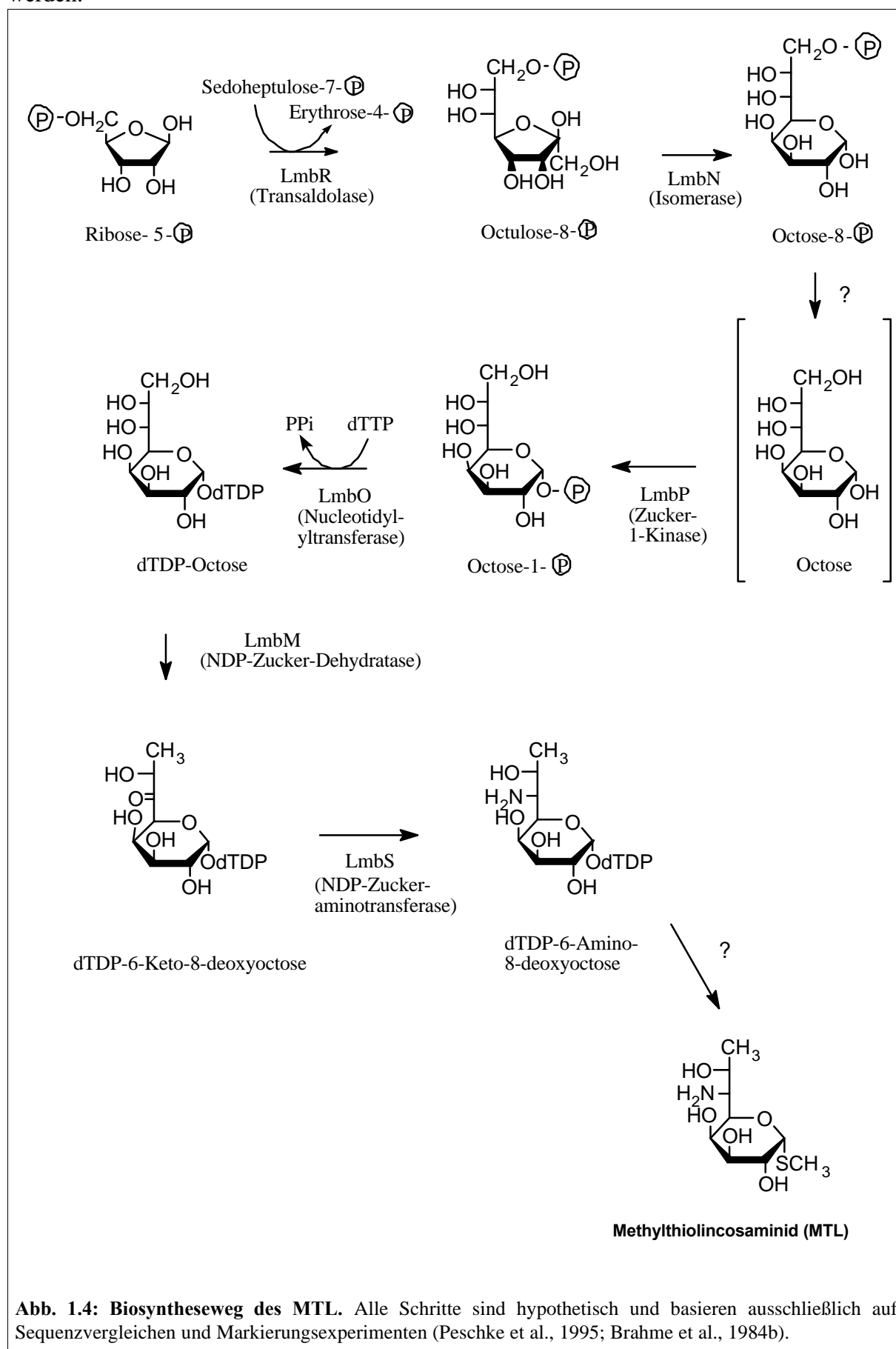
### Biosynthese von MTL

Brahme et al. postulierten 1985, daß die MTL-Vorläufermoleküle Sedoheptulose-7-phosphat (S-7-P) und Ribose-5-phosphat (R-5-P) mittels einer Transaldolasereaktion zu Octulose-8-phosphat (O-8-P) und Erythrose-4-phosphat (E-4-P) verknüpft werden. Durch eine Isomerase, Phosphomutase, Enolase, Octokinase, Tautomerase, Transaminase und eine Transthiomethylase sollte MTL ohne eine nukleotidaktivierte Zwischenstufe synthetisiert werden.

Dem gegenüber standen die Ergebnisse von Proteinsequenzvergleichen nach der Sequenzierung des Lincomycin A-Genclusters von Peschke et al. (1995). Hierbei fiel auf, daß einige Proteine Ähnlichkeiten zu Proteinen aufwiesen, die in anderen Organismen für die Bildung von 6-Desoxyhexosen notwendig sind. So schien *lmbO* für eine dTDP-Glucose-Synthase, *lmbM* für eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase und *lmbS* für eine Aminotransferase zu kodieren. Daher wurde ausgehend von Glucose-1-phosphat eine Nucleotidylylaktivierung in Position 1, gefolgt von einer Dehydratasereaktion durch *LmbM* zu dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose postuliert. Als nächster Schritt wurde die Transaminierung mittels *LmbS* zu dTDP-6-Desoxy-4-glucosamin angenommen. Eine Kettenverlängerung zu dem geforderten C8-Zucker-Gerüst sollte zu einem späteren Zeitpunkt der MTL-Biosynthese stattfinden.

Dagegen erscheint nach neueren Untersuchungen eine Synthese des C-8 Grundgerüsts des MTL aus Intermediaten des Pentosephosphatweges und eine weitere Modifikation über eine Nucleotidylylaktivierung zu MTL wahrscheinlicher. Hierfür spricht, daß (1) die *LmbO*-Funktion, eine Aktivierung des Zwischenproduktes, durch die hohe Sequenzidentität zu dTDP-D-Glucose 4,6-Dehydratasen mit ca. 27% offensichtlich ist (s. unten); (2) bereits durchgeführte Enzymtests mit überproduziertem *LmbS*, dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose und verschiedener Amininosäure-donatoren das Postulat einer Transaminierung des C6-Glucosekörpers nicht bestätigen konnten (Haase, 1996) und (3) neuere Proteinsequenzvergleiche für *LmbR* Identitäten zu Transaldolasen lieferten. Resultierend aus diesen Erkenntnissen wurde ein hypothetischer Biosyntheseweg entwickelt (s. Abb. 1.4), der durch eine Transaldolase-Reaktion (*LmbR*) eingeleitet wird. Im folgenden wird die Ketose-Form des C8-Körpers durch eine Isomerisierung in eine Aldosestruktur durch *LmbN* überführt. Die enzymatische Funktion für eine Dephosphorylierung an Position 8 konnte bisher keinem MTL-Protein zugeordnet

werden.



**Abb. 1.4: Biosyntheseweg des MTL.** Alle Schritte sind hypothetisch und basieren ausschließlich auf Sequenzvergleichen und Markierungsexperimenten (Peschke et al., 1995; Brahme et al., 1984b).

Nach der Phosphorylierung an C<sub>1</sub> durch LmbP kann eine nucleotidylylaktivierte Zwischenstufe durch LmbO gebildet werden, die anschließend in Position 6 und 8 dehydratisiert wird (LmbM). Dadurch kann die Einführung der Aminofunktion an Position 6 durch LmbS stattfinden. Die für den letzten Schritt verantwortliche Thiomethyltransferase kann entweder durch *lmbW* oder *lmbG* kodiert werden.

## 1.2.3 Charakteristische Merkmale der postulierten MTL-Biosyntheseenzyme

### 1.2.3.1 Transaldolasen

Neuere Proteindatenbankvergleiche für LmbR ergaben Hinweise auf eine mögliche Transaldolasefunktion. So lieferten binäre Alignments mit zwei postulierten Transaldolasen aus *E. coli*, MipB und TalC, Sequenzidentitäten von 27,6% bzw. 28,0%. Eine frühere Zuordnung von LmbR als Regulatorprotein basierte auf einer niedrigeren Sequenzidentität von 23,5% mit OrfU aus *Bacillus subtilis* (Trach et al., 1988). Somit wird die putative Biosynthese des MTL aller Wahrscheinlichkeit nach durch LmbR eingeleitet (s. Abb. 1.4).

Das Sequenzmotiv der Transaldolasefamilie (TAF) besitzt folgende Primärstruktur:



wobei die in Klammern gesetzten Aminosäuren (AS) variabel sind (Reizer et al., 1995). Fett gedruckte AS stellen die Übereinstimmungen mit der Primärstruktur von LmbR dar.

Der Reaktionsmechanismus der Transaldolase über eine Schiff'sche Base-Bindung mit einem Lysinrest wurde durch Borhydrid-Reduktion des Enzym-Substrat-Komplexes nachgewiesen (Horecker et al., 1961, 1963). Eine Beteiligung des Lysins am Reaktionsmechanismus wurde zusätzlich durch ortsgerichtete Mutagenese dieses Restes bestätigt (Miosga et al., 1993; Banki und Perl, 1996). Die Reaktion der Transaldolase wird durch die Kondensation der ε-Aminogruppe des aktiven Lysinrestes mit einem Ketosesubstrat zu einer Schiff'schen Base-Verbindung eingeleitet, wobei ein Molekül H<sub>2</sub>O abgespalten wird. Nach der Abspaltung einer Aldose wird ein resonanzstabilisierter Transaldolase-Glycerol-Komplex gebildet. Im zweiten Teil der Reaktion wird durch einen nukleophilen Angriff vom negativ geladenen C3 des Schiff'schen Base-Komplexes auf eine zweite Aldolase eine neue Bindung geknüpft. Die

abschließende Spaltung der Schiff'schen Base unter Anlagerung eines Wassermoleküls setzt eine neue Ketose frei und der Zyklus kann von Neuem beginnen.

### 1.2.3.2 Heptulose-Isomerasen

Obwohl die Primärstruktur von LmbN (276 AS) um ca. 83 AS länger ist als die vergleichbarer Phosphoheptose-Isomerasen (192-196 AS), wie beispielsweise GmhA (*E. coli*); (Brooke und Valvano, 1996b) oder die Phosphoheptose-Isomerase GmhA aus *Haemophilus ducreyi* (Bauer et al., 1998), existieren jedoch signifikante Übereinstimmungen, so daß eine Zuordnung von LmbN zur Enzymklasse der Isomerasen durchaus sinnvoll erscheint. GmhA-Gene wurden bisher aus mehreren Organismen wie beispielsweise aus *Haemophilus influenzae* (Brooke und Valvano, 1996a), aus *E. coli* (Brooke und Valvano, 1996b), aus *Helicobacter pylori* (Alm et al., 1999) und aus *Mycobacterium tuberculosis* (Cole et al., 1998) isoliert und sind an der Synthese von ADP-Glyceromannoheptose, ein Lipooligosaccharid (LOS)-Bestandteil, von Gram-negativen Bakterien beteiligt. Für GmhA (früher LpcA) aus *E. coli* konnte nachgewiesen werden, daß es für den ersten Schritt der »inner core« Lipopolysaccharid (LPS)-Synthese, der Isomerisierung von S-7-P zu D-Glycero-D-manno-Heptose-1-phosphat, verantwortlich ist (Brooke und Valvano, 1996b). Diese Reaktion war bereits von Eidels und Osborn (1974) postuliert und in einem Transketolase-negativen Stamm von *Salmonella typhimurium* bestätigt worden.

### 1.2.3.4 Kinasen

Kinasen sind häufig hoch konserviert und besitzen an Schlüsselpositionen definierte AS, die auch als »Katalytische Domänen« bezeichnet werden. Normalerweise reichen in Kinasen solche Domänen von 250 bis 300 AS, deren Lokalisation innerhalb des Enzyms jedoch nicht festgelegt ist (Hanks et al., 1988). Mechanistisch betrachtet binden nahezu alle Kinasen gleichzeitig ein Nucleosidtriphosphat (NTP) als Phosphatdonor und das Akzeptorsubstrat, um einen ternären Komplex zu bilden. Der Phosphattransfer erfolgt direkt zwischen den beiden gebundenen Substraten. Besonders hoch konserviert liegen die Segmente der Primärstruktur vor, die mit ATP assoziiert sind (Traut, 1994).

So besitzt LmbP als postulierte Octose-1-Kinase zwar nur mäßige Identitäten zu hauptsächlich Kinasen aus dem Galactoseoperon bzw. zu Mevalonatkinasen, z. B.: zu GalK-*Methanococcus*

*jannaschii* mit 15,6% (Bult et al., 1996), zu GalK-*Mycobacterium tuberculosis* mit 22,2% (Cole et al., 1998), zu Mevalonatkinase (KIME)-*Methanobacterium thermoautotrophicum* mit 22,0% (Smith et al., 1997), jedoch weisen einige Domänen zweifelsfrei auf die katalytische Funktion einer Kinase hin. Die LmbP-Sequenz <sup>91</sup>D GSGLG<sup>99</sup> besitzt eine hohe Übereinstimmung mit dem Kinase-2-Motiv (ATP-Bindestelle) für Phosphofruktokinasen <sup>99</sup>D GSXXG, wobei der Aspartatrest für die Koordinierung des für den Phosphattransfer notwendigen zweiwertigen Kations (Mg<sup>2+</sup>) verantwortlich ist. Das Kinase-3-Motiv, das normalerweise mit dem Purin der Ribose interagiert, fehlt bei Phosphofruktokinasen ebenso wie bei LmbP (Traut, 1994).

Weitere Peptid-Motive befinden sich verglichen mit GalK aus *Streptomyces lividans* 66 TK23 in folgender Anordnung (Mollet und Pilloud, 1991):

	I	III	V
<i>S. lividans</i> 66 TK23	GRENLIGEHTDY	PSGSLSSSA	GLRGP RRRMTGAGMGG
<i>S. lincolnensis</i> 2936	XXXXXXXXEHXXX	XXGSLGGSG	XLXXX XXXXXGAGGGG

Innerhalb der Domäne V bestehen auffallende Ähnlichkeiten mit Mevalonatkinasen (GAGGG), jedoch wäre eine solche Enzymfunktion in des MTL-Biosynthese nicht sinnvoll.

Domäne II und IV fehlen gänzlich. Auf Grund dieser Daten scheint es wahrscheinlich, daß LmbP für eine Phosphorylierung der *galacto*-Konfiguration der Octose in Position 1 in Frage kommt.

### 1.2.3.5 Nucleotidyltransferasen

LmbO zeigt signifikante Ähnlichkeiten zu dNTP-Nucleotidyltransferasen. Jedoch divergieren die Längen der Translationsprodukte erheblich. So sind im Durchschnitt die mit LmbO verglichenen Proteine um ca. 60% im Bereich des C-Terminus länger. Beim Vergleich mit LmbO weisen dTDP-D-Glucose-1-phosphat Synthasen größere Ähnlichkeiten auf als CTP-D-Glucose-1-phosphat-Synthasen. Beispielsweise zeigt LmbO Identitäten zu RmlA2 aus *Mycobacterium tuberculosis* von 30,0% (Cole, 1998), zu MtmD aus *Streptomyces agrillaceus* (Lombo et al., 1997) von 28,5%, zu StrD aus *Streptomyces glaucescens* (Beyer, 1996) von 29% und zu StrD aus *Streptomyces griseus* (Pissowotzki et al., 1991) von 33,4%. Im Vergleich dazu ergibt sich ein Identitätswert von nur 25,0% mit der  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat-Cytidyltransferase StrQ aus *S. glaucescens* (Beyer et al., 1996). Als prägnanter für die

Vorhersage der Substratspezifität von LmbO jedoch erweist sich der Grad der Übereinstimmung

Allgemein besitzen Pyrophosphorylasen zwei hoch konservierte Bereiche. Die Domäne I ist nahe dem N-Terminus in Position 5-43 lokalisiert und möglicherweise für die Bindung des Nucleotids verantwortlich (May et al., 1994; Thorson et al., 1994). In der Domäne II befindet sich ein hoch konservierter Lysylrest (Pos. 154 in LmbO), der nachweislich an der Katalyse beteiligt ist (Smith-White und Preiss, 1992; May et al., 1994). Der von Beyer (1996) mit B bezeichnete konservierte Bereich enthält das Konsensusmotiv  ${}^{64}\text{GDG}{}^{66}$ , das neben LmbO in allen Pyrophosphorylasen identifiziert werden konnte. Hingegen fehlen Bereiche A, C und D bei allen dTDP-Glucose-Synthasen (Beyer et al., 1998) ebenso wie bei LmbO. Des weiteren relevant für diese Substratspezifität ist ein hoch konservierter Bereich »RGEL« bei LmbO in den Positionen 193 - 196. Auf Grund dieser Vergleiche ist es naheliegend, daß LmbO für die Nucleotidaktivierung einer Octose während der MTL-Biosynthese eine Rolle spielt.

### 1.2.3.6 Dehydratasen

Der 325 AS langen Primärstruktur des *lmbM*-Produktes wird eine dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase-Funktion zugeordnet, da sich Sequenzähnlichkeiten zu dTDP-Glucose-Dehydratasen wie StrE aus *S. griseus* (Distler et al., 1987) bzw. aus *S. glaucescens* (Beyer, 1996) von jeweils ca. 27% ergeben. Außerdem liegt im N-Terminus (Pos. 10-15) das Motiv »GXGXXG« zur Bindung des für die Reaktion notwendigen NAD(H) vor (Wierenga et al., 1985). Daß es sich bei LmbM wahrscheinlich jedoch um ein Enzym mit veränderter Substratspezifität, z. B.: um eine dTDP-D-galacto-Octose-4,6-Dehydratase handelt, legen weiterhin die Sequenzvergleiche der bekannten dTDP-Glucose 4,6-Dehydratasen (jeweils höher als 35%) aus *S. griseus* und *S. glaucescens* und bereits durchgeführte Experimente mit dTDP-Glucose oder CDP-Glucose als Substrate, die zu keiner Umsetzung führten, nahe (Haase, 1996).

### 1.2.3.7 Aminotransferasen

Bakterien besitzen die Fähigkeit ihre für die Proteinsynthese notwendigen AS selbst zu produzieren (Mehta und Christen, 1993). Häufig stellt die Transaminierungsreaktion den letzten Schritt in der Synthese dar (Meister, 1962), nachdem das aus dem Intermediärstoffwechsel stammende Kohlenstoffgrundgerüst modifiziert wurde. Die Aminogruppe wird in der Regel von

einer an der Ammoniumassimilation beteiligten Verbindung (Glutamat oder Glutamin) geliefert. Da neben Phosphor Stickstoff einer der am häufigsten wachstumslimitierenden Faktoren ist, spielt der Stickstoffmetabolismus mit seinen Transaminierungsreaktionen eine essentielle Rolle. Zudem sind Aminotransferasen für Lipopolysaccharid-, Antibiotika- bzw. andere Sekundärmetabolitbiosynthesen verantwortlich.

Die für Transaminierungsreaktionen notwendigen Enzyme benötigen alle PLP (Pyridoxalphosphat = Vitamin B<sub>6</sub>-derivat) als Cofaktor. Pyridoxalphosphat-abhängige Enzyme werden nach Alexander et al. (1994) in 3 Familien unterteilt. Zur  $\alpha$ -Familie werden die Subfamilien der Glycin-Hydroxymethyltransferase, der Glycin-C-Acetyltransferase, der 5-Aminolevulinat-Synthase, der 8-Amino-7-oxononanoat-Synthase, der Aminosäure-Decarboxylasen, der Tyrosin-Phenol-Lyase und der Aminotransferase-Superfamilie gezählt. Die  $\beta$ -Familie enthält verschiedene Dehydratasen/Synthasen und die  $\delta$ -Familie verschiedene Lyasen. Für die Aminotransferase-Superfamilie der  $\alpha$ -Familie sind weitere Unterteilungen in I - IV möglich (Metha et al., 1993).

Aminotransferasen wie beispielsweise StrS, StsA, StrC aus *S. griseus* (Distler et al., 1992; Ahlert, 1997; Ahlert et al., 1997); DegT aus *Bacillus stearothermophilus* (Takagi et al., 1990), TylB aus *Streptomyces fradiae* (Cundliffe et al., 1993), EryCI aus *Saccharopolyspora erythraea* (Dhillon et al., 1989), DnrJ aus *Streptomyces peucetius* (Stutzmann-Engwall et al., 1992) oder LmbS aus *S. lincolnensis* (Peschke et al., 1995) zählen jedoch zu einem neuen Typus, die für einen Aminogruppentransfer auf Intermediate des Sekundärstoffwechsels verantwortlich sind, weshalb Vertreter dieser Subfamilie als Sekundärmetabolit Aminotransferasen (SMATs) bezeichnet werden (Piepersberg, 1994; Piepersberg und Distler, 1997; Ahlert, 1997). Ursprünglich wurde für solche Proteine eine Proteinkinase-Sensorproteinfunktion in einem Zweikomponenten-Regulationssystem postuliert, nachdem das Einbringen eines DNA-Fragments mit dem Leserahmen *dnrIJ* in den Wildstamm von *S. peucetius* die Produktion von  $\epsilon$ -Rhodemycinon, einem Schlüsselmetaboliten der Daunorubicin-Biosynthese, verzehnfachte (Stutzmann-Engwall et al., 1992). Zudem besitzen viele Aminotransferasen ein schwach ausgeprägtes »helix-turn-helix«-Motiv (Brennan und Matthews, 1989), welches typischerweise in DNA-bindenden Proteinen vorliegt. Dem gegenüber stehen (1) ein fehlendes ATP-Bindungsmotiv nahe dem C-Terminus, das normalerweise bei bekannten Kinase-Sensorproteinen auftritt (Stock et al., 1989); (2) der UV-spektroskopische Nachweis einer Bindung von Pyridoxalphosphat an gereinigtes RifD aus *Amycolatopsis mediterranei* (Kim et al., 1994); (3) ein erstmaliger Nachweis einer SMAT-Aktivität durch die Beteiligung von StsC an der Bildung von *scyllo*-Inosamin in *S. griseus* (Ahlert, 1997) und (4) vier hochkonservierte Aminosäure-Positionen Gly-197, Asp/Glu-222, Lys-258 und Arg-386, die in allen bisher



bekannten Aminotransferasen vorkommen, wobei sich die Nummerierung auf die AS-Positionen der cytosolischen Aspartat-Aminotransferase aus Schweineherz bezieht (Ochinnokov et al., 1973). Speziell das hochkonservierte Lys-258 bildet mit dem Cofaktor Pyridoxalphosphat eine Schiff'sche Base aus.

Putative Mitglieder der SMAT-Untergruppe besitzen folgendes Proteinsequenzmotiv im Vergleich zur Sequenz von LmbS aus *S. lincolnensis* 78-11:

Proteinsequenzmotiv SMAT:           Gx<sub>3</sub>Dx<sub>7</sub>Ax<sub>8</sub>EDx<sub>10</sub>Gx<sub>13</sub>**Kx**<sub>4-5</sub>g<sub>e</sub>GGx<sub>19</sub>G  
 Proteinsequenzmotiv LmbS:        Gx<sub>6</sub>p<sub>x</sub><sub>7</sub>s<sub>x</sub><sub>6</sub>EDx<sub>14</sub>Gx<sub>13</sub>**Kx**<sub>4</sub> aeGGx<sub>19</sub>G

Zusätzlich weist die LmbS-Primärstruktur Identitäten zu verschiedenen Aminotransferasen aus Streptomyceten wie beispielsweise aus *S. griseus* (Distler et al., 1992), *Streptomyces venezuelae* (Xue et al., 1998) und *Streptomyces antibioticus* (Quiros et al., 1998); (s. Tab. 1.2) und aus Gram-negativen Bakterien auf, die eine eindeutige Zuordnung in diese Enzymklasse zulassen.

**Tabelle 1.2: Sequenzähnlichkeiten zwischen LmbS und verschiedenen SMATs.** StrS: CAA68523; DesV: AAC68680; BlmS: AAD28515; OleN2: AAD55458; LmbS: S44965

	Sequenzidentität			
	StrS/ <i>S. griseus</i>	DesV/ <i>S. venezuelae</i>	BlmS/ <i>S. bluensis</i>	OleN2/ <i>S. antibioticus</i>
LmbS/ <i>S. lincolnensis</i>	37,7%	35,1%	37,5%	36,6%

### 1.2.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Untersuchung der Biosynthese der MTL-Untereinheit des Lincomycin A in *S. lincolnensis* 2936. Gerade die Biosynthese des MTL, eines einmalig in der Natur vorkommenden Metaboliten ist im Hinblick auf ähnliche Enzymfunktionen in anderen antibiotikasyntetisierenden Organismen und zur Entwicklung neuer Antibiotikastrukturen (Hybridantibiotika) durch ein gezieltes »pathway engineering« besonders interessant. Das derzeitige Postulat zur Biosynthese (s. Abb. 1.4) basiert lediglich auf Sequenzanalysen, Markierungsexperimenten und auf zwei Enzymtests, die ein Glucosegrundgerüst als Ausgangspunkt für weitere Modifikationen bis hin zum MTL ausschließen. Aus diesem Grund bestand die Notwendigkeit, grundlegende Einblicke in die MTL-Biosynthese durch die Anwendung molekulargenetischer, chemischer und enzymatischer Methoden erstmalig zu gewinnen.

Dazu wurde es notwendig

- (1) Proteine, die Schlüsselpositionen innerhalb der putativen Biosynthese besetzen, in löslicher, aktiver Form zu erhalten;
- (2) unter Verwendung eigens dafür chemisch synthetisierter bzw. enzymatisch *in situ* hergestellter Substrate postulierte Enzymreaktionen nachzuweisen;
- (3) eine heterologe Expression aller MTL-Proteine gemeinsam in einem Wirtsorganismus durchzuführen und eine mögliche MTL-Produktion nachzuweisen;
- (4) gezielte Mutanten zu generieren und zu charakterisieren und
- (5) die transkriptionelle Organisation des MTL-Subclusters zu analysieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits wurden von folgenden Herstellern bezogen:

#### Medienbestandteile, Chemikalien:

Agarose LE	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Amberlite IRA-420 (OH), Ionenaustauscher	Sigma, Deisenhofen
Antibiotika	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen
Chemikalien	Fluka, Buchs; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe, Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen
Radiochemikalien ( $\alpha$ -d-[ $^{32}$ P]-CTP, $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP, <i>Hyper</i> -Film)	Amersham Buchler, Braunschweig
DC-Alufolien Kieselgel 60 F <sub>254</sub>	Merck, Darmstadt
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
dNTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hybond-N <sup>+</sup> -Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PVDF-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PD-10-Colums, Sephadex G-25M	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Medienbestandteile	Life Technologies, Eggenstein; Difco, Detroit; Merck, Darmstadt; Oxoid, Wesel; Roth, Karlsruhe
Radiochemikalien, Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermosequenase Cycle-Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
T7-Sequenase 7-deaza-dGTP DNA-Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

#### Enzyme:

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
------------------------------	----------------------------------

DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Life Technologies, Eggenstein
DNase (RNase-frei)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
Restriktionsendonucleasen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Life Technologies, Eggenstein; Biolabs, New England, Beverly, USA; Eurogentec, Seraing, Belgien
T4-DNA-Ligase	Life Technologies, Eggenstein
T4-Polynucleotidkinase	Life Technologies, Eggenstein
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Life Technologies, Eggenstein
Vent- DNA-Polymerase	Biolabs, Schwalbach
aufgereinigte Transaldolase ( <i>E. coli</i> )	G. Sprenger, KFA Jülich
aufgereinigte Transketolase ( <i>E. coli</i> )	G. Sprenger, KFA Jülich
Transaldolase ( <i>Yeast</i> )	Sigma, Deisenhofen
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Sigma, Deisenhofen
Phosphoglycerat-Kinase	Sigma, Deisenhofen
Phosphoglucoisomerase	Sigma, Deisenhofen
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Sigma, Deisenhofen
Glycerinphosphat-Dehydrogenase	Sigma, Deisenhofen
Glucose-Kinase	Sigma, Deisenhofen
Lactat-Dehydrogenase	Sigma, Deisenhofen
Pyruvat-Kinase	Sigma, Deisenhofen

**Kits:**

BM Chromogenic Western Blotting Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
DIG-DNA-labelling-Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA/RNA Midi Kit	Qiagen, Hilden
Jet-Sorb-Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Western Blotting Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

Gel Extraction Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin C + T	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
Thermosequenase Cycle-Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
»rediprime«, Random Primer Labelling-Kit	Amersham Buchler, Braunschweig

## 2.2 Medien und Lösungen

### 2.2.1 Nährmedien

**für *Escherichia coli*:**

**LB-Medium/-Agar** (Miller, 1972): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% Agar, 1,8% NaCl

**SOB-Medium** (Hanahan, 1983): 2% BactoTrypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5% Hefeextrakt; Lösung autoklavieren und einstellen auf je 10 mM MgCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub>

**SOC-Medium** (Hanahan, 1983): SOB-Medium einstellen auf 20 mM D-Glucose

**M9-Medium** (Sambrook et al., 1989): 10% Lösung 1 (4% Glucose), 1% Lösung 2 (2% MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O), 1% Lösung 3 (0,2% CaCl<sub>2</sub>), 10% Lösung 4 (3,5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 1,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5% NaCl, 5% NH<sub>4</sub>Cl)

**LBM9**: 50% LB-Medium, 50% M9-Medium

**für Streptomyceten:**

**SPMR-Agar** (Babcock und Kendrick, 1988): 10,3% Saccharose, 1% MgCl<sub>2</sub>, 0,5% D-Glucose, 0,5% Difco Yeast, 2,2% Difco Agar, 20 ml/l 1 M TES pH 7.6, 2 ml/l Spurenelementlösung, nach autoklavieren 2 ml/l 5 M CaCl<sub>2</sub> zugeben

**SMA-Agar** (Distler et al., 1985): 2% Sojamehl, 2% D-Mannit, 2% Agar

**TSB-Medium** (Hopwood et al., 1985): 3% Oxoid Tryptone Soja Broth Powder

**TSB-PEG 8000** (Babcock und Kendrick, 1988): 3% Oxoid Tryptone Soja Broth Powder, 5% PEG 8000 autoklavieren und 0,5% Glycin, 5 ml/l  $MgCl_2$  (1M) zugeben

**YEME-Medium** (Hopwood et al., 1985): 0,3% Yeast Extract, 0,5% Bacto-Peptone, 0,3% Malt Extract, 1% Glucose, 10,3% Sucrose; nach autoklavieren 2 ml/l 2,5 M  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$

**MG-Medium** (Doull and Vining, 1989)

200 ml/l Maltose (25%), 2,1% Morpholinopropansulfonsäure, 0,02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 9 mg/l  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 mg/l  $CaCl_2$ , 1 mg/l NaCl, 0,882% Glutamat, 4,5 ml Spurenelementlösung, 150 ml/l K-Phosphat-Puffer (0.1 M), pH 6.5

**für *Micrococcus luteus*:**

**SNA-Agar** (Hopwood, et al., 1995) 0,8% Nutrient Broth, 0,6% Agar

**für *mel*-Promotortests:**

**AM-Medium** (nach Suter, 1983)

1,5% Glycerin, 0,5% L-Arginin, 0,03% L-Methionin, 0,1% L-Leucin, 0,05%  $K_2HPO_4$ , 0,02%  $MgSO_4$ , 0,001%  $CaCl_2$ , 0,001%  $FeSO_4$ , 0,001%  $CuSO_4$ , 0,001%  $ZnSO_4$ , 0,004%  $MnSO_4$

**AMT-Medium** (nach Suter, 1983)

AM-Medium, nach autoklavieren 0,1% L-Tyrosin zugeben

## 2.2.2 Sprühreagenzien für DC-Entwicklung

Cer-Lösung (Drepper et al., 1996):

1,25 g Molybdato-phosphorsäure-Hydrat, 0,5 g Cer-IV-sulfat, 41 ml  $H_2O$ , 3 ml konz.  $H_2SO_4$

Anisaldehydlösung (Stahl und Kaltenbach, 1961): 0,5 ml Anisaldehyd in 50 ml konz.  $CH_3CO_2H$ , 1 ml konz.  $H_2SO_4$

### 2.2.3 Antibiotika

Ampicillin	100 µg/ml
Apramycin	25 µg/ml in SPMR-Medium, 12,5 µg/ml in SMA-Medium
Chloramphenicol	30 µg/ml
Hygromycin	200 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml
Thiostrepton	25 µg/ml
Tobramycin	4 µg/ml
Rifampicin	400 µg/ml

## 2.3 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

**Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme.**

Stamm	wichtige Eigenschaften/ Antibiotikum	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> , (DE3), Cm <sup>R</sup> , pLysS	Studier et al., 1990
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , φ80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> JM109	<i>thi-1</i> , <i>recA1</i> Δ ( <i>lac-proA,B</i> ), F <sup>-</sup> , <i>traD36</i> , <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>Q</sup> M15	Yanisch-Perron et al., 1985
<i>E. coli</i> JM109 (DE3)	<i>E. coli</i> JM109, λ(DE3)	Promega (Heidelberg)
<i>E. coli</i> JM110	<i>dam</i> <sup>-</sup> , <i>dcm</i> <sup>-</sup> , <i>hsdR</i>	Promega (Heidelberg)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>lacZ</i> ΔM15, <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , <i>recA1</i>	Stratagene, Heidelberg Bullock et al., 1987
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam</i> <sup>-</sup> , <i>dcm</i> <sup>-</sup>	Oh und Chater, 1997
<i>M. luteus</i>	Lin <sup>S</sup>	Tang
<i>M. luteus</i> DN218	Lin <sup>S</sup> , Thio <sup>R</sup>	Neusser, 1999
<i>S. lincolnensis</i> NRRL2936	Lincomycinproduzent, Lin <sup>R</sup>	Swezey

Fortsetzung Tab. 2.1:

<b>Stamm</b>	<b>wichtige Eigenschaften/ Antibiotikum</b>	<b>Herkunft</b>
<i>S. lincolnensis</i> 78-11	Lincomycinüberproduzent, Lin <sup>R</sup>	Tang
<i>S. lincolnensis</i> NRRL2936-LmbR-Mutante 15(1B)	<i>lmbR</i> <sup>-</sup> , LinA <sup>-</sup> , Lin <sup>R</sup>	Hasib, 1998
<i>S. lividans</i> 66 TK 23	<i>spc-1</i> , Lin <sup>S</sup>	John Innes Institute, Norwich
<i>S. lividans</i> 66 1326	Actinorhodin, Prodigiosin	John Innes Institute, Norwich

## 2.4 Vektoren und rekombinante Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide sind in Tabelle 2.2, neukonstruierte Plasmide in Tabelle 2.3 aufgeführt.

**Tabelle 2.2: Vektoren und Plasmide.**

<b>Vektor</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
pDNW26	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ermEp</i> , <i>ori</i> pIJ101, ColE1, RSB <sup>lmbY</sup> , His-Tag	Neusser, 1999
pEFBA	<i>bla</i> , ColE1, <i>aacC4</i> , IS140'	Fernandez, unveröffentlicht
pET11a	<i>bla</i> , <i>lacI</i> , T7-F10p, <i>lacO</i> , s10-leader, ColE1	Studier et al., 1990
pET11dP	<i>bla</i> , <i>lacI</i> , T7-F10p, <i>lacO</i> , s10-leader, ColE1	Wehmeier und Hammes, unveröffentlicht
pET16b	<i>bla</i> , <i>lacI</i> , T7-F10p, <i>lacO</i> , s10-leader, His-Tag, ColE1	Studier et al., 1990
pHM8	<i>hyg</i> , <i>ermEp</i> , mini-circle, ColE1	Motamedi et al., 1995
pHLW1	<i>bla</i> , <i>lacZ</i> , ColE1, <i>aacC4</i> , IS140'	Hasib, 1998
pIJ6021	<i>kan</i> , <i>tsr</i> , <i>tipAp</i> , <i>ori</i> pIJ101	Murakami et al., 1989
pIJ4123	<i>kan</i> , <i>tsr</i> , <i>redD</i> , <i>tipAp</i> , <i>ori</i> pIJ101, His-tag	Murakami et al., 1989
pIJK	<i>bla</i> , <i>lacZ</i> ', ColE1, <i>lmbIJK</i>	Haase, unveröffentlicht
pJOE2702	<i>bla</i> , <i>rhap</i> , <i>rrnB</i> , ColE1	Volff et al., 1996
pMHW2	<i>bla</i> , <i>lacZ</i> ', ColE1, <i>lmbO</i>	Haase, 1996
pMHW2-1	<i>bla</i> , <i>lacZ</i> ', ColE1, <i>lmbO</i>	Haase, 1996
pMHW5	<i>bla</i> , <i>lacI</i> , T7-F10p, <i>lacO</i> , s10-leader, <i>lmbO</i>	Haase, 1996



Fortsetzung Tab. 2.2:

<b>Vektor</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
pMHW8	<i>bla</i> , <i>lacI</i> , <i>T7-F10p</i> , <i>lacO</i> , s10-leader, His-Tag, <i>lmbO</i>	Haase, 1996
pMHW10	<i>kan</i> , <i>tsr</i> , <i>tipAp</i> , <i>ori</i> pIJ101, <i>lmbS</i>	Haase, 1996
pSL1180	<i>bla</i> , <i>lacZ'</i> , M13 <i>ori</i>	Brosius, J. 1989
pSTW3.3	<i>cat</i> , <i>tsr</i> , <i>strR</i> , <i>strRp</i> , <i>ori</i> pACYC184, <i>ori</i> pIJ101	Thamm, 1999
pSUT7	<i>cat</i> , <i>T7p</i> , <i>ori</i> P15A	Pöhling, 1998
pTU979-1	<i>lmbKLMNZPOSRQTVWlmrB'</i>	Zhang, 1993
pTU50-76	<i>lmbKJIHGF'</i>	Zhang, 1993
pUC18	<i>bla</i> , <i>lacZ'</i> , ColE1	Vieira und Messing, 1982
pUC19	<i>bla</i> , <i>lacZ'</i> , ColE1	Vieira und Messing, 1982
pUC1911	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>lacZ'</i> , <i>ptrp</i> , <i>ori</i> pIJ101, ColE1	Salah-Bey, 1995
pUCBM21	<i>bla</i> , <i>lacZ'</i> , ColE1	Vieira und Messing, 1982
pUCPU21	<i>bla</i> , <i>lacZ'</i> , ColE1	Wehmeier, unveröffentlicht
pUWL201	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ermEp</i> , <i>ori</i> pIJ101, ColE1	Wehmeier, unveröffentlicht
pUWL218	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>lacZ'</i> , <i>ori</i> pIJ101, ColE1	Wehmeier, 1996
pUWL219	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>lacZ'</i> , <i>ori</i> pIJ101, ColE1	Wehmeier, 1996
pUWL201RSBA	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ermEp</i> , <i>ori</i> pIJ101, ColE1, RSBA	Weingarten, unveröffentlicht
pUWLSK	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ermEp</i> , <i>lacp</i> , <i>T3p</i> , <i>T7-F10p</i> , <i>ori</i> pIJ101, ColE1	Wehmeier, 1996
pUWLKS	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ermEp</i> , <i>lacp</i> , <i>T3p</i> , <i>T7-F10p</i> , <i>ori</i> pIJ101, ColE1	Wehmeier, 1996
pWKD13	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>mel</i> (promotorlos), <i>xylE</i> (promotorlos), ColE1, <i>ori</i> SCP2	Retzlaff und Distler, 1995
pWKD13II	<i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>mel</i> (promotorlos), <i>xylE</i> (promotorlos), ColE1, <i>ori</i> pIJ101	Retzlaff und Distler, 1995

**Tabelle 2.3: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.**

<b>neukonstruierte Plasmide</b>	<b>Konstruktion</b>
pAAW5.1	700 bp PCR-Produkt ( <i>lmbR</i> ) blunt-end in pUC18 <i>SmaI</i>
pAAW5.2	700 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW5.1 in pET11a
pAAW5.3	700 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW5.1 in pET16b
pAAW5.4	700 bp <i>XbaI/SmaI</i> aus pAAW5.2 in pUC18
pAAW5.5	700 bp <i>XbaI/SmaI</i> aus pAAW5.3 in pUC18

Fortsetzung Tab. 2.3:

<b>neukonstruierte Plasmide</b>	<b>Konstruktion</b>
pAAW5.7	700 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW5.5 in pUWL201
pAAW5.8	700 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW5.1 in pIJ6021
pAAW5.10	700 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW5.1 in pUWL201
pAAW5.11	700 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW5.1 in pIJ4123
pAAW5.17	700 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW5.1 in pAAW 24.1
pAAW5.18	700 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW5.1 in pAAW27.4
pAAW5.19	700 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW5.1 in pAAW23.1
pAAW5.20	700 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW5.1 in pDNW26 RSBY
pAAW5.22	700 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW5.1 in pJO2702
pAAW8.1	1000 bp PCR-Produkt ( <i>lmbP</i> ) blunt-end in pUC18 <i>SmaI</i>
pAAW8.2	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pET11a
pAAW8.3	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pET16b
pAAW8.4	1000 bp <i>XbaI/SmaI</i> aus pAAW8.2 in pUC18
pAAW8.5	1000 bp <i>XbaI/SmaI</i> aus pAAW8.3 in pUC18
pAAW8.6	1000 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW8.4 in pUWL201
pAAW8.7	1000 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW8.5 in pUWL201
pAAW8.8	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pIJ6021
pAAW8.10	1000 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW8.1 in pUWL201
pAAW8.11	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pIJ4123
pAAW8.14	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pHM8a
pAAW8.15	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pUWL201RSBA
pAAW8.17	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pAAW24.1
pAAW8.18.	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pAAW27.4
pAAW8.19	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pAAW23.1
pAAW8.20	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pDNW26 RSBY
pAAW8.22	1000 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW8.1 in pJOE2702
pAAW9.1	870 bp PCR-Produkt ( <i>lmbN</i> ) blunt-end in pUC18 <i>SmaI</i>
pAAW9.2	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pET11a
pAAW9.3	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pET16b
pAAW9.4	870 bp <i>XbaI/SmaI</i> aus pAAW9.2 in pUC18
pAAW9.5	870 bp <i>XbaI/SmaI</i> aus pAAW9.3 in pUC18
pAAW9.7	870 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW9.5 in pUWL201

Fortsetzung Tab. 2.3:

<b>neukonstruierte Plasmide</b>	<b>Konstruktion</b>
pAAW9.8	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pIJ6021
pAAW9.10	870 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW9.1 in pUWL201
pAAW9.11	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pIJ4123
pAAW9.14	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pHM8a
pAAW9.15	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pUWL201RSBA
pAAW9.17	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pAAW 24.1
pAAW9.18	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pAAW27.4
pAAW9.19	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pAAW23.1
pAAW9.20	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pDNW26 RSBY
pAAW9.21	220 bp <i>NcoI</i> -Deletion in pAAW9.3
pAAW9.22	870 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW9.1 in pJO2702
pAAW11.1	970 bp PCR-Produkt ( <i>lmbO</i> ) blunt-end in pUC18 <i>SmaI</i>
pAAW11.2	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pET11a
pAAW11.3	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pET16b
pAAW11.4	970 bp <i>XbaI/SmaI</i> aus pAAW11.2 in pUC18
pAAW11.5	970 bp <i>XbaI/SmaI</i> aus pAAW11.3 in pUC18
pAAW11.6	970 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW11.4 in pUWL201
pAAW11.7	970 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW11.5 in pUWL201
pAAW11.8	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pIJ6021
pAAW11.10	970 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW11.1 in pUWL201
pAAW11.11	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pIJ4123
pAAW11.12	970 bp <i>NdeI/EcoRI</i> aus pAAW11.1 in pIJ4123
pAAW11.14	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pHM8a
pAAW11.15	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pUWL201RSBA
pAAW11.17	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pAAW 24.1
pAAW11.18	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pAAW27.4
pAAW11.19	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pAAW23.1
pAAW11.20	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pDNW26 RSBY
pAAW11.22	970 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pAAW11.1 in pJOE2702
pAAW14.1	13600 bp <i>EcoRI</i> (MTL-Gene) aus pTU979-1 in pUWL218
pAAW14.2	620 bp <i>SmaI</i> ( <i>lmbO</i> ) aus pTU979-1 in pUC18
pAAW14.3	3400 bp <i>KpnI/SphI</i> ( <i>lmbOPZ</i> ) aus pTU979-1 in pUC18

Fortsetzung Tab. 2.3:

<b>neukonstruierte Plasmide</b>	<b>Konstruktion</b>
pAAW14.4	2500 bp <i>SstI/SphI</i> aus pAAW14.3 in pUC18
pAAW14.5	13180 bp <i>EcoRI/BamHI</i> (MTL-Gene) aus pTU979-1 in pSL1180
pAAW14.6	13180 bp <i>EcoRI/HindIII</i> aus pAAW14.5 in pUWLSK
pAAW 14.7	1600 bp <i>EcoRI/BamHI</i> ( <i>lmbJI</i> ) aus pIJK in 14.6
pAAW23.1	4150 bp <i>SphI</i> aus pAAW8.11 in pSTW 3.3
pAAW24.1	4100 bp <i>SphI</i> aus pAAW8.8 in pSTW 3.3
pAAW27.2	200 bp <i>XbaI/NdeI</i> aus PCR ptr-Promotor in pUCPU21
pAAW27.4	200 bp <i>HindIII/KpnI</i> aus pAAW27.2 in pUWL201 $\Delta NdeI$
pAAW28.10	2500 bp <i>BglIII/SstI</i> ( <i>lmbRSO</i> ) aus pTU979-1 in pUC18 ( <i>BamHI/SstI</i> )
pAAW28.11	600 bp <i>ApaI/KpnI</i> aus PCRaacC4 in pAAW28.10
pAAW28.12	1850 bp <i>NdeI/BamHI</i> -PCR ( <i>lmbS/O</i> ) in pET 11a
pAAW28.13	1850 bp <i>NdeI/BamHI</i> -PCR ( <i>lmbS/O</i> ) in pET16b
pAAW28.14	1850 bp <i>NdeI/BamHI</i> -PCR ( <i>lmbS/O</i> ) in pAAW24.1
pAAW29.1	2400 bp <i>SmaI</i> ( <i>lmrB, lmbWVT</i> ) aus pTU979-1 in pUC18
pAAW29.2	1300 bp <i>ApaI</i> ( <i>lmbW</i> ) aus pAAW29.1 in pSL1180
pAAW29.3	500 bp <i>KpnI/NcoI</i> -Fagment ( <i>lmbV</i> ) aus pAAW29.1 in pET11dP
pAAW29.4	400 bp <i>KpnI</i> ( <i>lmbW</i> ) aus pAAW29.1 in pUC18
pAAW29.5	400 bp <i>EcoRI/BamHI</i> -Fagment aus pAAW29.4 in pWKD13
pAAW29.6	1300 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW29.2 in pWKD13
pAAW29.7	500 bp <i>NcoI/BamHI</i> aus pAAW29.3 in pSL1180
pAAW29.8	500 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW29.7 in pWKD13
pAAW29.9	560 bp <i>KpnI/NcoI</i> -Fagment 2 ( <i>lmbVT</i> ) aus pAAW29.1 in pET11dP
pAAW29.10	560 bp <i>NcoI/BamHI</i> aus pAAW29.9 in pSL1180
pAAW29.11	560 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW29.10 in pWKD13
pAAW29.12	600 bp <i>BclI/SphI</i> ( <i>lmbWV</i> ) aus pAAW29.1 ( <i>E. coli</i> ET12567) in pUCBM21 ( <i>SphI/BamHI</i> )
pAAW29.13	600 bp <i>EcoRI/NcoI</i> aus pAAW29.12 in pSL1180
pAAW29.14	600 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW29.13 in pWKD13
pAAW29.15	1300 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW29.2 in pWKD13II
pAAW29.16	400 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW29.4 in pWKD13II
pAAW29.17	500 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW29.7 in pWKD13II
pAAW29.18	600 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW29.13 in pWKD13II

Fortsetzung Tab. 2.3:

<b>neukonstruierte Plasmide</b>	<b>Konstruktion</b>
pAAW30.1	2500 bp <i>SphI/SstI</i> ( <i>lmbOPZN</i> ) aus pTU979-1 in pUC18
pAAW30.2	530 bp <i>NcoI</i> ( <i>lmbZN</i> ) aus pAAW30.1 in pSL1180
pAAW30.3	530 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW30.2 in pWKD13
pAAW30.4	600 bp <i>ApaI/SphI</i> ( <i>lmbZN</i> ) aus pAAW30.1 in pUCBM21
pAAW30.5	340 bp <i>NcoI/BamHI</i> aus pAAW30.4 in pSL1180
pAAW30.6	340 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW30.5 in pWKD13
pAAW30.7	800 bp <i>ApaI</i> ( <i>lmbZ</i> ) aus pAAW30.1 in pSL1180
pAAW30.8	800 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW30.7 in pWKD13
pAAW30.9	300 bp <i>NcoI</i> aus pAAW30.4 in pSL1180
pAAW30.10	300 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW30.9 in pWKD13
pAAW30.11	700 bp <i>NcoI</i> ( <i>lmbN</i> ) aus pAAW30.1 in pSL1180
pAAW30.12	700 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW30.11 in pWKD13
pAAW30.13	30.1 <i>NdeI</i> (Polylinker, fill in)
pAAW30.14	165 bp <i>NdeI/NcoI</i> aus pAAW9.1 in pSL1180
pAAW30.15	165 bp <i>NdeI</i> (fill in)/ <i>EcoRI</i> aus pAAW30.14 in pWKD13 <i>BamHI</i> (fill in)/ <i>EcoRI</i>
pAAW30.16	530 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW30.2 in pWKD13II
pAAW30.17	800 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW30.7 in pWKD13II
pAAW30.18	340 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW30.5 in pWKD13II
pAAW31.1	1500 bp <i>BamHI</i> aus pHLW1 in pAAW29.1 ( <i>BclI</i> )
pAAW34.1	600 bp <i>EcoRI/SphI</i> ( <i>lmbKL</i> ) aus pTU979-1 in pUC18
pAAW34.2	600 bp <i>EcoRI/SmaI</i> aus pAAW34.1 in pSL1180
pAAW34.3	165 bp <i>EcoRI/KpnI</i> ( <i>lmbJ</i> ) aus pIJK in pWKD13II
pAAW34.4	600 bp <i>EcoRI/BamHI</i> aus pAAW34.2 in pWKD13II
pAAW34.5	1300 bp <i>EcoRI/SstI</i> ( <i>lmbKL</i> ) aus pTU979-1 in pUCBM21
pAAW34.6	1500 bp <i>SmaI</i> aus pEFBA in 34.5
pAAW34.7	460 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus PCR-Produkt ( <i>lmbK</i> ) in pET11a
pAAW34.8	460 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus PCR-Produkt ( <i>lmbK</i> ) in pET16b
pAAW 34.9	460 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus PCR-Produkt ( <i>lmbK</i> ) in pJOE2702
pAAW34.10	460 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus PCR-Produkt ( <i>lmbK</i> ) in pET16b
pAAW34.11	2480 bp <i>SstI</i> ( <i>lmbIJKL</i> ) aus pAAW14.7 in pUWL218
pAAW34.12	680 bp <i>SphI/EcoRI</i> ( <i>lmbKL</i> ) aus pAAW34.1 in pUWL219
pAAW35.1	1180 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pHMW10 in pDNW26RSBY

Fortsetzung Tab. 2.3:

neukonstruierte Plasmide	Konstruktion
pAAW35.2	1180 bp <i>NdeI/BamHI</i> aus pHMW10 in pUWL201RSBA
pAAW36.1I	2400 bp <i>NotI (lmbTQRS)</i> aus pTU979-1 in pSL1180
pAAW36.1II	1800 bp <i>NotI (lmbTQR)</i> aus pTU979-1 in pSL1180
pAAW36.3	600 bp <i>HincII (lmbQR)</i> aus pAAW36.1I in pSL1180

## 2.5 Verwendete Oligonucleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide für die PCR sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Sie wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg), Life Technologies (Eggenstein) oder Interaktiva (Ulm) bezogen.

