

**Untersuchungen zum
dTDP-L-Mycarose-Biosyntheseweg des Erythromycin A-
Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338**

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
Dipl.-Chem. Petra Weingarten

Wuppertal, im Juni 2000

Der Zweifel ist das Wartezimmer der Erkenntnis.

Indisches Sprichwort

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 1996 bis Juni 2000 an der Bergischen Universität GH Wuppertal am Lehrstuhl für Chemische Mikrobiologie des Fachbereichs 9 (Chemie) in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Wolfgang Piepersberg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Piepersberg danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen Anregungen.

Bei Herrn Dr. S. Beyer bedanke ich mich ganz herzlich für seine geduldige Einführung in das für mich neue Arbeitsgebiet, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine hilfreichen Ratschläge.

Herrn Dr. U. Wehmeier gilt mein besonderer Dank für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für zahlreiche gute Tips.

Frau Dr. M.-C. Raynal (Aventis; Romainville, Frankreich) danke ich für die zur Verfügung gestellten Zwischenprodukte EB und MEB der Erythromycin A-Biosynthese, die *Sac. erythraea*-Mutanten BII92, 335, BIV87 und BVII98 sowie ihr reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Leadlay und Frau Dr. S. Gaisser (beide Cambridge) gilt mein Dank für die *Sac. erythraea*-Mutante Xho91. Herrn Dr. H. J. Krügel (HKI, Jena) danke ich für das *dnmT*-Gen, Herrn Prof. Dr. H. Pape (Universität Münster) für *S. fradiae* T59-235.

Bei Herrn PD Dr. L. Elling (IET, FZ Jülich) und seinen Mitarbeitern, besonders bei Frau N. Günther, möchte ich mich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme während meines zweimonatigen Forschungsaufenthalts am IET in Jülich, ihre tatkräftige Unterstützung, die Bereitstellung von RmlC, RmlD und dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-glucose sowie die präparative Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-glucose mit DnmU und RmlD bedanken.

Herrn Dr. G. Dräger (TU Clausthal) danke ich herzlich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Herrn Prof. Dr. H. E. Meyer und Herrn M. Blüggel (beide Ruhr-Universität Bochum) danke ich für die aktive Unterstützung bei den massenspektrometrischen Analysen.

Herrn Dr. A. Stratmann gilt mein Dank für die Erstkorrektur meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Piepersberg für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die kooperative Zusammenarbeit, zahlreiche (auch nicht fachliche) Diskussionen und die schöne Zeit, die wir zusammen verbracht haben.

Meinen Eltern und Martin Blüggel danke ich für das mir entgegengebrachte Verständnis, die moralische Unterstützung und für alles, was sie für mich getan haben.

Inhalt

Abkürzungen	V
Zusammenfassung	VII
Summary	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Sekundärmetabolite und das Makrolidantibiotikum Erythromycin A	1
1.2 Indikationen von Erythromycin A und die Entwicklung von Derivaten	4
1.3 Wirkungsweise von Erythromycin und Resistenzmechanismus	7
1.4 Das Gencluster für die Biosyntheseenzyme von Erythromycin A	8
1.5 Biosynthese von Erythromycin A	10
1.5.1 Überblick über die Biosynthese von Erythromycin A	10
1.5.2 Biosynthese des 14-gliedrigen Makrolactons 6-Desoxyerythronolid B	10
1.5.3 Post PKS Biosynthese von Erythromycin A	11
1.5.4 Biosynthese von dTDP-L-Mycarose	12
1.5.5 Biosynthese von dTDP-D-Desosamin	18
1.6 Metabolismus von 6-Desoxyhexosen	20
1.7 Ziele dieser Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Chemikalien und Enzyme	24
2.2 Medien	25
2.2.1 Nährmedien	26
2.2.2 Antibiotika	29
2.3 Bakterien und Plasmide	29
2.4 Oligonucleotide	41
2.5 Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien	43
2.5.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	43
2.5.2 Anzucht und Lagerung von Actinomyceten	43
2.5.3 Anzucht und Lagerung von <i>B. subtilis</i>	44
2.5.4 Anzucht und Lagerung von <i>M. luteus</i>	44
2.6 Hemmhoftests und Fütterungsversuche	44
2.7 Extraktion und MS-Analyse der Metabolite von <i>Sac. erythraea</i> -Stämmen	45
2.8 Molekularbiologische Methoden	45

2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren	45
2.8.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	45
2.8.3 In vitro Manipulation von DNA	46
2.8.4 Elution von DNA aus Agarosegelen	46
2.8.5 Radioaktive und nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	46
2.8.6 Southern Blotting, Kolonie Blotting und DNA-DNA-Hybridisierung	46
2.8.7 Sequenzierung von DNA	47
2.8.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
2.8.9 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	49
2.8.10 Herstellung von ss-DNA zur Transformation von <i>Sac. erythraea</i>	50
2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration	50
2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.11 Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membran	51
2.12 Immunologischer Nachweis immobilisierter His-tag-Proteine	51
2.13 Heterologe Genexpression	51
2.13.1 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter Kontrolle des Promotors $P_{T7\Phi10}$	51
2.13.2 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter Kontrolle des Promotors P_{T5}	52
2.13.3 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter Kontrolle des Promotors P_{rhaBAD}	52
2.13.4 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter Kontrolle des Promotors P_{trc}	52
2.13.5 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter Kontrolle des Promotors P_{ptr}	53
2.13.6 Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i> unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*}	53
2.13.7 Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i> unter Kontrolle des Promotors P_{tipA}	53
2.13.8 Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i> unter Kontrolle des Promotors P_{ptr}	53
2.14 Gewinnung zellfreier Extrakte von <i>E. coli</i> und <i>Streptomyces</i>	54
2.15 Reinigung von His-tag-Proteinen mittels Ni-NTA-Agarose	54
2.16 Q-Sepharose-Säulenchromatographie	54
2.17 Enzymtests	55
2.17.1 Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit Enzymen des L-Mycarose-Biosynthesewegs	55
2.17.2 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität von His-tag-DnmU	55
2.18 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)	56
2.19 Fast Performance Liquid Chromatographie (FPLC)	57
2.20 LC-MS-Kopplung	57
2.21 Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen	58

3. Ergebnisse	59
3.1 Konstruktion von Expressionsvektoren mit modifizierten Ribosomenbindestellen	59
3.2 Expression der <i>eryB</i> -Gene und ihrer Homologen	62
3.2.1 Heterologe Expression des Gens <i>eryBII</i>	62
3.2.1.1 Heterologe Expression des Gens <i>eryBII</i> in <i>E. coli</i>	62
3.2.1.2 Heterologe Expression des Gens <i>eryBII</i> in <i>S. lividans</i> TK23	64
3.2.2 Heterologe Expression des Gens <i>eryBIII</i>	65
3.2.2.1 Heterologe Expression des Gens <i>eryBIII</i> in <i>E. coli</i>	65
3.2.2.2 Heterologe Expression des Gens <i>eryBIII</i> in <i>S. lividans</i> TK23	67
3.2.3 Heterologe Expression des Gens <i>eryBIV</i>	68
3.2.3.1 Heterologe Expression des Gens <i>eryBIV</i> in <i>E. coli</i>	68
3.2.3.2 Heterologe Expression des Gens <i>eryBIV</i> in <i>S. lividans</i> TK23	70
3.2.4 Expression des Gens <i>eryBVI</i>	72
3.2.4.1 Heterologe Expression des Gens <i>eryBVI</i> in <i>E. coli</i>	72
3.2.4.2 Heterologe Expression des Gens <i>eryBVI</i> in <i>S. lividans</i> TK23	75
3.2.4.3 Homologe Expression des Gens <i>eryBVI</i> in <i>Sac. erythraea</i>	76
3.2.5 Heterologe Expression des Gens <i>eryBVII</i>	77
3.2.5.1 Heterologe Expression des Gens <i>eryBVII</i> in <i>E. coli</i>	77
3.2.5.2 Versuche zur heterologen Expression des Gens <i>eryBVII</i> in <i>S. lividans</i> TK23	79
3.2.6 Heterologe Expression des Gens <i>dnmU</i> aus <i>S. peucetius</i>	80
3.2.6.1 Heterologe Expression des Gens <i>dnmU</i> in <i>E. coli</i>	80
3.2.6.2 Heterologe Expression des Gens <i>dnmU</i> in <i>S. lividans</i> TK23	81
3.2.7 Heterologe Expression des Gens <i>dnmT</i> aus <i>S. peucetius</i>	82
3.2.7.1 Heterologe Expression des Gens <i>dnmT</i> in <i>E. coli</i>	82
3.2.7.2 Heterologe Expression des Gens <i>dnmT</i> in <i>S. lividans</i> TK23	84
3.3 Identifizierung und Klonierung des <i>tylCVI</i> -Gens aus <i>S. fradiae</i> T59-235	85
3.3.1 Nested PCR zur Identifizierung von <i>eryBVI</i> -homologen Genen	85
3.3.2 Klonierung und Analyse des DNA-Fragments aus <i>S. fradiae</i> T59-235	85
3.4 Erzeugung und Charakterisierung von <i>eryBVI</i> -Substitutionsmutanten	88
3.4.1 Strategie zur Erzeugung und Charakterisierung der Substitutionmutanten	88
3.4.2 Konstruktion der Suizid-Vektoren	89
3.4.3 Genotypische und phänotypische Charakterisierung der <i>eryBVI</i> -Mutanten	92
3.4.4 Fütterung der <i>eryBVI</i> -Substitutionsmutanten mit Zwischenprodukten der Erythromycin A-Biosynthese	95
3.5 Komplementation von <i>eryB</i> -Mutanten	96
3.6 Enzymtests	98
3.6.1 Partielle Reinigung von His-tag-DnmU	98

3.6.2 Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit Enzymen des L-Mycarose-Biosynthesewegs	98
3.6.3 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität von His-tag-DnmU	101
3.6.4 ¹ H-NMR-Spektroskopische Untersuchung des Reaktionsproduktes	102
4. Diskussion	104
4.1 Jedes Gen benötigt individuell optimierte Expressionsbedingungen	104
4.2 TylCVI und MidL gehören zur Familie der 2,3-Dehydratasen	108
4.3 Homologe Rekombination erzeugte <i>eryBVI</i> -Substitutionsmutanten	109
4.4 Komplementation von <i>eryB</i> -Mutanten	110
4.5 Der dTDP-L-Mycarose-Biosyntheseweg	114
5. Literatur	117
6. Anhänge	134

Abkürzungen

A	Ampere	HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High performance liquid chromatography)
ATCC	American Type Culture Collection (USA)	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
APS	Ammoniumpersulfat	ISP	International <i>Streptomyces</i> project
ATP	Adenosintriphosphat	k	Kilo-
bp	Basenpaare	kb	Kilobasen
BSA	Rinderserumalbumin	kbp	Kilobasenpaare
BUGH	Bergische Universität Gesamthochschule	kDa	Kilodalton
ca.	circa	LC	liquid chromatography
Ci	Curie	λ	Wellenlänge
CTP	Cytidintriphosphat	<i>M.</i>	<i>Micrococcus</i>
d	Tag	max	maximal
Da	Dalton	MEB	3'-O- α -Mycarosylerythronolid B
DEB	Desoxyerythronolid B	min	Minute(n)
DEBS	Desoxyerythronolid B Synthase	MW	Molekulargewicht
dest.	destilliert	M_r	relatives Molekulargewicht
DMSO	Dimethylsulfoxid	mRNA	messenger RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MS	Massenspektrometrie
DNase	Desoxyribonuklease	NADH	Nicotinamidadenindenukleotid (reduzierte Form)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate	NADPH	Nicotinamidadenindenukleotidphosphat (reduzierte Form)
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig	NMR	magnetische Kernresonanz
DOH	Desoxyhexose	nt	Nukleotide
dTDP	Desoxythymidintriphosphat	NTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol	O.D. _x	Optische Dichte bei x nm und 1 cm Schichtdicke
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	<i>orf</i> , ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
EB	Erythronolid B	p. a.	pro analysi
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PAA	Polyacrylamid
<i>erm</i>	erythromycin ribosome methylation	PAG	Polyacrylamid-Gel
<i>ery</i> , Ery	Erythromycin-Biosynthesegen, bzw. -protein (Genprodukt)	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ESI	Electrospray Ionisation	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
eV	Elektronenvolt	PEG	Polyethylenglycol
FPLC	Fast protein liquid chromatography	pers.	persönliche
Glc	Glucose	PKS	Polyketidsynthase
GTP	Guanosintriphosphat	PVDF	Polyvinylidifluorid
h	Stunde(n)	RBS	Ribosomenbindestelle
His	Histidin		

RNA	Ribonukleinsäure	TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure
RNase	Ribonuklease	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
RT	Raumtemperatur	tRNA	transfer Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)	ÜN	über Nacht
s.	siehe	ÜNK	Übernachtskultur
S	Svedberg-Einheit	Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>	UTP	Uridintriphosphat
<i>Sac.</i>	<i>Saccaropolyspora</i>	UV	Ultraviolettes Licht
<i>Sal.</i>	<i>Salmonella</i>	V	Volt
SAM	S-Adenosylmethionin	Vol	Volumen
SD	Shine-Dalgarno (Sequenz)	vgl.	vergleiche
SDS	Natriumdodecylsulfat	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
<i>Sv.</i>	<i>Streptoverticillium</i>		

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Überproduktion und die funktionelle Charakterisierung von fünf Enzymen des Biosynthesewegs von dTDP-L-Mycarose, einer Hexose-Komponente des Makrolidantibiotikums Erythromycin A.

- Die an der Biosynthese der dTDP-L-Mycarose des Erythromycin A-Produzenten *Sac. erythraea* NRRL 2338 beteiligten EryB-Proteine sowie einige der entsprechenden Dnm-Proteine aus dem Daunorubicin-Produzenten *S. peucetius* DSM 40754 wurden als lösliche native Proteine und/oder als His-tag-Fusionsproteine in *E. coli* und/oder in *S. lividans* produziert: EryBII (dTDP-2,6-Didesoxy-4-ketohexose 2,3-Reduktase), EryBIII (dTDP-2,6-Didesoxy-4-ketohexose 3-C-Methyltransferase), EryBIV (dTDP-2,6-Didesoxy-3-methyl-4-ketohexose 4-Reduktase), EryBVI, DnmT (dTDP-6-Desoxy-4-ketohexose 2,3-Dehydratase) und DnmU (dTDP-(2),6-Desoxy-4-ketohexose (3),5-Epimerase).
- Die Expressionsbedingungen wurden für jedes Gen individuell optimiert. Für die Genexpression in Streptomyceten wurden neue *E. coli*/Streptomyceten Shuttle-Vektoren konstruiert.
- *In vitro* Untersuchungen der enzymatischen Funktionen der an der dTDP-L-Mycarose-Biosynthese beteiligten Proteine lieferten weder Zwischenprodukte des Biosynthesewegs noch dTDP-L-Mycarose selbst.
- Das Protein DnmU aus *S. peucetius* wurde in Enzymtestansätzen als dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose 3,5-Epimerase identifiziert.
- Das zu *eryBVI* homologe Gen *tylCVI* aus *S. fradiae* T59-235 wurde identifiziert, kloniert und sequenziert. Außerdem wurde das Gen *midL* aus *S. mycarofaciens* ATCC 21454 sequenziert. Die beiden abgeleiteten Genprodukte TylCVI und MidL besitzen 53,9% Sequenzidentität zueinander. EryBVI, TylCVI und MidL gehören zur Familie der Hexose 2,3-Dehydratasen
- Mutanten von *Sac. erythraea* mit Defekten in den Genen *eryBII*, *eryBIII*, *eryBIV*, *eryBVI* bzw. *eryBVII* wurden zu Komplementationsversuchen verwendet. Alle mit His-tag fusionierten EryB-Proteine waren *in vivo* aktiv. DnmU und EryBVII besitzen identische Enzymfunktionen. DnmT aus *S. peucetius*, TylCVI aus *S. fradiae* und MidL aus *S. mycarofaciens* besitzen die gleiche enzymatische Funktion wie die 2,3-Dehydratase EryBVI.

Summary

The objective of this study was the overproduction and functional characterization of five enzymes involved in the biosynthesis of dTDP-L-mycarose a hexose moiety of the macrolide antibiotic erythromycin A.

- The EryB proteins involved in the dTDP-L-mycarose biosynthesis of the erythromycin A producer *Sac. erythraea* NRRL 2338 and some of the corresponding Dnm proteins from the daunorubicin producer *S. peucetius* DSM 40754 respectively were produced as soluble native and/or His-tag fusion proteins in *E. coli* and/or *S. lividans*: EryBII (dTDP-2,6-dideoxy-4-ketohexose 2,3-reductase), EryBIII (dTDP-2,6-dideoxy-4-ketohexose 3-C-methyl-transferase), EryBIV (dTDP-2,6-dideoxy-3-methyl-4-ketohexose 4-reductase), EryBVI, DnmT (dTDP-6-deoxy-4-ketohexose 2,3-dehydratase) and DnmU (dTDP-(2),6-deoxy-4-ketohexose (3),5-epimerase).
- The expression conditions were optimised for each gene individually. New *E. coli*/streptomycetes shuttle vectors were constructed for the gene expression in streptomycetes.
- *In vitro* enzymatic assays using the proteins mentioned above yielded neither intermediates of the dTDP-L-mycarose pathway nor dTDP-L-mycarose itself.
- In enzymatic assays the protein DnmU from *S. peucetius* was identified as dTDP-6-deoxy-4-keto-D-glucose 3,5-epimerase.
- The *tylCVI* gene of *S. fradiae* T59-235 which is homologous to *eryBVI* was identified, cloned and sequenced. Furthermore the gene *midL* from *S. mycarofaciens* ATCC 21454 was sequenced. The two deduced gene products TylCVI and MidL share 53.9% sequence identity. EryBVI, TylCVI and MidL are members of the hexose 2,3-dehydratase family.
- *Sac. erythraea* mutants with defects in the genes *eryBII*, *eryBIII*, *eryBIV*, *eryBVI* and *eryBVII*, respectively, were used in complementation assays. All EryB proteins with His-tag fusion were found to be active *in vivo*. DnmU and EryBVII possess identical enzymatic functions. The EryBVI homologous proteins DnmT from *S. peucetius*, TylCVI from *S. fradiae* and MidL from *S. mycarofaciens* exhibit the same enzymatic function as the 2,3-dehydratase EryBVI.

1. Einleitung

1.1 Sekundärmetabolite und das Makrolidantibiotikum Erythromycin A

Mehr als zwei Drittel der heute bekannten ca. 10000 biologisch aktiven Substanzen (Antibiotika, Antitumormittel, Antipilzmittel, antivirale Stoffe, Immunsuppressiva, Anthelminthika etc.) aus Mikroorganismen werden von Actinomyceten produziert (Piepersberg 1994). Aufgrund der extrem hohen Strukturvariabilität der verschiedenen Sekundärmetabolite spielen Actinomyceten als Produzenten von bioaktiven Substanzen eine dominierende Rolle auch in Screening-Programmen (Davies et al. 1992; Omura 1992a, b; Piepersberg 1994). Die Biosynthesewege von Antibiotika und anderen Sekundärmetaboliten in Actinomyceten werden intensiv untersucht. Zu nennen sind hier neben vielen anderen die Biosynthesewege von Erythromycin (Abb. 1-1; *Saccharopolyspora erythraea*; Parsons et al 1999; Kim et al. 1999; Gaisser et al. 1998; Salah-Bey et al. 1998; Gaisser et al. 1997; Summers et al. 1997; Doumith et al. 1999; diese Arbeit), Doxorubicin (*Streptomyces peucetius*, *Streptomyces* sp. C5; Bao et al. 1999; Madduri et al. 1998; Otten et al. 1997; Scotti und Hutchinson 1996), Oleandomycin (*Streptomyces antibioticus*; Olano et al. 1998; Quiros et al. 1997 u. 1995), Lincomycin (*Streptomyces lincolnensis*; Arnold 2000; Neußer 1999; Neußer et al. 1998; Peschke et al. 1995), Streptomycin (*Streptomyces griseus*; Ahlert et al. 1997; Fritsche et al. 1998; *Streptomyces glaucescens*; Beyer et al. 1998; Piepersberg und Distler 1997; Piepersberg 1995), Avermectin (*Streptomyces avermitilis*; Ikeda et al. 1999; Ikeda et al. 1998; MacNeil 1995) Carbomycin (*Streptomyces thermotolerans*; Arisawa et al 1995; Arisawa et al. 1994) und Tylosin (*Streptomyces fradiae*; Bate et al. 1999; Fouces et al. 1999; Wilson und Cundliffe 1998; Gandecha et al. 1997).

Das Makrolidantibiotikum Erythromycin A (Abb. 1-1), das 1952 von McGuire erstmals isoliert wurde (McGuire et al. 1952), wird als Sekundärmetabolit von dem Gram-positiven, Mycelbildenden, sporulierenden Bodenbakterium *Saccharopolyspora erythraea* (*Sac. erythraea*) NRRL 2338 gebildet (Labeda 1987).

Sac. erythraea gehört der Familie der Pseudonocardiaceae der Ordnung Actinomycetales an. Bei Wachstum auf festen Nährböden bildet *Sac. erythraea* zunächst ein aus verzweigten Hyphen bestehendes rotbraunes (*erythraea* = lat. rot) Substratmycel aus. Das pink- oder braungraue Erscheinungsbild der alternden Kolonien ist auf das Luftmycel zurückzuführen, welches kurze Sporenketten in Form unvollkommener Spiralen oder gerader oder gekrümmter Ketten enthält. Die Sporenoberfläche ist dornig. Der GC-Gehalt der *Sac. erythraea*-DNA beträgt 76,9 mol% (Lacey 1989), wie es für Actinomyceten, deren DNA einen GC-Gehalt von

über 70 mol% aufweist, typisch ist. Das lineare Chromosom von *Sac. erythraea* hat eine Größe von etwa 8 Mbp (Reeves et al. 1998).

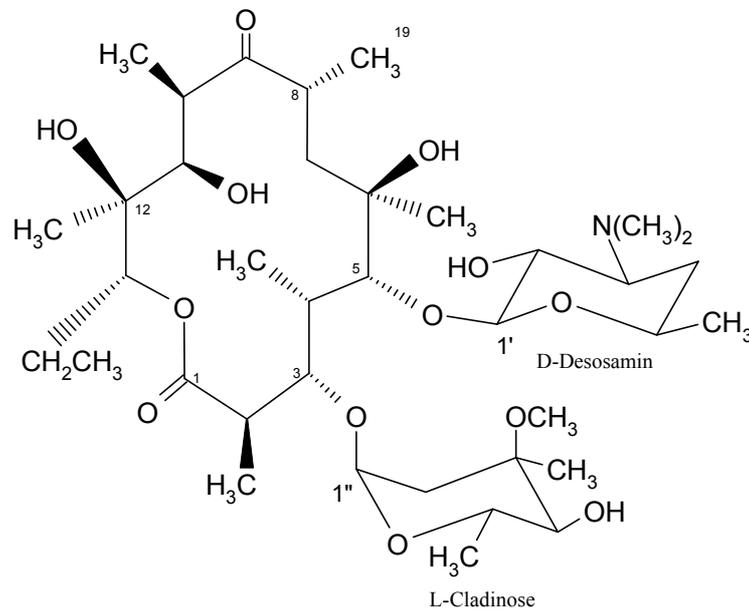


Abb. 1-1: Das 14-gliedrige Makrolidantibiotikum Erythromycin A

Erythromycin A besteht aus einem 14-gliedrigen Makrolactonring, an den zwei Desoxyhexosen kondensiert sind: die 2,6-Didesoxyhexose L-Cladinose an der C3-Position und die 3,4,6-Trideoxy-3-aminohexose D-Desosamin an der C5-Position (vgl. Abb. 1-1). Das Aglykon ohne Zuckerkomponenten ist nicht antibiotisch wirksam.

Dem Erythromycin strukturell sehr ähnlich ist das 14-gliedrige Makrolidantibiotikum Oleandomycin (Abb. 1-2), das von *Streptomyces antibioticus* produziert wird. Im Aglykon befindet sich im Gegensatz zum Erythromycin A an der C8-Position ein Epoxidring, die C6- und die C12-Position tragen keine Hydroxylgruppen und C13 trägt eine Methylgruppe anstelle der Ethylgruppe bei Erythromycin A. Während an der C5-Position im Oleandomycin ebenfalls die Aminohexose D-Desosamin angeknüpft ist, unterscheiden sich die Zuckerkomponenten der C3-Position. Im Oleandomycin befindet sich an dieser Stelle die 2,6-Didesoxyhexose L-Oleandrose. L-Oleandrose unterscheidet sich von L-Cladinose durch die fehlende Methylgruppe und die Stereochemie der Methoxygruppe an C3. Die 3-O-demethylierte Form der L-Cladinose ist die L-Mycarose. Diese Hexose bzw. ihre Derivate sind als Komponenten zahlreicher Makrolidantibiotika zu finden, wie beispielsweise in den 16-gliedrigen Makroliden Tylosin, Leucomycin A1, Midecamycin A2 und Platenomycin A1 (Abb. 1-2). Bei diesen Antibiotika ist das Mycarosederivat nicht direkt an das Aglykon angeknüpft, sondern jeweils α -glycosidisch an die Aminohexose D-Mycaminose gebunden. D-Mycaminose unterscheidet sich von D-Desosamin durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe an der C4-Position.

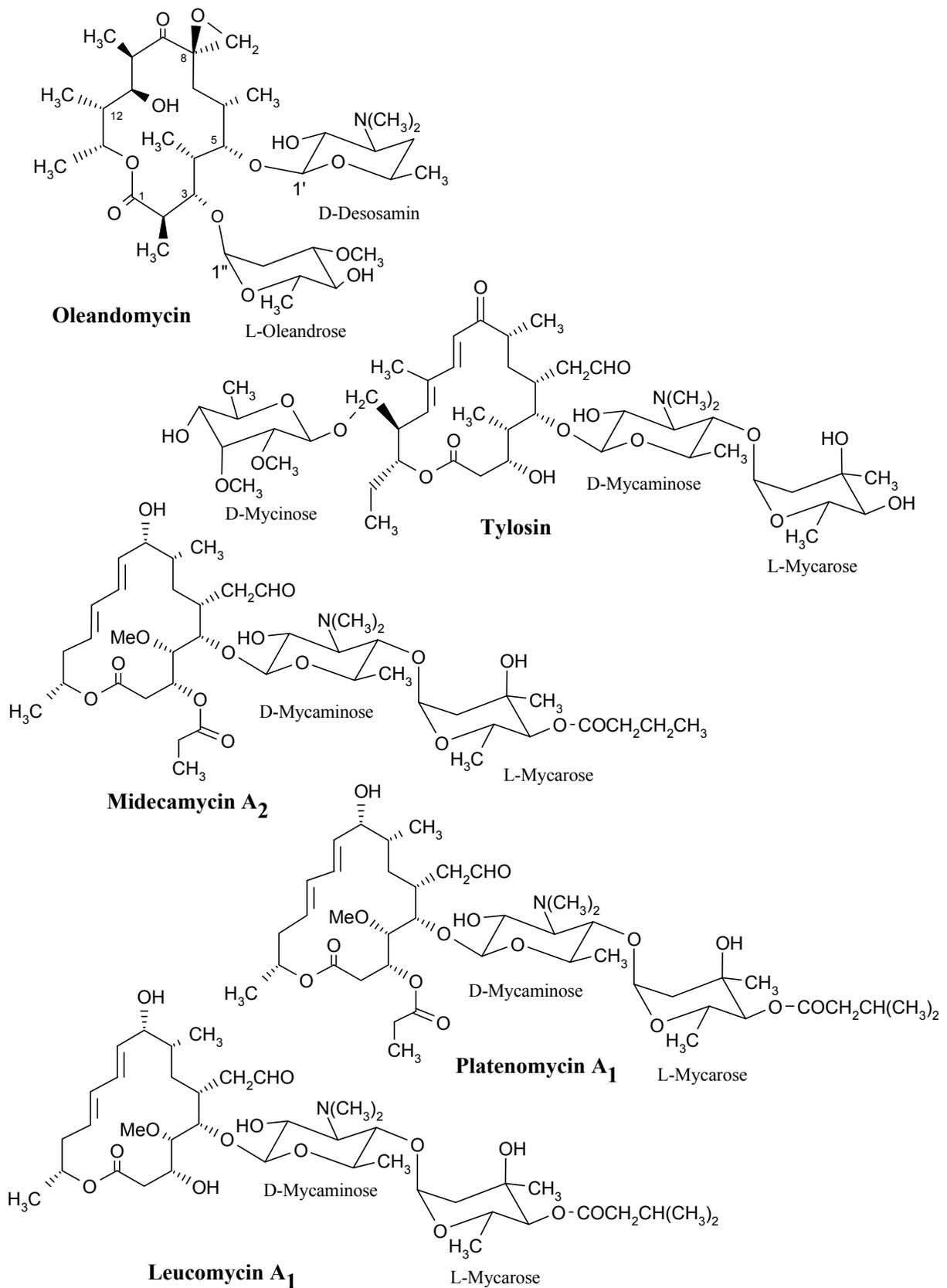


Abb. 1-2: 14- und 16-gliedrige Makrolidantibiotika, die strukturelle Gemeinsamkeiten mit Erythromycin A aufweisen. Oleanomycin wird von *S. antibioticus*, Midecamycin A₂ von *S. mycarofaciens*, Leucomycin von *Sv. cinnamoneum* und Platenomycin A₁ von *S. platensis* produziert.

1.2 Indikationen von Erythromycin A und die Entwicklung von Derivaten

Erythromycin-Derivate finden Anwendung gegen zahlreiche Infektionen Gram-positiver und Gram-negativer Pathogene sowie gegen Mycoplasma und Chlamydien. Wirksam sind Derivate des Erythromycins bei Infektionen der Atmungsorgane, die durch *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus pneumoniae* (*Diplococcus pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* (Erreger der Legionärskrankheit) oder *Bordetella pertussis* (Erreger des Keuchhustens) hervorgerufen werden sowie bei der Behandlung von Diphtherie (*Corynebakterium diphtheriae*), primärer Syphilis (*Treponema pallidum*) und Gonorrhö (*Neisseria gonorrhoeae*). Außerdem werden Erythromycin-Derivate bei der Behandlung von Infektionen, die durch *Streptococcus pyrogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis* oder *Ureaplasma urealyticum* ausgelöst werden, angewendet.

Die enorme Bedeutung von Polyketiden¹ in nahezu allen pharmazeutisch wichtigen Gebieten spiegelt sich in einem weltweiten Umsatz von mehr als 8-Milliarden USD pro Jahr wider (<http://www.kosan.com/K3prospectus.html>). Der Gesamtumsatz des Antibiotikamarktes wurde 1997 auf insgesamt 21,6 Milliarden USD geschätzt (IMS Health). Erythromycin und seine Derivate haben weltweit die größte Bedeutung unter den Makrolidantibiotika. Pro Jahr werden mehrere Tausend Tonnen Erythromycin produziert (Minas et al. 1998). Der Jahresumsatz von Erythromycin und den beiden semisynthetischen Derivaten Azithromycin und Clarithromycin (Abb. 1-4) betrug 1996 3,5 Milliarden USD (<http://www.kosan.com/K3prospectus.html>). 1998 überstieg allein der weltweite Jahresumsatz des Breitbandantibiotikums Clarithromycin (Biaxin[®]) 1,25 Milliarden USD (<http://abtweb2.abbott.com/news/1999news/pr042299.htm>). Hersteller von Erythromycin und seinen Derivaten sind unter anderem Abbott, Aventis, Pfizer und Taisho. Die auf dem Markt befindlichen Erythromycin-Derivate werden teilsynthetisch hergestellt, d.h. Erythromycin A wird aus *Sac. erythraea* Produktionsstämmen gewonnen und anschließend nach Bedarf derivatisiert. Die Totalsynthese von Erythromycin A mit seinen zehn asymmetrischen Zentren ist zwar möglich aber sehr aufwendig (Martin et al. 1997, Woodward et al. 1981).

Unter sauren Bedingungen zyklisiert Erythromycin intramolekular zunächst zum 8,9-Anhydroerythromycin-6,9-hemiketal gefolgt von einer zweiten intramolekularen Zyklisierung zum Erythromycin-6,9;9,12-spiroketal (Kirst 1990; Abb. 1-3). Durch diesen Zersetzungsprozeß, wie er auch im sauren Milieu des Magens stattfindet, wird die antibiotische Aktivität des Erythromycins zerstört. Seit den späten 80er Jahren wurden zahlreiche semisynthetische

¹ Als Polyketide werden Substanzen bezeichnet, deren Biosynthese in Analogie zur Fettsäurebiosynthese durch sequentielle Verknüpfung von Acyl-Coenzym-A-Einheiten (Acetyl- Propionyl, Butyryl-CoA bzw. deren durch Carboxylierung aktivierte Derivate) gekennzeichnet ist.

Varianten des Antibiotikums hergestellt. Hierdurch wurden zum einen Derivate entwickelt, die im sauren Milieu eine größere Stabilität als Erythromycin A besitzen, zum anderen wurde das Problem der zunehmenden mikrobiellen Antibiotikaresistenz angegangen, indem das antimikrobielle Spektrum, die pharmakokinetischen Eigenschaften und das Nebenwirkungsspektrum verbessert wurden. Zunächst wurden Modifikationen an denjenigen funktionellen Gruppen vorgenommen, die an der intramolekularen Zyklisierung beteiligt sind: an der C9-Ketofunktion, an der C6-Hydroxylgruppe, am C8-Proton und der C11,12-Diolgruppe.

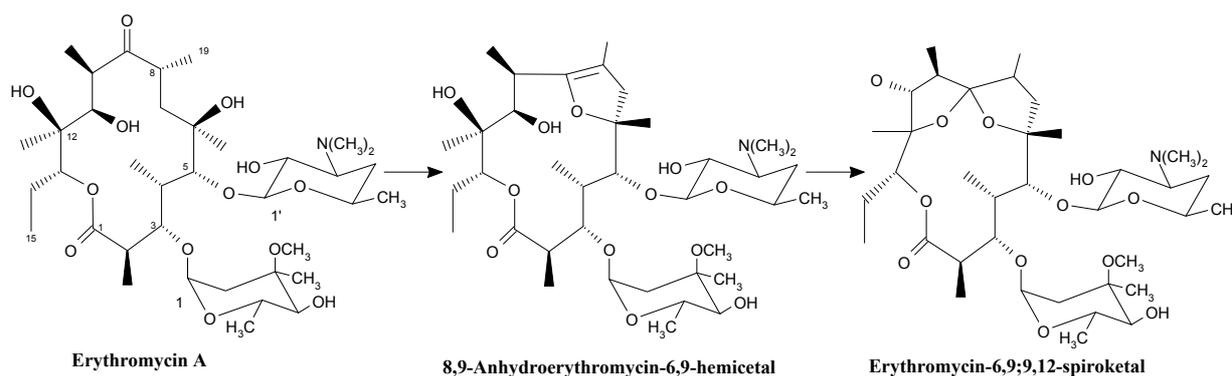


Abb. 1-3: Zersetzung von Erythromycin A durch intramolekulare Zyklisierung im sauren Milieu.

Die Konversion des 9-Ketons in einfache Oxime reduziert zwar die Tendenz der intramolekularen Zyklisierung aber auch gleichzeitig die antibiotische Wirksamkeit (Kirst 1990). Zur Verbesserung der antimikrobiellen Aktivität wurde eine Serie von *O*-alkylierten Oximen entwickelt. Unter diesen erwies sich das 9-[*O*-2(2-methoxyethoxy)methyl]Oxim (Roxithromycin, Rulid[®]; Abb. 1-4) als Verbindung mit den besten therapeutischen Eigenschaften. Eine weitere Modifikation der Ketogruppe stellt die Beckmann-Umlagerung des Ringsystems dar, die zu einem 15-gliedrigen Ringsystem, das ein *N*-Atom beinhaltet, führt (Djokic et al. 1987). Reduktion des Produktes der Beckmann-Umlagerung und anschließende *N*-Methylierung führte zu einem als Azithromycin bezeichneten Produkt (Bright et al. 1988), das unter dem Handelsnamen Zithromax[®] vertrieben wird (Abb. 1-4). Die Auswirkungen einer Alkylierung der C6-Hydroxylgruppe des Erythromycins wurden ebenfalls gründlich untersucht (Kirst 1990). Dies führte zur Auswahl des 6-*O*-methylierten Produktes (Clarithromycin; Morimoto et al. 1984). Weitere Erythromycin-Derivate, bei denen das C8-Proton durch Fluor ersetzt (Flurithromycin; Toscano et al. 1983) oder die Diolgruppierung an C11,12 in ein cyclisches Carbonat umgewandelt wurde (Morimoto et al. 1990), konnten ebenfalls die Stabilität des Erythromycins verbessern, erlangten aber keine Bedeutung als Pharmaka. Neuere Entwicklungen der semisynthetischen Erythromycin-Derivate stellen die Ketolide dar, die anstelle der Cladinose eine Ketogruppe an C3 besitzen. Sie induzieren keine MLS-Resistenz in Staphylokokken und Streptokokken und zeigen Wirkung gegen Bakterien, die bereits resistent gegenüber anderen Makrolidantibiotika sind. Zwei *in vitro* sehr wirksame Verbindungen dieser

Klasse sind HMR 3004 und HMR 3647 (Abb. 1-4; Ellie et al. 1998; Hoppe und Bryskier 1998; Reinert et al. 1998). HMR 3647 befindet sich in Phase III der klinischen Studien, und der Start des Genehmigungsverfahrens ist für 1999/2000 anvisiert (http://www.hmrpharma.com/hmrweb/products/dia_ketolide.asp).

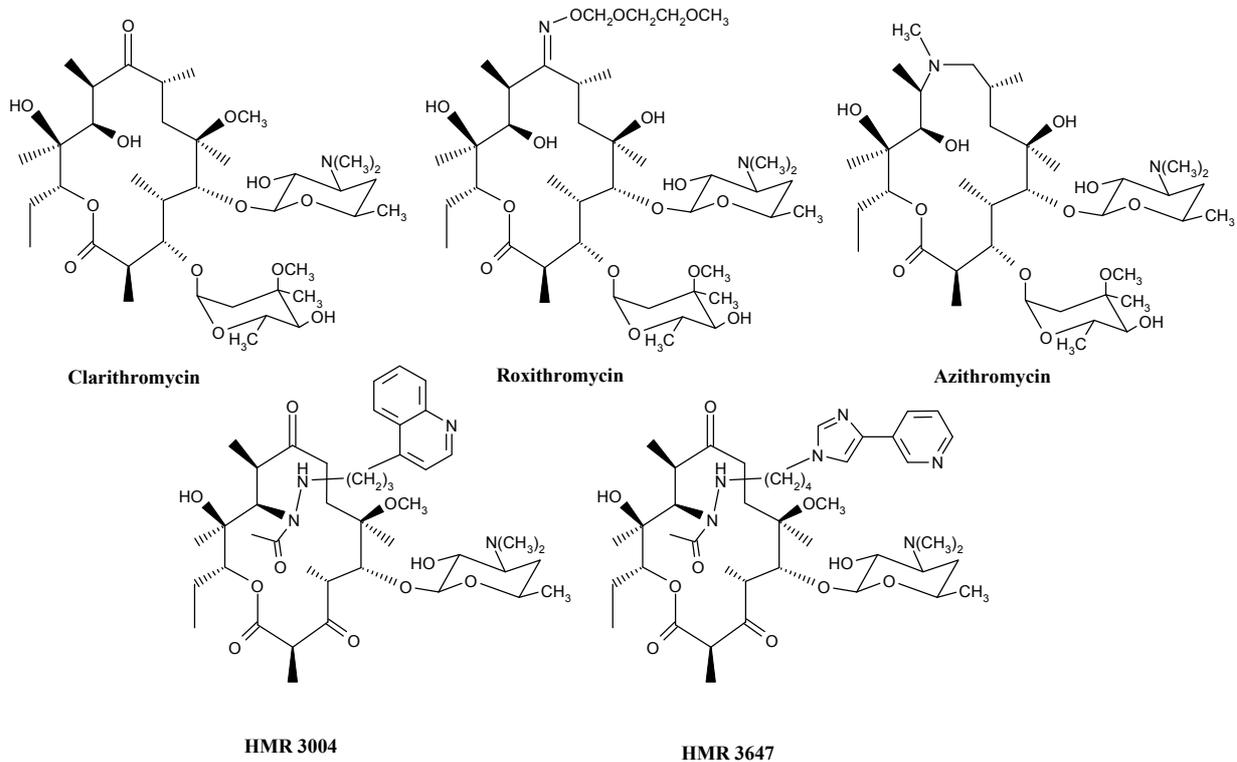


Abb. 1-4: Strukturen von neueren Erythromycin-Derivaten, die als Antibiotika Anwendung finden

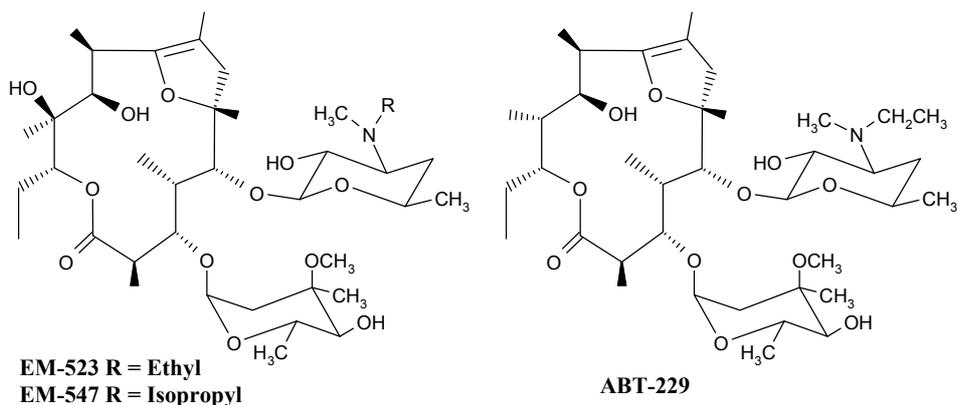


Abb. 1-5: Strukturen der Motilide EM-523, EM-547 und ABT-229, die als Medikamente bei gastrointestinalen Störungen Anwendung finden.

Neben der klassischen Anwendung von 14-gliedrigen Makroliden als antibakterielle Substanzen, werden 8,9-Anhydro-6,9-hemiketale des Erythromycins zur Stimulanz der gastro-

intestinalen Kontraktion eingesetzt. Diese Substanzen, die als Motilide bezeichnet und unter den Handelsnamen EM-523, EM-574 (Takeda) und ABT-229 (Abbott) vertrieben werden (Abb. 1-5), fungieren als Agonisten des gastrointestinalen Hormons Motilin, welches die gastrointestinale Bewegung aktiviert (Itoh 1997). Clarithromycin zeigt neben seiner verbesserten antibiotischen Wirksamkeit auch Antitumorwirkung (Sassa et al. 1999).

Auf genetischer Ebene stellt das *pathway engineering* einen Lösungsansatz zur Gewinnung von neuen Antibiotikastrukturen und Hybridantibiotika dar (Piepersberg 1994). Durch den genetischen Ansatz läßt sich die Variabilität der Strukturen erhöhen, denn durch das *pathway engineering* steht nun eine größere Anzahl an Grundgerüsten zur Verfügung, die wiederum modifiziert werden können. In den letzten Jahren konnte mehrfach gezeigt werden, daß durch gentechnische Veränderungen eines Produktionsstammes veränderte Makrolide gebildet werden, wie beispielsweise 6,12-Didesoxyerythromycin A (Stassi et al. 1998; Kakavas et al. 1998), 6-Desmethyl-6-ethylerythromycin A (Stassi et al. 1998; Post et al. 1998), 13-Desethyl-13-isopropylerythromycin A und 13-Desethyl-13-s-butylerythromycin A (Marsden et al. 1998) sowie weitere Erythromycin-Derivate (Katz und McDaniel 1999). Die Produktion dieser Hybridantibiotika zeigt deutlich, daß die späten Enzyme der Antibiotika-Biosynthese auch nicht natürliche Substrate prozessieren können. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für ein erfolgversprechendes *pathway engineering*. Während die an der Makrolidsynthese beteiligten Polyketidsynthasen inzwischen gut untersucht sind und auf diese Weise gezielte genetische Manipulationen wie z. B. den Austausch einzelner Module ermöglichen, ist über die Enzymatik der an der Synthese und am Transfer der 6-Desoxyhexosen beteiligten Schritte noch relativ wenig bekannt. Die Untersuchung der an diesen Biosyntheseschritten beteiligten Enzyme ist im Hinblick auf die immer größer werdende Wichtigkeit der Hybridantibiotika und die Modifikation der an das Makrolid angeknüpften Zuckerkomponenten von essentieller Bedeutung.

1.3 Wirkungsweise von Erythromycin und Resistenzmechanismus

Erythromycin A wirkt ebenso wie andere Makrolidantibiotika als Inhibitor der ribosomalen Proteinbiosynthese. Das Antibiotikum bindet an die 2058-2062 Region (*E. coli*-Nummerierung) der 23S rRNA der 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms (Chu 1999). Auf diese Weise wird die Dissoziation der Peptidyl-tRNA vom Ribosom während des Translokationsprozesses gefördert (Brisson-Noel et al 1988).

Zunehmende Antibiotikaresistenz pathogener Keime ist heute ein dringendes klinisches Problem. Gegen Erythromycin und andere Makrolide resistente Bakterien sind häufig zugleich auch gegen Lincosamide (Lincomycin, Clindamycin) sowie Streptogramine des B-Typs einschließlich Virginiamycin S resistent (MLS-Resistenz; Lai und Weisblum 1971). Die

Resistenzbildung ursprünglich Erythromycin-sensitiver Keime und auch von *Sac. erythraea* selbst erfolgt durch posttranskriptionale Modifikation der 23S-rRNA durch Adenin-spezifische N-Methyltransferasen, die S-Adenosylmethionin als Methyl donor verwenden. Die N⁶-Methylierung erfolgt am Adenin-Ribonucleotid A2058 (*E. coli*-Nummerierung) in der Domäne V der 23S-rRNA (Vester et al. 1998). Die Methyltransferasen werden durch eine Klasse von Genen, die als *erm*-Gene (erythromycin ribosome methylation genes) bezeichnet werden, kodiert (Weisblum 1995a). Bis heute sind etwa 30 *erm*-Methyltransferase-Gene, die teilweise konstitutiv, teilweise induzierbar exprimiert werden (Chu 1999), aus klinischen Pathogenen und Antibiotika-produzierenden Actinomyceten bekannt. Das Resistenzgen *ermE* aus *Sac. erythraea* wird konstitutiv exprimiert (Skinner und Cundliffe 1982). Bei induzierbarer Genexpression z. B. bei *ermSF* (*S. fradiae*), bei *ermA* und *ermC* (beide *Staphylococcus aureus*) findet die Regulation der Enzymsynthese auf dem Niveau der Translation der betreffenden mRNA statt (*translational attenuation*). Bei Inhibition der ribosomalen Aktivität infolge der Bindung der MLS-Antibiotika wird eine Konformationsänderung der mRNA unter Freigabe eines weiteren translationsaktiven Bereiches eingeleitet, der die eigentliche Methyltransferasebildung kodiert (Weisblum 1995b).

1.4 Das Gencluster für die Biosyntheseenzyme von Erythromycin A

Wie auch bei anderen Antibiotika-produzierenden Organismen (Hopwood und Sherman 1990), befinden sich die Gene für die Biosynthese von Erythromycin A bei *Sac. erythraea* innerhalb eines Genclusters (Abb. 1-6). Alle bisher identifizierten *ery*-Gene befinden sich in einem Segment von etwa 55 kbp Länge innerhalb des *Sac. erythraea* Chromosoms (Donadio et al. 1993). Dieses Segment befindet sich in einem Abstand von etwa 700 kbp bis 1.25 Mbp vom Ende des linearen Chromosoms (Reeves et al. 1998). Inzwischen wurde die *ery*-Genregion kloniert und sequenziert (Cortes et al. 1990; Bevitt et al. 1992; Stassi et al. 1993; Gaisser et al. 1997; Summers et al. 1997; Gaisser et al. 1998). Das Gen *eryCI* und das Erythromycin-Resistenz-Gen *ermE* befinden sich an einem Ende und *eryK* am anderen Ende dieses aus 21 eng beieinander liegenden offenen Leserahmen bestehenden Genclusters. Es ist unwahrscheinlich, daß jenseits dieser Gene noch zusätzliche Leserahmen lokalisiert sind, die unmittelbar an der Biosynthese von Erythromycin A beteiligt sind (Pereda et al. 1997). Das Cluster gliedert sich in drei Teile. Der mittlere Teil, der mehr als die Hälfte des gesamten Genclusters ausmacht, besteht aus den drei *eryA*-Genen, die die polyfunktionellen Polyketid-Synthasen für die Aglykon-Biosynthese kodieren. Dieser Bereich ist von kürzeren monofunktionellen Genen umgeben, die für die Biosynthese der Desoxyhexosen, ihre Anknüpfung an das Makrolacton und eine Reihe von Einzelschritt-Modifikationen am Makrolid verantwortlich sind.

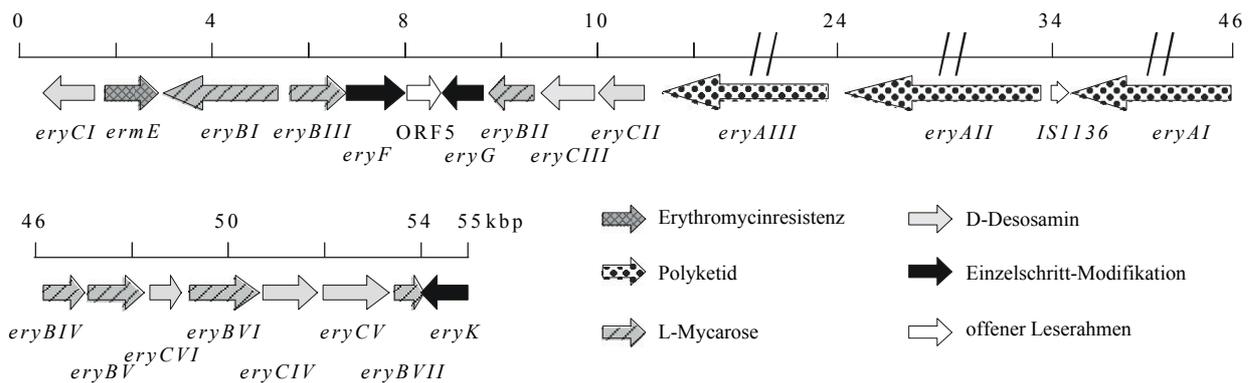


Abb. 1-6: Organisation des Genclusters für die Biosynthese von Erythromycin A aus *Sac. erythraea*. Die Lage und Orientierung der Gene, die entsprechend ihrer Funktion als verschieden ausgefüllte Pfeile dargestellt sind, sind entsprechend der DNA-Sequenzanalyse eingezeichnet. 2 kbp vor der *Bam*HI-Erkennungssequenz am Beginn des *ermE*-Gens wurde willkürlich die 0 kbp-Koordinate gesetzt. Die *eryA*-Gene im Zentrum des Genclusters kodieren für die Polyketidsynthasen, die *eryB*-Gene für Proteine, die an der Biosynthese und Anknüpfung von L-Mycarose beteiligt sind und die *eryC*-Gene für Proteine, die an der Biosynthese und Anknüpfung des D-Desosamins beteiligt sind. Gene für Einzelschritt-Modifikationen sind als schwarz ausgefüllte Pfeile dargestellt.

Die Funktionen der einzelnen Gene wurde durch Analyse von Mutanten, die in der Erythromycin-Biosynthese gestört waren (Weber et al. 1985), sowie durch gezielte Inaktivierung einzelner Gene des Clusters (Dhillon et al. 1989; Weber et al. 1990; Gaisser et al. 1997; Summers et al. 1997; Salah-Bey et al. 1998; Gaisser et al. 1998) analysiert. Die *eryB*-Gene kodieren Enzyme, die an der Biosynthese der L-Mycarose und ihrer Kondensation mit dem Aglykon beteiligt sind, während die *eryC*-Gene die Biosyntheseenzyme zur Synthese von D-Desosamin und seiner Anknüpfung an das Aglykon kodieren.

Das Gencluster für die Biosynthese von Erythromycin unterscheidet sich in einigen Punkten von den Genclustern anderer Sekundärmetabolit-Produzenten: Die Gene, die für die dTDP-D-Glucose-Synthase (*glt*) und für die dTDP-D-Glucose 4,6-Dehydratase (*gdh*) kodieren und für die ersten Biosyntheseschritte der Desoxyhexosen benötigt werden, befinden sich nicht wie bei anderen Antibiotikaproduzenten innerhalb des zugehörigen Genclusters (Pissowotzki et al. 1991; Donadio et al. 1993), sondern an anderer Stelle im Chromosom von *Sac. erythraea* (Linton et al. 1995; Reeves et al. 1998). Direkt benachbart zum *gdh*-Gen befindet sich das *kde*-Gen, das für ein Protein kodiert, welches Sequenzhomologie zu dTDP-4-Keto-6-desoxyhexose 3,5-Epimerasen zeigt. Dieses ist möglicherweise ebenfalls an der Biosynthese der Desoxyhexosen beteiligt. Darüber hinaus liegen innerhalb der *ery*-Genregion von *Sac. erythraea* keine globalen Regulatoren des Sekundärstoffwechsels, wie man sie z. B. beim Tylosin-Produzenten *S. fradiae* findet (Fernandez-Moreno et al. 1991; Geistlich et al. 1992; Bate et al. 1999).

1.5 Biosynthese von Erythromycin A

1.5.1 Überblick über die Biosynthese von Erythromycin A

Die Biosynthese von Erythromycin A (Abb. 1-7) kann in zwei Phasen unterteilt werden. In der ersten Biosynthesephase wird der Polyketidanteil des Antibiotikums aus sieben C_3 -Einheiten aufgebaut. Hierbei entsteht als erstes enzymfreies Zwischenprodukt 6-Desoxyerythronolid B (6DEB). In der zweiten Phase der Biosynthese wird das 6-Desoxyerythronolid B in einer Reihe von enzymatischen Schritten in Erythromycin A umgewandelt.

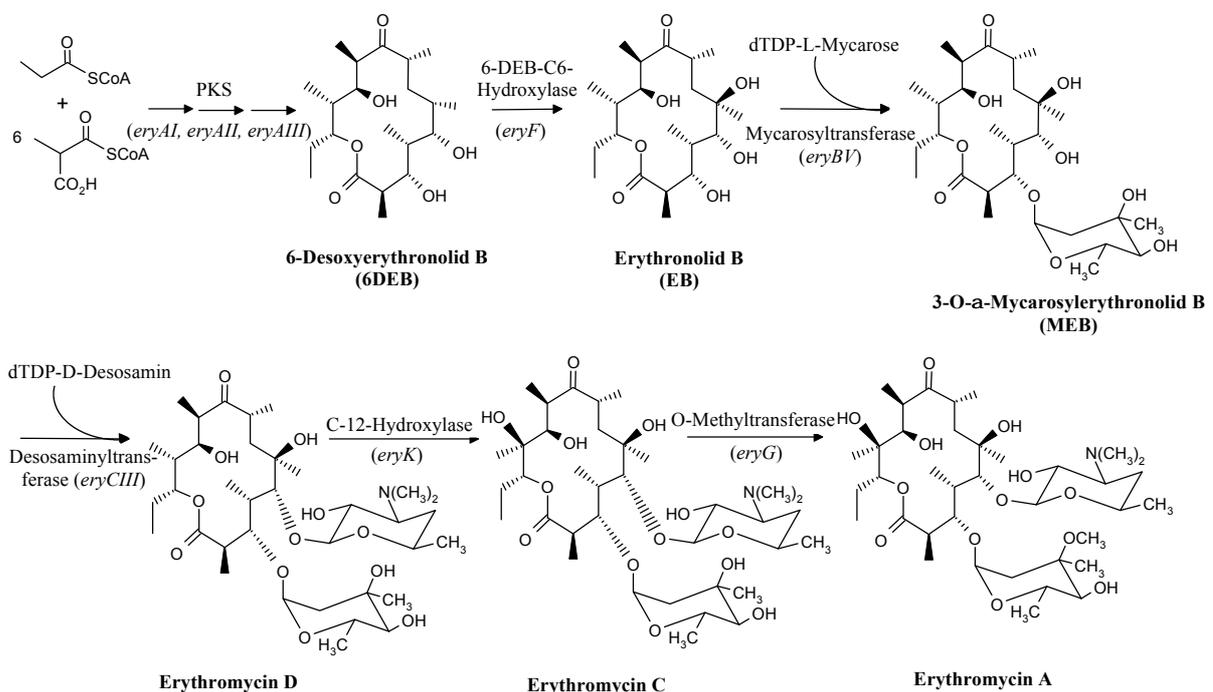


Abb. 1-7: Biosynthese von Erythromycin A. Neben der Kondensation der sieben C_3 -Bausteine zum 14-gliedrigen Makrolid sind hier die späten Schritte der Erythromycin A-Biosynthese dargestellt. Die Reaktionspfeile sind jeweils mit der Funktion des am Reaktionsschritt beteiligten Proteins sowie in Klammern mit der Bezeichnung des Gens, das für das jeweilige Protein kodiert, beschriftet. Die beiden letzten Schritte der Biosynthese können auch in umgekehrter Reihenfolge allerdings mit deutlich niedrigerer Effizienz ablaufen.

1.5.2 Biosynthese des 14-gliedrigen Makrolactons 6-Desoxyerythronolid B

Das Makrolacton-Grundgerüst des Erythromycins A wird aus sieben C_3 -Einheiten aufgebaut (siehe auch 1.5.1). Dies geschieht durch sequentielle Kondensation von einem Molekül Propionyl-CoA mit sechs Molekülen 2-Methylmalonyl-CoA durch eine Polyketidsynthase (PKS). Polyketidsynthasen sind den Fettsäuresynthetasen sehr ähnlich. Die PKS aus *Sac. erythraea*, die 6-Desoxyerythronolid B Synthase (DEBS), wird aus drei multifunktionellen Polypeptiden (DEBS 1, DEBS 2 und DEBS 3) gebildet, für die die Gene *eryAI*, *eryAII* und

eryAIII kodieren (Cortes et al. 1990; Donadio et al. 1991; Bevitt et al. 1992; Caffrey et al. 1992). Die Polyketidsynthase-Gene sind hoch konserviert, und als multifunktionelles Protein zählt die 6-Desoxyerythronolid B Synthase zum Typ I der Polyketidsynthasen (Hopwood 1993; Katz 1993). Die katalytischen Domänen der DEBS sind in sechs Modulen organisiert (Donadio et al. 1991). Jedes Modul enthält alle Funktionen, die für einen einzelnen spezifischen Kondensationsschritt und die damit verbundene Prozessierung der neu entstandenen β -Ketogruppe notwendig sind. Somit enthält jedes Modul eine Ketosynthase (KS)- eine Acyltransferase (AT)- und eine Acyl-Carrier Protein (ACP)-Domäne. Die AT ist für die korrekte Auswahl der nächsten Kettenverlängerungseinheit verantwortlich, während die KS den eigentlichen Kondensationsschritt katalysiert. Die ACP-Domäne bindet die wachsende Polyketidkette an die KS und übernimmt die entsprechende Kettenverlängerungseinheit von der zuständigen AT. Zusätzlich zu den genannten Domänen können noch eine β -Ketoreduktase (KR)-, eine Dehydratase (DH)- und eine Enoylreduktase (ER)-Domäne im jeweiligen Modul vorhanden sein. Die exakte Zusammensetzung der Domänen in einem Modul ist abhängig von der weiteren Prozessierung der neu entstandenen β -Ketogruppe. Jedes der drei großen multifunktionellen Polypeptide (DEBS 1, DEBS 2 und DEBS 3) enthält zwei solcher Module, so daß die DEBS insgesamt sechs Module besitzt, die jeweils einen der sechs sukzessiven Kondensationszyklen zum Aufbau des 14-gliedrigen Makrolactons katalysieren. Die Reihenfolge der sechs Kondensationsschritte mit anschließender Prozessierung ist kollinear mit der Reihenfolge der sechs Module auf genetischer Ebene, die insgesamt 28 katalytische Domänen beinhalten (Staunton und Wilkinson 1997). Am *N*-Terminus des ersten Proteins, DEBS 1, befindet sich ein „Beladungsmodul“, bestehend aus einer AT- und einer ACP-Domäne für die Startereinheit Propionyl-CoA. Die Intermediate der Polyketidsynthese bleiben während der gesamten Biosynthese über Thioesterbindungen an die Polyketidsynthase gebunden. Im Anschluß an das letzte Modul von DEBS 3 befindet sich eine Thioesterase (TE)-Domäne, die die Zyklisierung des Rings und die Ablösung des 6-Desoxyerythronolids B von der PKS katalysiert.

1.5.3 Post PKS Biosynthese von Erythromycin A

Die Hydroxylierung an C6 stellt die erste Modifikation des durch die Polyketidsynthasen gebildeten Makrolids dar. Die Reaktion wird durch EryF, eine Cytochrom P450 Monooxygenase, katalysiert (Weber et al. 1991) und findet unter Retention der Konfiguration statt. Das Gen *eryF* wurde in *E. coli* überexprimiert und die 3D-Struktur des Proteins aufgeklärt (Cupp-Vickery et al. 1995). Im nächsten Schritt wird durch EryBV katalysiert L-Mycarose an die C3-Hydroxylgruppe gebunden (Gaisser et al. 1997; Summers et 1997). Anschließend erfolgt die Anknüpfung des Aminozuckers D-Desosamin an die C5-Hydroxylgruppe durch EryCIII

(Gaisser et al. 1997; Summers et al. 1997), wobei das erste antibiotisch aktive Intermediat der Biosynthese, Erythromycin D, entsteht. Die Biosynthese von Erythromycin A wird durch die C12-Hydroxylierung katalysiert durch EryK unter Retention der Konfiguration und die O-Methylierung der C3''-Hydroxylgruppe der Mycarose durch EryG komplettiert. EryK ist wie EryF ebenfalls eine Cytochrom P450 Hydroxylase (Stassi et al. 1993), EryG ist eine SAM-abhängige O-Methyltransferase (Weber et al. 1989; Paulus et al. 1990; Haydock et al. 1991). Die beiden letzten Schritte der Biosynthese des Erythromycins A können auch in umgekehrter Reihenfolge erfolgen, allerdings mit einer deutlich niedrigeren Effizienz (Lambalot et al. 1995).

1.5.4 Biosynthese von dTDP-L-Mycarose

Analog zur Biosynthese anderer bakterieller 6-Desoxyhexosen (Liu und Thorson 1994) verläuft die Biosynthese von L-Mycarose über nucleotidaktivierte Zwischenstufen. Pape und Brillinger konnten bereits 1973 durch den Einsatz von ¹⁴C-markiertem S-Adenosylmethionin zeigen, daß ein zellfreier Extrakt aus dem Tylosin-Produzenten *S. fradiae* (damals *S. rimosus*) die Synthese von dTDP-Mycarose aus dTDP-D-Glucose und S-Adenosylmethionin katalysiert. Die Reaktion benötigt NAD(P)H und verläuft über dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose als Zwischenprodukt. Ausgehend von D-Glucose-1-Phosphat sind die ersten beiden Schritte der Biosynthese von dTDP-L-Mycarose die Aktivierung zu dTDP-D-Glucose durch eine dTDP-D-Glucose-Synthase (Gtt) gefolgt von einer Wasserabspaltung zu dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose durch eine dTDP-D-Glucose 4,6-Dehydratase (Gdh). Es ist anzunehmen, daß *Sac. erythraea* bei der Biosynthese von dTDP-L-Mycarose auf den generellen zellulären Pool an dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose zurückgreift (Summers et al. 1997). Da sich eine Inaktivierung des Gens *gdh* als letal für *Sac. erythraea* erwiesen hat, konnte die Beteiligung des Genproduktes an der dTDP-L-Mycarose-Biosynthese nicht bewiesen werden (Linton et al. 1995). Ausgehend von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose werden fünf enzymatische Schritte zur Synthese von dTDP-L-Mycarose benötigt (Abb. 1-8). Durch die phänotypische Analyse von Mutanten wurden im Erythromycin-Biosynthese-Gencluster sieben *eryB*-Gene identifiziert (vgl. Abb. 1-6), die für Proteine der L-Mycarose-Biosynthese kodieren und die mit *eryBI* bis *eryBVII* bezeichnet wurden (Weber et al. 1990; Haydock et al. 1991; Gaisser et al. 1997; Gaisser et al. 1998; Summers et al. 1997; Salah-Bey et al. 1998). Fünf Genprodukten kann eine mögliche Funktion im Biosyntheseweg der dTDP-L-Mycarose zugeordnet werden (Abb. 1-8). Das Gen *eryBV* kodiert für eine Glycosyltransferase, die für die Anknüpfung der dTDP-aktivierten L-Mycarose an das Aglycon verantwortlich ist. Die Funktion des Genproduktes von *eryBI* ist bisher noch unklar.

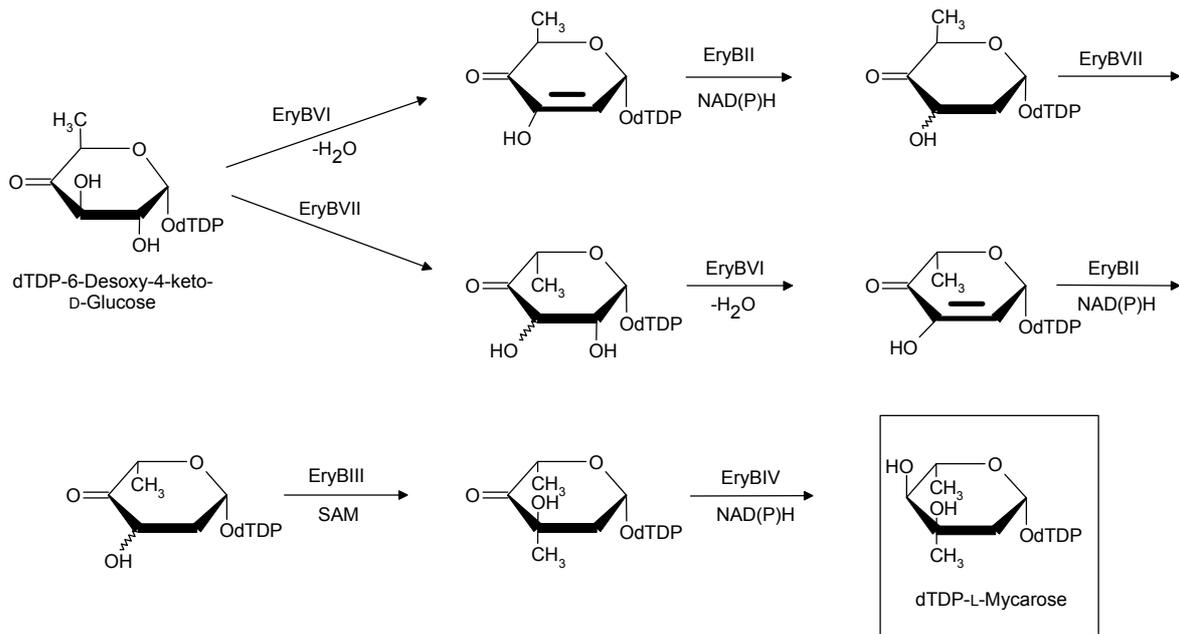


Abb. 1-8: Mögliche Biosynthesewege von dTDP-L-Mycarose. Ausgehend von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose wird dTDP-L-Mycarose in fünf enzymatischen Schritten gebildet.

Im folgenden sollen die Eigenschaften und die potentiellen enzymatischen Funktionen der *eryB*-Genprodukte näher beschrieben werden, die die Grundlage für die in Abbildung 1-8 dargestellten möglichen Biosynthesewege bilden:

EryBI: Das Genprodukt von *eryBI* (Acc. No. Y14327) ist ein 808 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 86,7 kDa, welches signifikante Sequenzidentität zu β -Glucosidasen zeigt (Anhang 1). Die größte Identität von 60,9% besteht zur β -Glucosidase OleR aus *S. antibioticus* (Acc. No. AF055579 ; Quiros et al 1998). Ursprünglich wurde angenommen (Weber et al. 1990), daß EryBI eine Rolle bei der Biosynthese von dTDP-L-Mycarose spielt. Dies wurde später durch die phänotypische Charakterisierung von verschiedenen *eryBI*-Mutanten widerlegt, die zeigte, daß diese Mutanten Erythromycin A produzieren (Gaisser et al. 1998). Anfang der 90er Jahre wurde postuliert, daß intrazelluläre Glycosylierung von Makroliden in Kombination mit extrazellulärer Deglycosylierung einen Resistenzmechanismus von Makrolid-Produzenten darstellt (Jenkins und Cundliffe 1991; Vilches et al. 1992). Dieses Postulat wurde für den Produzenten von Oleandomycin (vgl. Abb. 1-2) *S. antibioticus* bestätigt. Intrazellulär wird Oleandomycin durch das Genprodukt von *oleD* in 2'-O-Glycosyl-Oleandomycin umgewandelt (Hernandez et al. 1993), welches extrazellulär durch die β -Glucosidase OleR wieder in die aktive Form überführt wird (Quiros et al. 1998). Im Falle von *Sac. erythraea* konnte allerdings bisher weder ein Genprodukt identifiziert werden, das Erythromycin A durch Glycosylierung inaktivieren würde (Sasaki et al. 1996), noch konnte ein glycosyliertes Erythromycin-Derivat detektiert werden (Gaisser et al. 1998). Die Rolle von EryBI bleibt also weiterhin unklar (Trefzer et al. 1999).

EryBII: Das Genprodukt von *eryBII* (Acc. No. Y14332) ist ein Protein von 333 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 35,9 kDa. Die größte Sequenzidentität von 74,0% besitzt EryBII zu TylCII (Acc. No. AF147704; Bate et al. 1999), einer potentiellen NDP-Hexose 2,3-Enoyl-Reductase aus dem Produzenten von Tylosin (vgl. Abb. 1-2) *S. fradiae* (Anhang 2). Zu der potentiellen dTDP-6-Desoxy-4-keto-L-Hexose 2,3-Reductase AveBVIII (Acc. No. AB032523; Ikeda et al. 1999) aus *S. avermitilis*, dem Produzenten von Avermectin, bestehen 61,5% Identität. Sequenzhomologien zu anderen Oxidoreduktasen bestehen ebenfalls (Gaisser et al. 1998). Die massenspektrometrische Analyse des Kulturüberstandes der *eryBII*-Mutante BII92 (Gaisser et al. 1998) zeigte die Präsenz von 3''-C-Desmethyl-2'',3''-en-Erythromycin C, so daß der Verdacht naheliegt, daß es sich bei EryBII um eine Enoylreduktase, die für die Reduktion der Doppelbindung zwischen C2 und C3 verantwortlich ist (vgl. Abb. 1-8), handelt (Gaisser et al. 1998; Summers et al. 1997).

EryBIII: Das von *eryBIII* (Acc. No. S18530; aber mit Änderungen aus Gaisser et al. 1998) abgeleitete Genprodukt besteht aus 414 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 45,8 kDa. Das abgeleitete Genprodukt zeigt Sequenzhomologien zu S-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen in der Region des Consensus-Motivs I (Anhang 3) und in zwei weiteren weniger konservierten Regionen, die als Motiv II und Motiv III bezeichnet werden (Ingrosso et al. 1989; Haydock et al. 1991; Gandecha et al. 1997). Die Kristallstrukturanalyse des Komplexes von S-Adenosylmethionin mit Methyltransferasen (Schluckebier et al. 1995) deutet stark darauf hin, daß das Motiv I an der Bindung des Cofaktors beteiligt ist. Außerdem ist die konservierte Aminosäure (Glu oder Asp), die 17 Aminosäuren von Motiv I in Richtung C-Terminus entfernt ist, für einen wichtigen Kontakt mit dem gebundenen Cofaktor verantwortlich. Die mit Abstand größte Sequenzidentität von 71,8% besitzt EryBIII zu TylCIII aus dem Tylosin-Produzenten *S. fradiae* (Acc. No. AF147704; Bate et al. 1999; Anhang 3). Die *eryBIII*-Mutante 335, die durch den Austausch einer einzigen Aminosäure (Cys-13 → Ser) erzeugt wurde (Gaisser et al. 1998), weist den *eryB*-Phänotyp auf, da sie Erythronolid B (EB) akkumuliert. Dieses Ergebnis zeigt außerdem, daß Cys13, das auch in allen homologen Proteinen konserviert ist (Anhang 3), eine essentielle Funktion für die enzymatische Aktivität besitzt. Darüber hinaus konnte von Gaisser et al. (1998) gezeigt werden, daß die Mutante neben DEB eine weitere Substanz produziert, die als 3''-Desmethyl-Erythromycin A identifiziert werden konnte und Bioaktivität besitzt. Die postulierte Funktion von EryBIII als C-Methyltransferase bei der dTDP-L-Mycarose Biosynthese ist somit sehr wahrscheinlich. Außerdem konnte hierdurch gezeigt werden, daß die Enzyme, die die auf den Methyltransfer folgenden Biosyntheseschritte und die Anknüpfung an das Makrolacton katalysieren, auch modifizierte Substrate akzeptieren und umsetzen, so daß ein neues Erythromycin A-Derivat entsteht (Gaisser et al. 1998).

EryBIV: Das von *eryBIV* (Acc. No. Y11199) abgeleitete Genprodukt besteht aus 322 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 34,0 kDa. EryBIV besitzt 50,3% Sequenzidentität zu AveBIV (Acc. No. AB032523; Ikeda et al. 1999) (Anhang 4). EryBIV zeigt außerdem Sequenzhomologie zu der großen Familie von Hexose-Oxidoreduktasen, zu der auch die mechanistisch gut charakterisierte durch das *galE*-Gen kodierte UDP-Galactose 4-Epimerase aus *E. coli* gehört (Bauer et al. 1992; Lemaire und Müller-Hill 1986). RfbJ (Acc. No. X61917) aus dem D-Abequose-Biosyntheseweg von *Salmonella enterica* (Wyk und Reeves 1989), StrL und StrE (Acc. No. X62567) aus dem Streptomycin-Biosyntheseweg von *S. griseus* (Pissowotzki et al. 1991) sowie TylA2 (Acc. No. U08223; Merson-Davies et al. 1994) und TylD (Acc. No. AF147703; Fouces et al. 1999) aus *S. fradiae* sind weitere Mitglieder dieser Familie. Auch wenn die Enzymfamilie der dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase auf Ebene der Primärstruktur recht unterschiedlich ist (z. B. besitzt EryBIV lediglich 19% Identität zu RfbJ und 20% Identität zu GalE), so besitzt sie zwei streng konservierte Motive, die an der Bindung des Cofaktors beteiligt sind (Anhang 4): GxxGxxG (Motiv I) und YxxxKxxxD/E (Motiv II). Motiv I befindet sich innerhalb der ersten 20 Aminosäuren (40 bei AveBIV) des N-Terminus und ähnelt dem Rossmann Faltungsmotiv von Nucleotid-Bindestellen (Wierenga und Hol 1983). Motiv II befindet sich etwa 100 Aminosäuren näher am C-Terminus als Motiv I. Die in diesem Motiv konservierten Aminosäuren Tyrosin und Lysin sind ebenfalls an der Cofaktorbinding beteiligt (Bauer et al. 1992). Die UDP-Galactose 4-Epimerase GalE benötigt für die Dehydrierung in 4-Stellung des Glycopyranosyl-Restes unter Bildung eines nicht isolierbaren Zwischenproduktes NAD^+ als Cofaktor. Reduktion der Ketogruppe an C4 mit dem entstandenen NADH stellt die sekundäre Hydroxy-Gruppe in der einen oder anderen Konfiguration wieder her. Die anderen Mitglieder der Enzymfamilie reduzieren soweit bekannt ebenfalls ein C4-Keton. Daher ist anzunehmen, daß auch *eryBIV* für eine 4-Ketoreduktase kodiert, die den letzten Schritt in der Biosynthese von dTDP-L-Mycarose katalysiert (vgl. Abb. 1-8). Es ist außerdem sehr wahrscheinlich, daß die Reduktion der 4-Ketogruppe den letzten Schritt der dTDP-L-Mycarose-Biosynthese darstellt, da die Präsenz dieser Keto-Gruppe die Reaktionen an den benachbarten Zentren erleichtert. Dieses Postulat wird durch Analyse des Kulturüberstandes einer *eryBIV*-Deletionsmutante, BIV87, unterstützt. Diese Mutante akkumuliert neben Erythronolid B (EB) geringe Mengen Erythromycin-ähnlicher Substanzen, deren Massen jeweils um zwei Masseneinheiten geringer sind, als die der korrespondierenden Erythromycine A, B, C und D (Salah-Bey et al. 1998). Dies spricht deutlich für das Fehlen der 4-Ketoreduktase-Aktivität. Es scheint, daß die unreduzierte dTDP-4-Ketohexose als alternatives Substrat für die Mycarosyltransferase fungieren kann. Summers et al. (1997) kamen unabhängig davon zum gleichen Ergebnis.

EryBV: Das vom Gen *eryBV* (Acc. No. Y11199) abgeleitete Protein EryBV besteht aus 415 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 45,5 kDa. Das Protein zeigt Sequenz-

homologie zu einer Reihe von Glycosyltransferasen (Anhang 5). Die höchste Sequenzidentität von 50,6% besteht zu der Oleandrosyltransferase OleG2 (Acc. No. AJ002638; Doumith et al. 1999) aus *S. antibioticus*. Die *eryBV*-Mutante BV88 (Salah-Bey et al. 1998) akkumuliert als Hauptprodukt Erythronolid B (EB). Als Nebenprodukt konnte massenspektrometrisch Desosaminyl-Erythronolid B nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß die Desosaminyltransferase EryCIII auch Erythronolid B in beschränktem Umfang als Substrat akzeptiert (Salah-Bey et al. 1998), und es zeigt, daß EryBV tatsächlich die Funktion der Mycarosyltransferase im Erythromycin-Biosyntheseweg (vgl. Abb. 1-7) erfüllt.

EryBVI: Für die Translation von *eryBVI* (Acc. No. Y11199 und U77459) existieren zwei mögliche Startcodons (Abb. 1-9). Gaisser et al. (1997) wählten das weiter *upstream* liegende Startcodon GTG, während Summers et al. (1997) das zweite mögliche Startcodon, ATG, wählten, welches sich 69 Nukleotide weiter *downstream* befindet. Für die abgeleiteten Genprodukte ergeben sich somit Längen von 510 Aminosäuren (MW 57,7 kDa; Gaisser et al. 1997) bzw. 487 Aminosäuren (MW 55,1 kDa; Summers et al. 1997). Die massenspektrometrische Analyse des Kulturüberstandes der *eryBVI*-Deletionsmutante Xho91 (Gaisser et al. 1997) zeigt den *eryB*-Phänotyp (Anreicherung von EB).

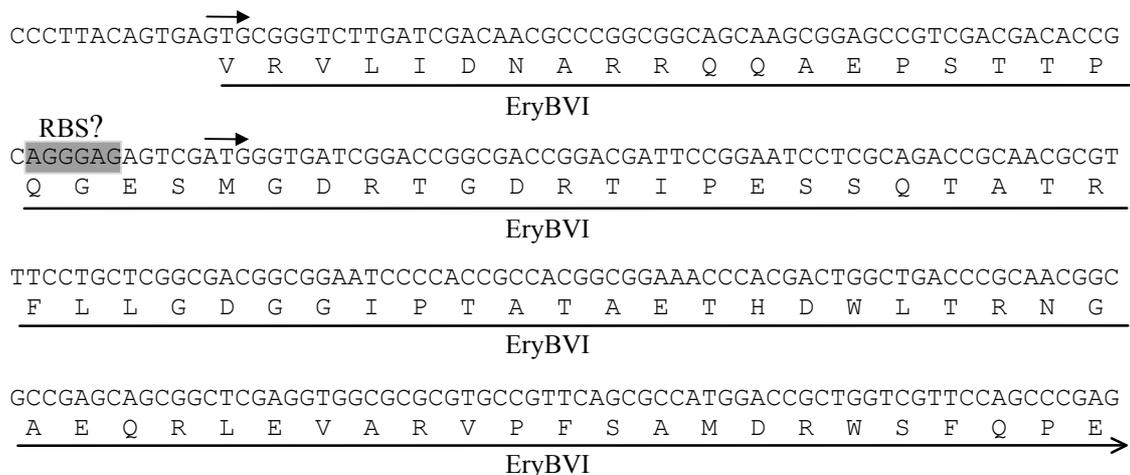


Abb. 1-9: Möglich Translationsstartpunkte von *eryBVI*: Dargestellt ist die Nucleotidsequenz im Bereich der zwei möglichen Translationsstartpunkten, die durch schwarze Pfeile gekennzeichnet sind und die aus der Translation resultierende Aminosäuresequenz. Eine potentielle Ribosomenbindestelle ist grau hinterlegt.

Im Anhang 6 ist der Vergleich von EryBVI mit homologen Genprodukten dargestellt. Die größte Sequenzidentität von 50,6% zu EryBVI besitzt OleV (Acc. No. AF055579) aus *S. antibioticus*. Zu SnogH (Acc. No. AJ224512; Torkkell et al. 1997) aus *S. nogalater* bestehen 49,5% Identität, zu AveBVI (Acc. No. AB032523; Ikeda et al. 1999) aus dem Produzenten von Avermectin, *S. avermitilis*, 47,2%, zum hypothetischen Protein PCZA361.3 (Acc. No. AJ223998; van Wageningen et al. 1998) aus *Amycolatopsis orientalis* 45,0%, zu LanS (Acc. No. AF080235; Westrich et al. 1999) aus dem Produzenten des Anthracyclin-Antibiotikums

Landomycin *S. cyanogenus* 44,9%, zum Genprodukt des Orfs27 (Acc. No. AJ011500; Ichinose et al. 1998) des Granaticin-Produzenten *S. violaceoruber* 43,5%, zu DnmT (Acc. No. U77891; Scotti und Hutchinson 1996) aus *S. peucetius* 42,6% und zum Genprodukt von Orf3 (Acc. No. U43704; Dickens et al. 1996) aus *Streptomyces* sp. C5 bestehen 40,2% Sequenzidentität. Oleandomycin und Avermectin enthalten als Zuckerkomponente L-Oleandrose, die wie L-Mycarose eine 2,6-Didesoxy-L-Hexose ist. Eine 3-Amino-2,6-didesoxy-L-Hexose, 4-Epi-Vancosamin, kommt im von *Amycolatopsis orientalis* produzierten Chloremomycin vor. Bei der in Granaticin und Landomycin vorhandenen L-Rhodinose handelt es sich um eine 2,3,6-Tridesoxy-L-Hexose, während das in Doxorubin vorhandene L-Daunosamin eine 3-Amino-2,3,6-tridesoxy-L-Hexose ist. Allen diesen Hexosekomponenten ist gemeinsam, daß es sich um 2-Desoxy-L-Hexosen handelt, die als gemeinsame Biosyntheseschritte die 2,3-Dehydratisierung, die 5-Epimerisierung und die Reduktion der 4-Ketogruppe durchlaufen. Da die 5-Epimerisierung und die Reduktion der 4-Ketogruppe wahrscheinlich durch die Genprodukte von *eryBVII* (s. unten) bzw. *eryBIV* katalysiert werden, ist anzunehmen, daß *eryBVI* sowie die aufgeführten homologen Gene für die 2,3-Dehydratase kodieren (vgl. Abb. 1-8). Draeger et al. (1999) konnten zeigen, daß das Produkt der Reaktion, das bei der Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit NADPH unter Katalyse der Genprodukte von *gra-Orf27* und *gra-Orf26* entsteht, dTDP-2,6-didesoxy-4-keto-D-Glucose ist. Dies deutet darauf hin, daß das Substrat für *EryBVI* ebenfalls dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose sein könnte (vgl. Abb. 1-8 oberer Biosyntheseweg). Allerdings gibt es aus dem Gencluster für die Biosynthese von Erythromycin kein Genprodukt, das signifikante Homologie zu *gra-Orf26* zeigt.

EryBVII: Das von *eryBVII* (Acc. No. Y11199) abgeleitete Genprodukt setzt sich aus 193 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von 21,2 kDa. *EryBVII* zeigt signifikante Sequenzidentität zu 3,(5)-Epimerasen (Anhang 7). Diese Genprodukte sind an der Biosynthese von L-Hexosen beteiligt und kommen nicht in Genclustern vor, die ausschließlich der Biosynthese von D-Hexosen zugeordnet werden (Summers et al. 1997). Die höchste Sequenzidentität von 59,3% besteht zu DnmU aus *S. peucetius* (Acc. No. AF006633; Otten et al. 1997). Außerdem besteht Homologie zu bereits charakterisierten 3,5-Epimerasen, wie z. B. StrM aus *S. griseus* und RmlC aus *Salmonella enterica* (Verseck 1997; Graninger et al. 1999). *EryBVII* ist demnach die 3,5- oder 5-Epimerase aus dem L-Mycarose Biosyntheseweg (vgl. Abb. 1-8). Die massenspektrometrische Analyse der im Kulturüberstand neben Erythronolid B in geringen Mengen vorhandenen Metabolite der *eryBVII*-Mutante BVII98 bestätigt diese Zuordnung (Gaisser et al. 1998). Im Chromosom von *Sac. erythraea*, direkt benachbart zum *gdh*-Gen, befindet sich das *kde*-Gen, das für ein Protein kodiert, welches ebenfalls Sequenzhomologie zu dTDP-4-Keto-6-desoxyhexose 3,5-Epimerasen zeigt. Das Genprodukt des *kde*-Gens kann die *EryBVII*-Enzymaktivität nicht substituieren, denn die Mutante BVII98 produziert kein Erythromycin A. Dies kann nach Gaisser et al. (1998) zwei

Gründe haben: Zum einen ist es möglich, daß der Zeitpunkt der Genexpression der *ery*-Gene nicht mit dem des *kde*-Gens koordiniert ist oder die Substrate der beiden Epimerasen unterschiedlich sind. Zum anderen handelt es sich möglicherweise bei EryBVII um eine 5-Epimerase und nicht um eine 3,5-Epimerase. Letzteres wurde ebenfalls von Summers et al. (1997) in Betracht gezogen. Kim et al. (1999) konnten zeigen, daß EryBVII dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose als Substrat verwertet und dieses in sein Epimer umwandelt. Es konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob es sich um eine 5- oder um eine 3,5-Epimerisierung handelte.

Der exakte Verlauf der L-Mycarose-Biosynthese bezüglich der Reihenfolge und der exakten Funktion der enzymatischen Schritte wurde bisher noch nicht aufgeklärt.

1.5.5 Biosynthese von dTDP-D-Desosamin

Ebenso wie für die Biosynthese von dTDP-L-Mycarose ist dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-glucose die Ausgangsverbindung für die Biosynthese von dTDP-D-Desosamin. Für die Generierung von dTDP-D-Desosamin aus dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose werden fünf enzymatische Schritte benötigt (Abb. 1-10). Inklusive des Gens *eryCIII*, welches für die Desosaminyltransferase kodiert, wurden aufgrund phänotypischer Analyse von Mutanten sechs *eryC*-Gene identifiziert, die an der Biosynthese von dTDP-D-Desosamin beteiligt sind. Die Mutanten produzierten kein Erythromycin mehr, sondern reicherten 3- α -Mycarosyl-Erythronolid B (MEB) an (Gaisser et al. 1997; Salah-Bey et al. 1998; Dhillon et al. 1989; Summers et al. 1997). Die Gene wurden mit *eryCI* bis *eryCVI* bezeichnet.

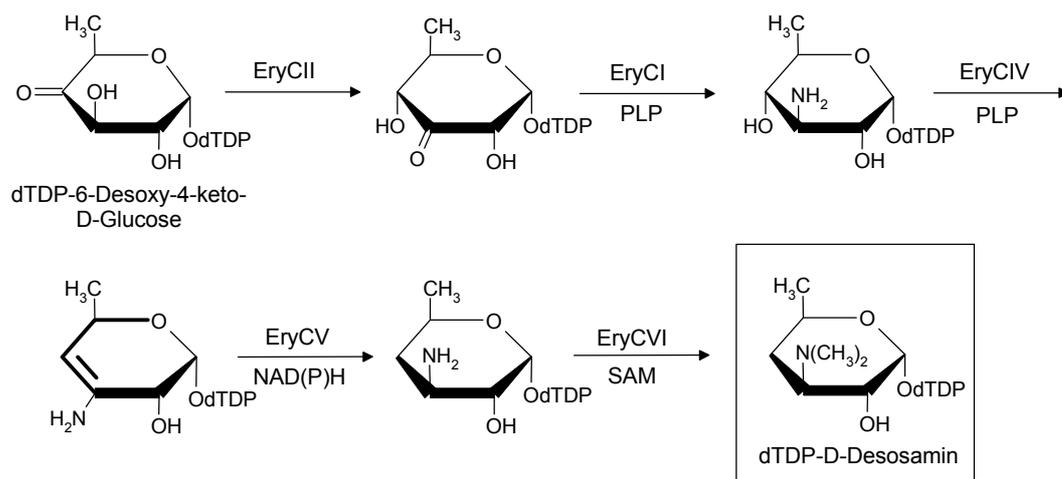


Abb. 1-10: Möglicher Biosyntheseweg von dTDP-D-Desosamin. Ausgehend von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose wird dTDP-D-Desosamin in fünf enzymatischen Schritten gebildet.

Im folgenden sollen die Eigenschaften und die potentiellen enzymatischen Funktionen der *eryC*-Genprodukte näher beschrieben werden, die die Grundlage für den in Abbildung 1-10 dargestellten möglichen Biosyntheseweg bilden:

EryCI: Das von *eryCI* abgeleitete Genprodukt ist ein Protein von 365 Aminosäuren und einer molaren Masse von 39,2 kDa. EryCI ist wahrscheinlich eine Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige Transaminase (Abb. 1-10), die die Aminogruppe an C3 der dTDP-6-Desoxy-3-keto-D-Glucose einführt. EryCI weist starke Sequenzidentität zu anderen Aminotransferasen auf (Anhang 8).

EryCII: Das von *eryCII* (Acc. No. Y14332) abgeleitete Protein besteht aus 361 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 38,4 kDa. Die größten Sequenzidentitäten (Anhang 9) von jeweils 35,9% bestehen zu SnogN aus *S. nogalater* (Acc. No. AF187532) und DesVIII aus *S. venezuelae* (Acc. No. AF079762; Xue et al. 1998). Alle homologen Proteine zeigen außerdem Homologie zu P450-Enzymen. Es wird postuliert, daß EryCII die Funktion der 3,4-Tautomerase im Biosyntheseweg von dTDP-D-Desosamin übernimmt (Abb. 1-10; Salah-Bey et al. 1997; Summers et al. 1997).

EryCIII: Bei dem von *eryCIII* (Acc. No. Y14332) kodierten Protein (422 Aminosäuren; MW 45,9 kDa) handelt es sich um die Desosaminyltransferase (vgl. Abb. 1-7), die signifikante Sequenzidentität zu anderen Glycosyltransferasen besitzt (Anhang 5).

EryCIV: Das von *eryCIV* (Acc. No. Y11199) abgeleitete Protein besteht aus 401 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 43,3 kDa. EryCIV wird die Funktion der Pyridoxalphosphat-abhängigen 3,4-Dehydratase im dTDP-D-Desosamin-Biosyntheseweg zugeschrieben (vgl. Abb. 1-10; Gaisser et al. 1997; Summers et al. 1997). Es ist jedoch auch möglich, daß die enzymatischen Funktionen oder die Reihenfolge der von EryCIV und EryCI katalysierten Reaktionen umgekehrt sind (Gaisser et al. 1997; Summers et al. 1997). Die höchste Identität von 65,8% (Anhang 10) hat EryCIV zu OleNI aus *S. antibioticus* (Acc. No. AF055579).

EryCV: Das Gen *eryCV* (Acc. No. Y11199) kodiert für ein Protein von 489 Aminosäuren Länge, das ein Molekulargewicht von 53,9 kDa besitzt. Außer OleT aus *S. antibioticus* (Acc. No. AF079762) und DesII aus *S. venezuelae* (Acc. No. AF079762; Xue et al. 1998), die 65,1% bzw. 63,8% Sequenzidentität zu EryCV aufweisen (Anhang 11), gibt es keine weiteren Datenbankeinträge mit nennenswerter Sequenzidentität. Die Aufgabe von EryCV ist wahrscheinlich die Reduktion der Enamindoppelbindung, die durch die 3,4-Dehydratisierung gebildet wurde (vgl. Abb. 1-10; Gaisser et al. 1998).

EryCVI: *eryCVI* (Acc. No. Y11199) kodiert für ein Protein aus 237 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26,0 kDa. Das Protein EryCVI zeigt starke Identität zu *S*-Adenosyl-methionin-abhängigen *N*-Methyltransferasen (Anhang 12) und hat im dTDP-D-Desosamin-Biosyntheseweg die Aufgabe der Desosaminyl *N*-Dimethyltransferase (vgl. Abb. 1-10; Gaisser et al. 1997). Die höchste Sequenzidentität besteht zu OleM1 aus *S. antibioticus* (Acc. No. AJ002638; Olano et al. 1998) von 68,1%. Alle diese *N*-Methyltransferasen besitzen den hochkonservierten Sequenzbereich LLDV/IACGTG, der sich auch in zahlreichen *N*-Methyl-

transferasen aus Säugern findet (Summers et al 1997) und an der Bindung des *S*-Adenosylmethionins beteiligt sein dürfte (Schluckebier et al. 1995).

1.6 Metabolismus von 6-Desoxyhexosen

Desoxyhexosen sind in der Natur weit verbreitet und kommen in Pflanzen, in tierischen Zellen, Pilzen und Mikroorganismen vor (Piepersberg und Distler 1997; Johnson und Liu 1998; Tonetti et al. 1998; Trefzer et al. 1999). In Säugerzellen findet man beispielsweise L-Fucose (6-Desoxy-L-Galactose) in Glycoproteinen und Glycolipiden (Flowers 1981), in Mikroorganismen kommen Desoxyhexosen als Elemente von Lipopolysacchariden (LPS) (Schnaitman und Klena 1993) und extrazellulären Polysacchariden (EPS) sowie als Bestandteil zahlreicher Sekundärmetabolite vor. Mehr als 90 verschiedene 6-Desoxyhexose-Derivate wurden bis jetzt in Sekundärmetaboliten identifiziert (Liu und Thorson 1994; Piepersberg 1994; Piepersberg und Distler 1997), von denen einige bereits in den vorangegangenen Abschnitten erwähnt wurden. Die Desoxyhexosen erfüllen hauptsächlich strukturelle Funktionen, indem sie die chemischen Eigenschaften von Verbindungen modifizieren, so daß die Wechselwirkungen mit der Umgebung verändert werden und diese Substanzen somit biologische Aktivität erhalten (Liu und Thorson 1994).

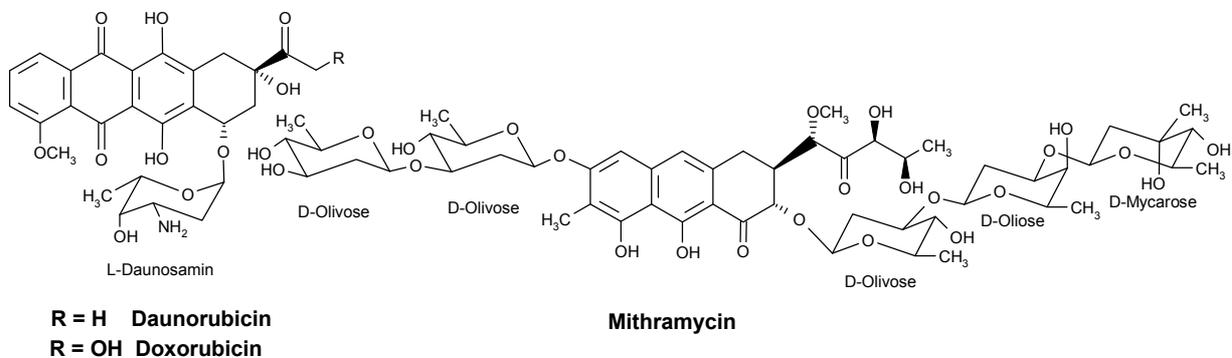


Abb. 1-11: Die Antitumormittel Daunorubicin (R = H), Doxorubicin (R = OH) und Mithramycin. Für die Antitumorwirkung dieser Sekundärmetabolite sind die enthaltenen 6-Desoxyhexose-Komponenten von essentieller Bedeutung.

Die Wechselwirkung der Oligosaccharid-Reste des Antibiotikums Mithramycin (Abb. 1-11) mit der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix ermöglicht beispielsweise die Ausbildung eines stabilen Antibiotikum-DNA-Komplexes (Van Dyke und Dervan 1983; Gao und Patel 1990). Die 6-Desoxyhexose L-Daunosamin, die für die anti-neoplastische Aktivität von Doxorubicin und Daunorubicin (vgl. Abb. 1-11) benötigt wird (Fujiwara und Hoshino 1983), ist ein weiteres Beispiel.

Die Biosynthese von 6-Desoxyhexosen gliedert sich in drei Teile: die Nucleotid-Aktivierung eines Hexosephosphats, die Dehydratisierung und die sich anschließenden Modifikationen der 6-Desoxyhexosen.

Die Aktivierung eines Hexose-1-phosphats geschieht durch die Übertragung eines Nucleotidyl-Restes, wobei Nucleotid-Triphosphate (NTPs) bei diesem Schritt die Cosubstrate sind. Das Hexose-1-phosphat entstammt dem Primärstoffwechsel des jeweiligen Organismus. Bei Prokaryonten handelt es sich bei den Hexosen meist um Glucose-1-phosphat und Mannose-1-phosphat und bei den Nucleosidtriphosphaten um CTP, GTP oder dTTP (Gabriel 1982; Liu und Thorson 1994; Piepersberg 1994; Piepersberg und Distler 1997). Der verwendete Aktivierungstyp ist nicht vom Produktspektrum des Produzenten oder der Organismen-Familie abhängig (Piepersberg 2000). Zu den Enzymen dieser Gruppe gehören die dTDP- α -D-Glucose Synthase aus *Sal. enterica* B (RmlA; Lindqvist et al. 1993) und aus *Sac. erythraea* (Gtt; Linton et al. 1995), die CDP- α -D-Glucose Synthase aus *S. glaucescens* (StrQ; Beyer 1998), *Sal. enterica* B (RmlF; Lindqvist et al. 1994), *Yersinia pseudotuberculosis* (AscA; Thorson et al. 1994) und die GDP- α -D-Mannose Synthase aus *Sal. enterica* B (RmlM; Elling et al. 1996).