**Tabelle 2.4: Verwendete PCR-Primer.** Fett gedruckte Buchstaben kennzeichnen Basenaustausche zur Insertion von Restriktionsschnittstellen.

Bezeichnung	Sequenz 5' ® 3'	generierte Restriktionsschnittstelle	Gen
M13-rp	GAGCGGATAACAATTTACACAGG		<i>lacZ</i>
M13-up	GTAAAACGACCGGCCAGT		<i>lacZ</i>
<i>ptr(NdeI)</i>	GCCGTCATATGGGCTCCTTG	<i>NdeI</i>	<i>ptrp</i>
<i>lmbR1</i>	CCGAACGGAGTCAACATATGAAGATC	<i>NdeI</i>	<i>lmbR</i>
<i>lmbR2</i>	TCCTCCTCGGCGGGATCCAAGCA	<i>BamHI</i>	<i>lmbR</i>
<i>lmbP1</i>	GGACAGGTGACATATGATCGACGT	<i>NdeI</i>	<i>lmbP</i>
<i>lmbP2</i>	TGGAGGCCGGATCCGATGATGC	<i>BamHI</i>	<i>lmbP</i>
<i>lmbN1</i>	CCTGGGAGAAACATGTGAGCACTCTGGA	<i>NdeI</i>	<i>lmbN</i>
<i>lmbN2</i>	TCCGCCGGATCCAGTACCGCC	<i>BamHI</i>	<i>lmbN</i>
<i>lmbO1</i>	GACCGAACCACATATGACCCCTCGC	<i>NdeI</i>	<i>lmbO</i>
<i>lmbO2</i>	GGTCACACCCTAGGGATCCTCGGCA	<i>BamHI</i>	<i>lmbO</i>
LMBO2	GGTCACACCCTCGGGATCCTCGGCA	<i>BamHI</i>	<i>lmbO</i>
LMBS	GGGGGTGAAGTACATATGAGCGACTAC	<i>NdeI</i>	<i>lmbS</i>
<i>Apra/Apa</i>	TCAGCGGGCCCTTGCCCC	<i>ApaI</i>	<i>aacC4</i>
S-OMu PCR1	CCGGCCTGCGGC		<i>lmbR</i>

Fortsetzung Tab. 2.4:

Bezeichnung	Sequenz 5' ® 3'	generierte Restriktions-schnittstelle	Gen
S-OMu PCR2	CGCCCAATGCGGGTGCC		<i>lmbO</i>
S-OMu PCR3	CCCTTCGCCGCGCCCTGC		<i>lmbS</i>
S-OMu PCR4	TGGTGCCGACCCCGAGGGC		<i>lmbS</i>
lmbK1	GAGACGGT <u>CATAT</u> GGGACGCGAG	<i>NdeI</i>	<i>lmbK</i>
lmbK2	CAGGAG <u>GATCC</u> GGTGCGCAT	<i>BamHI</i>	<i>lmbK</i>
K-Mu1	TGCTGATCGAGGCGACGGTGC		<i>lmbK</i>
K-Mu2	AGGCTCGGCACGCGGTGGTAC		<i>lmbK</i>
lmbW Mu-1	GGGCGATCCTTCGCGAACCGC		<i>lmbW</i>
lmbW Mu-2	AGGACGTGCCCGCCGCCGC		<i>lmbW</i>
aacC4-a	CATGCCCTCGTGGTCAGGTCT		<i>aacC4</i>
aacC4-e	TCATGAGCTCAGCCAATCGACTG		<i>aacC4</i>

## 2.6 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Plasmidtragende Stämme wurden stets unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert.

### 2.6.1 Anzucht von *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium oder auf LB-Agar kultiviert. Bei Selektion auf rekombinante pUC18/19-, pUCBM21-, pUCPU21- und pUWL218/219-Plasmide wurde 40 µg/ml X-Gal verwendet. Dauerkulturen wurden in 30% Glycerin in LB-Medium bei -20°C gelagert. Als Übernachtskulturen (ÜNK) wurden Anzuchten bezeichnet, die mindestens 16 h inkubiert wurden.

### **2.6.2 Anzucht und Lagerung von *Micrococcus luteus*/ *Micrococcus luteus* DN218**

*M. luteus* wurde in TSB- oder LB-Medium kultiviert oder *M. luteus* DN218 entsprechend in TSB- oder LB-Medium mit 25 µg/ml Thiostrepton.

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

*S. lincolnensis* wurde ausschließlich auf SPMR-Platten bebrütet. Andere Streptomycceten-Stämme wurden zusätzlich auf SMA-Platten zur Sporulation bei 28°C inkubiert.

Flüssigkulturen wurden in SPMR-, TSB- oder YEME-Medium auf einem Rotationsschüttler bei 200 Upm inkubiert. Für die Herstellung von Sporensuspensionen wurden gebildete Sporen mit 30%igem Glycerin abgeschwemmt und das Sporenfiltrat bei -20°C gelagert.

## **2.7 Lincomycin-Bioassay**

Der Nachweis einer Lincomycin-Produktion erfolgte auf SNA-Agar. Entsprechende, ausgestanzte Agarblöckchen (Ø 9 mm) aus Platten mit *S. lincolnensis* 2936, mit *S. lincolnensis* 2936-Mutanten oder mit komplementierten *S. lincolnensis* 2936-Mutanten wurden in einer sterilen Nunc-Schale auf frisch gegossenes SNA-Medium, das mit einer ÜNK des Indikatorstammes *M. luteus* bzw. *M. luteus* DN218 versetzt wurde, gelegt. Zum Aushärten des SNA-Agars wurde die Nunc-Schale für 2 h bei 4°C gelagert und anschließend über Nacht zur Ausbildung von Hemmhöfen bei 28°C inkubiert.

## **2.8 Molekularbiologische Methoden**

### **2.8.1 Isolierung von Plamid-DNA**

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mittels Kochpräparation (Sambrock et al., 1989), alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden). Plasmide aus Streptomycceten wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert.



### 2.8.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus Streptomyceten

Chromosomale DNA zur Identifizierung von *S. lincolnensis*-Mutanten wurde entsprechend der Methode von Pospiech und Neumann (1995) oder mit dem NucleoSpin C+T Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt.

*S. lincolnensis*-Gesamt-DNA wurde nach der von Mehling et al. (1995) beschriebenen Methode isoliert.

### 2.8.3 Isolierung von RNA aus *S. lincolnensis*

Gesamt-RNA aus *S. lincolnensis* wurde mit dem RNeasy Midi Kit bzw. dem DNA/RNA Midi Kit (Qiagen) isoliert. Ca. 0,5 g (Feuchtwicht) Zellen wurden nach Vorschrift des Herstellers präpariert. Bei der Verwendung des Qiagen DNA/RNA Midi Kit wurden folgende Modifikationen durchgeführt: Präzipitierte RNA wurde in Denaturierungslösung (4 M Guanidiniumrhodanid, 25 mM Natriumcitrat (pH 7), 0,5% Sarcosyl, 0,1 M 2-Mercaptoethanol aufgenommen (Chromczynski und Sacchi, 1987), in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 250 ml RNase-freiem Wasser gelöst. Die Reinheit und die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Wenn die RNA-Isolierung nicht direkt nach Ernte der Zellen erfolgte, wurden diese nach einmaligem Waschen in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.8.4 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten und RNA

Zur quantitativen und qualitativen Analyse von DNA-Restriktionen wurden 0,8 - 1,2%ige Agarosegele mit einem Ethidiumbromidgehalt von 50 ng/ml verwendet. Die Auftrennung erfolgte horizontal bei einer Spannung von 50 - 120 V in TAE-Puffer. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die DNA mittels UV-Licht ( $\lambda = 310$  nm) als fluoreszierende Bande sichtbar gemacht. Als Größenmarker diente sowohl  $\lambda$ -DNA [*EcoRI/HindIII*],  $\lambda$ -DNA [*HindIII*], 1 kb-ladder als auch 100 bp-ladder. Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem "JET-Sob"-Kit (Genomed), dem Gel-extraction Kit (Qiagen) oder dem Gel-extraction Kit von Macherey-Nagel, Düren nach Angaben der Hersteller.

Die Trennung von RNA in Agarosegelen wurde entweder nach der von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode mit Formaldehyd (Endkonzentration: 0,22 M) als denaturierendem Agens in MOPS-Elektrophoresepuffer (20 mM MOPS, 5 mM NaOAc, 1 mM EDTA, pH 7,2) oder nach der von Pelle und Murphey (1993) beschriebenen Methode durchgeführt. Als Längenstandard diente »RNA ladder« (Life Technologies, Eggenstein).

### **2.8.5 *In vitro* Manipulation von Nukleinsäuren**

Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatase (CIP), T4-DNA Ligase und Klenow-Fragment der DNA-Polymerase wurden nach Vorschrift der Hersteller verwendet.

### **2.8.6 Markierung von DNA-Fragmenten**

Eine radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem "rediprime" Random Primer Labelling Kit und 50  $\mu\text{Ci}$   $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-CTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Vorschrift des Herstellers.

### **2.8.7 Hybridisierung an immobilisierten Nukleinsäuren und deren Detektion**

Elektrophoretisch getrennte DNA oder RNA wurde auf positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Buchler, Braunschweig) mittels 0,4 N NaOH für DNA oder 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,2) für RNA (Chomczynski, 1992) übertragen.

Bei DNA-DNA Hybridisierungen mit homologen, radioaktiv markierten Sonden wurden die Membranen in 6 x SSC, 0,5% SDS, 1% Blockingreagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bei 65°C ü.N. inkubiert.

Für RNA-DNA Hybridisierungen wurde »High-SDS«-Puffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit 50% Formamid bei 50°C verwendet.

Nach der Hybridisierung wurde nicht gebundene Sonde durch Waschen mit verschiedenen Konzentrationen SSC (6 x SSC - 0,5 x SSC), 0,5% SDS bei gegebenenfalls zunehmenden Temperaturen entfernt.

### **2.8.8 Autoradiographie**

Zur Detektion von [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Fragmenten wurde "Hybond MP"-Röntgenfilm bei der Analyse von DNA/DNA-Hybridisierungen nach Inkubation bei -70°C verwendet. Im Gegensatz dazu erfolgte die Detektion von [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Fragmenten bei DNA/RNA-Hybridisierungen mittels Hyperfilm β-max von Amersham nach Exposition bei RT. In beiden Fällen wurden Röntgen-Verstärkerfolien Special 200 (Dr. Goos Suprema, Heidelberg) verwendet.

### **2.8.9 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynucleotiden nach Sanger et al. (1977). Die Sequenz wurde durch die Fluoreszenztechnik erhalten. Die Sequenzierung mit Fluorescein- oder CY5-markierten Primern erfolgte mit dem Thermosequense Cycle-Sequencing Kit und dem T7-Sequense 7-deaza-dGTP DNA sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Nach der Sequenzierreaktion wurden die erhaltenen Fragmente mittels einem 6 M Harnstoff/6% "Hydrolink Long Ranger"-Gel (Biozym, Hessisch Oldendorf) getrennt. Die Detektion erfolgte durch einen "A.L.F. DNA-Sequencer" bzw. "A.L.F. Express" (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Zur Analyse der gemessenen DNA-Sequenzen wurde das Computerprogramm A.L.F. Manager 2.5 bzw. A.L.F. Win 1.1 verwendet.

### **2.8.10 DNA und Aminosäuresequenzanalysen**

Die Programme DNA-Strider (Marck, 1989), Brujone (Vara), BLAST (Altschul et al., 1990) und Clustal V (Higgins, 1991) wurden für DNA- und Aminosäuresequenzanalysen verwendet. Datenbankvergleiche für Aminosäuresequenzen wurden als BLAST-Suche (<http://www>.

### 2.8.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde in Thermocyclern (Biometra, Göttingen) nach Bej et al. (1991) durchgeführt. Es wurde *Taq*- und Vent-DNA-Polymerase mit den vom Hersteller jeweils empfohlenen Puffern verwendet. Das für die Amplifizierung des jeweiligen Zielgens geeignete Primerpaar und deren Hybridisierungstemperatur wurde mit dem Programm PrimerFind 3.0 (Fröbel Labor Geräte, Lindau) ermittelt.

Die Amplifikationszeit betrug ca. 1 min/1000 bp Produktlänge.

Amplifikationsprogramm:

Schritt 1	98 °C	5 min	Denaturierung
2	95 °C	1 min	Zugabe der Polymerase
3	45 - 72 °C	30 sec	Annealing
4	72 °C	1 min/kb	Amplifikation
5	72 °C	2 min	Amplifikation

Die Amplifizierung (Schritt 2 - 4) des entsprechenden Gens erfolgte in 25 - 30 Reaktionszyklen. Die PCR-Reaktionen wurden nach den Bedingungen in Tabelle 2.5 und 2.6 durchgeführt.

**Tabelle 2.5: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze.**

Standardreaktionsansatz	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Vent-DNA-Polymerase
Polymerasepuffer (10 x)	10%	10%
dNTP (je)	50 nmol	12,5 nmol
Primer (je)	45 pmol	15 pmol
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	-
DMSO	10%	10%
Template-DNA:		
chromosomale DNA	150 ng	150 ng
Plasmid-DNA	15 ng	15 ng
DNA-Polymerase	2 U	2 U

**Tab. 2.6: Bedingungen der jeweiligen PCR-Reaktionen.**

<b>Gen/DNA-Bereich</b>	<b>Primerpaar</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>	<b>Template-DNA</b>
<i>ptr</i> -Promotor	up/ptr( <i>Nde</i> I)	45°C	pUC1911
<i>lmbR</i>	lmbR1/lmbR2	46°C	<i>S. lincolnensis</i> 2936
<i>lmbP</i>	lmbP1/lmbP2	54°C	<i>S. lincolnensis</i> 2936
<i>lmbN</i>	lmbN1/lmbN2	49°C	<i>S. lincolnensis</i> 2936
<i>lmbO</i>	lmbO1/lmbO2	57°C	<i>S. lincolnensis</i> 2936
<i>lmbS/lmbO</i>	LMBS/LMBO2	50°C	<i>S. lincolnensis</i> 2936
<i>lmbK</i>	lmbK1/lmbK2	48°C	<i>S. lincolnensis</i> 2936
<i>aacC4</i>	Apra-Apa/rp	58,5°C	pHLW1
<i>lmbK</i> -MuPCRII	K-Mu1/K-Mu2	63°C	chromosomale DNA <i>lmbK</i> -Mutanten
<i>lmbS</i> -MuPCRII	S-OMu PCR3/S-OMu PCR4	69°C	chromosomale DNA <i>lmbS</i> -Mutanten
<i>lmbW</i> -MuPCRII	W-Mu1/W-Mu2	71°C	chromosomale DNA <i>lmbW</i> -Mutanten
<i>aacC4</i> -PCRI (Mutantenscreening)	aacC4-a/aacC4-e	60,5°C	chromosomale DNA Mutanten <i>lmbS/lmbK/lmbW</i>

### 2.8.12 Transformation von *E. coli*, *S. lividans* und *S. lincolnensis*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). *S. lividans* 66 TK23/66 1326 und *S. lincolnensis* 2936 wurden nach dem Protokoll von Babcock und Kendrick (1988) protoplastiert und transformiert.

### 2.8.13 Integration von DNA in das Genom von *S. lincolnensis* 2936

Zur Erzeugung Apramycin-resistenter MTL-Mutanten wurde unmethylierte Plamid-DNA (aus *E. coli* JM110 oder *E. coli* ET12567) nach Denaturierung (Oh und Chater, 1997) in *S. lincolnensis* 2936 transformiert. Die Regenerierung erfolgte für 1 - 2 Tage auf SPMR-Platten. Auf eine erfolgreiche Integration von Plasmid-DNA in das Genom von *S. lincolnensis* 2936 wurde mit 15 - 25 µg/ml Apramycin selektiert. Isolierte Klone wurden über drei Sporulationszyklen hinweg angezogen, um eine Stabilisierung der Mutation zu erreichen. Die Blockierung innerhalb des Lincomycin-Biosyntheseweges wurde durch eine starke Verminderung der Hemmhofbildung (Lincomycin A-Produktion) im Vergleich zum Wildstamm in Bioassays mit *M. luteus* sichtbar (s. 2.7).

### 2.8.14 Komplementation erzeugter Mutanten

Zum einen wurden zur Komplementation hergestellte Protoplasten der jeweiligen Mutanten (s. 2.8.12) mit den entsprechenden Komplementationsplasmiden (Plasmide, die die intakten Gene enthielten) transformiert. Die Selektion erfolgte nach 16 h mittels 25 µg/ml Thiostrepton. Resistente Klone wurden durch Ausstrich auf SPMR<sub>thio</sub>-Platten vermehrt und im weiteren Verlauf im Bioassay unter Verwendung von *M. luteus* DN218 analysiert (s. 2.7).

In weiteren Komplementationsversuchen wurden Kreuzfütterungen sowohl mit MTL als auch mit PPL durchgeführt. Dazu wurden Klone auf einer Fläche von ca. 1 x 1 cm auf SPMR-Platten ausgestrichen, nach gestaffelten Wachstumszeiten in die Mitte des Bereiches ein Loch mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in den Agar gestochen und in einer Testreihe 10 µl, 15 µl oder 20 µl einer 10 mg/ml MTL- bzw. einer 10 mg/ml PPL-Lösung in das entstandene Loch pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C solange, bis sich ein dichter Sporenrasen gebildet hatte. Damit wurde daraufhin ein Bioassay mit *M. luteus* durchgeführt (s. 2.7).

In Komplementationsversuchen mit MTL bei submerser Anzucht wurden 4 Tage alte, in 10 ml SPMR-Medium kultivierte Zellen verwendet. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt, 3 mal mit 10 mM K-phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und anschließend in gleichem Volumen 50 mM K-phosphatpuffer, 100 mM Glucose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,0 resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde 0,7 ml MTL (15 mg/ml), 1 mM Methionin und 1 mM Tyrosin gegeben und für 4 bis 16 h bei 28°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch erneutes Kühlen gestoppt und

die Zellen bei 3000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde für HPLC-Analysen verwendet (Hausknecht und Wolf, 1986).

### **2.8.15 Heterologe Genexpression in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS und *E. coli* JM109**

Zu heterologen Proteinproduktion wurde *E. coli* BL21(DE3)/pLysS verwendet. 20 - 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Selektionsmarkern wurden mit 1 ml einer ÜNK oder mit 1 Kolonie einer Platte beimpft und bei RT bis 37°C unter Schütteln bei 200 Upm kultiviert. Bei Erreichen einer  $OD_{560} = 0,5$  wurde die Expression des T7-Polymerase-Gens durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression von Genen unter Kontrolle des Rhamnose-induzierbaren Promotors *rhap* wurde in *E. coli* JM109 durchgeführt und der Promotor bei einer OD von 0,5 mittels 1 mM Rhamnose induziert. Die Produktion der Zielproteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

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

*S. lividans* 66 TK23 oder *S. lividans* 66 1326 wurden mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transformiert und unter entsprechendem Selektionsdruck in TSB-, YEME-, SPMR oder GM-Medium bei 200 Upm und 28°C kultiviert (10 ml-Kultur in 50 ml Inkubationsröhrchen mit Stahlfedern). Die Hauptkultur wurde durch eine 1 : 100 Verdünnung einer 3 Tage alten Vorkultur angeimpft und das Zielgen je nach verwendetem Expressionsvektor konstitutiv oder durch Thiostrepton-Induktion (25 µg/ml) exprimiert.

## **2.9 Biochemische Methoden**

### **2.9.1 Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentration von zellfreiem Extrakt wurde nach der Method von Bradford (1976) mittels des Bio-Rad Protein Assay Kits und BSA als Referenzsubstanz bestimmt.

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

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen zwischen 10 - 12,5% und deren Anfärbung mit Coomassie-Brilliant Blue G250 erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Als Molmassenstandard wurde der "7L-Marker" ( $M_r$ : 14 kDa [ $\alpha$ -Lactalbumin], 20 kDa [Trypsin-Inhibitor], 24 kDa [Trypsinogen, PMSF-behandelt], 29 kDa [Carboanhydrase], 36 kDa [Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase], 45 kDa [Ovalbumin], 66 kDa [Rinderserumalbumin]; Sigma, Deisenhofen) verwendet. Für Immunoblot-Analysen wurden Prestained Marker high range: ( $M_r$ : 14 kDa [Lysozyme], 18 kDa [ $\beta$ -Lactoglobulin], 29 kDa [Carbonic anhydrase], 43 kDa [Ovalbumin], 68 kDa [Bovine serum albumin], 97 kDa [Phosphorylase B], 200 kDa [Myosin]) und Prestained Marker low range: ( $M_r$ : 2 kDa [Insulin], 6 kDa [Bovine Trypsin Inhibitor], 14 kDa [Lysozym], 18 kDa [ $\beta$ -Lactoglobulin], 29 kDa [Carbonic anhydrase], 43 kDa [Ovalbumin]) verwendet.

### 2.9.3 Reinigung von His-tag-LmbR und His-tag-LmbO mittels Ni-NTA-Agarose

His-tag-LmbR und His-tag-LmbO wurden mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) im Batch-Verfahren unter denaturierenden Bedingungen nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Elution der an die Ni-NTA-Agarose-Matrix gebundenen Proteine erfolgte durch Erniedrigung des pH-Wertes des Puffers.

### 2.9.4 Gewinnung von LmbR- und LmbO-Antiserum

Zur Gewinnung der Antiseren LmbR und LmbO wurden im ersten Schritt die LmbR- und LmbO-Proteine als His-tag-Versionen produziert und unter denaturierenden Bedingungen isoliert. Dazu wurden 200 ml Zellkulturen 10 h nach IPTG-Induktion bei RT geerntet, in 8 M Harnstoff (pH 8,0) aufgenommen und bei RT lysiert, was zu einer Denaturierung der hauptsächlich als unlösliche Einschlußkörperchen (»inclusion bodies«) gebildeten Zielproteine führte. Die weitere Vorgehensweise der Aufreinigung entsprach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden). Nach Trennung durch präparative SDS-PAGE wurden die Proteine mittels einer Imidazol-ZnCl<sub>2</sub> bzw. Imidazol-CuSO<sub>4</sub>-Negativfärbung sichtbar gemacht (Fernandez-Patib et al., 1992), entsprechende Proteine ausgeschnitten und 2 x 5 min in 2% Citronensäure



gewaschen. Die Proteine LmbR und LmbO wurden in Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3) bei einer Spannung von 120 V 2 h elektroeluiert. Nach Bestimmung der Proteinmenge wurde die Reinheit des Proteins durch SDS-PAGE und durch Western-Blot Analyse mittels Poly-His-Antikörper (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Die Immunisierung der Kaninchen wurde von der Firma Eurogentec (Seraine, Belgien) nach folgendem Protokoll durchgeführt: 30 µg des Proteins wurden in 0,75 ml H<sub>2</sub>O und 0,75 ml CFA aufgenommen und dem Tier intradermal injiziert. Es folgten 3 weitere Injektionen im Abstand von jeweils 4 Wochen (100 µg des Proteins in 0,4 ml IFA und 0,4 ml H<sub>2</sub>O). Drei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Tiere ausgeblutet und ca. 60 ml Serum gewonnen. Vor der Injektion wurden 3 ml prä-Immuneserum und nach den ersten beiden Injektionen jeweils 3 ml Immuneserum isoliert. Für beide Proteine wurde das Präimmuneserum, das Serum der ersten Blutung und das Serum der zweiten Blutung in Immunoblot-Analysen getestet.

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

Nach analytischer SDS-PAGE wurden Proteine auf PVDF-Membranen mittels einer Semidry-Blotapparatur (Biorad, München) übertragen. Der Transfer erfolgte 12 min bei konstanter Stromstärke von 250 mA in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% Methanol, pH 9,2 [Bjerrum und Schafer-Nielsen, 1986])

### **2.9.6 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine**

Zum Nachweis immobilisierter Proteine wurde die Membran 30 min - 2 h bei RT oder ü.N. bei 4°C mit "Blocking-Reagenz" (TBS + 1% BSA) blockiert und anschließend für 30 min bei RT mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor des Erstantikörpers in TBST inkubiert. Überschüssiger Erstantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären, in TBST 1 : 2500 verdünnten Antikörper (Anti-Rabbit/Mouse-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) erfolgte ebenfalls bei RT für 30 min. Ungebundener sekundärer Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Nach Zugabe von NBT/BCIP (Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim) als Substrat für die alkalische Phosphatase erfolgte der indirekte Nachweis des

### 2.9.7 Bestimmung von Promotoraktivität durch Melaninproduktion

Zur Identifizierung einer Promotoraktivität durch eine Melanin-Produktion wurden plasmidtragende Klone auf AMT-Platten und AM-Platten als Negativkontrolle ausgestrichen. Nach zwei bis vier Tagen konnten braunefärbte Höfe um die ausgestrichenen Kolonien, deren Plasmid ein promotortragendes DNA-Fragment beinhaltet, beobachtet werden.

### 2.9.8 Bestimmung der Catecholdioxygenase-Aktivität (Ingram et al., 1989)

Die Anzucht der entsprechenden Klone in *S. lividans* 66 TK23 erfolgte in 10 ml TSB (25 µg/ml Thiostrepton) bei 28°C. Die nach 36 h geernteten Zellen wurden in Aufschlußpuffer aufgeschlossen und Zellbruchstücke bei 13000 rpm/30 min/4°C abzentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen der Überstände wurden nach Bradford (s. 2.9.1) bestimmt und jeweils gleiche Proteinmengen in den Enzymtests eingesetzt. Zur Messung der Catecholdioxygenaseaktivität wurden 20 µg Zellprotein in 1 ml Reaktionspuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, 20 mM Brenzcatechin) gemischt und der Umsatz von Brenzcatechin zum Muconsäuresemialdehyd photometrisch bei 375 nm verfolgt. Die spezifische Aktivität der Catecholdioxygenase wurde aus der zeitlichen Extinktionsänderung und dem molaren Extinktionskoeffizienten des Musonsäuresemialdehyds nach folgender Formel ermittelt:

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

$\Delta E$  = linearer Bereich der Extinktionsänderung bei 357 nm

$V_1$  = Volumen des Gesamtansatzes [ml]

$V_2$  = Volumen der eingesetzten Probe

$t$  = Zeit [sec]

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

$d$  = Schichtdicke Küvette [cm]

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

### **2.9.9 Bestimmung der MTL-, PPL- und Lincomycin A-Produktion mittels HPLC (Asmus et al., 1983)**

Eine „Reversed Phase Ion-Pairing Liquid Chromatography“ Methode wurde zu Bestimmung von Lincomycin A, MTL und PPL im Kulturüberstand und in den Zellen eingesetzt. Als Ionenpaar-Reagenz wurde anionisches SDS verwendet. Die Trennung fand über zwei zur Verlängerung der Trennstrecke miteinander gekoppelten RP-8 Säulen (Nuclosil, 5  $\mu\text{m}$ ; 120 x 4 mm) bzw. über eine LiChrospher 100 RP-8 (5  $\mu\text{m}$ ) statt. Die Flußrate in diesem isokratisch geführtem Prozeß betrug 1,75 ml/min. Der Probenauftrag fand über eine 100  $\mu\text{l}$  Schleife statt. Für die Bestimmung des Lincomycin A und PPL im Kulturüberstand wurde nach Abzentrifugation der Zellreste (10 min bei 3000 rpm) der Überstand direkt injiziert. Bei der Untersuchung auf eine mögliche, heterologe MTL-Produktion wurden unlösliche Bestandteile nach Zellaufschluß abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4 °C), lösliche Proteine wurden durch 1 min Erhitzen auf 100 °C denaturiert und abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4 °C). Der klare Überstand wurde direkt analysiert. Der Laufpuffer bestand aus 5,8 g SDS, 10 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%), 660 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 330 ml Acetonitril, wurde mit  $\text{NH}_3$  auf pH 6,0 eingestellt und zum Abschluß filtriert.

## **2.10 Chemische Synthesen**

### **2.10.1 Selektive Schützung der $\alpha$ -D-Galactose 1 (Karthä, 1986)**

3 g (12 mmol) Iod wurden in 500 ml Aceton gelöst und mit 10 g (55 mmol) fein pulverisierter  $\alpha$ -D-Galactose versetzt und über Nacht gerührt. Nicht gelöste  $\alpha$ -D-Galactose wurde abfiltriert und das überschüssige Iod mit wäßriger  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung bis zur Entfärbung des Ansatzes entfernt. Der Reaktionsansatz wurde dreimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Einengen am Rotationsverdampfer wurde eine Destillation im Hochvakuum (0,1 mbar) mittels einer

Kurzwegdestillationsapparatur bei einer Ölbadtemperatur von 175°C durchgeführt. Die 1,2:3,4-di-*O*-Isopopyliden- $\alpha$ -D-galacto-pyranose wurde als hochviskoses, hellgelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 7,3 g (33 mmol), farbloses Öl (60%); Lit.: (70%)

NMR-Daten:

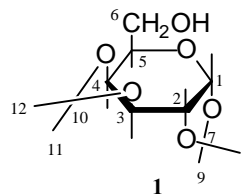
**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta = 5,58$  (d, 1 H,  $^3J_{1,2} = 5$  Hz, C<sub>1</sub>-H); 4,63 (dd, 1 H,  $^3J_{2,1} = 8$  Hz; 1H,  $^3J_{2,3} = 2,4$  Hz; C<sub>2</sub>-H); 4,35 (dd, 1 H,  $^3J_{4,5} = 5,5$  Hz, C<sub>4</sub>-H; 1 H  $^3J_{4,3} = 2,4$  Hz; C<sub>4</sub>-H); 4,29

(dd, 1 H,  $^3J_{3,2} = 7,9$  Hz, H<sub>4</sub>; 1 H,  $^3J_{3,4} = 2,5$  Hz; C<sub>3</sub>-H); 3,89 (m, 2 H, C<sub>6</sub>-H); 3,78 (m, 1 H, C<sub>5</sub>-H); 1,55 (s, 3 H, C<sub>8</sub>-H); 1,47 (s, 3 H, C<sub>9</sub>-H); 1,36 (s, 6 H, C<sub>11,12</sub>-H)

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta = 109,61$  C<sub>7</sub>-H; 108,8 C<sub>10</sub>-H; 96,45 C<sub>1</sub>-H; 71,72 C<sub>5</sub>-H; 70,94 C<sub>4</sub>-H; 70,77 C<sub>7</sub>-H; 68,33 C<sub>3</sub>-H; 62,41 C<sub>6</sub>-H; 26,17 C<sub>8</sub>-H; 26,08 C<sub>9</sub>-H; 25,08 C<sub>12</sub>-H; 24,48 C<sub>11</sub>-H



### 2.10.2 Oxidation der 1,2:3,4-di-*O*-Isopopyliden- $\alpha$ -D-galacto- pyranose 2 (Herscovici und Antonakis, 1980)

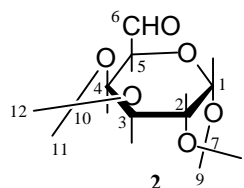
Die besten Ergebnisse lieferte die Oxidation mit Pyridiniumchlorochromat (PCC) unter Molekularsiebkatalyse. Zu 0,25 g (1 mmol) des geschützten Zuckers in 10 ml absolutiertem Dichlormethan wurden unter Luftausschluß 3 mmol (0,75 g) PCC und 3 g pulverisiertes, ausgeheiztes Molsieb (4 Å) als Katalysator gegeben und für 4 h unter Reaktionskontrolle mittels GC bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 25 ml Ether versetzt und solange über Kieselgel abfiltriert, bis kein Chromsalz in der Lösung mehr vorhanden war. Chromatographie an Kieselgel (Säule 1 = 30 cm , d = 1,5 cm) mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 97 : 3 lieferte 0,75 g (56%) eines farblosen Öls.

NMR-Daten:

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta = 9,57$  (s, 1H, C<sub>6</sub>-H); 5,63 (d, 1 H,  $^3J_{1,2} = 4,9$  Hz, C<sub>1</sub>-H); 4,62 (dd, 1H,  $^3J_{2,1} = 2,4$  Hz,  $^3J_{2,3} = 7,8$  Hz, C<sub>2</sub>-H); 4,57 (dd, 1H,  $^3J_{3,4} = 2,1$  Hz,  $^3J_{3,2} = 7,8$  Hz, C<sub>3</sub>-H);

4,35 (dd, 1H,  $^3J_{4,5} = 4,8$  Hz,  $^3J_{4,3} = 2,4$  Hz, C<sub>4</sub>-H); 4,15 (d, 1H,  $^3J_{5,4} = 2,1$  Hz, C<sub>5</sub>-H); 1,47 (s, 3H, C<sub>8</sub>-H); 1,40 (s, 3H, C<sub>9</sub>-H); 1,32 (s, 3H, C<sub>12</sub>-H); 1,29 (s, 3H, C<sub>11</sub>-H);



**$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta = 200,15 \text{ C}_6\text{-H}; 109,41 \text{ C}_7\text{-H}; 108,41 \text{ C}_{10}\text{-H}; 96,45 \text{ C}_1\text{-H}; 73,32 \text{ C}_5\text{-H}; 72,04 \text{ C}_2\text{-H}; 71,83 \text{ C}_4\text{-H}; 71,68 \text{ C}_3\text{-H}; 26,75 \text{ C}_8\text{-H}; 26,57 \text{ C}_9\text{-H}; 25,68 \text{ C}_{12}\text{-H}; 25,18 \text{ C}_{11}\text{-H}$

### 2.10.3 Darstellung des Wittig-Reagenzes Methoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran (Isler et al., 1957)

48 mmol (20,0 g) Methoxycarbonylmethyltriphenylphosphoniumbromid wurden in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und mit verdünnter NaOH-Lösung auf pH 9,0 eingestellt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und aus heißem Essigester/Cyclohexan umkristallisiert.

Ausbeute: 14 g (41 mmol) farblose Kristalle (85%) Smp.:  $115^\circ\text{C}$  (Lit.:  $116 - 117^\circ\text{C}$ )

### 2.10.4 Kettenverlängerung: Wittig-Reaktion 3 (Brimacombe et al., 1986)

1,25 mmol (0,3 g) des Aldehyds und 1,25 mmol (0,45 g) Methoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran wurden unter Argon zu 9 ml absolutem MeOH gegeben und für 20 h bei  $4^\circ\text{C}$  gerührt. Nach Einengen des Lösungsmittels erfolgte die Aufreinigung des Wittig-Produkts mittels einer Kieselgelsäule. Das Laufmittel bestand zu 95% aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und zu 5% aus Aceton. Die Ausbeute betrug 80% 1,0 mmol (0,27 g) eines dunkelgelben Öls. Lit.: 92%

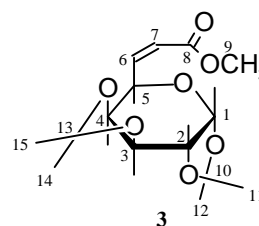
NMR-Daten:

 **$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta = 6,3$  (dd, 1H,  $^3J_{6,5} = 7,4 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{6,7} = 11,7 \text{ Hz}$  (cis),  $\text{C}_6\text{-H}$ );  $5,93$  (dd, 1H,  $^3J_{7,6} = 11,7 \text{ Hz}$  (cis),  $^4J_{7,5} = 1,3 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_7\text{-H}$ );  $5,57$  (d, 1H,  $^3J_{1,2} = 5,0 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_1\text{-H}$ );  $5,52$  (d, 1H,  $^3J_{5,4} = 7,4 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_5\text{-H}$ );  $4,66$  (dd, 1H,  $^3J_{2,3} = 7,8 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{2,1} = 2,4 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_2\text{-H}$ );  $4,48$  (dd, 1H,  $^3J_{3,4} = 2,0 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{3,2} = 7,7 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_3\text{-H}$ );  $4,36$  (dd, 1H,  $^3J_{4,3} = 2,4 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{4,5} = 5,1 \text{ Hz}$ ,  $\text{C}_4\text{-H}$ );  $3,73$  (s, 3H,  $\text{C}_9\text{-H}$ );  $1,60$  (s, 3H,  $\text{C}_{11}\text{-H}$ );  $1,49$  (s, 3H,  $\text{C}_{12}\text{-H}$ );  $1,36$  (s, 3H,  $\text{C}_{15}\text{-H}$ );  $1,33$  (s, 3H,  $\text{C}_{14}\text{-H}$ );

 **$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta = 166,15 \text{ C}_{18}\text{-H}; 14,6 \text{ C}_6\text{-H}; 119,9 \text{ C}_7\text{-H}; 109,4 \text{ C}_{10}\text{-H}; 96,5 \text{ C}_1\text{-H}; 73,3 \text{ C}_5\text{-H}; 71,2 \text{ C}_2\text{-H}; 70,4 \text{ C}_4\text{-H}; 65,6 \text{ C}_3\text{-H}; 51,5 \text{ C}_9\text{-H}; 26,1 \text{ C}_{12}\text{-H}; 25,2 \text{ C}_{13}\text{-H}; 24,9 \text{ C}_{15}\text{-H}; 24,5 \text{ C}_{14}\text{-H};$



### 2.10.5 Reduktion mit LiAlH<sub>4</sub> **4** (Valverde et al., 1986)

0,7 mmol (0,2 g) von **3** wurden in 12 ml THF gelöst und auf -20°C gekühlt. Zu dieser Mischung wurde 0,7 mmol (30 mg LiAlH<sub>4</sub>) in 2 ml THF unter Argon zugetropft. Danach wurde auf RT erwärmt und weitere 10 min gerührt. Erneut wurde der Ansatz auf -20°C abgekühlt und mit wäßriger, gesättigter Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung versetzt, um einen Überschuß von LiAlH<sub>4</sub> zu entfernen. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Essigester gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrates einrotiert. Eine Säulenchromatographie des Filtrates erfolgte mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Aceton = 5 : 1. Ausbeute: 60% 0,42 mmol (0,10 g) *Z*-Octenopyranose . Lit.: 87%

NMR-Daten:

#### <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 5,92 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6,7</sub> = 11,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub> = 5,8 Hz, C<sub>6</sub>-H);

5,78 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 11,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7,8</sub> = 7,1 Hz, C<sub>7</sub>-H); 5,6

(d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 5,0 Hz, C<sub>1</sub>-H); 4,6 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 7,8

Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,1</sub> = 2,2 Hz, C<sub>2</sub>-H); 4,36 (dd, 1H,

<sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 2,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 7,1 Hz, C<sub>3</sub>-H); 4,34 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>4,3</sub> = 2,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 6,2 Hz, C<sub>4</sub>-H); 4,25

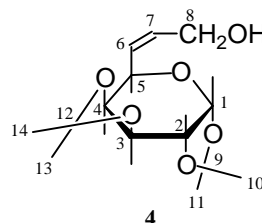
(m, 3H, C<sub>5</sub>-H, C<sub>8</sub>-H, C<sub>8</sub>-H); 1,60 (s, 3H, C<sub>10</sub>-H); 1,38 (s, 3H, C<sub>11</sub>-H); 1,37 (s, 3H, C<sub>14</sub>-H);

1,23 (s, 3H, C<sub>13</sub>-H);

#### <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 133,4 C<sub>6</sub>-H; 127,6 C<sub>7</sub>-H; 109,5 C<sub>9</sub>-H; 108,8 C<sub>12</sub>-H; 96,7 C<sub>1</sub>-H; 73,3 C<sub>5</sub>-H; 70,9 C<sub>2</sub>-H;

70,7 C<sub>4</sub>-H; 70,4 C<sub>3</sub>-H; 59,3 C<sub>1</sub>-H; 26,1 C<sub>11</sub>-H; 26,0 C<sub>12</sub>-H; 25,0 C<sub>15</sub>-H; 24,4 C<sub>14</sub>-H;



### 2.10.6 Oxidation der Doppelbindung von *Z*-Octenopyranose mit OsO<sub>4</sub> **5** (Brimacombe et al., 1986)

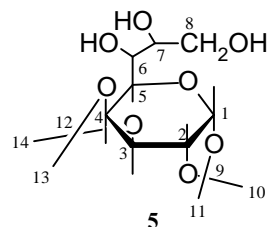
0,5 mmol (0,12 g) des ungesättigten Zuckers **4** wurde mit 1 mmol *N*-Methylmorpholine-*N*-oxid-monohydrat und 0,025 mmol OsO<sub>4</sub> in einem Aceton-H<sub>2</sub>O-Gemisch (8 : 1,5) bei RT 3 h gerührt, bis die Reaktion vollständig abgelaufen war. Das Reaktionsgemisch wurde mit 25 ml CHCl<sub>3</sub> verdünnt, die Lösung mit 5 M HCl (1 ml) gewaschen und danach kräftig mit 45%iger wäßriger Natriumbisulfid-Lösung geschüttelt. Nach Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wurde die Chloroform-Fraktion am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der ölige Rückstand wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und über Kieselgel abfiltriert. Die katalytische Osmylierung der *Z*-Octenopyranose ergab 65% einer Mischung von α-Octanopyranose und β-Octanopyranose im

Verhältnis 7 : 1. Die Umkristallisierung aus Essigester/Hexan ergaben 0,19 mmol (0,053 g) 38% der  $\alpha$ -Octanopyranose. Der Schmelzpunkt wurde mit 116 - 117°C bestimmt. Lit.: 117 -

NMR-Daten:

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta = 5,54$  (d, 1H,  $^3J_{1,2} = 5,0$  Hz, C<sub>1</sub>-H); 4,66 (dd, 1H,  $^3J_{2,1} = 2,3$  Hz,  $^3J_{2,3} = 8,0$  Hz, C<sub>2</sub>-H); 4,45 (dd, 1H,  $^3J_{3,2} = 8,0$  Hz,  $^3J_{3,4} = 1,8$  Hz, C<sub>3</sub>-H); 4,37 (dd, 1H,  $^3J_{4,5} = 5,1$  Hz,  $^3J_{4,3} = 2,2$  Hz, C<sub>4</sub>-H); 3,88 (m, 5H, C<sub>5</sub>-H, C<sub>6</sub>-H, C<sub>7</sub>-H, C<sub>8</sub>-H, C<sub>8</sub>-H); 1,57 (s, 3H, C<sub>10</sub>-H); 1,52 (s, 3H, C<sub>11</sub>-H); 1,38 (s, 3H, C<sub>14</sub>-H); 1,36 (s, 3H, C<sub>13</sub>-H);



**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta = 109,9$  C<sub>9</sub>-H; 109,1 C<sub>12</sub>-H; 96,8 C<sub>1</sub>-H; 74,3 C<sub>3</sub>-H; 73,2 C<sub>4</sub>-H; 71,3 C<sub>6</sub>-H; 71,1 C<sub>2</sub>-H; 70,7 C<sub>7</sub>-H; 65,1 C<sub>5</sub>-H; 64,2 C<sub>8</sub>-H; 26,0 C<sub>10</sub>-H; 25,9 C<sub>11</sub>-H; 25,1 C<sub>14</sub>-H; 24,6 C<sub>13</sub>-H;

### 2.10.7 Darstellung von *D-erythro-D-galacto-Octose 6* (Brimacombe et al., 1986)

Eine Lösung von 1,0 mmol (0,32 g) Triol **5** wurde in 12 ml schwefeliger Säure für 5 h auf 100°C erhitzt, abgekühlt und mit 15 g Amberlite IR 45 (OH-)-Harz neutralisiert. Das Harz wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Die Umkristallisation erfolgte aus wässrigem Ethanol (55%) und ergaben 0,55 mmol (0,132 g) farbloser Kristalle.

Smp.: 180°C (Lit.: 180 - 181,5°C)

$[\alpha]_{\text{D}} 45^\circ \rightarrow 62^\circ$  (5 min, in  $\text{H}_2\text{O}$ ); Lit.:  $[\alpha]_{\text{D}} 45^\circ \rightarrow 64^\circ$  (5 min, in  $\text{H}_2\text{O}$ )

## 2.11 Versuche zur enzymologischen Charakterisierung von LmbR und LmbP

### 2.11.1 LmbR: Enzymtest auf Transaldolase-Aktivität

Dazu wurden zwei gekoppelte, kontinuierliche Testsysteme A und B und ein diskontinuierlicher Test C entwickelt:

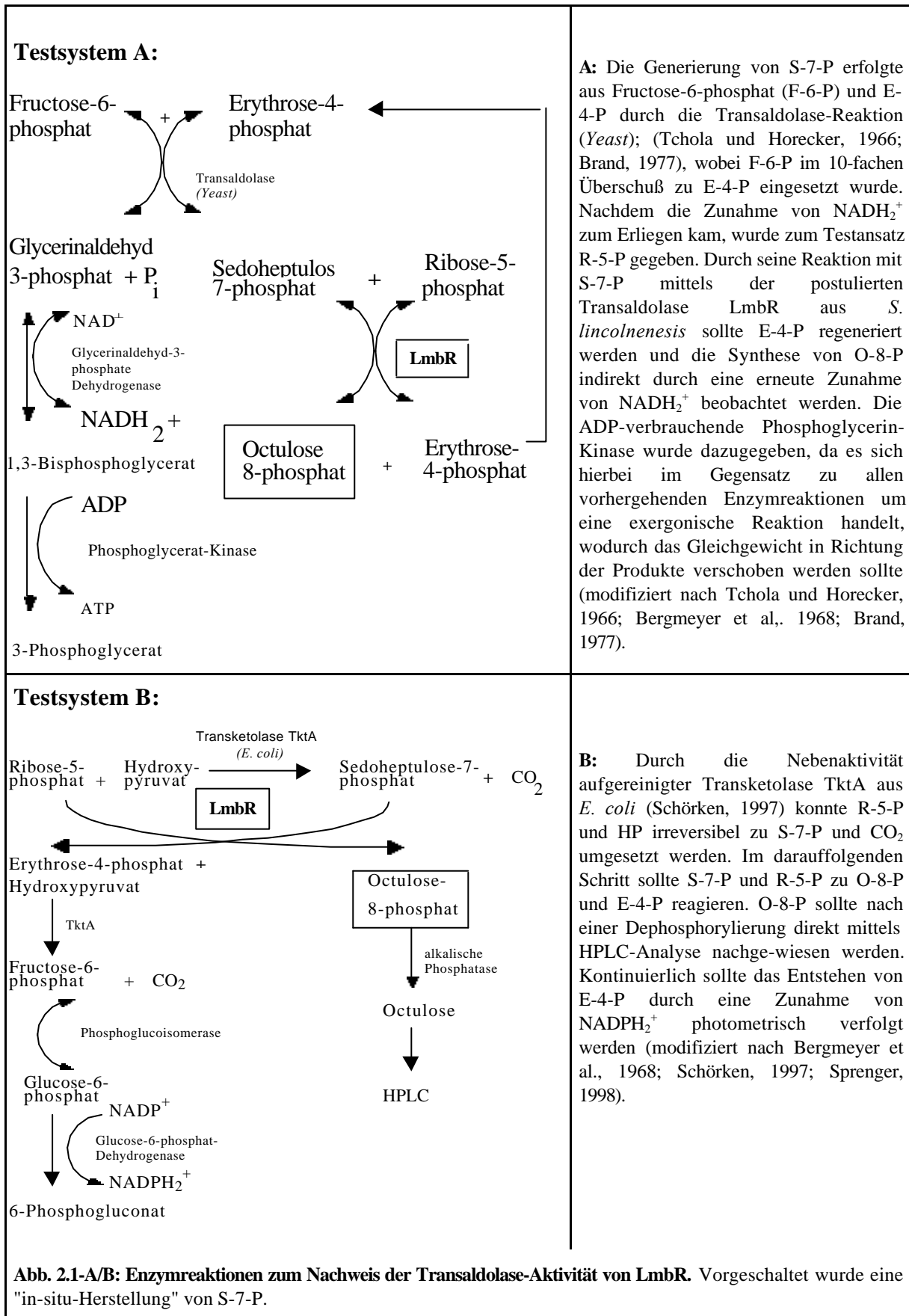
Für die Transaldolasetests A und B wurden folgende Substratkonzentrationen eingesetzt:

<u>Test A</u>		<u>Test B</u>	
F-6-P	10 mM	R-5-P	10 mM
E-4-P	1 mM	Hydroxypyruvat (HP)	10 mM
R-5-P	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NAD <sup>+</sup>	2 mM	TPP	0,5 mM
ADP	10 mM	NADP <sup>+</sup>	2 mM
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM		
Proteinextrakt	variabel	Proteinextrakt	variabel
Endvolumen	1 ml	Endvolumen	1 ml

Die zusätzlich für den Test A notwendigen Enzyme Transaldolase (*Yeast*), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Kaninchenmuskel) und Phosphoglycerat-Kinase (Kaninchenmuskel) wurden zu je ca. 5 U eingesetzt. Als Puffersystem wurde 100 mM Triethanolamin-HCl und 10 mM EDTA, pH 7.5 verwendet (Tchola und Horecker, 1966; Brand, 1968). Es wurden Versuchsreihen sowohl mit 1 mM NaF als auch ohne NaF als Phosphatase-Inhibitor durchgeführt. Gegebenenfalls wurden die Rohextrakte für 4 h bei 10°C gegen 2 l Puffer (20 mM Triethanolamin-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM DTT) dialysiert.

Für den Test B stand zur irreversiblen S-7-P-Synthese aufgereinigte Transketolase TktA aus der Arbeitsgruppe G. Sprenger (Jülich) zur Verfügung. Die Pufferzusammensetzung (50 mM Glycylglycin/KOH, pH 8.2) erfolgte entsprechend dem Puffer für die Transaldolase-reaktion aus *E. coli* (Schörken, 1997). Die für die gekoppelte Reaktion notwendige Phosphoglucoisomerase (*Yeast*) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (*Leuconostic mesteriodes*) wurden zu je 5 U verwendet.





Es wurde sowohl Rohextrakt als auch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gefälltes Protein des LmbR-Überexpressionsstammes als auch des Kontrollstammes benutzt. Zur Anreicherung wurden je ca. 5 g Zellen *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pAAW5.2 und *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pET11a im Testpuffer B aufgeschlossen und die Zelltrümmer bei 12000 U/4°C/15 min im SS 34 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde sukzessive in 10er Schritten mit 10% - 90% einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt (Englard und Leifter, 1990). Das jeweils gefällte Material wurde wiederum für 15 min bei 12000 U abzentrifugiert und in 1 ml Puffer (Test B) aufgenommen. Zur Entsalzung wurden PD10-Säulen verwendet, die im ersten Schritt mit 3 ml Puffer B äquilibriert wurden. Der Proteinextrakt wurde auf die Säule gegeben und die Elution der an dem Säulenmaterial haftenden Proteine erfolgte mit je 2 ml Puffer B. Beim ersten Versuch wurde durch ein analytische PAA-Gel die LmbR-enthaltende Fraktion bestimmt, bei weiteren Aufreinigungen wurde direkt die entsprechende, entsalzte Fraktion für enzymologische Untersuchungen im Testsystem B eingesetzt.