Die Umwandlung der Nucleotidyl-Diphosphohexose in die korrespondierende 6-Desoxy-4-ketohexose ist der zentrale Schritt in allen 6-Desoxyhexose-Biosynthesen, da dieses Zwischenprodukt den Verzweigungspunkt der Biosynthesewege der unterschiedlichen Zuckerderivate bildet (Liu und Thorson 1994; Piepersberg 1994; Piepersberg und Distler 1997; Trefzer et al. 1998). Diese irreversible Reaktion wird von spezifischen Nucleotidyl-Diphosphohexose 4,6-Dehydratasen katalysiert. Gene, die für diese Dehydratasen in Streptomyceten kodieren und zu denen *strE* aus *S. griseus* (Pissowotzki et al. 1991), *oleE* aus *S. antibioticus* (Acc. No. AF055579) und *gdh* aus *Sac. erythraea* (Linton et al. 1995) gehören, sind hoch konserviert (Stockmann und Piepersberg 1992). Alle 4,6-Dehydratasen besitzen NAD^+ als Coenzym, wobei diese prosthetische Gruppe in *E. coli* und *Sal. enterica* B fest an das Enzym gebunden ist (Wang und Gabriel 1969; Zarkowsky und Glaser 1969; Marumo et al. 1992). Dagegen ist die Aktivität der Dehydratasen aus *Y. pseudotuberculosis* und den Actinomyceten in *in-vitro*-Enzymreaktionen abhängig von exogenem NAD^+ (Matern et al. 1973; Vara und Hutchinson 1988; Thompson et al. 1992; Yu et al. 1992).

Die nachfolgenden Modifikationen an der Nucleotidyl-6-desoxy-4-ketohexose führen zu der großen Variabilität der 6-Desoxyhexosen. Zu den Modifikationen an den Positionen C2 bis C5 der Hexosen gehören Isomerisierung, Reduktion, Transaminierung, Acetylierung, Methylierung, Dehydratisierung, brechen von C-C-Bindungen und weitere Reaktionen (Liu und Thorson 1994; Piepersberg 1994; Piepersberg und Distler 1997; Trefzer et al. 1998). Einen wichtigen Schritt katalysieren die Nucleotidyl-4-keto-6-desoxyhexose 3,5-Epimerasen. Sie überführen die entsprechenden Hexosen durch eine 3,5-Epimerisierung von der D- in die L-stereoisomere Zuckerreihe. Biosynthesen von D- und L-6-Desoxyhexosen können wie bei

Sac. erythraea in einem Organismus parallel auftreten, und die so entstandenen Hexosen können in dasselbe Endprodukt eingebaut werden (Piepersberg 1994; Piepersberg und Distler 1997). Im Biosyntheseweg von L-Mycarose spielt neben der Epimerisierung an C5 außerdem die 2-Desoxygenierung eine wichtige Rolle. Erste Hinweise auf den Mechanismus dieser Transformation lieferten Draeger und Mitarbeiter (1999). Sie konnten zeigen, daß zwei Gene aus dem Granaticin-Gencluster von *S. violaceoruber* (*gra orf27* und *gra orf26*) bzw. zwei Gene aus dem Oleandomycin-Gencluster von *S. antibioticus* (*Tü99 orf10* und *Tü99 orf11*) für den Austausch der Hydroxylgruppe an C2 der dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose verantwortlich sind. Hierbei entsteht zunächst als sehr instabiles Zwischenprodukt dTDP-2,6-Didesoxy-3,4-diketo-D-glucose, aus dem dann katalysiert durch die Reduktase Gra Orf26 bzw. Tü99 Orf11 und NADPH als Cofaktor dTDP-2,6-Dedesoxy-4-keto-D-Glucose gebildet wird.

In den meisten Fällen wird die Biosynthese von 6-Desoxyhexosen durch die Übertragung der dTDP-aktivierten Derivate auf ein Akzeptormolekül mittels Glycosyltransferase (EryCIII und EryBV bei *Sac. erythraea*) abgeschlossen.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Die Kenntnis und Charakterisierung aller an der Biosynthese des Antibiotikums Erythromycin A beteiligten Proteine sollen zukünftig die Möglichkeit liefern, entweder durch gezielten Einsatz und Kombination verschiedener Biosynthese-Enzyme neue Makrolidantibiotika (Hybridantibiotika) zu generieren oder durch gezielte Beeinflussung der Regulationsmechanismen die Ausbeute des Antibiotikums in seinem Wirtstamm *Sac. erythraea* zu erhöhen. Aufgrund der großen klinischen Relevanz von Erythromycin A wurden die genetische Organisation des Genclusters für die Biosynthese und die Biosynthese dieses Antibiotikums in *Sac. erythraea* bereits intensiv untersucht (1.5). Die Postulate zu den Biosynthesewegen der beiden aktivierten Hexosekomponenten dTDP-L-Mycarose und dTDP-D-Desosamin beruhten bislang auf Sequenzvergleichen und der Analyse der aus Mutanten isolierten Zwischenprodukte der Biosynthese. Die präzise Zuordnung der *eryB*- und *eryC*-Genprodukte zu enzymatischen Funktionen und die Bestimmung der genauen Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte waren bisher noch nicht möglich. Spezifische Aufgabe dieser Arbeit sollte es daher sein, den Biosyntheseweg der dTDP-L-Mycarose zu untersuchen.

Hierzu sollten die an der dTDP-L-Mycarose-Biosynthese beteiligten EryB-Proteine aus *Sac. erythraea* sowie homologe Proteine aus anderen Actinomyceten in geeigneten Wirtstämmen produziert werden. Gene, die für EryBVI-homologe Proteine kodieren, sollten in Actinomyceten, die Sekundärmetabolite mit einem L-Mycarose-Anteil produzieren, identifiziert werden. Diese sollten anschließend kloniert, sequenziert und analysiert werden.

Die Enzymaktivitäten verschiedener heterolog produzierter EryB-Proteine sollten *in vitro* getestet werden, um diese in den Kontext des Biosynthesewegs einzuordnen.

Darüber hinaus sollte eine *eryBVI*-Substitutionsmutante hergestellt werden. Diese sollte phänotypisch und genotypisch charakterisiert werden. Die *eryBVI*-Substitutionsmutante sowie weitere zur Verfügung stehende *eryB*-Mutanten sollten für Komplementationsversuche eingesetzt werden. Hierbei sollte zum einen überprüft werden, ob die zu den EryB-Proteinen homologen Proteine aus anderen Actinomyceten *in vivo* die Funktion der EryB-Proteine übernehmen können, zum anderen sollte die Funktionalität der mit einem Marker (z. B. His-tag) versehenen EryB-Proteine kontrolliert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten einen Beitrag für die Nutzung der Hexosekomponente L-Mycarose in der kombinatorischen Biochemie schaffen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien, Enzyme und Kits wurden von folgenden Firmen bezogen:

Chemikalien:

α -[³² P]-dCTP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Agarose	Roche Diagnostics (Mannheim)
Antibiotika	Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma (Deisenhofen), Squibb and Sons (Princeton, USA), Serva (Heidelberg)
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics (Mannheim)
Chemikalien, p.a. Qualität	Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe)
dNTP	Roche Diagnostics (Mannheim)
dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-glucose	Günther (IET, FZ-Jülich)
dTDP-D-Glucose	Sigma (Deisenhofen)
Erythronolid B (EB) und 3- α -Mycarosylerythronolid B (MEB)	Aventis (Romainville, Frankreich)
Hybond N ⁺ /P-Membranen	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Medienbestandteile	Difco (Detroit, USA), Life Technologies (Karlsruhe) (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe)
NADPH	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
Q-Sepharose FF	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
S-Adenosylmethionin (SAM)	Roche Diagnostics (Mannheim)

Enzyme/Antikörper:

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche Diagnostics (Mannheim)
DNA Polymerase I Klenow Fragment	Life Technologies (Karlsruhe)
Lysozym	Serva (Heidelberg)

Penta-His-Antikörper	Qiagen (Hilden)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics (Mannheim), Life Technologies (Karlsruhe), New England Biolabs (Schwalbach)
Ribonuklease A	Sigma (Deisenhofen)
RmlC (angereichert)	Günther (IET, FZ-Jülich)
RmlD (angereichert)	Günther (IET, FZ-Jülich)
T4-DNA Ligase (einschl. Puffer)	Life Technologies (Karlsruhe)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (einschl. Puffer)	Life Technologies (Karlsruhe)
<i>Vent</i> -DNA-Polymerase (einschl. Puffer)	New England Biolabs (Schwalbach)

Kits:

Advantage-GC cDNA PCR Kit	Clontech (Heidelberg)
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad (München)
BM Chromogenic Western Blotting Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
DIG High Prime Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
Jet-Sorb-Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Nucleo Spin Extract 2 in 1 Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleo Spin Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Proteinbestimmungs-Kit	BioRad (München)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen (Hilden)
rediprime Random primer labelling Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Thermosequenase Cycle-Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

2.2 Medien

Alle eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung autoklaviert. Nicht hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Sartorius Membranfilter, 0,2 µm Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium oder Puffer nach dem Erkalten zugesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde nur doppelt deionisiertes (Milli-Q) Wasser verwendet. Glasgeräte wurden 4 h bei 180°C hitzesterilisiert. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich

alle prozentualen Angaben bei Feststoffen auf Gewichtsprozent (w/v), bei Flüssigkeiten auf Volumenprozent (v/v).

2.2.1 Nährmedien

Medien für *E. coli*

LB-Medium (Miller 1972)

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

LB-Agar (Miller 1972)

LB-Medium	
Agar (Gibco)	16 g/l

LB-Medium mit Sorbitol und Betain

(Chen et al. 1999)

LB-Medium	
Sorbitol	1 M
Betain	2,5 mM

2 X TY-Medium (Miller 1972)

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

2 X TY-Agar (Miller 1972)

2 X TY-Medium	
Agar (Gibco)	16 g/l

Weichagar

Trypton	10 g/l
NaCl	8 g/l
Bacto Agar (Difco)	8 g/l

SOB-Medium (Hanahan 1983)

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

SOC-Medium (Hanahan 1983)

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

M9-Medium (Sambrook et al. 1989)

Lösung 1 (4% Glucose)	10%
Lösung 2 (2% MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	1%
Lösung 3 (0,2% CaCl ₂)	1%
Lösung 4 (3,5% Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 1,5% KH ₂ PO ₄ , 2,5% NaCl, 5% NH ₄ Cl)	10%

M9-Agar (Sambrook et al. 1989)

M9-Medium	
Agar	16 g/l

Medien für Actinomyceten**TSB-Medium** (Hopwood et al. 1985)

Tryptone Soya Broth (Oxoid) 30 g/l

TSB-PEG 8000-Medium (Babcock und Kendrick 1988)

Tryptone Soya Broth (Oxoid) 30 g/l
 PEG 8000 50 g/l
 nach dem Autoklavieren
 Glycin 5 g/l
 MgCl₂ (1 M) 5 ml/l

SMA-Agar (Distler et al. 1985)

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

Spurenelementelösung (Hopwood et al. 1985)

ZnCl₂ 40 mg/l
 FeCl₃ x 6 H₂O 200 mg/l
 CuCl₂ x 2 H₂O 10 mg/l
 MnCl₂ x 4 H₂O 10 mg/l
 Na₂B₄O₇ x 10 H₂O 10 mg/l
 (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O 10 mg/l

SPMR-Agar (Babcock und Kendrick 1988)

Saccharose 103 g/l
 MgCl₂ x 6 H₂O 10 g/l
 D-Glucose 5 g/l
 Hefeextrakt (Difco) 5 g/l
 TES-Puffer pH 7,6 20 mM
 Bacto-Agar (Difco) 22 g/l
 Spurenelementelösung 2 ml/l
 nach dem Autoklavieren
 CaCl₂ (5 M) 2 ml

YEME (Hopwood et al. 1985)

Hefeextrakt (Difco) 3 g/l
 Bacto-Pepton (Difco) 5 g/l
 Malzextrakt 3 g/l
 D-Glucose 10 g/l
 Saccharose 340 g/l
 nach dem Autoklavieren
 MgCl₂ (1 M) 5 ml/l

TSB-Agar (Hopwood et al. 1985)TSB-Medium 20 g/l
Agar**R2YE-Agar** (Hopwood et al. 1985)

Saccharose 103 g/l
 D-Glucose 10 g/l
 MgCl₂ x 6 H₂O 10,12 g/l
 K₂SO₄ 250 mg/l
 Casamino acids (Difco) 100 mg/l
 Bacto-Agar (Difco) 22 g/l
 nach dem Autoklavieren
 KH₂PO₄ (0,5%) 10 ml/l
 CaCl₂ x 2 H₂O (3,68%) 80 ml/l
 L-Prolin (20%) 15 ml/l
 TES-Puffer pH 7,2(5,73%) 100 ml/l
 Spurenelementelösung 2 ml/l
 Hefeextrakt (Difco) (10%) 50 ml/l
 NaOH (1 M) 5 ml/l

ISP-Medium 2

ISP-Medium 2 (Difco) 38 g/l

ISP-Medium 4

ISP-Medium 4 (Difco) 37 g/l

Sporulation-Agar (ATCC Katalog 1992)

Hefeextrakt 1 g/l
 Rindfleischextrakt 1 g/l
 Tryptose 2 g/l
 D-Glucose 10 g/l
 FeSO₄ 1 mg/l
 Agar 15 g/l
 pH-Wert auf 7,2 einstellen

M1-102-Medium (Kaneda et al. 1962)

D-Glucose 5 g/l
 Saccharose (braun) 10 g/l
 Trypton 5 g/l
 Hefeextrakt 2,5 g/l
 EDTA Dinatriumsalz 36 mg/l
 pH-Wert mit KOH auf 7,0 bis 7,2 einstellen

R2T-Agar (Weber et al. 1985)

Saccharose	103 g/l
Hefeextrakt	6,5 g/l
Pepton	4 g/l
Trypton	5 g/l
K ₂ SO ₄	0,25 g/l
Bacto-Agar (Difco)	22 g/l
nach dem Autoklavieren	
D-Glucose (50%)	20 ml/l
Tris/HCl, pH 7,0 (2 M)	12,5 ml/l
KH ₂ PO ₄ (0,5%)	5 ml/l
NaOH (1 M)	2,5 ml/l
CaCl ₂ (5 M)	10 ml/l
MgCl ₂ (1M)	50 ml/l
Spurenelementelösung	2 ml/l

J-Medium (Salah-Bey et al. 1995)

Saccharose	100 g/l
Tryptone Soya Broth (Oxoid)	30 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
nach dem Autoklavieren	
MgCl ₂ (1 g/ml)	10 ml/l

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

Nutrient-Broth (Difco)	8 g/l
------------------------	-------

Medien für *Micrococcus luteus***TSB-Medium** (Hopwood et al. 1985)

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

SNA: Soft Nutrient-Agar (Hopwood et al. 1985)

Nutrient Broth	8 g/l
Bacto Agar (Difco)	6 g/l

R2T2-Agar (Gaisser et al. 1998)

wie R2T-Agar, aber ohne Pepton

R2T20-Agar (Yamamoto et al. 1986)

wie R2T2-Agar, aber mit 20% Saccharose

MG-Medium (Doull und Vining 1989)

Maltose (25%)	200 ml
Morpholinopropansulfonsäure	21 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	9 mg/l
CaCl ₂	1 mg/l
NaCl	1 mg/l
Glutamat	8,825 g/l
Spurenelementelösung	4,5 ml
K-Phosphat-Puffer (0,1 M), pH6,5	150 ml

Sucrose-Succinat-Medium (Caffrey et al. 1992)

Saccharose	0,2 M
Na-Succinat	20 mM
KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH 6,6	20 mM
MgSO ₄	5 mM
KNO ₃	100 mM
Spurenelementelösung	2 ml/l

NB-Agar

NB-Medium	
Agar	15 g/l

TSB-Agar (Hopwood et al. 1985)

TSB-Medium	
Agar	20 g/l

2.2.2 Antibiotika

Wenn erforderlich wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100 µg/ml
Apramycin	125 µg/ml (R2T20) 35 µg/ml (TSB, M1-102)
Chloramphenicol* (Ethanol)	30 µg/ml
Hygromycin	200 µg/ml
Thiostrepton* (DMSO)	50 µg/ml (<i>S. lividans</i>) 15 µg/ml (<i>Sac. erythraea</i> , <i>M. luteus</i> DN218)
Tobramycin	4 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

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

2.3 Bakterien und Plasmide

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

Tab. 2-1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/Eigenschaften	Referenz/Herkunft
<i>Bacillus subtilis</i>	Er ^S	DSM 347
<i>Bacillus subtilis</i> [pE194]	Er ^R	DSMZ (Braunschweig)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> , λ(DE3)	Studier u. Moffat (1986)
<i>E. coli</i> DH5α	φ80d, <i>lacZΔM15</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, F ⁻	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> ET12567	F ⁻ , <i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>recF143</i> , <i>zjj201::Tn10</i> , <i>lacY1</i> , <i>thi-1</i>	Oh und Chater (1997)
<i>E. coli</i> JM109	F ⁺ , <i>traD36</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZΔM15</i> , <i>proA⁺B⁺</i> (McrA), Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>recA1</i>	Yanish-Perron (1985)
<i>E. coli</i> JM109 (DE3)	wie <i>E. coli</i> JM109, λ(DE3)	Promega (Mannheim)
<i>E. coli</i> JM110	<i>dam⁻</i> , <i>dcm⁻</i> , <i>hsdR</i>	Promega (Mannheim)
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	F ⁻ , <i>lacZΔM15</i> , Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Km ^R , Thi ⁻ , Ara ⁻ , Gal ⁻ , Mtl ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ ; (exakter Genotyp nicht verfügbar)	Qiagen (Hilden)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>lacZΔM15</i> , <i>lacI^q</i> , <i>recA1</i>	Stratagene(Heidelberg)

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

Stamm	Genotyp/Eigenschaften	Referenz/Herkunft
<i>Micrococcus luteus</i>	Er ^S , Lm ^S , Ts ^S , Am ^R , Hy ^R	DSM 348
<i>Micrococcus luteus</i> DN218	Er ^S , Lm ^S , Am ^R , Hy ^R , Ts ^R	Neußer (1999)
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Erythromycin A	NRRL 2338
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> red variant	Erythromycin A	Hessler et al. (1997)
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> BII92	<i>eryBII</i> -Deletionsmutante	Salah-Bey et al. (1998)
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> 335	<i>eryBIII</i> -Punktmutationsmutante	Gaisser et al. (1998)
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> BIVI87	<i>eryBIV</i> -Deletionsmutante	Salah-Bey et al. (1998)
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> Xho91	<i>eryBVI</i> -Deletionsmutante	Gaisser et al. (1997)
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> BVII98	<i>eryBVII</i> -Deletionsmutante	Gaisser et al. (1998)
<i>Streptomyces fradiae</i> T59-235	Tylosin	Pape und Brillinger (1973)
<i>Streptomyces lividans</i> 66 1326	Actinorhodin, Prodigiosin	John Innes Institut
<i>Streptomyces lividans</i> 66 TK 23	Actinorhodin, <i>spc-I</i>	John Innes Institut; Hopwood et al. (1985)
<i>Streptomyces mycarofaciens</i>	Midecamycin A	ATCC 21454
<i>Streptomyces peucetius</i>	Doxorubicin	DSM 40754
<i>Streptomyces platensis</i>	Platenomycin A	IFO 12901
<i>Streptoverticillium cinnamoneum</i>	Leucomycin A	ATCC 11874

Tab. 2-2: Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp/Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pAAW24.1	<i>kan</i> , <i>cat</i> , <i>tsr</i> , P _{tipA} , <i>ori</i> pIJ101, <i>ori</i> pAC184, <i>lmbP</i>	Arnold (1999)
pAL201	ColE1, <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ori</i> pJV1, P _{ermE*}	Doumith et al. (2000)
pBlueskriptKSII(+)	ColE1, <i>bla</i> , <i>lacZ</i> - α , P _{lac} , P _{T7Φ10} , P ₃	Stratagene (Heidelberg)
pCIHC16	6,0 kbp <i>KpnI</i> -Fragment aus chromosomaler DNA von <i>Sac. erythraea</i> in pUC19, <i>eryF</i> ^t , ORF5, <i>eryG</i> , <i>eryBII</i> , <i>eryCIII</i> , <i>eryCIIt</i>	Raynal (1995)
pDNW26RBSY	ColE1, <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ori</i> pIJ101, P _{ermE*} , RBS <i>lmbY</i> , His-tag	Neußer (1999)
pEFBA	1,5 kbp <i>PstI/AatI</i> -Fragment mit Apramycinresistenz-Kassette <i>aacC4</i> in pBluescriptSK	Fernández
pET11a, pET11d	ColE1, <i>bla</i> , <i>lacI</i> ^q , P _{T7Φ10} , <i>lacO</i> , s10	Studier u. Moffat (1986)
pET16b	ColE1, <i>bla</i> , <i>lacI</i> ^q , P _{T7Φ10} , <i>lacO</i> , s10, His-tag	Calbiochem-Novabiochem (Schwalbach)
pET16bdnmT	<i>dnmT</i> als <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment in pET16b	Krügel (1998)
pGEM-7Zf(-)	<i>bla</i> , P _{T7Φ10} , <i>lacO</i> , P _{SP6} , <i>lacZ</i> - α	Promega (Mannheim)

^t Teilsequenz des Gens

Fortsetzung Tab. 2-2: Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp/Eigenschaften	Referenz
pHM8a	ColE1, <i>hyg</i> , P _{ermE*} , Minicircle, T _{fkmt}	Motamedi et al. (1995)
pIJ4123	<i>kan</i> , His-Tag, P _{tipA} , <i>ori</i> pIJ101	Takano et al. (1995)
pIJ702	<i>tsr</i> , <i>mel</i>	Katz et al. (1983)
pJOE2702	ColE1, <i>bla</i> , P _{rhaBAD} , <i>rrnB</i>	Volff et al. (1996)
pJOE2775	wie pJOE2702 aber mit His-tag	Altenbuchner (1999)
pKSB201	ColE1, <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ori</i> pIJ101, P _{pr}	Doumith et al. (2000)
pLC1-10	4,0 kbp <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment aus genomischer DNA von <i>S. mycarofaciens</i> in pUC18, <i>midE</i> ^t , <i>midL</i> , <i>midB</i> , <i>midD</i>	Cong (2000)
pLC1-18	1,8 kbp <i>EcoRI/PstI</i> -Fragment aus pLC1-10 in pUC18 (<i>EcoRI/PstI</i>), <i>midE</i> ^t , <i>midL</i> ^t	Cong (2000)
pLC1-19	1,5 kbp <i>PstI</i> -Fragment aus pLC1-10 in pUC18 (<i>PstI</i>), <i>midL</i> ^t , <i>midB</i> , <i>midD</i> ^t	Cong (2000)
pLC1-20	0,6 kbp <i>SstI/PstI</i> -Fragment aus pLC1-18 in pUC18 (<i>SstI/PstI</i>), <i>midL</i> ^t	Cong (2000)
pLC1-21	1,2 kbp <i>EcoRI/SstI</i> -Fragment aus pLC1-10 in pUC18 (<i>EcoRI/SstI</i>), <i>midE</i> ^t , <i>midL</i> ^t	Cong (2000)
pNCO2,8	2,8 kbp <i>NcoI</i> -Fragment aus chromosomaler DNA von <i>Sac. erythraea</i> in pLithmus28 (<i>NcoI</i>), <i>eryBIV</i> ^t , <i>eryBV</i> , <i>eryCVI</i> , <i>eryBVI</i> ^t	Gaisser et al. (1997)
pNCO6,2	6,2 kbp <i>NcoI</i> -Fragment aus chromosomaler DNA von <i>Sac. erythraea</i> in pLithmus28 (<i>NcoI</i>), <i>eryBVI</i> ^t , <i>eryCIV</i> , <i>eryCV</i> , <i>eryBVII</i> , <i>eryK</i>	Gaisser et al. (1997)
pQE60	ColE1, <i>bla</i> , P _{T5} , His-tag, t ₀ , T ₁	Qiagen (Hilden)
pRH3	7,3 kbp <i>SacI</i> -Fragment aus chromosomaler DNA von <i>Sac. erythraea</i> in pIJ702, <i>eryCI</i> , <i>ermE</i> , <i>eryBI</i> , <i>eryBIII</i> , <i>eryF</i> ^t	Dhillon et al. (1989)
pSUM2atrv	ColE1, <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ori</i> pSG5, P _{T7Φ10} , P _{ermE*} , T _{mmrT}	Beyer (1997)
pSUT7	P15A, <i>cat</i> , P _{T7Φ10}	Pöhling (1997)
pSUTNESLB10	Expression von <i>groESL</i> , <i>S. griseus</i> , unter Kontrolle von P _{T7Φ10}	Pöhling (1997)
pSVW701	Expresion von <i>rmlB</i> , <i>Sal. enterica</i> , unter Kontrolle von P _{T7Φ10}	Verseck (1997)
pSVW711	Expresion von <i>rmlD</i> , <i>Sal. enterica</i> , unter Kontrolle von P _{T7Φ10}	Verseck (1997)
pSVW731	Expresion von <i>rmlC</i> , <i>Sal. enterica</i> , unter Kontrolle von P _{T7Φ10}	Verseck (1997)
pTrc99A	ColE1, <i>bla</i> , <i>lacI</i> ^q , P _{trc}	Aman et al. (1988)
pUC18	ColE1, <i>bla</i> , <i>lacZ-α</i> , P _{lac}	Yanish-Perron (1985)
pUCBM21	ColE1, <i>bla</i> , <i>lacZ-α</i> , P _{lac}	Vieira und Messing (1982)

^t Teilsequenz des Gens

Fortsetzung Tab. 2-2: Übersicht über verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp/Eigenschaften	Referenz
pUCPU21	wie pUCBM21, aber <i>NcoI</i> Schnittstelle des Polylinkers durch <i>NdeI</i> Schnittstelle ersetzt, ursprüngliche <i>NdeI</i> Schnittstelle des Vektors deletiert	Hammes und Wehmeier (1996)
pUWL200ΔSprBII	pUWL200ΔSprB <i>BamHI</i> hydrolysiert, mit Klenow DNA-Polymerase aufgefüllt und religiert	Doumith et al. (2000)
pUWL201	ColE1, <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ori</i> pIJ101, P _{ermE*}	Doumith et al. (2000)
pUWL218	ColE1, <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ori</i> pIJ101	Wehmeier (1995)

Tab. 2-3: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaften
pPWW1-c/p	1,0 kbp <i>BspHI/HindIII</i> PCR-Fragment aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (c) bzw. pCIIC16 (p) (Primer PW1 und PW2) in pUCBM21 (<i>NcoI/HindIII</i>)	<i>eryBII</i>
pPWW2-c/p	1,0 kbp <i>BspHI/HindIII</i> PCR-Fragment aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (c) bzw. pCIIC16 (p) (Primer PW1 und PW2) in pQE60 (<i>NcoI/HindIII</i>)	<i>eryBII</i>
pPWW3-c	1,3 kbp PCR-Produkt aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW3 und PW4) <i>blunt end</i> in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBIII</i>
pPWW4-c	1,3 kbp <i>EcoRI/NcoI</i> (Partialverdau)-Fragment mit zusätzlichem <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus Polylinker aus pPWW3-c in pQE60 (<i>NcoI/HindIII</i>)	<i>eryBIII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{T5}
pPWW5-c/p	1,1 kbp <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW2-c/p in pGEM-7Zf(-) <i>EcoRI/HindIII</i>	<i>eryBII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{T7}
pPWW6-c/p	2,0 kbp <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW2-c/p in pUWL201 (<i>EcoRI/XbaI</i>)	<i>eryBII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW7-c/p	1,1 kbp <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW5-c/p in pUWL201 (<i>EcoRI/BamHI</i>)	<i>eryBII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW8-c	1,4 kbp <i>EcoRI</i> -Fragment aus pPWW4-c in pUWL201 (<i>EcoRI</i>)	<i>eryBIII</i> Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW9-1	1,6 kbp PCR-Produkt aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW7 und PW9) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang)
pPWW9-s	1,5 kbp PCR-Produkt aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW8 und PW9) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz),
pPWW10-1	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-1 in pET11a (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P _{T7Φ10}
pPWW10-s	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-s in pET11a (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle des P _{T7Φ10} ,

Fortsetzung Tab. 2-3: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaften
pPWW11	1,2 kbp <i>NcoI/HindII</i> -Fragment aus pNCO2,8 und 2,1 kbp <i>NcoI/SstI</i> -Fragment aus pNCO6,2 in pUC18 (<i>HindIII/SstI</i>)	<i>eryCVI</i> , <i>eryBVI</i> und flankierende Sequenz
pPWW12	3,3 kbp <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW11 in pUWL201 (<i>EcoRI/HindIII</i>)	<i>eryCVI</i> , <i>eryBVI</i> und flankierende Sequenz, Expression unter Kontrolle des eigenen Promotors
pPWW13	1,6 kbp <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW9-1 in pUWL201 (<i>EcoRI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW14-l	1,9 kbp <i>XbaI/HindIII</i> (Klenow)-Fragment aus pPWW10-l in pUCBM21 (<i>XbaI/SmaI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang)
pPWW14-s	1,8 kbp <i>XbaI/HindIII</i> (Klenow)-Fragment aus pPWW10-s in pUCBM21 (<i>XbaI/SmaI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz)
pPWW15-l	1,9 kbp <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW14-l in pUWL201 (<i>EcoRI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW15-s	1,8 kbp <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW14-s in pUWL201 (<i>EcoRI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*} ,
pPWW16	0,7 kbp PCR-Produkt aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primern PW5 und PW6) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBVII</i>
pPWW17	0,6 kbp <i>NcoI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW16 in pET11d (<i>NcoI/BamHI</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des $P_{T7\Phi10}$,
pPWW17QU	1,1 kbp <i>BamHI</i> -Fragment aus pSBW28-9 in pPWW17 (<i>BamHI</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des $P_{T7\Phi10}$
pPWW18	1,1 kbp PCR-Produkt aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW12 und PW13) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryCII</i>
pPWW19	1,1 kbp <i>NcoI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW18 in pET11d (<i>NcoI/BamHI</i>)	<i>eryCII</i> , Expression unter Kontrolle des $P_{T7\Phi10}$
pPWW19UQ	1,1 kbp <i>BamHI</i> -Fragment aus pSBW28-9 in pPWW17 (<i>BamHI</i>)	<i>eryCII</i> , Expression unter Kontrolle des $P_{T7\Phi10}$
pPWW20	1,0 kbp PCR-Produkt (Primer PW10 und PW11) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBIV</i>
pPWW21	1,0 kbp PCR-Produkt aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW10 und PW11) in pUC18 (<i>HincII</i>)	<i>eryBIV</i>
pPWW22	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW20 in pET11a (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBIV</i> , Expression unter Kontrolle des $P_{T7\Phi10}$
pPWW23	0,8 kbp PCR-Produkt aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primern PW14 und PW15) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryCVI</i>
pBlueKSΔX(+)	pBluescriptKS(+), <i>XbaI</i> Schnittstelle deletiert	
pBlueKSRBSA	1,0 kbp PCR-Fragment (Primer RBS11AI und RBS11II) von pET11a <i>ApaI</i> hydrolysiert in pBlueKSΔX(+), (<i>ApaI/HincII</i>)	RBSA
pBlueKSRBSD	1,0 kbp PCR-Fragment (Primer RBS11DI und RBS11II) von pET11a <i>ApaI</i> hydrolysiert in pBlueKSΔX(+), (<i>ApaI/HincII</i>)	RBSD

Fortsetzung Tab. 2-3: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaften
pBlueKSRBSAermE	0,3 kbp <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment aus pUWL200ΔSprBII in pBlueKSRBSA (<i>KpnI/XbaI</i>)	RBSA, P _{ermE} *
pBlueKSRBSDermE	0,3 kbp <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment aus pUWL200ΔSprBII in pBlueKSRBSD (<i>KpnI/XbaI</i>)	RBSD, P _{ermE} *
pET11aII	1,0 kbp <i>NdeI/ApaI</i> -Fragment aus pBlueKSRBSA in pET11a (<i>NdeI/ApaI</i>)	Vektor zur Expression unter Kontrolle des P _{T7Φ10} , RBSA
pET11dII	1,0 kbp <i>NcoI/ApaI</i> -Fragment aus pBlueKSRBSD in pET11d (<i>NcoI/ApaI</i>)	Vektor zur Expression unter Kontrolle des P _{T7Φ10} RBSD
pUWL201ΔN	pUWL201 mit deletierter <i>NdeI</i> Schnittstelle	Vektor zur Expression unter Kontrolle des P _{ermE} *
pPWW10-1KSRBSAermE	1,9 kbp <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW10-1 in pBlueKSRBSAermE (<i>NdeI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), RBSA
pPWW10-sKSRBSAermE	1,8 kbp <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW10-s in pBlueKSRBSAermE (<i>NdeI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), RBSA
pUWL201RBSA	0,4 kbp <i>KpnI/HindIII</i> -Fragment aus pBlueKSRBSAermE in pUWL201ΔN (<i>KpnI/HindIII</i>)	Vektor zur Expression unter Kontrolle des P _{ermE} *, RBSA
pPWW24-1	2,2 kbp <i>KpnI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW10-1KSRBSAermE in pUWL201ΔN (<i>KpnI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P _{ermE} *
pPWW22II	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW20 in pET11aII (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBIV</i> , Expression unter Kontrolle des P _{T7Φ10}
pPWW25	0,9 kbp <i>NcoI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW17 in pQE60 (<i>NcoI/HindIII</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{T5}
pRBSAII	0,4 kbp PCR-Fragment aus pBlueKSRBSAermE (Primer RBS <i>Nde</i> und RBSII) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	RBSAII
pRBSDII	0,4 kbp PCR-Fragment aus pBlueKSRBSDermE (Primer RBS <i>Nco</i> und RBSII) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	RBSDII
pBlueKSRBSAermEII	0,4 kbp <i>NdeI/KpnI</i> -Fragment aus pRBSAII in pBlueKSRBSAermE (<i>NdeI/KpnI</i>)	RBSAII, P _{ermE} *
pBlueKSRBSDermEII	0,4 kbp <i>NdeI/KpnI</i> -Fragment aus pRBSAII in pBlueKSRBSDermE (<i>NdeI/KpnI</i>)	RBSDII, P _{ermE} *
pPWW27-1	1,6 kbp PCR Produkt aus chromosomaler DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW16 und PW18) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang)
pPWW27-s	1,5 kbp PCR Produkt aus chromosomaler DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW17 und PW18) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz)
pPWW28-1	1,6 kbp <i>BspHI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW27-1 in pQE60 (<i>NcoI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P _{T5}
pPWW29-1	1,9 kbp <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW10-1 in pBlueKSRBSAermEII (<i>NdeI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (lang)
pPWW30-1	2,2 kbp <i>KpnI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW29-1 in pUWL201ΔN (<i>KpnI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P _{ermE} *

Fortsetzung Tab. 2-3: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaften
pPWW31	1,0 kbp <i>BspHI/HindIII</i> -Fragment aus PCR mit Primern PW1 und PW2 und genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> in pBlueKSRBSDermEII	<i>eryBII</i>
pPWW32	1,4 kbp <i>KpnI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW31 in pUWL201ΔN (<i>KpnI/HindIII</i>)	<i>eryBII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW33	1,9 kbp <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW25 in pUWL201 (<i>EcoRI/XbaI</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW34-l	2,6 kbp <i>EcoRI/XbaI</i> Fragment aus pPWW28-l in pUWL201 (<i>EcoRI/XbaI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW35-l	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-l in pHM8a (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Integration und Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW36-l	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-l in pIJ4123 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Integration und Expression unter Kontrolle des P _{tipA}
pPWW36-s	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-s neu in pIJ4123 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle des P _{tipA}
pPWW37-l	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-l in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P _{T7Φ10}
pPWW37-s	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-s in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle des P _{T7Φ10}
pPWW38-l	1,5 kbp <i>NdeI/EcoRI</i> -Fragment aus pPWW9-l in pKSB201 (<i>NdeI/EcoRI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P _{ptr}
pPWW38-s	1,5 kbp <i>NdeI/EcoRI</i> -Fragment aus pPWW37-s in pKSB201 (<i>NdeI/EcoRI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle des P _{ptr}
pBWW6-l	1,6 kbp <i>BspHI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW27-l in pSUM2atrv (<i>NcoI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle von P _{ermE*} und P _{T7Φ10}
pBWW6-s	1,5 kbp <i>BspHI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW27-s in pSUM2atrv (<i>NcoI/HindIII</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle von P _{ermE*} und P _{T7Φ10}
pBWW6v	6,2 kbp <i>NcoI</i> -Fragment aus pNCO6,2 in pBWW6-l (<i>NcoI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle von P _{ermE*} und P _{T7Φ10}
pBWW7	0,9 kbp <i>NcoI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW25 in pSUM2atrv (<i>NcoI/HindIII</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle von P _{ermE*} und P _{T7Φ10}
pPWW403-7	1,2 kbp PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von <i>S. fradiae</i> (Primer SBerA und SBerC) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	Teilsequenz aus <i>tylCVI</i>
pPWW39-s	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-s in pDNW26RBSY (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW39-l	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-l in pDNW26RBSY (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW40-s	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-s in pAAW24.1 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle des P _{tipA}
pPWW40-l	1,5 kbp <i>NdeI/BglII</i> -Fragment aus pPWW9-l in pAAW24.1 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P _{tipA}

Fortsetzung Tab. 2-3: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaften
pPWW41a	3,5 kbp <i>ApaI</i> -Fragment aus chromosomaler DNA von <i>S. fradiae</i> in pUCBM21 (<i>ApaI</i>)	<i>tylCVI</i> , <i>tylRI</i>
pPWW41b	wie pPWW41a, aber umgekehrte Orientierung	<i>tylCVI</i> , <i>tylRI</i>
pPWW456I-1	pPWW41a <i>SalI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW456II-1	pPWW41b <i>SalI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW456I-2	pPWW41a <i>NotI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW456II-2	pPWW41b <i>NotI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW456I-3	pPWW41a <i>KpnI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW456II-3	pPWW41b <i>KpnI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW456I-4	pPWW41a <i>NcoI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW456II-4	pPWW41b <i>NcoI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW456I-5	pPWW41a <i>BamHI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW456II-5	pPWW41b <i>BamHI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW465-3	0,57 kbp <i>SstI</i> -Fragment aus pPWW41a in pUC18 (<i>SstI</i>)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW465-7	0,62 kbp <i>SstI/KpnI</i> -Fragment aus pPWW41a in pUC18 (<i>SstI/KpnI</i>)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW467-4	0,56 kbp <i>SalI/NotI</i> -Fragment aus pPWW41a in pUC18 (<i>SalI/NotI</i>)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW471-1	0,50 kbp <i>NcoI/KpnI</i> -Fragment aus pPWW41a in pUC18 (<i>NcoI/KpnI</i>)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW471-3	0,95 kbp <i>NcoI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW41a in pUC18 (<i>NcoI/BamHI</i>)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW471-5	pLC1-21 <i>KpnI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW471-7	pLC1-19 <i>KpnI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW472-1	0,81 kbp <i>SstI</i> -Fragment aus pPWW41a in pUC18 (<i>SstI</i>)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW472-5	0,40 kbp <i>PstI</i> -Fragment aus pPWW41a in pUC18 (<i>PstI</i>)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung

Fortsetzung Tab. 2-3: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaften
pPWW472-16	0,70 kbp <i>KpnI</i> -Fragemnt aus pLC1-21 in pUC18 (<i>KpnI</i>)	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW476-3	pPWW471-7 <i>SmaI</i> hydrolysiert und religiert	Verkürzungsklon zur Sequenzierung
pPWW42-s	2,0 kbp <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW39-s in pAL201 (<i>KpnI/XbaI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle P_{ermE^*}
pPWW42-l	2,0 kbp <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW39-l in pAL201 (<i>KpnI/XbaI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle P_{ermE^*}
pPWW42-v	pPWW42-l <i>NcoI</i> hydrolysiert und religiert	<i>eryBVI</i> (N-terminal verkürzt), Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW43	0,3 kbp PCR-Fragment aus pQE60 (Primer QENde2 und QEPvuII) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	RBS pQE60 mit nachfolgender <i>NdeI</i> -Schnittstelle
pQE60ΔN	pQE60 <i>NdeI</i> hydrolysiert mit Klenow DNA-PolymeraseI aufgefüllt und religiert	
pQE60N	0,3 kbp <i>EcoRI/PvuII</i> -Fragment aus pPWW43 in pQE60ΔN (<i>EcoRI/PvuII</i>)	Vektor zur Expression unter Kontrolle des P_{T5} wie pQE60 aber mit <i>NdeI</i> -Schnittstelle anstelle von <i>NcoI</i> -Schnittstelle
pPWW44	0,6 kbp PCR-Fragment von pPWW11 (Primer PW27 und PW28) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	hinterer Teil von <i>eryBVI</i> mit eingeführter <i>ClaI</i> -Schnittstelle
pPWW45	0,9 kbp PCR-Fragment von pPWW11 (Primer PW29 und PW30) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	Ende <i>eryBVI</i> bis Mitte <i>eryCIV</i> mit eingeführter <i>ClaI</i> -Schnittstelle am Ende von <i>eryBVI</i>
pPWW46	0,9 kbp PCR Produkt von pEFBA (Primer Apr1 und Apr2) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>aacC4</i>
pPWW47	1,4 kbp <i>SstI/NotI</i> -Fragment des rekombinantes PCR Produktes von pPWW11 (Primer PW27 und PW30) in pPWW11 (<i>NotI/SstI</i>)	<i>eryBVI</i> mit eingeführter <i>ClaI</i> -Schnittstelle und flankierende Bereiche
pPWW48	0,9 kbp <i>ApaI/ClaI</i> -Fragment aus pPWW46 in pPWW47 (<i>ApaI/ClaI</i>)	<i>aacC4</i> und flankierender Bereich von <i>eryBVI</i> , Mutagenese von <i>Sac. erythraea</i>
pPWW48.1	pPWW48 <i>ClaI</i> hydrolysiert und mit Klenow DNA-PolymeraseI aufgefüllt und religiert	<i>aacC4</i> und flankierender Bereich von <i>eryBVI</i> , Mutagenese von <i>Sac. erythraea</i>
pPWW49	1,3 kbp <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW22 in pUWL201PW (<i>NdeI/HindIII</i>)	<i>eryBIV</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW50	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW22 in pDNW26RBSY (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBIV</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW51	1,4 kbp PCR Produkt aus genomischer DNA von <i>S. fradiae</i> (Primer PW37 und PW38) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>tylCVI</i>
pPWW52	1,3 kbp <i>XbaI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW22 in pBlueKSRBSAermEII (<i>XbaI/HindIII</i>)	<i>eryBIV</i>

Fortsetzung Tab. 2-3: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaften
pPWW53	2,6 kbp <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW48 in pUWL218 (<i>EcoRI/HindIII</i>)	<i>aacC4</i> und flankierender Bereich von <i>eryBVI</i> , Mutagenese von <i>Sac. erythraea</i>
pPWW53.1	2,6 kbp <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW48.1 in pUWL218 (<i>EcoRI/HindIII</i>)	<i>aacC4</i> und flankierender Bereich von <i>eryBVI</i> , Mutagenese von <i>Sac. erythraea</i>
pPWW54	1,6 kbp <i>KpnI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW52 in pUWL201PW (<i>KpnI/HindIII</i>)	<i>eryBIV</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW55a	1,4 kbp PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW20 und PW21) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBVII</i> bis Mitte <i>eryK</i>
pPWW55b	wie pPWW55a jedoch umgekehrte Orientierung	<i>eryBVII</i> bis Mitte <i>eryK</i>
pPWW56	2,9 kbp PCR-Fragment aus pNCO6,2 (Primer PW19 und PW20) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryCIV</i> bis Mitte <i>eryK</i>
pPWW57	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW55a in pDNW26RBSY (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW58	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW55a in pPWW49 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW59	1,4 kbp <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW57 in pAL201 (<i>KpnI/XbaI</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW60	1,5 kbp <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW50 in pAL201 (<i>KpnI/XbaI</i>)	<i>eryBIV</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW61	0,6 kbp PCR-Fragment mit Primern PW24 und PW27 und pPWW11 als Templat in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBVI</i>
pPWW62-s	0,6 kbp <i>NotI/BglII</i> -Fragment aus pPWW61 in pPWW9-s (<i>NotI/BglII</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz)
pPWW62-l	0,6 kbp <i>NotI/BglII</i> -Fragment aus pPWW61 in pPWW9-l (<i>NotI/BglII</i>)	<i>eryBVI</i> (lang)
pPWW68	0,7 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW63U in pDNW26RBSY (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>dnmU</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW69	0,7 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW63U in pPWW49 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>dnmU</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW70	0,7 bp <i>KpnI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW69 in pAL201 Δ N (<i>KpnI/BamHI</i>)	<i>dnmU</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW71	0,7 kbp <i>KpnI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW68 in pAL201 Δ N (<i>KpnI/BamHI</i>)	<i>dnmU</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW72-l	2,6 kbp <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW63-l in pAL201 Δ N (<i>EcoRI/XbaI</i>)	<i>eryBVI</i> (lang), Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW72-s	2,5 kbp <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW63-s in pAL201 Δ N (<i>EcoRI/XbaI</i>)	<i>eryBVI</i> (kurz), Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW73	1,4 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW51 in pPWW70 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>tylCVI</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}

Fortsetzung Tab. 2-3: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaften
pPWW74	1,5 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pET16bdnmT in pPWW71 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>dnmT</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW75	1,5 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pET16bdnmT in pPWW70 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>dnmT</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW76	1,4 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW51 in pPWW71 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>tylCVI</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW77	8,5 kbp <i>BamHI</i> -Fragment aus pSVW in pAL201ΔN (<i>BamHI</i>)	<i>strRDELMB2N</i>
pPWW78	4,1 kbp <i>BamHI</i> -Fragment aus pNCO6,2 in pAL201ΔN (<i>BamHI</i>)	<i>eryCIV</i> , <i>eryCV</i> , <i>eryBVII</i>
pPWW79	1,5 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pET16bdnmT in pJOE2702 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>dnmT</i> , Expression unter Kontrolle des P_{rhaBAD}
pPWW80	0,7 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW63U in pJOE2702 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>dnmU</i> , Expression unter Kontrolle des P_{rhaBAD}
pPWW81	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW22 in pJOE2702 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBIV</i> , Expression unter Kontrolle des P_{rhaBAD}
pPWW82	0,4 kbp PCR Produkt aus chromosomaler DNA von <i>S. fradiae</i> (Primer PW39 und PW40) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>tylCVI</i> (vorderer Teil)
pPWW82a	0,4 kbp PCR Produkt aus pPWW41a (Primer PW39 und PW40) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>tylCVI</i> (vorderer Teil)
pPWW82b	wie pPWW82a aber umgekehrte Orientierung	<i>tylCVI</i> (vorderer Teil)
pPWW83	0,6 kbp <i>NcoI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW16 in pTRC99A (<i>NcoI/BamHI</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des P_{trc}
pPWW84	0,4 kbp <i>NdeI/PstI</i> -Fragment aus pPWW82 in pPWW73 (<i>NdeI/PstI</i>)	<i>tylCVI</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW85	0,4 kbp <i>NdeI/PstI</i> -Fragment aus pPWW82 in pPWW76 (<i>NdeI/PstI</i>)	<i>tylCVI</i> , Expression unter Kontrolle des P_{ermE^*}
pPWW86	68 bp <i>PstI/HindIII</i> -Fragment des PCR Produktes von pNCO6,2 (Primer PW47 und PW48) in pUC18 (<i>PstI/HindIII</i>)	<i>eryBVII</i> (Anfang)
pPWW87	68 bp <i>PstI/HindIII</i> -Fragment des PCR Produktes von pNCO6,2 (Primer PW48 und PW49) in pUC18 (<i>PstI/HindIII</i>)	<i>eryBVII</i> (Anfang)
pPWW88	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW22 in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBIV</i> , Expression unter Kontrolle des $P_{T7\Phi10}$
pPWW89	0,7 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW63U in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>dnmU</i> , Expression unter Kontrolle des $P_{T7\Phi10}$
pPWW90	0,9 kbp <i>PstI/BamHI</i> -Fragment aus pNCO6,2 in pPWW86 (<i>PstI/BamHI</i>)	<i>eryBVII</i>
pPWW91	0,9 kbp <i>PstI/BamHI</i> -Fragment aus pNCO6,2 in pPWW87 (<i>PstI/BamHI</i>)	<i>eryBVII</i>
pPWW92	1,3 kbp PCR Produkt aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW43 und PW44) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>eryBIII</i>

Fortsetzung Tab. 2-3: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten rekombinanten Plasmide

Bezeichnung	Konstruktion	Gen/Eigenschaften
pPWW93	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment des PCR Produktes aus genomischer DNA von <i>Sac. erythraea</i> (Primer PW41 und PW42) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBII</i>
pPWW94	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW91 in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{T7Φ10}
pPWW95	1,0 kbp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW93 in pJOE2775 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{rhaBAD}
pPWW96	1,3 kbp <i>NdeI/BglIII</i> -Fragment aus pPWW92 in pJOE2775 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>eryBIII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{rhaBAD}
pPWW97	1,0 kbp <i>NcoI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW90 in pTRC99A (<i>NcoI/BamHI</i>)	<i>eryBVII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{trc}
pUWL201PW	0,4 kbp <i>KpnI/HindIII</i> -Fragment aus pBlueKSRSBAermEII in pUWL201ΔN (<i>KpnI/HindIII</i>)	Vektor zur Expression unter Kontrolle des P _{ermE*} , RBSAII
pPWW98	1,6 kbp <i>KpnI/PstI</i> -Fragment aus pPWW49 in pAL201 (<i>KpnI/PstI</i>)	<i>eryBIV</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW99	1,4 kbp <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW7-c in pAL201 (<i>KpnI/XbaI</i>)	<i>eryBII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW100	1,6 kbp <i>KpnI/XbaI</i> -Fragment aus pPWW8-c in pAL201 (<i>KpnI/XbaI</i>)	<i>eryBIII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW101	1,0 <i>NdeI/PstI</i> -Fragment aus pPWW95 in pPWW98 (<i>NdeI/PstI</i>)	<i>eryBII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW102	1,3 <i>NdeI/PstI</i> -Fragment aus pPWW96 in pPWW98 (<i>NdeI/PstI</i>)	<i>eryBIII</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW103	4,0 kbp <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pLC1-10 in pAL201ΔN (<i>EcoRI/HindIII</i>)	<i>midL</i> und flankierender Bereich
pPWW104	4,0 kbp <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment aus pLC1-10 in pAL201ΔN (<i>EcoRI/BamHI</i>)	<i>midL</i> und flankierender Bereich
pPWW105	0,4 kbp <i>NdeI/PstI</i> -Fragment aus pPWW82a und 2,9 kbp <i>PstI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW41a in pPWW70 (<i>NdeI/BamHI</i>)	<i>tylCVI</i> , Expression unter Kontrolle des P _{ermE*}
pPWW106	0,4 kbp PCR Produkt aus chromosomaler DNA von <i>S. fradiae</i> (Primer PW31 und PW32) in pUC18 (<i>SmaI</i>)	<i>tylCVI</i> vorderer Teil mit <i>upstream</i> -Bereich
pPWW107	1,9 kbp <i>SstII</i> -Fragment aus pPWW41a in pPWW106 (<i>SstII</i>)	<i>tylCVI</i> mit <i>upstream</i> -Bereich
pPWW108	2,3 kbp <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment aus pPWW107 in pAL201ΔN (<i>EcoRI/BamHI</i>)	<i>tylCVI</i> mit <i>upstream</i> -Bereich
pPWW109	2,3 kbp <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pPWW107 in pAL201ΔN (<i>EcoRI/HindIII</i>)	<i>tylCVI</i> mit <i>upstream</i> -Bereich

2.4 Oligonucleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide sind in Tabelle 2-4 aufgeführt. Sie wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Gibco BRL (Eggenstein) oder Interactiva (Ulm) bezogen. Die kursiv geschriebenen Basen kennzeichnen die eingefügten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

Tab. 2-4: Übersicht der verwendeten Oligonucleotide

Bezeichnung	Sequenz	Gen
aacC4-a	5'-ATGCCCTCGTGGTCAGGTCTG-3'	<i>aacC4</i>
aacC4-b	5'-CAGTTGACCCAGGGCTGTCG-3'	<i>aacC4</i>
Apr1	5'-TTTGAATGGGCCATGTGCAG-3'	<i>aacC4</i>
Apr2	5'-GCTCATGAGATCGATCCAATCGACTG-3'	<i>aacC4</i>
PW1	5'-GGAGAGAACCATCATGACCACCGACG-3'	<i>eryBII</i>
PW2	5'-CACCAGCCGTAAGCTTCTCGGTTCC-3'	<i>eryBII</i>
PW3	5'-GCGCTCGCCATGGTCTTCCTTGTG-3'	<i>eryBIII</i>
PW4	5'-ACGTGGAAGGAGAAGCTTTCGAGATCGG-3'	<i>eryBIII</i>
PW5	5'-CGTGAGCTGGCCATGGCGGGCGGT-3'	<i>eryBVII</i>
PW6	5'-CGTGCTCGGGATCCGTACCTGCC-3'	<i>eryBVII</i>
PW7	5'-CCGGACCCTTACAGCATATGCGGGTCTTG-3'	<i>eryBVI</i>
PW8	5'-CCGCAGGGAGAGCATATGGGTGATCGG-3'	<i>eryBVI</i>
PW9	5'-GGCCGCCGAAGATCTCCAGGTCGG-3'	<i>eryBVI</i>
PW10	5'-AGCAAATGCTCATATGAATGGGATCA-3'	<i>eryBIV</i>
PW11	5'-GACGTCAGCAGGATCCGCACTAG-3'	<i>eryBIV</i>
PW12	5'-GCGGAGGGAATCCATGGCCACG-3'	<i>eryCII</i>
PW13	5'-GGAGAAGAGGATCCGCATCGCGGTT-3'	<i>eryCII</i>
PW14	5'-CGGAGGGAGCAGCCATGGACGAGG-3'	<i>eryCVI</i>
PW15	5'-CCCGTGGAGCGGATCCCCTGTGC-3'	<i>eryCVI</i>
PW16	5'-CGGACCCTTACAGTTCATGAGGGTCTTGA-3'	<i>eryBVI</i>
PW17	5'-CGCAGGGAGAGTTCATGAGTGATCGG-3'	<i>eryBVI</i>
PW18	5'-TGTGCAGGAAAGCTTCGGGGCC-3'	<i>eryBVI</i>
PW19	5'-TTCGCTCCCATATGAACACAACCTCG-3'	<i>eryCV</i>
PW20	5'-GCCGGCGAGATCTTCGACCTC-3'	<i>eryK</i>
PW21	5'-GAGCTGCATATGGCGGGCGGTTTC-3'	<i>eryBVII</i>
PW22	5'-AGCGGCTCCATATGGCGCGCGT-3'	<i>eryBVI</i>
PW23	5'-GAGGTGGCGCATATGCCGTTTCAGCG-3'	<i>eryBVI</i>
PW24	5'-CGCGCGTTAGATCTGGCGGTCC-3'	<i>eryBVI</i>

Fortsetzung Tab. 2-4: Übersicht der verwendeten Oligonucleotide

Bezeichnung	Sequenz	Gen
PW25	5'-GTCCCGGACAGCCATATGACGCTCCCCGG-3'	<i>tylCVI</i>
PW26	5'-GCCGGGGCCCGCCCGGTGC-3'	<i>tylCVI</i>
PW27	5'-TGCAGCGCGGCCCGCCG-3'	<i>eryBVI</i>
PW28	5'-GGTGTAGACGATCGATGCGCACGC-3'	<i>eryBVI</i>
PW29	5'-CGTGCGCATCGATCGTCTACAC-3'	<i>eryBVI</i>
PW30	5'-TTACGAATTTCGAGCTCGTCGGAGTA-3'	<i>eryCIV</i>
PW31	5'-GGCGTGGCGGGAGCTGAC-3'	<i>S. fradiae</i> ORF5
PW32	5'-CGATGGAGAAGAACCGCCCG-3'	<i>tylCVI</i>
PW33	5'-GGTTGTTCGTCTGGTGTGCGC-3'	<i>eryCVI</i>
PW34	5'-GCCGAAGATCGCCAGGTCG-3'	<i>eryCIV</i>
PW35	5'-CGGAGGACGCATATGAAGGCGCGG-3'	<i>dnmU</i>
PW36	5'-GTCGCCCCCGGATCCACGACC-3'	<i>dnmU</i>
PW37	5'-CCGGACAGCCATATGACGCCGTCC-3'	<i>tylCVI</i>
PW38	5'-CTCGGCCGGATCCACGGGAAG-3'	<i>tylCVI</i>
PW39	5'-TCGGGCCCCCATATGGCCGGT-3'	<i>tylCVI</i>
PW40	5'-GGTCGGCGATATCTGCAGCGTGTGATG-3'	<i>tylCVI</i>
PW41	5'-GAGAGAACCCATATGACCACCGACGC-3'	<i>eryBII</i>
PW42	5'-CGGTTCTCTTGGGATCCCTGCAAC-3'	<i>eryBII</i>
PW43	5'-GCGCTCCATATGATCTTCTTGTGGGACTAGGCAAATGCCGGATATG-3'	<i>eryBIII</i>
PW44	5'-GCTTTCGAGATCGGGAACGGAGATCTTACGACTTCCAGTCGGGG-3'	<i>eryBIII</i>
PW45	5'-GTCCGGCCCCATGGGGCGG-3'	<i>eryBIV</i>
PW46	5'-TCAGCAGTACCCGGATCCGTGCTCCTCG-3'	<i>eryBIV</i>
PW47	5'-CGTAAGCTTCCCATGGCTGGTGGT-3'	<i>eryBVII</i>
PW48	5'-CGGAGACGATGTGGTTCATCT-3'	<i>eryBVII</i>
PW49	5'-CGTAAGCTTCATATGGCTGGTGGTTTCG-3'	<i>eryBVII</i>
QE60Nde	5'-CACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTACATATGG-3'	
QE60Xba	5'-CAGCTCTAGAGCGGCGGATTTG-3'	
QE60PvuII	5'-CCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGG-3'	
QE60Nde2	5'-CACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTACATATGGGAGGA-3'	
RBS11aI	5'-CATGCTAGCCATATGTAATATCTCCTCCTTAA-3'	
RBS11dI	5'-CATGCTAGCCATGGTTAATATCTCCTCCTTAA-3'	
RBS11II	5'-GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAAT-3'	
RBSNde	5'-GCTAGCCATATGTAATTTCTCCTCTTTAATGTT-3'	
RBSNco	5'-GCTAGCCATGGTTAATTTCTCCTCTTTAATGT-3'	
RBSII	5'-CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTA-3'	

Fortsetzung Tab. 2-4: Übersicht der verwendeten Oligonucleotide

Bezeichnung	Sequenz	Gen
SBerA	5'-GGGCGCTTCTTCTCAATCGAG-3'	<i>eryBVI</i>
SBerB	5'-CAGTCCGAGCAGGGCGCGTGG-3'	<i>eryBVI</i>
SBerC	5'-CTGGATGTTGACGTAGTGGCTGTG-3'	<i>eryBVI</i>
up	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	
rp	5'-GAACAGCTATGACC ATG-3'	
promo	5'-GAAATAAATACGACTCACTATAGG-3'	
termi	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG-3'	

2.5 Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien

Plasmidtragende Bakterienstämme wurden immer unter entsprechendem Selektionsdruck (2.2.2) kultiviert.

2.5.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

E. coli Stämme wurden in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C kultiviert. Dem LB-Agar wurde zur Blau-Weiß-Selektion rekombinanter pUC18- und pBluescript-Derivate 40 µg/ml X-Gal zugesetzt. Dauerkulturen wurden aus Übernachtskulturen durch Zugabe von 30% Glycerin hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Als Übernachtskulturen (ÜNK) wurden Ansätze bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden.

2.5.2 Anzucht und Lagerung von Actinomyceten

Kulturen von Actinomyceten wurden bei 28-30°C unter starkem Schütteln (ca. 200 Upm) inkubiert. Sporensuspensionen wurden nach Bebrütung der Stämme auf entsprechenden Agar-Platten durch Abschwemmen der Sporen mit 30% Glycerin und Filtrieren durch sterile Baumwollwatte hergestellt und bei -20°C gelagert.

S. lividans wurde in TSB-Medium bzw. auf SMA-, R2YE- oder SPMR-Agarplatten inkubiert.

Sac. erythraea wurde in TSB-, M1-102- oder Sucrose-Succinat-Medium bzw. auf R2T-, R2T2- oder R2T20-Agar bebrütet.

Flüssigkulturen von *S. platensis*, *Sv. cinnamoneum*, *S. fradiae*, *S. mycarofaciens* und *S. peucetius* wurden in TSB-Medium kultiviert. Zur Herstellung von Sporensuspensionen

wurden *S. platensis* und *Sv. cinnamoneum* auf Sporulation-Agar, *S. fradiae* auf SPMR-Agar, *S. mycarofaciens* auf ISP-Medium 2 und *S. peucetius* auf TSB-Agar inkubiert.

2.5.3 Anzucht und Lagerung von *B. subtilis*

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

2.5.4 Anzucht und Lagerung von *M. luteus*

M. luteus wurde in TSB-Medium bzw. auf TSB-Agar bei 30-37°C bebrütet. Dauerkulturen wurden aus Übernachtskulturen durch Zugabe von 30% Glycerin hergestellt und bei -20°C aufbewahrt.

2.6 Hemmhoftests und Fütterungsversuche

Zur Untersuchung der Antibiotikaproduktion von *Sac. erythraea* Stämmen wurden aus einem auf TSB-Agar kultivierten Bakterienrasen runde (Ø 1 cm) Agarstückchen ausgestochen. Diese wurden auf TSB-Agarplatten, die zuvor mit *M. luteus* beimpft wurden, oder auf NB-Agarplatten, die zuvor mit *B. subtilis* Sporen beimpft wurden, aufgesetzt. Zunächst wurden die Platten für 1 h bei 4°C inkubiert und dann über Nacht bei 37°C bebrütet. Alternativ wurden zwischen 50 µl und 250 µl Kulturüberstand aus Flüssigkulturen auf ein Antibiotikatestplättchen (Ø 0,9 cm; Schleicher & Schüll) aufgetragen und auf die zuvor beimpften Agarplatten gelegt. *M. luteus* wurde entweder direkt oder in Soft Nutrient-Agar eingeschlossen auf die TSB-Agarplatten aufgebracht.

Dieser Hemmhoftest wurde leicht modifiziert, um die Erythromycin-Produktion von *Sac. erythraea*-Mutanten nach Fütterung mit Erythronolid B (EB) oder 3- α -Mycarosylerythronolid B (MEB) zu untersuchen. Die zu untersuchenden Stämme wurden auf einer kreisrunden Fläche (Ø 1 cm) auf TSB-Agar ausgestrichen und für 3-5 Tage bei 28-30°C inkubiert. Dann wurden mit Hilfe steriler Zahnstocher kleine Löcher in den Bakterienrasen gebohrt. In diese Löcher wurden nun 10 µl einer 10 mM ethanolischen Stammlösung von EB oder MEB pipettiert. Nach Trocknung und Inkubation bei 28-30°C für weitere 24 h wurde die gesamte Agar-Platte mit *M. luteus* in Soft Nutrient-Agar überschichtet über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.7 Extraktion und MS-Analyse der Metabolite von *Sac. erythraea*-Stämmen

Die zu untersuchenden *Sac. erythraea* Stämme wurden zunächst für 3-7 Tage bei 28-30°C in 15 ml Sucrose-Succinat-Medium kultiviert. Bei plasmidhaltigen Stämmen wurde Thiostrepton zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks zugegeben. Die Zellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Kulturüberstand mit wässrigem Ammoniak auf pH 9-10 eingestellt. Die Extraktion erfolgte dreimal mit je 15 ml Essigsäureethylester.

Die organische Phase wurde mittels Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) mit einem Triple State Quadrupol Massenspektrometer, TSQ 7000 (ThermoQuest Finnigan, Egelsbach) oder einem Ion Trap LC Massenspektrometer, LCQ (ThermoQuest Finnigan, Egelsbach) analysiert. Das Einbringen des Analyten in das Massenspektrometer erfolgte entweder durch Direktinjektion über eine Hamiltonspritze mittels Spritzenpumpe (3-6 µl/min) oder mittels nano-Spray-Technik. Die hierzu verwendeten nano-Spray-Nadeln stammten von Protana (Odense, Dänemark). Die Massenspektren wurden im Positivmodus aufgenommen. Als „sheath-liquid“ wurde im Falle der Direktinjektion 0,025% TFA in 2-Propanol verwendet. Die angelegte Spannung betrug zwischen 2 und 4 kV. Zur genaueren Analyse wurden von einigen Ionen Fragmentspektren (MS/MS-Spektren) aufgezeichnet. Die hierzu angelegte Kollisionsenergie betrug zwischen -17 eV und -55 eV.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mittels Kochpräparation (Sambrook et al. 1989) und alkalischer Lyse (Birnboim und Doly 1979). Die Isolation von Plasmiden aus *S. lividans* und *Sac. erythraea* und von Plasmiden aus *E. coli* für DNA-Sequenzierreaktionen wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) oder dem Nucleo Spin Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt.

Streptomyceten-Gesamt-DNA wurde entsprechend der von Mehling et al. (1995) oder Pospich und Neumann (1995) beschriebenen Methoden isoliert.

2.8.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNA wurde in Agarosegelen nach der bei Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode mit 1 x TAE (4,84 g Tris, 1,14 ml Eisessig, 0,08 g EDTA, H₂O ad 1000 ml) als Elektrophoresepuffer getrennt. Es wurden Geltray-Gelkammern der Firma Renner (Dannstadt) verwendet. Als Längenstandard wurden „1 kb ladder“, „100 bp ladder“ (beide Life Techno-

logies, Karlsruhe) oder *EcoRI-HindIII*-hydrolysierte λ -DNA verwendet. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (366 nm) enthielt die Agarose 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid.

2.8.3 *In vitro* Manipulation von DNA

Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatase (CIP) und T4-DNA Ligase wurden gemäß der Empfehlungen der jeweiligen Hersteller verwendet. Entsprechendes galt für die Entfernung von 3'- oder 5'-Überhängen von DNA-Fragmenten mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I.

2.8.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Reinigung von *in vitro* manipulierter DNA erfolgte durch Trennung in Agarosegelen und anschließender Gelelution mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden), dem Nucleo Spin Extract 2 in 1 Kit (Macherey-Nagel, Düren) oder dem Jet-Sorb-Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Angaben der Hersteller.

2.8.5 Radioaktive und nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit dem rediprime Random Primer Labelling Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 50 μCi α -[^{32}P]-dCTP (3000 Ci/mmol) nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert.

Durch den Einbau von Dig-11-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim) wurden DNA-Fragmente nicht-radioaktiv markiert. Dies erfolgte nach dem Prinzip des „Random Oligonucleotide Primed Labelling“ (Feinberg und Vogelstein 1983/1984, Dig High Prime Kit; [Roche Diagnostics, Mannheim]).

2.8.6 Southern Blotting, Kolonie Blotting und DNA-DNA-Hybridisierung

Zur Übertragung gelelektrophoretisch getrennter hydrolysiertes DNA auf positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde das Transfer-system nach Chomczynski (1992) mit 0,4 N NaOH als Transferpuffer gewählt. Die Transferzeit betrug 8 bis 12 h. Die Membran wurde anschließend in 2 X SSC (20 X SSC: 3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH 7,2) geschwenkt und 3 min mit UV-Licht (366 nm) bestrahlt.

Für das Screenen von plasmidhaltigen *E. coli* Kolonien, die ausgehend von einer „shot-gun“-Klonierung vorlagen, wurde die Methode der Kolonie-Hybridisierung angewendet. Auf einer

LB-Agar-Platte mit Antibiotikum wurden jeweils 46 *E. coli* Klone sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Dann wurde die Platte für mindestens 30 min auf 4°C gestellt bevor die auf Plattengröße zurechtgeschnittene positiv geladene Nylonmembran für etwa 1 min auf die Agar-Plattenoberfläche gelegt und leicht angedrückt wurde. Nach vorsichtigem Abziehen wurde die Membran mit der Kolonieseite nach oben für 15 min auf Whatman 3 MM Papier, welches mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 mM NaCl, 0,1% SDS) getränkt war, gelegt. Anschließend wurde die Membran 15 min auf Whatman 3MM Papier, getränkt mit Neutralisationslösung (1,0 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5), überführt bevor sie für weitere 15 min auf mit 2 X SSC getränktes Whatman 3 MM Papier gelegt wurde. Schließlich wurde für 3 min mit UV-Licht (366 nm) bestrahlt.

Hybridisierungen erfolgten in Plastikschüsseln und temperierbaren Wasserbadschüttlern. Prähybridisierungs- und Hybridisierungstemperaturen (55–68°C, je nachdem, ob es sich um hetreologe oder um homologe DNA-Sonden handelte) waren immer identisch. Bei DNA-DNA Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden wurde die Membran zunächst für 2-4 h in Hybridisierungslösung (6 X SSC, 0,5% SDS, 1% Blockingreagenz [Roche Diagnostics, Mannheim]) geschwenkt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung erneuert und zu dieser die hitzedenaturierte (100°C, 5 min) [³²P]-markierte DNA-Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Nicht gebundene Sonde wurde anschließend durch Waschen mit 6 X SSC, 0,5% SDS entfernt. Wenn nötig wurde die Stringenz der Waschschritte erhöht, (a) durch Erniedrigung der SSC Konzentration, (b) durch Erhöhung der Inkubationstemperatur. Die Detektion erfolgte mit „Hybond MP“-Röntgenfilmen unter Verwendung von „Quanta III“ Verstärkerfolien (Dupont) bei -70°C.

Bei Verwendung nicht-radioaktiv markierter Sonden erfolgte die Hybridisierung im „High-SDS“-Puffer (5 X SSC, 0,1% N-Laurylsarcosin, 0,02% SDS, 1% Blockingreagenz [Roche Diagnostics, Mannheim]). Der immunologische Nachweis hybridisierter Dig-11-dUTP-markierter DNA erfolgte mit dem „DIG Nucleic Acid Detection Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers und NBT/BCIP als Substrat für die alkalische Phosphatase.

2.8.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte nach dem von Sanger et al. (1977) beschriebenen Didesoxy-Nucleotid-Kettenabbruchverfahren. Die Sequenzierung mit CY5-markierten Primern (up und rp bzw. promo und termi) erfolgte mit dem Thermosequenase Cycle-Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die aus der Sequenzierungsreaktion resultierenden Fragmente wurden in einem 6 M Harnstoff/6% „HydroLink Long Ranger“-Gel (Biozym, Hessisch Oldendorf) getrennt und mittels eines „A.L.F. Express“

(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) detektiert. Die Umsetzung der gemessenen Fluoreszenzspitzen zu einer DNA-Sequenz erfolgte durch das Computerprogramm A.L.F.Win 2.10.

2.8.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde nach Arnheim und Erlich (1992) in Thermocyclern (Biometra, Göttingen) mit einer Heizrate von 1°C/s durchgeführt. Es wurden *Vent*- (New England Biolabs, Schwalbach) und *Taq*-DNA-Polymerase (Life Technologies, Karlsruhe) sowie das Advantage-GC cDNA PCR Kit (Clontech, Heidelberg) unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen verwendet. In Tabelle 2-5 sind die Standardzusammensetzungen der PCR-Ansätze für *Vent*- und *Taq*-Polymerase aufgeführt.

Tab. 2-5: Standardzusammensetzung für PCR mit *Vent*- oder *Taq*-Polymerase

Zusammensetzung eines Standardreaktionsansatzes (100 µl)	<i>Vent</i> -DNA-Polymerase	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
Templat-DNA	100 ng (chromosomale DNA), 10 ng (Plasmid –DNA)	100 ng (chromosomale DNA), 10 ng (Plasmid-DNA)
Primer, je	0,5 µM	0,5 µM
dNTP, je	0,2 mM	0,2 mM
MgCl ₂	2,0 mM	2,0 mM
<i>Taq/Vent</i> -DNA-Polymerasepuffer (10 x)	10 µl	10 µl
DMSO	10%	10%
DNA-Polymerase (Zugabe bei Schritt 2)	2,0 U	2,5 U

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung des Advantage-GC cDNA PCR Kits entsprach der vom Hersteller angegebenen. Die PCR-Ansätze wurden mit jeweils 70 µl sterilem Mineralöl überschichtet. Die für die Amplifikation eines Zielgens entsprechenden optimalen Primerpaare sowie die Hybridisierungstemperaturen wurden mit dem Programm PrimerFind 3.0 (Fröbel Labor Geräte, Lindau) ermittelt. Ausgehend von einem Standardprotokoll wurden die PCR-Bedingungen für jedes verwendete Primerpaar (vgl. 2.4) optimiert (Tab. 2-6).

Wurde mittels PCR eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsschnittstelle eingefügt, lag die Hybridisierungstemperatur innerhalb der ersten sechs Zyklen (Schritt 2 bis 4) entsprechend der Anzahl an auszutauschenden Basen unterhalb der Schmelztemperatur des mutagenisierenden Oligonucleotids. Wiesen die Primer keine Basenaustausche auf, so entfielen die Schritte 2 bis 4 der Standardreaktionsbedingungen. Die Verlängerungszeit betrug 1 min/kbp

Produktlänge. *Vent*- oder *Taq*-Polymerase wurden bei Schritt 2 des ersten Zyklus zugegeben während bei Verwendung des Advantage-GC cDNA PCR Kits die Polymerase bereits von Anfang an dem Reaktionsansatz zugefügt wurde. Zur Einführung einer Mutation innerhalb eines zu amplifizierenden DNA-Fragmentes wurde die Methode der rekombinanten PCR nach Higuchi (1990) angewandt.

Tab. 2-6: Standardreaktionsbedingungen für die PCR mit *Vent*- oder *Taq*-Polymerase; die Angaben in Klammern entsprechen den Bedingungen bei Verwendung des Advantage-GC cDNA PCR Kits

	Schritt	Temperatur	Dauer
	1	98°C	5 min (3 min)
5 X	2	95°C	1 min
	3	variabel	1 min
	4	72°C (68°C)	1 min/kbp
	5	95°C	1 min
30 X	6	variabel	1 min
	7	72°C (68°C)	1 min/kbp
	8	72°C (68°C)	1,5 min

2.8.9 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen und die Transformation mit Plasmid-DNA wurde nach Hanahan (1983) durchgeführt.

S. lividans wurde nach dem Protokoll von Babcock und Kendrick (1988) protoplastiert und transformiert.

Die Protoplastierung und Transformation *Sac. erythraea* red variant geschah in Anlehnung an Gaisser et al. (1997). Eine 30 ml Flüssigkultur in TSB-Medium wurde für 4 bis 6 Tage bei 28°C bis 30°C unter starkem Schütteln (200 Upm) kultiviert. Für eine optimale Transformationseffizienz wurden die Zellen mit dem Beginn der Produktion von rotem Pigment geerntet. Das Mycel wurde abzentrifugiert und mit 10,3% Saccharose-Lösung gewaschen. Anschließend wurde in 30 ml PT-Puffer (100 g Saccharose, 0,25 g K₂SO₄, 5,1 g MgCl₂·6H₂O und 2 ml Spurenelementelösung in 875 ml H₂O autoklavieren; nach dem Autoklavieren: 25 ml CaCl₂ (1 M) und 100 ml TES (0,25 M, pH 7,2) zugeben) mit 2-5 mg/ml Lysozym suspendiert, bei 30°C inkubiert und die Protoplastierung mikroskopisch verfolgt. Die Protoplastierung konnte bis zu 4 h dauern, und das Mycel wurde etwa alle 30 min vorsichtig auf- und abpipettiert. Die trübe obere Phase, die die Protoplasten enthielt, wurde schließlich mit einer Pipette abgenommen (ca. 20 ml) und die Protoplasten abzentrifugiert (2500 Upm, 15 min). Dann wurden die Protoplasten mit 10 ml PT-Puffer gewaschen, in 2-3 ml PT-Puffer

aufgenommen, zu 150 µl aliquotiert und zunächst für 12 h bei -20°C, dann bei -80°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Zur Transformation der Protoplasten wurde ausschließlich unmethylierte Plasmid-DNA (aus *E. coli* ET12567 oder *E. coli* JM 110 präpariert) verwendet. 10 µg Plasmid-DNA in wäßriger Lösung und 400 µl PEG-Lösung (25%PEG 3350 [Sigma, Deisenhofen] in PT-Puffer) wurden so an den Rand des Eppendorf-Reaktionsgefäßes, das die Protoplasten enthielt, gegeben, daß sie gleichzeitig die Protoplasten erreichten. Dann erfolgte die Zugabe von 400 µl PT-Puffer und das Ausplattieren auf zuvor gut getrockneten (2-3 h) R2T20-Agarplatten. Nach Inkubation bei 28-30°C für 24 h wurden die Platten mit Thiostrepton-Lösung überschichtet (Endkonzentration 10 µg/ml). Nach weiteren 6-7 Tagen Inkubation bei 28-30°C konnten die Transformanten erneut ausgestrichen werden.

Zur Mutagenese von *Sac. erythraea* wurde ss-DNA (siehe 2.8.10) verwendet.

2.8.10 Herstellung von ss-DNA zur Transformation von *Sac. erythraea*

Zur alkalischen Denaturierung wurden 9 µl einer Plasmid-DNA-haltigen Lösung (5-10 µg DNA) mit 2 µl 1 M NaOH versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach schneller Abkühlung auf 4°C wurden 2 µl 1 N HCl zur Lösung zugeben (Oh und Chater 1997). Die auf diese Weise behandelte DNA wurde umgehend für die Transformation verwendet.

2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Proteinbestimmungs-Kits (BioRad, München) nach der Methode von Bradford (1976) spektralphotometrisch bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach der Methode von Laemmli et al. (1970) mit einem 5% Sammel- und einem Trenngel, dessen Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration je nach Anwendung zwischen 9% und 12% betrug. Analytische Gelelektrophoresen wurden in einer Minigel-Twin (Biometra, Göttingen) bei konstanter Spannung von 120 V durchgeführt. Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue R-250 bzw. G-250 (Merril 1990) gefärbt. Als Molmassenstandard wurde der VII-L-Marker (M_r : 14 kDa [α -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. Sollte das Gel

anschließend geblottet werden, wurden die vorgefärbten Proteinmarker im Molekulargewichtsbereich von 2,8 bis 43,0 kDa oder von 14,3 bis 200 kDa der Firma Life Technologies (Karlsruhe) verwendet.

2.11 Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membran

Zur Western-Blot-Analyse wurden Proteine nach analytischer SDS-PAGE mittels einer TRANS-BLOT SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München) auf Hybond P-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Die Membran wurde zuvor 30 s in MeOH und 10 min in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% Methanol, pH 9,2 [Bjerrum und Schafer-Nielsen 1986]) äquilibriert. Der Transfer erfolgte 10-15 min bei 250 mA konstanter Stromstärke in Transferpuffer. Die erfolgreiche Übertragung auf die Membran wurde durch eine reversible Ponceau S-Färbung (0,2% Ponceau S in 1% Essigsäure) mit anschließender Hintergrundentfärbung durch H₂O überprüft. Durch Inkubation in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) konnte die Färbung rückgängig gemacht werden.

2.12 Immunologischer Nachweis immobilisierter His-tag-Proteine

Zum Nachweis immobilisierter His-tag-Proteine (vgl. 2.11) wurde die Membran 2-8 h mit Blocking Puffer (3% BSA in TBS-Puffer) inkubiert und anschließend 60 min mit dem Erstantikörper (Penta-His-Antikörper, Qiagen (Hilden)), der 1:1000 (0,2 µg/ml) in Blocking Puffer verdünnt wurde, behandelt. Überschüssiger Erstantikörper wurde durch zweimaliges (je 10 min) Waschen mit TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X-100) und einmaliges Waschen mit TBS entfernt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Anti-Rabbit-IgG/anti-mouse-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat [Roche Diagnostics, Mannheim]), der 1:1000 (220 mU/ml) mit Blocking-Puffer verdünnt wurde. Nach Entfernen des ungebundenen Zweitantikörpers (3 X 10 min Waschen mit TBST) erfolgte der indirekte Nachweis des Erstantikörpers mit NBT/BCIP (Roche Diagnostics, Mannheim) als Substrat für die Alkalische Phosphatase.

2.13 Heterologe Genexpression

2.13.1 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter Kontrolle des Promotors P_{T7F10}

Wenn die Transkription zu exprimierender Gene unter Kontrolle des Promotors P_{T7F10} (Giordano et al. 1989; Dubendorff und Studier 1991) stand, wurden *E. coli* BL21(DE3) oder

E. coli JM109(DE3) als Wirtsorganismen verwendet. Beide *E. coli* Stämme tragen eine Kopie des Gens für die DNA-abhängige-RNA-Polymerase des Phagen T7 stabil in das Genom integriert. Zur Expression heterologer Gene wurden 10 ml LB-Medium, 2 X TY-Medium oder LB-Medium mit Sorbitol und Betain mit einer ÜK des plasmidtragenden *E. coli* T7-Expressionsstammes auf eine O.D.₅₈₀ von 0,05 beimpft und bei 18-37°C geschüttelt (180 Upm). Bei Erreichen einer O.D.₅₈₀ = 0,8 wurde die Expression des T7-RNA-Polymerasegens durch IPTG-Zugabe (Endkonz.: 0,5 mM) induziert. Die Probennahme erfolgte vor, sowie zu definierten Zeitpunkten nach IPTG-Zugabe.

2.13.2 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter Kontrolle des Promotors P_{T5}

Standen die zu exprimierenden Gene unter Kontrolle des Promotors P_{T5} (Bujard et al. 1987), wurden *E. coli* M15[pREP4] oder *E. coli* JM109 als Wirtsorganismen verwendet. Zur Expression heterologer Gene wurden 10 ml LB-Medium mit einer ÜK des plasmidtragenden *E. coli* T5-Expressionsstammes auf eine O.D.₅₈₀ von 0,05 beimpft und bei 18-37°C geschüttelt (180 Upm). Bei Erreichen einer O.D.₅₈₀ = 0,8 wurde die Genexpression durch IPTG-Zugabe (Endkonz.: 0,5 mM) induziert. Die Probenentnahme erfolgte vor, sowie zu definierten Zeitpunkten nach IPTG-Zugabe.

2.13.3 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter Kontrolle des Promotors P_{rhaBAD}

Wenn die Transkription zu exprimierender Gene unter Kontrolle des Promotors P_{rhaBAD} (Egan und Schleif 1993) stand, wurden *E. coli* DH5α oder *E. coli* JM109 als Wirtsorganismen verwendet. Zur Expression heterologer Gene wurden 10 ml LB-Medium, 2 X TY-Medium oder LB-Medium mit Sorbitol und Betain mit einer ÜK des plasmidtragenden *E. coli* Expressionsstammes auf eine O.D.₅₈₀ von 0,05 beimpft und bei 18-37°C geschüttelt (180 Upm). Das Medium zur Genexpression wurde mit 0,2% L-Rhamnose zur Induktion des Promotors P_{rhaBAD} angereichert. Die Probennahme erfolgte zu definierten Zeitpunkten während des Zellwachstums sowie in der stationären Phase.

2.13.4 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter Kontrolle des Promotors P_{trc}

E. coli DH5α wurde als Wirtsorganismus verwendet, wenn die Transkription der zu exprimierenden Gene unter Kontrolle des Promotors P_{trc} (Brosius et al. 1985) stand. 10 ml LB-Medium, 2 X TY-Medium oder LB-Medium mit Sorbitol und Betain mit einer ÜK des plasmidtragenden *E. coli* Expressionsstammes auf eine O.D.₅₈₀ von 0,05 beimpft und bei 18-37°C geschüttelt (180 Upm). Bei Erreichen einer O.D.₅₈₀ = 0,8 wurde die Genexpression durch IPTG-Zugabe

(Endkonz.: 0,5 mM) induziert. Die Probenentnahme erfolgte vor, sowie zu definierten Zeitpunkten nach IPTG-Zugabe.

2.13.5 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter Kontrolle des Promotors P_{ptr}

Zur Expression heterologer Gene in *E. coli* unter Kontrolle des Promotors P_{ptr} (Salah-Bey et al. 1995) wurden 10 ml LB-Medium mit einer ÜK des plasmidtragenden *E. coli* DH5 α Expressionsstammes auf eine O.D.₅₈₀ von 0,05 beimpft und bei 37°C geschüttelt (180 Upm). Die Probennahme erfolgte zu definierten Zeitpunkten während des Zellwachstums sowie in der stationären Phase.

2.13.6 Heterologe Genexpression in *S. lividans* unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*}

S. lividans 66 TK23 wurde als Wirtstamm für die Genexpression unter Kontrolle des konstitutiven Promotors P_{ermE^*} (Bibb et al. 1985a) verwendet. Die jeweiligen plasmidtragenden *S. lividans*-Transformanten wurden in TSB-Medium bei 28-30°C kultiviert. Die Hauptkultur wurde durch 1:100 Verdünnung einer 3 Tage alten Vorkultur angeimpft und unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Kulturen wurden nach 24-72 h geerntet, zweimal mit 10,3%iger Saccharoselösung gewaschen und zur Herstellung von zellfreiem Extrakt verwendet (vgl. 2.14).

2.13.7 Heterologe Genexpression in *S. lividans* unter Kontrolle des Promotors P_{tipA}

S. lividans 66 1326 wurde als Wirtsorganismus verwendet, wenn die Transkription der zu exprimierenden Gene unter Kontrolle des mit Thiostrepton-induzierbaren Promotors P_{tipA} (Murakami et al. 1989) stand. Die plasmidtragenden *S. lividans* Stämme wurden in YEME-Medium bei 28-30°C für ca. 12 h inkubiert. Dann wurde der Promotor P_{tipA} durch Zugabe von Thiostrepton (Endkonzentration: 10 μ g/ml) induziert. Nach weiteren 24-28 h wurden die Kulturen geerntet, zweimal mit 10,3%iger Saccharoselösung gewaschen und zur Herstellung von zellfreiem Extrakt verwendet (vgl. 2.14).

2.13.8 Heterologe Genexpression in *S. lividans* unter Kontrolle des Promotors P_{ptr}

S. lividans 66 1326 wurde als Wirtstamm für die Genexpression unter Kontrolle des durch Streß induzierbaren Promotors P_{ptr} (Salah-Bey et al. 1995) verwendet. Die jeweiligen plasmidtragenden *S. lividans*-Stämme wurden in J-Medium bei 28-30°C kultiviert. Die Hauptkultur in MG-Medium wurde durch 1:100 Verdünnung einer 3 Tage alten Vorkultur beimpft und eben-

falls bei 28-30°C inkubiert. Der Promotor P_{pir} wurde auf diese Weise durch Nahrungsmangel induziert. Die Kulturen wurden nach 24-72 h geerntet, zweimal mit 10,3%iger Saccharoselösung gewaschen und zur Herstellung von zellfreiem Extrakt verwendet (vgl. 2.14).

2.14 Gewinnung zellfreier Extrakte von *E. coli* und *Streptomyces*

Für den Zellaufschluß wurde 1 ml Aufschlußpuffer I (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) pro 1 g Zellnaßgewicht verwendet. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Ultraschall („Bandelin Sonoplus UW60“ mit 5 mm Mikrospritze und Spannungsquelle „HD60“; Bandelin, Berlin). Die Zellen wurden zwischen 3 und 10 Mal (je 20 s mit 30 s Pause zwischen den Beschallungen) mit 70% Intensität auf Eis beschallt. Zelldebris wurde anschließend durch Zentrifugation (30 min, 30000 g, 4°C) abgetrennt. Zellfreie Extrakte wurden entweder sofort weiterverwendet oder in N_2 (fl.) schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.15 Reinigung von His-tag-Proteinen mittels Ni-NTA-Agarose

Die Reinigung von His-tag-Proteinen erfolgte im Batch-Verfahren in Eppendorf-Reaktionsgefäßen. 2 ml zellfreier Extrakt des Expressionsstammes, für dessen Herstellung Aufschlußpuffer II (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM $MgCl_2$, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 mg/ml BSA) verwendet wurde, wurden für 60 min auf Eis mit 500 μ l einer 50%igen Suspension von Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) in Aufschlußpuffer bei guter Durchmischung inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 15000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Ni-NTA-Agarose wurde zweimal mit je 2 ml Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 mg/ml BSA) gewaschen, und schließlich wurde das His-tag Protein mit viermal 250 μ l Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 mg/ml BSA) eluiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils für 10 min bei 15000 x g zentrifugiert. Zur Abtrennung des Imidazols aus den Elutionsfraktionen wurden Microcon Zentrifugen-Filtereinheiten YM10 (Millipore, Eschborn) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.16 Q-Sepharose-Säulenchromatographie

Zur Anreicherung von His-tag DnmU wurde der Anionenaustauscher Q-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. 35 ml der Q-Sepharose FF wurden in eine Säule (\varnothing 2,6 cm, l 7 cm) gepackt und mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5 equilibriert. Dann wurden 27 ml zellfreier Extrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pPWW89 mit einem Proteingehalt von

10,2 mg/ml auf die Säule aufgetragen und mit ca. 30 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5 nachgewaschen. Die Elution, die an einem UV-Monitor bei 280 nm verfolgt wurde, erfolgte mit einer Flußrate von 2,8 ml/min und einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl in 500 ml Tris/HCl pH 7,5. Insgesamt wurden 330 Fraktionen à 2,8 ml aufgefangen, von denen jede fünfte Fraktion mittels SDS-PAGE analysiert wurde. Die Fraktionen 133 bis 145 (insgesamt 32,5 ml), die His-tag DnmU enthielten, wurden gepoolt und mit Hilfe einer Amicon Diaflo Ultrafiltrationsmembran YM10, Ø 43 mm (Millipore, Eschborn) in einer Amicon-Rührzelle (Millipore, Eschborn) auf ca. 10 ml mit einem Proteingehalt von 4,4 mg/ml eingengt.

2.17 Enzymtests

2.17.1 Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit Enzymen des L-Mycarose-Biosynthesewegs

Ausgehend von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose wurden die an der Biosynthese von dTDP-L-Mycarose beteiligten Enzyme in allen möglichen Kombinationen in Form der zellfreien Proteinextrakte nach der Genexpression in *E. coli* in folgendem Testsystem eingesetzt:

Tris/HCl pH 7.5	50 mM
dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose	20 mM
MgCl ₂	5 mM
KCl	5 mM
NADPH	10 mM (für jedes reduzierende Enzym)
SAM	20 mM (falls Methyltransferase im Assay)
Proteinextrakt	je 10 µl
Gesamtvolumen	200 µl

Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Substrates dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose gestartet. Die Probenentnahme von je 50 µl erfolgte nach ½ h, 1 h, 3 h und 12 h. Durch Filtration in einer Microcon Filtriereinheit mit Ultrafiltrationsmembran YM-10 (Millipore, Eschborn) wurde die Reaktion gestoppt, und unlösliche Partikel wurden abgetrennt. Die Analyse der einzelnen Testansätze erfolgte mittels HPLC (s. 2.18), FPLC (s. 2.19) und LC-MS-Kopplung (s. 2.20).

2.17.2 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität von His-tag-DnmU

Zur Bestimmung der Aktivität von His-tag-DnmU wurde ein von Verseck (1997) entwickeltes Testsystem verwendet. Es handelte sich hierbei um einen gekoppelten kontinuierlichen Enzymtest, bei dem mit der dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-glucose Epimerase DnmU und mit der

dTDP-4-Keto-L-rhamnose Synthase RmlD (angereichert; Günther, IET, FZ-Jülich) inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-glucose gestartet und anhand der Abnahme von NADPH bei $\lambda = 340$ nm photometrisch verfolgt ($\epsilon_{340\text{nm}}(\text{NADPH}) = 6,2 \cdot 10^3$ l/mol·cm). Die Testansätze wurden bei 37°C inkubiert. Die photometrischen Messungen erfolgten an einem THERMOmax Mikrotiterplatten-Lesegerät (Molecular Devices, Ismaning/München). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SOFTmax-Pro Version 1.2.0 (Molecular Devices, Ismaning/München). Der Testansatz hatte die folgende Zusammensetzung:

Tris/HCl, pH 7,8	50 mM
dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose	2 mM
NADPH	1 mM
RmlD (angereichert)	10 μ l
DnmU-Testfraktion	variabel
Gesamtvolumen	100 μ l

Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte nach der Formel:

$$C = \frac{\Delta E \cdot V_1}{\epsilon \cdot d \cdot V_2 \cdot c_p} \text{ (mol/min} \cdot \text{mg Protein)}$$

C = spezifische Enzymaktivität [U = μ mol/min]	d = Schichtdicke des Flüssigkeitsspiegels: 0,313 cm
ΔE = Extinktionsänderung (linearer Bereich) [1/min]	V_2 = Volumen der eingesetzten Probe [μ l]
V_1 = Volumen des gesamten Testansatzes [μ l]	c_p = Proteinkonzentration der eingesetzten Probe [mg/ml]
ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [l/mol·cm]	

2.18 High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

Die HPLC-Analysen zum Nachweis von Nucleotid-aktivierten Zuckern erfolgten mit einer Anlage (HPLC-Pumpe 480, Degase DG1310, Probengeber Gina 160, Motorventil 94/344, Analysator UVD 160S) von Dionex Softron (Germering). Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software Chromeleon V4.10 (Dionex, Germering). Folgendes Trennsystem (Ryll und Wagner 1991) wurde für die Reversed Phase Ionenpaarchromatographie verwendet:

Säule: RP18; Hypersil ODS 5 μ , 4,0 mm X 125 mm; Detektionswellenlänge: 254 nm; Flußrate: 1,0 ml/min, Temperatur 40°C

Laufmittel A:	Kaliumdihydrogenphosphat	100 mM
	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	7,5 mM
	pH 5,3 (mit KOH eingestellt)	
Laufmittel B:	Laufmittel A	70%
	Methanol	30%
	pH 5,9 (mit KOH eingestellt)	

Elutionsprogramm:	Zeit [min]	Vol% B
	2,5	0%
	16,5	40%
	17,5	100%
	29,0	100%
	30,0	0%
	35,0	0%

2.19 Fast Performance Liquid Chromatographie (FPLC)

Die FPLC-Analysen zum Nachweis von Nucleotid-aktivierten Zuckern erfolgten mit dem ÄKTA-FPLC-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software Unicorn V 3.00 (Amersham Pharmacia Biotech).

Folgendes Trennsystem für die Ionenaustauscher-Chromatographie wurde verwendet:

Säule: UnoQ1 7,0 mm X 35 mm (BioRad, München);

Detektionswellenlängen: 254 nm und 280 nm; Flußrate: 4,0 ml/min; Temperatur 21°C

Laufmittel A: H₂O

Laufmittel B: KCl 100 mM
 Na₂B₄O₇*10 H₂O 90 mM
 B(OH)₃ 220 mM
 pH 9,0

Elutionsprogramm:	Zeit [min]	Vol% B
	3,3	5%
	5,5	32%
	6,75	35%
	11,6	45%
	12,6	100%
	25,0	100%

2.20 LC-MS-Kopplung

Die LC-MS-Analysen zum Nachweis von Nucleotid-aktivierten Zuckern erfolgten durch Kopplung von Kapillar-HPLC (Pumpe: ABI 140 B [PE Applied Biosystems, Weiterstadt]) mit dem Triple State Quadrupol Massenspektrometer TSQ 7000 (ThermoQuest Finnigan, Egelsbach). Die MS-Messungen erfolgten im Negativmodus.