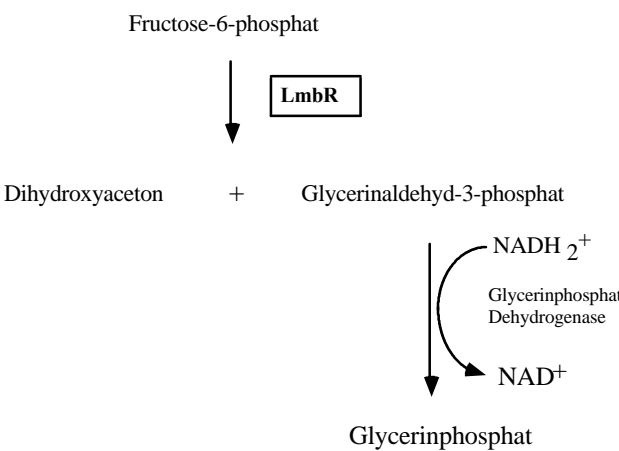
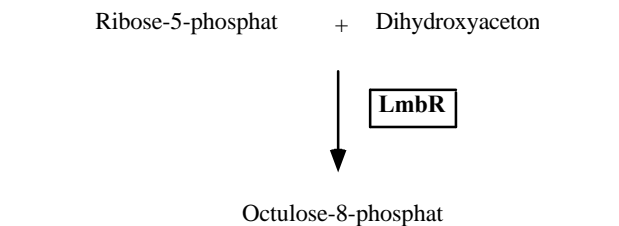
Diskontinuierlicher Enzymtest C für die postulierte Transaldolaseaktivität von LmbR:

Das Testprinzip entspricht dem rechten Teil des Testsystems A ( $\text{S-7-P} + \text{R-5-P} \rightarrow \text{O-8-P} + \text{E-4-P}$ ). Hierbei wurde S-7-P und R-5-P zu je 5 mM in beiden Puffersystemen aus den kontinuierlichen Tests A und B eingesetzt. Das Testgesamtvolumen betrug 200  $\mu\text{l}$  unter Verwendung von 10  $\mu\text{l}$  - 20  $\mu\text{l}$  Zellrohextrakt oder dialysiertem Zellrohextrakt. Die Enzymreaktion wurde mit Zugabe der Substrate gestartet und bei 30°C inkubiert. Die Probennahme erfolgte nach 30 min, 60 min und nach 4 h. Die Reaktion wurde durch Kochen von 1 min gestoppt und unlösliche Partikel durch Zentrifugation abgetrennt. Die Analyse der Enzymtests fand mittels DC statt. Als stationäre Phase diente DC-Alufolie Kieselgel 60 F<sub>254</sub>. Die Trennung der Substanzen auf der stationären Phase erfolgte nach Testen verschiedener Laufmittelgemische mittels Isopropanol :  $\text{NH}_3$  :  $\text{H}_2\text{O}$  :  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  = 5 : 3 : 1 : 1. Nachdem die DC-Platten mit einer Cer/Molybdatlösung besprüht wurden (s. 2.2.2), erfolgte die Sichtbarmachung der Spots durch eine Inkubation bei 100°C für 10 min.

### **2.11.2 LmbR: Versuche zum Nachweis einer möglichen Aldolase-Aktivität**

Eine mögliche Aldolase-Aktivität von LmbR wurde durch 2 Testsysteme, die unterschiedliche Edukte bereitstellten und die zu jeweils unterschiedlichen Produkten führen sollten, untersucht.

Es wurde ein gekoppelter, kontinuierlicher Test D nach Sprenger (unveröffentlicht, 1999) und ein diskontinuierlicher Test E durchgeführt.

<p><b>Testsystem D:</b></p>  <p>Fructose-6-phosphat</p> <p>↓ <b>LmbR</b></p> <p>Dihydroxyaceton + Glycerinaldehyd-3-phosphat</p> <p>↓ <b>Glycerinphosphat-Dehydrogenase</b></p> <p>NADH<sub>2</sub><sup>+</sup> → NAD<sup>+</sup></p> <p>Glycerinphosphat</p>	<p><b>D:</b> Eine Aldolase-Reaktion als mögliche Nebenreaktion von LmbR mit F-6-P als Substrat sollte zu Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G-3-P) führen. Der indirekte Nachweis dieser Reaktion sollte in einem gekoppelten, kontinuierlichen Test mittels einer Abnahme der NADH<sub>2</sub><sup>+</sup>-Konzentration durch die Glycerinphosphat-Dehydrogenase photometrisch erfolgen.</p>
<p><b>Testsystem E:</b></p>  <p>Ribose-5-phosphat + Dihydroxyaceton</p> <p>↓ <b>LmbR</b></p> <p>Octulose-8-phosphat</p>	<p><b>E:</b> Diskontinuierlicher Enzymtest zur Umsetzungskontrolle von R-5-P mit Dihydroxyaceton zu O-8-P</p>

**Abb. 2.2-D/E: Enzymreaktionen zum Nachweis einer putativen Aldolase-Aktivität von LmbR.**

Folgende Konzentrationen wurden bei den jeweiligen Enzymreaktionen eingesetzt:

<u>Test D</u>		<u>Test E</u>	
F-6-P	10 mM	R-5-P	10 mM
NADH	2 mM	Dihydroxyaceton	10 mM
Extrakt	variabel	Extrakt	variabel
Endvolumen	1 ml	Endvolumen	0,2 ml

Drei verschiedene Puffersysteme wurden bei beiden Enzymtests eingesetzt:

<u>Puffer 1</u> (Chin und Feingold, 1969) pH 7.9	<u>Puffer 2</u> (nach Michal und Beutler, 1968) pH 7.6	<u>Puffer 3</u> (Groth, 1966) pH 7.3
Tris-HCL 50 mM	Triethanolamin- 400 mM HCl	Tris-HCl 50 mM
KCl 50 mM		Na-Citrat 100 mM

In Testsystem D wurde als Hilfsenzym Glycerinphosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel verwendet.

Für den diskontinuierlichen Test E wurden zum Nachweis möglicher Produkte ein DC-System entwickelt. DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> dienten als stationäre Phase. Die besten Ergebnisse bei der Trennung von R-5-P, Ribose und Dihydroxyaceton erbrachte das Laufmittelgemisch CH<sub>3</sub>CN : NaOH (0,1 M) = 7 : 3. Die Detektion der Spots erfolgte ebenfalls durch Besprühen mit Cer-Reagenz bzw. Anisaldehyd-Reagenz (s. 2.2.2) und anschließender 15 min Inkubation bei 100°C.

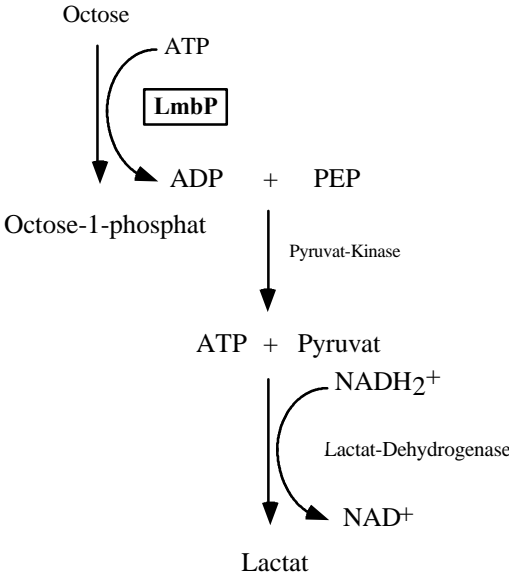
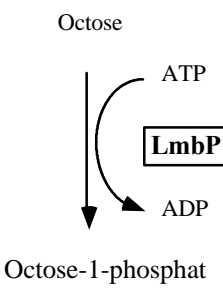
### 2.11.3 LmbP: Enzymtest auf Kinase-Aktivität

Es wurden jeweils ein gekoppeltes, kontinuierliches Testsystem F und ein diskontinuierliches Testsystem G verwendet.

Folgende Konzentrationen wurden in den jeweiligen Testsystemen eingesetzt:

<u>Test F</u>		<u>Test G</u>	
Octose	2,5-5 mM	Octose	5 mM
ATP	1,1 mM	ATP	1 mM
PEP	1,6 mM	$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP	1 $\mu$ Ci
MgCl <sub>2</sub>	3,3 mM	MgCl <sub>2</sub>	3,3 mM
NADH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	1 mM	NaF	1 mM
Proteinextrakt	variabel	Proteinextrakt	variabel
Endvolumen	1 ml	Endvolumen	100 $\mu$ l

Als Puffersystem wurde im Test F 65,8 mM Tris-HCl, pH 7,7 verwendet. Die für das gekoppelte System zusätzlich notwendigen Enzyme Pyruvat-Kinase (Kaninchenmuskel) und Lactat-Dehydrogenase (Kaninchenmuskel) wurden ca. zu je 5 U eingesetzt. Sowohl dialysierte als auch nicht dialysierte Proteinrohextrakte wurden photometrisch untersucht.

<p><b>Test F:</b></p>  <p>Octose</p> <p>ATP</p> <p><b>LmbP</b></p> <p>ADP + PEP</p> <p>Octose-1-phosphat</p> <p>Pyruvat-Kinase</p> <p>ATP + Pyruvat</p> <p>NADH<sub>2</sub><sup>+</sup></p> <p>Lactat-Dehydrogenase</p> <p>NAD<sup>+</sup></p> <p>Lactat</p>	<p><b>F:</b> Die Phosphorylierung von Octose sollte kontinuierlich durch eine ADP-Entwicklung, nach Zugabe von Phosphoenolpyruvat (PEP) detektiert werden können. Durch die Pyruvat-Kinase entstandenes Pyruvat sollte durch die Lactat-Dehydrogenase unter photometrisch zu verfolgendem NADH<sub>2</sub><sup>+</sup>-Verbrauch zu Lactat umgewandelt werden (Drepper, 1993).</p>
<p><b>Test G:</b></p>  <p>Octose</p> <p>ATP</p> <p><b>LmbP</b></p> <p>ADP</p> <p>Octose-1-phosphat</p>	<p><b>G:</b> Dieses diskontinuierliche Testsystem wurde verwendet, um eine Phosphorylierung von Octose direkt nachweisen zu können. Um die Detektierbarkeit zu erleichtern wurde <math>\gamma</math>-[<sup>32</sup>P]-ATP eingesetzt.</p>

**Abb. 2.3-G/F:** Verschiedene Testsysteme zum Nachweis einer möglichen Kinaseaktivität von LmbP.

Im diskontinuierlichen Test G waren keine zusätzlichen Hilfsenzyme notwendig. Die ATP-Konzentration wurde mit 1  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP supplementiert. Um entstandenes phosphoryliertes Produkt zu schützen wurde NaF als Phosphataseinhibitor eingesetzt. Der Testpuffer bestand aus 100 mM Triethanolamin-HCl, pH 8,0 bzw. 50 mM Tris-HCl, pH 7,8. Im Gegensatz zum gekoppelten Enzymtest F wurden hier nur dialysierte Gesamtzellextrakte verwendet. Die Enzymreaktion wurde mit Zugabe des Substrates gestartet und bei 30°C inkubiert. Um den zeitlichen Verlauf der Enzymreaktion zu beobachten, erfolgten Probennahmen nach 30 min, 45 min und nach 10 h. Die Reaktion wurde durch 1 min Kochen gestoppt und unlösliche Niederschläge durch Zentrifugation abgetrennt. Die Enzymtests wurden mittels DC analysiert. Als stationäre Phase dienten hier wiederum DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>. Das Laufmittel

besaß die Zusammensetzung  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{NaOH} (0.1 \text{ M}) = 7 : 3$ . Zur Detektion wurden die DC-Platten bei RT auf Röntgenfilmen inkubiert nach ca. 4 h entwickelt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Heterologe Expression von MTL-Genen

Für eine eingehendere Charakterisierung diverser putativer MTL-Proteine (LmbR, LmbP, LmbN, LmbO, LmbK) erwies sich deren heterologe, lösliche Produktion in *E. coli* und/bzw. in *S. lividans* als notwendig. Dazu wurden die jeweiligen Gene von Interesse mittels PCR unter Verwendung von chromosomaler DNA aus *S. lincolnensis* 2936 als »template« amplifiziert. Auf Grund ihrer korrekturlesenden Eigenschaft wurde bei allen PCR-Ansätzen Vent-Polymerase verwendet. Als universell einzusetzende Restriktionsschnittstellen für eine Klonierung in unterschiedlichste Expressionsvektoren wurde durch PCR-Mutation am Translationsstartpunkt der Gene eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NdeI* und stromabwärts der jeweiligen Gene eine für *BamHI* eingeführt. Verwendete Primerpaare wurden nach dem jeweiligen Gen benannt (s. 2.8.11). Der am translationalen Startpunkt des Gens lokalisierte Primer wurde mit 1 und der Primer für den stromabwärts liegenden Bereich mit 2 gekennzeichnet.

Die Expressionsstrategien werden in folgenden Kapiteln näher erläutert.

#### 3.1.1 Expression in *E. coli*

Eine Überproduktion von Streptomyces-Genen in *E. coli* unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7 $\Phi$ 10-Promotors führt in vielen Fällen zu einer Ausbildung des Proteins in Form unlöslicher Einschlußkörper (»inclusion bodies«). Um diese Aggregationen nicht korrekter Faltungszwischenprodukte der Proteine zu vermindern, wurden verschiedene Expressionsstämme [*E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS, *E. coli* JM109 (DE3)], verschiedene Medienzusammensetzungen (Minimalmedium MM9, LB-Medium mit Betain und Sorbitol) und Temperaturen zwischen 20°C und 37°C getestet (Schein und Noteborn, 1988; Bowden und Georgiou, 1988). Eine weitere Möglichkeit, eine Fehlfaltung der überproduzierten Proteine zu unterbinden, stellte die Verwendung schwächer induzierbarer Promotorsysteme wie des Rhamnose-induzierbaren Promotors *rhap* aus dem L-Rhamnose Gencluster von *E. coli* dar. Dieser Promotor ist auf dem Vektor pJOE2702 enthalten, dessen RBS der des pET11a Expressionsvektors entspricht (Volf et al., 1996). Mittels dieses Systems konnten eine Reihe von Proteinen beispielweise aus *S. coelicolor*, die vorher durch das T7 $\Phi$ 10-Expressionssystem

in unlöslicher Form gebildet wurden, problemlos im Überstand der Zellaufschlüsse nachgewiesen werden (A. Engels, pers. Mitteilung).

### LmbR

Das Gen *lmbR* besitzt eine Länge von 663 bp und kodiert rechnerisch für ein Protein von 23,5 kDa. Von besonderem Interesse war eine Produktion löslichen Proteins der putativen Transaldolase LmbR, da LmbR aller Wahrscheinlichkeit nach für den Initiationsschritt der Biosynthese von MTL verantwortlich ist (s. 1.2.2) und mögliche Substrate für die Enzymreaktion zugänglich waren bzw. *in situ* hergestellt werden konnten.

Die Sequenzierung zweier klonierter PCR-Produkte (pAAW5.1) erbrachte in der kodierenden Region von bp 510 bis 519 eine von der *lmb*-Datenbank (acc. S44966) abweichende Sequenz, die zum Austausch dreier Aminosäuren führte (s. Tab. 3.1). Jedoch zeigten die aus dem Wildstamm erhaltenen Amplifikate auf Proteinebene durch ihre etwas neutraleren Ladungen eine bessere Übereinstimmung zu anderen Transaldolasen wie beispielsweise zu TalB aus *E. coli* als die Sequenzierdaten aus dem Überproduktionsstamm *S. lincolnensis* 78-11 (Peschke et al., 1995).

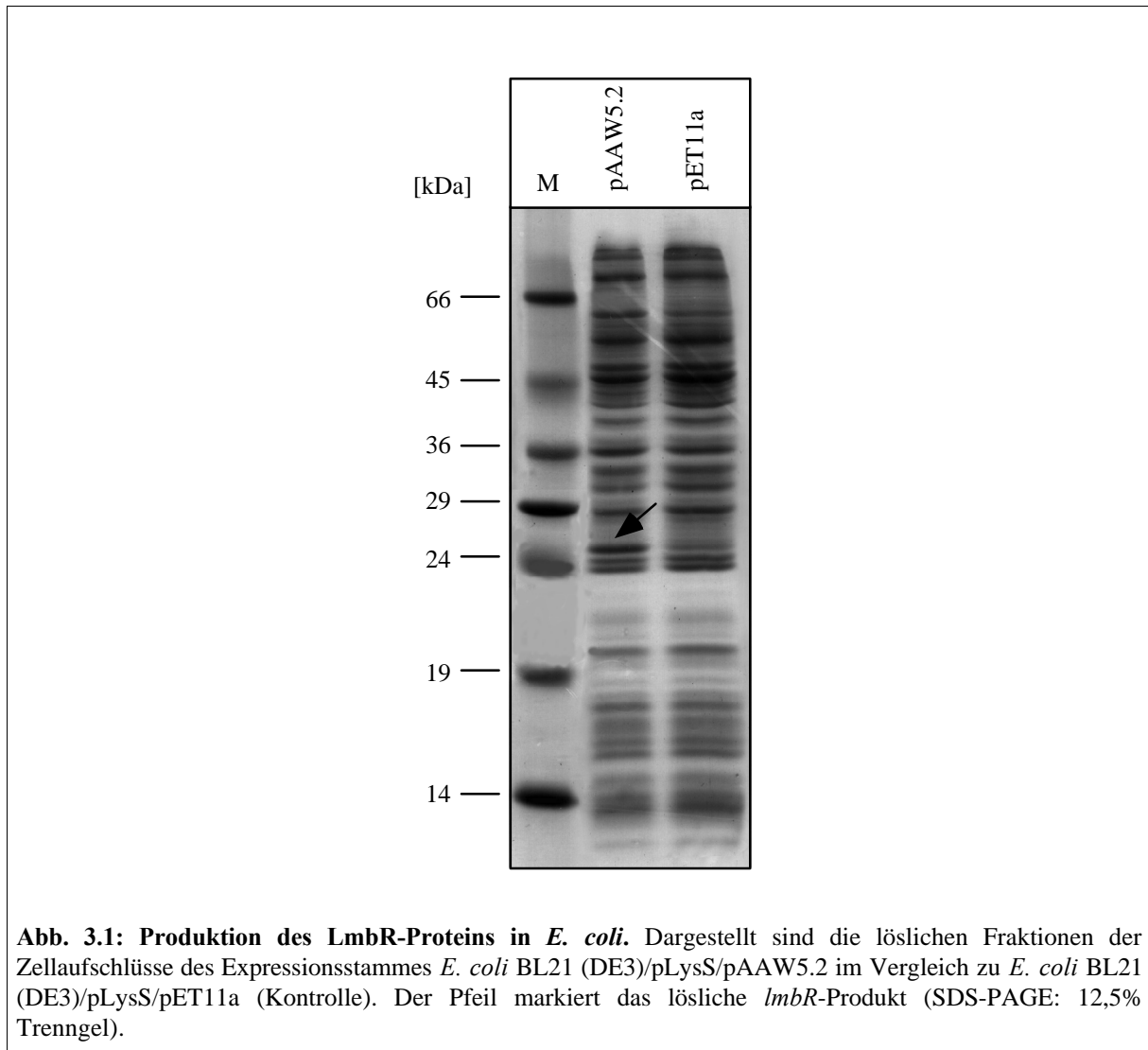
**Tabelle 3.1: Vergleich der Sequenzierungsergebnisse und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz für *lmbR* (bp 510 - 519) aus *S. lincolnensis* 78-11 und für das PCR-Produkt aus *S. lincolnensis* 2936.**

[bp]	510	519
	C	M Y
Sequenzierdaten pTU979-1 ( <i>S. lincolnensis</i> 78-11); (acc. S44966)	TGT	ATG TAC
Sequenzierdaten PCR-Produkt pAAW5.1 ( <i>S. lincolnensis</i> 2936); (diese Arbeit)	GTG	CGC GCG
	V	R A

Das 700 bp große *NdeI/BamHI*-Fragment aus pAAW5.1 wurde jeweils in die Expressionsvektoren pET11a und pET16b (pAAW5.2/5.3) kloniert. Eine Zunahme der Proteinproduktion in *E. coli* BL21 (DE3) wurde zeitabhängig nach IPTG-Induktion verfolgt. Durch SDS-PAGE konnte sowohl natives Protein (23,5 kDa) als auch das His-tag-Fusionsprotein (26 kDa) nachgewiesen werden. In beiden Fällen führte die Überproduktion zur Bildung von Einschlusskörperchen. Durch Verwendung des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3)/pLysS/pAAW5.2, der nach Einfrieren der Zellen einen Zellaufschluß mittels Ultraschall weitgehend überflüssig macht, wurde natives LmbR zu ca. 30% löslich produziert (s. Abb.



3.1). Bei einer Verringerung der Expressionstemperatur von 37°C auf 20°C konnte eine verstärkte Löslichkeit bis zu 50% erreicht werden. Ebenfalls erfolgte eine Produktion löslichen Proteins zu ungefähr gleichem Anteil in pJOE2702 (pAAW5.2) bei einer Anzuchtstemperatur von 37°C (ohne Abbildung).



**Abb. 3.1: Produktion des LmbR-Proteins in *E. coli*.** Dargestellt sind die löslichen Fraktionen der Zellaufschlüsse des Expressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pAAW5.2 im Vergleich zu *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pET11a (Kontrolle). Der Pfeil markiert das lösliche *lmbR*-Produkt (SDS-PAGE: 12,5% Trenngel).

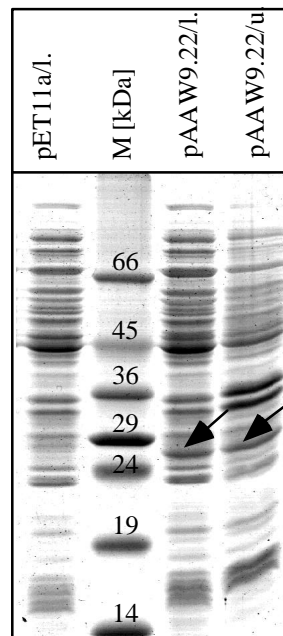
### LmbP

Das 981 bp große *lmbP* Gen, das möglicherweise für eine Octose-1-Kinase kodiert, konnte sowohl in nativer Form als 32 kDa-Protein (pAAW8.2) als auch als 35 kDa-His-tag-Fusionsprotein (pAAW8.3) in *E. coli* BL21 (DE3) überproduziert werden (ohne Abbildung). Geänderte Anzuchtbedingungen erbrachten keine nachweisbare Zunahme der Löslichkeit der Proteine mittels SDS-PAGE. Ebenfalls konnte der Anteil an Einschlusskörpern nicht reduziert werden, indem *lmbP* unter Kontrolle des Promotors *rhap* (pAAW8.22) in *E. coli* JM109 exprimiert wurde. Somit erschien zum Erhalt löslichen Proteins eine Expression in

Streptomyceten notwendig, zumal ein mögliches Substrat für diese Enzymreaktion chemisch synthetisiert wurde.

### LmbN

Die ursprüngliche Größe des *lmbN<sub>1</sub>*-Gens wurde mit 828 bp angegeben und entspricht einem 28,5 kDa großen Protein. Wie bereits erwähnt, wird LmbN die Isomerasefunktion für den zweiten Schritt der MTL-Biosynthese zugeschrieben (s. 1.2.2). O-8-P wird aller Wahrscheinlichkeit nach hierbei in Octose-8-phosphat umgewandelt. Die Überproduktion des Gens *lmbN<sub>1</sub>* erfolgte in beiden pET-Vektoren (s. Tab. 3.4). Die SDS-PAGE lieferte für pAAW9.2 bzw. 9.3 überproduzierte Proteine der erwarteten Molekularen Masse von 28,5 kDa für die native- bzw. 31 kDa für die His-tag-Version. In beiden Fällen kam es zur Ausbildung unlöslichen Proteins, welches durch Veränderungen der Anzuchtbedingungen nicht unterbunden werden konnte (ohne Abbildung).



**Abb. 3.2: Produktion des LmbN<sub>1</sub>-Proteins in *E. coli*.** Dargestellt sind die löslichen und unlöslichen Fraktionen der Zellaufschlüsse des Expressionsstammes *E. coli* JM109 (DE3)/pAAW9.22 im Vergleich zu *E. coli* JM109 (DE3)/pJOE2702 (Kontrolle). Die Pfeile markieren das *lmbN<sub>1</sub>*-Produkt (SDS-PAGE: 12,5% Trenngel). Abk. l.: lösliche Fraktion; u.: unlösliche Fraktion (Präzipitat der 13000 g-Zentrifugation)

Der Einsatz des Expressionsvektors pJOE2702 (pAAW9.22) bei 37°C führte, wie Abbildung 3.2 zu entnehmen ist, zu ca. 60% löslichem Protein; bei einer Anzuchttemperatur von 30°C

konnte keine detektierbare LmbN<sub>1</sub>-Produktion mehr festgestellt werden.

### LmbO

Das *lmbO*-Gen besitzt eine Länge von 826 bp und kodiert rechnerisch für ein Protein von 23,6 kDa.

Frühere Arbeiten zur Expression von *lmbO* mittels pMHW5 bzw. pMHW8 (pTU979-1-Amplifikate) führten nicht zu detektierbaren LmbO-Proteinen. Die Sequenzierung (pMHW2, pMHW2-1) zeigte, daß es höchstwahrscheinlich durch eine Leserasterverschiebung nur zur Produktion eines verkürzten, 6,5 kDa-großen Proteins kam (Haase, 1996). Aus diesem Grund wurde besonders hier eine Amplifikation von chromosomaler DNA aus *S. lincolnensis* 2936 notwendig. Der Vergleich der in dieser Arbeit vom Wildstamm amplifizierten Sequenz (pAAW11.1) zu den publizierten Daten (acc. S44964) zeigte Abweichungen in der kodierenden Region von 44 bp bis 60 bp, die zu einer Änderung von 5 AS, jedoch zu keiner Leserasterverschiebung wie bei pMHW2 und pMHW2-1 führten (s. Tab. 3.2). Um festzustellen, ob die Leserasterverschiebung bereits auf dem Plasmid pTU979-1 enthalten ist, oder ob eine fehlerhafte PCR zu diesem Ereignis führte, wurde eine Kontrollsequenzierung der *lmbO*-Region des pTU979-1 durchgeführt. Dazu wurde ein 620 bp großes *Sma*I-Fragment, das 530 bp des vorderen Bereichs von *lmbO* abdeckte, aus pAAW14.1 isoliert und das rekombinante Plasmid pAAW14.2 erhalten. Für den weiter stromabwärts liegenden *lmbO*-Abschnitt konnte ein 2500 bp *Sst*I/*Sph*I-Fragment verwendet werden (pAAW14.4). Beide Plasmide pAAW14.2 und pAAW14.4 stimmten in ihren Sequenzdaten mit dem aus dem Wildstamm gewonnenen Amplifikat pAAW11.1 überein, so daß davon ausgegangen werden kann, daß das *lmbO*-Gen 826 bp umfaßt und für ein Protein von 23,6 kDa kodiert. Somit kann die vorherige Produktion eines nicht nachweisbaren, kleinen Proteins von 6,5 kDa mit pMHW5/pMHW8 auf einen Amplifikationsfehler während der PCR zurückgeführt werden.

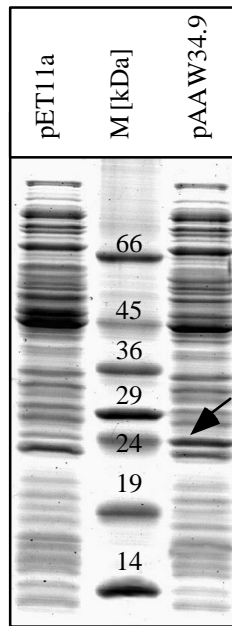
**Tabelle 3.2: Vergleich der Sequenzierungsergebnisse und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz für *lmbO* (bp 42 - 60) aus *S. lincolnensis* 78-11 und für das PCR-Produkt aus *S. lincolnensis* 2936. Abk.: *S. lin.*: *S. lincolnensis***

[bp]	42	60
	I G R V R A	
Sequenzierdaten pTU979-1 ( <i>S. lin.</i> 78-11); (acc. S44964)	ATT GGG CGC GTA CGC GCA	
Sequenzierdaten PCR-Produkt pAAW11.1 ( <i>S. lin.</i> 2936); (diese Arbeit)	ATG GGC GCG TAC GCG CGC	
	M G A Y A R	

Zur heterologen Produktion von LmbO erfolgte eine Expression des Gens mittels der pET11a/16b-Vektoren (pAAW11.2/11.3). Für die His-tag-Version des LmbO-Proteins konnte die Molmasse von 26 kDa in einer SDS-PAGE Analyse trotz Änderungen in den Expressionsbedingungen lediglich als Produktion von Einschlußkörperchen bestätigt werden (ohne Abbildung). Hingegen konnte keine Überproduktion von nativem LmbO beobachtet werden. Die Verwendung des *rhap*-Expressionssystems erbrachte ebenfalls keine Produktion löslichen Proteins. Ein weiterer Ansatzpunkt, lösliches, natives LmbO zu produzieren, bestand in einer gemeinsamen Expression mit *lmbS*, da das Protein LmbS bereits in früheren Experimenten in *E. coli* exprimiert werden konnte (Haase, 1996) und keine eindeutige RBS der Stromaufwärtssequenz von *lmbO* zuzuschreiben ist. Dazu wurde mittels PCR (Primerpaar *lmbS.1/lmbO.2*) ein 1850 bp großes, *lmbS* und *lmbO* enthaltendes Fragment amplifiziert und mit beiden pET-Vektoren zu pAAW28.12 bzw. 28.13 ligiert. Die Expression beider rekombinanter Plasmide in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS wies das jeweilige LmbS-Protein (41 kDa bzw. 43,5 kDa), jedoch keine durch SDS-PAGE zu identifizierende, zusätzliche Proteinbande für LmbO auf. Der Expressionsnachweis gelang erst unter Verwendung eigens für LmbO hergestellter Antikörper (s. 3.1.2).

### LmbK

Sequenzdatenvergleiche wiesen darauf hin, daß LmbK Verwandtschaft zu Phosphatasen besitzt und möglicherweise für die postulierte Octose-8-phosphat-Phosphatase kodieren könnte. Dadurch wurde eine Expression des einzeln vorliegenden Gens *lmbK* ebenfalls interessant. Da frühere Arbeiten zur Expression des 573 bp langen *lmbK*-Gens sowohl unter Verwendung seiner eigenen RBS als auch der RBS des Phagen T5 nicht zur Produktion eines Proteins mit der errechneten molekularen Masse von 20,5 kDa führten (Schmidt, 1994), wurde hier eine Expression mittels pET11a (pAAW34.2) und pJOE2702 (pAAW34.9) getestet. Es konnte bei einer Expressionstemperatur von 37°C in *E. coli* JM109/pAAW34.9-Extrakten eine zusätzliche Proteinbande mit einer etwas größeren apparenten molekularen Masse als der errechneten bei 23 kDa detektiert werden; dabei wies LmbK eine ca. 40%ige Löslichkeit auf (s. Abb. 3.3). Hingegen führte die Expression von *lmbK* in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pAAW34.2 zur Produktion unlöslicher Einschlußkörperchen (ohne Abb.).



**Abb. 3.3: Produktion des LmbK-Proteins in *E. coli*.** Dargestellt ist die lösliche Fraktion des Zellaufschlusses des Expressionsstammes *E. coli* JM109/pAAW34.9 im Vergleich zu *E. coli* JM109/pJOE2702 (Kontrolle). Der Pfeil markiert das *lmbK*-Produkt (SDS-PAGE: 12,5% Trenngel).

### 3.1.2 Expression in Streptomyceten

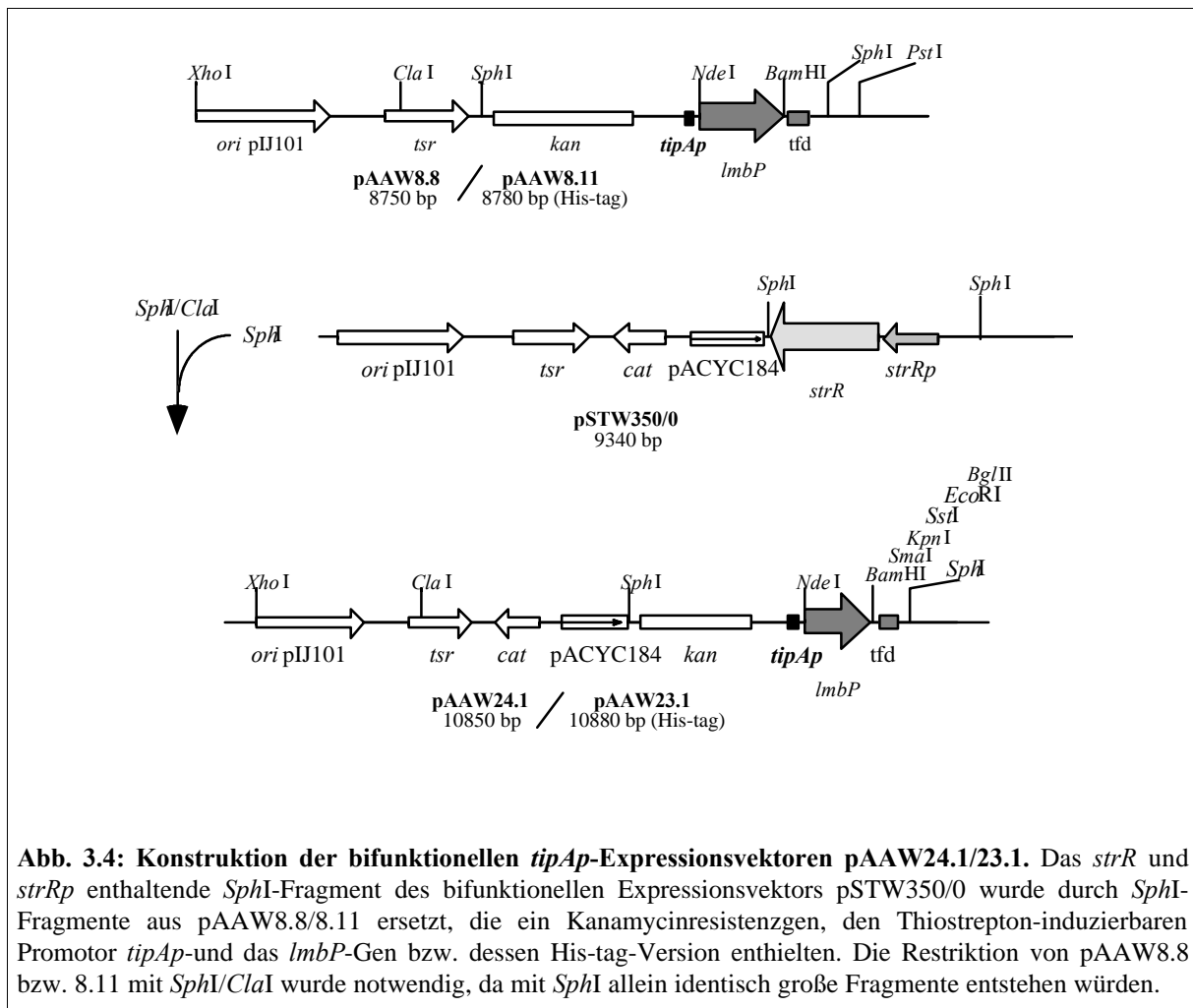
Durch die alternative Expression von Lmb-Proteinen in *S. lividans* sollten nachteilige Effekte der Expression in *E. coli*, wie beispielsweise die Bildung von »inclusion bodies«, umgangen werden. Verschiedene Streptomyceten-Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren wurden zur Expression MTL-relevanter Gene eingesetzt.

Für eine starke und konstitutive Expression des Erythromycin-Resistenzgens *ermE* sind zwei Promotoren verantwortlich (Bibb et al., 1985). Der Promotor *ermEp* findet Verwendung in dem bifunktionellen Vektor pUWL201, der jedoch keine RBS für die zu exprimierenden Gene besitzt. Aus diesem Grund wurden bereits in pET-Vektoren klonierte Gene verwendet, um die pET-RBS nutzen zu können. Dazu wurden die *XbaI/EcoRV*-Fragmente aus den pET-Konstrukten in pUC18 *XbaI/SmaI* ligiert. Durch eine darauffolgende *EcoRI/HindIII*-Klonierung in pUWL201 wurde eine korrekte Orientierung der Gene bezüglich des *ermE*-Promotors gewährleistet.

Ein weiterer *ermEp*-enthaltender Vektor, pHM8a, weist im Gegensatz zu pUWL201 bereits eine RBS auf und integriert durch sein »mini-circle«-Integriationselement in das Streptomyceten-genom (Motamedi, 1995). Er besitzt die RBS des Elongationsfaktor EF-Tu aus *Streptomyces ramocissimus*, dessen Gen stark exprimiert wird (Vijgenboom et al., 1994). Hier war es möglich eine direkte *NdeI/BamHI*-Klonierung der entsprechenden Gene vorzunehmen. Für beide Vektoren kam *S. lividans* 66 TK23 als Wirtstamm zur Verwendung.

#### 3.1.2.1 Konstruktion zweier bifunktionaler Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Promotoren zur Expression von *S. lincolnensis*-Genen in *S. lividans*

Um den Klonierungsaufwand für eine ausstehende, nachweisbare Expression löslichen Proteins mehrerer Gene aus der MTL-Biosynthese zu minimieren, wurden zwei verschiedene *E. coli*-Streptomyceten »shuttle-Expressionsvektoren« mit unterschiedlichen Promotoren konstruiert, in die eine direkte *NdeI/BamHI*-Klonierung möglich ist. Als Promotor bot sich der Thiostrepton-induzierbare *tipAp* aus *Streptomyces azureus* an (Murakami, 1989), da bisher unter seiner Kontrolle mehrere Streptomyceten-Gene erfolgreich produziert werden konnten (Ahlert, 1997; Verseck, 1997). Schon geringste Konzentrationen von Thiostrepton (1 pmol) bewirkten eine Induktion, die bis zu einer 200-fachen Expression von *tipA* führen kann (Murakami et al., 1989).



**Abb. 3.4: Konstruktion der bifunktionellen *tipAp*-Expressionsvektoren pAAW24.1/23.1.** Das *strR* und *strRp* enthaltende *SphI*-Fragment des bifunktionellen Expressionsvektors pSTW350/0 wurde durch *SphI*-Fragmente aus pAAW8.8/8.11 ersetzt, die ein Kanamycinresistenzgen, den Thiostrepton-induzierbaren Promotor *tipAp*- und das *lmbP*-Gen bzw. dessen His-tag-Version enthielten. Die Restriktion von pAAW8.8 bzw. 8.11 mit *SphI/ClaI* wurde notwendig, da mit *SphI* allein identisch große Fragmente entstehen würden.

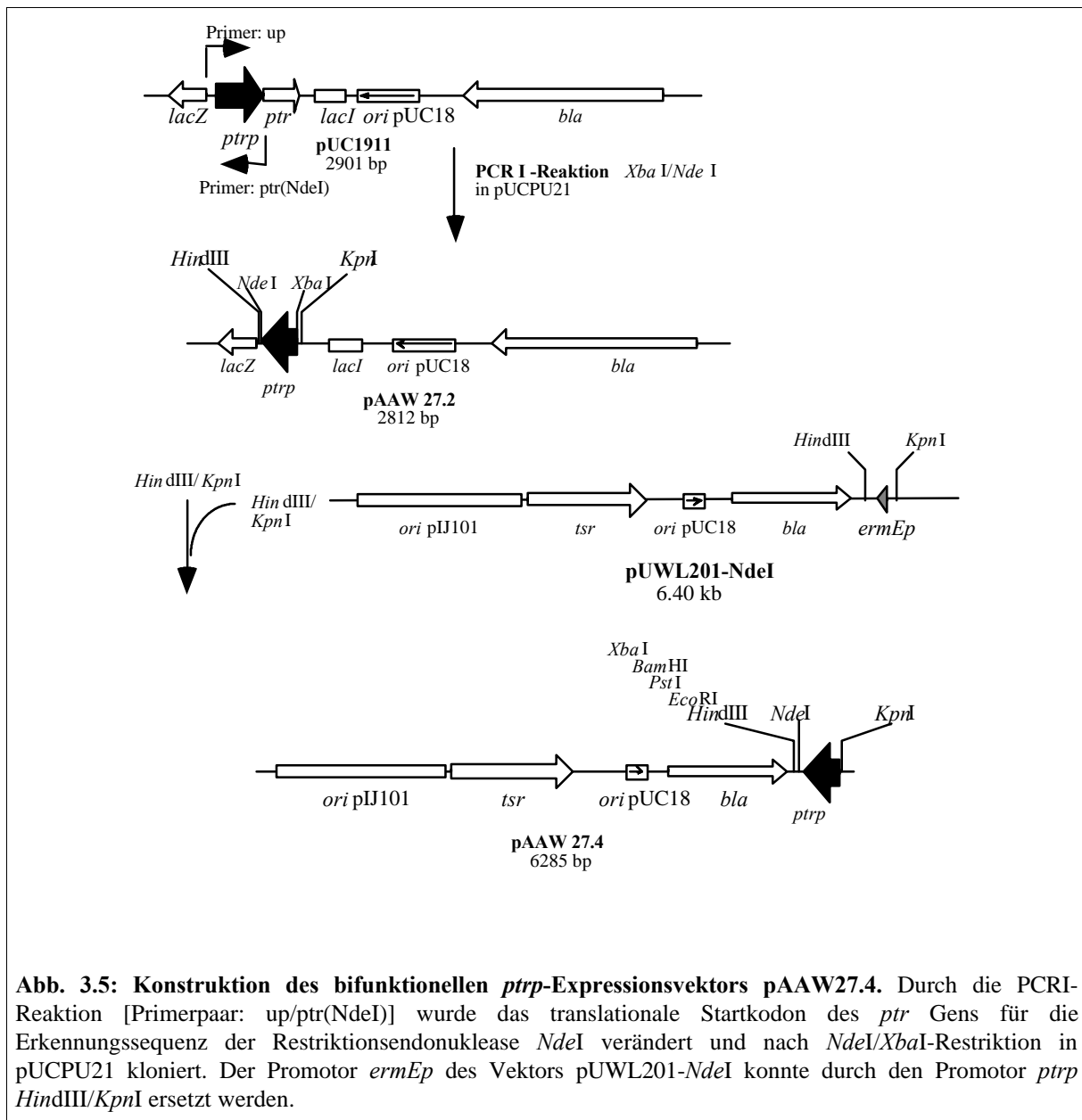
Nachdem mehrere, unterschiedliche Versuche nicht zur stabilen Integration eines *E. coli*-Replikationsursprungs in die Streptomycceten-Expressionsvektoren pIJ6021 bzw. pIJ4123 führten, wurde ein weiterer Ansatz, den Promotor eines bereits bifunktionellen Expressionsvektors durch den Promotor *tipAp* zu ersetzen, verfolgt. Hierbei erwies sich das Plasmid pSTW350/0, das den *strR*-Promotor und das *strR*-Gen aus *S. griseus* enthält (Thamm, 1999), als geeignet, da seine beiden einzigen *SphI*-Restriktionsschnittstellen *strR*-Promotor und *strR*-Gen flankieren (s. Abb. 3.4). Des Weiteren besitzt pSTW350/0 Resistenz gegen Chloramphenicol und Thiostrepton und sowohl einen *E. coli*- als auch einen Streptomyccetenreplikationsursprung. Da die zur *tipAp*-Isolierung benutzten Vektoren pIJ6021 und pIJ4123 keine für diesen Klonierungsschritt geeigneten Restriktionsschnittstellen aufwiesen, wurden pAAW8.8 bzw. pAAW8.11 verwendet. Die Ligation von pSTW350/0 *SphI* mit den 4100 - 4150 bp großen *SphI*-Fragmenten aus pAAW8.8/8.11 führte zu den rekombinanten Plasmiden pAAW24.1 bzw. zur His-tag Version pAAW23.1. Beide Expressionsvektoren besitzen zusätzlich zur Thiostreptonresistenz eine weitere Resistenz in

Streptomyceten gegen Kanamycin. Für eine Expression der jeweiligen Gene erfolgte die Transformation in *S. lividans* 66 TK23.

Ein weiterer, induzierbarer Promotor *ptrp* stammt aus dem Pristinamycin-produzierenden Streptomyceten *Streptomyces pristinaespiralis* und kontrolliert die Expression des Multiresistenzgens *ptr* (Blanc et al., 1995). Das *ptr*-Gen kodiert für ein Membranprotein, das Resistenz gegen die Antibiotika Pristinamycin, bestehend aus zwei synergetisch wirkenden Komponenten (Pristinamycin I: cyclisches Hexadecapeptid; Pristinamycin II: mehrfach ungesättigtes Peptolid), und Rifampicin erzeugt. Induziert werden kann *ptrp* sowohl durch physiologischen Streß als auch durch eine Reihe von Antibiotika und Chemikalien (K. Salah-Bey, 1995). Mit Hilfe dieses Promotors konnten bereits einige Streptomyceten-Gene exprimiert werden (K. Salah-Bey, pers. Mitteilung).

Eine Neukonstruktion eines *ptrp* enthaltenden *E. coli*-Streptomyceten »shuttle-Vektors« wurde notwendig, da lediglich ein 219 bp *Sau3AI* in pUC19 (pUC1911) zur Verfügung stand (Salah-Bey, 1995), das den Promotor *ptrp* und das 5'-Ende des *ptr*-Gens enthielt. Durch PCR-Reaktion I mit pUC1911 als »template«, wurde mittels des Primers up und ptr(*NdeI*) als reverser Primer (s. 2.8.10) eine *NdeI*-Schnittstelle am translationalen Startkodon für *ptr* regeneriert und ein PCR-Fragment von ca. 200 bp erhalten. Nach Restriktion mit *NdeI/XbaI* wurde das 175 bp-Fragment in pUCPU21 kloniert und im resultierenden Klon, pAAW27.2, die Übereinstimmung mit der *ptrp*-Sequenz (acc. X84072) durch Sequenzierung bestätigt. Im darauffolgenden Schritt wurde der *ermEp* in pUWL201, dessen interne *NdeI*-Restriktionsschnittstelle vorher deletiert wurde, durch das 180 bp *HindIII/KpnI ptrp*-Promotor-Fragment aus pAAW27.2 ersetzt. Der daraus resultierende Vektor wurde mit pAAW27.4 bezeichnet (s. Abb. 3.5). Die Klonierung des zu exprimierenden Gens kann über den Polylinker mit den Restriktionsschnittstellen *NdeI/HindIII-EcoRI-PstI-BamHI-XbaI* erfolgen und zur Expression in *S. lividans* 66 1326 transformiert werden. Die Anzucht der plamidtragenden Klone erfolgte im ersten Schritt im Vollmedium (TSB-Medium) für 2 Tage. Im Anschluß daran wurde durch physiologischen Streß (Transfer in GM-Medium) die Induktion des Promotors *ptrp* ausgelöst.

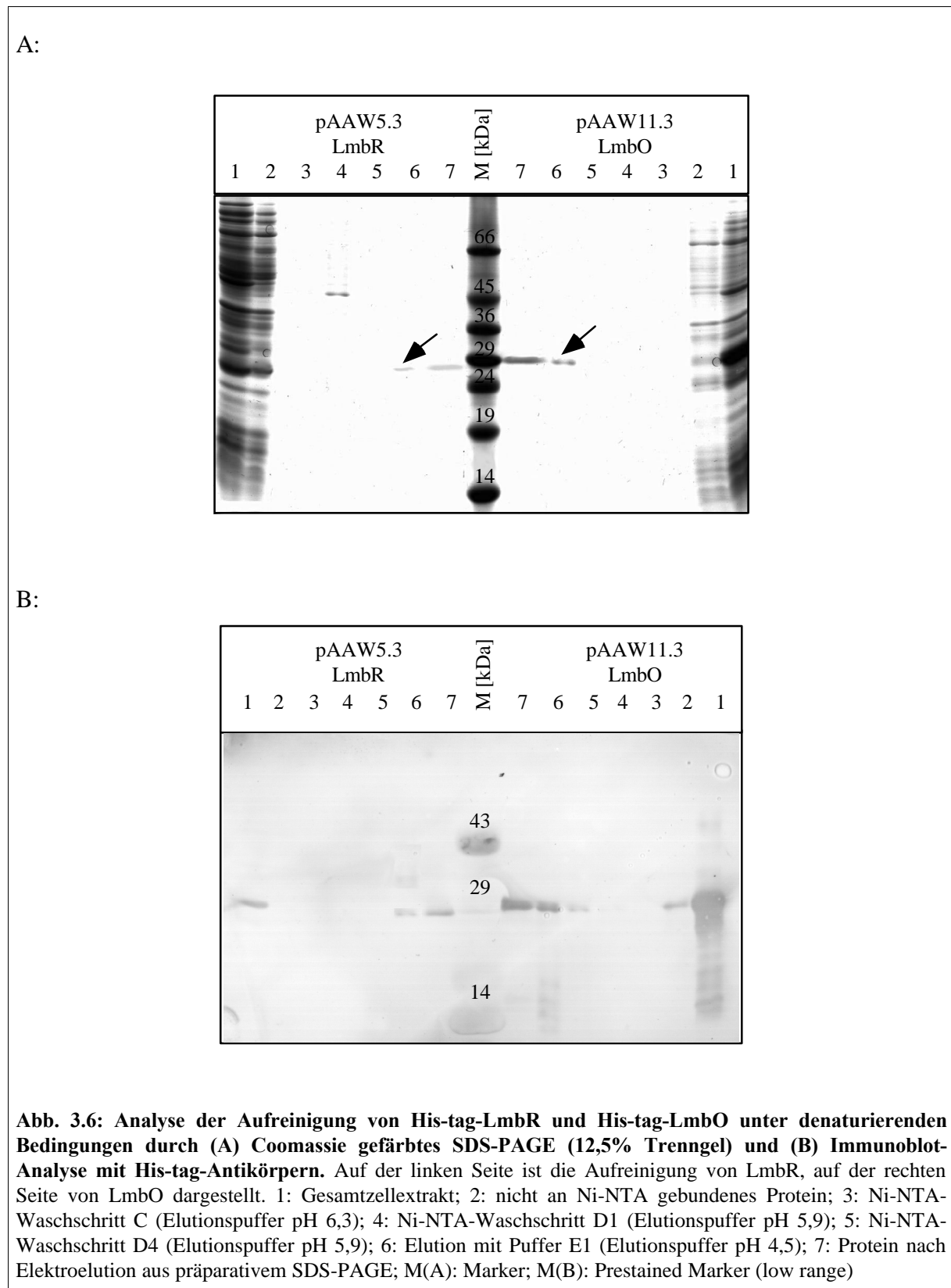




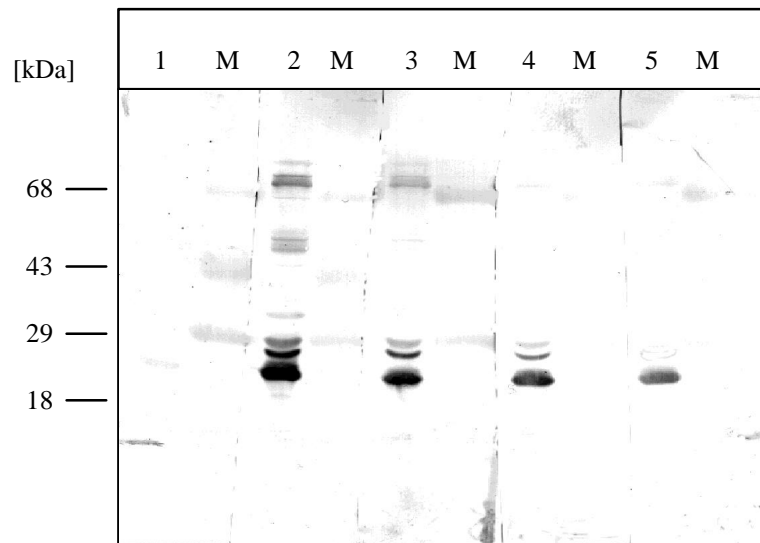
### 3.1.2.2 Herstellung polyklonaler Antisera gegen LmbR und LmbO zum spezifischen Nachweis der Expression

Um die schwache, über SDS-PAGE schwer zu identifizierende Expression der Proteine LmbR und LmbO in Streptomyceten nachweisen zu können, wurden für beide Proteine spezifische Antisera gewonnen. Dazu wurden in beiden Fällen die His-tag Versionen der Proteine aus *E. coli* verwendet, die in größeren Mengen als unlösliche Einschlusskörper bei Anzucht von *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pAAW5.3 bzw. pAAW11.3 unter Standardbedingungen gebildet wurden. Die N-terminalen Histidinreste ermöglichten eine Reinigung mittels Ni-NTA unter

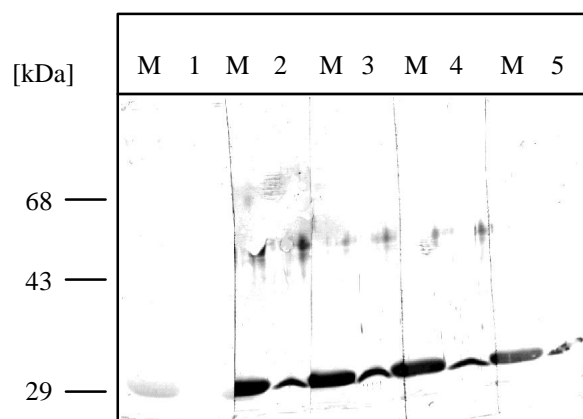
denaturierenden Bedingungen. Die Analyse der aufgereinigten Proteine LmbR und LmbO ist in der Abbildung 3.6 dargestellt.



A:



B:



**Abb. 3.7: Charakterisierung des Anti-LmbR-Serums (A) und des Anti-LmbO-Serums (B).** Die Immunoblot-Analyse der einzelnen Membranstreifen erfolgte für Gesamtzellextrakte *E. coli* JM109/pAAW5.22 (A) nach Übertragung vom SDS-PAGE (12,5%) auf Nitrocellulose bzw. für Gesamtzellextrakte *S. lividans* 66 TK23/pAAW11.11 (B) nach Übertragung vom SDS-PAGE (10%) auf Nitrocellulose mit Präimmunsereen in Spur 1: Verdünnung 1:2000; und mit verschiedenen Verdünnungen der Antiseren; Spur 2: Verdünnung 1:2000, Spur 3: Verdünnung 1:5000; Spur 4: Verdünnung 1:10000, Spur 5: Verdünnung 1:20000. M: Prestained Marker (high range)

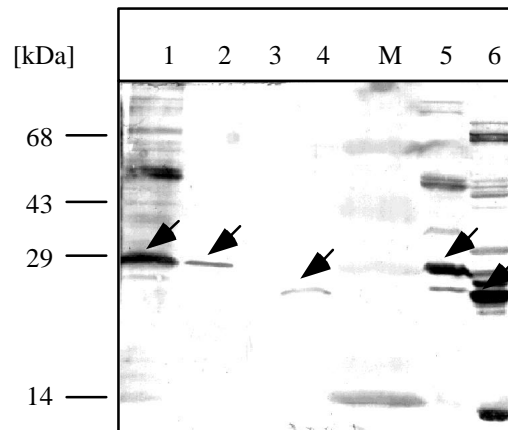
Eine Immunoblot-Analyse der angereicherten His-tag-Proteine erfolgte mit His-tag-Antikörpern (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), wobei noch geringe Kontaminationen in Spur 6 (für

pAAW5.3 im Bereich oberhalb des LmbR; für pAAW11.3 unterhalb des LmbO) durch *E. coli*-spezifische Proteine festgestellt wurden (s. Abb. 3.6-B). Um die Reinheit zu erhöhen wurde im Anschluß eine präparative SDS-PAGE durchgeführt und das Protein nach einer Negativfärbung aus den entsprechend ausgeschnittenen Gelstreifen elektroeluiert (s. 2.9.5). Somit konnte für jede Präparation ca. 300 µg hoch angereichertes Protein für die Immunisierung isoliert werden. Die Charakterisierung der Antisera erfolgte durch Immunoblotanalysen. Dazu wurden für LmbR Gesamtzellextrakte von *E. coli* JM109/pAAW5.22 und für LmbO Gesamtzellextrakte von *S. lividans* 66TK23/pAAW11.11 verwendet, nachdem bei den jeweiligen Überexpressionsversuchen in *E. coli* BL21/pLysS Kreuzreaktionen mit anderen bakteriellen Proteinen auftraten. Monospezifische Reaktionen lieferte das Anti-LmbR-Serum der ersten und zweiten Präparation bei einer Verdünnung von 1:20000 (s. Abb. 3.7-A), das Anti-LmbO-Serum der zweiten Präparation bei einer Verdünnung von 1:5000 (s. Abb. 3.7-B). Tests für die Präimmunsere (1:2000) ergaben keine unspezifischen Signale.

### 3.1.2.3 Heterologe Expressionsstudien zu MTL-Biosynthesegenen

#### LmbR

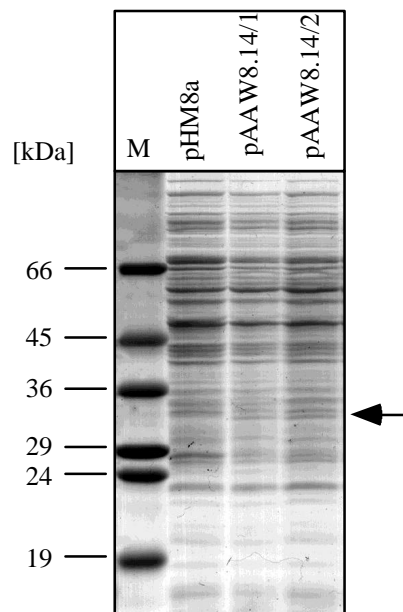
Zur Expression von *lmbR* in Streptomyceten wurden die unter 3.1.2.1 beschriebenen Vektoren pAAW24.1 und pAAW27.4, des weiteren pUWL201 und pDNW26 genutzt. Mittels Coomassiefärbung nach SDS-PAGE konnte lediglich für pAAW5.7 (pUWL201, His-tag) eine zusätzliche Proteinbande identifiziert werden, die jedoch in nachfolgenden Versuchen nicht mehr reproduzierbar war. Aus diesem Grund wurde eine immunochemische Analyse des Proteins LmbR mittels polyklonaler Antikörper in Betracht gezogen. Dazu wurde der jeweilige Gesamtzellextrakt nach SDS-PAGE auf einer PVDF-Membran immobilisiert und mit dem Serum der 1. Präparation behandelt. Es konnten bei einer Expression in *S. lividans* 66 TK23 bzw. 1326 unter Kontrolle der Promotoren *ermEp* ( pAAW5.7 und pAAW5.20), *tipAp* (pAAW5.17) und *ptrp* (pAAW5.18) nach einer Wachstumszeit von 48 h nach der Induktion Banden für natives und His-tag-LmbR nachgewiesen werden (s. Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Immunoblot-Analysen der Expressionsversuche von LmbR in *S. lividans* 66 TK23 bzw. 1326.** Gesamtzellextrakte wurden mittels 12,5% SDS-PAGE getrennt und mit einer 1:10000-Verdünnung des Anti-LmbR-Serums analysiert. Spur 1: *S. lividans* 66 TK23/pAAW5.7; Spur 2: *S. lividans* 66 1326/pAAW5.17; Spur 3: *S. lividans* 66 1326/pAAW5.18 (Zellernte 3 Tage nach Induktion); Spur 4: *S. lividans* 66 1326/pAAW5.18 (Zellernte 2 Tage nach Induktion); Spur 5: *S. lividans* 66 TK23/pAAW5.20; Spur 6: JM109/pAAW5.22 als Positivkontrolle; M: Prestained Marker (high range)

### LmbP

Das *lmbP*-Gen wurde als ca. 1000 bp großes *NdeI/BamHI*-Fragment beginnend mit ATG in pIJ6021 (pAAW8.8), pIJ4123 (pAAW8.11), pHM8a (pAAW8.14), pAAW23.1 (pAAW8.17), pAAW24.1 (pAAW8.19) und pAAW27.4 (pAAW8.18) kloniert. Zusätzlich erfolgte eine Klonierung von *lmbP* in pUWL201 (pAAW8.7). In diesen Versuchen war nur die Expression in pAAW8.14 (*ermEp*, pHM8a) erfolgreich und eine schwach ausgeprägte, zusätzliche Proteinbande des nativen LmbP von ca. 34 kDa konnte anhand einer SDS-PAGE-Analyse ermittelt werden (s. Abb. 3.9).

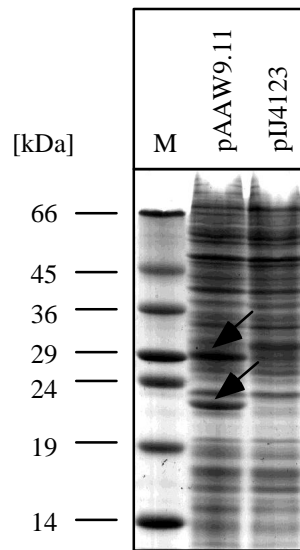


**Abb. 3.9: Produktion des LmbP-Proteins in *S. lividans* 66 TK23/pAAW8.14.** Dargestellt ist die Produktion des Proteins zweier Transformanten unter Kontrolle des Promotors *ermEp* im Vergleich zur Negativkontrolle (pHM8a); (SDS-PAGE: 12,5% Trenngel). Der Pfeil kennzeichnet überproduziertes LmbP.

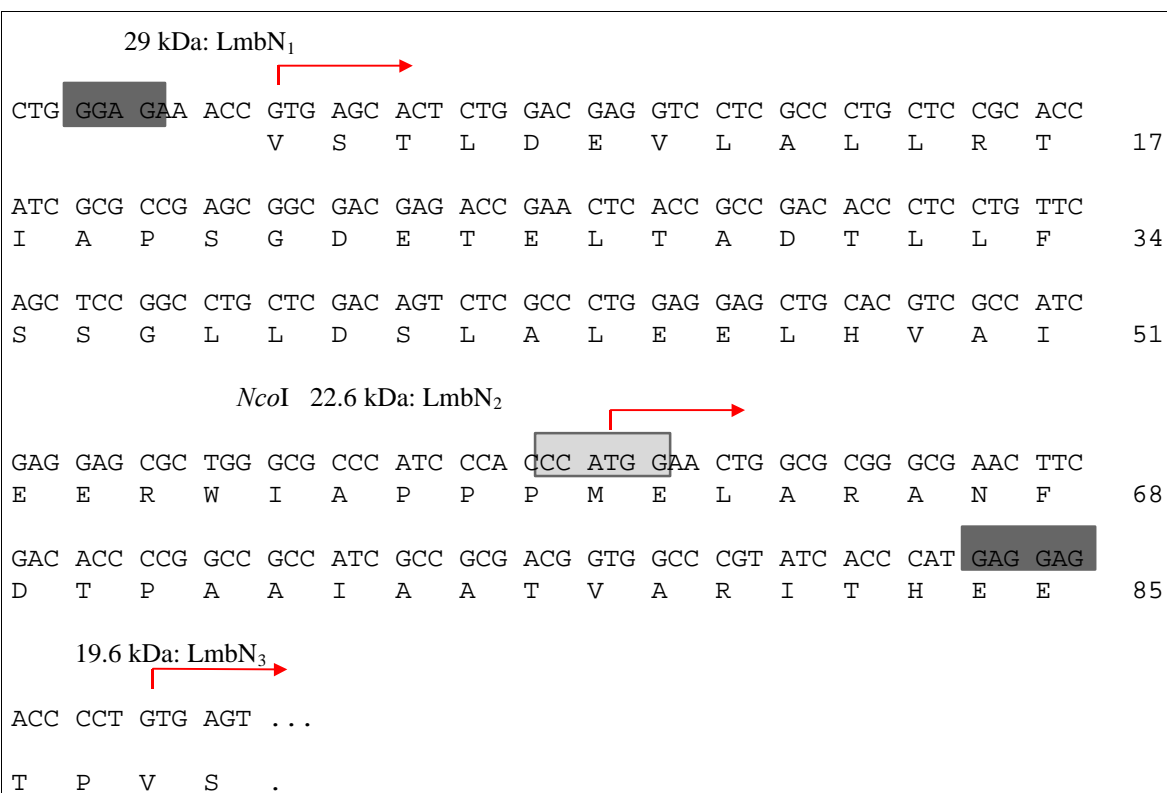
### LmbN

In Versuchen zur Expression von *lmbN<sub>1</sub>* wurden bereits oben erwähnte Vektoren verwendet. Hier zeigte die Expression von *lmbN<sub>1</sub>* mit Hilfe des Promotors *tipAp* sowohl im Streptomyceten-Expressionsvektor pIJ4123 (pAAW9.11) als auch im entsprechenden »shuttle-Vektor« pAAW24.1 (pAAW9.17) eine starke Bande bei ca. 30 kDa für die His-tag-Version nach Fermentation in SPMR-Medium (s. Abb. 3.10). Zusätzlich wurde ein Protein mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 23 kDa reproduzierbar gebildet. Dies führte zu der Vermutung, daß ein kürzerer, als der bisher postulierte Leserahmen das Gen *lmbN* repräsentiert.

Bei genauerer Untersuchung der DNA-Sequenz im Bereich des Starts von *lmbN* ergaben sich zwei weitere putative Startkodons (s. Abb. 3.11). Ein ATG-Startkodon befindet sich 168 Nucleotide stromabwärts des *lmbN<sub>1</sub>*-Starts und das daraus resultierende, N-terminal verkürzte Protein wurde mit LmbN<sub>2</sub> bezeichnet. Die zu erwartende molekulare Masse des Proteins entspricht mit 22,6 kDa der bereits detektierten Bande. Ein weiterer möglicher Startpunkt GTG befindet sich 249 nt stromabwärts ( $\Rightarrow$  LmbN<sub>3</sub>), dessen errechnete molekulare Masse 19,6 kDa beträgt.



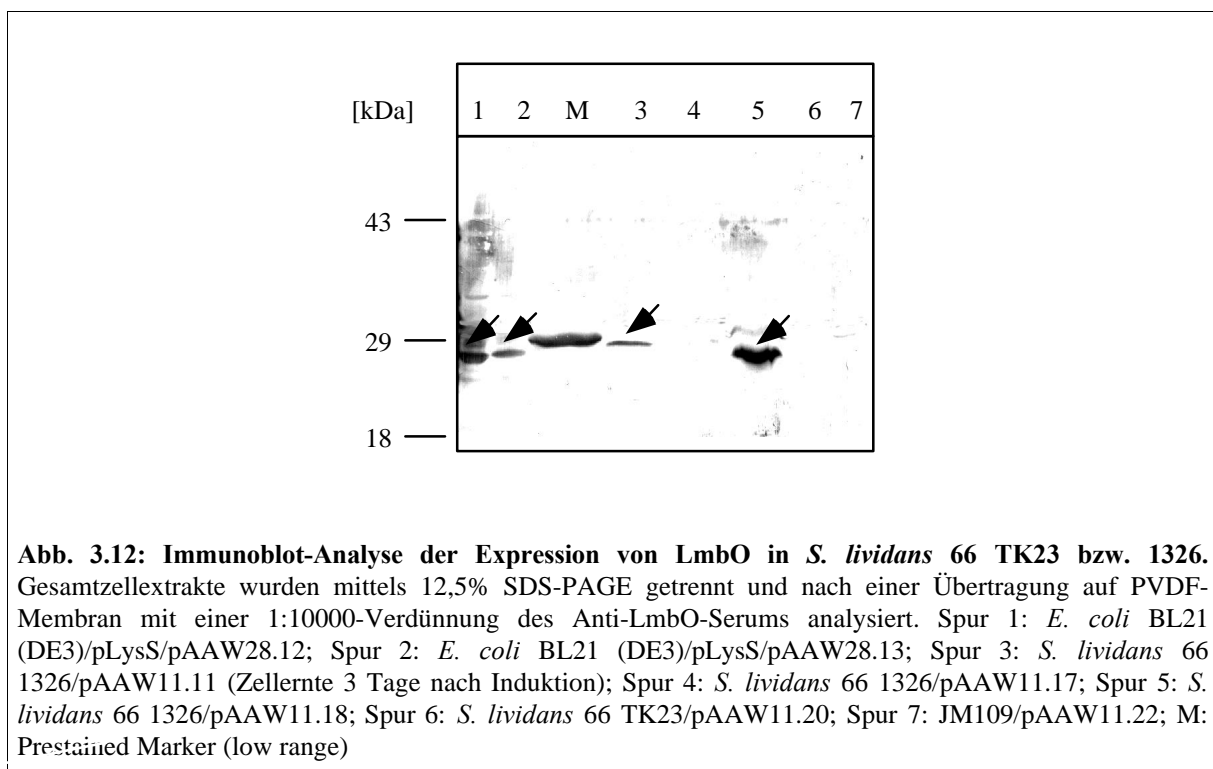
**Abb. 3.10: Produktion des LmbN-Proteins in *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11 (SDS-PAGE: 12,5% Trenngel).** Die Pfeile (pAAW9.11) kennzeichnen überproduziertes LmbN unter Kontrolle des Promotors *tipAp* (His-tag: 31 kDa) und des putativen Promotors *lmbNp* (23 kDa).



**Abb. 3.11: Mögliche Startkodons von *lmbN*.** Alle drei möglichen translationalen Startpunkte sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Des weiteren sind die *Nco*I-Restriktionsschnittstelle und die putativen RBSs der möglichen Startpunkte von LmbN<sub>1</sub> und LmbN<sub>3</sub> grau unterlegt.

## LmbO

Eine signifikante Überexpression von LmbO in verschiedenen Vektoren für Streptomyceten ließ sich in *S. lividans* nicht nachweisen. Daher wurde ebenfalls der sensitivere Nachweis einer Expression anhand polyklonaler Antikörper gegen His-tag-LmbO gewählt (s. Abb. 3.12). In Zellextrakten von *S. lividans* 66 1326 mit pAAW11.11 (pIJ4123), pAAW11.14 (pHM8a) und mit pAAW11.18 (pAAW27.4), konnte in allen Fällen die Expression eines Proteins mit einer molekularen Masse von ca. 23,5 kDa bzw. des His-tag-Proteins von ca. 26,5 kDa nachgewiesen werden. Lediglich im Falle des Plasmids pAAW11.11 (Vektor pAAW24.1) fehlte die His-tag-Proteinbande bei 26,5 kDa im Immunoblot (s. Spur 4, Abb. 3.12).



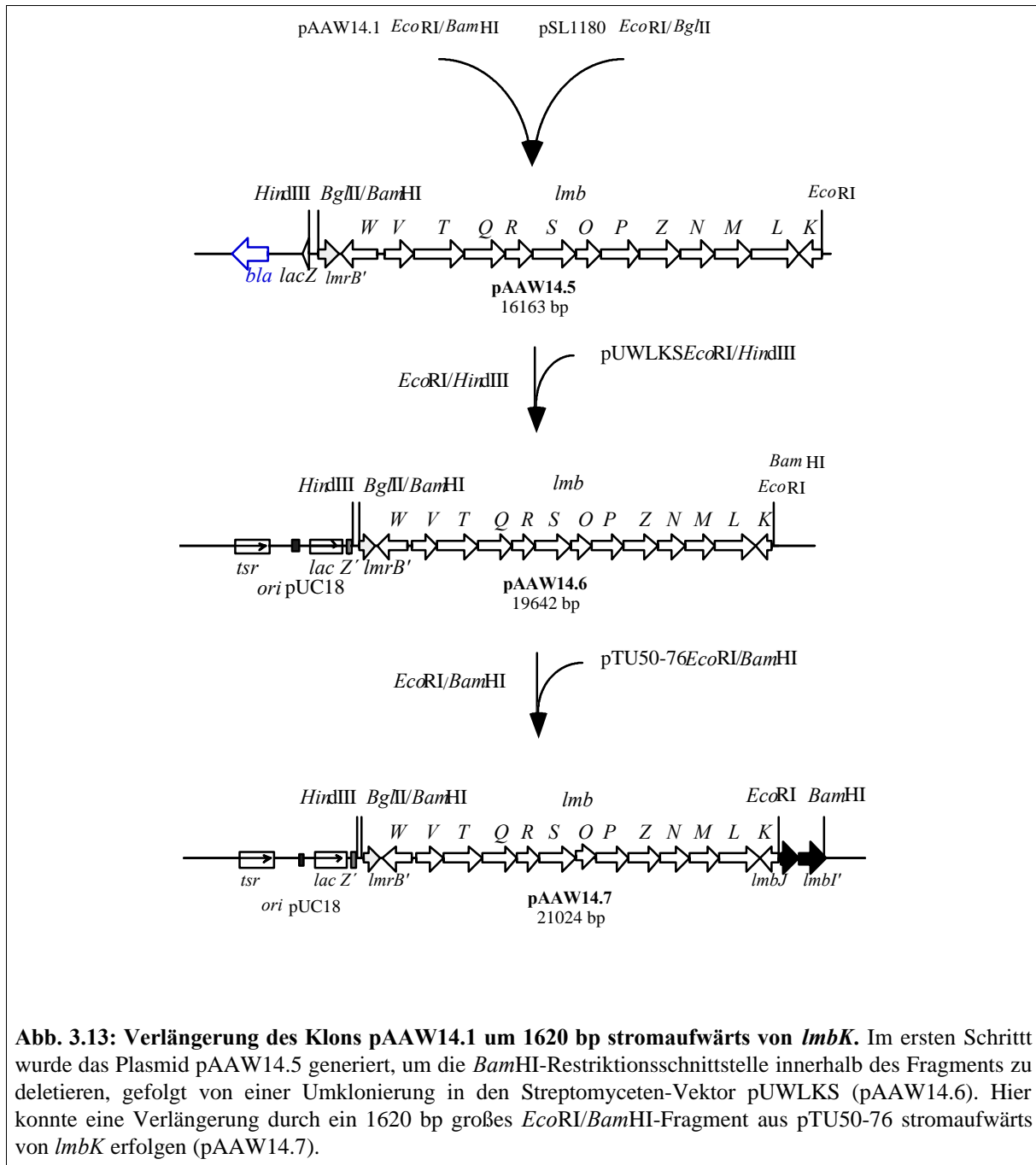
**Abb. 3.12: Immunoblot-Analyse der Expression von LmbO in *S. lividans* 66 TK23 bzw. 1326.** Gesamtzellextrakte wurden mittels 12,5% SDS-PAGE getrennt und nach einer Übertragung auf PVDF-Membran mit einer 1:10000-Verdünnung des Anti-LmbO-Serums analysiert. Spur 1: *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pAAW28.12; Spur 2: *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pAAW28.13; Spur 3: *S. lividans* 66 1326/pAAW11.11 (Zellernte 3 Tage nach Induktion); Spur 4: *S. lividans* 66 1326/pAAW11.17; Spur 5: *S. lividans* 66 1326/pAAW11.18; Spur 6: *S. lividans* 66 TK23/pAAW11.20; Spur 7: JM109/pAAW11.22; M: Prestained Marker (low range)

### 3.1.2.4 Expression des vollständigen, postulierten MTL-Genclusters in *S. lividans* 66 TK23

Zur plasmidkodierte, heterologen Produktion von MTL im Wirtstamm *S. lividans* 66 TK23 wurde es notwendig, alle für die postulierte Biosynthese von MTL verantwortlichen Gene zusammen in einen in Streptomyceten replizierenden Vektor zu klonieren. Dazu bot es sich an, das 13600 bp große *EcoRI*-Fragment aus pTU979-1 mit pUWL218 zu ligieren, um pAAW14.1 zu generieren. Dieses Fragment umfaßte ausgehend von *lmbK* zusätzliche 60 bp stromaufwärts von *lmbK* und weiterhin die Genabfolge *lmbLMNZPOSRQTVWlmrB* mit einschließlich 18 bp



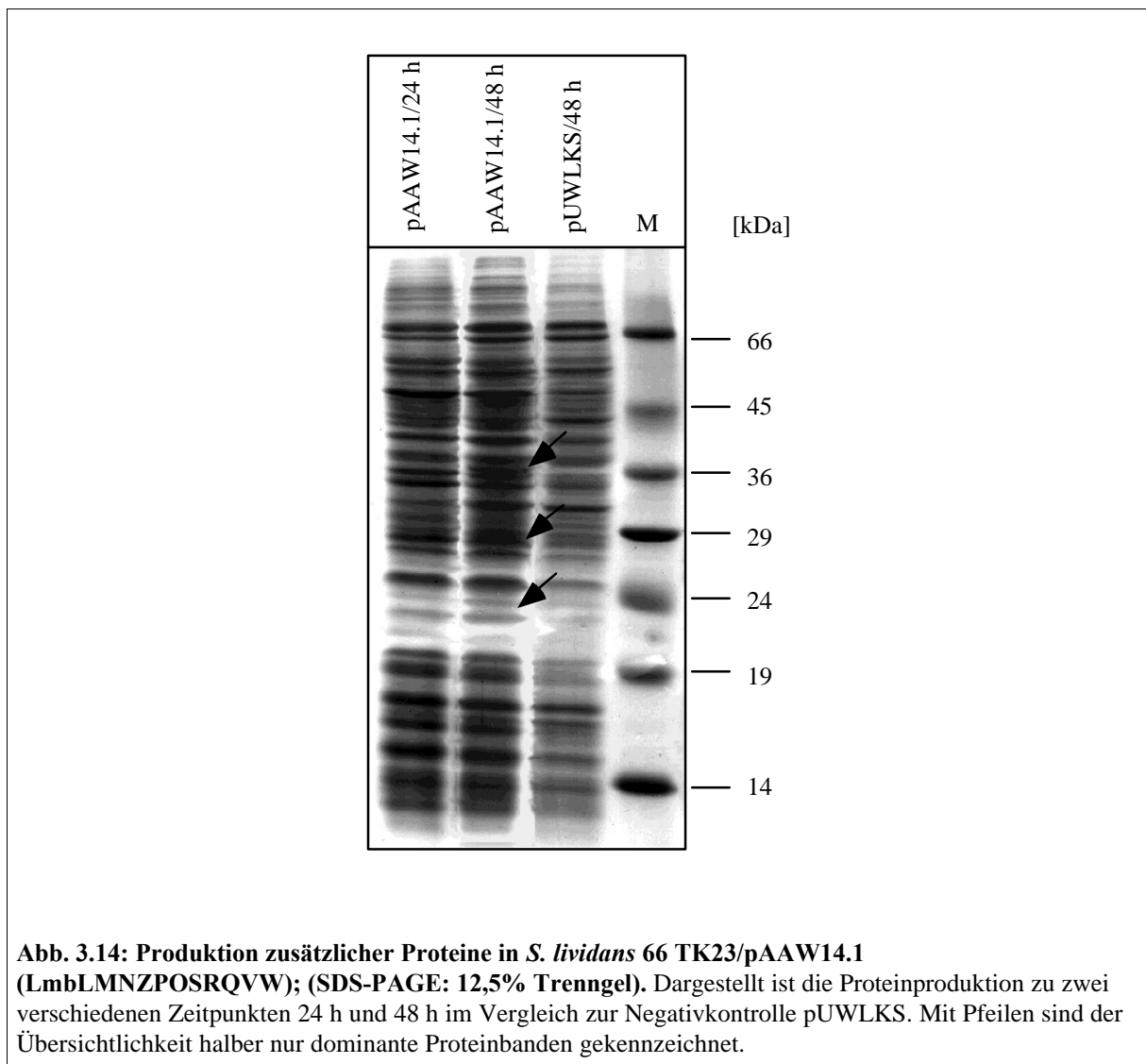
stromaufwärts von *lmrB*. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht feststand, ob der Promotor vor dem Gen *lmbK* innerhalb dieses klonierten Bereiches von 60 bp lag, wurde eine Verlängerung des Fragments stromaufwärts von *lmbK* vorgenommen (s. Abb. 3.13). Das generierte Plasmid pAAW14.7 sollte somit eine Plasmidkodierung der kompletten Enzymsausstattung für die putative MTL-Biosynthese gewährleisten.



Die Expression von pAAW14.1 bzw. 14.7 in *S. lividans* 66 TK23 wurde in verschiedenen Medien wie TSB, YEME und SPMR getestet. Interessanterweise wiesen ausschließlich die SDS-PAGE-Analysen von Anzuchten, die in SPMR durchgeführt wurden, zusätzliche

Proteinbanden auf. *S. lincolnensis* 2936 und sein Überproduktionsstamm 78-11 produzierten nachweisbar in Bioassays nur dann Lincomycin A, wenn ihre Kultivierung in bzw. auf SPMR-Medium erfolgte (Hasib, 1998). Eine 48 h alte Kultur von *S. lividans* 66 TK23/pAAW14.1 lieferte im Vergleich zum Kontrollstamm zusätzliche Proteinbanden für molekulare Massen von 48 - 50 kDa, 46 kDa, 38-40 kDa, 33 kDa, 29 kDa, 28 kDa und 22 kDa (s. Abb. 3.14). Eine mögliche Zuordnung der entsprechenden Proteinbanden zu den theoretischen Genprodukten erfolgt in Tabelle 3.3. Bei Zellernten aus späteren Wachstumsphasen fehlten jedoch oben aufgeführte Proteine. Möglicherweise fand zu diesem Zeitpunkt bereits deren Degradation durch Proteasen statt.

Eine heterologe Produktion von MTL in *S. lividans* TK23 66/pAAW14.1 bzw. pAAW14.7 konnte sowohl in den Kulturüberständen als auch in den Rohextrakten nach 4-tägiger Fermentation in SPMR-Medium anhand von HPLC-Analysen (s. 2.9.9) nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 3.14: Produktion zusätzlicher Proteine in *S. lividans* 66 TK23/pAAW14.1 (LmbLMNZPOSRQVW); (SDS-PAGE: 12,5% Trenngel).** Dargestellt ist die Proteinproduktion zu zwei verschiedenen Zeitpunkten 24 h und 48 h im Vergleich zur Negativkontrolle pUWLKS. Mit Pfeilen sind der Übersichtlichkeit halber nur dominante Proteinbanden gekennzeichnet.

**Tabelle 3.3: Zuordnung der produzierten Proteinbanden (s. Abb. 3.14) zu MTL-Proteinen.**  
 +: mögliche Zuordnung;

Genprodukt	M <sub>r</sub> [kDa] (errechnet)	Expression pAAW14.1 SDS-PAGE
LmbK	20,2	
LmbL	45,9	+
LmbM	35,1	+
LmbN <sub>2</sub>	22,5	+
LmbZ	35,8	+
LmbP	34,1	
LmbO	23,6	+
LmbS	41,0	+
LmbR	23,5	
LmbQ	38,4	
LmbT	44,5	+
LmbV	26,0	
LmbW	35,1	+

### 3.1.3 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Expressionsversuche

In der Tabelle 3.4 sind die Gendaten und die Expressionsergebnisse unter Kennzeichnung der Nachweismethode zusammengefaßt.

**Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Expressionsergebnisse von *lmbK*, *lmbR*, *lmbN*, *lmbP*, *lmbO* unter Angabe des jeweiligen Expressionssystems und Promotors.** Expressionsexperimente, die mittels entsprechender Vektoren zu löslichem Protein führten, sind grau unterlegt. Die jeweiligen Nachweismethoden sind angegeben: (C): SDS-PAGE Coomassie-gefärbt; (AB): Antikörper-Nachweis nach Western-Blott.

Protein- daten	erech- nete Mol- masse	Expression in <i>Escherichia coli</i> unter Angabe der Expressionssysteme und Promotoren (Nachweismethode)			Expression in <i>Streptomyces lividans</i> unter Angabe der Expressionssysteme und Promotoren (Nachweismethode)				
		pET11a (pT7)	pET16b (pT7) [His*tag]	pJOE 2702 ( <i>rhap</i> )	pUWL 201 ( <i>ermEp</i> ) [His*tag ]	pHM8a ( <i>ermEp</i> )	pAAW 27.4 ( <i>ptrp</i> )	pAAW 23.1 ( <i>tipAp</i> ) [His*tag]	pAAW 24.1 ( <i>tipAp</i> )
<i>lmbK</i> 573 [bp]	20.2 [kDa]	+ (C)		+ (C)					
<i>lmbR</i> 663 [bp]	23.5 [kDa]	+ (C)	+ (C)	+ (C/AB)	+ (AB)	-	+ (AB)	+ (AB)	+ (AB)
<i>lmbN</i> <sub>1</sub> 828 [bp]	28.5 [kDa]	-	+ (C)	+ (C)	-	-	-	+ (C)	-
<i>lmbN</i> <sub>2</sub> 660 [bp]	22,6 [kDa]							+ (C)	
<i>lmbN</i> <sub>3</sub> 579 [bp]	19,6 [kDa]								
<i>lmbP</i> 981 [bp]	34,0 [kDa]	+ (C)	+ (C)	+ (C)	-	+ (C)	-	-	-
<i>lmbO</i> 826 [bp]	23,6 [kDa]	+ (AB)	+ (C)	-	-	+ (AB)	+ (AB)	+ (AB)	+ (AB)

Die Symbole bedeuten: +: Expression; -: keine detektierbare Expression; ohne Kennzeichnung: nicht durchgeführt.

## 3.2 Versuche zur biochemischen Charakterisierung der Lmb-Proteine

### 3.2.1 LmbR

#### 3.2.1.1 Versuche zum Nachweis der postulierten Transaldolaseaktivität von LmbR

Die postulierte Transaldolase-Funktion des LmbR-Proteins zur Synthese von O-8-P, dem ersten Zwischenprodukt in der hypothetischen Biosynthese von MTL (s. Abb. 1.4), sollte geprüft werden. Als problematisch erwies sich in erster Linie die zum Nachweis der postulierten Reaktion von R-5-P und S-7-P zu O-8-P und E-4-P notwendige Analytik, da sowohl Edukte als auch Produkte monophosphorylierte Zucker darstellen und aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in Struktur und chemischer Eigenschaft schwer zu trennen sind.

Da das Substrat S-7-P lediglich nur noch in einer Restmenge von 5 mg kommerziell erhältlich war, wurde es notwendig S-7-P *in situ* bereitzustellen. Dies gelang mittels beider entwickelter Testsysteme A und B (s. Abb. 2.1); (s. 2.11.1). Die Kontrolle dieser Synthese erfolgte für den Test A über eine erneute Zugabe von E-4-P, nachdem bereits das Substrat E-4-P vollständig verbraucht wurde und keine weitere Zunahme der  $\text{NADH}_2^+$ -Konzentration detektiert werden konnte. Die daraufhin wieder zunehmende Konzentrationserhöhung von  $\text{NADH}_2^+$  bewies, daß über dieses System unter den gegebenen Reaktionsbedingungen G-3-P und S-7-P regeneriert werden konnten.

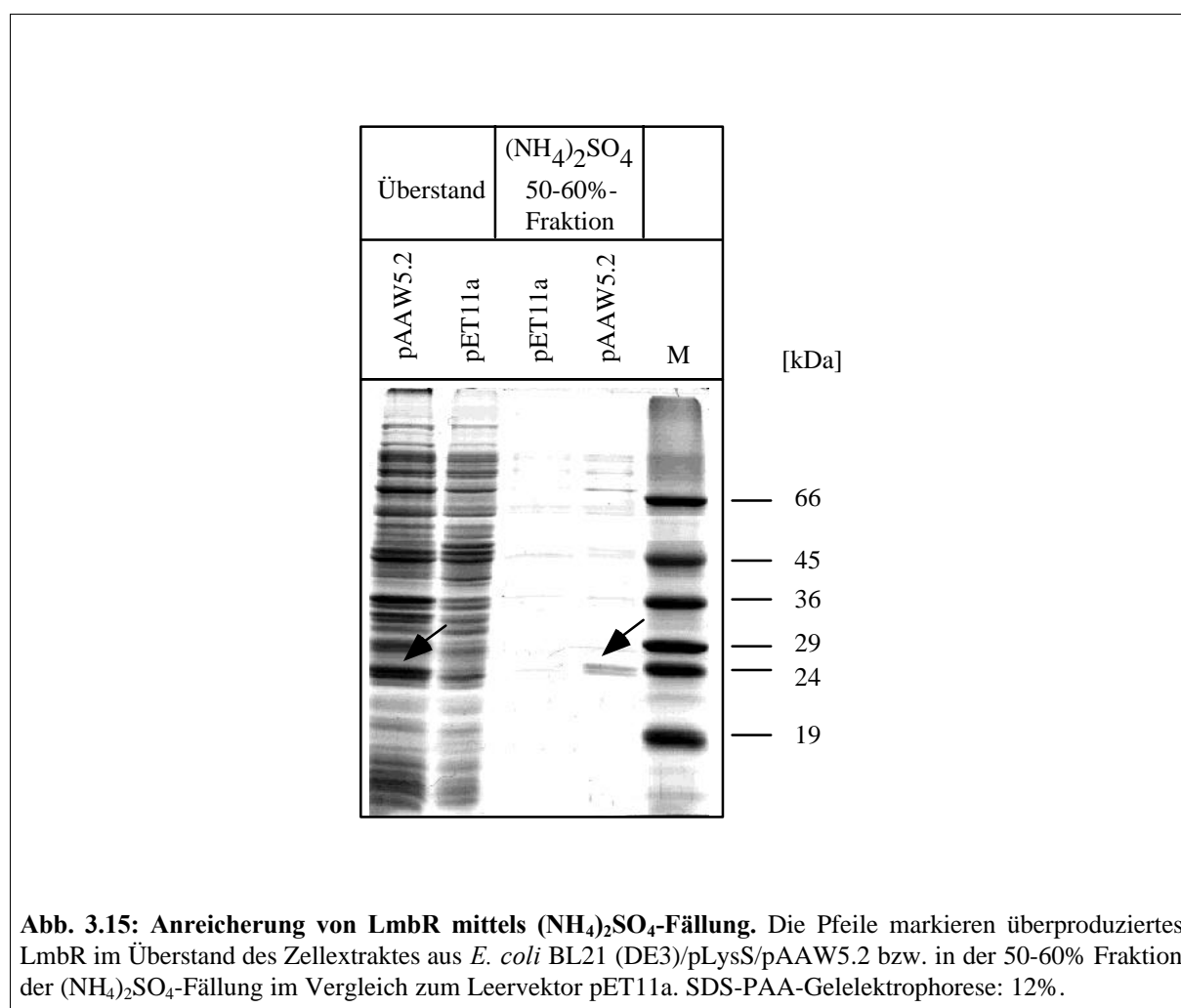
Für eine Regenerierung von E-4-P mittels LmbR wurden Zellen von *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pAAW5.2 aufgeschlossen und der Rohextrakt nach Abzentrifugation bzw. dialysierter Extrakt im Enzymtest eingesetzt. Eine E-4-P-Regenerierung durch LmbR war unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen jedoch nicht nachweisbar.

Das Testsystem B wurde etabliert, da hierbei S-7-P irreversibel durch die Verwendung der aufgereinigten Transketolase TktA aus *E. coli* (Schörken, 1997) hergestellt werden konnte (s. Abb. 2.1-B). Hier wurde eine TAL-Aktivität von LmbR weder durch eine Zunahme der  $\text{NADPH}_2^+$ -Konzentration noch durch einen direkten Nachweis mittels HPLC nach einer alkalischen Phosphatase Behandlung bestätigt. Für eine Kontrollreaktion konnte von G. Sprenger (Jülich) zur Verfügung gestellte, aufgereinigte Transaldolase TalB aus *E. coli* verwendet werden, da TalB eine meßbare Nebenaktivität zur Bildung von O-8-P und E-4-P aus den oben genannten Substraten besitzt. Um störende niedermolekulare Extraktbestandteile

abzutrennen und eine partielle Enzymanreicherung zu erzielen, wurde LmbR durch eine fraktionierte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung angereichert (s. 2.11.1); (s. Abb. 3.17).

Tests mit der 50-60% Fraktion der  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung des überproduzierten LmbR (s. Abb. 3.15) zeigten im Vergleich zur gleichen Fällungsfraction von *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pET11a keine gesteigerten Umsätze.

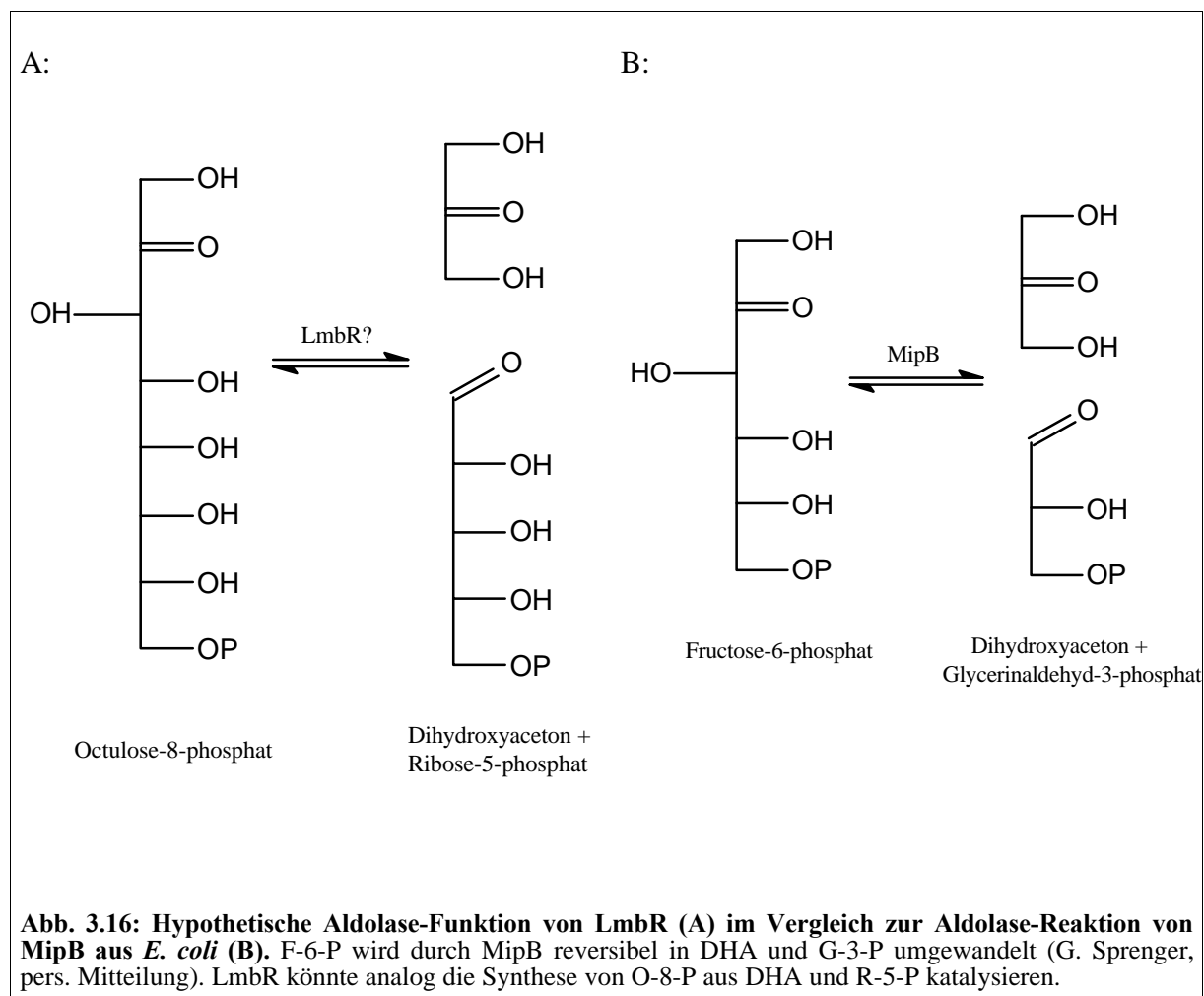
Bei der mittels DC-Analyse direkt zu detektierenden Reaktion von S-7-P mit R-5-P zu O-8-P und E-4-P konnten im diskontinuierlichen Test C (s. 2.11.1) keine Produktpots identifiziert werden.



### 3.2.1.2 Versuche zum Nachweis einer möglichen Aldolaseaktivität von LmbR

Neuere Untersuchungen zur Enzymaktivität von MipB aus *E. coli* ergaben, daß es sich bei diesem Enzymtyp um eine Aldolase handeln könnte, die zu einer neuen Klasse gezählt wird

(Sprenger et al., unveröffentlicht). Da die Proteinsequenz von LmbR mit denjenigen von MipB bzw. TalC die größten Homologien aufweist, könnte LmbR ebenfalls eine Aldolasereaktion, die reversible Kondensation von R-5-P mit DHA zu O-8-P, katalysieren (s. Abb. 3.16).



Um die für LmbR hypothetischen Aldolaseaktivitäten zu untersuchen, wurden für alle durchgeführten Enzymtests (s. 2.11.2) Rohextrakte sowohl von *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pAAW5.2, *S. lincolnensis* 2936, *S. lincolnensis* 78-11, *S. lividans* 66 TK23/pAAW14.1 und *S. lividans* 66 TK23/pAAW14.7 verwendet. Zur Kontrolle wurden Extrakte der Vektor-tragenden Wirtsstämme getestet. Die MipB-katalysierte Aldolasereaktion zur Spaltung von F-6-P konnte in den *E. coli*-Extrakten bestätigt werden.

Die analoge Aldolase-Aktivität der *S. lincolnensis*-Stämme bzw. des überproduzierten LmbR, ein Umsatz von F-6-P zu G-3-P und DHA, konnte im kontinuierlichen, gekoppelten Test D unter Verwendung verschiedener Puffersysteme (s. 2.11.2) nicht bestätigt werden.

Die Biosynthese von O-8-P aus DHA und R-5-P (s. Abb. 3.18) wurde mit Hilfe des diskontinuierlichen Tests E (s. 2.11.2), in dem ebenfalls alle oben aufgeführten Extrakte

eingesetzt wurden, und einer anschließenden Analyse der Reaktionsprodukte mittels DC überprüft. Es konnte zwar eine Abnahme der Intensität des R-5-P-Spots und die Entstehung einer neuen Substanz festgestellt werden, jedoch handelte es sich dabei nachweislich durch Cochromatographie um dephosphoryliertes R-5-P und nicht um das Produkt O-8-P.

### 3.2.2 LmbP

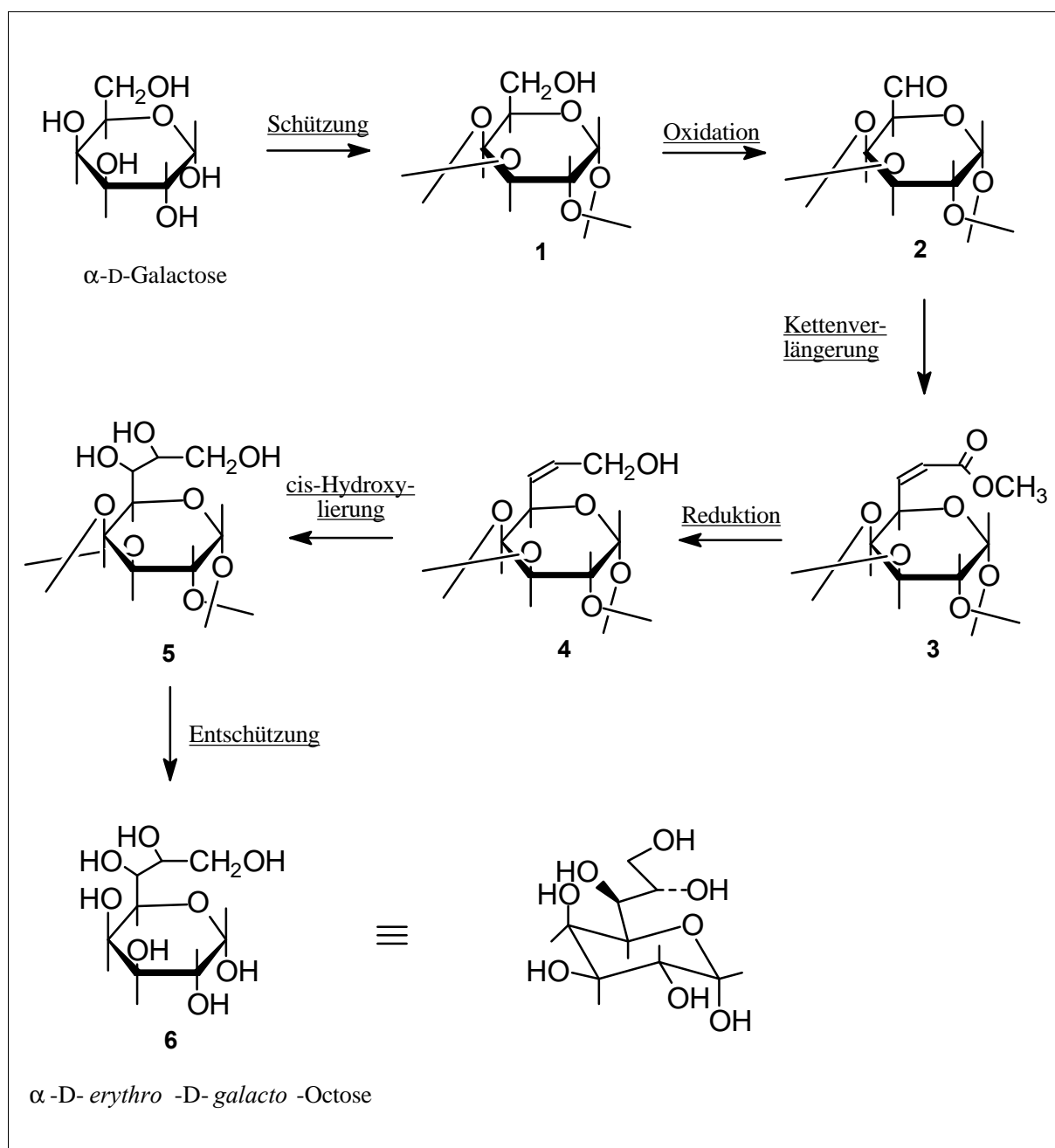
Wie bereits in Kapitel 1.2.3 erläutert, kodiert *lmbP* aller Wahrscheinlichkeit nach für eine Octose-Kinase. Da das Endprodukt MTL eine Galactose-Konfiguration besitzt und die Proteinsequenz von LmbP Ähnlichkeit zu Galactose-1-Kinasen (Phosphotransferase) und nicht zu Glucose-6-Kinasen aufzeigte, wurde davon ausgegangen, daß die *galacto*-Konfiguration des C-8-Zuckers das geeignete Substrat für die Enzymreaktion von LmbP darstellt. Um die entsprechende Octose als Substrat des 1-Phosphotransfers testen zu können, wurde diese Verbindung auf chemischem Weg hergestellt (s. Abb. 3.17).

#### 3.2.2.1 Chemische Substratsynthese

Die Synthese von höheren, biologisch aktiven Monosacchariden stand schon länger im Interesse von Synthesechemikern, da dadurch Modifikationen eingeführt werden können, die durch eine Partialsynthese nicht zugänglich sind. Bereits 1983 gelang es Larson und Danishefsky einen chemischen, 15-stufigen Syntheseweg für Lincosamine zu entwickeln.