Folgendes Trennsystem für die *reversed phase* Chromatographie wurde in Anlehnung an Stein (1995) verwendet:

Säule: RP18; 800 µm X 250 mm (LC Packings, Amsterdam);

Flußrate: 15 µl/min durch Vorsäulensplit

Laufmittel A: Ammoniumformiat 50 mM
 Octylamin 0,384‰
 Methanol 1,0%
 pH 5,4

Laufmittel B: Ammoniumformiat 50 mM
 Octylamin 0,384‰
 Methanol 10,0%
 pH 5,4

Elutionsprogramm:	Zeit [min]	Vol% B
	2,5	0%
	16,5	40%
	17,5	100%
	29,0	100%
	30,0	0%
	35,0	0%

2.21 Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen

DNA- sowie Proteinsequenzanalysen wurden mit den Programmen DNA-Strider 1.1 (Marck 1989) und Brujere II (Vara) durchgeführt. Multiple Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen Clustal V (Higgins et al. 1991) und Clustal W (Thompson et al. 1994; <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt. Paarweise Sequenzvergleiche mit den Datenbanken EMBL, GENBANK und SWISSPROT wurden mit dem Programmpaket FASTA 3 (Pearson und Lipman 1988; <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>) und BLAST (Altschul et al. 1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Konstruktion von Expressionsvektoren mit modifizierten Ribosomenbindestellen

Streptomyceten können als Wirtsorganismen für die Produktion rekombinanter Proteine eingesetzt werden (Brawner et al. 1991; Brawner 1994; Binnie et al. 1997). Die Expression der Gene kann hierbei z. B. unter Kontrolle des Thiostrepton-induzierbaren Promotors P_{tipA} aus *S. lividans* (Takano et al. 1995) oder unter Kontrolle des durch spontane Mutation verstärkten konstitutiven Promotors P_{ermE^*} aus *Sac. erythraea* stehen (Bibb et al. 1985a). Shine-Dalgarno-Sequenzen von Streptomyceten-Genen zeigen Komplementarität zum 3'-Ender der 16S rRNA, sie besitzen einen Abstand zum Initiationscodon der Translation von 5-12 Nucleotiden (im Durchschnitt 8,5) und weisen die Konsensus-Sequenz (a/g)GGAGG auf (Strohl 1992) (Abb. 3-1).

pET11a:	5' -CTTTA <u>A</u> GAAGGAGATATACATATG-3'
pET11d:	5' -CTTTA <u>A</u> GAAGGAGATATACCATG-3'
pQE60:	5' -CATTA <u>A</u> AGAGGAGAAATTAACCATG-3'
pIJ6021:	5' - GAGAAGGGAGCGGACATATG-3'
pHM8a:	5' -CACTCCACAGGAGGACCCATATG-3'
RBSA:	5' -CTTTA <u>A</u> AGGAGGAGATAT <u>t</u> ACATATG-3'
RBSAII:	5' - C ATTAA <u>A</u> AGAGGAGAAAT <u>t</u> ACATATG-3'
RBSD:	5' -CTTTA <u>A</u> AGGAGGAGATAT <u>t</u> aACCATG-3'
RBSDII:	5' - C ATTAA <u>A</u> AGAGGAGAAAT <u>t</u> aACCATG-3'
Konsensus:	<u>RGGAGG</u>
16S rRNA:	3' - UCUU <u>UCCUCC</u> ACUAG-5'

Abb. 3-1: Gegenüberstellung von Shine-Dalgarno-Sequenzen (SD) aus Expressionsvektoren mit der von Strohl (1992) ermittelten Konsensus-Sequenz und dem 3'-Ende der 16S rRNA von *S. lividans* (Bibb et al. 1985b). Die Übereinstimmungen mit der Konsensus-Sequenz sind grau hinterlegt, zur 16S rRNA komplementäre Basen sind mit einer durchgezogenen Linie unterstrichen, das jeweilige Startcodon mit einer gepunkteten Linie. Die in den modifizierten Ribosomenbindestellen gegenüber pET11a/d veränderten Basen sind fett hervorgehoben und zusätzlich eingefügte Basen sind klein geschrieben. R: A/G

Bei der Expression von Streptomyceten-Genen in *E. coli* kommt es häufig zur Aggregation von inkorrekten Faltungsintermediaten der Genprodukte in Form unlöslicher Einschlußkörper (*inclusion bodies*). Das zu exprimierende Gen kann dann mitsamt der in den *E. coli*-Expressionsvektoren (z. B. pET11a, pET11d, pQE60) vorhandenen Shine-Dalgarno-Sequenz in geeignete Vektoren für die Expression in Streptomyceten kloniert werden (z. B. pUWL201). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, daß die Shine-Dalgarno-Sequenz aus dem Plasmid pQE60

gute Ergebnisse bei der Expression von *eryBII* und *eryBIII* in *S. lividans* unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} lieferte (s. 3.2.1.2 und 3.2.2.2). Um sowohl eine *NdeI*-Schnittstelle als auch eine *NcoI*-Schnittstelle zur *in frame* Klonierung der zu exprimierenden Gene zur Verfügung zu haben, wurden die Ribosomenbindestellen von pET11a und pET11d durch Mutagenese mittels PCR auf der Grundlage der Sequenz von pQE60 modifiziert. Hierzu wurden zunächst zwei Amplifikate durch PCR mit Vent-DNA-Polymerase produziert: Zur Erzeugung der Ribosomenbindestelle RBSA (vgl. Abb. 3-1) wurden pET11a-DNA als Templat-DNA und das Primerpaar RBS11aI/RBS11aII verwendet, zur Generierung der Ribosomenbindestelle RBSD (vgl. Abb. 3-1) wurden entsprechend pET11d-DNA und das Primerpaar RBS11dI/RBS11dII eingesetzt. Die nun folgenden Schritte zur Erzeugung der Expressionsvektoren mit modifizierten Ribosomenbindestellen sind exemplarisch für RBSA in Abbildung 3-2 dargestellt. Die erhaltenen PCR-Produkte hatten erwartungsgemäß eine Länge von 1,5 kbp, wurden durch Hydrolyse mit *ApaI* auf 1,0 kbp verkürzt und anschließend in mit *ApaI/HincII* hydrolysierten pBlueKSΔX(+) ligiert. Die so entstandenden Plasmide pBlueKSRBSA und pBlueKSRBSD wurden durch DNA-Sequenzierung im relevanten Bereich überprüft. Aus diesen beiden Vektoren wurden 1,0 kbp *NdeI/ApaI*- bzw. *NcoI/ApaI*-Fragmente isoliert, in *NdeI/ApaI* bzw. *NcoI/ApaI* hydrolysierte pET11a bzw. pET11d ligiert und auf diese Weise die Vektoren pET11aII und pET11dII erzeugt (Abb. 3-2). Um den Promotor P_{ermE^*} in günstigem Abstand (vgl. Abb. 3-1) vor der Shine-Dalgarno-Sequenz zu plazieren, wurde ein 0,3 kbp *KpnI/XbaI*-Fragment aus pUWL201ΔsprBII in die Plasmide pBlueKSRBSA und pBlueKSRBSD eingefügt, so daß pBlueKSRBSA_{ermE} und pBlueKSRBSD_{ermE} erhalten wurden. Die Anwendbarkeit des Shuttlevektors pUWL201 für die Genexpression wurde erweitert, indem schließlich das *KpnI/HindIII*-Fragment aus pUWL201ΔN (*NdeI*-Schnittstelle wurde durch *NdeI*-Hydrolyse, Klenow-Behandlung und Religation deletiert) durch das 0,4 kbp *KpnI/HindIII*-Fragment aus pBlueKSRBSA_{ermE} ersetzt wurde. Der daraus resultierende Shuttlevektor pUWL201RBSA enthielt nun eine für die Translation in *S. lividans* günstige Shine-Dalgarno-Sequenz mit einer *NdeI*-Restriktionsschnittstelle 6 bp *downstream*, die eine Insertion des zu exprimierenden Gens in optimalem Abstand zur Ribosomenbindestelle ermöglicht (vgl. Abb. 3-2). Da pUWL201 zwei *NcoI*-Schnittstellen im Replikationsursprung von pIJ101 enthält, war es nicht möglich, diese analog zur *NdeI*-Schnittstelle durch einfache *NcoI*-Restriktion, Klenow-Behandlung und Religation zu entfernen. Sollte nun eine *NcoI*-Schnittstelle am Startcodon eines zu exprimierenden Gens zu seiner Ligation in den Expressionsvektor dienen, mußte das Gen zunächst in pBlueKSRBSD_{ermE} und von dort aus mitsamt Promotor P_{ermE^*} und Shine-Dalgarno-Sequenz in pUWL201 ligiert werden. Um eine weitere Variation der erzeugten Ribosomenbindestellen RBSA und RBSD zu erhalten, wurden diese nochmals mittels PCR modifiziert, so daß RBSAII und RBSDII entstanden (s. Abb. 3-1). Zur Erzeugung der Ribosomenbindestelle RBSAII (vgl. Abb. 3-1) wurden pBlueKSRBSA_{ermE}

als Templat-DNA und das Primerpaar RBSNde/RBSII verwendet, zur Generierung der Ribosomenbindestelle RBSII wurden entsprechend pBlueKSRBSAermE und das Primerpaar RBSNco/RBSII eingesetzt. Die entstandenen 0,4 kbp langen PCR-Fragmente wurden *blunt end* in pUC18 ligiert, so daß die Plasmide pRBSAII und pRBSDII entstanden, die mittels DNA-Sequenzierung überprüft wurden.

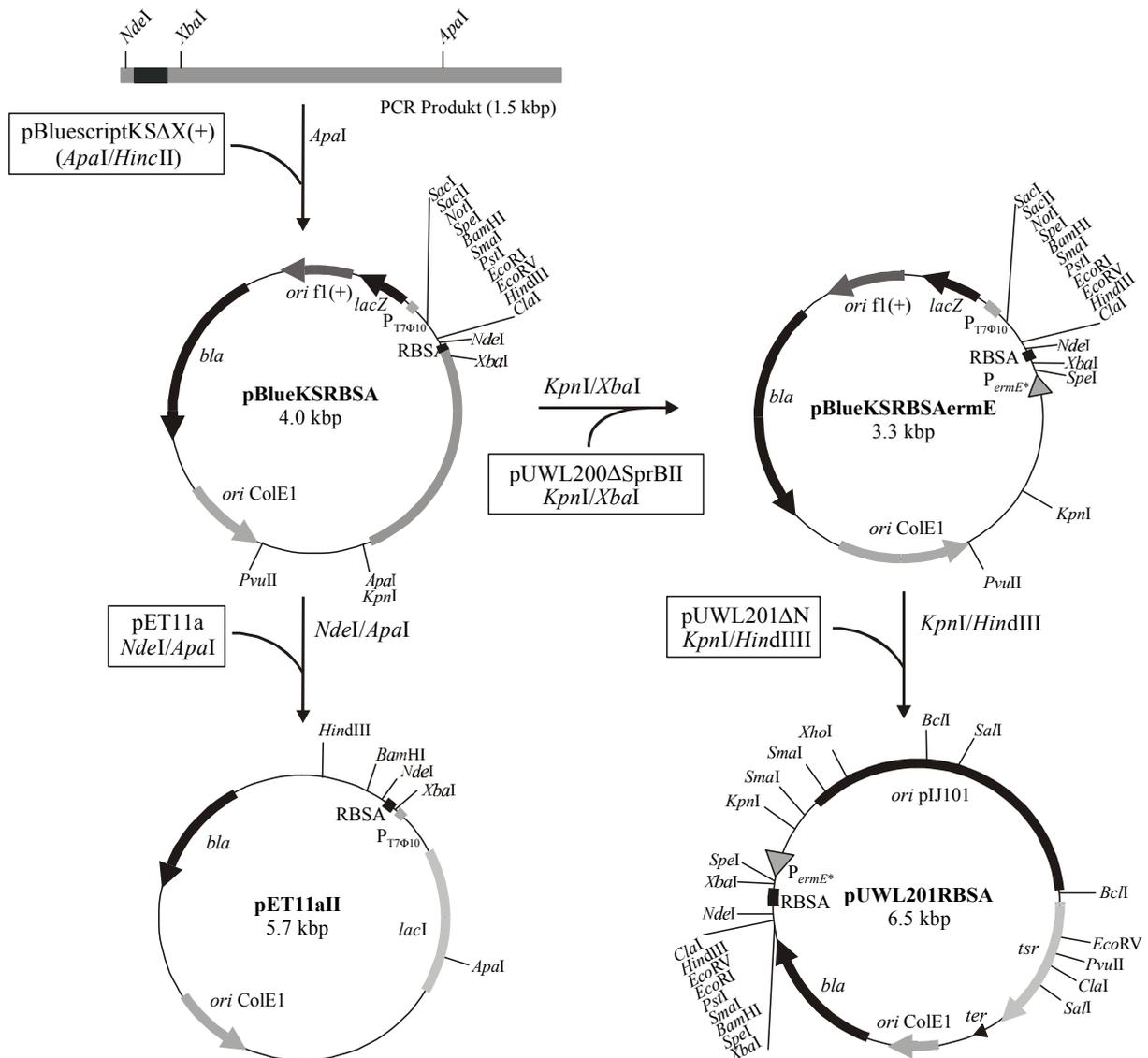


Abb. 3-2: Konstruktion von Expressionsvektoren mit modifizierter Shine-Dalgarno-Sequenz. Zur Konstruktion verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen, die für die Verwendung der Vektoren nützlich sind, sind eingezeichnet.

Aus diesen Plasmiden wurde sodann das 0,4 kbp *NdeI/KpnI*-Fragment bzw. das 0,4 kbp *NcoI/KpnI*-Fragment isoliert und dieses in *NdeI/KpnI* bzw. *NcoI/KpnI* hydrolysierten pBlueKSRBSAermE bzw. pBlueKSRBSDermE kloniert, so daß pBlueKSRBSAermEII und pBlueKSRBSDermEII entstanden. Zur Fertigstellung von pUWL201PW wurde das 0,4 kbp *KpnI/HindIII*-Fragment aus pBlueKSRBSAermEII in pUWL201ΔN ligiert.

3.2 Expression der *eryB*-Gene und ihrer Homologen

Um die Genprodukte der *eryB*-Gene aus *Sac. erythraea* und einige ihrer Homologen aus nahe verwandten Streptomycceten *in vitro* auf enzymatische Aktivität zu untersuchen, war zunächst die heterologe Expression der Gene notwendig. Als Wirtstämme für die Genexpression dienten *E. coli* und *S. lividans*. Wenn möglich, wurden die Proteine in beiden Wirtssystemen produziert. In einem ersten Schritt wurden jeweils geeignete Primer abgeleitet, die zur Amplifikation des Gens in einer PCR eingesetzt wurden, um für die Klonierung geeignete Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen einzuführen. Die Amplifikate wurden zunächst in Vektoren (pUC18 oder pUCBM21) ligiert, die die Sequenzierung der PCR-Produkte zur Überprüfung ihrer DNA-Sequenz erlaubten. Anschließend erfolgte die Klonierung in die Expressionsvektoren, die Transformation in die zur Produktion verwendeten *E. coli*- und *S. lividans*-Stämme und schließlich die Analyse der Zellextrakte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (s. 2.10) bzw. Western-Blot-Analyse mittels Penta-His-Antikörper (s. 2.12) nach Immobilisierung auf PVDF_Membran (s. 2.11).

Tabelle 3-1 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit exprimierten Proteine. Die genaue Vorgehensweise und experimentelle Details bei der Produktion der einzelnen Proteine werden in den sich anschließenden Kapiteln ausführlich beschrieben.

Tab. 3-1: Übersicht über die Produktion von löslichen EryB- und zwei homologen Dnm-Proteinen

Protein	Produktion in <i>E. coli</i>		Produktion in <i>S. lividans</i>	
	nativ	His-tag	nativ	His-tag
EryBII	n.d.	+	+	/
EryBIII	n.d.	+	+	/
EryBIV	+	+	+	+
EryBVI	-	+	n.d.	+
EryBVII	n.d.	-	n.d.	n.d.
DnmU	+	+	+	+
DnmT	/	+	/	+

+ : lösliches Protein
- : unlösliches Protein

n.d.: nicht detektierbar
/ : nicht durchgeführt

3.2.1 Heterologe Expression des Gens *eryBII*

3.2.1.1 Heterologe Expression des Gens *eryBII* in *E. coli*

Das Gen *eryBII* wurde unter Kontrolle des L-Rhamnose-induzierbaren Promotors P_{rhaBAD} aus *E. coli* (Egan und Schleif 1993) kloniert. Zu diesem Zweck wurde das Expressionsplasmid

pJOE2775 ausgewählt, da dieses die C-terminale Fusion mit einem His-tag ermöglicht. Im Falle einer vorhandenen schwachen Proteinproduktion, die im SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung nicht darstellbar ist, besteht so die Möglichkeit des immunologischen Nachweises mit Penta-His-Antikörpern. Das Gen *eryBII* wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *Sac. erythraea* amplifiziert (Primerpaar: PW41/PW42), so daß am Translationsstartpunkt des Gens eine *NdeI*- und am 5'-Ende eine *BamHI*-Erkennungssequenz eingefügt wurde. Das erhaltene 1,0 kbp PCR-Produkt wurde mit *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert und in ebenso behandelten pUCPU21 ligiert, so daß das Plasmid pPWW93 entstand, dessen Insert mittels DNA-Sequenzierung überprüft wurde.

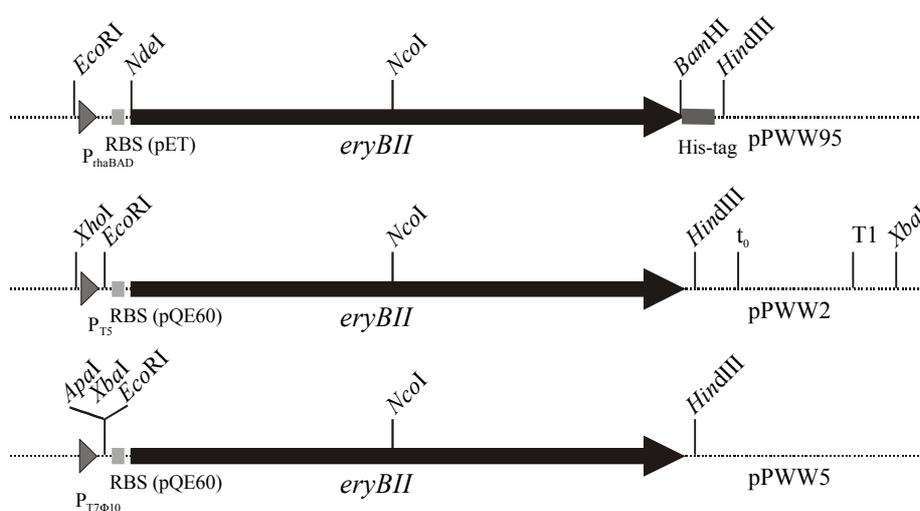


Abb. 3-3: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *eryBII* aus *Sac. erythraea* in *E. coli* konstruierten Plasmide. Die für die Genexpression bedeutenden Bereiche der Plasmide sind jeweils als linearer Ausschnitt, der Vektoranteil als gestrichelte Linie dargestellt. Das Plasmid pPWW2 enthält das Gen *eryBII* im Vektor pQE60 unter Kontrolle von P_{T5} , die Ribosomenbindestelle stammt aus pQE60. t_0 : Transkriptionsterminator des Phagen λ , T1: Transkriptionsterminator des *rrnB*-Operons von *E. coli*. Das Plasmid pPWW5 beinhaltet *eryBII* unter Kontrolle von $P_{T7\Phi10}$ im Vektor pGEM-7Zf(-). Im Plasmid pPWW95 steht *eryBII* unter Kontrolle des L-Rhamnose-induzierbaren Promotors P_{rhaBAD} . Die Ribosomenbindestelle stammt aus pET11a. Am 3'-Ende von *eryBII* befindet sich *in frame* die DNA-Sequenz für ein His-tag.

Hieraus wurde das 1,0 kbp *NdeI/BamHI*-Fragment isoliert und in *NdeI/BamHI* behandelten pJOE2775 kloniert, so daß das 5'-Ende von *eryBII* an das 3'-Ende der Vektor-eigenen Sequenz fusioniert wurde, die für ein Histidin-Hexapeptid kodiert. Das so entstandene Expressionsplasmid wurde pPWW95 genannt (Abb. 3-3). Nach Transformation von pPWW95 (Abb. 3-3) in *E. coli* JM109 wurden die Zellen, wie unter 2.13.3 beschrieben, bei 28°C kultiviert und die Gesamtzellextrakte sowie die löslichen Fraktionen analysiert. His-tag-EryBII konnte auf den Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gelen nicht detektiert werden. Der immunologische Nachweis zeigte aber eindeutig die Produktion von löslichem His-tag-EryBII in *E. coli* JM109. Abhängig vom verwendeten Medium traten deutliche Unterschiede in der Menge des produzierten Proteins auf. Im Western-Blot war bei der Verwendung von LB-Medium mit Sorbitol und Betain eine deutliche zusätzliche Proteinbande im Bereich der

erwarteten Größe von 36,8 kDa sichtbar (Abb. 3-4). Bei Verwendung von 2 X TY-Medium war dagegen nur eine ganz dünne zusätzliche Proteinbande zu erkennen (ohne Abbildung).

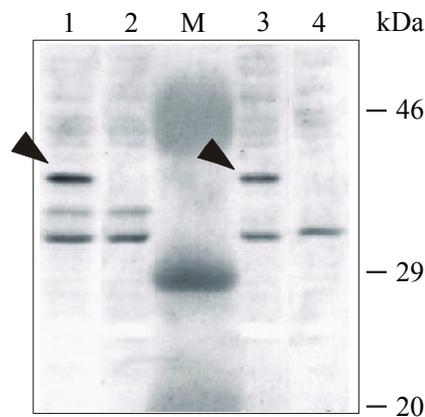


Abb. 3-4: Immunologischer Nachweis von His-tag-EryBII. Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte (Spuren 1 und 2) und der zellfreien Extrakte (Spuren 3 und 4) von *E. coli* JM109 mit dem *eryBII*-Expressionsplasmid pPWW95 (Spuren 1 und 3) und mit pJOE2775 (Spuren 2 und 4) mittels eines Penta-His-Antikörpers. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium mit Sorbitol und Betain bei 28°C. Jeweils ca. 50 µg Gesamtprotein/Spur wurden durch SDS-PAGE (10% Trenngel) getrennt und auf PVDF-Membran übertragen. M: Molekulargewichtsstandard; die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben. Die zusätzliche His-tag-EryBII-Bande ist jeweils durch Pfeile markiert.

Für die Produktion von nativem EryBII wurde das Gen *eryBII* in die Expressionsvektoren pQE60 und pGEM-7Ff(-) ligiert, so daß die Plasmide pPWW2 und pPWW5 entstanden (vgl. Tab. 2-3; vgl. Abb. 3-3). *E. coli* JM109 und *E. coli* M15[pREP4] wurden mit pPWW2 transformiert, *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW5. Die Expressionsstämme zeigten nach Kultivierung, wie unter 2.13.1 und 2.13.2 beschrieben, bei der SDS-PAGE-Analyse (vgl. 2.10) der Zellextrakte keine Produktion von EryBII.

3.2.1.2 Heterologe Expression des Gens *eryBII* in *S. lividans* TK23

Für die Genexpression von *eryBII* in *S. lividans* TK 23 unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} wurden die beiden Expressionsplasmide pPWW6 und pPWW7 konstruiert (Abb. 3-5). Das Plasmid pPWW6 enthält das 2,0 kbp *EcoRI/XbaI*-Fragment aus pPWW2 im ebenso hydrolysierten Shuttleplasmid pUWL201, während beim Plasmid pPWW7 das 1,1 kbp *EcoRI/BamHI*-Fragment aus pPWW5 in pUWL201 ligiert wurde. Im Unterschied zu pPWW7 enthält pPWW6 den Teil aus pQE60, der *downstream* des zu exprimierenden Gens liegt und die Transkriptionsterminatoren, t_0 des Phagen λ und T1 des *rrnB*-Operons von *E. coli* umfaßt (vgl. Abb. 3-5). Nach Transformation der Plasmide in *S. lividans* TK23 wurden die plasmidhaltigen Stämme, wie unter 2.13.6 beschrieben, in TSB-Medium kultiviert. Die Analyse der zellfreien Extrakte (vgl. 2.14) zeigte die Produktion von EryBII in Form einer zusätzlichen Proteinbande bei 36 kDa (Abb. 3-6). Das theoretische Molekulargewicht von EryBII beträgt 36,0 kDa.

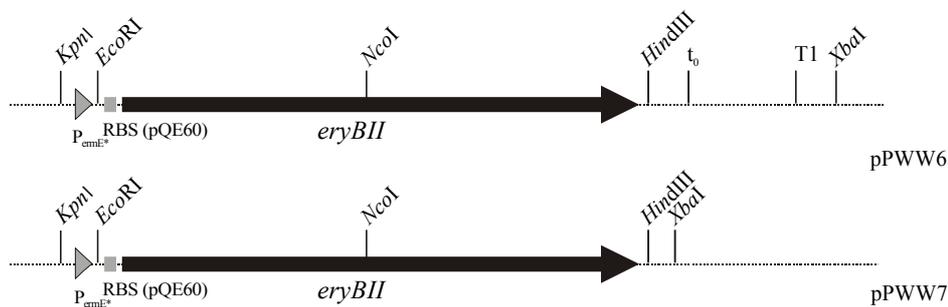


Abb. 3-5: Schematische Darstellung der Plasmide für die Expression des Gens *eryBII* aus *Sac. erythraea* in *S. lividans* TK23. Die Plasmide pPWW6 und pPWW7 enthalten das Gen *eryBII* unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} . Sie unterscheiden sich im *downstream*-Bereich von *eryBII*. Bei pPWW6 sind dort die zwei Transkriptionsterminatoren aus pQE60 lokalisiert. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

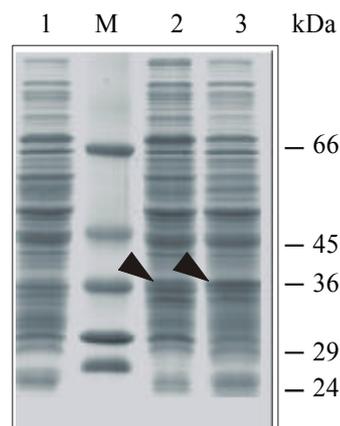


Abb. 3-6: Expression des Gens *eryBII* in *S. lividans* TK23. SDS-PAGE-Analyse der zellfreien Extrakte von *S. lividans* TK23 mit den *eryBII*-Expressionsplasmiden pPWW6 (Spur 2) und pPWW7 (Spur 3) und mit pUWL201 (Spur 1). Jeweils ca. 50 μ g Gesamtprotein/Spur wurden durch SDS-PAGE (10% Trenngel) getrennt. M: Molekulargewichtsstandard; die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben. Die zusätzliche EryBII-Bande ist durch Pfeile markiert.

3.2.2 Heterologe Expression des Gens *eryBIII*

3.2.2.1 Heterologe Expression des Gens *eryBIII* in *E. coli*

Das Gen *eryBIII* wurde unter Kontrolle des L-Rhamnose-induzierbaren Promotors P_{rhaBAD} aus *E. coli* kloniert. Wie im Fall von *eryBII* (3.2.1.1) wurde das Expressionsplasmid pJOE2775 zu diesem Zweck ausgewählt. Das Gen *eryBIII* wurde mittels PCR amplifiziert (Primerpaar: PW43/PW44; Templat DNA: genomische DNA von *Sac. erythraea*), so daß am Translations-

startpunkt des Gens eine *NdeI*- und am 5'-Ende eine *BglII*-Erkennungssequenz eingefügt wurde. Das erhaltene 1,3 kbp PCR-Produkt wurde *blunt end* in *SmaI*-behandelten pUC18, so daß das Plasmid pPWW92 entstand. Hieraus wurde pPWW96 (Abb. 3-7) konstruiert, indem das 1,3 kbp *NdeI/BglII*-Fragment isoliert und in *NdeI/BamHI* behandelten pJOE2775 kloniert, so daß das 5'-Ende von *eryBIII* an das 3'-Ende der Vektor-eigenen Sequenz fusioniert wurde, die für ein Histidin-Hexapeptid kodiert.

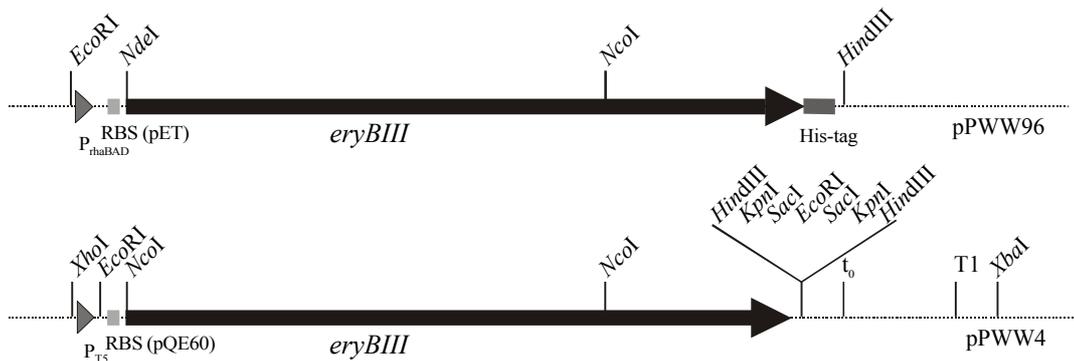


Abb. 3-7: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *eryBIII* aus *Sac. erythraea* in *E. coli* konstruierten Plasmide. Das Plasmid pPWW4 enthält das Gen *eryBIII* im Vektor pQE60 unter Kontrolle von P_{T5} , die Ribosomenbindestelle stammt aus pQE60. Im Plasmid pPWW96 steht *eryBIII* unter Kontrolle des L-Rhamnose-induzierbaren Promotors P_{rhaBAD} . Die Ribosomenbindestelle stammt aus pET11a. Am 3'-Ende von *eryBIII* befindet sich *in frame* die DNA-Sequenz für ein His-tag. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

Nach Transformation des Expressionsplasmids pPWW96 in *E. coli* JM109 wurden die Zellen, wie unter 2.13.3 bei 28°C beschrieben, kultiviert und die Gesamtzellextrakte sowie die löslichen Fraktionen analysiert.

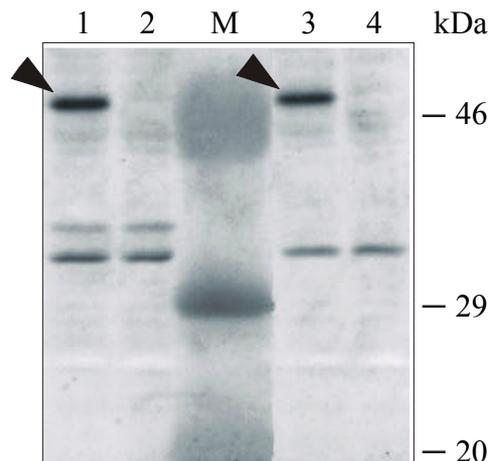


Abb. 3-8: Immunologischer Nachweis von His-tag-EryBIII. Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte (Spuren 1 und 2) und der zellfreien Extrakte (Spuren 3 und 4) von *E. coli* JM109 mit dem *eryBIII*-Expressionsplasmid pPWW96 (Spuren 1 und 3) und mit pJOE2775 (Spuren 2 und 4) mittels eines Penta-His-Antikörpers. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium mit Sorbitol und Betain bei 28°C. Jeweils ca. 50 µg Gesamtprotein/Spur wurden durch SDS-PAGE (10% Trenngel) getrennt und auf PVDF-Membran übertragen. M: Molekulargewichtsstandard; die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben. His-tag-EryBIII ist durch Pfeile markiert.

His-tag-EryBIII konnte auf den Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gelen nicht detektiert werden. Der immunologische Nachweis mittels Penta-His-Antikörper (vgl. 2.12) zeigte aber eindeutig die Produktion von His-tag-EryBIII in *E. coli* JM109. Abhängig vom verwendeten Medium traten auch in diesem Fall Unterschiede in der Menge des produzierten Proteins auf. Im Western-Blot war bei der Verwendung von LB-Medium mit Sorbitol und Betain eine deutliche Bande im Bereich der erwarteten Größe von 46,6 kDa sichtbar (Abb. 3-8), wurde dagegen 2 X TY-Medium verwendet, so war die Intensität der Bande, anders als im Fall von His-tag-EryBII, sogar noch stärker (ohne Abbildung).

Für die Produktion von nativem EryBIII wurde das Gen *eryBIII* in den Expressionsvektor pQE60 ligiert, so daß das Plasmid pPWW4 entstand (Tab. 2-3; Abb. 3-7). *E. coli* JM109 und *E. coli* M15[pREP4] wurden mit pPWW4 transformiert. Die *E. coli*-Stämme zeigten nach Kultivierung, wie unter 2.13.2 beschrieben, bei der SDS-PAGE-Analyse (2.10) der Zellextrakte keine Produktion von EryBIII.

3.2.2.2 Heterologe Expression des Gens *eryBIII* in *S. lividans* TK23

Für die Genexpression von *eryBIII* in *S. lividans* TK 23 unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} wurde das Expressionsplasmid pPWW8 (Abb. 3-9) konstruiert.



Abb. 3-9: Schematische Darstellung des Plasmids pPWW8 für die Expression des Gens *eryBIII* aus *Sac. erythraea* in *S. lividans* TK23. pPWW8 und pPWW7 enthalten das Gen *eryBIII* unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} . Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

Das Plasmid pPWW8 enthält das 1,4 kbp *EcoRI*-Fragment aus pPWW4 im ebenso hydrolysierten Shuttleplasmid pUWL201. Nach Transformation des Plasmids in *S. lividans* TK23 wurden die plasmidhaltigen Stämme, wie unter 2.13.6 beschrieben, in TSB-Medium kultiviert. Die Analyse der zellfreien Extrakte (vgl. 2.14) mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zeigte die Produktion von EryBIII in Form einer zusätzlichen diffusen Proteinbande bei 47 kDa (Abb. 3-10). Das von der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht von EryBIII beträgt 45,8 kDa.

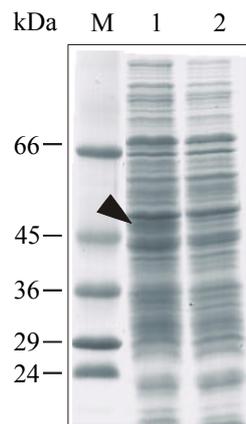


Abb. 3-10: Expression des Gens *eryBIII* in *S. lividans* TK23. SDS-PAGE-Analyse der zellfreien Extrakte von *S. lividans* TK23 mit dem *eryBIII*-Expressionsplasmid pPWW8 (Spur 1) und mit pUWL201 (Spur 2). Jeweils ca. 50 µg Gesamtprotein/Spur wurden durch SDS-PAGE (10% Trenngel) getrennt. Die zusätzliche EryBIII-Bande ist durch einen Pfeil markiert. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-4.

3.2.3 Heterologe Expression des Gens *eryBIV*

3.2.3.1 Heterologe Expression des Gens *eryBIV* in *E. coli*

Die heterologe Expression des Gens *eryBIV* in *E. coli* wurde sowohl mit Hilfe der Vektoren pET11a und pET16b als auch mit Hilfe Vektors pJOE2702 durchgeführt.

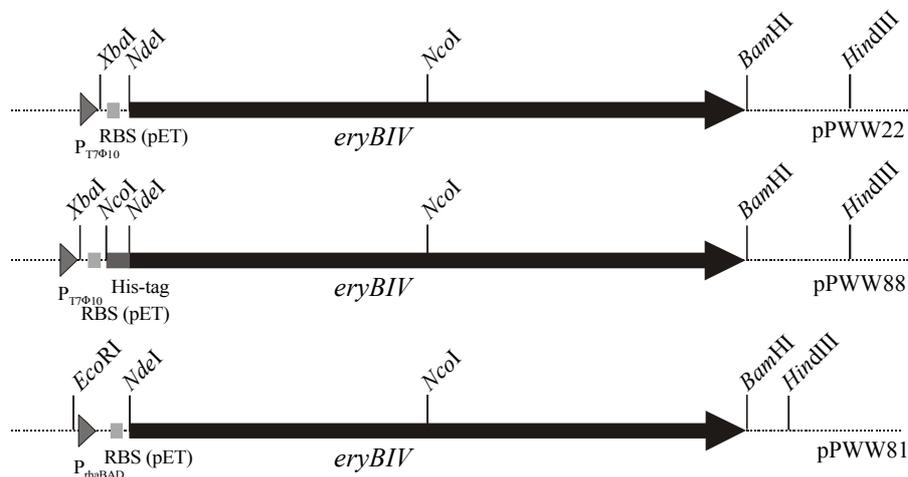


Abb. 3-11: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *eryBIV* aus *Sac. erythraea* in *E. coli* konstruierten Plasmide. Das Plasmid pPWW22 enthält das Gen *eryBIV* im Vektor pET11a, das Plasmid pPWW88 im Vektor pET16b. In beiden Fällen steht das Gen unter Kontrolle von $P_{T7\Phi10}$, im Plasmid pPWW88 befindet sich zusätzlich *in frame* am 5'-Ende des Gens die DNA-Sequenz für ein His-tag. Im Plasmid pPWW81 steht *eryBIV* unter Kontrolle des L-Rhamnose-induzierbaren Promotors P_{rhaBAD} . Die Ribosomenbindestelle stammt hier ebenfalls aus pET11a. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

Für die Klonierung in das pET-Vektorsystem wurde *eryBIV* zunächst mittels PCR aus chromosomaler DNA von *Sac. erythraea* unter Verwendung des Primerpaares PW10/PW11

amplifiziert. Am Startcodon des Gens wurde durch die PCR eine *NdeI*-Erkennungssequenz und hinter dem Stopcodon eine *BamHI*-Erkennungssequenz eingefügt. Das Amplifikat (1,0 kbp) wurde *blunt end* in *SmaI*-hydrolysierten pUC18 ligiert. Aus diesem Plasmid, pPWW20, wurde das 1,0 kbp *NdeI/BamHI*-Fragment isoliert und sowohl in pET11a als auch in pET16b, die zuvor mit *NdeI* und *BamHI* hydrolysiert wurden, ligiert.

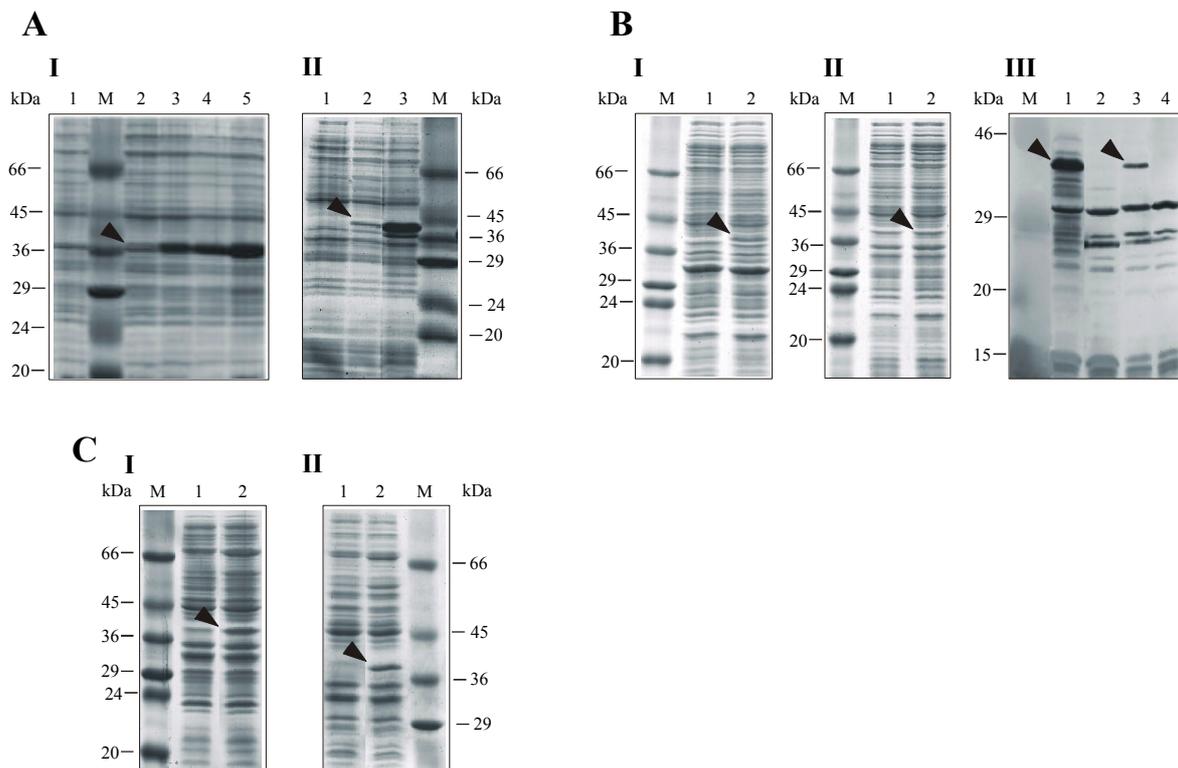


Abb. 3-12: Produktion von EryBIV und His-tag-EryBIV in *E. coli*.

A: SDS-PAGE-Analyse von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW22 und mit pET11a.

I: Gesamtzellextrakte zu verschiedenen Zeitpunkten auf einem 10%igen Trenngel: *E. coli* BL21(DE3) mit pET11a 30 min nach Induktion (Spur 1), *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW22 0 min (Spur 2), 30 min (Spur 3), 60 min (Spur 4) und 150 min (Spur 5) nach Induktion mit IPTG. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium bei 37°C.

II: Lösliche Fraktionen und Gesamtzellextrakt der *E. coli*-Kulturen, die in LB-Medium bei 20°C kultiviert wurden, 7 h nach IPTG-Induktion auf einem 12%igen Trenngel: lösliche Fraktion von *E. coli* BL21(DE3) mit pET11a (Spur 1), lösliche Fraktion von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW22 (Spur 2), Gesamtzellextrakt von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW22 (Spur 3).

B: SDS-PAGE- und Western-Blot-Analysen von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW88 und pET16b. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium mit Sorbitol und Betain bei 28°C. Ein 12%iges Trenngel wurde verwendet. I: SDS-PAGE der Gesamtzellextrakte von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spur 1) und pPWW88 (Spur 2). II: SDS-PAGE der löslichen Fraktionen von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spur 1) und pPWW88 (Spur 2). III: Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte (Spuren 1 und 2) und der zellfreien Extrakte (Spuren 3 und 4) von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spuren 2 und 4) und pPWW88 (Spuren 1 und 3). Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die Proteine auf PVDF-Membran übertragen. Für den immunologischen Nachweis wurde ein Penta-His-Antikörper verwendet.

C: SDS-PAGE-Analyse von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW81 und pJOE2702. Die Anzucht der Zellen erfolgte in 2 X TY-Medium bei 28°C.

I: SDS-PAGE der Gesamtzellextrakte von *E. coli* BL21(DE3) mit pJOE2702 (Spur 1) und pPWW81 (Spur 2).

II: SDS-PAGE der löslichen Fraktionen von *E. coli* BL21(DE3) mit pJOE2702 (Spur 1) und pPWW88 (Spur 2).

M: Molekulargewichtsstandard; die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben. Pro Spur wurden jeweils ca. 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Lagen der zusätzlichen Banden der Proteine EryBIV und His-tag-EryBIV sind durch Pfeile markiert.

Die erhaltenen Plasmide wurden mit pPWW22 und pPWW88 bezeichnet (Abb. 3-11) Diese unterscheiden sich durch ein His-tag, mit dem im Falle von pPWW88 das produzierte Protein EryBIV *N*-terminal versehen wird. Nach Transformation der Expressionsplasmide pPWW22 und pPWW88 in *E. coli* BL21(DE3) wurden die Zellen, wie unter 2.13.1 beschrieben, kultiviert und die Gesamtzellextrakte sowie die löslichen Fraktionen analysiert (Abb. 3-12). EryBIV und *N*-terminales His-tag-EryBIV waren auf Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gelen in Form zusätzlicher Proteinbanden oberhalb der 36 kDa Proteinmarkerbande sichtbar. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht für EryBIV beträgt 34,0 kDa. Wurden die Zellen bei 37°C kultiviert und wurde LB-Medium verwendet, so lagen EryBIV und His-tag-EryBIV in Form unlöslicher Proteine (*inclusion bodies*) vor. Dieses Problem konnte teilweise durch Variation der Anzuchtbedingungen umgangen werden. Wurde z. B. die Temperatur bei der Expression von *eryBIV* in pET11a auf 20°C erniedrigt, so war ein geringer Anteil des produzierten Proteins EryBIV löslich (vgl. Abb. 3-12, AII). Im Falle von His-tag-EryBIV konnte dies durch Anzucht in LB-Medium mit Sorbitol und Betain bei 28°C erreicht werden (vgl. Abb. 3-12; BII u. BIII). Wurde anstelle von pET11a der in dieser Arbeit konstruierte Vektor pET11aII (s. 3.1; vgl. Abb. 3-2), verwendet (pPWW22II), der die Ribosomenbindestelle des Vektors pQE60 besitzt, ergaben sich keine Unterschiede in der Intensität der Proteinproduktion oder der Löslichkeit des Produktes (ohne Abbildung).

Für die Klonierung von *eryBIV* in den L-Rhamnose induzierbaren Vektor pJOE2702 wurde das 1,0 kbp *NdeI/BamHI*-Fragment aus pPWW22 in mit *NdeI* und *BamHI* behandelten pJOE2702 ligiert (vgl. Abb. 3-11), so daß das Expressionsplasmid pPWW81 erhalten wurde. Nach Transformation in *E. coli* JM109 wurden die Zellen, wie unter 2.13.3 beschrieben, in 2 X TY-Medium bei 28°C kultiviert und die Gesamtzellextrakte sowie die löslichen Fraktionen mittels SDS-PAGE (2.10) analysiert. Die Produktion von EryBIV war auch hier deutlich in Form einer zusätzlichen Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 38 kDa zu erkennen (vgl. Abb. 3-12, C). Das Protein EryBIV wurde unter den verwendeten Expressionsbedingungen als lösliches Protein produziert (vgl. Abb. 3-12, CII).

3.2.3.2 Heterologe Expression des Gens *eryBIV* in *S. lividans* TK23

Für die Genexpression von *eryBIV* in *S. lividans* TK 23 unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} wurden drei Plasmide pPWW49, pPWW50 und pPWW54 konstruiert, die sich in der verwendeten Ribosomenbindestelle und durch die Präsenz der DNA-Sequenz für ein *N*-terminales His-tag unterscheiden (Abb. 3-13). Das Plasmid pPWW49 enthält das 1,3 kbp *NdeI/HindIII*-Fragment aus pPWW22 ligiert in pUWL201PW, so daß sich vor dem Gen *eryBIV* die Shine-Dalgarno-Sequenz RBSAII befindet. Zur Konstruktion des Plasmids pPWW50 wurde das 1,0 kbp *NdeI/BamHI*-Fragment in das von Neusser (1999) konstruierte Plasmid pDNW26RBSY eingefügt. Dieses Plasmid enthält die Ribosomenbindestelle des Gens *lmbY*

aus *S. lincolnensis* und zusätzlich die DNA-Sequenz für ein His-tag am 5'-Ende des Gens. Das Plasmid pPWW54, das die Shine-Dalgarno-Sequenz aus pET11a besitzt, wurde in zwei Schritten konstruiert. Zunächst wurde das 1,3 kbp *XbaI/HindIII*-Fragment aus pPWW22, das neben *eryBIV* die RBS von pET11a enthielt, in die *XbaI/HindIII* Schnittstellen von pBlueKSRBSAermEII ligiert. Aus dem resultierenden Plasmid, pPWW52, wurde das 1,6 kbp *KpnI/HindIII*-Fragment isoliert und in mit *KpnI* und *HindIII* hydrolysierten pUWL201PW ligiert (pPWW54).

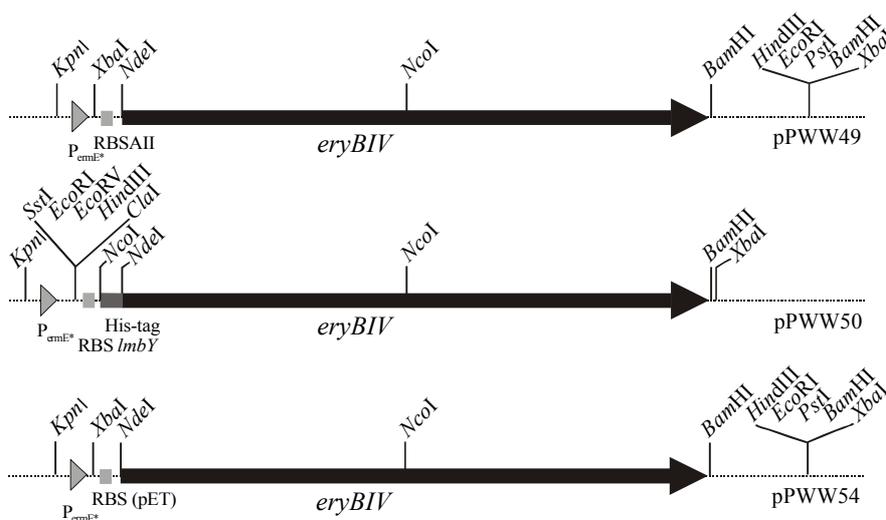


Abb. 3-13: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *eryBIV* aus *Sac. erythraea* in *S. lividans* TK23 konstruierten Plasmide. Allen drei Plasmiden ist gemeinsam, daß sie *eryBIV* unter Kontrolle des konstitutiven Promotors P_{ermE^*} enthalten. pPWW49 enthält die Ribosomenbindestelle RBSAII und pPWW54 die Ribosomenbindestelle aus pET11a. pPWW50 enthält die Shine-Dalgarno-Sequenz des Gens *lmbY* aus *S. lincolnensis* und zusätzlich am 5'-Ende von *eryBIV* die DNA-Sequenz für ein His-tag. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

S. lividans TK23 wurde mit den drei Plasmiden transformiert und die erhaltenen plasmidhaltigen Stämme, wie unter 2.13.6 beschrieben, in TSB-Medium kultiviert. Die Analyse der zellfreien Extrakte (vgl. 2.14) zeigte die Produktion von EryBIV bzw. His-tag-EryBIV in Form zusätzlicher Proteinbanden (Abb. 3-14). Das apparente Molekulargewicht von etwa 38 kDa bzw. 40 kDa stimmte mit dem von EryBIV bzw. His-tag-EryBIV, das in *E. coli* produziert wurde, überein. Die Intensitäten der zusätzlichen EryBIV-Proteinbanden unterschieden sich sehr stark in Abhängigkeit von der verwendeten Ribosomenbindestelle. Wurde das Plasmid pPWW49, welches die für die Genexpression in Streptomycceten optimierte Shine-Dalgarno-Sequenz (vgl. 3.1) besitzt, für die Expression von *eryBIV* verwendet, so war die Proteinbande auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel deutlich zu erkennen (vgl. Abb. 3-14, A Spur 2). Dagegen war nur eine ganz dünne zusätzliche Proteinbande sichtbar, wenn pPWW54 mit der RBS aus pET11a zur Expression verwendet wurde (vgl. Abb. 3-14, A Spur 1). Im Fall der Produktion von His-tag-EryBIV wurde außerdem ein immunologischer

Nachweis des His-tag-Fusionsproteins (vgl. 2.12) durchgeführt (Abb. 3-14, C). Dieser zeigte klar eine zusätzliche Bande auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts.