Um für das postulierte Substrat von LmbP die geforderte Galactosekonfiguration zu erhalten, wurde  $\alpha$ -D-Galactose als Edukt verwendet. Die Syntheseabfolge ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Im ersten Schritt erfolgte eine Schützung der *cis*-ständigen Hydroxygruppen mittels Isopropylidenschutzgruppen (1), gefolgt von einer Oxidation der ungeschützten, entständigen Hydroxygruppe zum Aldehyd (2). An der resultierenden Aldehydgruppe wurde durch eine Wittig-Reaktion eine Kettenverlängerung um 2 C-Atome erreicht (3). Der entstandene  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ester konnte im nachfolgenden Schritt zu einem  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Alkohol reduziert werden (4). Die *cis*-Hydroxylierung der *Z*-ständigen Doppelbindung führte zu dem geschützten Produkt in der geforderten  $\alpha$ -D-*erythro*-D-*galacto*-Konfiguration der Octose (5). Der letzte Syntheseschritt beinhaltete die Entschützungen der vier, jeweils paarweise *cis* ständigen, isopropylidengeschützten Hydroxygruppen (s. 2.10). Es konnten ca. 100 mg des Produktes erhalten werden. Die NMR-Daten sind in Kapitel 2.10 aufgeführt.



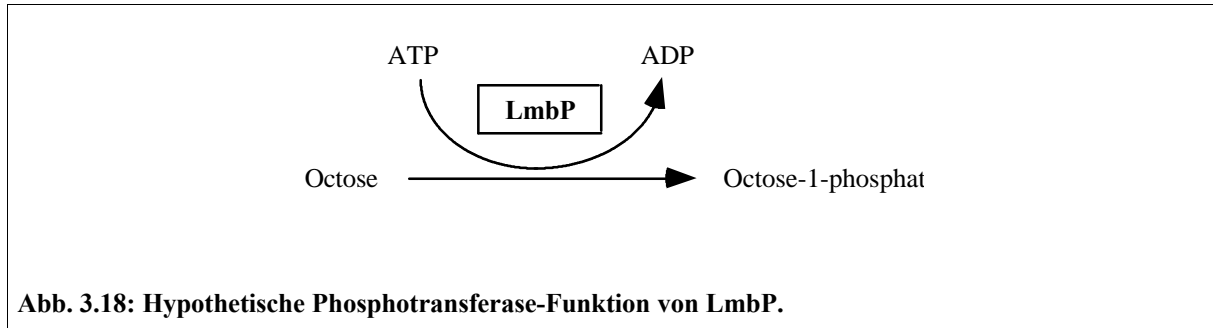


**Abb. 3.17: Chemischer Syntheseweg zur Herstellung des putativen Substrates  $\alpha$ -D-*erythro*-D-*galacto*-Octose für die Enzymreaktion von LmbP.** Die Synthese ausgehend von  $\alpha$ -D-Galactose beinhaltet 6 Stufen und erfolgt über die Zwischenprodukte: **1:** 1,2:3,4-di-O-Isopropyliden- $\alpha$ -D-*galacto*-pyranose, **2:** 1,2:3,4-di-O-Isopropyliden- $\alpha$ -D-*galacto*-hexodialdo-1,5-pyranose, **3:** Methyl(*Z*)-6,7-dideoxy-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-*galacto*-oct-6-enopyranouronat, **4:** (*Z*)-6,7-Dideoxy-1,2-3,4-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-*galacto*-oct-6-enopyranose, **5:** 1,2:3,4-di-O-Isopropyliden- $\alpha$ -D-*erythro*-D-*galacto*-octopyranose.

### 3.2.2.2 Versuche zum Nachweis der postulierten Phosphotransferaseaktivität von LmbP

Um die Phosphorylierung des chemisch synthetisierten Substrates  $\alpha$ -D-*erythro*-D-*galacto*-Octose mittels LmbP nachweisen zu können, wurde ein gekoppeltes Testsystem verwendet (s. 2.11.2),

so daß bei Ablauf der Reaktion eine Abnahme von  $\text{NADH}_2^+$  in Gegenwart von Pyruvat, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase photometrisch zu messen ist (Heinrich und Howard, 1966; Anderson und Sapico, 1975).



**Abb. 3.18: Hypothetische Phosphotransferase-Funktion von LmbP.**

Der Versuch, eine Phosphorylierung der Octose direkt nachzuweisen (s. Kapitel 2.11.2, Abb. 2.3-G), erfolgte mittels  $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , um die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen. Die Trennung von Edukt und Produkt sollte mittels DC durchgeführt werden. Für die Enzymreaktion wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet, die für Galactose-1-Kinasen unterschiedlicher Organismen bereits optimiert wurden (Wilson und Hogness, 1966; Schell und Wilson, 1977; Mollet und Pilloud, 1991). Zur Herstellung einer Vergleichssubstanz für die DC-Analyse erfolgte eine Phosphorylierung von Glucose mittels Hexokinase zu Glucose-6-phosphat (Bergmeyer et al., 1968).

In beiden Testsystemen wurden sowohl Rohextrakte als auch dialysierte Extrakte der LmbP-überproduzierenden Stämme *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS/pAAW8.2 bzw. pAAW8.3 und *S. lividans* 66 TK23/pAAW8.14 analysiert. Es konnte unter allen getesteten Bedingungen keine Phosphorylierung des postulierten Substrates *a*-D-erythro-D-galacto-Octose nachgewiesen werden.

### 3.3 Generierung verschiedener MTL-Mutanten

Um die tatsächliche Beteiligung an der MTL-Biosynthese einiger postulierter MTL-Biosynthesenzyme, LmbR, LmbS, LmbK und LmbW zu überprüfen, sollten »knock-out« Mutanten erzeugt und analysiert werden. Experimente zur Komplementation und Fütterung mit MTL, die die Wiederherstellung der Lincomycin A-Produktion zeigen sollten, wurden für die Charakterisierung der Mutanten durchgeführt. Dazu wurde folgende, allgemeine Strategie verfolgt:

Die zur integrativen Mutagenese eingesetzten Fragmente enthielten neben den überlappenden, flankierenden DNA-Bereichen des *lmb*-Clusters, das durch den Selektionsmarker inaktivierte Gen. Die Konstruktion erfolgte in *E. coli*-Vektoren. Da dadurch die rekombinanten Plasmide im zu mutagenisierenden Wildstamm *S. lincolnensis* 2936 nicht replizieren konnten, wurde eine Integration in das Genom erzwungen (Kieser und Hopwood, 1991). Als Selektionsmarker einer erfolgreichen, homologen Rekombination wurde das *aacC4*-Gen verwendet, das für eine Aminoglycosid-3-Acetyltransferase IV kodiert (Bräu et al, 1984, Allmannsberger et al., 1985). Das Genprodukt verleiht Resistenz gegen Tobramycin bzw. Gentamicin in *E. coli* und gegen Apramycin in Streptomyceten. Denaturierte Plasmide wurden eingesetzt, um eine Integration des mutagenisierenden DNA-Abschnitts durch homologe Rekombination in das Genom von *S. lincolnensis* 2936 zu forcieren (Oh und Chater, 1997). Nachdem die fehlende Lincomycin A-Produktion der Mutanten überprüft wurde (s. 2.7), erfolgte eine Charakterisierung mittels PCR (s. 2.8.11) und Southern-Hybridisierungsexperimenten (s. 2.8.7). Eine mögliche Komplementation der Doppel-Crossover Mutanten wurde *in vivo* sowohl auf genetischer Ebene mit verschiedenen, rekombinanten Expressionsplasmiden als auch durch MTL-Fütterungsexperimente mittels Bioassay analysiert. Bei keiner Mutante konnte unter allen getesteten Bedingungen (s. 2.8.14) eine Komplementation durch Fütterung mit dem Biosynthesezwischenprodukt MTL erzielt werden. Daher wurden ruhende Zellen aus submerser Anzucht zur MTL-Fütterung verwendet (Hausknecht und Wolf, 1986; S. T. Chung, pers. Mitteilung); (s. 2.8.14). Nach gestaffelten Inkubationszeiten wurde sowohl der Kulturüberstand als auch die Rohextrakte auf eine Lincomycin A-Produktion mittels HPLC-Analyse untersucht (s. 2.9.10).

Um auszuschließen, daß das jeweils inaktivierte Gen alternativ an der PPL-Biosynthese beteiligt war, wurden ebenfalls Kreuzfütterungsversuche mit PPL durchgeführt. Wie vorherige Arbeiten (Zhang, 1993; Schmidt, 1994) zeigten, ist die Lincomycin A-Produktion stark von der Wachstumsphase abhängig. Daher wurden nur Stämme zum Vergleich herangezogen, die sich einheitlich in der Produktionsphase befanden.

### 3.3.1 Komplementation einer *lmbR*-Mutante

Die genetische Komplementation der *lmbR*-Mutante *S. lincolnensis* 2936-15(1B) (Hasib, 1998) erfolgte mit Hilfe verschiedener *lmbR*-Expressionsplasmide. Rekombinante Plasmide, die ausschließlich *lmbR* enthielten, konnten keine signifikante Lincomycin A-Produktion in den Mutanten erzeugen (s. Tab. 3.5). Mittels der Plasmide pAAW14.1 (*lmbLMNZPOSRQTVW*) und pAAW14.7 (*lmbKLMNZPOSRQTVW*) wurde jedoch eine schwache Lincomycin A-Bildung festgestellt.

Ebenso erbrachten Kreuzfütterungsexperimente mit PPL keine Lincomycin A-Syntheseerhöhung. Fütterungsexperimente mit MTL bei submerser Anzucht zeigten nach 16 h nur eine sehr schwache Lincomycin A-Produktion (ohne Abbildung), die aller Wahrscheinlichkeit nach an der niedrigen Aufnahme von MTL in die Zellen liegt.

**Tabelle 3.5: Komplementation der *lmbR*-negativ Mutante 15 (1B).** Die Ergebnisse der Hemmhofstests (Nachweis einer Lincomycin A-Produktion) sind im Vergleich zu Negativ- (-) und Positivkontrolle (++++) angegeben.

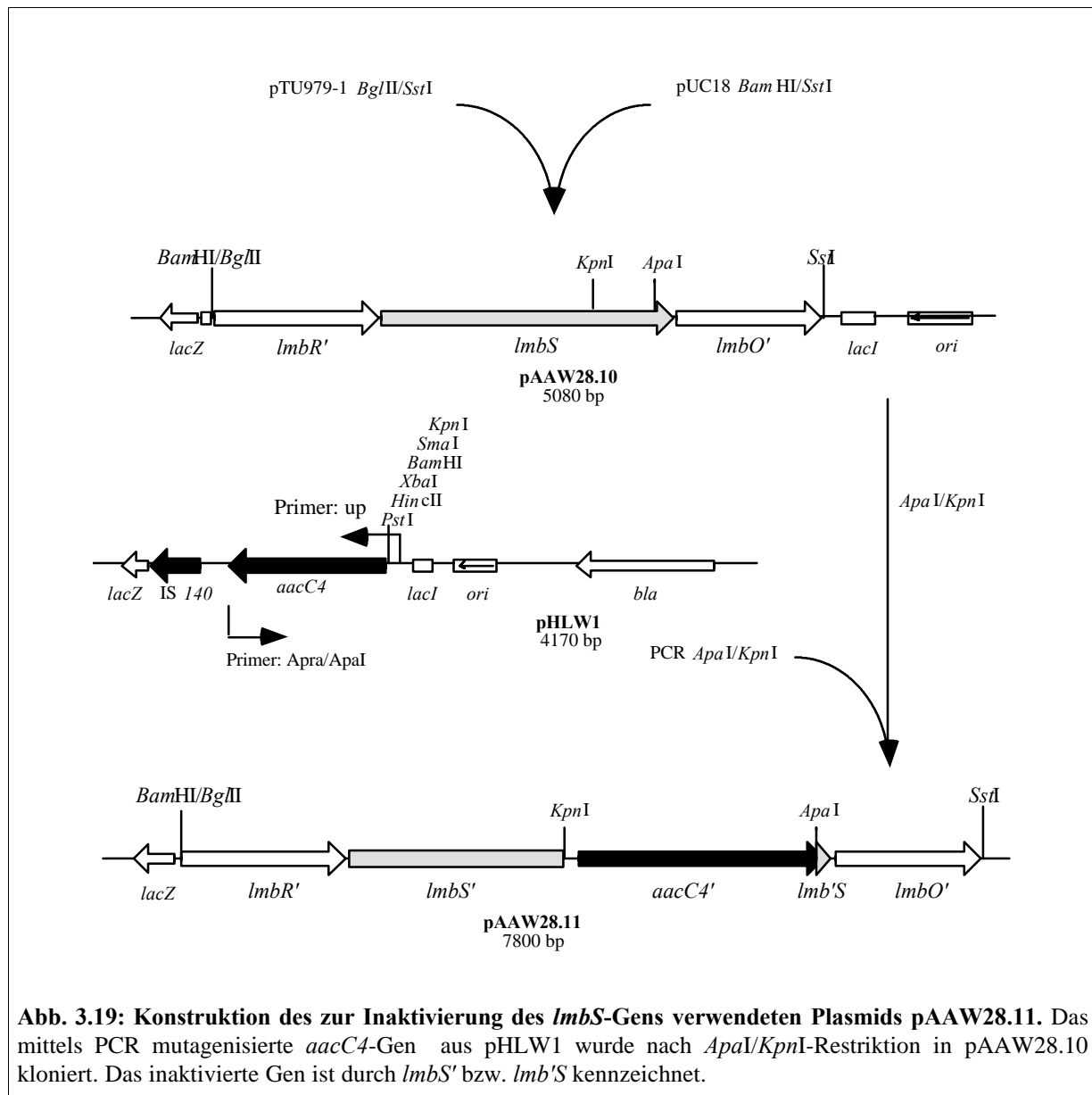
Transformierte Plasmide Mutante	pAAW 14.1	pAAW 14.7	pAAW 5.7	pAAW 5.10	pAAW 5.17	pAAW 5.18	pAAW 5.19
Nr. 15 (1B)	+	+	-	-	-	-	-

-: keine Hemmhofbildung; +: sehr geringe Hemmhofbildung; Anzucht s. 2.8.14

### 3.3.2 Isolierung, Charakterisierung und Komplementierung von *lmbS*-Mutanten

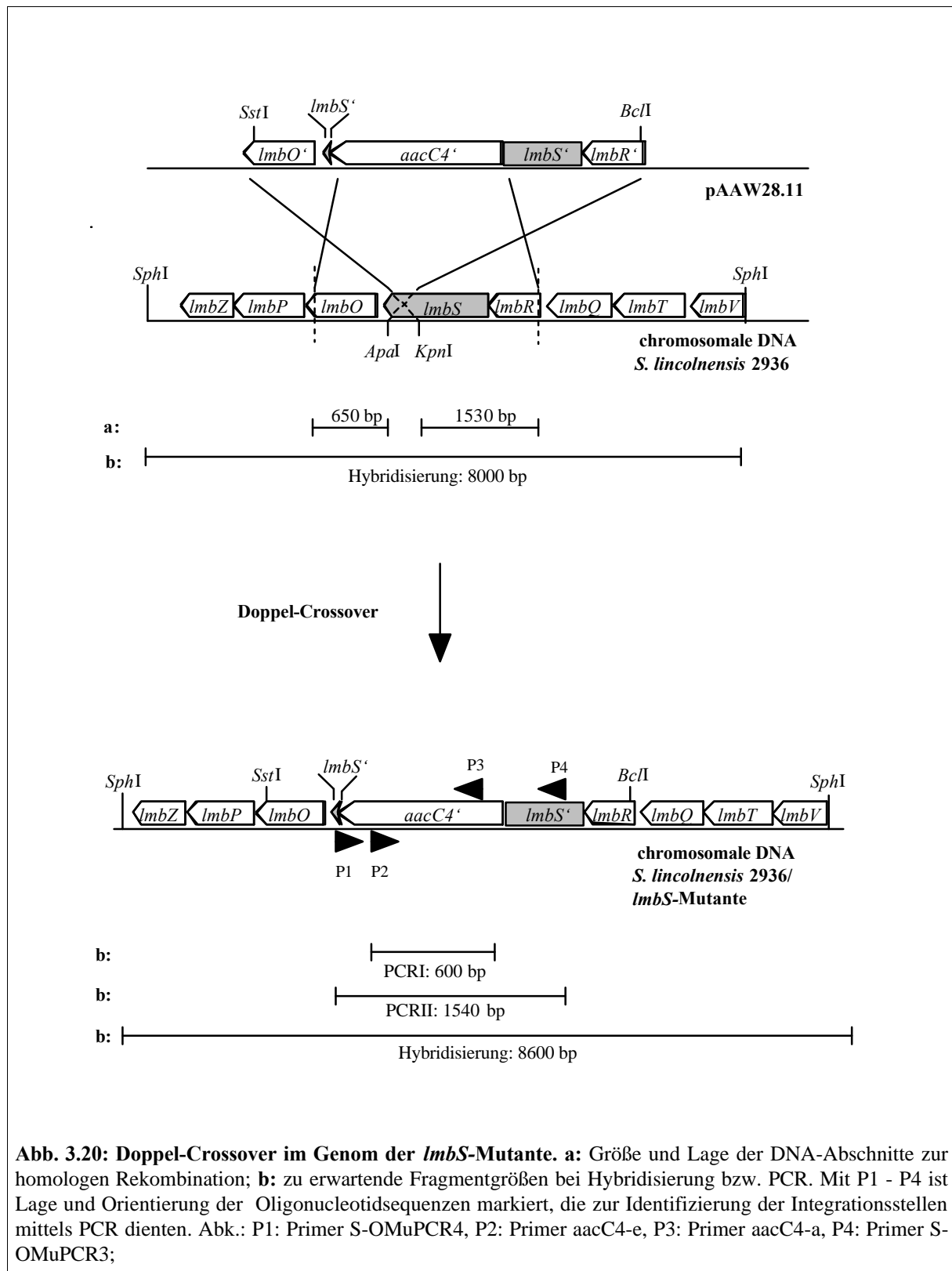
Für eine Inaktivierung des *lmbS*-Gens war es notwendig eine »in-frame« Mutante zu generieren, um eine Inaktivierung des nachfolgenden Gens *lmbO* auszuschließen. Zu diesem Zweck wurde ein 2420 bp großes *BglII/SstI*-Fragment, das *lmbR*, *lmbS* und *lmbO* enthielt, in pUC18 *BamHI/SstI* ligiert (pAAW28.10) und wie folgt umkonstruiert (s. Abb. 3.19).

Das *lmbS*-interne 247 bp *KpnI/ApaI*-Fragment wurde im Anschluß daran durch das *aacC4*-Gen so ersetzt, daß der Leserahmen für die translationale Erkennung des Stopkodons von *lmbS* erhalten blieb. Dadurch sollte der sich anschließende Leserahmen *lmbO* transkriptionell und translationell unbeeinflusst bleiben. Dazu wurde im *aacC4*-Gen mittels PCR am Stopkodon eine *ApaI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt (Primerpaar: rp/Apa-Apa). Da sich eine zweite *ApaI*-



Restriktionsschnittstelle innerhalb von *lmbS* befand, die auf Grund eines Fehlers in der veröffentlichten Sequenz (acc. S44965) nicht auftrat, wurde eine *ApaI*-Partialrestriktion von pAAW28.10 notwendig. Nach Klonierung des *KpnI/ApaI* hydrolysierten *aacC4*-Amplifikats in pAAW28.10 konnte das Plasmid pAAW28.11 generiert werden (s. Abb. 3.19). Die beiden letzten AS im *aacC4*-Genprodukt wurden dadurch bei dieser Fusion durch 5 AS des C-terminalen Endes von LmbS substituiert. Rekombinate Klone wurden bereits in *E. coli* durch Tobramycin-Resistenz selektiert. Das bewies gleichzeitig, daß die Aktivität des auf diese Weise verlängerten AacC4-Proteins nicht beeinflußt wurde.

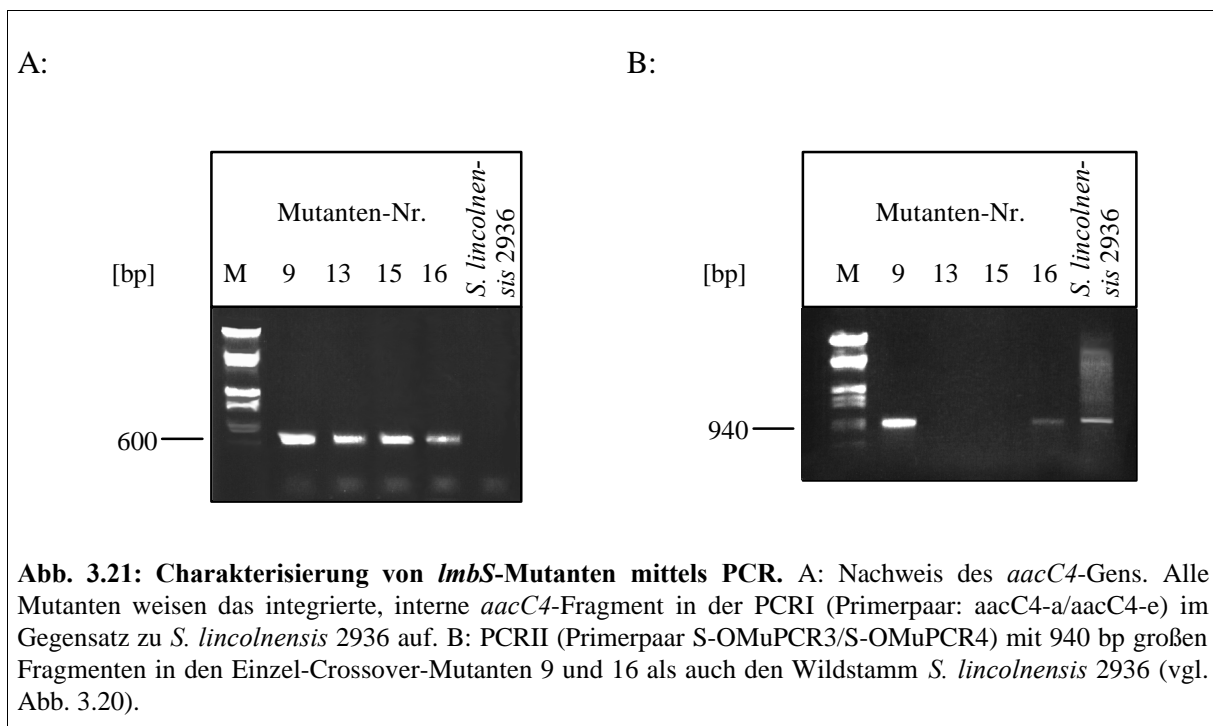
Das Plasmid pAAW24.11 wurde in *S. lincolnensis* 2936 transformiert und 23 phänotypische Lincomycin A-negativ-Mutanten konnten isoliert werden. Deren Analyse durch PCR-Analyse und DNA-DNA-Hybridisierung ergab, daß bei zwei *lmbS*-negativen Stämmen (Nr. 13 und Nr.



15) ein Doppel-Crossover-Ereignis stattgefunden hatte. Alle weiteren 21 Isolate wiesen eine *lmbS*-Inaktivierung durch Einzel-Crossover Ereignisse auf. Die PCR-Analyse II (Primerpaar: S-OMuPCR4/S-OMuPCR4) erbrachte für die Einzel-Crossover-Mutanten ein Fragment der

Größe von 940 bp, wohingegen in den beiden Doppel-Crossover-Mutanten dieses Fragment fehlte (s. Abb. 3.21-B). Bei allen getesteten Mutanten konnte das interne *aacC4*-Fragment in der PCRI (Primerpaar: *aacC4-a/aacC4-e*) nachgewiesen werden (s. Abb. 3.21-A), so daß es sich bei allen Lincomycin A-negativen Stämmen um *lmbS-aacC4*-Rekombinanten handelte.

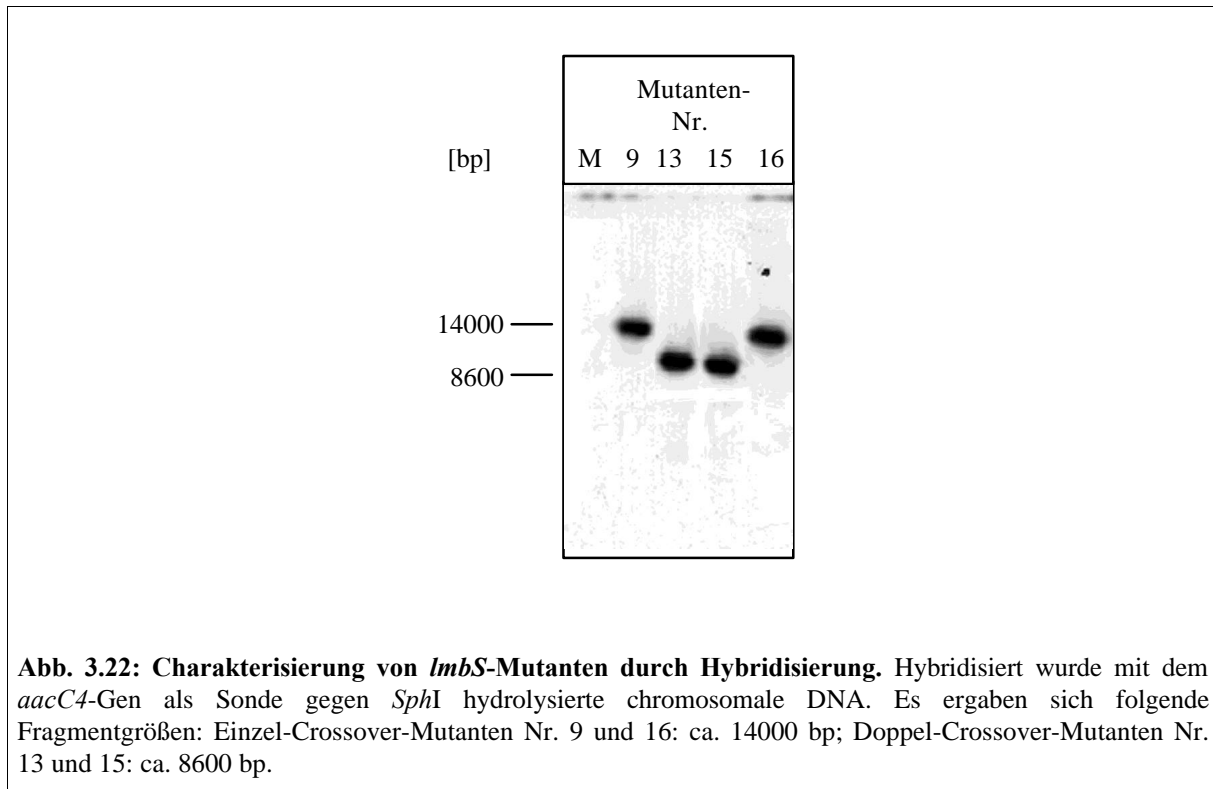
Für DNA-DNA-Hybridisierungsexperimente wurde als Sonde das 600 bp *ApaI/KpnI*-Fragment der Apramycin-Resistenz aus pAAW28.11 isoliert und *SphI*-hydrolysierte chromosomale DNA der zu untersuchenden Stämme analysiert (s. Abb. 3.22). Die erhaltenen Hybridisierungsmuster entsprachen den erwarteten Fragmentgrößen von 8600 bp für die Doppel-Crossover-Mutanten (Nr.13 und 15) im Vergleich zur Einzel-Crossover-Mutante (Nr. 9) mit ca. 14000 bp (s. Abb. 3.20).



**Abb. 3.21: Charakterisierung von *lmbS*-Mutanten mittels PCR.** A: Nachweis des *aacC4*-Gens. Alle Mutanten weisen das integrierte, interne *aacC4*-Fragment in der PCRI (Primerpaar: *aacC4-a/aacC4-e*) im Gegensatz zu *S. lincolnensis* 2936 auf. B: PCRII (Primerpaar S-OMuPCR3/S-OMuPCR4) mit 940 bp großen Fragmenten in den Einzel-Crossover-Mutanten 9 und 16 als auch den Wildstamm *S. lincolnensis* 2936 (vgl. Abb. 3.20).

Eine Komplementation der Mutanten Nr. 13 und 15 erfolgte mit verschiedenen *lmbS*-Expressionsplasmiden. Dazu wurden die Stämme jeweils mit den Plasmiden pAAW14.7, pAAW35.15, pAAW35.20 und pMHW10 transformiert und nach jeder Transformation mehrere rekombinante Klone im Vergleich zum Wildstamm/pUWL218 und zu nichtkomplementierter Mutante/pUWL218 im Bioassay getestet.

Mit allen verwendeten rekombinanten Plasmiden konnte eine Komplementation der Mutanten in jeweils 3 bis 4 Transformanten nachgewiesen werden (s. Tab. 3.6).



**Tabelle 3.6: Komplementation der *lmbS*-negativ Mutanten Nr.13 und Nr.15.** Die Ergebnisse der Hemmhoftests (Nachweis einer Lincomycin A-Produktion) sind im Vergleich zu Negativ- (-) und Positivkontrolle (+++++) angegeben.

Mutante/ Komplementationsplasmid	pAAW14.7	pAAW35.15	pAAW35.20	pMHW10
Nr. 13	++	++	+	+++++
Nr. 15	+++	++	++	++

+: sehr geringe Hemmhofbildung; ++: mittelmäßige Hemmhofbildung; +++: gute Hemmhofbildung; ++++: zum Wildtyp vergleichbare Hemmhofbildung; Anzucht s. 2.8.14

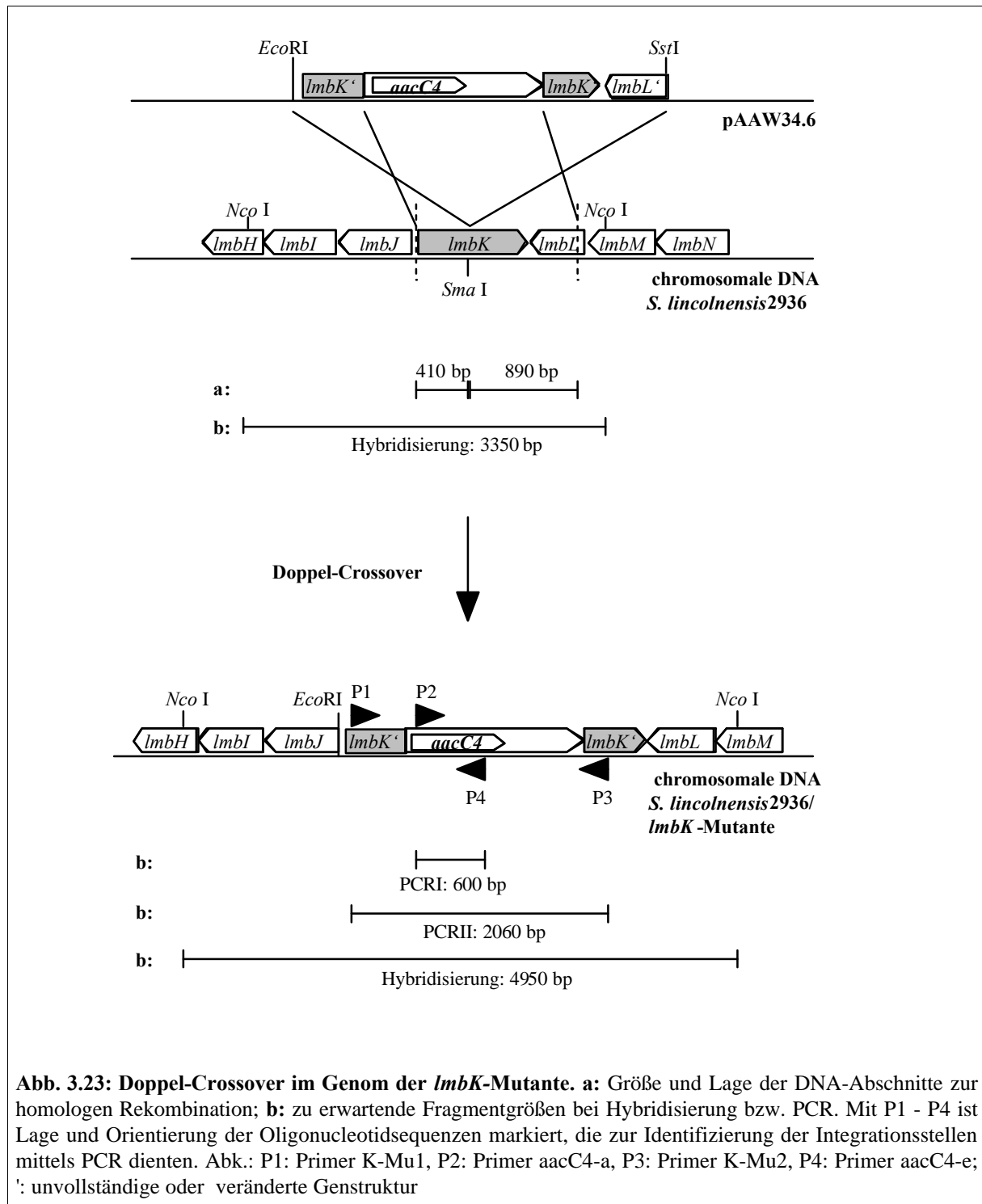
Da Transformanden mit pMHW10 eine dem Wildtyp entsprechende Lincomycin A-Produktion erzielten, konnte davon ausgegangen werden, daß die Mutation keine polaren Effekte auf stromabwärts von *lmbS* liegende Gene verursachte.

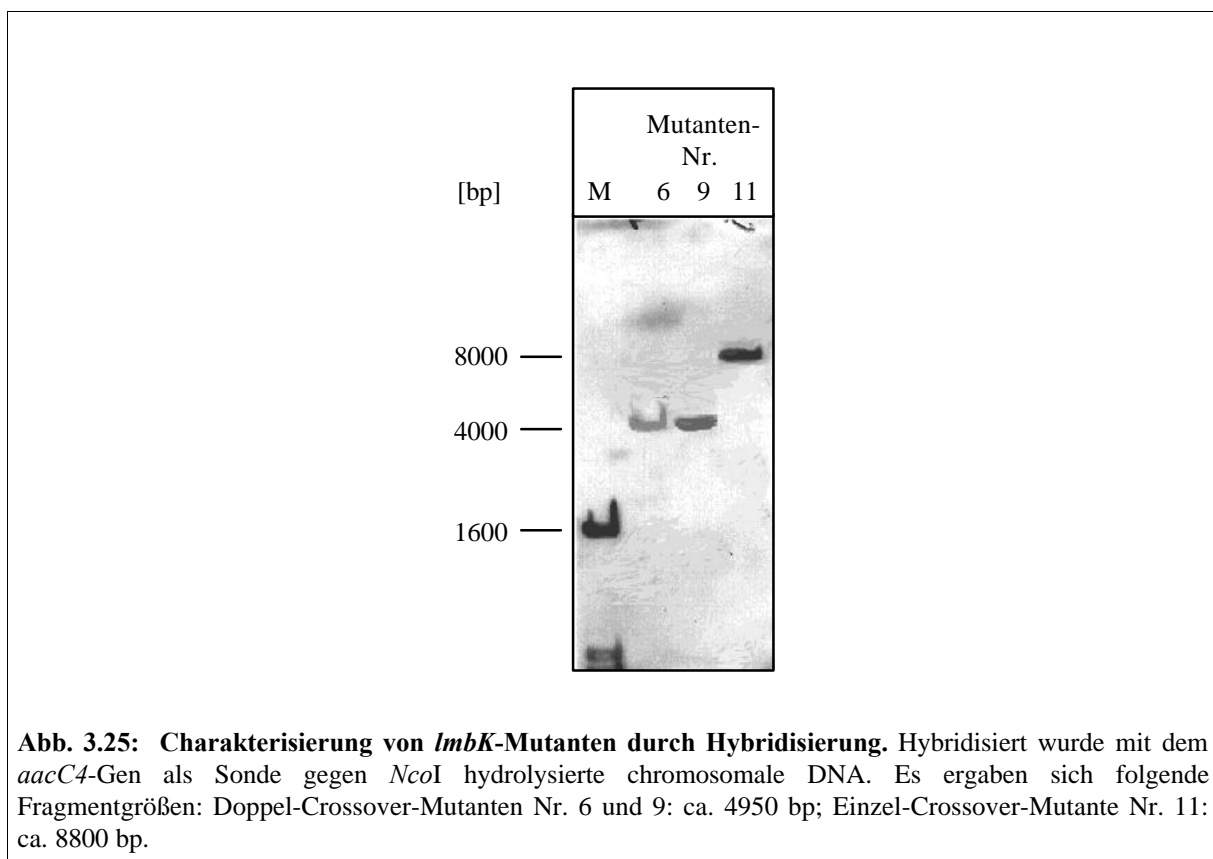
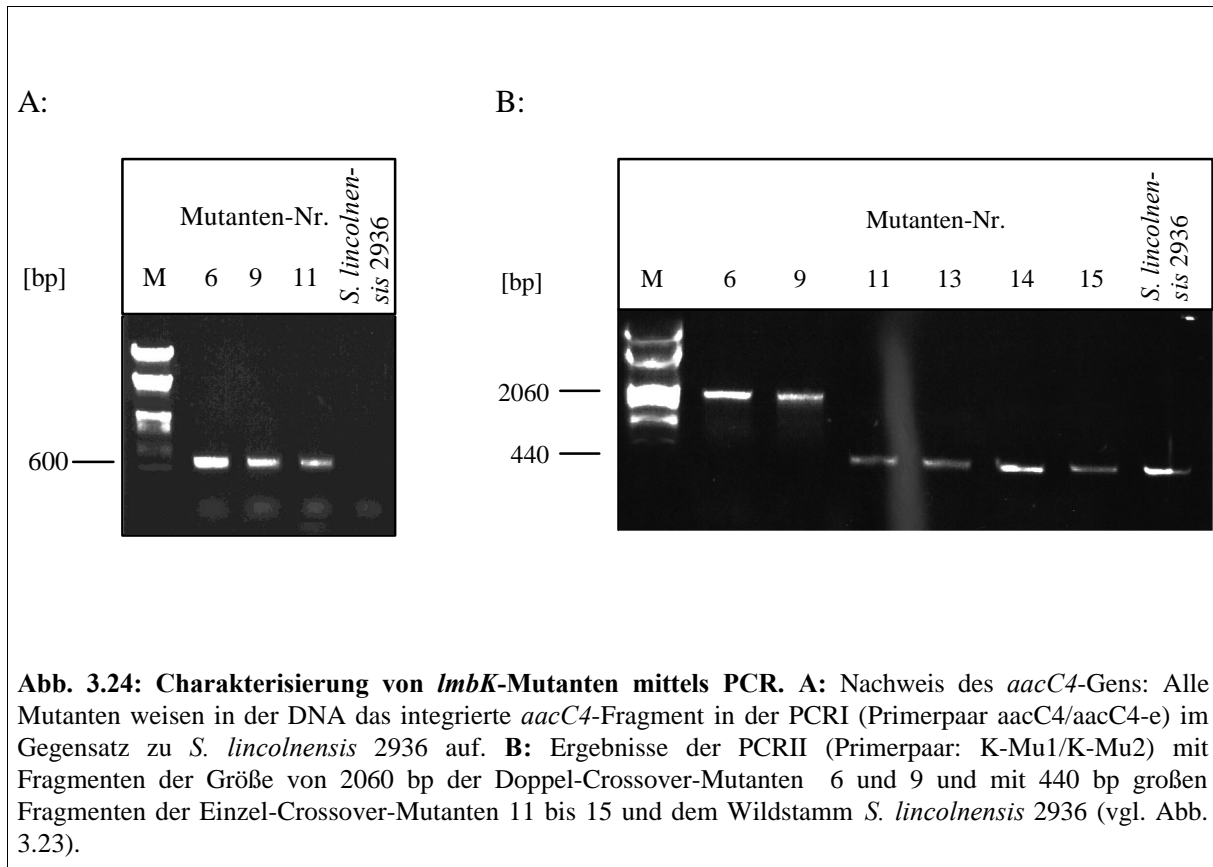
Eine Komplementation mit MTL konnte in beiden Testsystemen nicht erzielt werden.



### 3.3.3 Isolierung, Charakterisierung und Komplementierung von *lmbK*-Mutanten

Zur Erzeugung einer *lmbK*-Mutante wurde das Gen mittels der Apramycin-Resistenzkassette (*aacC4* und Teil eines *IS140*-Fragments) inaktiviert. Die Konstruktion des Mutagenenseplamsides konnte durch eine einfache Insertion der Resistenzkassette erfolgen, da





*lmbK* im Cluster monocistronisch vorliegt und somit keine polaren Effekte zu erwarten waren. Dazu wurde ein 1300 bp großes, *lmbK* und *lmbL* enthaltendes *EcoRI/SstI*-Fragment aus pTU979-1 mit pUCBM21 ligiert, um die *SmaI*-Restriktionsschnittstelle im Polylinker des Vektors zu deletieren. In dem daraus resultierenden rekombinanten Plasmid pAAW34.5 wurde die singuläre *SmaI*-Restriktionsschnittstelle für eine Insertion des 1500 bp großen *SmaI*-Fragments der Apramycin-Resistenz-Kassette (*aacC4*-Gen und Teil des *IS140*-Fragments) aus pEFBA genutzt und pAAW34.6 generiert.

Nichtmethylierte, einzelsträngige pAAW34.6-DNA wurde zur Transformation von *S. lincolnensis* 2936 eingesetzt. Die Mutationsrate lag in diesem Fall mindestens um den Faktor 10 höher als bei der Generierung der *lmbS*-Mutante.

Im Bioassay wiesen alle getesteten *lmbK*-Mutanten einen Verlust der Lincomycin A-Produktion auf. Bei einer Charakterisierung der genomischen DNA mittels PCR wurden zwei Doppel-Crossover-Mutanten (Nr. 6 und Nr. 9) ermittelt (s. Abb. 3.24).

Hybridisiert wurde daraufhin *NcoI* hydrolysierte chromosomale DNA der Mutanten mit dem 600 bp großen *ApaI/KpnI-aacC4*-Fragment. Wie zu erwarten, wiesen die Einzel-Crossover-Mutanten ein 8800 bp großes Fragment und die Doppel-Crossover-Mutanten ein 4900 bp großes Fragment auf (s. Abb. 3.23 und 3.25). Die Komplementation beider Doppel-Crossover-Mutanten Nr. 6 und 9 erfolgte mit den Expressionsplasmiden pAAW14.1, pAAW14.7, pAAW34.11 und pAAW34.12. Da keine bzw. eine nur sehr geringe Lincomycin A-Produktion durch die Plasmide pAAW34.12 und pAAW14.1 erzielt wurden, befand sich offensichtlich kein aktiver Promotor vor dem *lmbK*-Gen. Beide Plasmide enthielten nur ein 60 bp großes Fragment stromaufwärts von *lmbK*. Im Gegensatz dazu lieferten die Plasmide mit größeren Stromaufwärtsbereichen pAAW14.7 (1690 bp) und pAAW34.11 (1890 bp) eine signifikantere Komplementation der Mutante Nr. 9 (s. Tab. 3.7).

**Tabelle 3.7: Komplementation der *lmbK*-negativ Mutanten Nr.6 und Nr.9.** Die Ergebnisse der Hemmhoftests (Nachweis einer Lincomycin A-Produktion) sind im Vergleich zu Negativ- (-)<sup>a</sup> und Positivkontrolle (++++)<sup>a</sup> angegeben.

Mutante/ Komplementationsplasmid	pAAW14.1	pAAW14.7	pAAW34.11	pAAW34.12
Nr. 6	-	+	+	-
Nr. 9	+	++	++	+

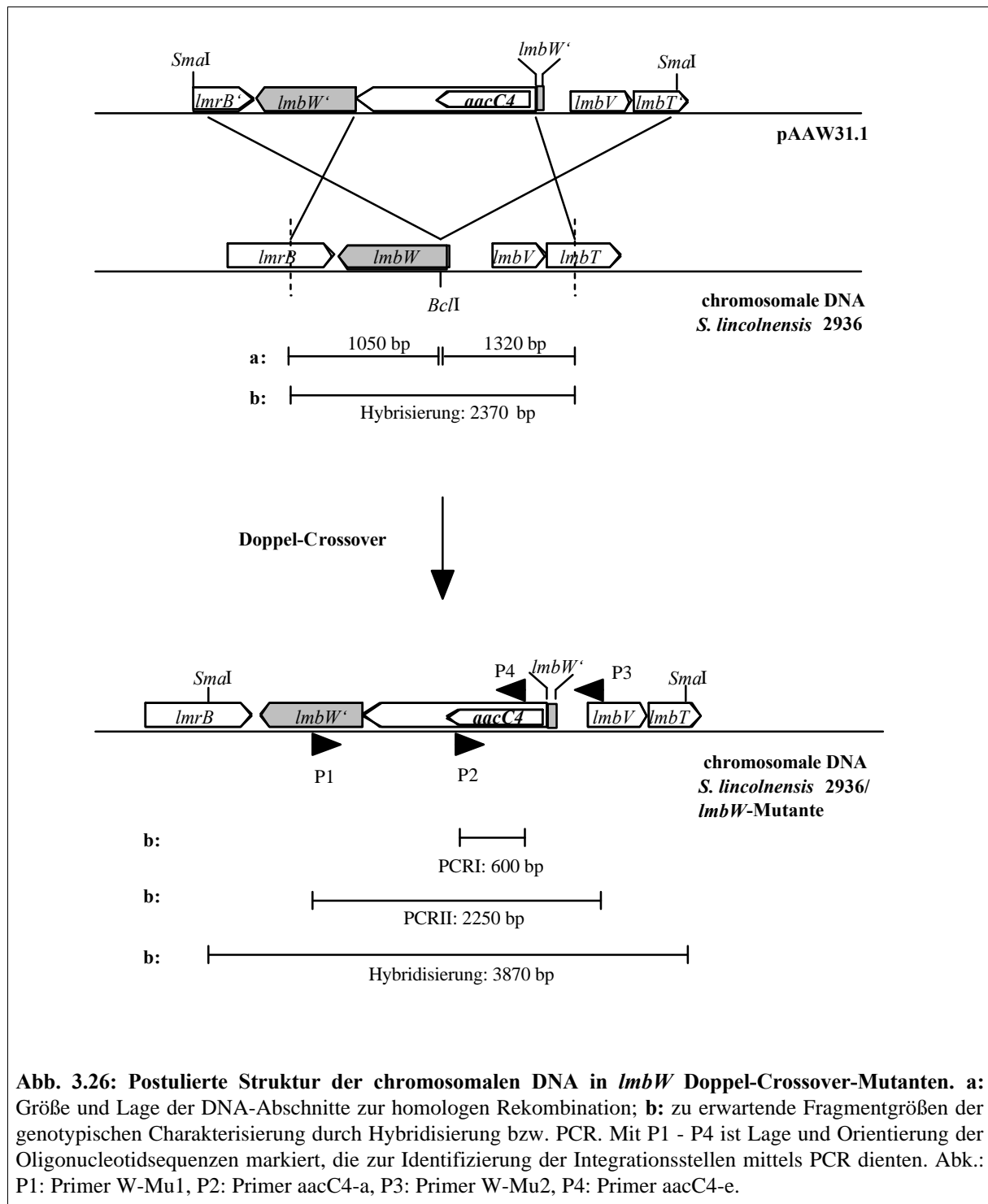
-: keine Hemmhofbildung; +: sehr geringe Hemmhofbildung; ++: mittelmäßige Hemmhofbildung; Anzucht s. 2.8.14.

Nach Komplementierung mittels MTL nach submerser Anzucht zeigten beide Mutanten, wie für die *lmbR*-Mutante bereits beobachtet, nur eine sehr geringe Lincomycin A-Produktion.

### 3.3.4 Isolierung und Charakterisierung von *lmbW*-Mutanten

Die mögliche Beteiligung des *lmbW*-Genprodukts am letzten Schritt der MTL-Biosynthese sollte ebenfalls durch Mutagenese geprüft werden (s. 1.2.2). Dazu wurde ein 2400 bp großes, *lmbW* enthaltendes *Sma*I-Fragment aus pTU979-1 isoliert und in pUC18 kloniert (pAAW29.1). Da *lmbW* ebenfalls monocistronisch vorliegt, konnte die Apramycin-resistenzkassette (s. *lmbK*-Mutante) als 1800 bp-großes *Bam*HI-Fragment in die singuläre *Bgl*II-Restriktionsschnittstelle inseriert werden (pAAW31.1).

Ca. 40 apramycinresistente rekombinante *lmbW*-Mutanten konnten isoliert werden, die alle kein Lincomycin A mehr synthetisierten. Die PCR-Analysen ihrer DNA ergaben ausschließlich Einzel-Crossover-Ereignisse. Um ein zweites Rekombinationsereignis zu forcieren, wurden mehrere Klone vier mal ohne Selektionsdruck in TSB-Medium bei 30°C kultiviert, ausplattiert und die DNA einzelner Kolonien erneut analysiert (Gaisser et al., 1997). Die in der PCRII (Primerpaar: W-Mu1/W-Mu2) erhaltenen Fragmente von 750 bp wiesen ebenfalls nur Einzel-Crossover-Ereignisse nach (s. Abb. 3.26). Die *aacC4*-spezifischen Amplifikate für die Apramycinresistenz konnten in der PCRI (Primerpaar *aacC4-a/aacC4-e*) amplifiziert werden.



## 3.4 Promotoranalyse von MTL-Biosynthesegenen

### 3.4.1 Northern-Blot-Analysen

Eine Identifizierung von Transkriptionseinheiten im Bereich des MTL-Subclusters wurde im ersten Ansatz durch Northern-Blot-Analysen vorgenommen.

Gesamt-RNA des Wildstammes *S. lincolnensis* 2936 und des Überproduktionsstammes *S. lincolnensis* 78-11 wurden aus verschiedenen Wachstumsphasen (18 h, 24 h, 36 h, 48 h, 68 h, 95 h, 112 h) präpariert, um sicherzustellen, daß die entsprechenden mRNA-Moleküle exprimiert wurden. Die submerse Anzucht der Stämme erfolgte in SPMR-Medium, da in diesem Medium die Lincomycin A-Produktion signifikant und reproduzierbar war und mittels HPLC-Analyse detektiert werden konnte (Stühler, 1999). Die in Tabelle 3.8 aufgeführten internen Bereiche aus den zu analysierenden Regionen wurden als Sonden eingesetzt.

**Tabelle 3.8: Sonden zur Northern-Hybridisierung.** Die isolierten und mittels  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP markierten Fragmente wurden zur DNA/RNA-Hybridisierung eingesetzt.

DNA-Bereich <sup>a</sup>	Fragment
<i>lmbN'</i> <i>ML'</i>	ca. 2650 bp Fragment aus pTU979-1
<i>lmbV'</i> <i>TQR'</i>	ca. 3000 bp Fragment aus pTU979-1
<i>lmbV'</i> <i>TQR'</i>	ca. 2800 bp Fragment aus pTU979-1
<i>lmbP</i>	ca. 1000 bp Fragment aus pAAW8.3
<i>lmbS</i>	ca. 1180 bp Fragment aus pAAW35.1
<i>lmbN'</i>	ca. 870 bp Fragment aus pAAW9.2

<sup>a</sup>: Mit einem Strich gekennzeichnete Gene befinden sich nur teilweise auf dem isolierten Fragment.

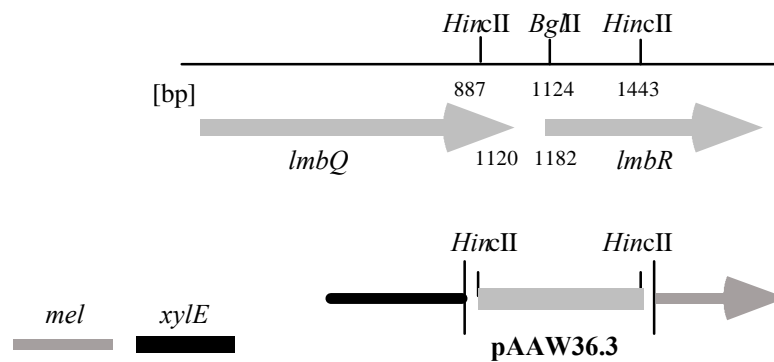
Nur mit der *lmbS*-Sonde konnte in der 68 h Probe der Gesamt-RNA aus *S. lincolnensis* 78-11 ein schwaches Signal mit einer Transkriptlänge von ca. 4500 bp erhalten werden (ohne Abbildung). Da bereits anhand von Expressionsexperimenten ein Promotor vor *lmbN* als wahrscheinlich gilt, könnte die *lmbS*-enthaltende mRNA einem polycistronischen *lmbRSOPZ*-Transkript entsprechen.

### 3.4.2 Nachweis von Promotoren innerhalb des MTL-Biosynthesegenclusters

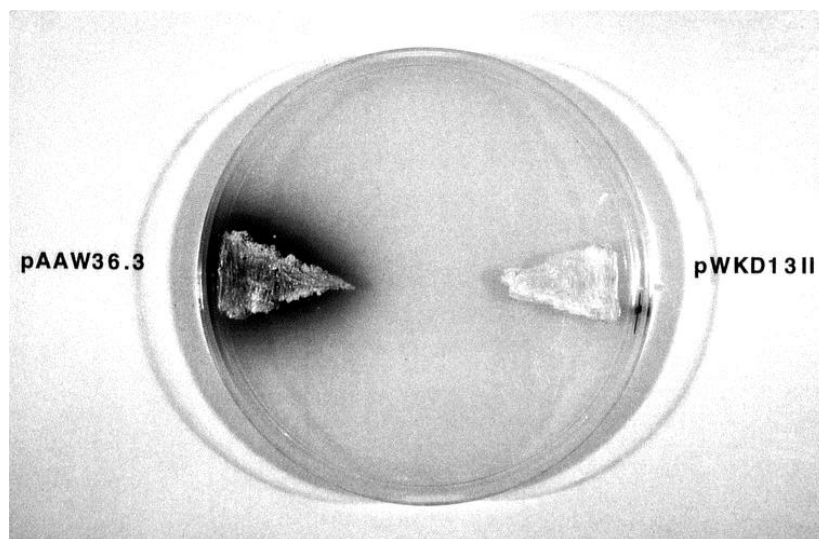
Da sich die RNA aus *S. lincolnensis* als zu instabil erwies, wurde im zweiten Ansatz versucht, Promotoren durch Verwendung von Promotortestvektoren zu kartieren. Für die Identifizierung putativer Promotoren im Bereich des MTL-Biosynthesegenclusters wurden verschiedene Abschnitte der Plasmide pTU979-1 bzw. pAAW14.7 mit dem promotorlosen »single-copy« Plasmid pWKD13 ligiert. Das Plasmid pWKD13 (Retzlaff und Distler, 1993) enthält als Indikatorgene sowohl *melC* (Tyrosinasegen); (Paget et al., 1994) als auch das *xylE* (Catecholdioxygenasegen), deren Startkodons gegenläufig den Polylinker des Vektors flankieren. Die zu untersuchenden DNA-Bereiche wurden über die *EcoRI*- und *BamHI*-Schnittstellen mit pWKD13 fusioniert. Da die beobachteten Promotoraktivitäten sich als gering erwiesen, wurden relevante Bereiche zusätzlich mit Hilfe der analogen »multi-copy« Variante pWKD13II (Retzlaff und Distler, 1993) getestet. Nach Konstruktion der Plasmide (s. Anhänge 1-4) erfolgte eine Transformation in den Wirtstamm *S. lividans* 66 TK23. Die *melC*-abhängige Melaninbildung wurde unter Verwendung von AMT-Platten (Braunfärbung des Mediums) getestet. Für den qualitativen Nachweis von *xylE*-aktiven Fragmenten wurden sporulierte Kolonien mit 0,2 M Brenzkatechin als Substrat überschichtet und auf eine Gelbfärbung getestet. Quantitativ erfolgte eine Aktivitätsbestimmung wie unter 2.9.8 beschrieben. Als Negativkontrollen dienten *S. lividans* TK23/pWKD13 bzw. pWKD13II.

#### 3.4.2.1 Promotor *lmbRp*:

Einen ersten Hinweis auf einen Promotor vor dem *lmbR*-Gen lieferten Northern-Experimente (s. 3.4.1). Zusätzlich befindet sich auf DNA-Ebene vor *lmbR* ein 62 bp langer intercistronischer Bereich, der den potentiellen Promotor enthalten könnte. Der Nachweis einer Melaninproduktion erfolgte mit dem 560 bp *HincII*-Fragment durch pAAW36.3 (Klonierung s. Anhang 1), das einen 230 bp-Bereich stromaufwärts von *lmbR* enthielt (s. Abb. 3.27 und Abb. 3.28).



**Abb. 3.27: Fragment für den Nachweis des *lmbR*-Promotors.** Als Promotortestplasmid diente pWKD13II. Der resultierende Klon wurde mit pAAW36.3 bezeichnet. Das mit einem Pfeil versehene *mel*-Operon kennzeichnet die Promotoraktivität des klonierten Fragments.

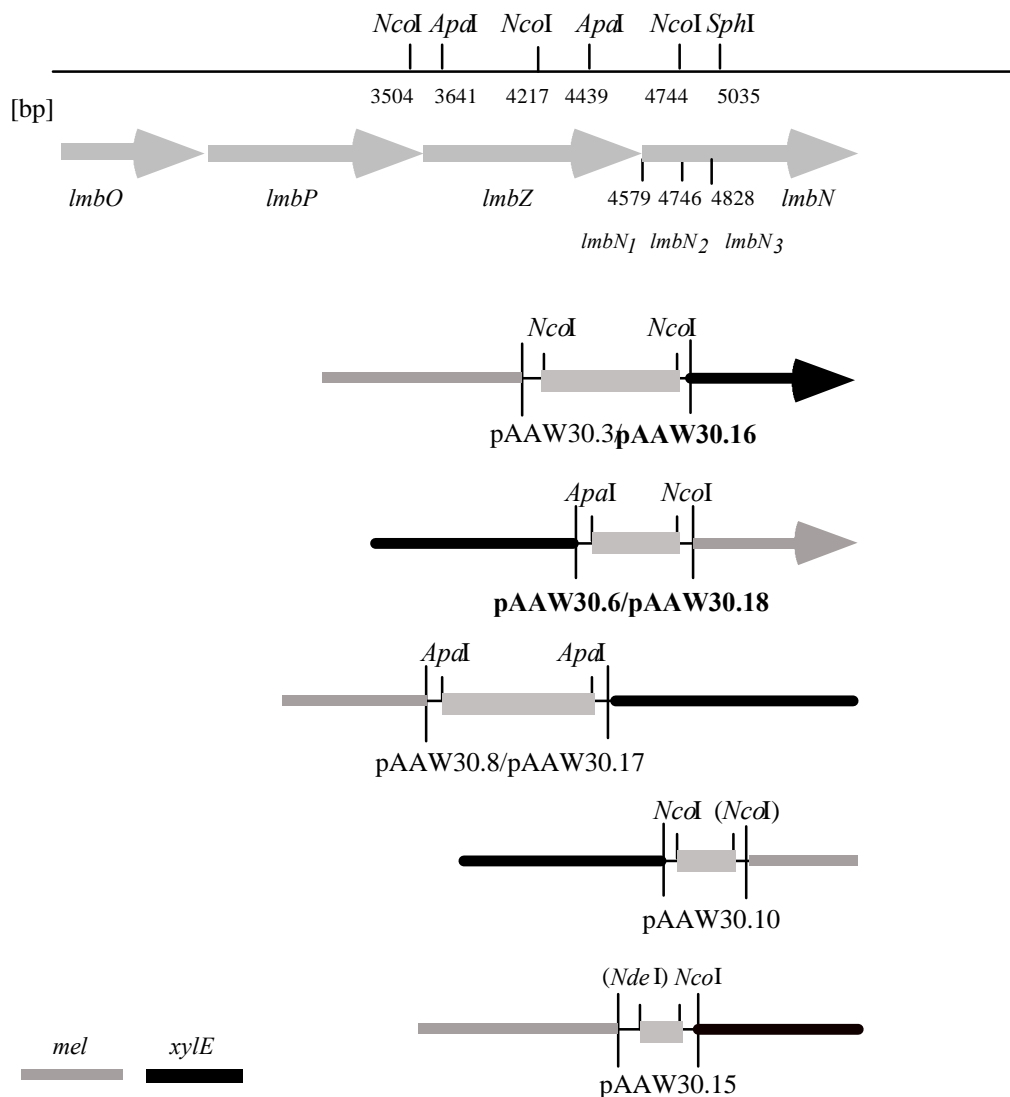


**Abb. 3.28: Melaninproduktion durch *S. lividans* 66 TK23/pAAW36.3 Zellen.** Melanin wurde erstmals nach dreitägigem Wachstum auf AMT-Platten gebildet.

### 3.4.2.2 Promotor *lmbNp*

Bei der Expression von *lmbN* in *S. lividans* 1326 wurde möglicherweise sowohl ein artifizielles LmbN-Protein (31 kDa, His-tag) durch die induzierte *tipAp*-Promotoraktivität als auch das



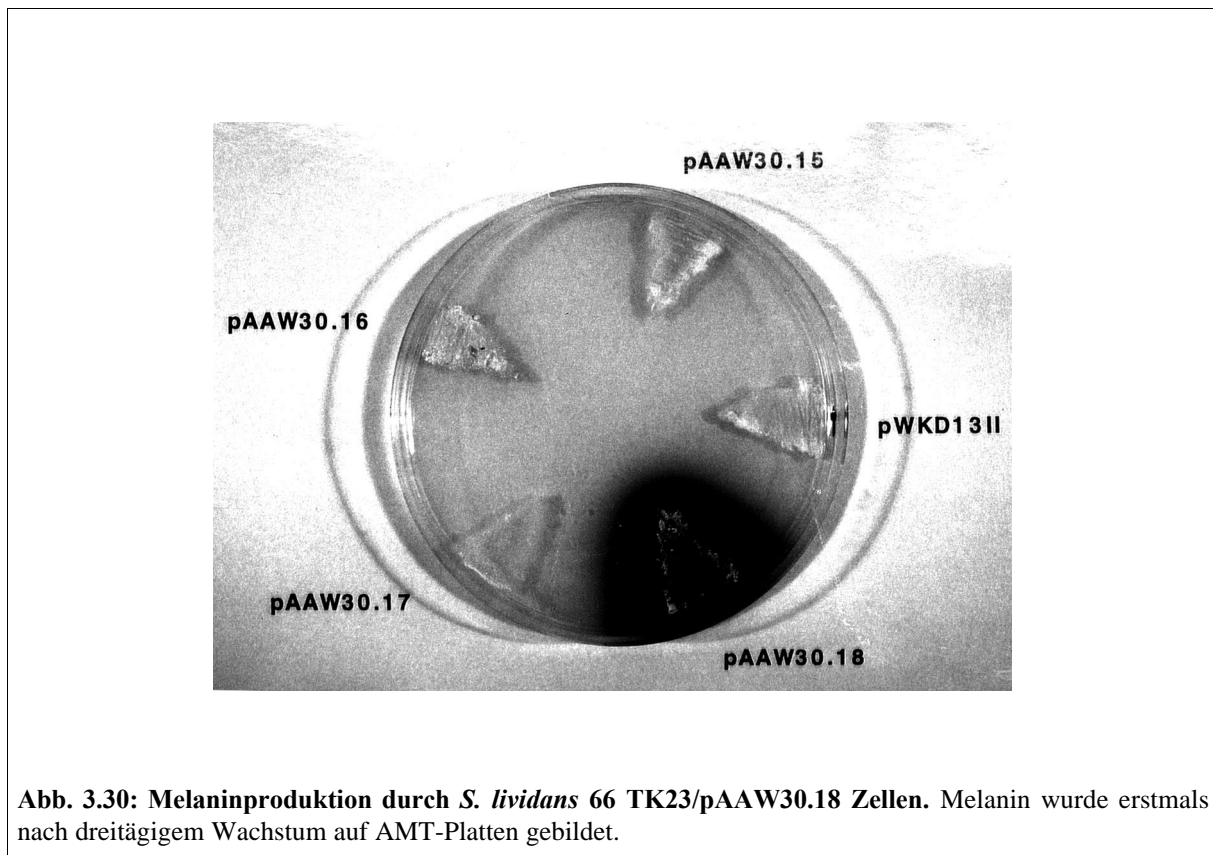


**Abb. 3.29: Fragmente für den Nachweis eines *lmbN*-Promotors.** Es wurden die Promotorrestvektoren pWKD13 und pWKD13II verwendet. Die Pfeile am *mel*- bzw. *xylE*-Bereich kennzeichnen Promotoraktivität. Für fettgedruckte Plasmide konnte eine Promotoraktivität beobachtet werden. Die Positionen der Startpunkte der drei möglichen *lmbN*-Versionen sind angegeben.

natürliche LmbN (22 kDa) durch seinen eigenen Promotor erzeugt (s. 3.2). Die weiteren möglichen Startpunkte von *lmbN<sub>2</sub>* und *lmbN<sub>3</sub>* sind bereits in Abbildung 3.11 dargestellt.

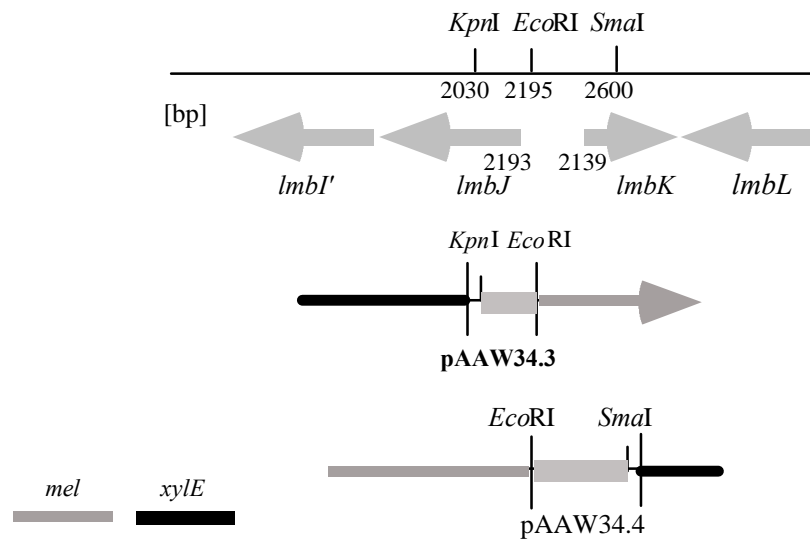
Um den vermuteten Promotor *lmbN<sub>p</sub>* zu kartieren, wurden verschiedene Fragmente sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts des bisher postulierten ursprünglichen Startpunkts in Position 4579, getestet (s. Abb. 3.29). Starke Melaninproduktion wurde für *S. lividans* 66 TK23/pAAW30.6 bzw. pAAW30.18 (Klonierung s. Anhang 2) beobachtet, die ein 305 bp großes *ApaI/NcoI*-Fragment stromaufwärts des putativen Translationsstartpunkts 4746

enthielten (s. Abb. 3.29 und Abb. 3.30). Für einen ähnlichen Bereich (pAAW30.16) konnte eine XylE-Aktivität von 0,06 [nkat/mg Gesamtprotein] nachgewiesen werden. Das DNA-Fragment zwischen den Positionen 4579 bis 4746 wurde aus dem Expressionsplasmid pAAW9.2 durch eine *NdeI/NcoI*-Restriktion erhalten und führte zu pAAW30.15. In den resultierenden Transformanten konnte keine XylE-Produktion beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigte, daß sich innerhalb des 5'-Endes des *lmbN<sub>I</sub>*-Genabschnitts offensichtlich keine Promotorstrukturen befinden. Ebenfalls zeigte ein Fragment, welches den Bereich 190 bp stromabwärts von 4746 beinhaltet (Klon pAAW30.10), keine Promotoraktivität.

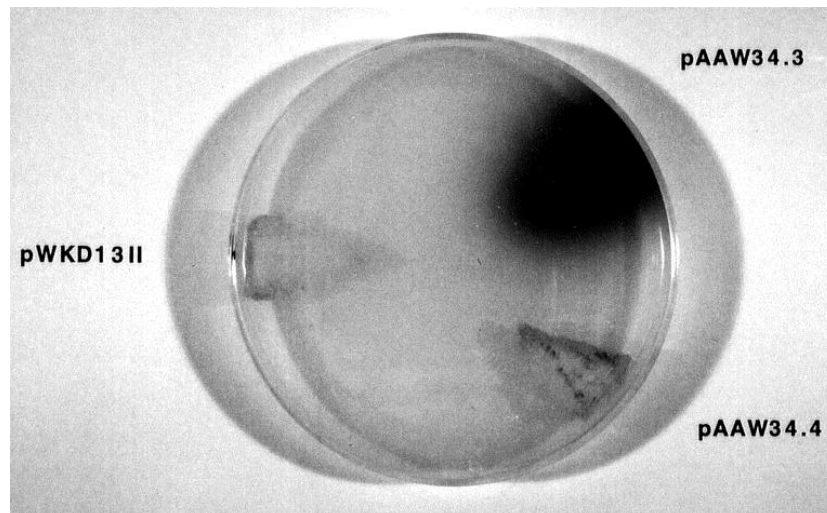


### 3.4.2.3 Promotor *lmbKp*

Da das Gen *lmbK* monocistronisch vorliegt, ist ein eigener Promotor notwendig. Von Interesse war, ob der Promotor vor *lmbK* innerhalb eines Stromaufwärtsbereichs von 56 bp oder weiter entfernt vom *lmbK*-Start lokalisiert ist (s. 3.1.2.4). Dazu wurde jeweils ein Bereich stromaufwärts und stromabwärts der *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle kloniert und auf vorhandene Promotoraktivität getestet (s. Abb. 3.31).



**Abb. 3.31: Fragmente für den Nachweis eines *lmbK*-Promotors.** Es wurde der Promotortestvektor pWKD13II verwendet und resultierende rekombinante Klone mit pAAW34.3 und pAAW34.4 bezeichnet. Das mit einem Pfeil versehene *mel* kennzeichnet eine Promotoraktivität.

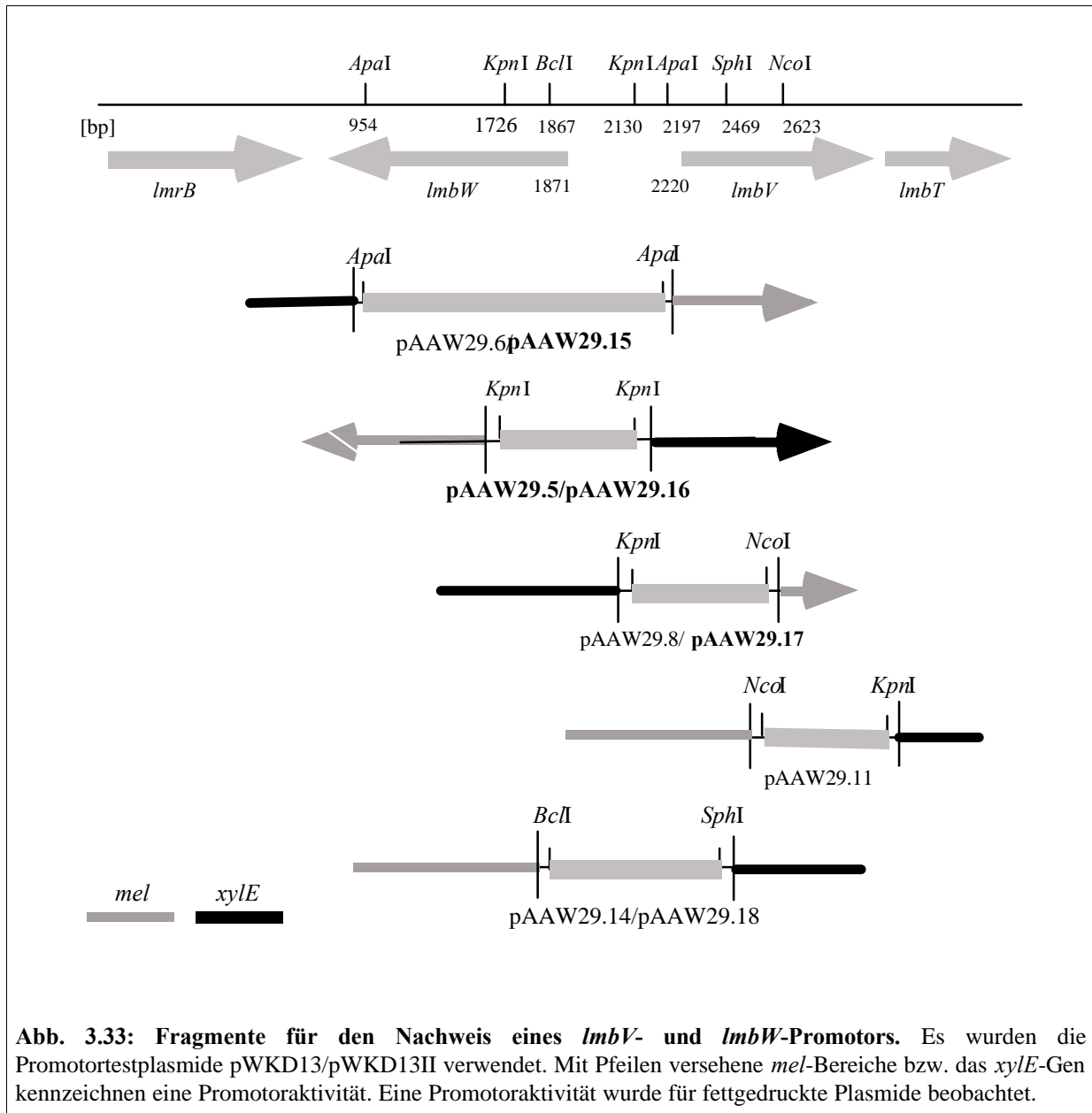


**Abb. 3.32: Melaninproduktion durch *S. lividans* 66 TK23/pAAW34.3 Zellen.** Melanin wurde erstmals nach dreitägigem Wachstum auf AMT-Platten gebildet.

Im Gegensatz zu *S. lividans* 66 TK23/pAAW34.4 konnte auf dem in pAAW34.3 klonierten DNA-Fragment eine Promotoraktivität durch Melaninproduktion nachgewiesen werden (s. Abb. 3.32).

### 3.4.2.4 Promotoren *lmbWp/lmbVp*

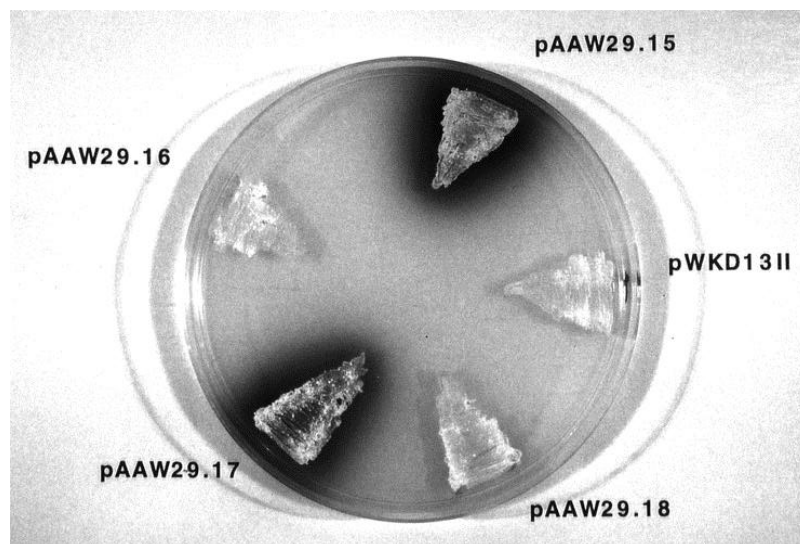
Da *lmbW* und *lmbV* in gegenläufiger Orientierung angeordnet sind, wurde hauptsächlich der intercistronische Bereich auf vorhandene Promotoraktivität für *lmbV* und *lmbW* untersucht.



Nach Klonierung (s. Anhang 4) konnte für *lmbW* innerhalb eines 260 bp-Fragments (Klon pAAW29.5/29.16) eine Promotoraktivität anhand starker Melaninproduktion identifiziert werden (s. Abb. 3.33 und Abb. 3.34). Jedoch zeigten *S. lividans* 66 TK23/pAAW29.6/29.15-Transformanten keine *xylE*-Aktivität für eine ähnliche Region wie in pAAW29.5 enthalten. Ebenso konnte keine XylE-Produktion für einen stromaufwärts, um 500 bp weiterführenden

Bereich mittels eines *KpnI/NcoI*-Fragments (pAAW29.17) nachgewiesen werden. Wahrscheinlich befinden sich alle *lmbW*-Promotorstrukturen innerhalb 260 bp stromaufwärts des Translationsstartpunkts.

Für *lmbV* zeigten drei teilweise, überlappende Fragmente deutliche Melaninproduktion (pAAW29.15/29.17, s. Abb. 3.34) bzw. schwache *xylE*-Aktivität (pAAW29.16). Die quantitative Bestimmung einer XylE-Produktion ergab einen Wert von 0,035 [nkat/mg Gesamtprotein] nach einer Wachstumszeit von 42 h im Vergleich zu *S. lividans* 66 TK23/pWKD13II. Das bedeutet, daß für *lmbV* sowohl im Bereich 90 bp stromaufwärts (pAAW29.17) als auch auf dem zwischen 490 und 90 bp weiter vom Translationsstartpunkt entfernt liegenden *KpnI*-Fragment (pAAW29.16) Promotoren lokalisiert sind.

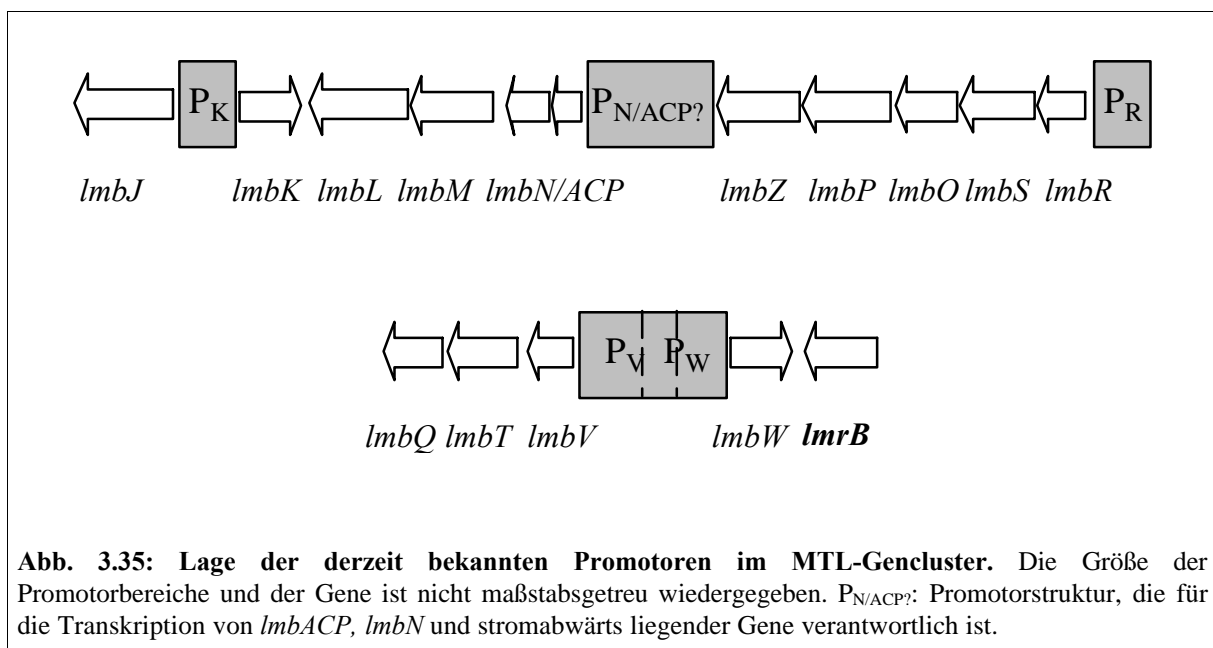


**Abb. 3.34:** Melaninproduktion durch *S. lividans* 66 TK23/pAAW29.15 bzw. pAAW29.17 Zellen. Melanin wurde erstmals nach dreitägigem Wachstum auf AMT-Platten gebildet.

### 3.4.2.5 Zusammenfassende Interpretation der Promortest-Experimente im Bereich des MTL-Genclusters

Der Hochkopienzahlvektor pWKD13II lieferte in den meisten Fällen durch die erhöhte Gendosis eindeutigere Ergebnisse als die »single-copy«-Variante. Für das MTL-Gencluster konnten bisher 5 Promotoren identifiziert werden (s. Abb. 3.35). Insgesamt können sie als schwache Promotoren charakterisiert werden, da zum einen Northern-Blot-Experimente zu nur einem Signal geringer Intensität führten und zum anderen Promotoraktivitäten häufig erst mittels der »multi-copy«-Varianten verschiedener DNA-Abschnitte zu detektieren war. Des Weiteren liegen die gemessenen Xyle-Aktivität für den Promotor *lmbNp* bzw. *lmbVp* mit 0,035 [nkat/mg Gesamtprotein] äußerst niedrig.

Erst kürzlich wurde von Haase postuliert, daß das N-terminale Ende des ursprünglichen 274 AS großen LmbN<sub>1</sub>-Polypeptids möglicherweise für das bisher noch fehlende Acylcarrierprotein (ACP) zur Kondensationsreaktion von PPL und MTL kodiert (pers. Mitteilung). Somit könnte der Promotor stromaufwärts von *lmbN* ebenfalls für die Transkription von *lmbACP* mitverantwortlich sein.



**Abb. 3.35: Lage der derzeit bekannten Promotoren im MTL-Gencluster.** Die Größe der Promotorbereiche und der Gene ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben.  $P_{N/ACP?}$ : Promotorstruktur, die für die Transkription von *lmbACP*, *lmbN* und stromabwärts liegender Gene verantwortlich ist.

Ein weiterer Promotor könnte sich vor *lmbT* befinden, da ein intergenischer Bereich von ca. 60 bp zwischen *lmbV* und *lmbT* existiert. Zusätzlich wurde ein möglicher »inverted repeat« einige Basenpaare stromabwärts des *lmbT*-Starts identifiziert (s. Anhang 5). Ähnlich gestaltet sich die Struktur um den Startpunkt von *lmbM*, wobei der intergenische Bereich ca. 25 bp umfaßt und eine mögliche *rho*-Faktor unabhängige Terminationsstruktur (Richardson, 1993) für das *lmbN*-

Transkript ca. 190 bp stromabwärts des *lmbM*-Starts liegt (s. Anhang 6). Würde sich der Promotor für *lmbM* bestätigen, liegt *lmbN* entweder monocistronisch oder polycistronisch mit *lmbACP* vor.

## 4 Diskussion

Auf Grund immer häufiger auftretender Resistenzen von Krankheitserregern gegen sich im Einsatz befindliche Antibiotika, wird ein teilweiser Ersatz durch neue, antibiotisch wirksame Mittel mit verändertem Wirkprofil dringend notwendig. Die Suche nach solchen Substanzen beschränkt sich nicht nur auf bisher nicht identifizierte Naturstoffe und chemisch modifizierte Antibiotika (z.B.: Clindamycin), sondern wird verstärkt auch im Hinblick auf mögliche Hybridantibiotika durchgeführt. Biokombinatorisch hergestellte Hybridantibiotika stellen nach Maß angefertigte Verbindungen dar, die durch eine Kombination genetischer Elemente zur Verknüpfung von Untereinheiten bzw. Strukturelementen unterschiedlicher Verbindungen führen. Diese neuartigen Molekül besitzen dann möglicherweise ein verändertes Wirkspektrum oder eine bessere Verträglichkeit für den Patienten (Piepersberg, 1994). Dazu eignen sich besonders die Zuckereinheiten, die als NDP-aktivierte Vorstufen an verschiedene Aglyka wie beispielsweise Makrolide, Anthrazykline oder Glycopeptide kondensiert werden (Hutchinson, 1998). Dieser Zielrichtung diene auch vorbereitend die vorliegende Arbeit: Da die bisherigen Erkenntnisse nahelegen, daß die MTL-Einheit über einen NDP-aktivierten Vorläufer entsteht (z. B.: NDP-Lincosamin), könnte man sich zukünftig einen Glycosyltransfer auf andere Aglyka vorstellen. Um Ansatzpunkte für ein solches Verfahren aufzudecken, ist eine detaillierte Kenntnis der Biosynthese unumgänglich. Eine Analyse des bisher nur hypothetisch beschriebenen MTL-Biosyntheseweges stellte daher das primäre Ziel dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden *S. lincolnensis*-Gene, deren Produkte eine entscheidende Rolle innerhalb der putativen MTL-Biosynthese spielen, näher untersucht. Dazu gehörten die Expression der Gene; die Funktionszuweisung durch Nachweis der Enzymaktivitäten, nachdem Substrate auf enzymatischen bzw. chemischen Wege synthetisiert wurden; die Erzeugung von Mutanten und die Untersuchung möglicher Promotoren.

### 4.1 Heterologe Überproduktion von Genen der MTL-Biosynthese

Eine zentrale Bedeutung für alle weiteren Untersuchungen besaß die erfahrungsgemäß problematische heterologe Expression der Streptomyceten-Gene. Daher sollen zunächst die



hierbei gemachten methodischen Erfahrungen eingehend diskutiert werden. Die wichtigsten bekannten oder vermuteten Schwierigkeiten bei heterologer Produktion von Streptomyceten-Enzymen sind Instabilität der Expressionskassetten bzw. der gebildeten mRNA, die korrekte Faltung und/oder die Stabilität der Proteine (Pöhling, 1998).

Um die für die MTL-Biosynthese wichtigen Enzyme LmbR, LmbN, LmbK, LmbP und LmbO möglichst in großer Konzentration, jedoch auch löslich und aktiv zu erhalten, wurden verschiedene Expressionssysteme in *E. coli* und *S. lividans* ausgetestet.

#### **4.1.1 Heterologe Expression der Gene *lmbR*, *lmbN*, *lmbK*, *lmbP* und *lmbO* in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS und *E. coli* JM109**

In ersten Versuchen wurden die Gene *lmbR*, *lmbN*, *lmbK*, *lmbP* und *lmbO* unter Kontrolle des pT7-Expressionssystems in *E. coli* produziert. Dazu wurden die Expressionsvektoren pET11a und pET16b verwendet und dabei jeweils die Produktion von nativem Protein (pET11a) und N-terminal His-tag-verlängertem Protein (pET16b) angestrebt. Zusätzlich kodiert pET16 vor dem ATG für 12 Histidinreste und 8 weitere AS durch eine »leader-Sequenz«. Die Fusion dieses Polypeptids mit dem N-Terminus des zu überproduzierenden Proteins, ermöglicht so eine Aufreinigung des Genprodukts mittels einer Nickel-NT-Agarose (Studier et al., 1990). Als vorteilhaft erweist sich bei den pET-Expressionsvektoren der Terminator  $\phi$  des Phagen T7 als zusätzliches Kontrollelement, da beim Fehlen dieses Elements kein »stem-loop« am 3'-Ende der mRNA ausgebildet werden konnte, der die mRNA Ende vor dem Abbau durch RNasen schützt (Higgins et al., 1993; Klug 1993). Aller Wahrscheinlichkeit nach war das der Grund, warum in einer früheren Arbeit (Schmidt, 1994) unter Verwendung des terminatorlosen pT7-5-Vektors und der RBS des Phagen T5 eine Produktion des Proteins LmbK nicht nachgewiesen werden konnte.

Alle Proteine konnten mindestens mittels eines der beiden pET-Vektoren produziert werden. Bei einer Anzuchttemperatur von 37°C erfolgte in allen Fällen die Ausbildung von unlöslichen Einschlußkörperchen. Zwar konnten bisher keine gemeinsamen Charakteristika der rekombinanten Proteine wie deren Hydrophobizität oder Aufbau der Untereinheiten identifiziert werden, die zur Aggregation der Genprodukte führt (Kane und Hartley, 1988; Wilkinson und Harrison, 1991), jedoch wurden verschiedene empirische Möglichkeiten zur Vermeidung von »inclusion bodies« bereits beschrieben. Eine osmotischen Druckerhöhung mittels nicht verstoffwechselbarer Zuckerezusätze im Medium, Senken der Fermentationstemperatur, eine zeitlich limitierte Induktion der Expression oder Veränderungen im pH-Wert des Mediums können die

Produktion löslichen Proteins steigern (Bowden und Georgiou, 1988; Schein und Noteborn, 1988; Olins und Lee, 1993; Hockney, 1994). Da diese Maßnahmen alle zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit führen, verlangsamt sich ebenso die Translation wie der Proteinfaltungsvorgang. Dadurch können sich offenbar besser Unterstrukturen ausbilden, die die korrekte Faltung oder beispielsweise eine Disulfidbrückenbindung begünstigen (Rudolph und Lilie, 1996).

Für die Expression löslichen LmbR-Proteins konnte eine Optimierung mittels Temperaturerniedrigung unter Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS erfolgreich durchgeführt werden, so daß ca. 50% des heterolog gebildeten Proteins in der löslichen Fraktion nachzuweisen war. Die Produktion von ca. 50% löslichem LmbK mittels des Rhamnose-induzierbaren Expressionssystems pJOE2702, dessen Promotor *rhap* aus dem L-Rhamnose-Operon von *E. coli* stammt (Egan und Schleif, 1993; Volff et al., 1996) und dessen RBS der des pET11a entspricht, zeigte, daß schwächere Promotoren ebenfalls eine positive Auswirkung auf die Bildung aktiven Proteins haben können.

Bei Expressionsversuchen mit *lmbP* und *lmbO* konnte kein erhöhter Anteil löslichen Proteins durch die beschriebenen Maßnahmen erzielt werden. Das weist darauf hin, daß weitere Faktoren für eine heterologe Ausbildung löslichen Proteins verantwortlich sein müssen. So gilt es als wahrscheinlich, daß der GC-Gehalt und die damit verbundene Kodonverwendung der Proteine der unterschiedlichen Organismen eine Rolle spielt. Beispielsweise liegt der GC-Gehalt bei *E. coli*-Genen des *rml*-Clusters in der Regel durchschnittlich zwischen 40 und 50% (Marolda und Valvano, 1995), wohingegen der Wert bei analogen Streptomycetengen um 20 bis 25% höher liegt (Pissowotzki et al., 1991). Des weiteren stellte sich beim Vergleich funktional identischer Proteine aus Enterobakterien und aus Streptomyceten heraus, daß sich die vom extremen GC-Gehalt verursachte Codonverwendung ebenfalls in einer veränderten Aminosäurezusammensetzung bemerkbar macht, z. B. dadurch, daß AT-reiche Lysinreste durch Argininreste ersetzt sind (Wright und Bibb, 1992). Inwieweit jedoch der GC-Gehalt bzw. die Kodonverwendung der jeweiligen Proteine eine Rolle bei der Bildung löslichen Proteins spielt, ist bisher weitgehend ungeklärt. Ein weiterer, wichtiger Ansatzpunkt zur Expression löslichen Proteins, stellt die Co-Expression mit Chaperonen wie beispielsweise GroELS oder DnaK dar. So konnte der Anteil von löslich gebildetem Protein, das zuvor ausschließlich als Einschlußkörperchen produziert wurde, sowohl mit *E. coli*-Chaperonen (Olins und Lee, 1993; Hockney, 1994) als auch mit GroES/EL aus *S. griseus*, wie beispielsweise für die Amidinotransferase StrB1 gezeigt (Pöhling, 1998), erhöht werden. Eine weitere Fusionsmöglichkeit besteht mit Proteinen, die allein bereits in *E. coli* in löslichem Zustand (z. B.: Thioredoxin, Maltose-Bindeprotein) produziert werden konnten (Lavallier et al., 1993;

Makrides, 1996). Wahrscheinlich werden hierbei übergeordnete Strukturen, wie Sekundär- oder Tertiärstrukturen, von Chaperonen erkannt und führen zur korrekten Faltung der Proteine.

#### **4.1.2 Heterologe Expression der Gene *lmbR*, *lmbN*, *lmbP* und *lmbO* in *S. lividans* 66 TK23 bzw. *S. lividans* 66 1326**

Eine Expression der Gene *lmbR*, *lmbN*, *lmbP* und *lmbO* in Streptomyceten wurde notwendig, da LmbP und LmbO in *E. coli*-Wirtsstämmen nicht als lösliche Proteine produziert wurden und da die *in vivo*-Komplementation der knock-out Mutanten mit entsprechenden Expressionsplasmiden in *S. lincolnensis* 2936 beabsichtigt war. Weiterhin bot die heterologe Expression der Streptomyceten-Gene in *S. lividans* den Vorteil, daß es erfahrungsgemäß in der Regel zu keiner Ausbildung von »inclusion-bodies« kommt. Sehr häufig findet dazu der konstitutiv exprimierte Promotor *ermEp* aus *Sa. erythraea* (Bibb et al., 1985) oder der Thiostrepton-induzierbare Promotor *tipAp* aus *S. azureus* (Murakami, 1988) Verwendung. Die signifikante Überproduktion der His-tag-Variante des LmbN-Proteins (*tipAp*) und des LmbP-Proteins (*ermEp*) konnten realisiert werden. Da eine Expression von *lmbO* und *lmbR* lediglich mittels spezifischer Antikörper reproduzierbar detektiert werden konnten (s. Tab. 3.1), kann davon ausgegangen werden, daß in den meisten Fällen eine Expression des Zielgens stattfand, jedoch die Expressionsanalyse durch SDS-PAGE in Kombination mit einer Coomassie-Färbung eine viel zu niedrige Sensitivität besaß. Die heterologe Expression im Streptomycetenwirt findet also häufig nur auf dem Niveau der natürlichen Transkriptions-/Translationsrate statt und kann erst anhand einer Enzymreaktion oder einer auftretenden Resistenz erkannt werden.

## **4.2 Enzymfunktionen postulierter MTL-Enzyme**

### **4.2.1 LmbR: Transaldolase oder Aldolase?**

Eine zunächst postulierte, Pentosephosphatweg-analoge Transaldolasereaktion (TAL-Reaktion) bzw. eine Aldolasereaktion (AL-Reaktion), katalysiert durch LmbR, schien die Möglichkeit zu eröffnen im ersten Schritt mittels der C-C-Knüpfung eine Kettenverlängerung des C5-Zuckers um eine C3-Einheit zu erklären (s. Abb. 1.3). Obwohl keine der beiden Enzymaktivitäten für LmbR nachgewiesen werden konnte, scheint es sich bei LmbR um ein biosynthetisches Enzym und nicht wie zunächst von Peschke et al. (1995) postuliert um ein Regulatorprotein zu handeln.

Dies machen zum einen binäre Sequenzvergleiche (s. Tab. 4.1), in denen LmbR zu dem positiven Regulator OrfU/RsbU (regulator sigma B); (Mitchell et al., 1992; Wise und Price, 1995; Akbar et al., 1997) nur 23% Identität besitzt, und zum anderen das in LmbR existierende TAF (transaldolase family)-Sequenzmotiv deutlich (s. 1.2.3). Des weiteren stimmen die Proteinlängen der ALs MipB und TalC (Blattner et al., 1993) aus *E. coli* mit LmbR überein (ca. 220 bp; s. Abb. 4.1). Beide Tatsachen deuten auf eine etwaige Verwandtschaft hin. MipB und TalC sind zu 70% miteinander identisch, was eine Isoenzymfunktion vermuten läßt.

**Tabelle 4.1: Binärer Vergleich von TAL-, AL-Mitgliedern und OrfU.** Die Identität ist in Prozent angegeben. Folgende Abkürzungen und Referenzen wurden für die publizierten Sequenzen verwendet: LmbR aus *S. lincolnensis* (acc. S44966); OrfU der spoOF-Region aus *Bacillus subtilis* (acc. P19669); TalB aus *E. coli* (acc. P30148), TalC (orf f220) aus *E. coli* (acc. P32669), MipB aus *E. coli* (acc. D88188); Fructose-1,6-bisphosphataldolase Fda aus *S. galbus* (acc. AJ131707) und Tal aus *Methanococcus janaschii* (acc. Q58370). Die Werte in Klammern kennzeichnen die Anzahl der Aminosäurereste der Proteine.

	LmbR (Slin) <sup>a</sup> (220)	OrfU (Bsu) (186)	TalB (Eco) (317)	TalC (Eco) (220)	MipB (Eco) (220)	Fda (Sgal) (340)
Tal (Mjan) <sup>a</sup> (217)	31,4	44,5	24,2	35,4	32,7	13,2
LmbR (Slin) (220)		23,5	17,3	28,0	27,6	14,7
OrfU (Bsu) (186)			19,5	28,0	26,4	14,1
TalB (Eco) (317)				26,0	27,7	15,1
TalC (Eco) (220)					70,0	12,3
MipB (Eco) (220)						16,4

<sup>a</sup>: die Abkürzung in Klammern bezieht sich auf den Herkunftsorganismus (s. Legende)

S.linc-LmbR	VKIFLDTPDLSVVEQWLPHGIVDGVTTNPTLLRKSIEDWTGTVGVLARR	50
E.coli-MipB	MELYLDTSDDVAVKALSRIFFLAGVTTNPSII-AAGKKPLDVVLPQLHEA	49
E.coli-TalC	MELYLDTANVAEVERLARIFPIAGVTTNPSII-AASKESIWEVLPRLQKA	49
	. . .***. . . * . . .*****. . . . . . . . . . . *	
S.linc-LmbR	IAPRD-LSVQVSGVDHDD-VSQAKMLASRGENIVIKVPVISPDRPHLDV	98
E.coli-MipB	MGGQGRLEFAQVMATTAEGMVNDALKLRSIIADIVVKVPVTAEG----LAA	95
E.coli-TalC	IGDEGILFAQTMSRDAQGMVEEAKRLRDAIPGIVVKIPVTSEG----LAA	95
	. . . * * . . . *	
S.linc-LmbR	MTTLREYGIIPVNATACLSAGQALAAKAGVRYASLLWGRVGDGEGCPESV	148
E.coli-MipB	IKMLKAEGIPTLGTAVYGAAQGLLSALAGAEYVAPYVNRIDAQGGSGIQT	145
E.coli-TalC	IKILKKEGITTTLGTAVYSAAQGLLAALAGAKYVAPYVNRVDAQGGDGIRT	145
	. * . ** . ** . * . * * * * * . * . . * . * . * . *	
S.linc-LmbR	VADITGLLRRHGMTAQLLVGSRAPADITRGLTAGADAVTVPPALLARWL	198
E.coli-MipB	VTDLHQLLKMHAPQAKVLAASFKTTPRQALDCLLAGCESITLPLDVAQQMI	195
E.coli-TalB	VQELQTLLEMHAPESMVLAAASFKTTPRQALDCLLAGCESITLPLDVAQQML	195
	* . . ** * . . . * * * . . . * * * . . . * * * . . . * . . .	
S.linc-LmbR	DHHYARATVRDFQADAGVKY---E-	219
E.coli-MipB	SYPAVDAAVAKFEQDWQGAFGRTS-	219
E.coli-TalC	NTPAVESAIEKFEHDWNAAFGTTHL	220
	. . . * . * . . .	

**Abb. 4.1: Vergleich der Primärstrukturen des LmbR-Proteins (219 AS) mit den *E. coli* Proteinen MipB (219 AS) und TalC (220 AS).** Identische AS sind mit einem Stern, konservative Aminosäureaustauschen mit einem Punkt gekennzeichnet. Grau unterlegte Bereiche stellen konservierte Sequenzmotive dar. Der fettgedruckte Lysinrest in Position 84 für LmbR entspricht dem in Aldolasen für die Ausbildung der Schiff'schen Base verantwortlichen K.

### Unterteilung der Aldolasen

Tsolas und Horecker (1972) wiesen nach, daß der Reaktionsmechanismus der Klasse-I-ALs (AL-I) mit dem der TALs verwandt ist und ebenfalls über die Bildung einer Schiff'schen Base an einem Lysinrest im aktiven Zentrum abläuft. Ein Vergleich der Struktur der TAL mit der Struktur der Fructose-Bisphosphat-AL (FBP-AL) führte zu der Schlußfolgerung, daß höchstwahrscheinlich die TAL als ein Produkt einer zirkulären Permutation eines AL-Gens anzusehen ist (Jia et al., 1996; Lindquist und Schneider, 1997; Schörken et al., 1998).

Typischerweise katalysieren ALs eine reversible Aldolkondensation, die einer stereospezifischen Addition eines Donorketons an ein Akzeptoraldehyd entspricht. Bisher wurden mehr als 30 ALs identifiziert, gereinigt und näher untersucht (Takayama et al., 1997). Mechanistisch können zwei Klassen unterschieden werden (Dreyer und Schulz, 1996):

(1) TypI-AL bildet ein Schiff'sche Base-Zwischenprodukt der aktiven AS mit dem Donorsubstrat, das stereospezifisch an den Akzeptor gebunden wird. Sie kommen

hauptsächlich in höheren Lebewesen vor, wobei jedoch auch für einige Bakterien wie *E. coli* (Baldwin und Perham, 1978) *Staphylococcus carnosus* (Witke und Götz, 1993) und *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko et al., 1996) dieser Mechanismus nachgewiesen werden konnte.

(2) Die TypII-AL (AL-II) hingegen nutzt  $Zn^{2+}$  als Cofaktor.  $Zn^{2+}$  agiert hierbei als Lewis-Säure im aktiven Zentrum und wird durch hochkonservierte Histidinreste des Enzyms komplexiert. Das zweiwertige Kation dient dabei der Stabilisierung der Intermediate während der Reaktion. ALs des TypsII wurden bisher ausschließlich in Bakterien und Pilzen identifiziert und weisen eine extrem hohe Übereinstimmung in ihrer Primärstruktur auf.

Prinzipiell existiert keine signifikante Homologie zwischen beiden Enzymklassen, was auf eine getrennte Entwicklung schließen läßt. *E. coli* ist der einzige Organismus, in dem bisher beide Enzymtypen identifiziert wurden (16% Identität), wobei die Identität von DhnA (AL-I) mit eukaryotischen AL-I mit 17 bis 28% ebenfalls zu gering ausfällt, um signifikant zu sein. Wie Thompson et al. (1997) weiterhin zeigten, wird *dhnA* nur nach Induktion durch Substrate der Gluconeogenese exprimiert und übernimmt unter diesen Bedingungen ca. 60% der Enzymleistung, wohingegen die *E. coli* FBP-AL vom TypII konstitutiv produziert wird. Ein gemeinsames Merkmal zwischen beiden Enzymtypen stellt jedoch eine Primärstrukturlänge von ca. 350 AS dar.

Eine andere Unterteilung der ALs kann in Bezug auf ihre Substratabhängigkeit, in Pyruvat/Phosphoenolpyruvat-, Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)-, 2-Desoxyribose-5-phosphat-, oder Glycin-abhängige ALs, vorgenommen werden.