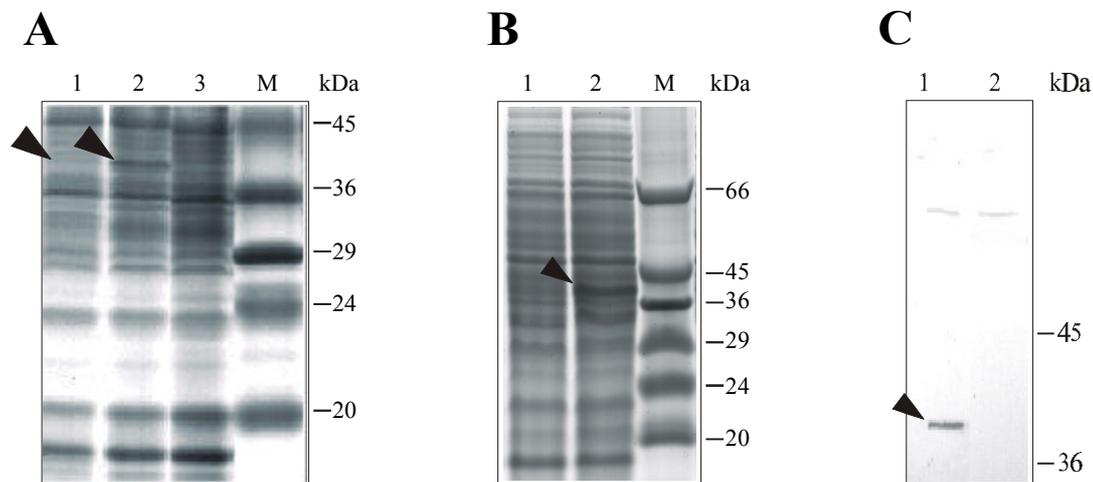


Abb. 3-14: Produktion von EryBIV und His-tag-EryBIV in *S. lividans* TK23.

A: SDS-PAGE-Analyse von *S. lividans* TK23 mit pPWW54 (Spur 1), pPWW49 (Spur 2) und pUWL201 (Spur 3).

B: SDS-PAGE-Analyse von *S. lividans* TK23 mit pPWW49 (Spur 2) und pUWL201 (Spur 1).

C: Immunologischer Nachweis von His-tag-EryBIV. *S. lividans* TK23 mit pPWW49 (Spur 1) und pUWL201 (Spur 2) wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran übertragen und mittels Peta-His-Antikörpern nachgewiesen.

Die Lagen der zusätzlichen Banden der Proteine EryBIV und His-tag-EryBIV sind durch Pfeile markiert. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-12.

3.2.4 Expression des Gens *eryBVI*

3.2.4.1 Heterologe Expression des Gens *eryBVI* in *E. coli*

Für die heterologe Expression des Gens *eryBVI* in *E. coli* wurde neben den Vektoren pET11a, pET16b, pQE60 und pSUM2atr_v mit den IPTG-induzierbaren Promotoren P_{T7Φ10} bzw. P_{T5} auch der Vektor pKSB201, der den Streß-induzierbaren Promotor P_{pir} enthält, verwendet. Für das Gen *eryBVI* existieren zwei mögliche Startcodons (vgl. 1.5.3, Abb. 1-9). Aus diesem Grund wurden die meisten Expressionsversuche an diesem Gen sowohl mit der DNA-Sequenz für die kurze (s) als auch für die lange (l) Form des Genproduktes durchgeführt. Für die Klonierung in das pET-Vektorsystem und in pKSB201 wurde *eryBVI* zunächst mittels PCR aus chromosomaler DNA von *Sac. erythraea* unter Verwendung der Oligonukleotidkombination PW7/PW9 für die lange Version bzw. PW8/PW9 für die kurze Version amplifiziert. Die am Startcodon des Gens eingefügte *Nde*I-Erkennungssequenz und die hinter dem Stopcodon eingefügte *Bgl*II-Erkennungssequenz ermöglichten die Klonierung von *eryBVI* als *Nde*I/*Bgl*II-Fragment in die Vektoren pET11a und pET16b, wodurch die Expressionsplasmide pPWW10-s/l und pPWW37-s/l generiert wurden (Abb. 3-15). Außerdem wurde die lange Version von *eryBVI* als *Nde*I/*Eco*RI-Fragment in pKSB201 ligiert, so daß das Plasmid

pPWW38-l entstand. Durch die Klonierung von *eryBVI* in pQE60, pSUM2atr_v und pKSB201 wurden die Plasmide pPWW28-l, pBWW6-s/l und pPWW38-l erzeugt (vgl. Tab. 2-3).

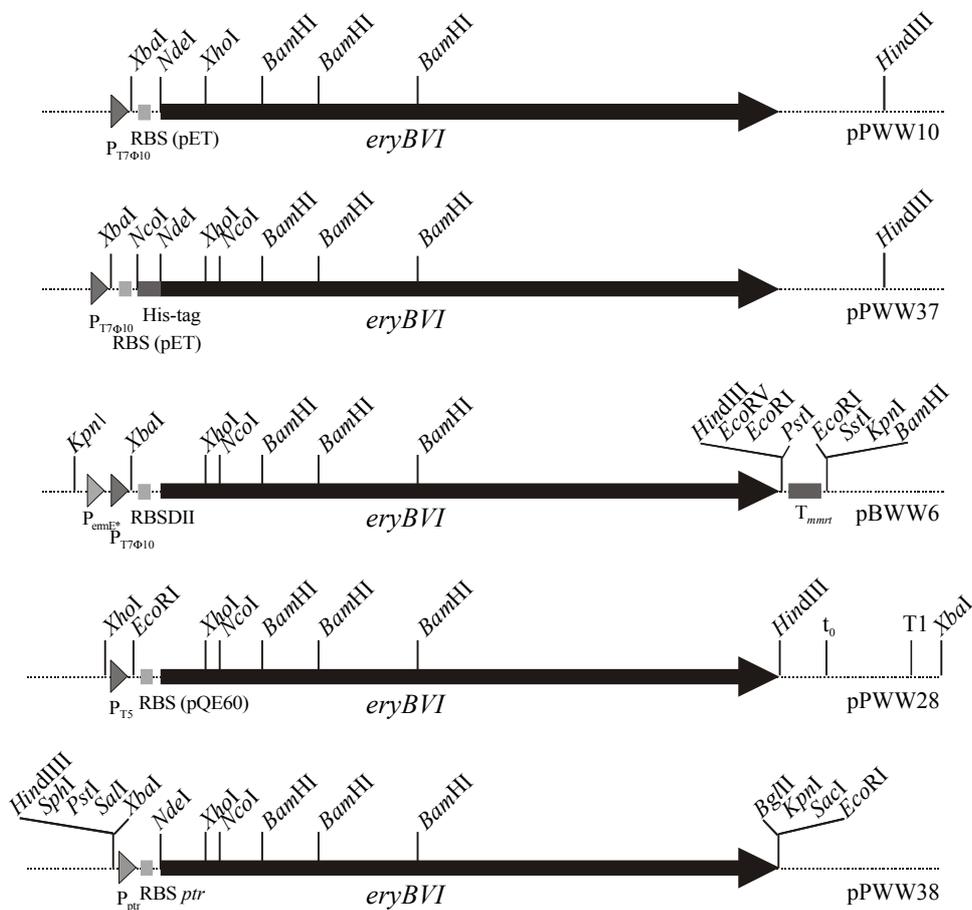


Abb. 3-15: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *eryBVI* aus *Sac. erythraea* in *E. coli* konstruierten Plasmide. Das Plasmid pPWW10 enthält das Gen *eryBVI* im Vektor pET11a, das Plasmid pPWW37 im Vektor pET16b. Das Plasmid pBWW6 wurde durch Ligation von *eryBVI* in pSUM2atr_v konstruiert. Letzteres enthält den *mmrT*-Terminator aus dem Vektor pMT3003 (Paget et al. 1994) hinter dem zu exprimierenden Gen sowie den Promotor P_{ermE^*} , der außerdem die Expression in Streptomyzeten erlaubt. Das Plasmid pPWW28, in dem die Expression unter Kontrolle des Promotors P_{T5} erfolgt, entstand durch Klonierung von *eryBVI* in pQE60. Im Plasmid pPWW38, das für die Expression in *E. coli* und in Streptomyzeten verwendet werden kann, steht *eryBVI* unter Kontrolle des Promotors P_{ptr} . Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

Zunächst wurden die Plasmide pPWW10-s/l und pPWW6-s/l in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die Zellen in LB-Medium bei 37°C, wie unter 2.13.1 beschrieben, kultiviert. Das EryBVI-Protein wurde sowohl in der langen als auch in der kurzen Version mit apparenten Molmassen von etwa 58 kDa (lange Version) bzw. 56 kDa (kurze Version; Abb. 3-16 A) in auf Coomassie-gefärbten PAA-Gelen deutlich erkennbaren Mengen produziert. Das theoretische Molekulargewicht von EryBVI beträgt 57,7 kDa (lange Version) bzw. 55,1 kDa (kurze Version). Allerdings zeigte die Analyse der löslichen Fraktionen, daß das EryBVI-Protein ausschließlich als unlösliche Einschlußverbindung (*inclusion body*) gebildet wurde. Um eine zumindest teilweise Löslichkeit von in *E. coli* heterolog produziertem EryBVI zu erreichen, wurden die Kulturbedingungen zahlreichen Variationen unterworfen. Die Genexpression in

LB-Medium wurde bei Temperaturen von 20°C, 30°C und 42°C durchgeführt. In weiteren Versuchen wurden die bei 37°C wachsenden Zellen einem Hitzeschock von 5 min Dauer bei 42°C direkt vor der Induktion mit IPTG unterzogen. Dies ebenso wie die Anzucht bei 42°C sollte zu einer vermehrten Bildung von Hitzeschockproteinen führen, die dann ihrerseits bei der korrekten Faltung des überproduzierten Proteins EryBVI unterstützende Funktionen erfüllen.

Einen ähnlichen Effekt sollte die Coexpression von *eryBVI* mit *groES* und *groEL* aus *S. griseus* haben. Hierzu wurde zusätzlich zu den Plasmid pPWW10-s/l das Expressionsplasmid pSUTNESLB10 (Pöhling (1997)) in die beiden *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und JM109(DE3) eingebracht. Pöhling (1997) konnte zeigen, daß die zeitgleiche Produktion der beiden Chaperone GroES und GroEL mit dem StrB1-Protein aus *S. griseus* zu einer partiellen Löslichkeit des StrB1-Proteins führte. Durch die Coproduktion von EryBVI mit den beiden Chaperonen sollte untersucht werden, ob diese einen ähnlichen Effekt auf die Löslichkeit von EryBVI ausüben. Zusätzlich wurden die zur Induktion verwendete IPTG-Konzentrationen variiert (0,5 mM bis 2,0 mM). Alle diese Versuche, das Protein EryBVI in einer löslichen Form in *E. coli* zu produzieren, ergaben kein auf Coomassie-gefärbten Gelen erkennbares lösliches *eryBVI*-Genprodukt. Auch die Verlängerung der in den Vektor pBWW6-s/l klonierten DNA-Sequenz von *eryBVI* um 4,9 kbp natürlichen *downstream*-Bereich (pBWW6v) hatte keinen Einfluß auf die Löslichkeit des Proteins. Die Verwendung der Plasmide pPWW28-1 und pPWW38-1 (vgl. Abb. 3-15; s. Tab. 2-3) führte nicht zur Produktion von für die Detektion im Coomassie-gefärbten PAA-Gel ausreichenden Mengen an EryBVI.

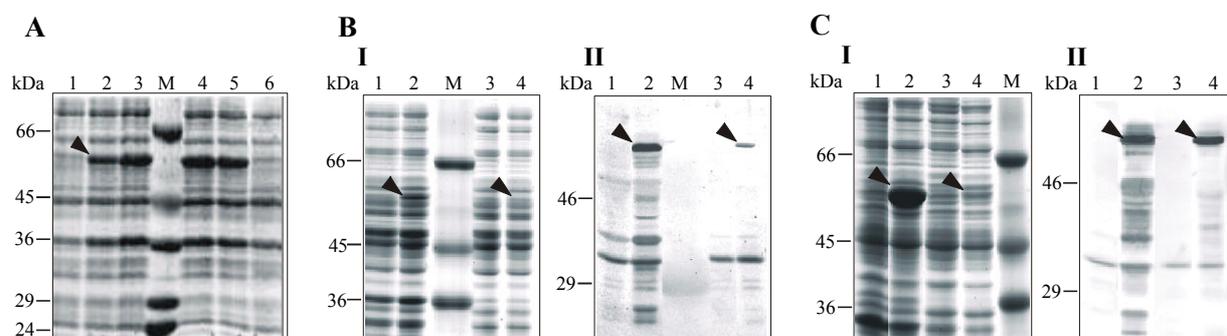


Abb. 3-16: Produktion von EryBVI und His-tag-EryBVI in *E. coli*.

A: SDS-PAGE-Analyse von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW10-s und mit pET11a. Die Gesamtzellextrakte von verschiedenen Zeitpunkten nach IPTG-Induktion auf einem 10%igen Trenngel: *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW10-s 0 min (Spur 1), 30 min (Spur 2), 60 min (Spur 3), 120 min (Spur 4) und 180 min (Spur 5) sowie mit pET11a 180 min nach Induktion mit IPTG (Spur 6). Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium bei 37°C.

B: SDS-PAGE- (I) und Western-Blot-Analyse (II) von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW37-s und pET16b. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium bei 28°C. Auf ein 10%iges Trenngel wurden folgende Proben aufgetragen: Gesamtzellextrakte von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spur 1) und pPWW37-s (Spur 2) und löslichen Fraktionen von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spur 3) und pPWW37-s (Spur 4).

C: SDS-PAGE- (I) und Western-Blot-Analyse (II) von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW37-s und pET16b. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium mit Sorbitol und Betain bei 28°C. Auf ein 10%iges Trenngel wurden folgende Proben aufgetragen: Gesamtzellextrakte von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spur 1) und pPWW37-s (Spur 2) und löslichen Fraktionen von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spur 3) und pPWW37-s (Spur 4).

Die zusätzlichen Banden der Proteine EryBVI und His-tag-EryBVI sind durch Pfeile markiert. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-12.

Schließlich wurde das Plasmid pPWW37 zur Produktion von His-tag-EryBVI in *E. coli* BL21(DE) genutzt. Bei Anzucht der Zellen in LB-Medium bei 28°C war eine schwache zusätzliche Proteinbande im Gesamtzellextrakt auf dem Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel erkennbar, während diese Bande in der löslichen Fraktion nicht sichtbar war (vgl. Abb. 3-16, BI). Die Western-Blot-Analyse zeigte aber die Existenz einer geringen Menge lösliches His-tag-EryBVI in der löslichen Proteinfraction (vgl. Abb. 3-16, BII). Wurde dagegen LB-Medium mit Sorbitol und Betain bei 28°C zur Kultivierung der Zellen verwendet, so konnten die Mengen an produziertem und an löslichem His-tag-EryBVI deutlich gesteigert werden (vgl. Abb. 3-16, CI u. CII).

3.2.4.2 Heterologe Expression des Gens *eryBVI* in *S. lividans* TK23

Für die heterologe Genexpression von *eryBVI* in *S. lividans* wurden zwölf verschiedene Plasmide konstruiert (Tab. 3-2). Nach Transformation von *S. lividans* mit diesen und den jeweiligen Kontrollplasmiden, wurden die Stämme, wie unter 2.13.6, 2.13.7 und 2.13.8 beschrieben, kultiviert und die aus ihnen gewonnenen zellfreien Extrakte auf das Vorhandensein des Proteins EryBVI bzw. His-tag-EryBVI untersucht.

Tab. 3-2 : Zur Expression von *eryBVI* in *S. lividans* konstruierte Plasmide und ihre Eigenschaften.

Plasmid	Basisvektor	Promotor	Shine-Dalgarno-Sequenz	weitere Eigenschaften
pPWW12	pUWL201	natürlich	natürlich	
pPWW13	pUWL201	P _{ermE} *	natürlich	
pPWW15	pUWL201	P _{ermE} *	RBS(pET)	
pPWW24	pUWL201	P _{ermE} *	RBSA	
pPWW30	pUWL201	P _{ermE} *	RBSAII	
pPWW34	pUWL201	P _{ermE} *	RBS(pQE60)	
pPWW35	pHM8a	P _{ermE} *	RBS von EFTu aus <i>S. ramocissimus</i>	Minicircle aus <i>S. coelicolor</i> , T _{fkml} aus <i>Streptomyces</i> spp. MA6548
pPWW36	pIJ4123	P _{tipA}	RBS <i>tipA</i>	Thiostrepton-induzierbar, His-tag
pPWW38	pKSB201	P _{ptr}	RBS <i>ptr</i>	Streß-induzierbar
pPWW39	pDNW26RBSY	P _{ermE} *	RBS <i>lmbY</i>	His-tag
pPWW40	pAAW24.1	P _{tipA}	RBS <i>tipA</i>	Thiostrepton-induzierbar
pBWW6	pSUM2atrV	P _{ermE} *, P _{T7Φ10}	RBSDII	T _{mmrI} aus <i>S. coelicolor</i>

Auch die Variation der Expressionsbedingungen ermöglichte die Detektion einer zusätzlichen Proteinbande des entsprechenden Molekulargewichts auf den Coomassie-gefärbten PAA-Gelen nicht. Die Western-Blot-Analyse der zellfreien Extrakte von *S. lividans* TK23 mit den Plasmiden pPWW39-s und pPWW39-l zeigte dagegen deutlich, daß His-tag-EryBVI produziert wurde (Abb. 3-17).

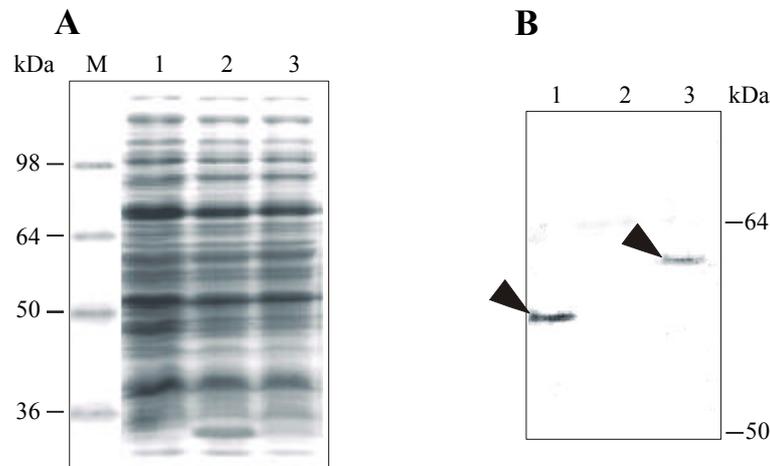


Abb. 3-17: Produktion von His-tag-EryBVI in *S. lividans*.

A: SDS-PAGE-Analyse der zellfreien Extrakte von *S. lividans* TK23 mit pPWW39-s (Spur 1), pPWW39-l (Spur 3) und pUWL201 (Spur 2) auf einem 10%igen Trenngel.

B: Immunologischer Nachweis von His-tag-EryBVI. Die zellfreien Extrakte von *S. lividans* TK23 mit pPWW39-s (Spur 1), pPWW39-l (Spur 3) und pUWL201 (Spur 2) wurden auf einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und auf PVDF-Membran übertragen.

Die zusätzlichen Proteinbanden der kurzen und der langen Version von His-tag-EryBVI sind durch Pfeile markiert. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-12.

3.2.4.3 Homologe Expression des Gens *eryBVI* in *Sac. erythraea*

Eine weitere Möglichkeit zur Produktion des Proteins EryBVI bestand darin, das Protein mit einem His-tag zu versehen und in seinem natürlichen Wirt *Sac. erythraea* homolog zu produzieren. Anschließend sollte die Expression mittels des His-tag-Antikörpers nachgewiesen werden.

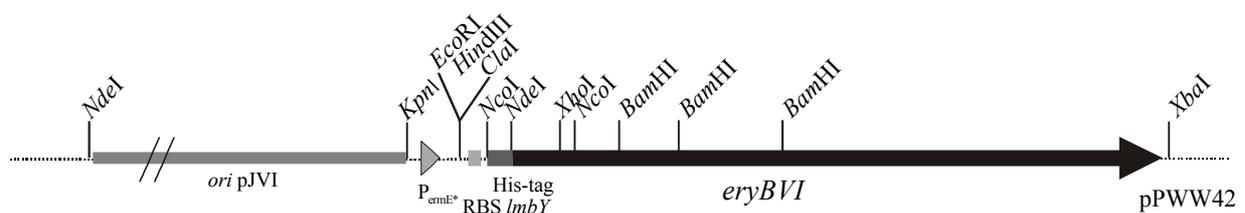


Abb. 3-18: Schematische Darstellung des für die Produktion von His-tag-EryBVI in *Sac. erythraea* konstruierten Plasmids pPWW42. Die Genexpression mit diesem Plasmid erfolgt unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} . Die Shine-Dalgarno-Sequenz stammt von *lmbY* aus *S. lincolnensis*. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

Zu diesem Zweck wurden die Plasmide pPWW42-s/l (Abb. 3-18) konstruiert, indem *eryBVI* mitsamt der DNA-Sequenz für den His-tag, der Shine-Dalgarno-Sequenz von *lmbY* und dem Promotor P_{ermE^*} als *KpnI/XbaI*-Fragment aus pPWW39-s/l isoliert und in pAL201 ligiert wurde. Der Vektor pAL201 besitzt den Replikationsursprung des Plasmids pJVI, der von

Sac. erythraea im Gegensatz zum Replikon aus pIJ101 besser erkannt wird (Yamamoto et al. 1986). Nach Transformation von *Sac. erythraea* mit pPWW42 und pAL201 wurden die Zellen in TSB-Medium bei 28°C für 72 h kultiviert und anschließend zur Präparation von zellfreien Extrakten (2.14) verwendet. Auf den Coomassie-gefärbten Gelen konnte keine zusätzliche Proteinbande dargestellt werden, während beide Formen des His-tag-EryBVI-Proteins im Western-Blot eindeutig nachgewiesen werden konnten (Abb. 3-19).

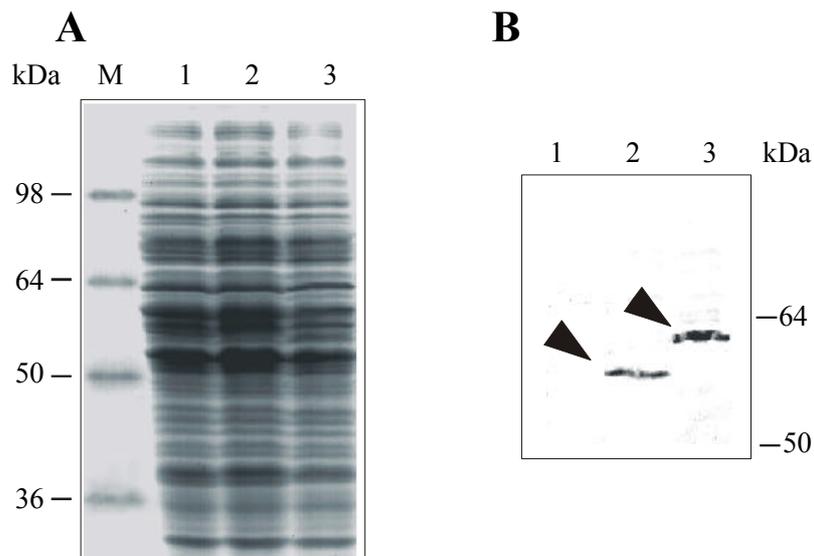


Abb. 3-19: Produktion von His-tag-EryBVI in *Sac erythraea*.

A: SDS-PAGE-Analyse der zellfreien Extrakte von *Sac. erythraea* mit pAL201 (Spur 1), pPWW42-s (Spur 2) und pPWW42-l (Spur 3) auf einem 10%igen Trenngel.

B: Immunologischer Nachweis von His-tag-EryBVI. Die zellfreien Extrakte von *Sac. erythraea* mit pAL201 (Spur 1), pPWW42-s (Spur 2) und pPWW42-l (Spur 3) wurden auf einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und auf PVDF-Membran übertragen.

Die zusätzlichen Proteinbanden der kurzen und der langen Version von His-tag-EryBVI sind durch Pfeile markiert. Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 3-12.

3.2.5 Heterologe Expression des Gens *eryBVII*

3.2.5.1 Heterologe Expression des Gens *eryBVII* in *E. coli*

Für die heterologe Produktion von His-tag-EryBVII in *E. coli* wurde ausgehend von pET16b das Plasmid pPWW94 konstruiert (Abb. 3-20). Durch PCR mit der Oligonukleotidkombination PW48/PW49 wurden am 5'-Ende des Gens *eryBVII* eine *HindIII*- und am Startcodon eine *NdeI*-Erkennungssequenz plaziert. Das aus dem Amplifikat durch Hydrolyse erhaltene *HindIII/PstI*-Fragment wurde zusammen mit dem *PstI/BamHI*-Fragment aus pNCO6,2 in pUC18 ligiert. Aus diesem Plasmid (pPWW91) wurde *eryBVII* als *NdeI/BamHI*-Fragment isoliert und in pET16b ligiert. Nach Transformation von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW94 und dem Kontrollvektor wurden die Stämme bei 28°C in LB-Medium mit Sorbitol und Betain kultiviert.

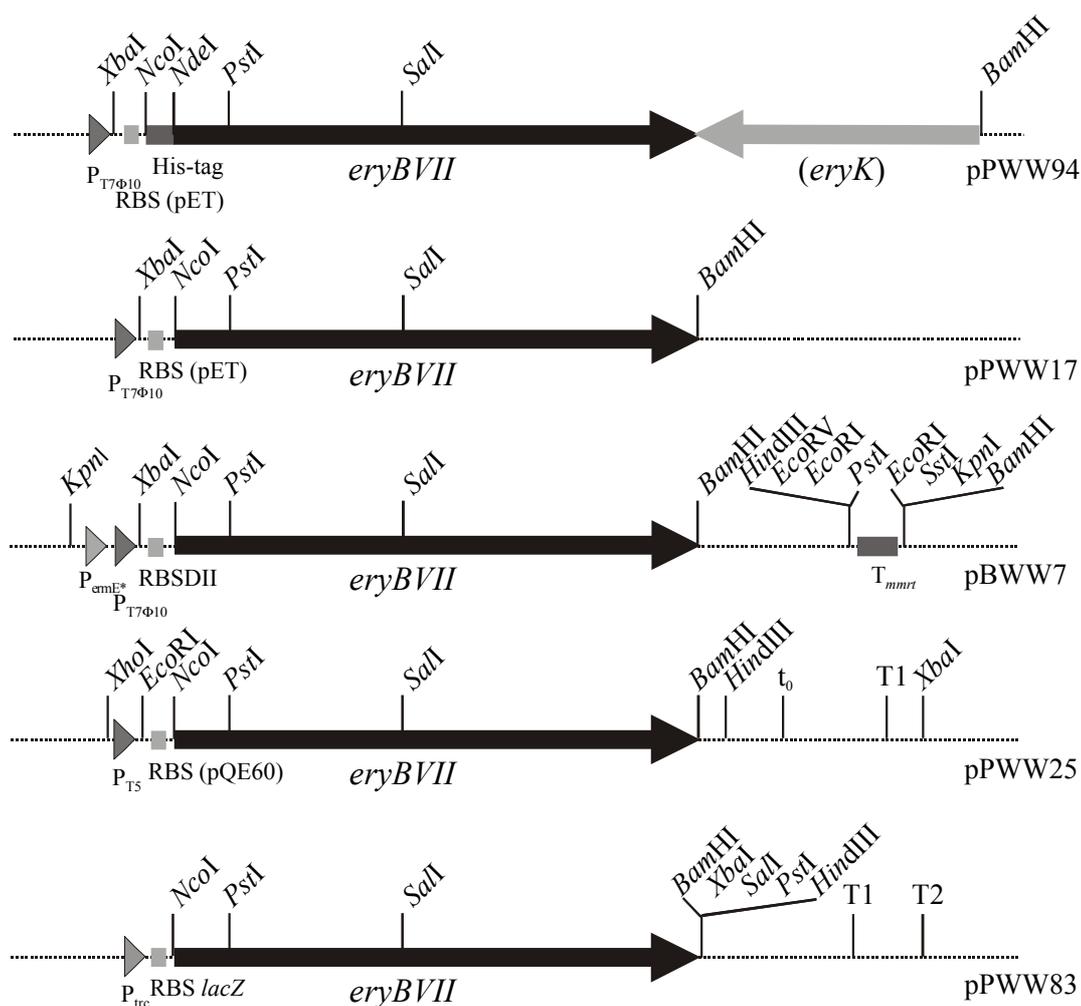


Abb. 3-20: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *eryBVII* aus *Sac. erythraea* in *E. coli* konstruierten Plasmide. Das Plasmid pPWW17 enthält das Gen *eryBVII* im Vektor pET11d, das Plasmid pBWW7 im Vektor pSUM2atr. In beiden Fällen steht das Gen unter Kontrolle von $P_{T7\Phi10}$, ebenso wie im Plasmid pPWW94. Außerdem enthält letzteres den natürlichen *downstream*-Bereich mit dem 3'-Ende von *eryK*. Das Plasmid pPWW25, in dem die Expression unter Kontrolle des Promotors P_{T5} erfolgt, entstand durch Klonierung von *eryBVII* in pQE60. Im Plasmid pPWW83 steht *eryBVII* unter Kontrolle des Promotors P_{trc} . Sonstige Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

Während sich das produzierte Protein His-tag-EryBVII nicht durch SDS-PAGE-Analyse darstellen ließ, zeigte die parallel durchgeführte Western-Blot-Analyse jedoch eindeutig die Produktion eines zusätzlichen Proteins als sichtbare Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 27 kDa, das sich aber unter den verwendeten Kulturbedingungen als völlig unlöslich erwies (Abb. 3-21). Die berechnete Molmasse von His-tag-EryBVII beträgt 23,7 kDa.

Für die heterologe Produktion von nativem EryBVII in *E. coli* wurden unterschiedliche Expressionsstämme, verschiedene Anzuchtbedingungen und Vektoren mit diversen Promotoren getestet (vgl. Abb. 3-20). In keinem der aus diesen Zellen gewonnenen Gesamtzell-extrakte konnte eine Produktion des EryBVII-Proteins detektiert werden.

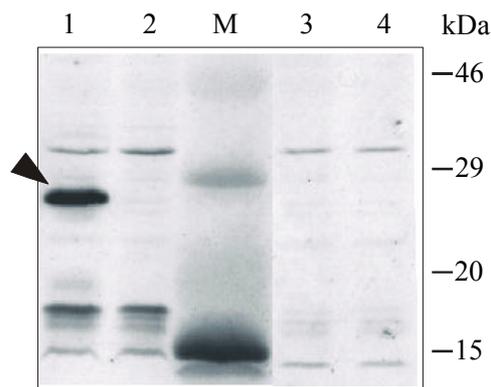


Abb. 3-21: Immunologischer Nachweis von His-tag-EryBVII. Die Western-Blot-Analyse wurde mit Gesamtzellextrakten (Spuren 1 und 2) und mit zellfreien Extrakten (Spuren 3 und 4) von *E. coli* BL21(DE3)/pPWW94 (Spuren 1 und 3) bzw. /pET16b (Spuren 2 und 4) durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium mit Sorbitol und Betain bei 28°C. Die zusätzliche Bande des His-tag-EryBVII-Proteins ist durch einen Pfeil markiert. Weitere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 3-12.

3.2.5.2 Versuche zur heterologen Expression des Gens *eryBVII* in *S. lividans* TK23

Für die Produktion von EryBVII in *S. lividans* wurden drei verschiedene Plasmide konstruiert (Abb. 3-22). Transformanden der drei Plasmide in *S. lividans* TK23 zeigten keine Produktion von EryBVII nach Anzucht der Zellen in TSB-Medium bei 28°C. Die Western-Blot-Analyse der Proteine aus *S. lividans* /pPWW57 verglichen mit *S. lividans*/pDNW26RBSY bestätigte dieses Ergebnis.

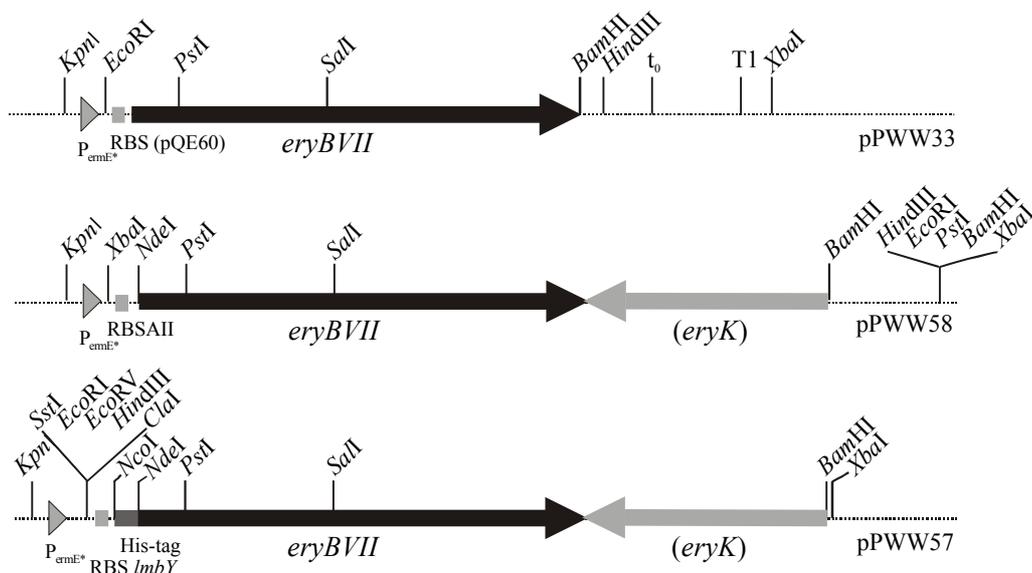


Abb. 3-22: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *eryBVII* aus *Sac. erythraea* in *S. lividans* konstruierten Plasmide. In allen drei Plasmiden steht das zu exprimierende Gen *eryBVII* unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} . Das Plasmid pPWW57 dient zur Produktion von N-terminalem His-tag-EryBVII. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

3.2.6 Heterologe Expression des Gens *dnmU* aus *S. peucetius*

Da das Protein EryBVII weder in *E. coli* noch in *S. lividans* in löslicher Form produziert werden konnte, wurde das zu *eryBVII* funktionell homologe Gen *dnmU* aus *S. peucetius* in *E. coli* und in *S. lividans* exprimiert. Die Sequenzidentität der Proteine EryBVII und DnmU von 59,3% (s. Anhang 7) deuten identische Enzymaktivitäten an. Dies wurde auch durch *in vivo* Komplementation der *eryBVII*-Mutante BVII98 mit *dnmU* bestätigt (s. unten 3.5).

3.2.6.1 Heterologe Expression des Gens *dnmU* in *E. coli*

Das Gen *dnmU* wurde zunächst mittels PCR (Oligonukleotidkombination PW35/PW36) aus genomischer DNA von *S. peucetius* amplifiziert. Am Startcodon wurde hierdurch eine *NdeI*-Erkennungssequenz eingefügt und *downstream* des Stopcodons eine *BamHI*-Schnittstelle. Als *NdeI/BamHI*-Fragment wurde das Gen *dnmU* in die Vektoren pJOE2702 und pET16b ligiert, so daß die Expressionsplasmide pPWW80 bzw. pPWW89 entstanden (Abb. 3-23).

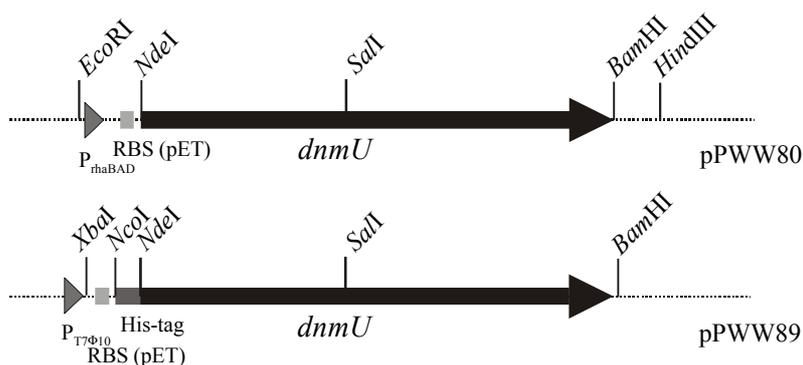


Abb. 3-23: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *dnmU* aus *S. peucetius* in *E. coli* konstruierten Plasmide. Im Plasmid pPWW80 steht das zu exprimierende Gen *dnmU* unter Kontrolle des Promotors P_{rhaBAD} , im Plasmid pPWW89 unter Kontrolle des Promotors $P_{T7\Phi10}$. Dieses Plasmid dient zur Produktion von N-terminalem His-tag-DnmU. Sonstige Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

Das Plasmid pPWW80 wurde in *E. coli* JM109 transformiert und die resultierenden Stämme in 2 X TY-Medium bei 28°C kultiviert. Die Produktion von His-tag-DnmU erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)/pPWW89, kultiviert in LB-Medium mit Sorbitol und Betain bei 28 C. Die SDS-PAGE-Analysen der Gesamtzellextrakte und der löslichen Überstandsfraktionen zeigten eine deutliche Produktion von löslichem DnmU bzw. His-tag-DnmU in allen Stämmen mit apparenten Molekulargewichten von etwas unter 24 kDa (DnmU) bzw. 27 kDa (His-tag-DnmU) (Abb. 3-24). Diese Werte stimmten gut mit dem errechneten Molekulargewicht von 22,6 kDa überein. Die Präsenz von His-tag-DnmU wurde darüber hinaus durch Western-Blot-Analyse der entsprechenden Zellextrakte bestätigt (vgl. Abb. 3-24, BIII).

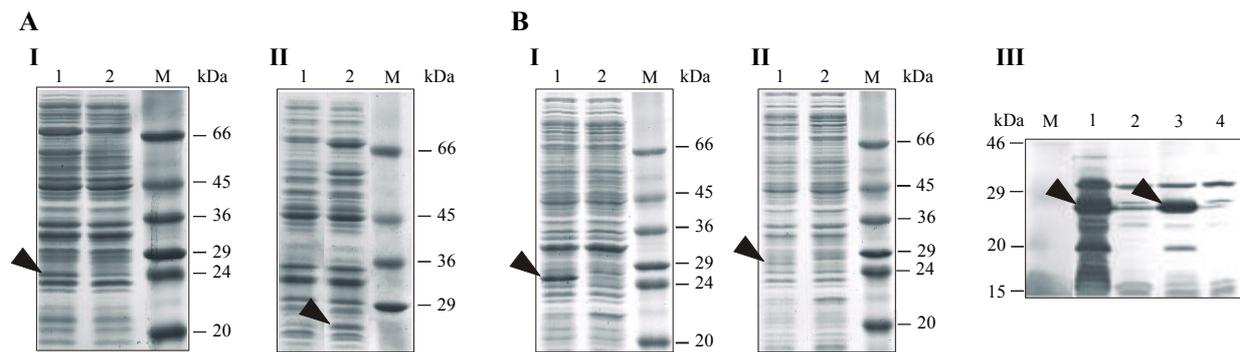


Abb. 3-24: Produktion von DnmU und His-tag-DnmU in *E. coli*.

A: SDS-PAGE-Analyse von *E. coli* JM109 mit pPWW80 (Spur 1) und mit pJOE2702 (Spur 2). Die Anzucht der Zellen erfolgte in 2 X TY-Medium bei 28°C.

I: Gesamtzellextrakte II: Lösliche Fraktionen

B: SDS-PAGE- und Western-Blot-Analysen von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW89 und pET16b. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium mit Sorbitol und Betain bei 28°C.

I: SDS-PAGE der Gesamtzellextrakte von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW89 (Spur 1) und pET16b (Spur 2).

II: SDS-PAGE der löslichen Fraktionen von *E. coli* BL21(DE3) mit pPWW89 (Spur 1) und pET16b (Spur 2).

III: Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte (Spuren 1 und 2) und der zellfreien Extrakte (Spuren 3 und 4) von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spuren 2 und 4) und pPWW89 (Spuren 1 und 3). Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die Proteine auf PVDF-Membran übertragen. Für den immunologischen Nachweis wurde ein Penta-His-Antikörper verwendet.

Die zusätzlichen Banden der Proteine DnmU und His-tag-DnmU sind durch Pfeile markiert. Sonstige Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-12.

3.2.6.2 Heterologe Expression des Gens *dnmU* in *S. lividans* TK23

Für die Produktion von DnmU und His-tag-DnmU in *S. lividans* wurde das *NdeI/BamHI-dnmU*-Fragment in die Vektoren pUWL201PW und pDNW26RBSY kloniert und so die Plasmide pPWW69 und pPWW68 generiert (Abb. 3-25).

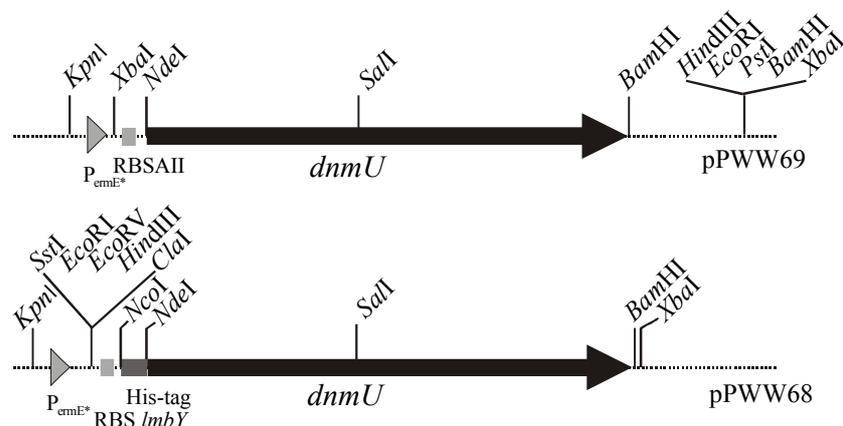


Abb. 3-25: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *dnmU* aus *S. peuceitius* in *S. lividans* konstruierten Plasmide pPWW68 und pPWW69. Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

Die Expression in *S. lividans* TK23 resultierte in einer deutlichen Produktion der Proteine DnmU und His-tag-DnmU, die auf dem Coomassie-gefärbten PAA-Gel in Form zusätzlicher

Proteinbanden bei etwa 24 kDa und 27 kDa deutlich erkennbar waren (Abb. 3-26, A). Eine Western-Blot-Analyse des Extraktes aus *S. lividans* TK23/pPWW68 bestätigte, daß die Bande von His-tag-DnmU stammte (Abb. 3-26, B).

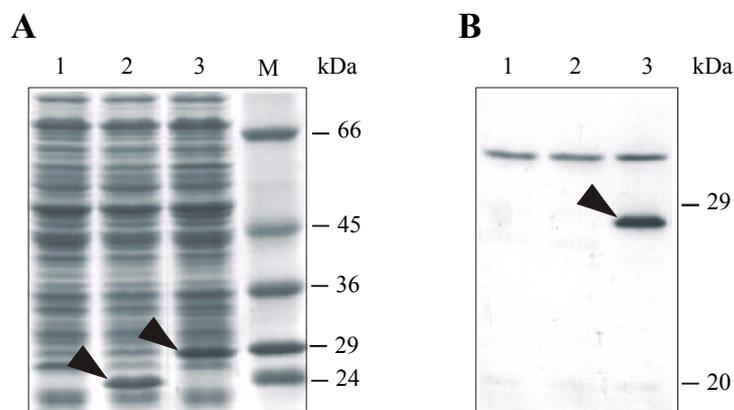


Abb. 3-26: Produktion von DnmU und His-tag-DnmU in *S. lividans*.

A: SDS-PAGE-Analyse von der zellfreien Extrakte von *S. lividans* mit pUWL201 (Spur 1), pPWW69 (Spur 2) und mit pPWW68 (Spur 3).

B: Western-Blot-Analyse der zellfreien Extrakte von *S. lividans* mit pUWL201 (Spur 1), pPWW69 (Spur 2) und mit pPWW68 (Spur 3).

Die Anzucht der Zellen erfolgte in TSB-Medium bei 28°C. Die zusätzlichen Banden der Proteine DnmU und His-tag-DnmU sind durch Pfeile markiert. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-12.

3.2.7 Heterologe Expression des Gens *dnmT* aus *S. peuceitius*

Das Protein EryBVI ist im L-Mycarose-Biosyntheseweg an einem der ersten Schritte der Biosynthese beteiligt (Abb. 1-8). Zur Aufklärung des gesamten Biosynthesewegs ist es von immenser Bedeutung, daß die Proteine, die die ersten Schritte der Reaktionskaskade katalysieren, funktionell sind. Neben *eryBVI* aus *Sac. erythraea* wurde das homologe Gen *dnmT* aus *S. peuceitius* ebenfalls in *E. coli* und in *S. lividans* exprimiert.

3.2.7.1 Heterologe Expression des Gens *dnmT* in *E. coli*

Das Expressionsplasmid pET16bdnmT (Krügel 1998; Abb. 3-27) wurde zur Produktion von N-terminalem His-tag-DnmT in *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 28°C in verschiedenen Medien. Die anschließende Analyse der Gesamtzellextrakte und der löslichen Fraktionen zeigte die Produktion von His-tag-DnmT in LB-Medium mit Sorbitol und Betain in Form einer zusätzlichen Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 60 kDa (Abb. 3-28). Bei Verwendung von LB-Medium konnte die Genexpression nur im Western-Blot nachgewiesen werden.

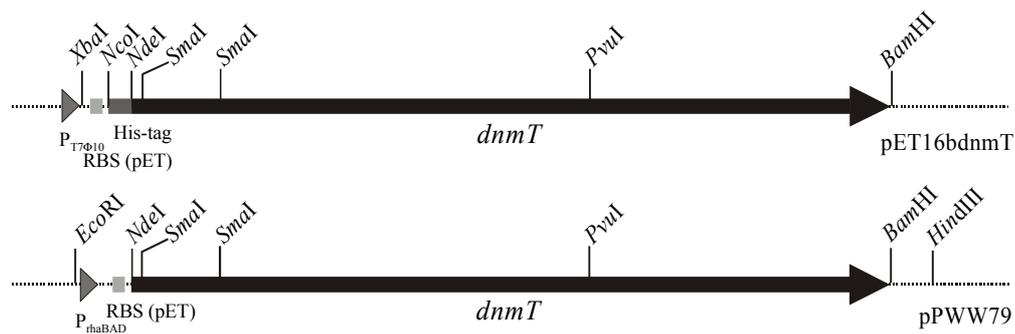


Abb. 3-27: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *dnmT* aus *S. peucetius* in *E. coli* verwendeten Plasmide. Die für die Genexpression bedeutenden Bereiche der Plasmide sind jeweils als linearer Ausschnitt, der Vektoranteil als gestrichelte Linie dargestellt. Im Plasmid pPWW79 steht das zu exprimierende Gen *dnmT* unter Kontrolle des Promotors P_{rhaBAD} , im Plasmid pET16bdnmT unter Kontrolle des Promotors $P_{T7\Phi10}$. Dieses Plasmid, das von Krügel (1998) konstruiert wurde, dient zur Produktion von N-terminalem His-tag-DnmT.

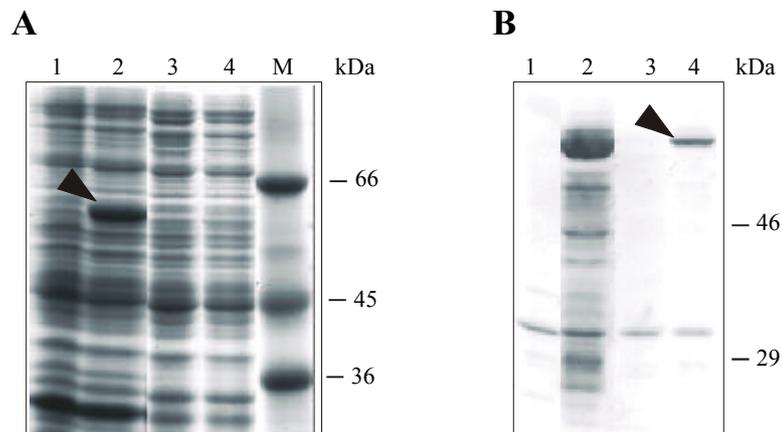


Abb. 3-28: Produktion von His-tag-DnmT in *E. coli* BL21(DE3).

A: SDS-PAGE-Analyse der Gesamtzellextrakte (Spuren 1 und 2) und der zellfreien Extrakte (Spuren 3 und 4) von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spuren 1 und 3) und pET16bdnmT (Spuren 2 und 4).

B: Western-Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte (Spuren 1 und 2) und der zellfreien Extrakte (Spuren 3 und 4) von *E. coli* BL21(DE3) mit pET16b (Spuren 1 und 3) und pET16bdnmT (Spuren 2 und 4). Sorbitol und Betain bei 28°C. Die Bande des Proteins His-tag-DnmT ist durch Pfeile markiert. Sonstige Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-12.

Zur Produktion von nativem DnmT wurde das *NdeI/BamHI*-Fragment aus pET16bdnmT in den Vektor pJOE2702 ligiert, so daß das Plasmid pPWW79 entstand (vgl. Abb. 3-27). Nach Transformation in *E. coli* JM109 wurden die Zellen in den unterschiedlichen Medien bei 28°C kultiviert. Natives DnmT war allerdings nicht als zusätzliche Proteinbande auf Coomassiegefärbten PAA-Gelen darstellbar.

3.2.7.2 Heterologe Expression des Gens *dnmT* in *S. lividans* TK23

Für die Produktion von DnmT und His-tag-DnmT in *S. lividans* wurde das *NdeI/BamHI*-Fragment aus pET16bdnmT in die Vektoren pUWL201PW und pDNW26RBSY ligiert und so die Plasmide pPWW66 bzw. pPWW67 generiert (Abb. 3-29). Nach Transformation von *S. lividans* TK23 mit pPWW66 und pPWW67 wurden die Stämme in TSB-Medium bei 28°C kultiviert und die zellfreien Extrakte analysiert.