Unter den Pyruvat/Phosphoenolpyruvat-abhängigen ALs befindet sich die 3-Desoxy-D-manno-2-Octulosonat-8-phosphat Synthase, die als Phospho-2-keto-3-desoxyoctonoat (KDO-8-P) Synthetase bezeichnet wird und, ähnlich der postulierten LmbR-Reaktion, einen C8-Körper aufbaut (Takayama et al., 1997). Dieses Enzym katalysiert die irreversible Aldolreaktion von Pyruvat mit D-Arabinose-5-phosphat zu KDO-8-P, das ein Intermediat in der Biosynthese der Lipopolysaccharide (LPS) von Gram-negativen Bakterien darstellt. Entgegen älteren Ergebnissen, in denen dieser AL-Typ eine hohe Substratspezifität besaß (Taetz und Dowhan, 1990), zeigten neuere Untersuchungen der KDOP-Synthase aus *Neisseria gonorrhoeae*, daß diese ein wesentlich breiteres Substratspektrum aufweist, beispielsweise E-4-P neben Arabinose-5-phosphat akzeptiert, und die Kondensation über einen irreversiblen, nicht AL-typischen Mechanismus verläuft (Subramaniam, et al., 1998). Zudem scheinen KDOP-Synthasen in der Natur weiter verbreitet als bisher angenommen, da sie bereits in höheren Pflanzen nachgewiesen werden konnten.

### Einordnung des Proteins LmbR

TALs aus taxonomisch weit entfernten, sowohl eukaryotischen als auch prokaryotischen Organismen wie *Hefe*, *Kluyveromyces lactis*, *E. coli* und Mensch zeigten untereinander eine erstaunlich hohe Identität von ca. 55% (Sprenger et al., 1995). Vergleicht man jedoch die Primärsequenz von LmbR mit einer authentischen TAL wie beispielsweise TalB aus *E. coli* (Yura et al., 1992), ergibt sich eine wesentlich niedrigere Verwandtschaft (17% Identität); (s. Tab. 4.1).

LmbR weist wie MipB und TalC den hoch konservierten, in das Sequenzmotiv »IVvKvPV« eingebetteten, Lysinrest in Position 86 (für TalC und MipB Position 85) auf (s. Abb. 4.1), wie er typischerweise bei ALs-I in Position 236 zu finden ist. Jedoch entspricht die Differenz der Position des Lysinrestes von 150 AS in etwa der Differenz der Proteinlängen. Möglicherweise entstanden die drei Proteine durch eine N-terminale Verkürzung und bilden eine neue Enzymunterklasse. Auf Grund der bisher genannten Merkmale, liegt die Vermutung nahe, daß LmbR eine MipB/TalC-ähnliche Reaktion katalysieren könnte. Für MipB konnte nachgewiesen werden, daß aufgereinigtes Protein keinerlei TAL-Funktion besaß, statt dessen eine reversible Kondensation von DHA mit G-3-P zu F-6-P, also eine Aldolasereaktion, katalysierte (G. Sprenger, pers. Mitteilung).

LmbR besitzt zwar sechs Histidinreste über seine gesamte Primärstruktur verteilt, jedoch nicht an Positionen 92, 94 und 155, wie für den Zink-katalysierten Mechanismus gefordert (Dreyer und Schulz, 1996). Des weiteren fehlen FBP-II typische, hochkonservierte Bereiche völlig und die Sequenzidentität zu Fda aus *S. galbus* liegt mit 14,7% bei einem für die FBP-II Familie wahrscheinlich insignifikanten Wert (s. Tab. 4.1). Die aufgeführten LmbR-Merkmale weisen darauf hin, daß das Protein eher dem TypI ähnelt. Beide Enzymtypen sind relativ spezifisch gegenüber dem Donorsubstrat, zeigen jedoch relaxierte Spezifität gegenüber dem Akzeptorsubstrat.

TALs, ALs, sowie andere C-C-bindungsknüpfende Enzyme, zeigen zumeist eine sehr hohe Enantioselektivität. Von den C3-Gruppen übertragenden Enzymen werden in der Regel Produkte mit einer 3S, 4R Konfiguration gebildet (Moradian und Benner, 1992), was hier zu einer *gluco*-Konfiguration der Octose führen würde. Dies steht im Gegensatz zu dem geforderten Produkt einer *galacto*-Konfiguration der Octulose bzw. der Octose, die als Substrat für eine der nachfolgenden Reaktionen, der Phosphorylierung an C1, postuliert wurde (s. 1.2.2).

### Weitere mögliche LmbR-Enzymfunktionen

Verschiedene Enzymtests, die eine TAL- bzw. AL- Aktivität nachweisen sollten (s. Tab. 4.2), verliefen negativ.

**Tabelle 4.2: Übersicht zu den durchgeführten Enzymtests zum Nachweis einer TAL- bzw. AL-Enzymaktivität von LmbR.** Die Tests A, B und C sind unter 2.11.1, die Tests D und E unter 2.11.2 beschrieben.

TAL-Enzymtests <sup>a</sup>	AL-Enzymtests
A: R-5-P + E-4-P → ... → O-8-P + ...	D: F-6-P → DHA + G-3-P
B: HP + R-5-P → ... → O-8-P + ...	E: R-5-P + DHA → O-8-P
C: S-7-P + R-5-P ↔ O-8-P + E-4-P	

<sup>a</sup>: Die Punkte entsprechen nicht aufgeführten Zwischenschritten bzw. weiteren Produkten

Mögliche Erklärungen für das Scheitern der Funktionsnachweise könnten sein, daß (1) die zur postulierten TAL-Reaktion konkurrierenden Primärstoffwechselreaktionen das Substrat verbrauchen oder andere Substratspektren für (2) die TAL-Reaktion, bzw. (3) die AL-Reaktion in Frage kommen.

(1) Obwohl eine (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Behandlung eines Proteins eine sehr schonende Anreicherung eines nativen Proteins darstellt (Englard und Seifter, 1990), wäre es trotz allem denkbar, daß während des Zellaufschlusses oder während der Reinigungsschritte wie Ausfällen, wieder in Lösung bringen bzw. Entsalzen, LmbR inaktiviert wurde.

Eine andere Möglichkeit einen TAL-Enzymtest ohne konkurrierende Primärstoffwechselreaktion durchzuführen, würde durch die Verwendung eines TAL-negativen Wirtsstammes zur heterologen Expression eröffnet. Da jedoch nahezu alle Primärstoffwechsellzyme Isoenzyme besitzen, wie es beispielsweise für die Transketolaseenzyme TktA und TktB aus *E. coli* der Fall ist, gestaltet sich der Nachweis dieser Mutanten schwierig (Iida et al, 1993; Sprenger, 1993; Sprenger, 1995). Eine *E. coli*-TAL-negativ Mutante wurde bisher nicht beschrieben, hingegen konnte eine Hefe-TAL-Verlust-Mutante identifiziert werden, die S-7-P anreichert (Schaff et al., 1990), so daß das für die LmbR-TAL-Reaktion notwendige Substrat S-7-P zusätzlich in ausreichenden Mengen verfügbar wäre. Des weiteren könnte eine Expression des *lmbR*-Gens in einem TAL-negativen Bakterium wie *Zymomonas mobilis* (Feldmann et al., 1992) zur Ausbildung der Zielaktivität ohne TAL-Hintergrundaktivität führen (Zhang et al., 1995).

(2) Allgemein besitzen sowohl eukaryotische als auch prokaryotische TALs nur einen geringen Spielraum bezüglich ihrer Akzeptor- und Donorsubstrate, die von ihren physiologischen



Substraten abweichen. Beispielsweise wird TalB aus *E. coli* kompetitiv durch Zucker in der L-Konfiguration gehemmt, wie es für L-Arabinose-5-phosphat und L-Glycerinaldehyd bereits nachgewiesen wurde (Sprenger et al, 1995). Falls ein anderer Zucker als R-5-P als Akzeptorsubstrat für die TAL-Reaktion fungieren sollte, würde das das negative Ergebnis des TAL-Funktionsnachweises u. a. ebenfalls erklären.

(3) Weiterhin wäre es denkbar, daß *lmbR* für eine DHAP-abhängige AL kodiert. In Streptomyceten ist jedoch über DAHP-Synthesen nahezu nichts bekannt. Lediglich aus *S. coelicolor* A3(2) wurde sie isoliert und analysiert (Walker et al, 1996). Der Einsatz dieser AL-Klasse erfolgt zu synthetischen Zwecken einer C-C-Knüpfung (Dreyer und Schulz, 1996), wobei durch Racker und Schroeder (1957) O-8-P aus R-5-P und F-6-P synthetisiert werden konnte. Da das Substratspektrum bezüglich des Donorsubstrates DHAP relativ spezifisch ist, hätte die getestete Reaktion von DHA mit R-5-P durch LmbR nicht stattfinden können. Durrwachter et al. (1986) zeigten, daß eine Reaktion von DHA mit einem Phosphatderivat eines Akzeptoraldehyds nur dann durch FBP-AL katalysiert wurde, wenn zum Reaktionsansatz Arsenat oder Vanadat gegeben wurde. Die in Lösung spontan gebildeten Vanadat- bzw. Arsenatester wurden daraufhin vom Enzym als Phosphatanaloga akzeptiert (Lagunas und Sols, 1968). Das daraufhin in einer analogen Reaktion mit LmbR entstehende Produkt Octulose-1,8-bisphosphat würde eine phosphorylierende Reaktion, wie sie für LmbP postuliert wurde, überflüssig machen (s. unten).

### **LmbR-Mutante**

Obwohl im phänotypischen Erscheinungsbild der LmbR-negativen Mutante kein Lincomycin A mehr nachzuweisen war, kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß LmbR allein dafür verantwortlich zu machen ist. Der Grund dafür ist in der Konstruktionsweise der Mutante zu suchen, da es sich hierbei nicht um eine »in-frame« Substitution durch das *aacC4*-Gen handelte. Dadurch können polare Effekte auf stromabwärts liegende Gene nicht ausgeschlossen werden. Diese Effekte würden nach bisherigen Erkenntnissen die Gene *lmbS,O,P,Z* beeinflussen, da der stromabwärts nächste, bisher identifizierte Promotor im Bereich vor *lmbN* lokalisiert wurde. Daß aller Wahrscheinlichkeit nach eine Beeinflussung der *lmbR*-stromabwärts folgenden Gene durch diese Mutation stattfand, schien durch die fehlende phänotypische Komplementation einer Lincomycin A-Produktion mittels verschiedener Komplementationsplasmide, die ausschließlich für *lmbR* kodierten, bestätigt. Dieser negative Effekt wäre ausschließlich mit der Konstruktion einer »in-frame«-Deletionsmutante bzw. -Substitutionsmutante zu minimieren.

### Vorschläge zum weiteren Vorgehen

Aus den diskutierten Einzelheiten lassen sich folgende Vorschläge zur Klärung des entscheidenden, einleitenden Schritts ableiten:

1. Es sollte eine in-frame knock-out Mutante des *lmbR* Gens einen klaren MTL-negativen Phänotyp aufweisen und eine Substanz anhäufen, die dem C8-Vorläufermolekül entspricht.
2. Das LmbR-Enzym sollte aus einer größeren Zellmenge eines überproduzierenden Expressionsstammes aufgereinigt werden.
3. Der postulierte Mechanismus sollte daraufhin *in vitro* nachweisbar oder ausschließbar sein.
4. Das postulierte Produkt, und ebenso der nachfolgend durch Isomerisierung entstehende Zucker (s. unten), sollten synthetisch bzw. enzymatisch hergestellt werden und in Rückreaktionen durch LmbR ( $\pm$  LmbN) als Substrate dienen.

### 4.2.2 Die Isomerase LmbN

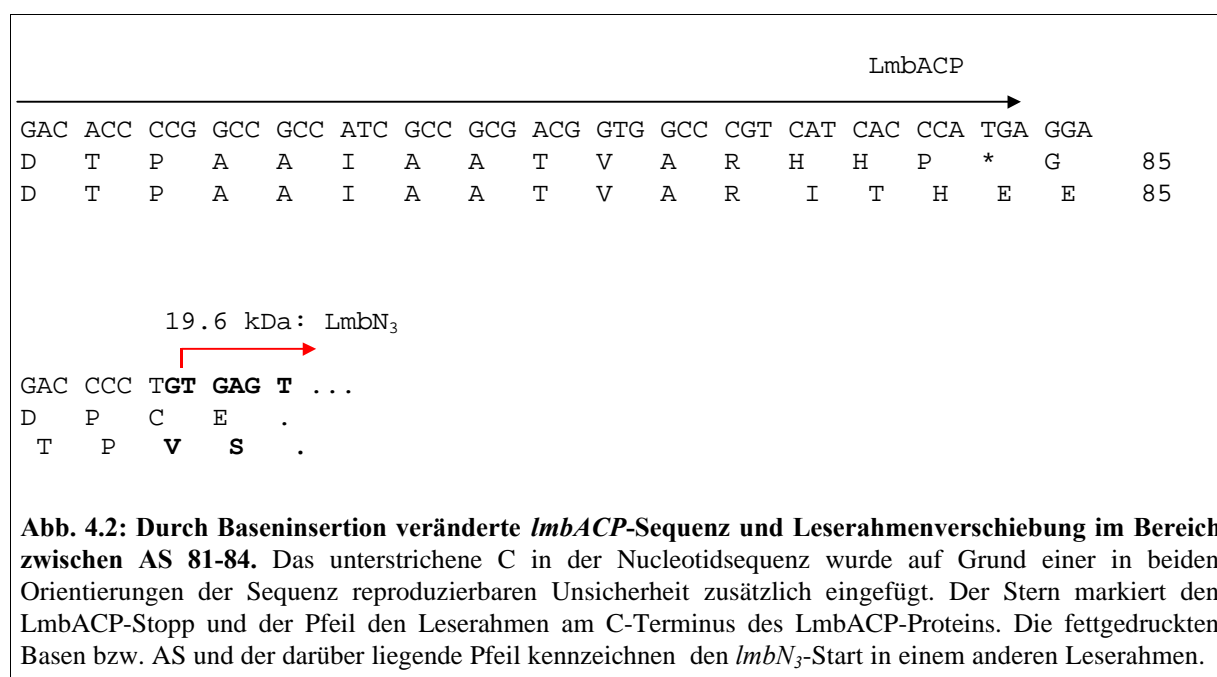
Da bei der Expression von *lmbN<sub>1</sub>* unter dem Promotor *tipAp* in *S. lividans* neben seiner Histag-Version mit 31 kDa ein zusätzliches, ca. 23 kDa großes, prominentes Protein mittels SDS-PAGE reproduzierbar detektiert wurde (s. Abb. 3.11), führte dies zu der Vermutung, daß der tatsächliche Leserahmen von *lmbN* kürzer sein muß als bisher angenommen. Verschiedene Gründe könnten für diese Beobachtungen in Frage kommen:

1. Ein *lmbN*-eigener Promotor könnte sich innerhalb des zur Expression klonierten Fragments befinden. Generell werden Actinomyceten-Promotorstrukturen in *S. lividans* erkannt (Virolle und Bibb, 1988; Beyer, 1995). Promotoranalysen mit Fragmenten des Anfangsbereiches von *lmbN* anhand eines bifunktionellen Reportersystems (pWKD13) konnten diese Annahme jedoch nicht bestätigen (s. 3.5). Das Scheitern der Regenerierung von *lmbN*-Mutanten deutete hingegen auf die Existenz eines *lmbN*-Promotors innerhalb dieses Fragmentes hin. In der dafür vorgenommenen Konstruktion wurde der gesamte, ursprüngliche Leserahmen für das *lmbN*-Gen durch das promotorlose *aacC4*-Gen ersetzt, wodurch polare Effekte auf stromabwärts liegende Gene vermieden werden sollten (M. Haase, pers. Mitteilung). Da jedoch keine Selektion mittels einer Apramycinresistenz phänotypisch erfolgen konnte, wurde angenommen, daß durch die Konstruktion zumindest ein Teil des *lmbN*-Promotors deletiert wurde und deshalb keine phänotypische Ausprägung des Resistenzgens *aacC4* stattfinden konnte.
2. Des Weiteren könnte eine posttranslationale Spaltung des Proteins LmbN<sub>1</sub> in das Acylcarrierprotein LmbACP (s. 3.4.2.5) und LmbN<sub>3</sub> vorliegen, die jedoch nicht autokatalytisch wie beispielsweise bei der Penicillin G Acylase oder der Cephalosporin Acylase (Inokoshi et

al., 1992) stattfinden kann, da nur bei Expression des LmbN<sub>1</sub> in Streptomyceten und nicht in *E. coli* das zweite, kleinere Protein gebildet wurde. In diesem Fall würde eine spezifische Protease notwendig sein, die dieses Acylcarrierprotein erkennt.

3. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer veränderten Sequenz, die aus einer Unsicherheit in der Lesbarkeit an Position 244 resultieren könnte. Die Insertion einer zusätzlichen Base C an dieser Stelle würde durch die damit verbundene Leserahmenverschiebung ein Stoppkodon für das LmbACP nach 252 bp generieren. Dadurch würden *lmbACP* und *lmbN<sub>3</sub>* durch zwei unterschiedlichen Leserahmen kodiert werden (s. Abb. 4.2). Dagegen spricht jedoch, daß nicht nur bei der Expression in *E. coli*, sondern auch in *S. lividans*, dieses mögliche *lmbACP* Stoppkodon zumindest teilweise überlesen worden wäre, da in beiden Fällen ein Protein mit der apparenten molekularen Masse des LmbN<sub>1</sub> produziert wurde.

Um zu beweisen, daß tatsächlich ein eigener *lmbACP*-Stopp und damit eine veränderte Zusammensetzung der drei C-terminalen AS existiert, müßten z. B. alle neugebildeten Proteine sequenziert werden oder ein C-terminales His-tag-LmbACP konstruiert werden, dessen C-Terminus nach Aufreinigung sequenziert wird.



Daß es sich bei dem natürlichen LmbN um das LmbN<sub>3</sub>-Protein handeln muß (s. Abb. 3.11), erscheint trotz größerer apparenter molekularer Masse (= LmbN<sub>2</sub>); (s. Abb. 3.10) auf Grund von Sequenzvergleichen (1) und der Länge des LmbACP (2) als sehr wahrscheinlich. Der Beweis wird noch durch die N-terminale Sequenzierung des Produkts zu beweisen sein.

1. Die Primärstruktur des LmbN zeigte signifikante Übereinstimmungen zu GmhA aus *E. coli* und *H. influenzae*, deren Funktion als Heptoseisomerasen nachgewiesen wurden (s. 1.2.3, s. Abb. 4.3). Die für den translationalen Startpunkt von LmbN<sub>3</sub> sprechende Tatsache beruht in der

übereinstimmenden Sequenzlänge und Lage der konservierten Motive mit den GmhA-Proteinen aus *E. coli* und *H. influenzae*. Von Brooke und Valvano (1996a) wurde vorgeschlagen, daß diese drei Enzyme zu einer neuen Familie von Zuckerphosphatisomerasen gerechnet werden müssen, die jeweils einen höheren Zucker (C7 bzw. C8) aus der Ketose- in die Aldoseform überführen (s. 1.2.3). Des weiteren befindet sich stromaufwärts des potentiellen Starts von LmbN<sub>3</sub> eine mögliche RBS ..GAGGAG..., wohingegen vor dem LmbN<sub>2</sub>-Startpunkt keine RBS zu finden ist (s. Abb. 4.2). Jedoch wurden in Streptomyceten Proteine identifiziert, deren DNA-Sequenz stromaufwärts des translationalen Starts keine RBS aufweist, so daß die Transkription ein Nucleotid vor dem Translationsstart beginnt (Strohl, 1992; Bibb et al., 1994). Die Entstehung solcher sogenannter »leaderless«-mRNAs wurde schon häufiger in Streptomyceten beobachtet und könnte für die *lmbN*-mRNA ebenfalls in Frage kommen.

S.linc-LmbN	M--SVVRNLLSDSGR-----LTADLAPDAMGAGAQLLFDTWHAGGTTLSC	43
E.coli-GmhA	MYQDLIRNELNEAAETLANFLKDDANIHAIQRAAVLLADSFKAGGKVLSC	50
H.infl-GmhA	MYLEQIKGELQEADVLAQKFMADKNIQLIQEAALLIANSFKQGGKVLSC	50
	. . . * . . . . . . . . * * . . . ** ***	
S.linc-LmbN	GNGGSASTASHAADLAKLTIVPGQRRMRTLCLNDNASAFSAWTNDEGFPV	93
E.coli-GmhA	GNGGSHCDAMHFAEELTGRYRENRPYPAIAISD-VSHISCVGNDFGFND	99
H.infl-GmhA	GNGGSHCDAMHFAEELTGRYRENRPAYPAIAISD-VSHLSCVSNDFGYEY	99
	***** * * * . . . . * * . * * * * .	
S.linc-LmbN	VYREQAEPWLEPTATLVAFSVHGGSRGGEVSANLPAVARLAKERGAAVVA	143
E.coli-GmhA	IFSRIVEAVGREGDVLGISTSGNSA-----NVIKAIAAAREKGMKVIT	143
H.infl-GmhA	VFSRYIEAVGQTGDVLFGLSTSGNSK-----NVLNAINIAKEKGMKVIA	143
	. . * . * . * * * * * . * * * * * .	
S.linc-LmbN	VTGFDGGALGDLADVHINIPH--ATEPVATPLIESLHVLVHHALCVAHAP	191
E.coli-GmhA	LTGKDGGKMAGTADIEIRVPHFGYADRIQEIHIKVIHILIQLIEKEMVK-	192
H.infl-GmhA	LTGKDGGQMAGLADVEIRVPHFRYADRTQEIHIKVIHILMMLIEFEMAKT	193
	. ** *** . . . * * . * * . . . * . * * .	
S.linc-LmbN	-	
E.coli-GmhA	-	
H.infl-GmhA	A	

**Abb. 4.3: Vergleich der Primärstrukturen des LmbN<sub>3</sub>-Proteins (191 AS) mit den GmhA-Proteinen aus *E. coli* (192 AS) und *H. influenzae* (194 AS).** Identische AS sind mit einem Stern, konservative Aminosäureaustausche mit einem Punkt gekennzeichnet.

2. Die 75 AS lange Sequenz des potentiellen LmbACP zeigte eine ca. 35%ige Identität mit anderen ACPs. Das Protein sollte vier AS vor dem Start von LmbN<sub>3</sub> enden und würde somit den LmbN<sub>3</sub>-Start untermauern.

### 4.2.3 Die Kinase LmbP

Wie bereits beschrieben wird für LmbP eine Kinase-Funktion postuliert, da trotz relativ weitläufiger Sequenzverwandtschaft zu Galactokinasen bzw. Mevalonatkinasen (zwischen 15% und 22% Identität), verschiedene Kinasemotive innerhalb der LmbP-Primärstruktur identifiziert werden konnten (s. 1.2.3).

*In vitro* zeigten Galactokinasen ihr Aktivitätsoptimum bei einem pH-Wert von 8,0 und verhielten sich während ihrer Reinigung sehr stabil (Schell und Wilson, 1977). Verschiedene Enzymtests unter ähnlichen Reaktionsbedingungen konnten jedoch keine phosphorylierende Aktivität von LmbP mit der chemisch synthetisierten  $\alpha$ -D-erythro-D-galacto-Octose als Substrat belegen (s. 3.3.2.2). Einen plausiblen Grund dafür könnte die Stereochemie des Substrates  $\alpha$ -D-erythro-D-galacto-Octose liefern. So könnte es eine falsche Konfiguration an 4 (4S) aufweisen. In der Regel führen sowohl TAL- als auch AL-Reaktionen zu einer 4R-Konfiguration im Produkt (s. oben). Daraus könnte geschlossen werden, daß das primäre LmbP-Substrat einer  $\alpha$ -D-erythro-D-gluco-Octose entsprechen sollte. Einen weiteren Hinweis auf eine solche Konfiguration der Octose lieferte die neu postulierte Funktion von LmbM (s. unten).

Galactokinasen scheinen hoch substratspezifisch zu sein. So wurde für GalK aus *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen, daß andere getestete Substrate wie Glucose, Mannose, Galactitol, Arabinose, 2-Deoxygalactose, Fucose oder Lactose zu weniger als 0,5% phosphoryliert wurden. Somit stellt Galactose *in vivo* das einzige Substrat für GalK dar. Wenn Galactose als alleinige C-Quelle vorhanden ist, entsprechen ca. 1,5% aller löslichen Hefezellproteine GalK (Schell und Wilson, 1977). Bei der Verstoffwechslung von Galactose findet im ersten Schritt die Phosphorylierung statt, gefolgt von einer Nucleotidaktivierung (Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase) und einer Epimerisierung an C4 (UDP-Galactose-4-Epimerase). Von Gram<sup>+</sup>-Bakterien hingegen kann Galactose über das PTS-System aufgenommen und dadurch phosphoryliert werden.

Falls sich die Annahme bestätigt, daß LmbP die Glucose-Variante der Octose als physiologisches Substrat benötigt, könnte das zum Nachweis der Enzymfunktion notwendige Substrat zum einen chemisch synthetisiert werden. Hierbei kann nach Verwendung einer anderen Schutzgruppentechnik der analoge Weg wie bei der Synthese der Galactose-Form beschritten werden. Die zweite Möglichkeit, das Substrat zu erhalten, besteht nach Generierung einer *lmbP*-negativen Mutante in der Isolierung der angehäuften Substanz.

Da kein Mutase-kodierendes *lmb*-Gen gefunden wurde, ist es wenig wahrscheinlich, daß Octose-1-phosphat durch eine Mutase aus O-8-P gebildet wird.

#### 4.2.4 LmbM: Dehydratase oder 4-Epimerase?

Genbankvergleiche in jüngerer Zeit lieferten für LmbM höhere Verwandtschaften zu UDP-Glucose 4-Epimerasen (GalE) als zu NDP-Hexose Dehydratasen (RmlB/StrE); (s. Tab. 4.2). Beide Enzymtypen gehören zur gleichen Unterfamilie der Oxidoreduktasen mit N-terminaler Dinucleotidbindestelle .

**Tabelle 4.2: Sequenzidentität zwischen LmbM und verschiedenen Epimerasen (GalE) bzw. Dehydratasen (StrE/TyIY).** GalE-1: acc. AAB90870; GalE: acc. P09147; StrE (*S. griseus*): acc. P29782; StrE (*S. glaucescens*): acc. AJ006985.1; TyIY: acc. AF055922

	Sequenzidentität				
	GalE-1/ <i>Archaeo-globus fulgidus</i>	GalE/ <i>E. coli</i>	StrE/ <i>S. griseus</i>	StrE/ <i>S. glaucescens</i>	TyIY/ <i>S. fradiae</i>
LmbM/ <i>S. lincolnensis</i>	36,6%	31,1%	27,1%	27,4%	30,0%

Beim Vergleich mit GalE aus *E. coli* wurde besonders im N-terminalen Bereich der Dinucleotidbindestelle eine gut übereinstimmende Region identifiziert.

Die GalE-Enzyme katalysieren eine reversible Reaktion zwischen UDP-Galactose und UDP-Glucose unter Beteiligung von NAD<sup>+</sup>. Wenn Wachstum auf Galactose erfolgt, wird UDP-Galactose zu UDP-Glucose epimerisiert und in die Glycolyse eingeführt. Umgekehrt ist die Umwandlung von UDP-Glucose in UDP-Galactose, beispielsweise in *S. lividans*, notwendig, wenn bei Abwesenheit von Galactose in der Nahrung UDP-Galactose als Metabolit für die Biosynthese der Galactosyllipide, die einen Bestandteil der Plasmamembran darstellen, benötigt wird (Adams et al., 1988). Der enzymatische Mechanismus führt über eine Oxidation der OH-Gruppe zum 4-Ketozwischenprodukt durch Hydrid-Transfer an den Nicotinamidring des katalytisch benötigten NAD<sup>+</sup>-Coenzym. Danach rotiert der 4-Ketozucker in der Enzymtasche und wird unter Inversion reduziert (Thoden et al., 1997; Thoden und Holden, 1998). Der Nucleotidylylanteil ist für die Substratbindung an das Enzym verantwortlich (Wong und Frey, 1977).

In der MTL-Biosynthese könnte somit eine Epimerisierung nach der Nucleotidaktivierung (durch LmbO) der Octose von der *gluco*-Konfiguration in die *galacto*-Konfiguration stattfinden, um die von MTL geforderte stereochemische Struktur herzustellen.

LmbMS.lin	MSGRYCVTGGAGFIGSHFVETAPRRGRHPGEVVAYDDLNTTTGGFEPL-	49
GaleE.col	M--RVLVTGGSGYIGSHTCVQLLQNGH---DVIILDNLCNSKRSVLPVIE	45
	* * * * * . * . * . * . . . .	
LmbMS.lin	-LADERLRFVVRADVLDTARLTEELTGWTQDDVVHLAS-----SVDMRKG	92
GaleE.col	RLGGKHPTFVEGDIRNEALMTEILHDHAIDTVIHFAGLKAVGESVQKPLE	95
	* . . . * * . * . * * * . . * * . * . * * . * . * * .	
LmbMS.lin	YHDRGFDLRQCAEGTLSVLNAMRASGPRTVLFSSSSTVYGDVPTLPTPEH	142
GaleE.col	YYDNNVN-----GTLRLISAMRAANVKNFIFSSSATVYGDQPKIPYVES	139
	* * . * * * * . . . * * * . * * * . * * * . * * .	
LmbMS.lin	AGPYAPISMYGAGKLAEEALLSANCHLD-GFTAHVFRFGNVVGGRMN---	189
GaleE.col	FPTGTQPQSPYGKSKLMVEQILTDLQKAQPDWSIALLRVFNPNVGAHPGDM	189
	. * * * * . * * * . * . . . . * . * * * . .	
LmbMS.lin	----HGVIHD---FIEKLD-ARRDRLQVLG-----DGRQRKNYFLVEEC	225
GaleE.col	GEDPQGI PNNLMPYIAQVAVGRRDSLAI FGN DYPTEDGTGVRDYIHVMDL	239
	. * . . . * . . * * * * . * * * * * . * . * .	
LmbMS.lin	VDGILTASGKLG--PGFHVNLGNPGTVSVDEIAAIVIDEMGLKGVGLEH	272
GaleE.col	ADGHVVAMEKLANKPGVHIYNL GAGVGN SVLDVVNAF SKACG-KPVNYHF	288
	* * . * * * . * * * . * * * * * * * * . * * * .	
LmbMS.lin	EGGVRGWPGDVPVVEYDLTRVHELGWS-APTDGRQAIRTCARRL--LAER	320
GaleE.col	A---PRREGDLP--AY-----WADASKADRELNWRVTRTLDEMAQD	314
	. * * . * * * * * * . * . * . * . * * * . * .	
LmbMS.lin	GWQR-----P-	324
GaleE.col	TWHWQSRHPQGYPD	328
	* . . * .	

**Abb. 4.4:** Vergleich der Primärstruktur des LmbM-Proteins (324 AS) mit der UDP-Glucose-4-Epimerase aus *E. coli* (328 AS); (acc. P09147). Identische AS sind mit einem Stern, konservative Aminosäureaustausche sind mit einem Punkt gekennzeichnet. Der grau unterlegte Bereich markiert das GXGXXG-Motiv der NAD<sup>+</sup>-Bindestelle .

Die Dehydratase-Funktion könnte von LmbL bzw. LmbZ übernommen werden, da beide Proteine jeweils eine N-terminale NAD-Bindestelle mit dem Motiv GXXGXG aufweisen, das nur leicht vom Rossmann-Motiv abweicht (Wierenga et al., 1985).

#### 4.3.5 LmbS: Aminotransferase

Eine Beteiligung des Proteins LmbS an der Transaminierung der Ketoctose und die Zugehörigkeit zur SMAT-Familie ist auf Grund der Motive in der Sequenz eindeutig (s. 1.2.3).

Mit dem durch die *lmbS*-negative Mutante angehäuften Substrat könnte in einem Enzymtest *in vitro* mittels überexprimiertem LmbS der zweifelsfreie Beweis der Transaminierung erbracht

werden. Die Komplementation der *lmbS*-negativen Mutante durch *lmbS*-Expressionsplasmide zeigte, daß keine Beeinflussung weiterer, an der MTL-Biosynthese beteiligter Gene durch polare Effekte stattfand.

Mit StrS, das möglicherweise für die Transaminierung eines C6-Ketozuckers in der Streptomycin-Biosynthese verantwortlich ist, ergibt sich eine Übereinstimmung in der Primärsequenz von 37,7%, so daß StrS näher mit LmbS als mit den anderen Aminotransferasen, StrA und StrC, der Streptomycin-Biosynthese verwandt ist (Ahlert, 1996).

#### 4.3.6 LmbK: Phosphatase?

Das *lmbK*-Genprodukt wies eine entfernte Verwandtschaft sowohl mit Imidazolglycerinphosphat-Dehydratase als auch mit Phosphoglycolatphosphatasen (PGP) auf. PGPs weisen in der Regel höhere Übereinstimmungen mit Imidazolglycerinphosphat-Dehydratase auf als mit anderen Phosphatasen, so daß sie einem neuen Typus von Phosphatasen zugeordnet werden (Schäferjohann, 1993). Wenn *lmbK* tatsächlich eine Imidazolglycerinphosphat-Dehydratase kodieren würde, wie von Peschke et al. postuliert (1995), läge eine Zuordnung zur PPL-Biosynthese auf Grund der Strukturähnlichkeiten im Substrat nahe. Komplementationsexperimente von *lmbK*-Mutanten mit PPL erbrachten jedoch keine Regenerierung der Lincomycin A-Produktion. Diese Beobachtungen könnten Indizien für eine alternative Phosphatasefunktion von LmbK liefern, die zur Bereitstellung des LmbP-Substrates im postulierten Biosyntheseweg von MTL notwendig wäre (s. unten).

#### 4.3.7 LmbW: Thiomethyltransferase?

Während der Biosynthese von Lincomycin A werden 3 Methylierungsschritte benötigt, die jeweils zu einer NCH<sub>3</sub>-, CCH<sub>3</sub>- und SCH<sub>3</sub>-Gruppe führen. Die postulierte Funktion von LmbJ *N*-Demethylincomycin zu methylieren, ist durch eine gezielte »in-frame«-Mutation von *lmbJ* und anschließender Analyse des angehäuften Metabolits kürzlich bewiesen worden (Stühler, 1999). Der Leserahmen *lmbG* wird dem PPL-Biosyntheseweg zur Kettenverlängerung zu 1,2,3,6-Tetradehydropropylprolin (TDPPL) zugewiesen, da er in der Region der PPL-Biosynthese des Lincomycin A-Genclusters lokalisiert ist. LmbW ist möglicherweise für den letzten Schritt der MTL-Biosynthese, einer Substitution der aktivierenden Gruppe durch eine Thiomethylgruppe, verantwortlich. Diese funktionelle Gruppe der Zuckereinheit ist für die



Wirkung des Antibiotikums essentiell. So zeigte Bannister (1972), daß eine Substitution durch Wasserstoff, eine Änderung der Konfiguration von axial in äquatorial oder die Oxidation zum Sulfoxid einen Verlust der antibiotischen Aktivität zur Folge hatten. Im Gegensatz dazu führte der Austausch der Thiomethylgruppe durch eine Thioethyl- oder Thiobutylgruppe zu einer leichten Aktivitätserhöhung.

Als Substrat für den  $\text{SCH}_3$ -Gruppentransfer kämen Methionin und S-Adenosyl-Methionin (SAM) in Betracht. Argoudelis et al. (1969) stellten in Fütterunsexperimenten mit L-[methyl- $^{14}\text{C}$ ] Methionin fest, daß 91% der Radioaktivität des MTL in der Thiomethylgruppe nachzuweisen waren und folgerten daraus, daß eine Transthiometylierung des MTL-Vorläufermoleküls mittels Methionin stattfand. Jedoch entsteht SAM biosynthetisch aus Methionin und ATP, so daß die Herkunft der  $\text{SCH}_3$ -Gruppe grundsätzlich im Methionin zu suchen ist. Weiterhin spricht gegen Methionin als Substrat, daß die Primärsequenz von LmbW ein SAM-Bindemotiv aufweist. Einige SAM-abhängige Methyltransferasen, die eine Untergruppe bilden, sind durch 3 unterschiedliche Motive gekennzeichnet, die immer in der gleichen Reihenfolge auftreten. Zwei Motive werden mit der Bindung des Substrats SAM und des Produkts S-Adenosylhomocystein in Verbindung gebracht (Kagan und Clarke, 1994). In LmbW (318 AS) wurde das Motiv I: ... $^{143}\text{VLDVGC GG}^{152}$ ... identifiziert, das eine signifikante Übereinstimmung zum Motiv I ... $^{60}\text{VLDIGCGRG}^{69}$ ... des 220 AS langen DauC (*Streptomyces* sp. strain C5; Dickens et al., 1995) aufweist.

Die Thiomethylierung der dTDP-6-Amino-8-deoxyoctose muß dabei über einen ungewöhnlichen, bisher nicht beschriebenen Mechanismus erfolgen, in dem die OdTDP-Gruppe durch die Thiomethylgruppe substitutiv ersetzt wird oder alternativ eine Hydrolyse mit darauffolgender Thiomethylierung an der 1-OH-Gruppe stattfindet. Dazu könnte das 5'-Thiomethylderivat des SAM, das bei der Polyaminbiosynthese anfällt, als Coenzym benutzt werden.

Eine notwendige Voraussetzung für die Aufklärung der LmbW-Funktion wäre die bisher nicht gelungene Isolierung von *lmbW*-Doppel-Cross-Over-Mutanten, bei denen der Leserahmen ausgetauscht bzw. deletiert wurde. Damit würde die Wahrscheinlichkeit, daß umliegende Gene durch polare Effekte beeinflußt würden, minimiert werden.

## 4.4 MTL-Biosynthese

Aus den unter 4.3 diskutierten enzymologischen Zusammenhängen resultiert ein abgewandeltes Postulat für den Biosyntheseweg des MTL (s. Abb. 4.5).

Reaktionsschritt 1:

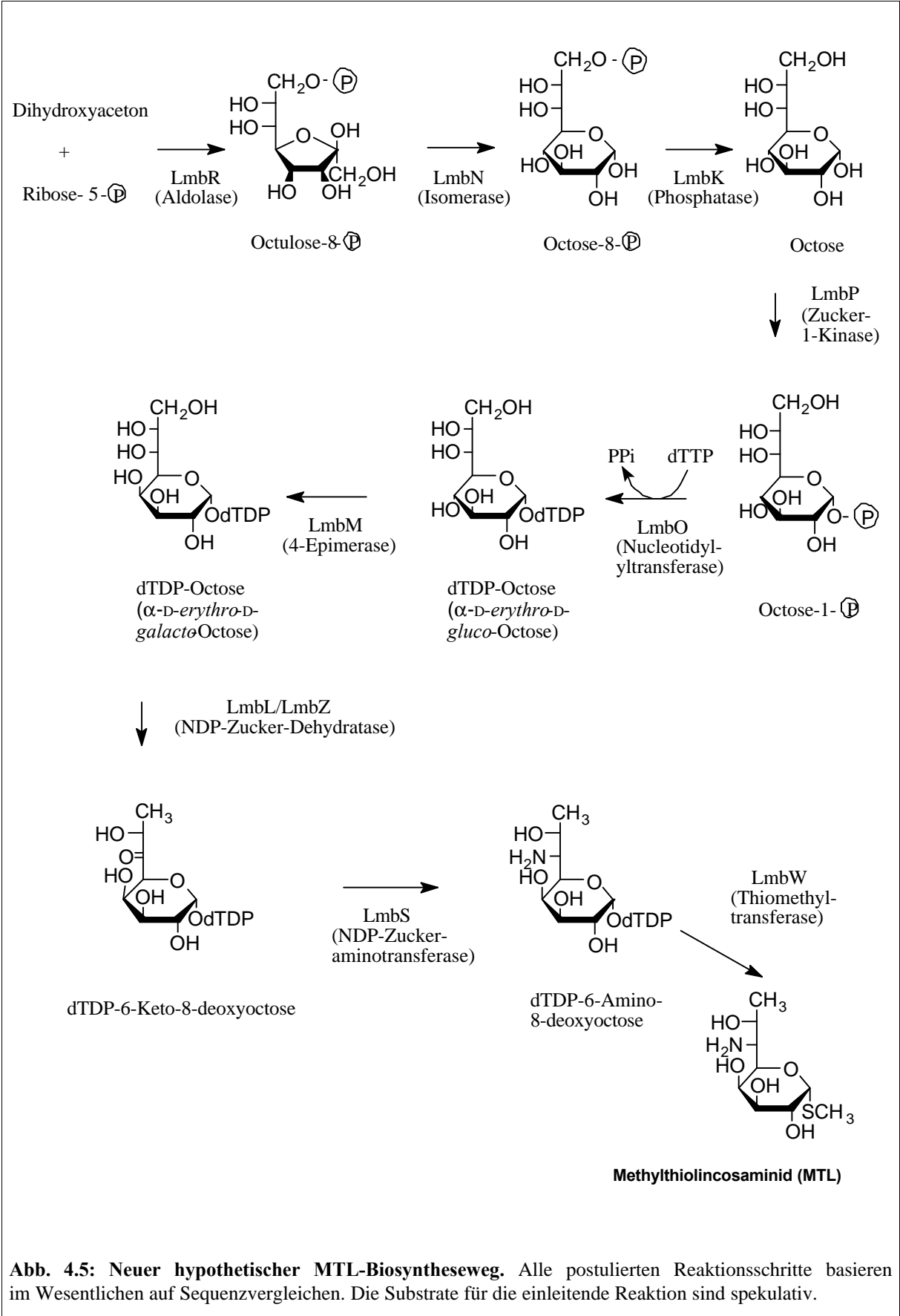
Daß der Aufbau des C8-Grundgerüsts des MTL direkt zu Beginn der Biosynthese durch eine Kondensationsreaktion vom Typ (T)AL-katalysierte Aldolkondensation stattfindet, erscheint trotz fehlendem Beweis auf Grund der Markierungsmuster *in vivo* (Brahme, 1984b) nach wie vor sinnvoll und stellt daher einen der Kernpunkte der Hypothese dar. Eine alternative Synthese aus Glucose beispielsweise in Analogie zu anderen Zuckeruntereinheiten von Antibiotika würde über eine dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose und eine 4-Amino-6-deoxyhexose führen. Die aminierte Hexose würde keine sinnvolle Struktur zur Kettenverlängerung bieten, da in der Reaktion eine Methylgruppe an Position C6 generiert wurde, für die die danach notwendige Kettenverlängerung mechanistisch unwahrscheinlich ist. Die Kettenverlängerung an C1 hingegen würde gleichzeitig zu einer Deaktivierung dieser Position führen.

Reaktionsschritte 2 - 6:

Die weiteren Schritte der hypothetischen MTL-Biosynthese könnten analog zu Elementen der Lipopolysaccharid (LPS)-Biosynthese in gleicher Reihenfolge ablaufen. Dabei würden die entsprechenden Enzymfunktionen folgendermaßen aussehen: Isomerisierung durch LmbN; Phosphatasereaktion durch LmbK; 1-Phosphotransfer durch LmbP; Nucleotidylylierung durch LmbO und Epimerisierung durch LmbM.

Die Biosynthese von ADP-D-*glycero*-D-Mannoheptose, ein Vorläufer der Kernzone der LPS Gram<sup>-</sup>-Bakterien, weist eine signifikante Analogie zu den hier postulierten Reaktionen der MTL-Synthese auf (s. Abb. 4.5). Dabei wird für einen Bestandteil des LPS das Ausgangsmolekül S-7-P durch eine Phosphoheptoseisomerase, eine noch hypothetische Phosphoheptosemutase, eine ADP-Heptosesynthetase und eine Epimerase zu ADP-L-*glycero*-D-Mannoheptose verändert (Brooke und Valvano, 1996b). LmbN zeigt signifikante Übereinstimmungen zu solchen Phosphoheptoseisomerasen (s. 4.3.2). Im Falle der MTL-Synthese ist keine Phosphoheptosemutasereaktion zu postulieren, da die vorhandenen Gene eher eine Dephosphorylierung an Position 8 (LmbK) und erneute Rephosphorylierung an Position 1 (LmbP) wahrscheinlich machen und kein Mutase-kodierendes Gen identifiziert werden konnte.

Die Nucleotidylyltransferase LmbO zeigt deutliche Ähnlichkeiten zu dTDP-D-Glucose-1-P Synthasen und weist geringere Übereinstimmungen mit anderen NDP-Hexose Synthasefamilien auf, die beispielsweise GDP-Mannose, UDP-Galactose, CDP-Glucose oder ADP-Glucose



**Abb. 4.5: Neuer hypothetischer MTL-Biosyntheseweg.** Alle postulierten Reaktionsschritte basieren im Wesentlichen auf Sequenzvergleichen. Die Substrate für die einleitende Reaktion sind spekulativ.

synthetisieren. Dies kann als weiteres Indiz für eine *gluco*-Konfiguration des Substrates gewertet werden (s. Abb. 4.5).

Reaktionsschritte 7 bis 9:

Die weitem Schritte könnten wie folgt ablaufen: Dehydratisierung durch LmbZ oder LmbL, Transaminierung durch LmbS und Thiomethylierung durch LmbW (s. Abb. 4.5).

## 5 Literatur

Adams, C. W.; Fornwald, J. A.; Schmidt, F. J.; Rosenberg, M. und Brawner, M. E. (1988) Gene organization and structure of the *Streptomyces lividans gal* operon. J. Bacteriol. 170, 203-212.

Ahlert, J. (1997) Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von Streptomycin in *Streptomyces griseus* N2-3-11: Identifizierung und Expression einer L-Glutamin:scyllo-Inosose Aminotransferase. Dissertation BUGH, Wuppertal.

Ahlert, J.; Distler, J.; Mansuri, K. und Piepersberg, W. (1997) Identification of *stsC*, the gene encoding the L-glutamine:scyllo-inosose aminotransferase from streptomycin-producing *Streptomyces*. Arch. Microbiol. 168, 102-113.

Akbar, S.; Kang, A. M.; Gaidenko, T. A. und Price, C. W. (1997) Modulator protein RsbR regulates environmental signalling in the general stress pathway of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 24, 567-578.

Alexander, F. W.; Sandmeier, E.; Mehta, P. K. und Christen, P. (1994) Evolutionary relationships among pyridoxyl-5'-phosphate-dependent enzymes. Eur. J. Biochem. 219, 953-960.

Allmansberger, R.; Bräu, B. und Piepersberg, W. (1985) Genes for gentamicin-(3)-acetyltransferases III and IV: II. Nucleotide sequences of three AAC(3)-III genes and evolutionary aspects. Mol. Gen. Genet. 198, 514-520.

Alm, R. A.; Ling, L. L.; Moir, D. T.; King, B. L.; Brown, E. D.; Doig, P. C.; Smith, D. R.; Noonan, B.; Guild, B. C.; deJonge, B. L.; Carmel, G.; Tummino, P. J.; Caruso, A.; Uria-Nickelsen, M.; Mills, D. M.; Ives, C.; Gibson, R.; Merberg, D.; Mills, S. D.; Jiang, Q.; Taylor, D. E.; Vovis, G. F. und Trust, T. J. (1999) Genomic Sequence Comparison of Two Unrelated Isolates of the Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 397, 176-180.

Altschul, A. Z.; Bradner, J. E. und O'Halloran, T. V. (1990) Basic logical alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.

Anderson, R. L. und Sapico, V. L. (1975) D-Fructose (D-Mannose) Kinase. Methods in Enzymology, Volume XLII, Carbohydrate Metabolism Part C, 112-114.

Argoudelis, A. D.; Eble, T. E.; Fox, J. A. und Mason, D. J. (1969) Studies on the biosynthesis of lincomycin. IV. The origin of methyl groups. Biochemistry 8, 3408-3411.

Argoudelis, A. D.; Fox, J. A.; Mason, D. J. und Eble, T. E. (1964) New lincomycin related antibiotics. J. Am. Chem. Soc. 86, 5044-5045.

Argoudelis, A. D.; Fox, J. A. und Mason, D. J. (1965) Studies of the biosynthesis of lincomycin. II. Antibiotic U-11,973, N-demethyl lincomycin. Biochemistry 4, 710-713.

- 
- Asmus, P. A. und Landis, J. B. (1983) Liquid chromatographic determination of lincomycin in fermentation beers. *J. Chromatogr.* 264, 241 - 248.
- Babcock, M. J. und Kendrick, K. E. (1988) Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 170, 2802-2808.
- Baldwin, S. A. und Perham, R. N. (1978) Novel kinetic and structural properties of the class-I D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *E. coli* (Crookes' strain). *Biochem. J.* 169, 643-652.
- Baltz, R. H. (1986) Mutation in *Streptomyces*. In: Queener, S. W. und Day, L. E. (Hrsg.) The bacteria, a treatise on structure and function. Antibiotic-producing *Streptomyces*., S. 61-94, Academic Press New York, New York.
- Banki, K. D. und Perl A. (1996) Inhibition of the catalytic activity of human transaldolase by antibodies and site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 378, 161-165.
- Bannister, B. (1972a) Modifications of lincomycin involving the carbohydrate portion. Part I. The 2-O-methyl- and 2-deoxy-analogues. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I*, 3025-3030.
- Bannister, B. (1972b) Modifications of lincomycin involving the carbohydrate portion. Part II. Analogues with D-*gluco* and D-*ido*-stereochemistry. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I*, 3031-3035.
- Bauer, B. A.; Stevens, M. K. und Hansen, E. J. (1998) Involvement of the *Haemophilus ducreyi gmhA* gene product in lipooligosaccharide expression and virulence. *Infect. Immun.* 66, 4290-4298.
- 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.
- Bergmeyer, H. U.; Gawehn, K. und Grassel, M. (1968) Enzymes as Biochemical Reagents. In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.) Methods of enzymatic analysis. 1 edn, S. 424-555, Verlag Chemie Weinheim; Academic Press, Inc., New York.
- Beyer S. (1996) Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von 5'-Hydroxystreptomycin in *Streptomyces glaucescens* GLA.0. BUGH, Wuppertal.
- Beyer, S.; Distler, J. und Piepersberg, W. (1996a) 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.
- Beyer, S.; Mayer, G. und Piepersberg, W. (1998) The StrQ protein encoded in the gene cluster for 5'-hydroxystreptomycin of *Streptomyces glaucescens* GLA.0 is a alpha-D-glucose-1-phosphate cytidylyltransferase (CDP-D-glucose synthase). *Eur. J. Biochem.* 258, 1059-67.
- Bibb, M. J.; Findlay, P. und Johnson, M. (1984) The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequence. *Gene* 30, 157-166.

- Bibb, M. J.; Janssen, G. R. und Ward, J. M. (1985) Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* 41, E357-E368.
- Bibb, M. J.; White, J.; Ward, J. M. und Janssen, G. R. (1994) The mRNA for the 23S rRNA methylase encoded by the *ermE* gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* 14, 533-545.
- Birnboim, C. und Doly, J. (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plamid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7, 1513-1523.
- Bjerrum, O. J. und Schafer-Nielsen, C. (1986) Buffer systems and transfer parameters for semi-dry electroblotting with a horizontal apparatus. In: Dunn, S. D. (Hrsg.) *Electrophoresis.*, S. 315-327, VCH, Weinheim.
- Blanc, V.; Salah-Bey, K.; Folcher, M. und Thompson, C. J. (1995) Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin-producing organism, *Streptomyces pristinaespiralis*. *Mol. Microbiol.* 17, 989-999.
- Blanco, G.; Rodico, M. R.; Puglia, A. M.; Mendez, C.; Thompson, C. J. und Salas, J. A. (1994) Synthesis of ribosomal proteins during growth of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 12, 375-385.
- Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B. und Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-74.
- Bowden G. A. und Georgiou, G. (1988) The effects of sugar on  $\beta$ -lactamase aggregation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 4, 97-101.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brahme, N. M.; Gonzalez, J. E.; Mizensak, S.; Rolls, J. R.; Hessler, E. J. und Hurley, L. H. (1984a) Biosynthesis of the lincomycins. 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moiety of lincomycin A and B. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 7873-7878.
- Brahme, N. M.; Gonzalez, J. E.; Mizensak, S.; Rolls, J. R.; Hessler, E. J. und Hurley, L. H. (1984b) Biosynthesis of the lincomycins. 2. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of methylthiolincosaminide moiety of lincomycin A. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 7878-7883.
- Brand, K. (1968) Transaldolase. In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.) *Volume 2.* 1 edn, S. 710-713, Verlag Chemie Weinheim, Academic Press, Inc., New York.
- Bräu, B.; Pilz, U. und Piepersberg, W. (1984) Genes for gentamicin-(3)-acetyltransferases III and IV: I. Nucleotide sequence of the AAC(3)-IV gene and possible involvement of an *IS140* element in its expression. *Mol. Gen. Genet.* 193, 179-187.

- Brennan, R. G. und Matthews, B. W. (1989) The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.* 264, 1903-1906.
- Brimacombe, J. S.; Hanna, R.; Kabir, A. K.; Bennett, F. und Taylor, I. D. (1986) Higher-carbon sugars. Part 1. The synthesis of some octose sugars via the osmylation unsaturated precursors. *J. Chem. Soc. Pekin. Trans. I*, 815-821.
- Brooke, J. S. und Valvano, M. A. (1996a) Molecular cloning of the *Haemophilus influenzae gmhA (lpcA)* gene encoding a phosphoheptose isomerase required for lipooligosaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* 178, 3339-3341.
- Brooke, J. S. und Valvano, M. A. (1996b) Biosynthesis of inner core lipopolysaccharide in enteric bacteria identification and characterization of a conserved phosphoheptose isomerase. *J Biol. Chem.* 271, 3608-3614.
- Brosius, J. (1989) Superlinker in cloning and expression vectors. *DNA* 8, 759.
- Bult, C. J.; White, O.; Olsen, G. J.; Zhou, L.; Fleischmann, R. D.; Sutton, G. G.; Blake, J. A.; Fitzgerald, L. M.; Clayton, R. A.; Goycane, J. D.; Kerlavage, A. R.; Dougherty, B. A.; Tomb, J.; Adams, M. D.; Reich, C. I.; Overbeek, R.; Kirkness, E. F.; Weinstock, K. G.; Merrick, J. M.; Glodek, A.; Scott, J. L.; Geoghagen, N. S. M.; Weidman, J. F.; Fuhrmann, J. L.; Nguyen, D.; Utterback, T. R.; Kelley, J. M.; Peterson, J. D.; Sadow, P. W.; Hanna, M. C.; Cotton, M. D.; Roberts, K. M.; Hurst, M. A.; Kaine, B. P.; Borodovsky, M.; Klenk, H.; Fraser, C. M.; Smith, H. O.; Woese, C. R. und Venter, J. C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073.
- Bullock, W. O.; Fernandez J. M. und Short, J. M. (1987) *Biotechniques* 5, 376-378.
- 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, Am. Soc. Microbiol., Washington, DC.
- Chater, K. F. (1984) Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In: Losick, R. und Shapiro, L. (Hrsg.) Microbial development., S. 89-115, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Chater, K. F. (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 685-713.
- Chiu, T. und Feingold, D. S. (1969) L-Rhamnulose 1-phosphate aldolase from *Escherichia coli*. Crystallization and properties. *Biochemistry* 8, 98-108.
- Chromczynski, P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201, 134-139.
- Chromczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chung, S. T. und Crose, L. L. (1990) Transposon Tn4556 mediated DNA insertion an site-directed mutagenesis. In: Heslot, H.; Davies, J.; Florent, J.; Bobichon, L.; Durand, G. und



Penasse, L. (Hrsg.) Genetics of Industrial Microorganisms., S. 207-218, Société Française de Microbiologie.

Coats, J. H.; Li, G. P.; Kuo, M. T. und Yurek, D. A. (1989) Discovery, production, and biological assay of an unusual flavenoid cofactor involved in lincomycin biosynthesis. *J. Antibiot.* 42, 472-474.

Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry III, C. E.; Tekaiia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, S.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, S.; Squares, S.; Squares, R.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S. und Barrell, B. G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.

Cundliffe, E. (1989) How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Ann. Rev. Microbiol.* 43, 207-233.

Cundliffe, E. (1990) Recognition sites for antibiotics within rRNA. In: Hill, W.; Dahlberg, A.; Garrett, R. A.; Moore, P. B.; Schlessinger, D. und Warner, J. R. (Hrsg.) *The ribosome*, S. 479-490, American Society for Microbiology, Washington D.C.

Cundliffe, E.; Merson-Davies, L. A. und Kelemen, G. H. (1993) Aspects of tylosin production and resistance in *Streptomyces fradiae*. In: Hegeman, G. D.; Baltz, R. H. und Skatrud, P. L. (Hrsg.) *Basic and applied molecular genetics*. 2nd edn, S. 235-243, American Society for Microbiology, Washington D.C.

Dhillon, N.; Hale, R. S.; Cortes, J. und Leadlay, P. F. (1989) Molecular characterization of a gene from *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Microbiol.* 3, 1405-1414.

Dickens, M. L.; Ye, J. und Strohl, W. R. (1995) Analysis of clustered genes encoding both early and late steps in daunomycin biosynthesis by *Streptomyces* sp. strain C5. *J. Bacteriol.* 177, 536-543.

Distler, J.; Ebert, A.; Mansouri, K.; Possowotzki, K.; Stockmann, M. und Piepersberg, W. (1987) 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.; Mayer, G.; Stockmann, M. und Piepersberg, W. (1992) Streptomycin production and its regulation in *Streptomyces*. *Gene* 115, 105-111.

Drepper, A. (1993) Charakterisierung und mögliche Funktion ungewöhnlicher Kinasen des Acarbose-Produzenten *Actinoplanes* sp. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster.

Drepper, A.; Peitzmann, R. und Pape, H. (1996) Maltokinase (ATP: Maltose 1-phosphotransferase) from *Actinoplanes* sp.: Demonstration of enzyme activity and characterization of the reaction product. *FEBS Lett.*, 177-179.

Dreyer, M. K. und Schulz, G. E. (1996) Catalytic mechanism of the metal-dependent fuculose aldolase from *Escherichia coli* as derived from the structure. *J. Mol. Biol.* 259, 458-466.

- Egan, S. M. und Schleif, R. F. (1993) A regulatory cascade in the induction of *rhaBAD*. J. Mol. Biol. 234, 87-98.
- Eidels, L. und Osborn, M. J. (1974) Phosphoheptose Isomerase, first enzyme in the biosynthesis of aldoheptose in *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 249, 5642-5648.
- Englard, S. und Seifter, S. (1990) Precipitation techniques. Meth. enzymol., Vol. 182., 285-297.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132, 6-13.
- Feldmann, S. D.; Sahm, H. und Sprenger, G. A. (1992) Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild-type and recombinant strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72, 248-254.
- Fernandez-Patron, C.; Castellanos-Serra, L. und Rodriguez, P. (1992) Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. Biotechniques 12, 564-576.
- Fouces, R.; Mellado, E.; Diez, B. und Barredo, J. L. (1999) The tylosin biosynthetic cluster from *Streptomyces fradiae*: genetic organization of the left region. Microbiology 145, 855-868.
- Gaisser, S.; Böhm, G. A.; Cortes, J. und Leadley, P. F. (1997) Analysis of seven genes from the eryAI-eryK region of the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. Mol. Gen. Genet. 256, 239-251.
- Gladek, A. und Zakrezewska, J. (1984) Genome size of *Streptomyces*. FEMS Microbiol. Lett. 24, 73.
- Graeme, E. W.; Dunbar, B.; Hunter, I. S.; Nimmo, H. G. und Coggins, J. R. (1996) Evidence for a novel class of microbial 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces rimosus* and *Neurospora crassa*. Microbiology 142, 1973-1982.
- Groth, D. P. (1966) Deoxyribose 5-phosphate aldolase. II. Liver. Meth. Enzymol., Volume IX, Carbohydrate metabolism, 549-554.
- Haase, M. (1996) Lincomycin-Biosynthese in *Streptomyces lincolnensis* 78-11: Überexpression der Aminotransferase LmbS und enzymologische Charakterisierung. Diplomarbeit, BUGH Wuppertal.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.
- Hanks, S. K.; Quinn, A. M. und Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science 241, 42-51.
- Hasib L. (1998) Erzeugung von zielgerichteten Mutationen in *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936 am Beispiel einer *lmbR*-Mutante. Diplomarbeit, BUGH Wuppertal.

- Hausknecht, E. C. und Wolf, H. J. (1986) Preparation and purification of [<sup>14</sup>C] labelled N-demethyl lincomycin and propylproline from [<sup>14</sup>C] tyrosine. *J. labelled Compounds Radiopharmaceuticals* 24, 247 - 253.
- Heinrich, M. R. und Howard, S. M. (1966) Galactokinase. *Meth. Enzymol.*, Volume IX., 407-412.
- Herscovici, J. und Antonakis, K. (1980) Molecular sieve-assisted oxidation: new methods for carbohydrate derivative oxidations. *J. C. S. Chem. Comm.*, 561-562.
- Higgins, D. G.; Bleasby, A. J.; Fuchs, R. (1991) CLUSTALV: improved software for multiple sequence alignment.
- Higgins, C. F.; Causton, H. C.; Dance, G. S. und Mudd, E. A. (1993) The role of the 3' end in mRNA stability and decay. In: Belasca, J. G. und Brawerman, G. (Hrsg.) *Control of messenger RNA stability.*, S. 13-30, Academic Press, Inc., San Diego, USA.
- Hockney, R. C. (1994) Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Tib. Tech.* 12, 456-463.
- Hoeksema, H.; Bannister, B.; Birkenmayer, R. D.; Mackellar, F. A.; Kagan, F.; Magerlein, B. J.; Schroeder, W.; Slomp, G. und Herr, R. R. (1964) Chemical studies on lincomycin. I: The structure of lincomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 68, 4223-4224.
- Hoeksema, H.; Crum, G. F. und DeVries, W. H. (1955) Isolation and purification of Celesticetin. *Antibiot. Ann.* 2, 837-841.
- Holmes, D. J.; Caso, J. L.; Katoh, T. und Thompson, C. J. (1993) Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. In: Baltz, R. H., Hegeman, G. D. und Skatrud, P. L. (Hrsg.) *Industrial Microorganisms: Basic and applied molecular genetics.*, S. 69-73, American Society for Microbiology, Washington, DC 20005.
- Holt, T. G.; Chang, C.; Laurent-Winter, C.; Murakami, T.; Garrels, J. I.; 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.; Kieser, T.; Bruton, C. J.; Kieser, H. M.; Lyciate, D. J.; Ward, J. M. und Schrepf, H. (1985) *In Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory Manual.* The John Innes Foundation, Norwich.
- Horecker, B. L.; Pontremoli, S.; Ricci, C. und Cheng, T. (1961) On the nature of the transaldolase-dihydroxyacetone complex. *Biochemistry* 47, 1949-1955.
- Horecker, B. L.; Rowley, P.; Grazi, E.; Cheng, T. und Tchola, O. (1963) The mechanism of action of transaldolase: IV. Lysine as the substrate-binding site. *Biochem. Z.* 338, 36-51.
- Iida, A.; Teshiba, S. und Mizobuchi, K. (1992) Identification and characterization of the *tktB* gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 175, 5375-5383.

- 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 galP1, a catabolite-controlled promoter. *J. Bacteriol.* 171, 6617-6624.
- Inokoshi, J.; Takeshima, H.; Ideda, H. und Omura, S. (1992) Cloning and sequencing of the aculeacin A acylase-encoding gene from *Actinoplanes utahensis* and expression in *Streptomyces lividans*. *Gene* 119, 29-35.
- Jia, J.; Huang, W.; Schörken, U.; Sahn, H.; Sprenger, G. A.; Linnquist, Y. und Schneider, G. (1996) Crystal structure of transaldolase B from *Escherichia coli* suggests a circular permutation of the  $\alpha/\beta$  structure within the class I aldolase family. *Structure* 4, 715-724.
- Kagan, R. M. und Clarke, S. (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 417-427.
- Kane, J. F. und Hartley, D. L. (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Tib. Tech.* 6, 95-101.
- Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirosawa, M.; Sugiura, M. und Sasamoto, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64 % to 92 % of the genome. *DNA Res.* 3, 109-136.
- Kartha, K. P. (1986) Iodine, a novel catalyst in carbohydrate reactions I. *O*-isopropylidination of carbohydrates. *Tetrahedr. Lett.* 27, 3415-3416.
- Kieser, T. und Hopwood, D. A. (1991) Genetic manipulation of *Streptomyces*: new integrating vectors and methods for gene replacement. *Meth. Enzymol.*, 204., 430-458.
- Klug, G. (1993) The role of mRNA degradation in the regulated expression of bacterial photosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* 9, 1-7.
- Kuo, M.-S. T.; Yurek, D. A.; Coats, J. H. und Li, G. P. (1989) Isolation and identification of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin, an unusual cosynthetic factor in *Streptomyces*, from *Streptomyces lincolnensis*. *J. Antibiot.* 42, 475-478.
- Kuo, M. S.; Yurek, D. A.; Coats, J. H.; Chung, S. T. und Li, G. P. (1992) Isolation and identification of 3-propylideneD1-pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *J. Antibiot.* 45, 1773-1777.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 309, 462-464.
- Lagunas, R. und Sols, A. (1968) *FEBS Lett.* 1, 32.
- Larson, E. R. und Danishefsky, D. (1983) A totally synthetic route to lincosamine. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 6715-6716.

- Lavallie, E. E.; Diblasio, E. A.; Kovacic, S.; Grant, K. L.; Schendel, P. F.; McCoy, J. M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology* 11, 187-193.
- Lin, Y.; Kieser, H. M.; Hopwood, D. A.; Chen, C. W. (1993) The chromosomal DNA of *S. lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* 10, 923-933.
- Lindquist, Y. und Schneider, G. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 422-427.
- Lombo, F.; Siems, K.; Brana, A. F.; Mendez, C.; Bindseil, K. und Salas, J. A. (1997) Cloning and insertional inactivation of *Streptomyces argillaceus* genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin. *J. Bacteriol.* 179, 3354-3357.
- Magerlein, B. J.; Birkenmeyer, R. D. und Kagan, F. (1967) Lincomycin V. Amino acid fragment. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2459-2464.
- Makrides, S. C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538.
- Marck, C. (1988) 'DNA-Strider': a 'C'-program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucl. Acids. Res.* 16, 1829-1836.
- Marolda, C. L. und Valvano, M. A. (1995) Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis region of the *Escherichia coli* VW 187 (O7:K1) *rfb* gene cluster: Identification of functional homologs of *rfbB* and *rfbA* in the *rff* cluster and correct location of the *rffE* gene. *J. Bacteriol.* 177, 5539-5546.
- May, T. B.; Shinabarger, D.; Boyd, A. und Chakrabarty, A. M. (1994) Identification of amino acid residues involved in the activity of phosphomannose isomerase-guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* 269, 4872-4877.
- 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.
- Mehta, P. K. und Christen, P. (1993) Homology of pyridoxyl-5'-phosphate-dependent aminotransferases with the *cobC* (cobalamin synthesis), *nifS* (nitrogen fixation), *pabC* (p-aminobenzoate synthesis) and *maly* (abolishing endogenous induction of the maltose system) gene products. *Eur. J. Biochem.* 211, 373-376.
- Mehta, P. K.; Hale, T. I. und Christen, P. (1993) Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur. J. Biochem.* 211, 373-376.
- Meister, A. (1962) Amino group transfer. In: Boyer, P. D., Lardy, H. und Myrbäck, K. (Hrsg.) *The enzymes*. 2nd edn, S. 193-217, Academic Press, New York, London.
- Michal, G. und Beutler, H. (1968) D-Fructose-1,6-diphosphate, dihydroxyacetone-phosphate and D-glyceraldehyde-3-phosphate. In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.) *Methods of enzymatic analysis*. 1 edn, S. 1315-1319, Verlag Chemie Weinheim; Academic Press, Inc., New York.

- Michalik, J.; Emilianowicz-Czerska, W.; Switalski, L. und Raczynska-Bjanowaska, K. (1975) Monophenol monooxygenase and lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. Antimicrob. Agents Chemother. 8, 526-531.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 433.
- Miosga, T.; Schaaff-Gerstenschläger, I.; Franken, E.; Zimmermann, F. K. (1993) Lysine 144 is essential for the catalytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* transaldolase. Yeast 9, 1241-1249.
- Mitchell, C.; Morris, P. W. und Vary, J. C. (1992) Identification of proteins phosphorylated by ATP during sporulation of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 174, 2474-2477.
- Mollet, B. und Pilloud, N. (1991) Galactose utilization in *Lactobacillus helveticus*: Isolation and characterization of the galactokinase (*galK*) and galactose-1-phosphate uridyltransferase (*galT*) genes. J. Bacteriol. 173, 4464-4473.
- Moradian, A. und Benner, S. A. (1992) A biometric biotechnological process for converting starch to fructose: thermodynamic and evolutionary considerations in applied enzymology. J. Am. Chem. Soc. 114, 6980-6987.
- Motamedi, H.; Shafiee, A. und Cai, S. (1995) Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces* spp. Gene 16, 25-31.
- Murakami, T.; Holt, T. G. und Thompson, C. J. (1989) Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 171, 1459-1466.
- Neusser, D.; Schmidt, H.; Spizek, J.; Novotna, J.; Peschke, U.; Kaschabeck, S.; Tichy, P.; Piepersberg, W. (1998) The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. Arch. Microbiol. 169, 322-32.
- Neusser, D. (1999) Untersuchungen zur Biosynthese der Propylprolin-Untereinheit des Antibiotikums Lincomycin A aus *Streptomyces lincolnensis*. Dissertation, BUGH Wuppertal.
- Novagen (1992) pET system manual. Novagen, Madison, USA.
- Oh, S. und Chater, K. F. (1997) Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): Possible relevance to other organisms. J. Bacteriol. 179, 122-127.
- Olins, P. O. und Lee, S. C. (1993) Recent advances in heterologous gene expression in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Biotechnol. 4, 520-525.
- Omura, S. (1992) The expanded horizon for microbial metabolites - A review. Gene 115, 141-149.
- Ovchinnikov, Y. A.; Egorov, C. A.; Aldonova, N. A.; Feigina, M. Y.; Lipkin, V. M.; Abdulaev, N. G.; Grishin, E. V.; Kiselev, A. P.; Modyanov, N. N.; Braunstein, A. E.;

- Polyanovsky, O. L. und Nosikov, V. V. (1973) The complete amino acid sequence of cytoplasmic aspartate aminotransferase from pig heart. FEBS Lett. 29, 31-34.
- Paget, M. S. B.; Hintermann, G. und Smith, C. P. (1994) Construction and application of streptomycete promotor probe vectors which employ the *Streptomyces glaucescens* tyrosinase-encoding gene as reporter. Gene 146, 105-110.
- Pearson, W. R. und Lipman, D. J. (1988) Improved tools for biological sequence analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 701-705.
- Pelle, R. und Murphy, N. B. (1993) Northern hybridization: Rapid and simple electrophoretic conditions. Nucl. Acids Res. 21, 2783-2784.
- Peschke, U.; Schmidt, H.; Zhang, H.-Z. und Piepersberg, W. (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Mol. Microbiol. 16, 1137-1156.
- Piepersberg, W. (1997) Molecular biology, biochemistry, and fermentation of aminoglycoside antibiotics. In: Strohl, W. R. (Hrsg.) Biotechnology of antibiotics. 2 edn, S. 81-163, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong.
- Piepersberg, W. (1994) Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. Crit. Rev. Biotechnol. 14, 251-258.
- Piepersberg, W. und Zeck, A. (1994) Mikrobieller Stoffwechsel. In: Präve, P.; Faust, U.; Sittig, W. und Sukatsch, D. A. (Hrsg.) Handbuch der Biotechnologie. 4 edn, S. 141-177, Oldenbourg Verlag, München.
- Pissowotzki, K.; Mansouri, K. und Piepersberg, W. (1991) Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*. Molecular structure and putative function of genes *strELMB2N*. Mol. Gen. Genet. 231, 113-123.
- Pöhling S. (1998) Analyse des allgemeinen Proteinsekretionsapparates von *Streptomyces griseus* und *Streptomyces galbus*. Dissertation, BUGH Wuppertal.
- Preston, A.; Maskell, D.; Johnson, A. und Moxon, E. R. (1996) Altered lipopolysaccharide characteristic of the I69 phenotype in *Haemophilus influenzae* results from mutations in a novel gene, *isn*. J. Bacteriol. 178, 396-402.
- Pospiech, A. und Neumann (1995) Quick and versatile method for the isolation of genomic DNA from gram-positive bacteria. TIG. 11, 217-218.
- Quiros, L. M.; Aguirrezabalaga, I.; Olano, C.; Mendez, C. und Salas, J. A. (1998) Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. Mol. Microbiol. 28, 1177-1185.
- Raetz, C. R.; Dowhan, W. (1990) Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 265, 1235-1238.

- Reizer, J.; Reizer, A. und Saier, M. H. (1995) Novel phosphotransferase system genes revealed by bacterial genome analysis - a gene cluster encoding a unique enzyme I and the proteins of a fructose-like permease system. *Microbiology* 141, 961-971.
- 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.
- Richardson, P. J. (1993) Transcription termination. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 1-30.
- Rudolph, R. und Lillie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB. J.* 10, 49-56.
- Rutter, W. J.; Hunsley, J. R.; Groves, W. E.; Calder, J.; Rajkumar, T. V. und Woodfin, B. M. (1966) Fructose diphosphate aldolase. *Meth. Enzymol.*, Volume IX, Carbohydrate metabolism, S. 479-486.
- Salah-Bey, K.; Blanc, V. und Thompson, C. J. (1995) Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene (*ptr*) in various *Streptomyces* spp. and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 17, 1001-1012.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schäferjohann, J.; Yoo, J.; Kusian, B. und Bowien, B. (1993) The *cbb* operons of the facultative chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus* encode phosphoglycolate phosphatase. *J. Bacteriol.* 175, 7329-7340.
- Schaff, I. S.; Hohmann, S. und Zimmermann, K. F. (1990) Molecular analysis of the structural gene for yeast transaldolase. *Eur. J. Biochem.* 188, 597-603.
- Schell, M. A. und Wilson, D. B. (1977) Purification and properties of galactokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 252, 1162-1166.
- Schein, C. H.; Noteborn, M. H. M. (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Biotechnology* 6, 291-294.
- Schmidt, H. (1989) Molekulare Analyse eines Lincomycin-Resistenzgens von *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Diplomarbeit Universität zu, Köln.
- Schmidt, H. (1994) Lincomycin-Biosynthese in *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Analyse von zwölf Genen mit vermuteter Beteiligung an der Synthese der Propylprolin-Untereinheit. Dissertation, BUGH Wuppertal.
- Schörken, U. (1997) Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Transketaolase und Transaldolase, sowie biochemische Charakterisierung der Enzyme aus *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Düsseldorf.



Schörken, U.; Jia, J.; Sahm, H.; Sprenger, G. A. und Schneider, G. (1998) Disruption of *Escherichia coli* transaldolase into catalytically active monomers: evidence against half-of-the-sites mechanism. FEBS Lett. 441, 247-250.

Shine, J. und Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1342-1346.

Skinner, R.; Cundliffe, E. und Schmidt, F. J. (1983) Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. J. Biol. Chem. 258, 12702-12706.

Slomp, G. und MacKellar, F. A. (1967) Lincomycin IV. Nuclear magnetic resonance studies on the structure of lincomycin, its degradation products and some analogs. J. Am. Chem. Soc. 89, 2454-2459.

Smith, D. R.; Doucette-Stamm, L. A.; Deloughery, C.; Lee, H.; Dubois, J.; Aldredge, T.; Bashirzadeh, R.; Blakely, D.; Cook, R.; Gilbert, K.; Harrison, D.; Hoang, L.; Keagle, P.; Lumm, W.; Pothier, B.; Qiu, D.; Spadafora, R.; Vicare, R.; Wang, Y.; Wierzbowski, J.; Gibson, R.; Jiwani, N.; Caruso, A.; Bush, D.; Safer, H.; Patwell, D.; Prabhakar, S.; McDougall, S.; Shimer, G.; Goyal, A.; Pietrowski, S.; Church, G. M.; Daniels, C. J.; Mao, J. R.; Nolling, J. und Reeve, J. N. (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. J. Bacteriol. 179, 7135-7155.

Smith-White, B. J. und Preiss, J. (1992) Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. J. Mol. Evol. 34, 449-464.

Sprenger, G. (1995) Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. Arch. Microbiol. 164, 324-330.

Sprenger, G. A. (1993) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K12 transketolase (*tkt*) gene. Biochim. Biophys. Acta. 1216, 307-310.

Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Sprenger, G. und Sahm, H. (1995) Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: Cloning of its gene, *talB*, and characterization of the enzyme from recombinant strains. J. Bacteriol. 177, 5930-5936.

Stahl, E. und Kaltenbach, U. (1961) J. Chromatography 5, 351.

Stock, J. B.; Ninfa, A. J. und Stock, A. M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev. 53, 1101-1105.

Stroeher, U. H.; Karageorgos, L. E.; Brown, M.H.; Morona, R. und Manning, P. A. (1995) A putative pathway for perosamine biosynthesis is the first function encoded within the *rfb* region of *Vibrio cholerae* O1. Gene 166, 33-42.

Strohl, W. R. (1992) Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. Nucl. Acids Res. 20, 961-974.

- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Studier, F. W.; Rosenberg, A. H.; Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185, 61-89.
- Stühler, K. (1999) Lincomycin-Biosynthese in *Streptomyces lincolnensis* NRRL2936: Mutagenesestudien zur Charakterisierung der N-Methyltransferase LmbJ. Diplomarbeit, BUGH Wuppertal.
- Stutzman-Engwall, K. J.; Otten, S. L. und Hutchinson, C. R. (1992) Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. *J. Bacteriol.* 174, 144-154.
- Subramaniam, P. S.; Xie, G.; Xia, T. und Jensen, R. A. (1998) Substrate ambiguity of 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase from *Neisseria gonorrhoeae* in the context of its membership in a protein family containing a subset of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthases. *J. Bacteriol.* 180, 119-127.
- Suter, M. A. (1983) Isolierung und Charakterisierung melaninnegativer Mutanten aus *Streptomyces glaucescens*. Dissertation Nr. 6276 Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich.
- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1074-1078.
- Takagi, M.; Takada, H. und Imanaka, T. (1990) Nucleotide sequence and cloning in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus stearothermophilus* pleiotropic regulatory gene *degT*. *J. Bacteriol.* 172, 411-418.
- Takayama, S.; McGarvey, G. J. und Wong, C. (1997) Microbial aldolases and transketolases: New biocatalytic approaches to simple and complex sugars. *Annu. Rev. Microbiol.* 285-310.
- Tchola, O. und Horecker, B. L. (1966) Transaldolase. *Meth. Enzymol.*, Volume IX, Carbohydrate Metabolism, 499-505.
- Thamm, S. (1998) Genetische und biochemische Untersuchungen von StrR - dem »pathway«-spezifischen Transkriptionsaktivator von Genen der Streptomycin-Biosynthese in *Streptomyces griseus* N2-3-11. Dissertation, BUGH Wuppertal.
- Thoden, J. B.; Hegeman, A.; Wesenberg, G.; Chapeau, M. C.; Rey, P. A. und Holden, H. M. (1997) Structural analysis of UDP-sugar binding to UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 36, 6294-6304.
- Thoden, J. B. und Holden, H. M. (1998) Dramatic differences in the binding of UDP-galactose and UDP-glucose from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37, 11469-11477.
- Thompson, G. J.; Howlett, G. J.; Ashcroft, A. E. und Berry, A. (1998) The *dhnA* gene of *Escherichia coli* encodes a class I fructose bisphosphate aldolase. *Biochem. J.* 331, 437-445.

- Thorson, J. S.; Kelly, T. M. und Liu, H. (1994) Cloning, sequencing and overexpression in *Escherichia coli* of the  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate cytidyltransferase gene isolated from *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Bacteriol. 176, 1840-1849.
- Trach, K.; Chapman, J. W.; Piggot, P.; Lecoq, D. und Hoch, J. A. (1988) Complete sequence and transcriptional analysis of the *spoOF* region of *Bacillus subtilis* chromosome. J. Bacteriol. 170, 4194-4208.
- Traut, T. W. (1994) The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. Eur. J. Biochem. 222, 9-19.
- Valverde, S.; Herradon, B.; Rabanal, R. M. und Martin-Lomas, M. (1987) Preparation of (4R,5S)-(5-methyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-ylmethyl)-phosphonium iodide. A synthetic approach to olguine: further model studies. Can. J. Chem. 65, 332-338.
- Vieira, M. und Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19, 259-268.
- Vijgenboom, E.; Woudt, L. P.; Heinstra, P. W. H.; Rietveld, K.; Ban Haarlem, J.; Van Wezel, G. P.; Shochat, S. und Bosch, L. (1994) Three *tuf*-like genes in the kirromycin producer *Streptomyces ramocissimus*. Microbiology 140, 983-998.
- Volff, J.; Eichenseer, C.; Viell, P.; Piendl, W. und Altenbuchner, J. (1996) Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. Mol. Microbiol. 21, 1037-1047.
- Wehmeier, U. F. (1995) New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors allowing blue-white screening on Xgal plates. Gene 165, 149-150.
- Weisblum, B. (1985) Inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity, and structural elements that regulate expression - a review. Antimicrob. Agents Chemother. 16, 63-90.
- Wierenga, R. K.; DeMaeyer, M. C. H. und Hol, W. G. J. (1985) Interaction of pyrophosphate moieties with  $\alpha$ -helixes in dinucleotide binding proteins. Biochemistry 24, 1346-1357.
- Wilkinson, D. L. und Harrison, R. G. (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Bio/Technology 9, 443-448.
- Wise, A. und Price, C. W. (1995) Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor  $\sigma^B$  in response to environmental signals. J. Bacteriol. 177, 123-133.
- Witke, C. und Götz, F. (1993) Cloning, sequencing and characterization of the gene encoding the class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Staphylococcus carnosus*. J. Bacteriol. 175, 7495-7499.
- Witz, D. F.; Hessler, E. J. und Miller, T. L. (1971) Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. Biochemistry, 1128-1132.

---

Wright, F. und Bibb, M. J. (1992) Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113, 55-65.

Xue, Y.; Zhao, L.; Liu, H. W. und Sherman, D. H. (1998) A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12111-12116.

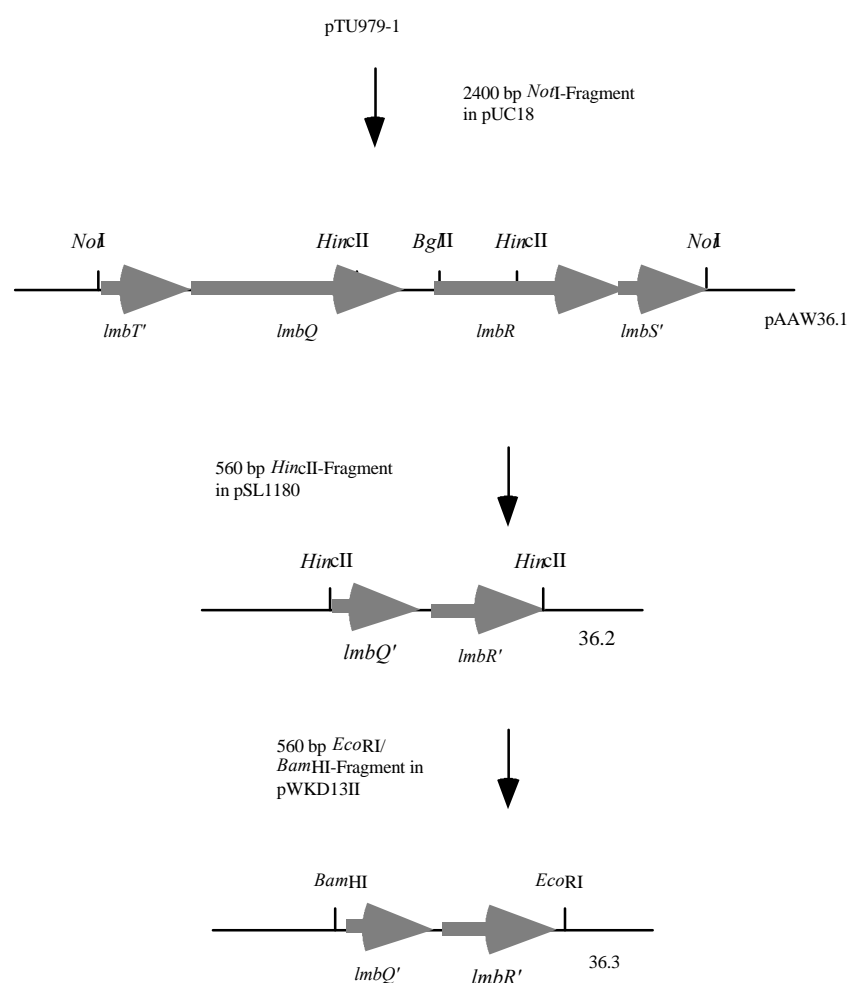
Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 page cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Yura, T.; Mori, H.; Nagai, H.; Nagata, T.; Ishihama, A.; Fujita, N.; Isono, K.; Mizubuchi, K. und Nakata, A. (1992) Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 0-2,4 min region. *Nucl. Acids Res.* 20, 3305-3308.

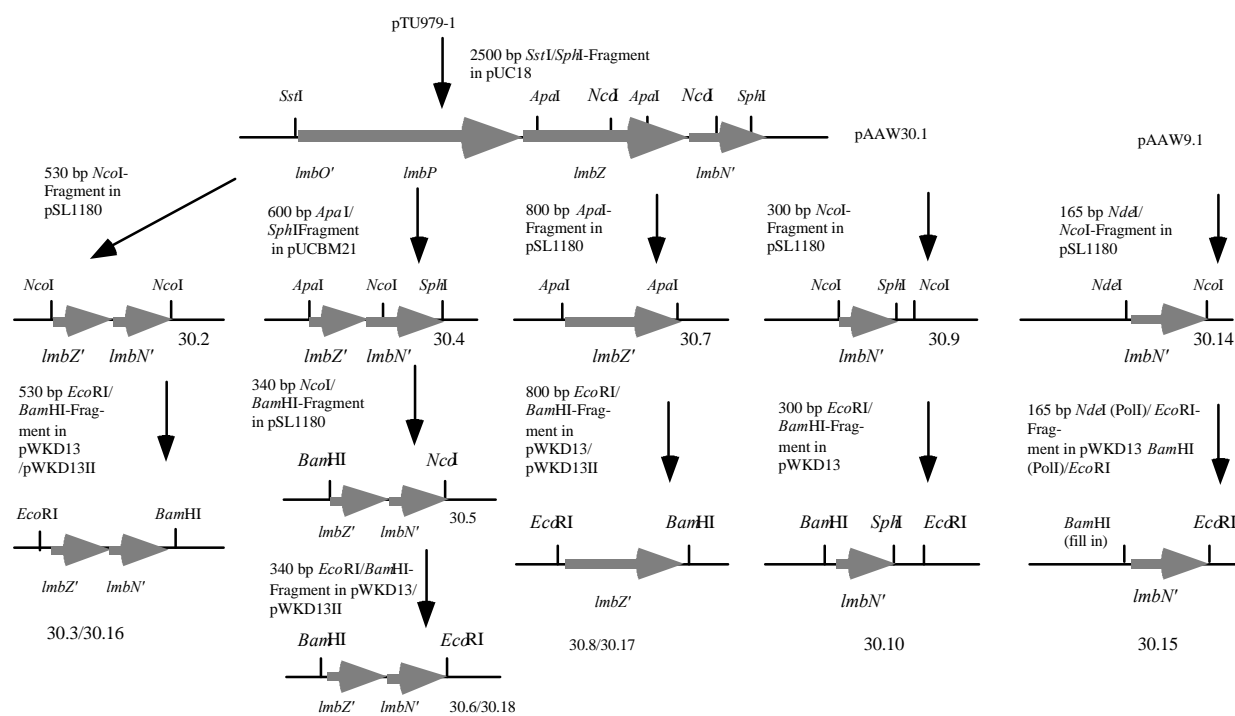
Zhang, H. Genetik und Biochemie der Lincomycin-Biosynthese in *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Klonierung und Analyse der Produktions- und Resistenzgene. Dissertation BUGH, Wuppertal.

Zhang, H.; Schmidt, H. und Piepertsberg, W. (1992) Molekular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* und *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.*, 2147-2157.

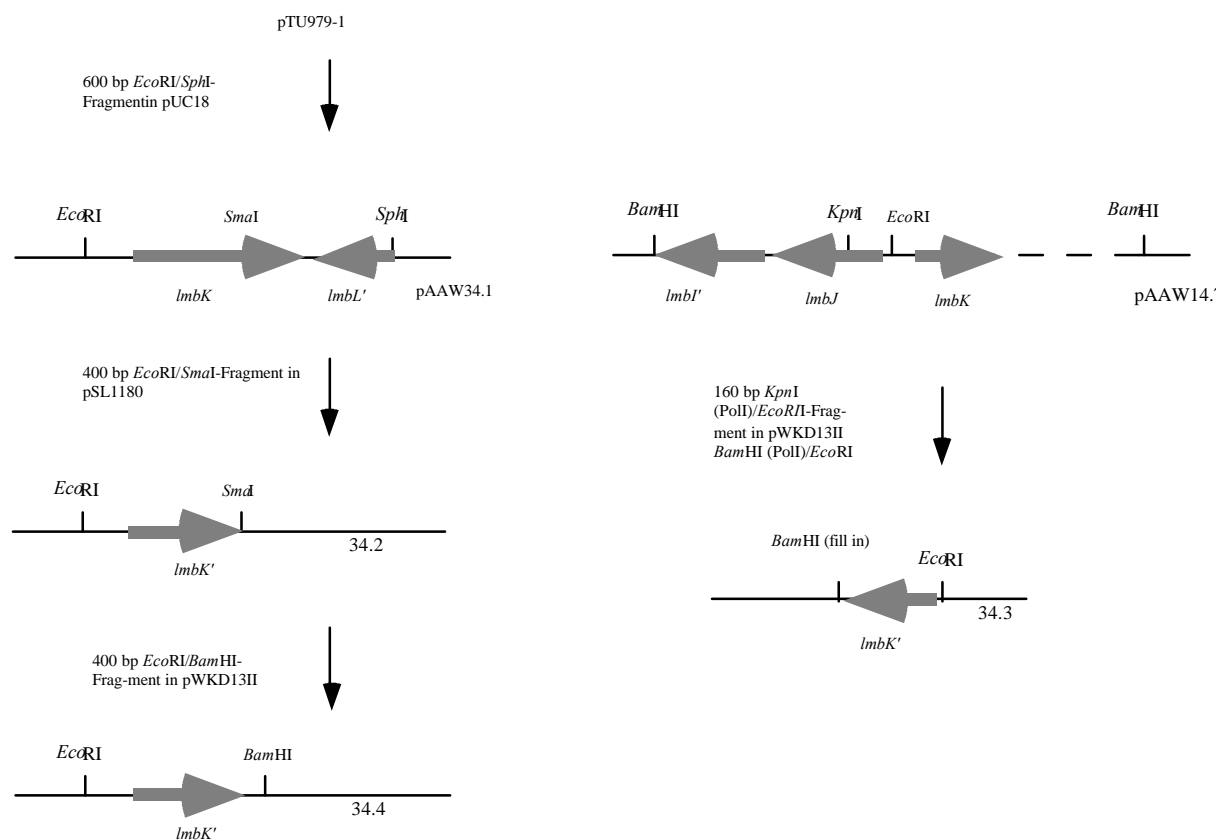
Zhang, M.; Eddy, C.; Deanda, K.; Finkelstein, M. und Picataggio, S. (1995) Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267, 240-243.



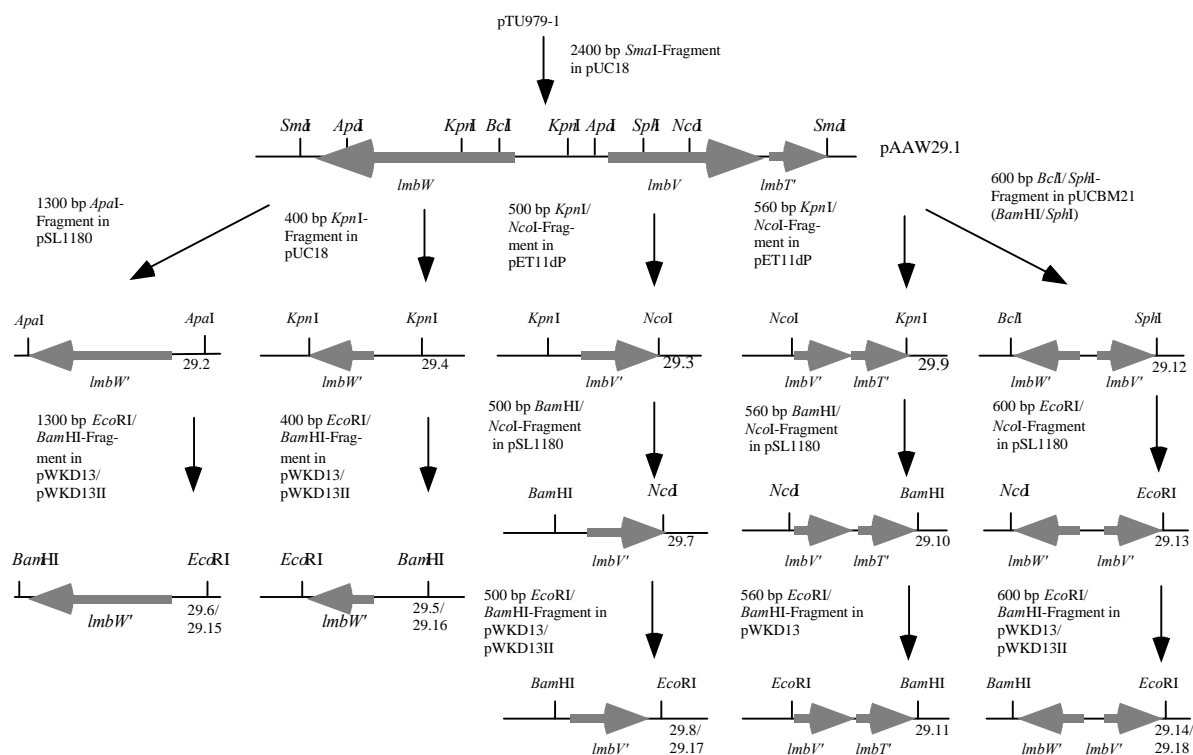
**Anhang 1: Konstruktion des Promotortestplasmids für den Bereich eines putativen Promotors *lmbRp*.** Als Promotortestvektor kam pWKD13II zur Verwendung. Die für die Konstruktion verwendeten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Die Gene sind als Pfeile, die Vektor-, Polylinker- bzw. die intergenischen Bereiche sind als Linien dargestellt. Die Richtungskontrolle des klonierten Fragments erfolgte mittels der *BgIII*-Restriktionsschnittstelle. Die aus dem Plasmid pAAW36.1 resultierende Zwischenkonstruktion und das Testplasmid sind in fortlaufender Nummerierung von 36.2 (= pAAW36.2) an benannt.



**Anhang 2: Konstruktion der Promotortestplasmide für den Bereich eines putativen Promotors *lmbNp*.** Als Promotortestvektoren kamen sowohl pWKD13 als auch pWKD13II zur Verwendung. Die für die Konstruktion verwendeten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Die Gene sind als Pfeile, die Vektor-, Polylinker- bzw. die intergenischen Bereiche sind als Linien dargestellt. Die Ligation nicht kompatibler überhängender Fragmentenden erfolgte nach Herstellung von stumpfen Enden, die durch Abdauen bzw. Auffüllen der überhängenden 5'- bzw. 3'-Enden mittels des Klenow-Fragments (große Untereinheit der DNA-PolymeraseI) generiert wurden. Die aus den Plasmiden pAAW30.1 oder pAAW9.1 resultierenden Zwischenkonstruktionen bzw. Testplasmide sind in fortlaufender Nummerierung von 30.2 (= pAAW30.2) an benannt. Abk.: Poll: Klenow-Fragment

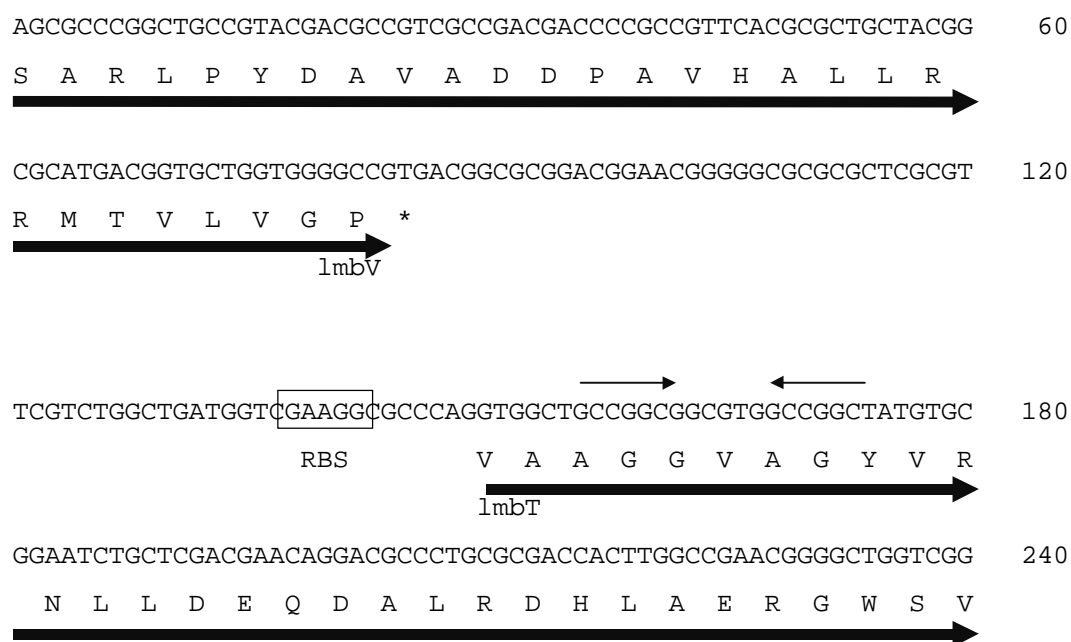


**Anhang 3: Konstruktion der Promortestplasmide für den Bereich eines putativen Promotors *lmbKp*.** Als Promortestvektor kam pWKD13II zur Verwendung. Die für die Konstruktion verwendeten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Die Gene sind als Pfeile, die Vektor-, Polylinker- bzw. die intergenischen Bereiche sind als Linien dargestellt. Die gestrichelte Linie in pAAW14.7 weiterhin, auf dem Plasmid enthaltenen Genen. Die Ligation nicht kompatibler überhängender Fragmentenden erfolgte nach Herstellung von stumpfen Enden, die durch Abdauen bzw. Auffüllen der überhängenden 5'- bzw. 3'-Enden mittels des Klenow-Fragments (große Untereinheit der DNA-PolymeraseI) generiert wurden. Die aus dem Plasmiden pAAW34.1 oder pAAW14.7 resultierenden Zwischenkonstruktionen bzw. Testplasmide sind in fortlaufender Nummerierung von 34.2 (= pAAW34.2) an benannt. Abk.: Poll: Klenow-Fragment

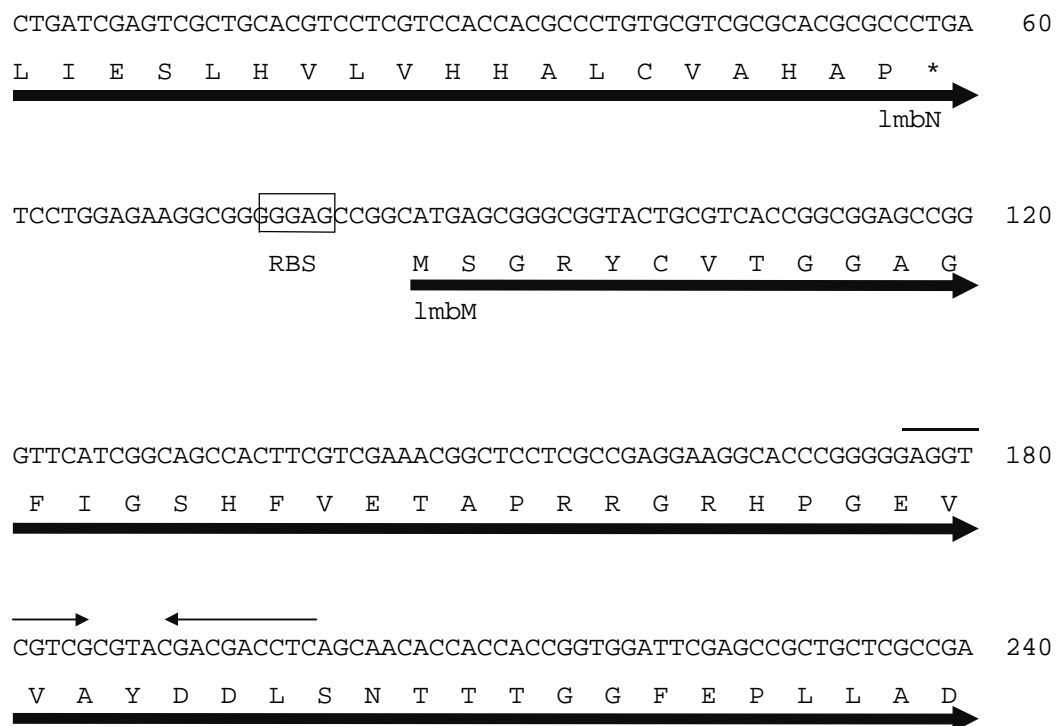


**Anhang 4: Konstruktionen der Promotortestplasmide für die Bereiche der putativen Promotoren *lmbVp* bzw. *lmbWp*.** Als Promotortestvektoren kamen sowohl pWKD13 als auch pWKD13II zur Verwendung. Die für die Konstruktion verwendeten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Die Gene sind als Pfeile, die Vektor-, Polylinker- bzw. die intergenischen Bereiche sind als Linien dargestellt. Die aus dem Plasmid pAAW29.1 resultierenden Zwischen-konstruktionen bzw. Testplasmide sind in fortlaufender Nummerierung von 29.2 (pAAW29.2) an benannt.





**Anhang 5: *S. lincolnensis*-Genbereich zwischen *lmbV* und *lmbT*.** Die dargestellte DNA-Sequenz umfaßt einen Teil von *lmbV*, den intergenischen Bereich zwischen *lmbV* und *lmbT* und den Anfangsbereich von *lmbT*. Unter der DNA-Sequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt. Die dick gedruckten Pfeile unterhalb der Sequenz kennzeichnen die partiellen Gene und die dünn gedruckten, gegeneinander gerichteten Pfeile oberhalb der *lmbT*-Sequenz markieren den »inverted repeat« (Pos. 154-173). Vor dem *lmbT*-Translationsstart wurde die mögliche RBS durch einen Kasten markiert.



**Anhang 6: *S. lincolnsensis*-Genbereich zwischen *lmbN* und *lmbM*.** Die dargestellte DNA-Sequenz umfaßt einen Teil von *lmbN*, den intergenischen Bereich zwischen *lmbN* und *lmbM* und den Anfangsbereich von *lmbM*. Unter der DNA-Sequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt. Die dick gedruckten Pfeile unterhalb der Sequenz kennzeichnen die partiellen Gene und die dünn gedruckten, gegeneinander gerichteten Pfeile oberhalb der *lmbM*-Sequenz markieren den »inverted repeat« (Pos. 175-199). Vor dem *lmbM*-Translationsstart wurde die mögliche RBS durch einen Kasten markiert.