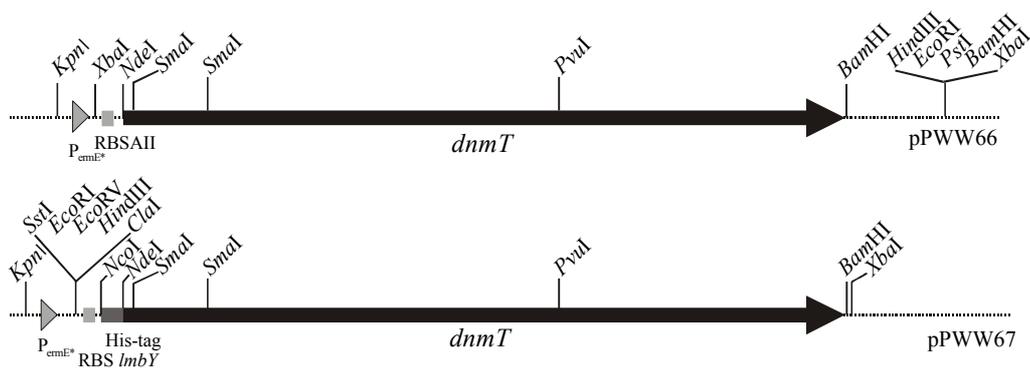


Abb. 3-29: Schematische Darstellung der für die Expression des Gens *dnmT* aus *S. peucetius* in *S. lividans* konstruierten Plasmide. In den Plasmiden pPWW66 und pPWW67 steht das zu exprimierende Gen *dnmT* unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} . pPWW67 diente zur Produktion von N-terminalem His-tag-DnmT. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-3.

Auf dem Coomassie-gefärbten PAA-Gel waren DnmT und His-tag-DnmT nicht in Form zusätzlicher Proteinbanden erkennbar. Die Western-Blot-Analyse der zellfreien zeigte aber eine deutlich sichtbare Bande des His-tag-DnmT-Proteins im Extrakt von *S. lividans* TK23 mit pPWW67 (Abb. 3-30).

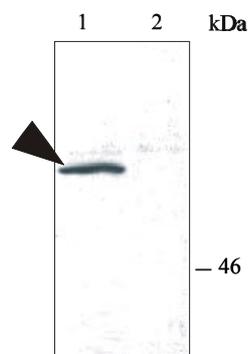


Abb. 3-30: Immunologischer Nachweis von His-tag-DnmT. Western-Blot-Analyse der zellfreien Extrakte von *S. lividans* TK23 mit dem *dnmT*-Expressionsplasmid pPWW67 (Spur 1) und mit pUWL201 (Spur 2). Die Anzucht der Zellen erfolgte in TSB-Medium bei 28°C. Die zusätzliche Bande des Proteins His-tag-DnmT ist durch einen Pfeil markiert. Sonstige Erläuterungen s. Legende zu Abb. 3-12.

3.3 Identifizierung und Klonierung des *tylCVI*-Gens aus *S. fradiae* T59-235

Die Streptomycetenstämme *S. fradiae* T59-235, *Sv. cinnamoneum* ATCC 11874, *S. platensis* IFO 12901 und *S. mycarofaciens* ATCC 21454 produzieren 16-gliedrige Makrolide mit L-Mycarose als Zuckerkomponente (vgl. Abb. 1-2). Um weitere Quellen für EryBVI-homologe Genprodukte unter anderem für die Komplementation von *eryBVI*-Mutanten zu erschließen, sollten die homologen Gene in diesen Stämmen identifiziert werden.

3.3.1 *Nested* PCR zur Identifizierung von *eryBVI*-homologen Genen

Aus den Regionen der bekannten EryBVI-homologen Genprodukte ließen sich drei Primer, SberA, SberB und SberC, ableiten (vgl. Anhang 6). Mit diesen konnte eine zweistufige *nested* PCR zur Identifizierung von *eryBVI*-homologen Genen durchgeführt werden. In der ersten Stufe dieser *nested* PCR wurden die beiden äußeren Primer SberA und SberC eingesetzt. Als Templat diente genomische DNA von *S. fradiae* T59-235, *Sv. cinnamoneum* ATCC 11874, *S. platensis* IFO 12901 und *S. mycarofaciens* ATCC 21454 sowie von *Sac. erythraea* NRRL 2338 zur Kontrolle. In der unmittelbar darauf folgenden zweiten Stufe der PCR wurden jeweils 1 µl bis 5 µl des Reaktionsgemisches aus der ersten Stufe und die Oligonucleotidkombination SberB und SberC eingesetzt. Diese Vorgehensweise erhöhte die Spezifität der PCR und somit die Wahrscheinlichkeit, ein *eryBVI*-ähnliches Gen in den getesteten Stämmen zu identifizieren. Im ersten Schritt der *nested* PCR waren Amplifikate von ca. 1200 bp Länge, im zweiten Schritt von ca. 880 bp Länge zu erwarten. Außer bei der Kontrolle wurde nur aus der genomischen DNA von *S. fradiae* T59-235 im ersten Schritt ein singuläres PCR-Produkt der erwarteten Länge amplifiziert. Im zweiten Schritt konnte hieraus ein PCR-Produkt mit einer Länge von ungefähr 490 bp amplifiziert werden. Aus der genomischen DNA der übrigen Stämme wurde kein Amplifikat entsprechender Länge erhalten. Das 1,2 kbp DNA-Fragment aus *S. fradiae* T59-235 wurde in pUC18 kloniert (pPWW403-7) und sequenziert. Die DNA-Sequenz bestätigte, daß die klonierte DNA ein Segment eines *eryBVI*-homologen Gens enthielt. Dieses Gen erhielt bei seiner unabhängigen Identifizierung im *tyl*-Cluster durch Bate et al. (1999 und 2000) die Bezeichnung *tylCVI*.

3.3.2 Klonierung und Analyse des DNA-Fragments aus *S. fradiae* T59-235

Das 1,2 kbp DNA-Fragment enthielt lediglich einen Teil des *tylCVI*-Gens. Deshalb wurde über homologe DNA-DNA-Hybridisierung der Gesamt-DNA von *S. fradiae* T59-235 ein starkes

Signal bei Spaltung mit *ApaI* mit einer Fragmentgröße von etwa 3,6 kbp identifiziert (Abb. 3-31); dieses *ApaI*-Fragment wurde shotgunkloniert.

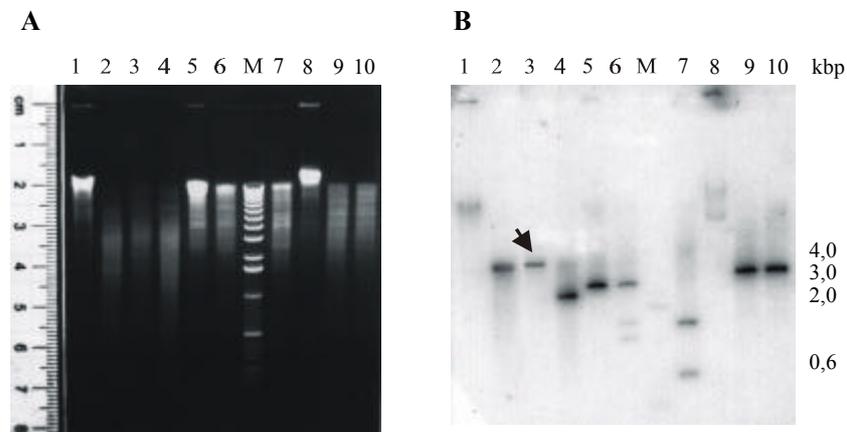


Abb. 3-31: Homologe DNA-DNA-Hybridisierung von genomischer DNA von *S. fradiae* T59-235 mit einer *tyI/ CVI*-Sonde. A: Agarose-Gel (0,8%ig) von genomischer DNA, die mit unterschiedlichen Restriktionsendonucleasen behandelt wurde: Spur 1: *BglII*, Spur 2: *BglIII/ApaI*, Spur 3: *ApaI*, Spur 4: *ApaI/KpnI*, Spur 5: *KpnI*, Spur 6: *KpnI/EcoRI*, Spur 7: *SstI*, Spur 8: *XhoI*, Spur 9: *XhoI/NcoI*, Spur 10: *NcoI*, M: 1kb DNA-Leiter. **B:** Autoradiogramm des Southern-Blots von dem unter A dargestellten Gel (s. 2.8.6). Das Signal des für die Shotgun-Klonierung eingesetzten 3,6 kbp DNA-Fragmentes ist mit einem Pfeil markiert.

Dazu wurden *ApaI*-Fragmente von etwa 3,6 kbp Größe isoliert und mit dem *ApaI*-hydrolysierten Vektor pUCBM21 ligiert. Die nach Transformation des Ligationsansatzes erhaltenen *E. coli* DH5 α -Kolonien wurden mittels Kolonie-Hybridisierung gescreent (s. 2.8.6; Sonde: 1,2 kbp-Fragment aus pPWW403-7) und das Plasmid pPWW41a aus einer positiv hybridisierenden *E. coli*-Kolonie isoliert und analysiert.

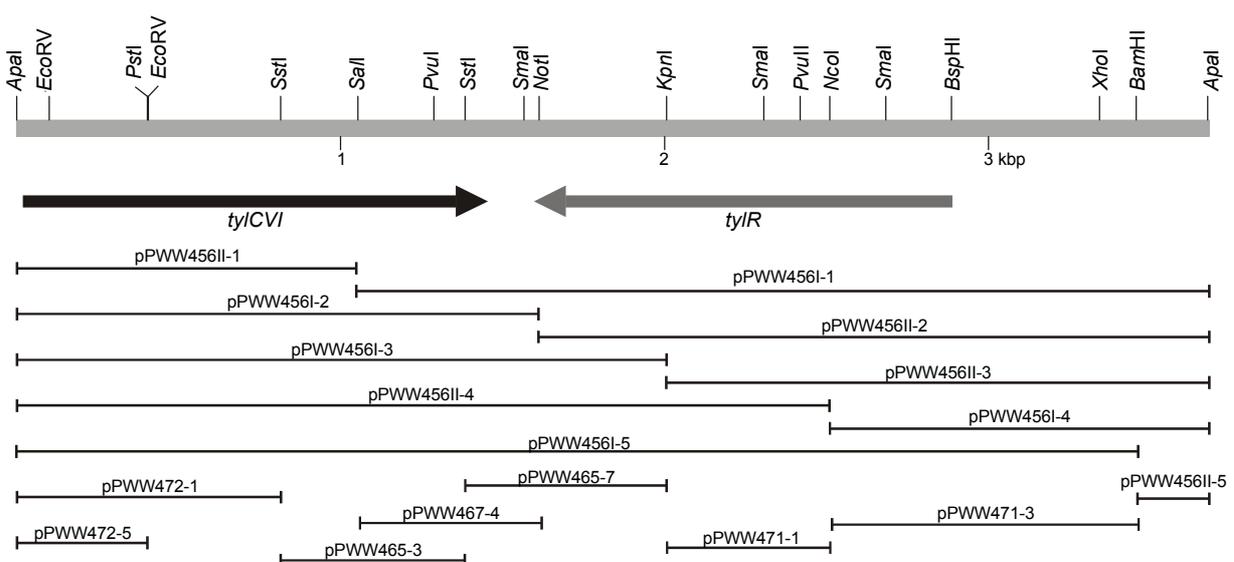


Abb. 3-32: Physikalische Karte des 3,6 kbp *ApaI*-Fragmentes aus genomischer DNA von *S. fradiae* T59-235. Die Gene *tyI/ CVI* und *tyI/ R*, die auf dem Fragment liegen, sind entsprechend ihrer jeweiligen Orientierung als Pfeile eingezeichnet. Die Darstellung ist maßstabgetreu.

Das in diesem Plasmid enthaltene 3,7 kbp-Fragment aus *S. fradiae* wurde subkloniert und doppelsträngig sequenziert (Abb. 3-32; Sequenz s. Anhang 13). Das *ApaI*-Fragment besaß einen G + C-Gehalt von 72,85% und enthielt, entsprechend den Streptomyceten-spezifischen Kriterien der Codonverwendung (Bibb et al. 1984; Wright und Bibb 1992), zwei vollständige, gegenläufig orientierte offene Leserahmen, die mit *tylCVI* und *tylR* bezeichnet wurden (Codonverwendung und G + C-Gehalt der beiden Leserahmen s. Anhang 14). Im Gencluster für die Biosynthese von Tylosin sind *tylCVI* und *tylR* *downstream* von *tylAII* und *tylO* lokalisiert, die für eine 4,6-Dehydratase bzw. eine Thioesterase kodieren (Merson-Davies und Cundliffe 1994; Bate et al. 1999; Bate et al. 2000).

Das Gen *tylCVI* kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 52,4 kDa, das sich aus 478 Aminosäuren zusammensetzt. Zu den bekannten potentiellen 2,3-Dehydratasen besitzt TylCVI große Sequenzhomologie (Tabelle 3-3; Sequenzvergleiche von TylCVI mit homologen Genprodukten s. Anhang 15).

Tab. 3-3: Sequenzidentitäten der EryBVI-homologen 2,3-Dehydratasen in %

	EryBVI	TylCVI	OleV	gra-ORF27	AveBVI	LanS	PCZA361.3	DnmT	ORF3	SnogH	MidL
EryBVI	100,0										
TylCVI	48,7	100,0									
OleV	50,6	49,7	100,0								
gra-ORF27	43,5	46,5	49,0	100,0							
AveBVI	47,2	49,1	51,7	47,9	100,0						
LanS	44,0	46,5	53,3	52,1	67,4	100,0					
PCZA361.3	45,0	45,5	47,8	48,3	62,9	66,0	100,0				
DnmT	42,6	44,5	51,1	46,1	49,4	48,5	45,6	100,0			
ORF3	40,2	41,4	48,2	43,7	45,8	45,0	42,7	81,1	100,0		
SnogH	49,5	45,4	51,5	48,9	50,3	54,0	50,0	57,3	50,5	100,0	
MidL	46,7	53,9	51,4	44,7	46,5	50,0	43,7	44,6	43,8	46,6	100,0

Das Protein TylR besteht aus 430 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 46,3 kDa. Die Datenbanksuche nach homologen Genprodukten lieferte einen einzigen Eintrag mit signifikanter Sequenzhomologie zu TylR (Anhang 16): Das Genprodukt AcyB2 aus *S. thermotolerans*, dem Produzenten des 16-gliedrigen Makrolidantibiotikums Carbomycin, besitzt 41,9% Sequenzidentität zu TylR (Acc. No. JC2032; Arisawa et al. 1993). Das Protein AcyB2 hat regulatorische Funktion bei der Expression des Gens *acyB1*, das für eine 4'-*O*-Acyltransferase kodiert (Arisawa et al. 1993).

Im Gencluster von *S. mycarofaciens* ATCC 21454 für die Biosynthese von Midecamycin ist das Gen *midL*, das für die potentielle 2,3-Dehydratase MidL mit 53,9% Sequenzidentität zu TylCVI kodiert, zwischen den Genen *midB* (4,6-Dehydratase) und *midE* (4'-*O*-Propionyltransferase) lokalisiert (Cong 2000). Das Gen *midL* wurde für diese Arbeit zur Sequenzierung und weiteren Bearbeitung übernommen. *midL* kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 52,5 kDa, das aus 467 Aminosäuren besteht (Sequenz s. Anhang 17;

Codonverwendung und G + C-Gehalt des Leserahmens s. Anhang 18). Das MidL-Protein besitzt hohe Sequenzhomologie zu 2,3-Dehydratasen (vgl. Tabelle 3-3; Sequenzvergleiche von MidL mit homologen Genprodukten s. Anhang 15).

3.4 Erzeugung und Charakterisierung von *eryBVI*-Substitutionsmutanten

3.4.1 Strategie zur Erzeugung und Charakterisierung der Substitutionmutanten

Um die Funktionalität der verschiedenen Expressionsprodukte (insbesondere mit His-tag) und die Funktionalität heterologer Genprodukte testen zu können, sowie zur Identifizierung der Biosynthese-Zwischenprodukte sollten Einzelgen-Mutanten mit komplettem Verlust des Leserahmens erzeugt werden. Die *Sac. erythraea*-Mutanten BII92, 335, BIV87, Xho91 und BVII98 (Gaisser et al. 1997; Gaisser et al. 1998; Salah-Bey et al. 1998) standen bereits zur Verfügung. Bei diesen Mutanten handelte es sich um Deletions- bzw. Punktmutationsmutanten (vgl. Tab. 2-1). Diese hatten bei der Komplementation mit homologen Genen den Nachteil, daß es zu homologen Rekombinationsereignissen kommen konnte, so daß dadurch der Wildzustand wiederhergestellt wurde. Substitutionsmutanten, bei denen das gesamte zu mutagenisierende Gen z. B. durch ein Resistenzgen ausgetauscht wird, eignen sich dagegen für diese Versuche besser. Da das Genprodukt von *eryBVI* wahrscheinlich einen der ersten Schritte der Biosynthese der dTDP-L-Mycarose katalysiert, und da für die Komplementation einer *eryBVI*-Mutante mit *dnmT*, *tylCVI* und *midL* drei Gene mit großer Sequenzähnlichkeit aus anderen Streptomyceten zur Verfügung standen, sollten *eryBVI*-Substitutionsmutanten erzeugt werden. Die Vorgehensweise zur Generierung und Charakterisierung der *knock-out* Mutanten ist schematisch in Abbildung 3-33 dargestellt.

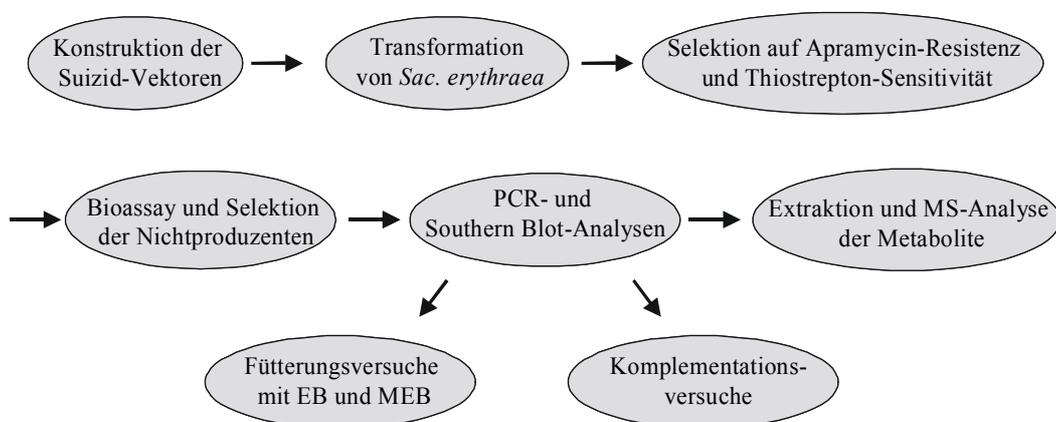


Abb. 3-33: Schematische Darstellung der Erzeugung und Charakterisierung von *eryBVI*-Substitutionsmutanten. Die einzelnen Schritte sind jeweils als separate Ellipsen dargestellt, ihre Reihenfolge ergibt sich aus den eingezeichneten Pfeilen.

durch das Gen *aacC4* auf zwei verschiedene Arten (Abb. 3-35). Bei der ersten Variante wurde *eryBVI* so durch das *aacC4*-Gen ersetzt, daß das resultierende Genprodukt ein Fusionsprotein von AacC4 und EryCIV darstellte. Im zweiten Fall wurde *eryBVI* so durch *aacC4* ersetzt, daß der Leserahmen für die translationale Erkennung des Stopcodons von *eryBVI* erhalten blieb. Zunächst wurde das Plasmid pPWW11, das den gesamten offenen Leserahmen von *eryBVI* sowie Teile der flankierenden Gene *eryCVI* und *eryCIV* enthielt, als Templat-DNA für die rekombinante PCR-Technik (Higushi 1990) eingesetzt, um eine artifizielle *ClaI*-Schnittstelle (vgl. Abb. 3-35) am 3'-Ende von *eryBVI* zu erzeugen.

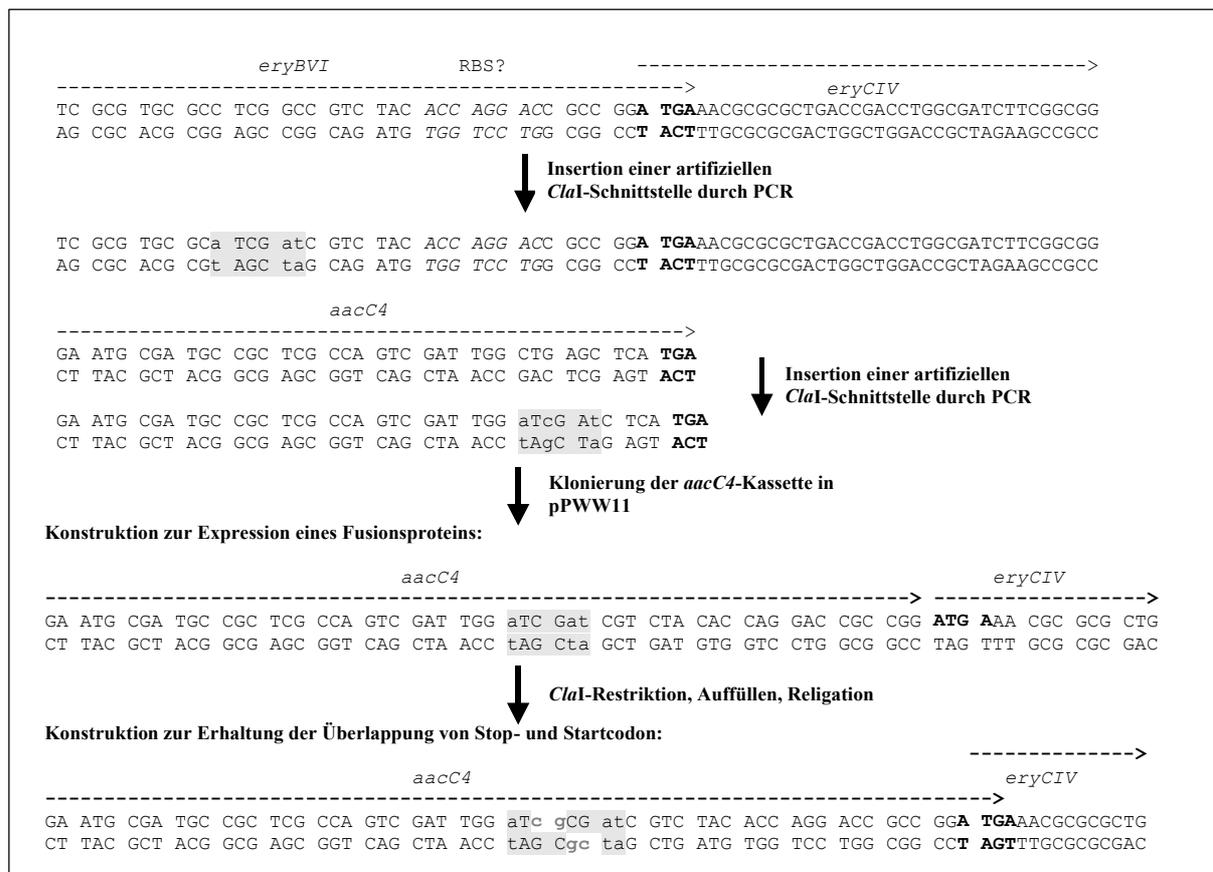


Abb. 3-35: Substitution von *eryBVI* durch das Gen *aacC4*. Die potentielle Ribosomenbindestelle von *eryCIV* ist kursiv dargestellt. Start und Stopcodons sind fett hervorgehoben. Die durch PCR eingeführten artifiziellen *ClaI*-Schnittstellen sind grau hinterlegt dargestellt.

In zwei getrennten PCR-Ansätzen wurden unter Verwendung der Primerpaare PW27/PW28 und PW29/PW30 ein 560 bp *ClaI/NotI*-Fragment und ein 850 bp *ClaI/SstI*-Fragment generiert. Diese beiden Fragmente, die sich im Bereich der *ClaI*-Schnittstelle überlappten, dienten als Templat-DNA in einem weiten PCR-Ansatz mit der Oligonukleotidkombination PW27/PW30 (äußere Primer). Hierdurch wurde ein PCR-Produkt von 1,4 kbp Länge gewonnen, das am 3'-Ende von *eryBVI* eine *ClaI*-Restriktionsschnittstelle enthielt und das zur Substitution des *NotI/SstI*-Fragmentes von pPWW11 diente, so daß pPWW47 (Abb. 3-36) entstand. In einem

weiteren PCR-Ansatz wurde *aacC4* aus dem Plasmid pEFBA amplifiziert (Oligonukleotidkombination Apr1/Apr1), so daß am 5'-Ende der *aacC4*-Kassette eine *ApaI*-Erkennungssequenz und am 3'-Ende eine *ClaI*-Restriktionsschnittstelle (Abb. 3-36) generiert wurden. Das auf diese Weise gewonnene 0,9 kbp *ApaI/ClaI*-Fragment wurde mit der *ApaI/ClaI* hydrolysierten DNA von pPWW47 ligiert. Das erhaltene Plasmid pPWW48 enthielt die Konstruktion zur Expression eines Fusionsproteins von AacC4 und EryCIV (vgl. Abb. 3-35 u. Abb. 3-36). Um zu erreichen, daß die Anordnung des Stopcodons von *eryBVI* relativ zum Startcodon von *eryCIV* erhalten blieb, wurde das Plasmid pPWW48 mit *ClaI* hydrolysiert und nach Auffüllen der Schnittstelle religiert (pPWW48.1; vgl. Abb. 3-36).

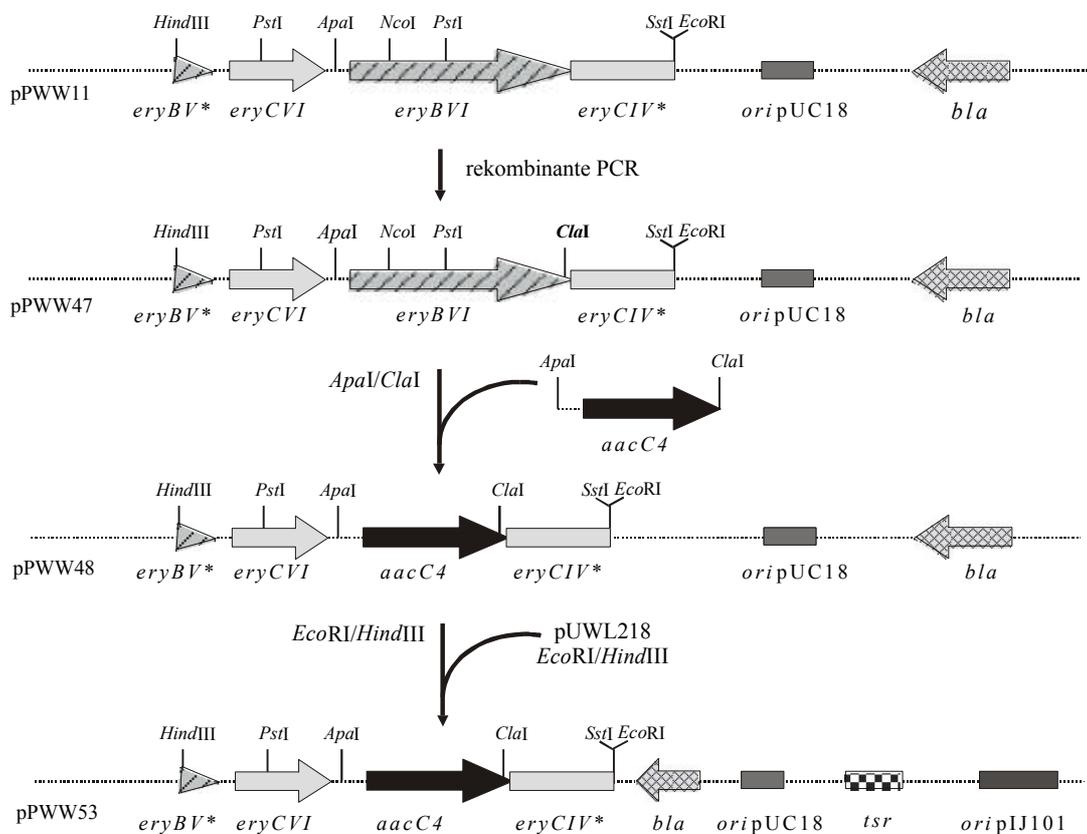


Abb. 3-36: Konstruktion des Suizid-Vektors pPWW53. Für die Konstruktion von pPWW48 wurde ausgehend von pPWW11 mittels PCR eine *ClaI*-Restriktionsschnittstelle konstruiert und das Gen *eryBVI* durch das Gen *aacC4* substituiert. Der Suizid-Vektor entstand durch Ligation des *EcoRI/HindIII*-Fragmentes in pUWL218.

Die rekombinanten Plasmide wurden bereits in *E. coli* auf die vermittelte Tobramycin-Resistenz selektioniert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, daß die C-terminale Verlängerung des Proteins AacC4 durch die C-terminalen Aminosäuren von EryBVI bzw. durch EryCIV keinen Einfluß auf die Resistenzvermittlung hatte. Die beiden zur Transformation von *Sac. erythraea* verwendeten Suizid-Plasmide pPWW53 und pPWW53.1 wurden schließlich durch Ligation der aus pPWW48 und pPWW48.1 isolierten *EcoRI/HindIII*-Fragmente in pUWL218 erzeugt.

3.4.3 Genotypische und phänotypische Charakterisierung der *eryBVI*-Mutanten

Nach Transformation der Plasmide pPWW53 und pPWW53.1 in *Sac. erythraea* und nach drei Sporulationszyklen wurden sieben Apramycin-resistente und gleichzeitig Thiostrepton-sensitive Transformanten erhalten (53M1 und 53M5 ausgehend von pPWW53 sowie 53.1M2, 53.1M9, 53.1M13, 53.1M15 und 53.1M16 ausgehend von pPWW53.1). Diese wurden in Bioassays auf Erythromycin A-Produktion überprüft (vgl. 2.6; Abb. 3-37). Sechs dieser Mutanten hatten die Fähigkeit verloren, ein aktives Antibiotikum zu produzieren. Mutante 53M5 zeigt dagegen einen dem *Sac. erythraea* Wildtyp vergleichbaren Hemmhofdurchmesser.



Abb. 3-37: Hemmhoftests zur Ermittlung der Erythromycin A-negativen Mutanten. Als Indikatororganismus diente *Micrococcus luteus*.

Drei unabhängige PCR-Analysen bestätigten die Existenz von sechs Doppelcrossover-Mutanten (Abb. 3-38). Mutante 53M5 war bezüglich des erhaltenen Fragmentmusters der PCR-Ansätze identisch mit dem *Sac. erythraea* Wildstamm. Teile des *aacC4*-Gens konnten in diesen beiden Fällen nicht amplifiziert werden. Aus den Doppelcrossover-Mutanten konnten keine internen Fragmente aus dem Gen *eryBVI* erhalten werden. Bei Verwendung der Primer PW33 und PW34 wurden aus der DNA der Substitutionsmutanten PCR-Fragmente der erwarteten Größe erhalten.

Die im Anschluß durchgeführten Southern-Hybridisierungen mit genomischer DNA der Mutanten bestätigten die zuvor erhaltenen Ergebnisse (Abb. 3-39). Die erhaltenen Hybridisierungsmuster entsprachen den erwarteten Fragmentgrößen (vgl. Abb. 3-34 und Abb. 3-39). Wurde die *aacC4*-Sonde zur Hybridisierung verwendet, so wurden bei den Doppelcrossover-Mutanten Signale bei der erwarteten Fragmentgröße von 3,4 kbp erhalten, während beim Wildstamm und bei Mutante 53M5 keine Signale detektierbar waren. Im Gegensatz dazu traten bei diesen beiden Stämmen bei der Hybridisierung mit der *eryBVI*-Sonde die erwarteten Signale der Fragmentgrößen 1 kbp und 3 kbp auf.

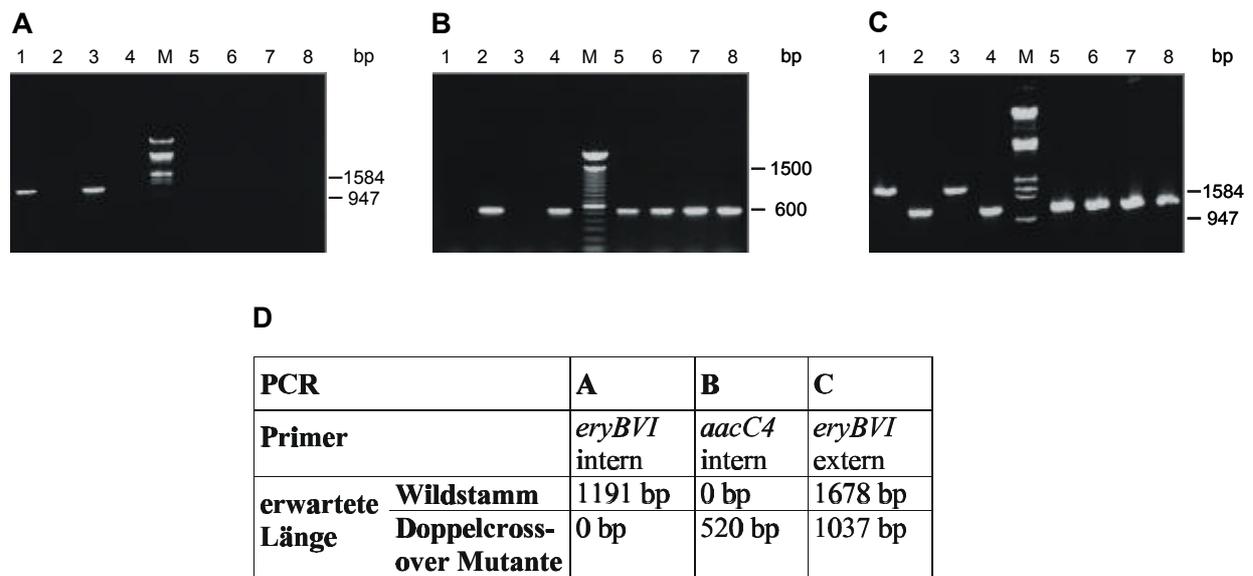


Abb. 3-38: Charakterisierung von *eryBVI*-Mutanten mittels PCR. Bei PCR-Ansatz A wurden die *eryBVI*-internen Primer SBERA und SBERC, bei PCR-Ansatz B die *aacC4*-internen Primer *aacC4*-a und *aacC4*-b und bei PCR-Ansatz C die aus den *eryBVI*-flankierenden Bereichen abgeleiteten Primer PW33 und PW34 verwendet. Die erwarteten Längen der PCR-Produkte sind in Tabelle D aufgeführt. Spur 1: wt; Spur 2: 53M1; Spur 3: 53M5; Spur 4: 53.1M2; Spur 5: 53.1M9; Spur 6: 53.1M13; Spur 7: 53.1M15; Spur 8: 53.1M16; M: DNA-Größenmarker, die Größen einiger Markerbanden sind in bp angegeben.

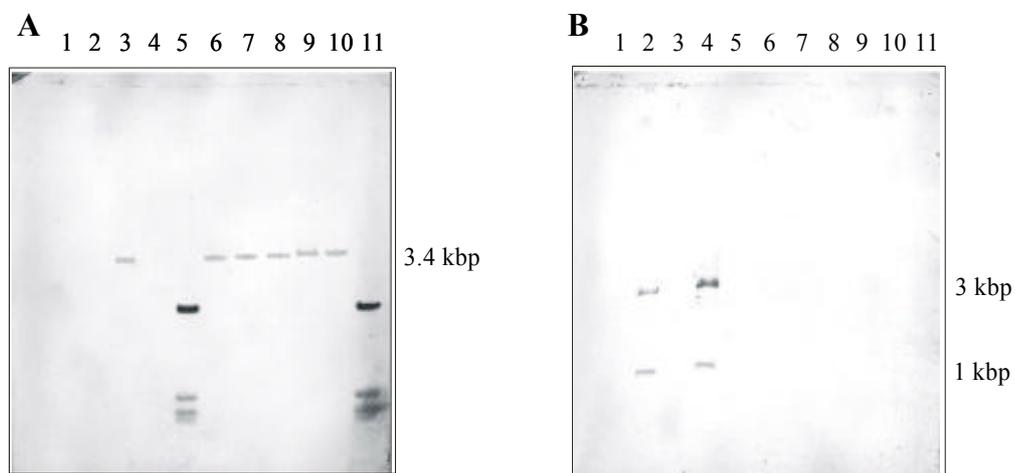


Abb. 3-39: Charakterisierung von *eryBVI*-Mutanten mittels Southern-Hybridisierung. Die mit *PstI* hydrolysierte genomische DNA der *Sac. erythraea*-Stämme wurde mit zwei Sonden hybridisiert. **A:** einem 1,5 kbp *aacC4*-Fragment und **B:** einem 1,2 kbp *eryBVI*-Fragment. Spur 1: λ -DNA *EcoRI*/*HindIII* hydrolysiert; Spur 2: wt; Spur 3: 53M1; Spur 4: 53M5; Spur 5: 1 kb ladder; Spur 6: 53.1M2; Spur 7: 53.1M9; Spur 8: 53.1M13; Spur 9: 53.1M15; Spur 10: 53.1M16; Spur 11: 1 kb ladder. Die Größen der PCR-Produkte sind in kbp angegeben.

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der Mutanten wurden die von ihnen produzierten Metabolite aus dem Kulturmedium isoliert und mittels Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) analysiert (s. 2.7).

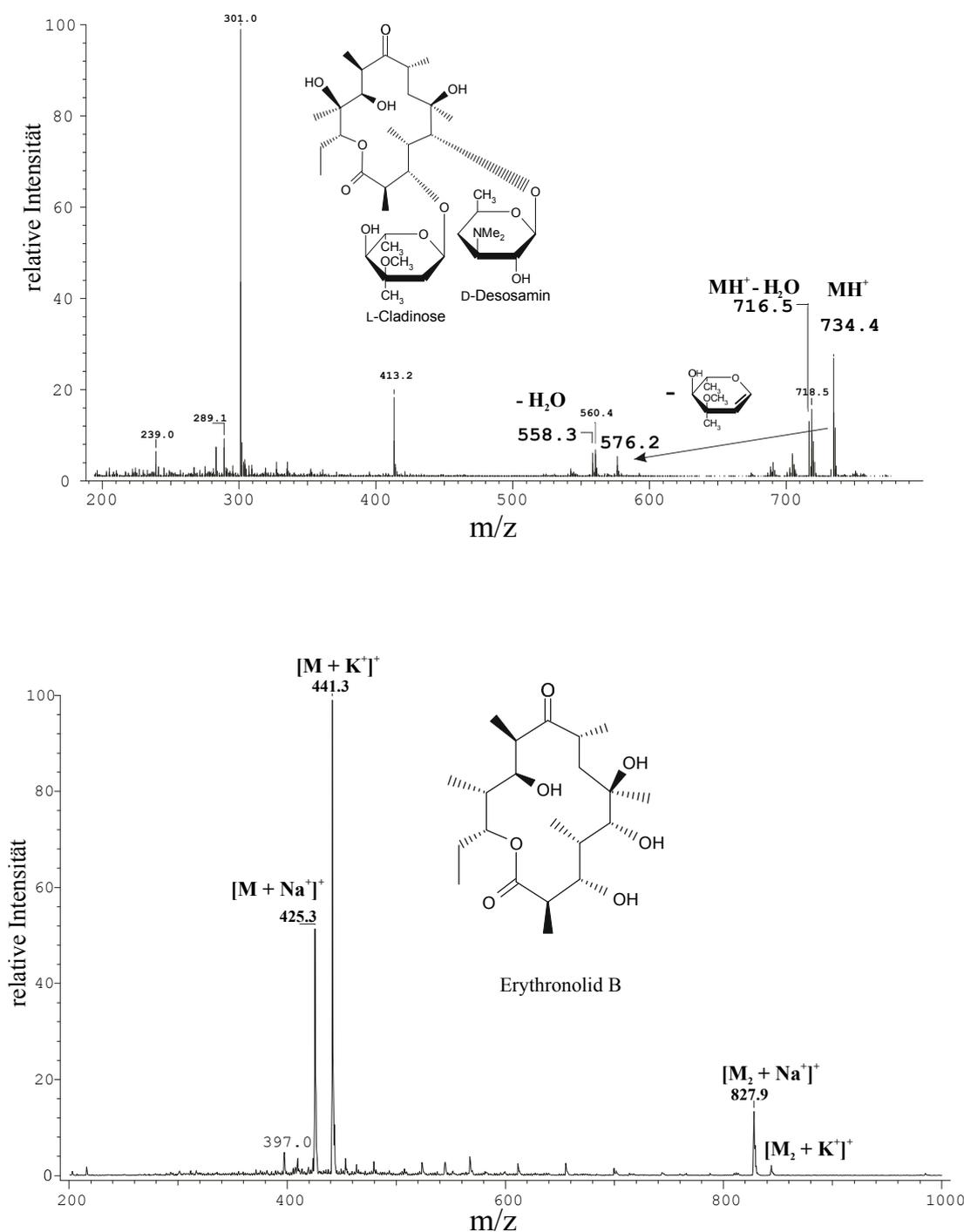


Abb. 3-40: ESI-MS-Spektren von Erythromycin A isoliert aus dem Kulturüberstand von *Sac. erythraea* NRRL 2338 (oben) und Erythronolid B isoliert aus dem Kulturüberstand der Mutante 53M1 (unten). Das Massenspektrum von Erythromycin A wurde mit dem Triple State Quadrupol Massenspektrometer TSQ 7000 aufgenommen, das Spektrum von Erythronolid B mit dem Ion Trap LC Massenspektrometer LCQ.

Im Kulturüberstand aller genotypisch als Doppelcrossover-Mutanten charakterisierten Stämme (53M1, 53.1M2, 53.1M9, 53.1M13, 53.1M15 und 53.1M16) ließ sich im Gegensatz zum Kulturüberstand des Wildstammes kein Erythromycin A nachweisen (Abb. 3-40). Die Substitutionsmutanten produzierten, wie für *eryB*-Mutanten charakteristisch, die Zwischenstufe Erythronolid B der Erythromycin-Biosynthese. Erythronolid B konnte in den Massenspektren als Natrium- (m/z 425,3) und als Kalium-Addukt (m/z 441,3) sowie als Dimer mit Natrium (m/z 827,9) und Kalium (m/z 843,9) identifiziert werden. Als Referenzsubstanz diente Erythronolid B.

3.4.4 Fütterung der *eryBVI*-Substitutionsmutanten mit Zwischenprodukten der Erythromycin A-Biosynthese

Um sicherzustellen, daß die Substitution von *eryBVI* durch *aacC4* keine Auswirkungen auf die benachbarten und *downstream* im *ery*-Gencluster angeordneten Gene bzw. deren Expression hat, wurden die Mutanten mit Erythronolid B (EB) und 3- α -Mycarosylerythronolid B (Myc-EB) gefüttert und auf ihre Erythromycin A-Produktion in Bioassays überprüft (s. 2.6; Abb. 3-41). Fütterung mit dem Substrat EB, das von den Mutanten selbst produziert wird, konnte die Produktion von Erythromycin A nicht komplementieren, während die Zugabe von Myc-EB die Biosynthese von Erythromycin A komplementieren konnte. Dies zeigte, daß die Biosynthese von D-Desosamin nicht beeinflußt wurde und somit keine polaren Mutationen in den *eryBVI*-Substitutionsmutanten bezüglich der downstream gelegenen *eryC*-Gene vorlagen (vgl. Abb. 1-6).

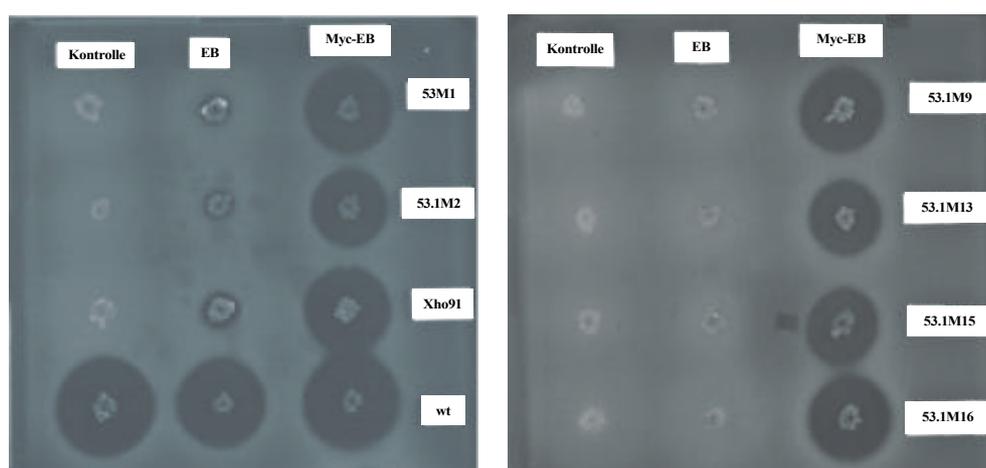


Abb. 3-41: Bioassays zur Erythromycin A-Produktion im *Sac. erythraea* NRRL 2338 (wt) und in *eryBVI*-Mutanten. Die Hemmhöfe, die sich in einem *Micrococcus luteus*-Rasen nach Fütterung von *Sac. erythraea*-Zellen mit Erythronolid B (EB) und 3- α -Mycarosylerythronolid B (Myc-EB) bilden, sind jeweils im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Substratfütterung dargestellt.

3.5 Komplementation von *eryB*-Mutanten

Die zur Verfügung stehenden *eryB*-Mutanten wurden für Komplementationsversuche auf genetischer Ebene verwendet, um die enzymatische Aktivität der mit His-tag versehenen EryB-Proteine und die Möglichkeit der Substitution von *eryBVI* durch die homologen Gene *tylCVI*, *midL* und *dnmT* sowie von *eryBVII* durch *dnmU in vivo* zu testen. Die *eryB*-Mutanten wurden mit verschiedenen rekombinanten Expressionsplasmiden transformiert und die jeweiligen Stämme mittels Bioassays (s. 2.6) und MS-Analysen auf Erythromycin A-Produktion überprüft (Tab. 3-4).

Tab. 3-4: Ergebnisse der Bioassays und MS-Analysen der Komplementationen von *eryB*-Mutanten auf genetischer Ebene mit verschiedenen Expressionsplasmiden.

Stamm	Mutiertes Gen	Plasmid	Genprodukt für Komplementation	Ø des Hemmhofs [cm] ± 0,3	MS-Nachweis von m/z 756,4 bzw. 734,3
NRRL 2338	–	–	–	4,2	+++
BII92	<i>eryBII</i>	pAL201	–	1,8	+
BII92	<i>eryBII</i>	pPWW99	EryBII	2,4	+++
BII92	<i>eryBII</i>	pPWW101	His-tag-EryBII (C-term.)	2,0	++
335	<i>eryBIII</i>	pAL201	–	1,5	–
335	<i>eryBIII</i>	pPWW100	EryBIII	1,7	–
335	<i>eryBIII</i>	pPWW102	His-tag-EryBIII (C-term.)	1,9	+++
BIV87	<i>eryBIV</i>	pAL201	–	1,6	+
BIV87	<i>eryBIV</i>	pPWW98	EryBIV	2,1	++
BIV87	<i>eryBIV</i>	pPWW60	His-tag-EryBIV (N-term.)	2,1	+++
53M1	<i>eryBVI</i>	pAL201	–	–	–
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW42-s	His-tag-EryBVI kurz (N-term.)	2,6	/
53M1	<i>eryBVI</i>	PPWW42-l	His-tag-EryBVI lang (N-term.)	2,6	/
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW42-v	EryBVI N-term. verkürzt	–	/
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW72-s	His-tag-EryBVI (C-term.)	2,8	/
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW75	DnmT	2,6	++
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW74	His-tag-DnmT (N-term.)	2,6	++
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW108	TylCVI	2,4	++
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW109	TylCVI	–	/
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW73	TylCVI N-terminal verkürzt	–	/
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW103	MidL	1,6	+
53M1	<i>eryBVI</i>	pPWW104	MidL	–	/
BVII98	<i>eryBVII</i>	pAL201	–	2,0	+
BVII98	<i>eryBVII</i>	pPWW78	EryBVII	2,7	+++
BVII98	<i>eryBVII</i>	pPWW70	DnmU	2,8	++
BVII98	<i>eryBVII</i>	pPWW71	His-tag DnmU (N-term.)	2,8	+++

m/z 756,4: [EryA+Na⁺]⁺; m/z 734,3: [EryA+H⁺]⁺; –: nicht vorhanden; +: nachweisbar; ++: intensives Signal; +++: intensivstes Signal des Spektrums; /: nicht durchgeführt

Die Expressionsplasmide enthielten alle den für die Replikation in *Sac. erythraea* geeigneten Replikationsursprung des Plasmids pJV1 (Bailey et al 1986). Dennoch war in vielen Fällen eine Reisolierung der für die Komplementation verwendeten Plasmide nach einigen Sporulationszyklen in für weitere Analysen ausreichenden Mengen nicht möglich.

Einige der *eryB*-Mutanten (BII92, BIV87 und BVII98) produzierten bioaktive Substanzen, die zur Bildung von Hemmhöfen führten. Außerdem waren bei der massenspektrometrischen Analyse der Kulturüberstände dieser Mutanten Produkte nachweisbar, deren Molekulargewichte (734,3 [EryA+H⁺]⁺; 756,4: [EryA+Na⁺]⁺) und deren Fragmentspektren denen von Erythromycin A entsprachen. Zur Beurteilung, ob die Komplementationen erfolgreich waren, mußten deshalb die relativen Signalintensitäten in den Massenspektren der Kulturüberstände vergleichbarer Mutanten-Stämmen mit unterschiedlichen Plasmiden miteinander verglichen werden. Die Größen der Hemmhöfe in den Bioassays aller komplementierten Mutanten waren immer kleiner als beim Wildstamm *Sac. erythraea* NRRL 2338. Die *eryBII*-Mutante BII92 und die *eryBIV*-Mutante BIV87 ließen sich sowohl durch Plasmide, die die Gene für die jeweiligen nativen Proteine und für die mit His-tag versehenen Proteine enthielten, komplementieren. Die *eryBIII*-Mutante 335 ließ sich nur durch das Plasmid pPWW102, das die genetische Information für das C-terminale His-tag-EryBIII trug, und nicht durch das Plasmid pPWW100, auf dem das Gen für das native EryBIII lokalisiert war, komplementieren. Die kurze Variante von EryBVI (vgl. Abb. 1-9), sowohl mit N-terminalem als auch mit C-terminalem His-tag versehen, komplementierte die *eryBVI*-Mutante 53M1 genauso wie die längere Version des Proteins. Die kurze Version des Proteins EryBVI ist demnach für seine enzymatische Aktivität ausreichend. Die zu EryBVI homologen Proteine DnmT, TylCVI und MidL komplementierten die Mutante 53M1 ebenfalls. Die Gene *tylCVI* und *midL* wurden jeweils in beiden möglichen Orientierungen mit ihrem natürlichen *upstream*-Bereich in das Plasmid pAL201 ligiert. Hierbei zeigte sich in beiden Fällen, daß eine Komplementation der *eryBVI*-Mutante nur dann möglich war, wenn der Promotor P_{ermE*} des Plasmids in gleicher Orientierung angeordnet war wie das jeweilige zur Komplementation verwendete Gen (pPWW108 und pPWW103).

Da der von Bate et al. (1999 und 2000) angegebene Startpunkt des Gens *tylCVI* von dem in dieser Arbeit angenommenen Startpunkt (Anhang 13), der 60 Nukleotide *upstream* liegt, abweicht, wurde mit Hilfe des Expressionsplasmids pPWW73 getestet, ob die kürzere Version des Proteins zur Komplementation ausreicht. Die durch das Plasmid pPWW73 exprimierte Version des Proteins TylCVI konnte die *eryBVI*-Mutante 53M1 nicht komplementieren.

3.6 Enzymtests

3.6.1 Partielle Reinigung von His-tag-DnmU

Zur enzymatischen Charakterisierung des His-tag-DnmU-Proteins wurde das in *E. coli* produzierte Protein partiell gereinigt. Hierzu wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Zum einen wurde das mit His-tag versehene Protein mittels Ni-NTA-Agarose im Batch-Verfahren (s. 2.15) gereinigt, zum anderen wurde das Protein über Q-Sepharose-Säulenchromatographie (s. 2.16) angereichert. Die hierbei erhaltenen Fraktionen wurden zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität eingesetzt.

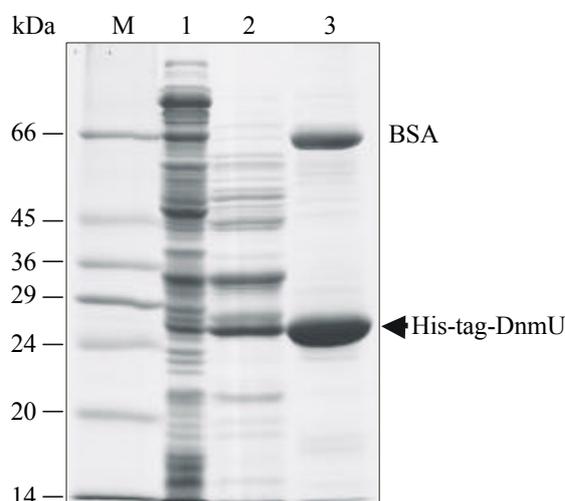


Abb. 3-42: Partielle Reinigung von His-tag-DnmU. SDS-PAGE-Analyse von in *E. coli* produziertem His-tag-DnmU. Spur 1: Gesamtzellextrakt, Spur 2: nach Q-Sepharose-Säulenchromatographie und Spur 3: nach Reinigung mit Ni-NTA-Agarose im Batch-Verfahren. Pro Spur wurden jeweils ca. 50 µg Gesamtprotein auf ein 12%iges Trenngel aufgetragen. M: Molekulargewichtsstandard; die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

3.6.2 Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit Enzymen des L-Mycarose-Biosynthesewegs

Da die Reihenfolge der einzelnen Schritte der Biosynthese von dTDP-L-Mycarose ausgehend von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose bisher noch nicht aufgeklärt worden war (vgl. 1.5.4), wurde das Substrat dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit den an der Biosynthese beteiligten Enzymen und den Cofaktoren NADPH und SAM inkubiert (s. 2.17.1). Hierbei wurden die in *E. coli* produzierten mit His-tag versehenen Proteine in Form von zellfreien Extrakten und über Ni-NTA-Agarose gereinigt in allen möglichen Permutationen eingesetzt, da sich alle His-tag-Proteine in den Komplementationsversuchen (vgl. 3.5) als aktiv erwiesen hatten.

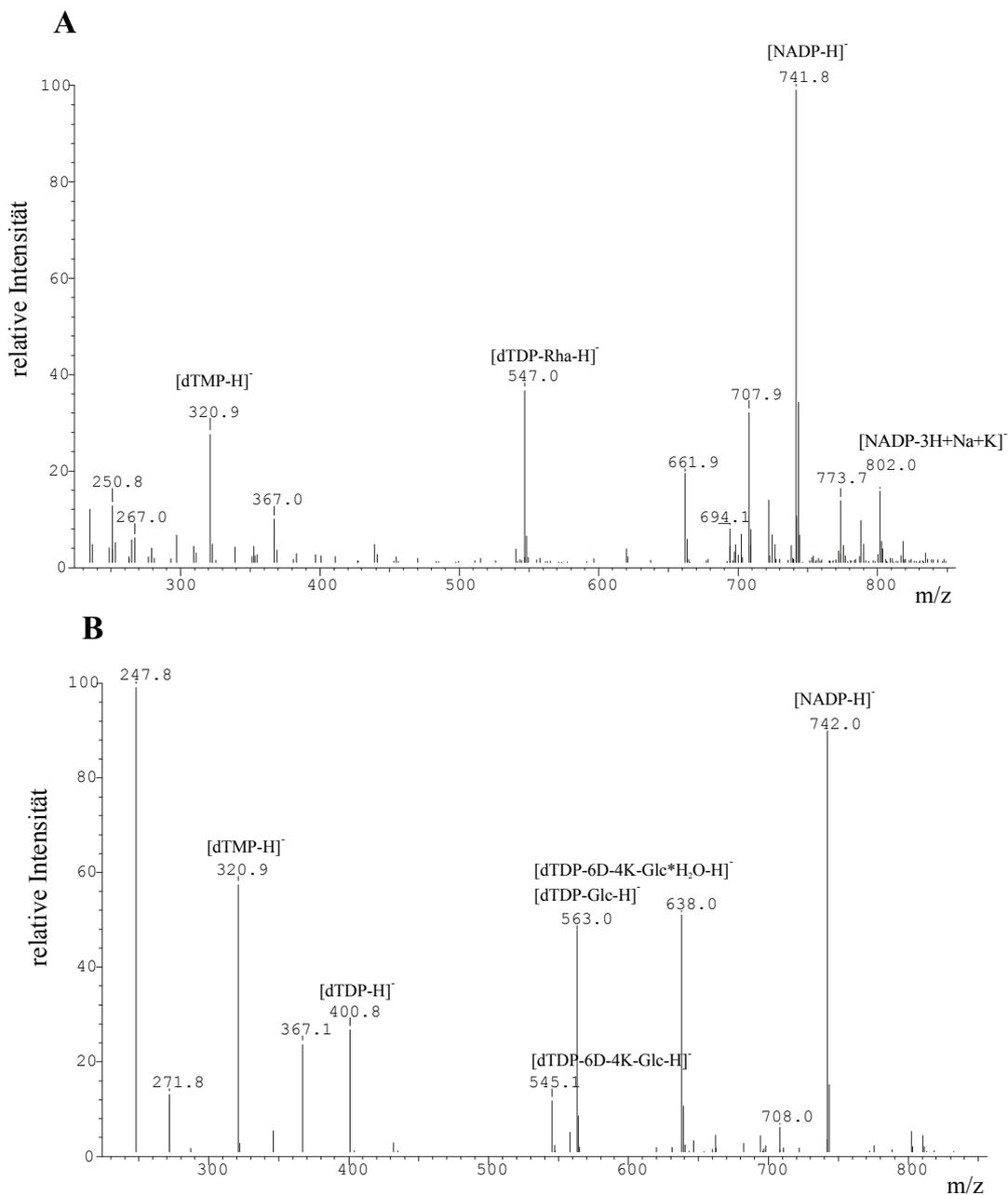


Abb. 3-43: ESI-MS-Spektren der Enzymtestansätze mit A: zellfreien Extrakten aus *E. coli* und B: über Ni-NTA-Agarose gereinigenden Proteinen. Die Signale, die Bestandteilen der Enzymtests bzw. ihren Produkten oder Zersetzungsprodukten zugeordnet wurden, sind beschriftet.

Anstelle von EryBVII wurden His-tag-DnmU und gereinigtes RmlC (*Sal. Enterica*; nativ; Günther, IET, FZ-Jülich) verwendet. His-tag-EryBVI und His-tag-DnmT wurden als alternative 2,3-Dehydratasen eingesetzt. Die Testansätze wurden mittels HPLC (s. 2.18), FPLC (s. 2.19) und LC-MS (s. 2.20) analysiert. Hierbei stellte sich heraus, daß die Hintergrundaktivitäten von RmlC und RmlD aus *E. coli* dazu führten, daß in allen Testansätzen, in denen zellfreie Extrakte der zur Expression verwendeten *E. coli*-Stämme eingesetzt wurden, das Substrat dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose verbraucht und in dTDP-L-Rhamnose umgewandelt wurde. Zwischenprodukte der dTDP-L-Mycarose-Biosynthese konnten nicht detektiert werden

(vgl. Abb. 3-43 A). Wurden jedoch die über Ni-NTA-Agarose gereinigten His-tag-Proteine für die Enzymtestansätze verwendet, so fand keine Reaktion statt. Neben der dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose konnten nur ihre Zersetzungsprodukte und NADPH detektiert werden (vgl. Abb. 3-43 B).

In weiteren Assays wurde dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit His-tag-DnmU, das über Ni-NTA-Agarose gereinigt worden war (s. 3.6.1), gereinigtem RmlD und NADPH inkubiert. Die eingesetzte dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose wurde von den beiden Proteinen bei Anwesenheit des Cofaktors NADPH zu dTDP-L-Rhamnose umgesetzt (Abb. 3-44). In einem Kontrollversuch wurde anstelle von über Ni-NTA-Agarose gereinigtem His-tag-DnmU ein Proteinextrakt von *E. coli* BL21 (DE3)/pET16b eingesetzt, welcher der gleichen Behandlung mit Ni-NTA-Agarose unterzogen worden war. Es fand keinerlei Reaktion statt, so daß gezeigt werden konnte, daß die *E. coli*-Proteine, die für die Hintergrundaktivitäten verantwortlich waren, durch die Reinigung abgetrennt worden waren

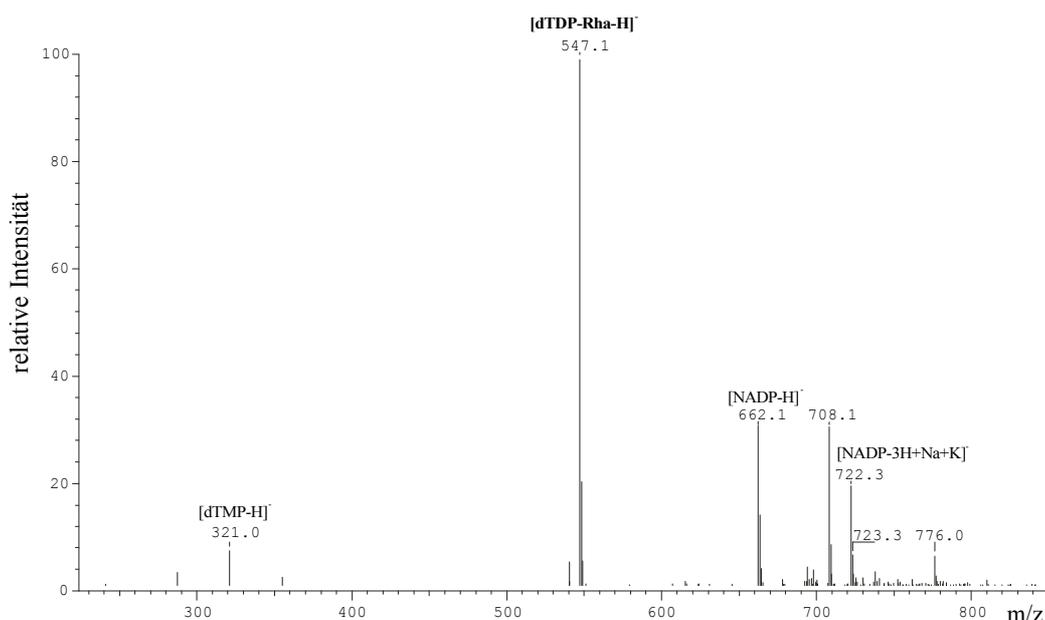


Abb. 3-44: ESI-MS-Spektrum der Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit His-tag-DnmU, das über Ni-NTA-Agarose gereinigt wurde, und RmlD (gereinigt) zu dTDP-L-Rhamnose. Das Edukt war bereits nach 30 min komplett verbraucht.

Zum Nachweis, daß es sich bei dem in den MS-Spektren nachgewiesenen Signal des Molekulargewichts von 547 Da um dTDP-L-Rhamnose handelt, wurde ein Fragmentspektrum der Verbindung aufgezeichnet und mit dem Fragmentspektrum der strukturell ähnlichen Verbindung dTDP-D-Glucose verglichen (Abb. 3-45). Der Massenfingerprint beider Substanzen zeigte aufgrund seiner Ähnlichkeit, daß sie der gleichen Substanzklasse angehörten. Die Massendifferenz von 16 Da zwischen den Fragmenten, die die Hexosekomponente enthielten, deutete darauf hin, daß sich die beiden Hexosen um ein Sauerstoffatom unterschieden.

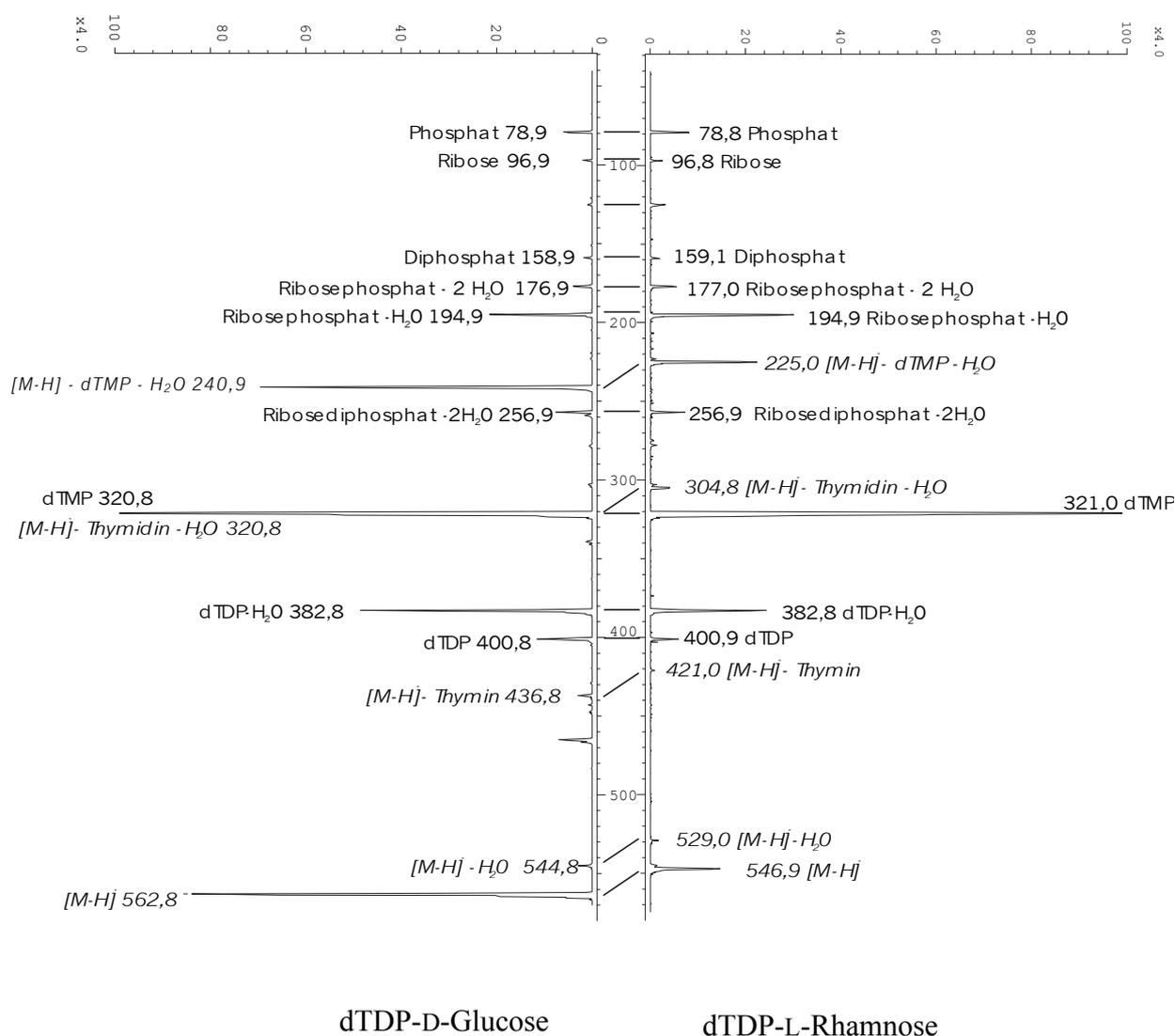


Abb. 3-45: Vergleich ESI-MS/MS-Spektren von dTDP-D-Glucose und dTDP-L-Rhamnose aus der Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit His-tag-DnmU, das über Ni-NTA-Agarose gereinigt wurde und RmlC (gereinigt). Fragmente, die dem dTDP-Teil der dTDP-aktivierten Hexosen zugeordnet wurden, sind aufrecht, Fragmente, die den Hexose-Anteil entalten sollten, kursiv beschriftet. Die Massendifferenz zwischen den Fragmenten von dTDP-D-Glucose, die Glucose enthielten, und den Fragmenten von dTDP-L-Rhamnose, die L-Rhamnose enthielten, betrug 16 Da.

3.6.3 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität von His-tag-DnmU

Da sich das Protein His-tag-DnmU als aktiv erwiesen hatte (vgl. 3.6.2), wurde seine spezifische Enzymaktivität mit einem von Verseck (1997) entwickelten gekoppelten Testsystem ermittelt (Abb. 3-46). dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose wurde zunächst einer Epimerisierung durch die 3,5-Epimerase RmlC unterworfen. Anschließend wurde das Produkt dTDP-4-Keto-L-Rhamnose durch die dTDP-L-Rhamnose Synthase RmlD unter Verbrauch von NADPH

reduziert. Der Nachweis dieser beiden Reaktionsschritte erfolgte photometrisch über Messung des Verbrauchs an NADPH.

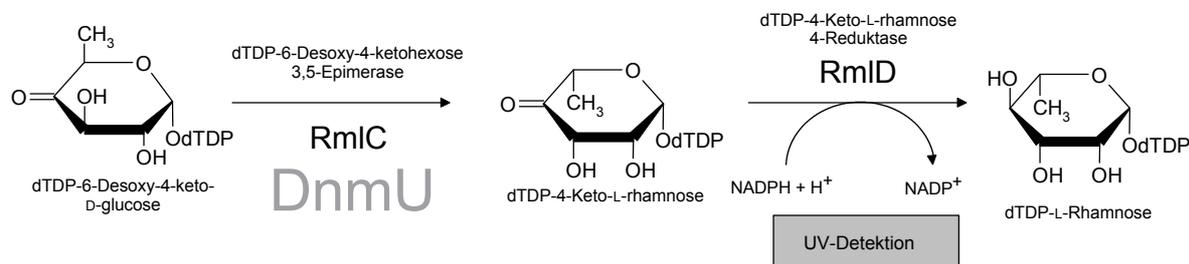


Abb. 3-46: Testsystem zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von DnmU

Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität von His-tag-DnmU wurde im vorliegenden Testsystem das Protein RmlC durch His-tag-DnmU ausgetauscht (s. 2.17.2). Die ermittelten spezifischen Aktivitäten sind in der Tabelle 3-5 aufgelistet.

Tab. 3-5: Ergebnisse der Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivitäten von His-tag-DnmU

Quelle von His-tag-DnmU	Spezifische Enzymaktivitäten:
zellfreier Extrakt von <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pPWW89	42,7 ± 4,2 mU/mg
zellfreier Extrakt von <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET16b	14,4 ± 1,6 mU/mg
His-tag-DnmU (aufgereinigt im Batch-Verfahren mit Ni-NTA-Agarose)	172 ± 16 mU/mg
His-tag-DnmU (angereichert durch Q-Sepharose Säulen-Chromatographie)	73,5 ± 4,4 mU/mg

3.6.4 ¹H-NMR-Spektroskopische Untersuchung des Reaktionsproduktes

Um die Frage zu klären, ob es sich beim Protein DnmU um eine 3,5- oder um eine 5-Epimerase handelte, wurden vom Produkt der präparativen Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit DnmU und RmlD sowie von der dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose ¹H-NMR-Spektren (400 MHz, D₂O) gemessen (Tab. 3-6). Die ¹H-NMR-Spektren wurden an einem Bruker ARX 400 NMR-Spektrometer aufgezeichnet.

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte eindeutig, daß bei der Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit DnmU und RmlD dTDP-L-Rhamnose gebildet wurde. Charakteristisch für die dTDP-L-Rhamnose waren die relativ großen Kopplungskonstanten von jeweils 9,5 Hz der vicinalen Protonen H-3'' und H-4'' und der vicinalen Protonen H-4'' und H-5'', da sich diese Protonen in einer axial-axial-Orientierung befanden. Die Kopplungskonstante von 3,3 Hz spiegelte die equatorial-axial-Orientierung von H-2'' und H-3'' wider. Die β -Konfiguration der L-Rhamnose am anomeren Zentrum wurde durch die vicinale Kopplungskonstante $^3J_{H-1'', H-2''} = 0$ Hz und die Heterokopplungskonstante von $^3J_{H-1'', P} = 8,6$ Hz belegt. Darüber hinaus betrug die

chemische Verschiebung des axialen H-1'' der dTDP-L-Rhamnose 5,21 ppm gegenüber 5,55 ppm des equatorialen H-1'' der dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose. Die erhaltenen ¹H-NMR-Spektren standen so in Übereinstimmung mit den früher beschriebenen Spektren (Stein et al. 1995; Verseck 1997).

Tab. 3-6: ¹H-NMR-Daten von dTDP-L-Rhamnose und dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben, in Klammern dahinter sind die Multiplizität und die Kopplungskonstante in Hz aufgelistet.

Position	dTDP-L-Rhamnose	dTDP-4-keto-6-desoxy-D-glucose
6	7,73 (d, 1.0 Hz)	7,75 (d, 1.1 Hz)
5-CH ₃	1.92 (s)	1.93 (s)
1'	6.34 (t, 6.7 Hz)	6.34 (t, 7.0 Hz)
2'-CH ₂	2.36 (m)	2.36 (m)
3'	4.62 (m)	4.62 (m)
4', 5'-CH ₂	4.18 (m)	4.18 (m)
1''	5.21 (br d, 8.6 Hz)	5.55 (dd, 7.0, 3.6 Hz)
2''	4.08 (br d, 3.3 Hz)	3.61 (ddd, 10.0, 3.6, 3.4 Hz)
3''	3.64 (dd, 9.5, 3.3 Hz)	3.78 (d, 10.0 Hz)
4''	3.37 (t, 9.5 Hz)	-
5''	3.44 (dq, 9.5, 5.9 Hz)	4.09 (q, 6.6 Hz)
6''	1.30 (d, 5.9 Hz)	1.22 (d, 6.6 Hz)

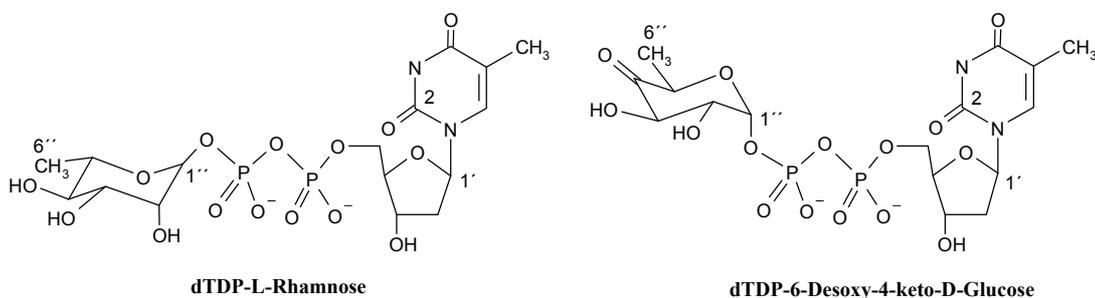


Abb. 3-47: Chemische Strukturen von dTDP-L-Rhamnose und dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose

4. Diskussion

Die Desoxyhexosen sind ein biologisch bedeutender funktioneller Bestandteil antibiotisch wirksamer Sekundärmetabolite. Die Aufklärung der Biosynthesewege der Desoxyhexosen ist daher von grundlegendem Interesse. Die zunehmende Antibiotikaresistenz pathogener Keime, z. B. gegen die Desoxyhexose-haltigen Therapeutika Erythromycin (Makrolid) und Vancomycin (Glycopeptid) und das Auftreten neuer Infektionskrankheiten machen die Entwicklung und den Einsatz neuer Antibiotika oder verbesserter Formen der bereits etablierten Wirkstoffe dringend notwendig. Neben der Suche nach neuen Naturstoffen und der chemischen Modifikation bekannter Substanzen ist der Einsatz der Biokombinatorik zur Herstellung von Hybridantibiotika, z. B. durch Variation der 6-Desoxyhexose-Komponenten ein erfolversprechender Ansatz (Piepersberg 1994; Hutchinson 1998). Die Makrolide sind hier ein besonders naheliegendes Beispiel.

Die vorliegende Arbeit befaßte sich dementsprechend mit dem Biosyntheseweg der 2,6-Didesoxyhexose dTDP-L-Mycarose des Erythromycin A-Produzenten *Sac. erythraea* NRRL 2338. Hauptziel war dabei, die bisher noch unbekannte Zuordnung und Abfolge der Biosyntheseschritte bzw. die noch unbekannte Enzymologie der postulierten Beteiligung einer 2,3-Dehydratase (z. B. EryBVI, DnmT ?), 2,3-Reduktase (EryBII ?), 3,(5)-Epimerase (EryBVII, DnmU ?), 3-C-Methyltransferase (EryBIII ?) und 4-Ketoreduktase (EryBIV ?) einer Klärung näher zu bringen. Ein wesentlicher Schritt in diese Richtung mußte die Bereitstellung der individuellen und aktiven (möglichst auch gereinigten) Einzelproteine durch heterologe Expression sein.

4.1 Jedes Gen benötigt individuell optimierte Expressionsbedingungen

Für die heterologe Genexpression eines Proteins ist eindeutig *E. coli* der prokaryontische Organismus der Wahl (Hannig und Makrides 1998; Makrides 1996). Diese Dominanz ist bedingt durch das profunde Wissen über das genetische und biochemische System dieses Organismus, das in den vergangenen Jahrzehnten durch seine Verwendung in Industrie und Forschung erlangt wurde (Binnie et al. 1997). Trotz vieler Vorteile ist die effiziente Expression von unterschiedlichen Genen in *E. coli* dennoch kein Routineverfahren, da die einzigartigen strukturellen Eigenschaften unterschiedlicher Gene und ihrer mRNA die Anwendung einer generellen Expressionsmethode ausschließen (Hannig und Makrides 1998). Die Expression der *eryB*-Gene sowie der zwei *eryBVII* und *eryBVI* entsprechenden Gene *dnmU* und *dnmT* in *E. coli* zeigten dies sehr deutlich. Für die Produktion von löslichem Protein in *E. coli* mußten in jedem einzelnen Fall das Expressionssystem und die Kultivierungsbedingungen individuell angepaßt werden (vgl. 3.2). Hierbei traten im Einzelfall zwei Hauptprobleme auf: (1) die

Bildung von unlöslichen Protein-Aggregaten (*inclusion bodies*) und (2) eine z. T. zu geringe Menge an produzierten Proteinen, die sich z. B. in einem PAA-Gel nicht als zusätzliche Bande detektieren ließen. Bei Verwendung der Vektoren pET11a/d und pET16b, die den starken Promotor $P_{T7\Phi10}$ enthalten (Studier et al. 1990), war keines der im Rahmen dieser Arbeit produzierten Proteine löslich, wenn die Expression bei 37 °C durchgeführt wurde.

Die Bildung von *Inclusion Bodies* ist ein sehr häufig auftretendes Problem bei der *high-level* Produktion von Proteinen im Cytoplasma von *E. coli* (Ptitsyn 1996). Gemeinsame generelle Charakteristika von rekombinanten Proteinen wie beispielsweise ihr Aufbau aus Untereinheiten, ihre Aminosäurekomposition, ihre Größe oder ihre Hydrophobizität, die zur Bildung von unlöslichen Aggregaten führen, konnten bislang nicht identifiziert werden (Kane und Hartley 1991; Wilkinson und Harrison 1991). Eine Reihe von Strategien für die Genexpression wurden zur Vermeidung der Bildung der *Inclusion Bodies* beschrieben. Hierzu zählen das Senken der Fermentationstemperatur, eine osmotische Druckerhöhung mittels Zusatz von nicht verstoffwechselbaren Substanzen im Medium, Veränderungen des pH-Wertes im Medium, die Verwendung von gut löslichen Polypeptiden als Fusionspartner und die Coexpression von Chaperonen (Schein und Noteborn 1988; Schein 1989; Olins und Lee 1993; Lorimer 1996; Markrides 1996; Hannig und Markrides 1998). Viele dieser Maßnahmen führen zur Verlangsamung des Wachstums, so daß auch die Translation und die Proteinfaltung verlangsamt werden.

Durch Erniedrigung der Kultivierungstemperatur konnte die Löslichkeit der in *E. coli* produzierten und bei 37 °C zum größten Teil als Einschlußverbindungen vorliegenden Proteine, EryBIV, His-tag-EryBIV, EryBVI, His-tag-EryBVI, DnmU, His-tag-DnmU und His-tag-DnmT, deutlich erhöht werden (vgl. 3.2). Die osmotische Druckerhöhung durch den Zusatz von Sorbitol und Betain im Kulturmedium (Blackwell und Horgan 1991) hatte einen sehr deutlichen Einfluß auf die Löslichkeit der in *E. coli* produzierten Proteine His-tag-EryBII, His-tag-EryBIV, His-tag-EryBVI, His-tag-DnmU und His-tag-DnmT. Zusätzlich waren die produzierten Proteinmengen größer als bei der Verwendung anderer Medien. Der positive Effekt, den der Zusatz von Sorbitol und Betain häufig bewirken, ist von den spezifischen Eigenschaften des Proteins abhängig. Auf die Bildung von Einschlußverbindungen bei der Produktion von His-tag-EryBVII hatte die Verwendung von Sorbitol und Betain im Kulturmedium beispielsweise keinerlei Einfluß. Auf die Löslichkeit von StrB1 hatte die Coexpression der Chaperone *groES* und *groEL* aus *S. griseus* mit *strB1* einen positiven Effekt (Pöhling 1997). Im Gegensatz dazu wurde EryBVI unter den gleichen Bedingungen nicht als lösliches Protein produziert. Die positive Wirkung der Coexpressionsstrategie ist proteinspezifisch (Hannig und Makrides 1998).

Die Verwendung von schwächeren Promotoren kann ebenfalls die Bildung von Protein-Aggregaten verringern (Wilms et al. 1999). Deshalb wurden für die Expressionsversuche neben

Vektoren mit den IPTG-induzierbaren Promotoren $P_{T7\Phi10}$ (Giordano et al. 1989; Dubendorff und Studier 1991) und P_{T5} (Bujard et al. 1987) auch Vektoren mit dem Streß-induzierbaren Promotor P_{ptr} (Salah-Bey et al. 1995), dem Promotor P_{trc} (Brosius et al. 1985) und dem L-Rhamnose-induzierbaren Promotor P_{rhaBAD} (Egan und Schleif 1993) verwendet. Oftmals waren die produzierten Proteinmengen jedoch so gering, daß sie auf gefärbten Gelen nicht detektierbar waren. Erst die Verwendung von Antikörpern gegen mit His-tag fusionierte Proteine zeigte, daß eine Expression stattgefunden hatte.

Durch die sorgfältige Erprobung verschiedener *E. coli*-Expressionssysteme und Bedingungen wurden bis auf EryBVII alle am dTDP-L-Mycarose-Biosyntheseweg beteiligten Proteine aus *Sac. erythraea* sowie die EryBVII bzw. EryBVI homologen Proteine DnmU und DnmT aus *S. peucetius* in löslicher Form und mit His-tag in *E. coli* produziert. Die nativen Proteine EryBIV und DnmU wurden ebenfalls in sichtbarem Umfang überproduziert, während EryBII, EryBIII und EryBVII in nativer Form nicht nachweisbar waren. Da die His-tag-Proteine häufig auch nicht im gefärbten Gel, sondern nur durch nachfolgende Western-Blot-Analyse detektierbar waren, ist anzunehmen, daß auch die nicht detektierbaren nativen Proteine, zumindest zum Teil, in geringen Mengen in *E. coli* produziert wurden.

Neben *E. coli* eignet sich *S. lividans* besonders gut für die Expression heterologer Streptomyceten-Gene (Gilbert et al. 1995), da in diesem Wirtssystem die für Streptomyceten charakteristische Codonverwendung und der hohe GC-Gehalt (Wright und Bibb 1992) kein Hindernis darstellen. Da *S. lividans* kein Endonuclease-Restriktionssystem besitzt (Kieser und Hopwood 1991), wird dieser Streptomyceten-Wirt besonders häufig zur Expression heterologer Gene verwendet, denn die notwendigen Plasmide können in *E. coli* kloniert und anschließend in *S. lividans* transformiert werden (Anné und Mellaert 1993). Außerdem kommt es in der Regel nicht zur Ausbildung von unlöslichen Protein-Aggregaten. Für die Genexpression in *S. lividans* werden unter anderem der konstitutive Promotor P_{ermE^*} aus *Sac. erythraea* (Bibb et al. 1985a), der konstitutive Promotor P_{aph} aus *S. fradiae* (Thompson und Gray 1983), der Thiostrepton-induzierbare Promotor P_{tipA} aus *S. azureus* (Murakami et al. 1989), der Streß-induzierbare Promotor P_{ptr} aus *S. pristinaspiralis* (Salah-Bey et al. 1995) oder die jeweils eigenen Promotoren der zu exprimierenden Gene verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Promotor P_{ptr} und dem Promotor P_{tipA} hauptsächlich der Promotor P_{ermE^*} verwendet. Die verwendete Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) als Ort der Initiation der Translation war ein weiterer kritischer Faktor für die Produktion eines Proteins. Am Beispiel der Expressionen von *eryBII* und *eryBIII* in *S. lividans* unter Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} zeigte sich, daß bei Verwendung der SD-Sequenz aus pQE60 gute Resultate erzielt werden können (vgl. 3.2). Ein Vergleich der Sequenz des 3'-Endes der 16S rRNA von *S. lividans* mit verschiedenen SD-Sequenzen von Expressionsvektoren (vgl. 3.1) zeigte, daß die entsprechende DNA-Sequenz von pQE60 besonders gut mit der von Strohl (1992) ermittelten Konsensus-Sequenz

übereinstimmt und daß der Abstand der SD-Sequenz zum Startcodon der Translation mit neun Nucleotiden dem Durchschnitt von 8,5 Nucleotiden sehr nahe kommt. Auf dieser Grundlage wurden aufbauend auf dem von Wehmeier entwickelten Plasmid pUWL201 (Doumith et al. 2000) die Shuttlevektoren pUWL201RBS und pUWL201PW konstruiert (vgl. 3.1), die ein für die Genexpression in Streptomycceten optimiertes Motiv der Ribosomenbindestelle aufweisen. Der Vorteil, den die SD-Sequenz RBSAII aus pUWL201PW gegenüber der SD-Sequenz aus pET11a bietet, konnte anhand der Expression des Gens *eryBIV* demonstriert werden (vgl. 3.2.3.2). Bei Verwendung von RBSAII und Klonierung des Startcodons von *eryBIV* in die *NdeI*-Restriktionsschnittstelle von pUWL201PW, die sich theoretisch in optimalem Abstand zur SD-Sequenz befindet, konnte die Menge an produziertem EryBIV, verglichen mit der produzierten Menge an EryBIV bei Verwendung der SD-Sequenz von pET11a, deutlich gesteigert werden.

Ein Nachteil der heterologen Genexpression in *S. lividans* ist die häufig relativ zu *E. coli* geringe Menge an produziertem Genprodukt (Brawner et al. 1991). Neben schwachen Promotoren und suboptimaler Translation können hierfür auch eine Reihe von Proteasen verantwortlich sein, die von Streptomycceten produziert werden (Aretz et al. 1989) und deren Anwesenheit sich in der geringen Halbwertszeit der heterolog produzierten Proteine bemerkbar macht (Brawner 1994). Die geringen Mengen an produzierten Proteinen sind wahrscheinlich der Grund dafür, daß einige der in *S. lividans* produzierten nativen EryB-Proteine im zellfreien Extrakt des entsprechenden *S. lividans*-Stammes nicht als sichtbare Bande auf gefärbten Gelen detektierbar waren (vgl. Tab. 3-1). Einerseits muß auch berücksichtigt werden, daß bei der großen Zahl der von Streptomycceten exprimierbaren Gene und der wegen des wesentlich langsameren Wachstums auch geringeren Translationsrate jede in Streptomycceten-Proteinextrakten erkennbare zusätzliche Bande eine deutliche Überexpression darstellt. Andererseits sind generell starke Promotoren und Induktionssysteme (wie z. B. das $P_{T7\Phi 10}/lacI$ -System für *E. coli*) für Streptomycceten noch nicht verfügbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten durch Erprobung verschiedener Expressionssysteme und Bedingungen bis auf EryBVII alle am dTDP-L-Mycarose-Biosyntheseweg von *Sac. erythraea* beteiligten Proteine sowie die zu EryBVII bzw. EryBVI homologen Proteine DnmU und DnmT aus *S. peucetius* als native und/oder mit His-tag fusionierte Proteine in *S. lividans* produziert werden. *S. lividans* besitzt die Fähigkeit zur Produktion großer Mengen extrazellulärer Proteine (Strickler et al. 1992). Diese Fähigkeit wurde bereits für die Produktion und Sekretion zahlreicher heterologer Proteine ausgenutzt (Anné und Mellaert 1993, Binnie et al. 1997). Da heterolog produzierte Proteine im Kulturmedium aufgrund der im Vergleich zum intrazellulären Raum deutlich geringeren Konzentration an Wirtsproteinen leichter zu detektieren, einfacher zu isolieren und zu reinigen sind, wäre auch der Export der EryB-Proteine und ihrer Homologen eine sinnvolle Alternative zur der in dieser Arbeit

durchgeführten heterologen Produktion im Cytoplasma. Zu berücksichtigen sind in diesem Fall das im Medium im Vergleich zum Cytoplasma unterschiedliche Redoxpotential und der mögliche Abbau der sekretierten Proteine durch extrazelluläre Proteasen. Für die Sekretion ins Kulturmedium müßten die Proteine mit einem für *S. lividans* geeigneten Signalpeptid versehen werden (Gilbert et al. 1995).

4.2 TylCVI und MidL gehören zur Familie der 2,3-Dehydratasen

Da insbesondere die 2,3-Dehydratasen als instabil gelten (Draeger et al. 1999), war es besonders notwendig, von den Genen bzw. Enzymen der 2,3-Dehydratase-Familie alternative Quellen zu erschließen. Eine alternative Quelle stellt das Gen *tylCVI* aus *S. fradiae* T59-235 dar, das im Rahmen dieser Arbeit identifiziert, kloniert und sequenziert wurde. Eine weitere Alternative ist das Gen *midL* aus dem Midecamycin-Gencluster von *S. mycarofaciens*, das für die 2,3-Dehydratase MidL kodiert. TylCVI besitzt die größte Sequenzidentität von 53,9 % über den gesamten Sequenzbereich zu MidL.

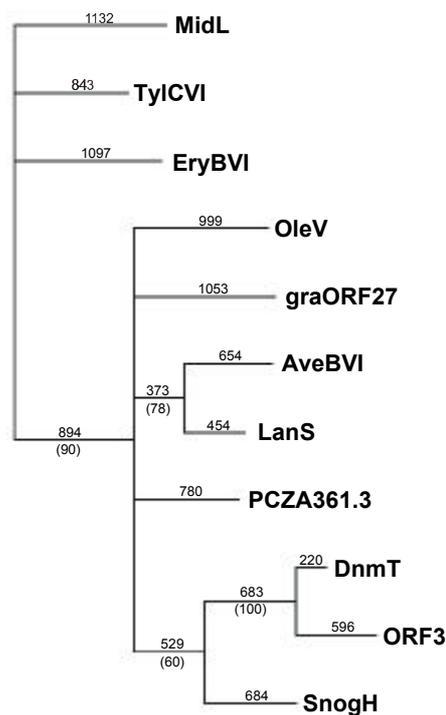


Abb. 4-1: Phylogenetischer Baum der potentiellen 2,3-Dehydratasen. Das Phylogramm wurde mit Hilfe des Programms PAUP 3.1 erstellt. Die Zahlen geben die errechneten Längen der Äste an, die Zahlen in Klammern die Wahrscheinlichkeit in %, daß ein Knoten beim Bootstrapping (500 Mal) auftrat. Das in Anhang 15 dargestellte Alignment war Grundlage für die Berechnung. Die verwendeten Sequenzen sind: MidL aus *S. mycarofaciens*, TylCVI aus *S. fradiae* (Acc. No. AF210634), EryBVI aus *Sac. erythraea* (Acc. No. Y11199), OleV aus *S. antibioticus* (Acc. No. AF055579), gra-ORF27 aus *S. violaceoruber* (Acc. No. AJ011500), AveBVI aus *S. avermitilis* (Acc. No. AB032523), LanS aus *S. cyanogenus* (Acc. No. AF080235), das hypothetische Protein PCZA361.3 aus *Amycolatopsis orientalis* (Acc. No. AJ223998), DnmT aus *S. peuceetius* (Acc. No. U77891), ORF3 aus *Streptomyces* sp. C5 (Acc. No. U43704) und SnogH aus *S. nogalater* (Acc. No. AJ224512).

Da Tylosin und Midecamycin strukturell sehr eng verwandte 16-gliedrige Makrolidantibiotika sind (vgl. Abb. 1-2), und auch die beiden Gencluster, soweit bekannt, größere Ähnlichkeiten untereinander als beispielsweise zu denjenigen für die Makrolide Erythromycin A aus *Sac. erythraea* (vgl. Abb. 1-6) und Oleandomycin aus *S. antibioticus* (Aguirrezabalaga et al. 2000) aufweisen, könnte dies eine evolutionär engere Verwandtschaft der entsprechenden Einzelgene begründen. Wahrscheinlich wurden die nicht-taxonomisch verbreiteten Makrolid-Biosynthesecluster größtenteils immer als Ganzes horizontal übertragen. Es sind aber auch Abweichungen von diesem Genverbreitungsmuster bekannt (z. B. im *ole*-, *ery*- und *mid*-Cluster aus *S. antibioticus*, *Sac. erythraea* bzw. *S. mycarofaciens*; vgl. Cong 2000). Wie der phylogenetische Baum der Enzymfamilie der 2,3-Dehydratasen zeigt (Abb. 4-1), bilden die Proteine TylCVI, MidL und EryBVI eine Gruppe dieser Enzymfamilie, die sich von den anderen Proteinen der Enzymfamilie abhebt. Die 2,3-Dehydratase EryBVI aus *Sac. erythraea* besitzt demnach einen größeren Verwandtschaftsgrad zu den 2,3-Dehydratasen MidL und TylCVI aus *S. mycarofaciens* bzw. *S. fradiae*, den Produzenten der 16-gliedrigen Makrolide, als zu OleV, aus *S. antibioticus*, dem Produzenten des 14-gliedrigen Makrolids Oleandomycin.

4.3 Homologe Rekombination erzeugte *eryBVI*-Substitutionsmutanten

Um die Funktionalität verschiedener Expressionsprodukte von *eryBVI* (insbesondere mit His-tag) sowie die Funktionalität der zum Protein EryBVI homologen Proteine DnmT, TylCVI und MidL testen zu können, wurden *eryBVI*-Substitutionsmutanten erzeugt. Die *eryBVI*-Mutanten reicherten das für *eryB*-Mutanten charakteristische Zwischenprodukt Erythronolid B (EB) an (vgl. Gaisser et al. 1997; Summers et al. 1997; Gaisser et al. 1998; Salah-Bey et al. 1998; vgl. 3.4.3). Dies zeigt, daß die Biosynthese des Makrolidgrundgerüsts bis einschließlich zum Erythronolid B normal stattfand und daß aufgrund der blockierten Biosynthese der dTDP-L-Mycarose seine Anknüpfung an das Makrolacton nicht möglich war. Für die weiteren Enzyme der Erythromycin A-Biosynthese, die Desosaminyltransferase EryCIII, die C-12-Hydroxylase EryK und die O-Methyltransferase EryG, fehlten nun die passenden Substrate.

Bei der Konstruktion der Suizid-Vektoren wurde darauf geachtet, daß der *upstream*-Bereich von *eryCIV*, in dem sich wahrscheinlich eine Ribosomenbindestelle befindet (vgl. Abb. 3-35), erhalten blieb. Dennoch mußte experimentell sichergestellt werden, daß polare Mutationen mit Auswirkungen auf die *downstream* von *eryBVI* liegenden *eryC*-Gene ausgeschlossen waren. Da D-Desosamin bei der Biosynthese von Erythromycin erst im Anschluß an die Übertragung von L-Mycarose auf das Makrolidgrundgerüst an das hierbei entstehende MEB angeknüpft wird und folglich die D-Desosamin-Komponente im angereicherten Zwischenprodukt der Biosynthese, EB, nicht vorhanden ist (vgl. Abb. 1-7), konnte die MS-Analyse der Kulturüberstände der *eryBVI*-Substitutionsmutanten keinen Aufschluß über eventuell entstandene polare Mutationen

geben. Aus diesem Grund wurden Fütterungsversuche mit den Zwischenprodukten Erythronolid B (EB) und 3- α -Mycarosylerythronolid B (Myc-EB) durchgeführt (vgl. 3.4.4). Diese zeigten deutlich, daß es durch die Substitution des Gens *eryBVI* mit dem Gen *aacC4* bei keiner der beiden Mutanten-Typen zu polaren Mutationen gekommen war. Die Fütterung der *eryBVI*-Substitutionsmutanten mit Myc-EB bewirkte die Rekonstitution der Biosynthese des antibiotisch wirksamen Erythromycins A. Dies bedeutete, daß die Mutanten weiterhin die Fähigkeit zur Biosynthese von dTDP-D-Desosamin besitzen und daß folglich keines der *eryC*-Gene durch die Substitution von *eryBVI* durch *aacC4* in seiner Funktionalität beeinflusst wurde.

4.4 Komplementation von *eryB*-Mutanten

Für die vorgesehenen enzymatischen Untersuchungen des dTDP-L-Mycarose-Biosynthesewegs *in vitro* mußte sichergestellt werden, daß die mit His-tag versehenen EryB-Proteine nicht durch die angefügte His-tag-Verlängerung in ihrer enzymatischen Aktivität beeinflusst wurden. Die mit His-tag versehenen heterolog produzierten Proteine sollten ja vorzugsweise für die enzymatischen *in vitro* Untersuchungen bzw. Synthesen verwendet werden, da sie sich aufgrund ihres Poly-Histidin-Restes relativ einfach durch Affinitätschromatographie reinigen ließen. Somit standen sie für enzymatische Untersuchungen, die mit gereinigten Proteinen durchgeführt werden sollten, schneller und mit relativ geringem Aufwand oft schon nach einem Reinigungsschritt in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Zudem konnten nicht alle an der Biosynthese der dTDP-L-Mycarose beteiligten Proteine aus *Sac. erythraea* NRRL 2338 als native Proteine in detektierbaren Mengen produziert werden, die mit His-tag versehenen Proteine konnten hingegen zumeist im Western-Blot nachgewiesen werden (s. oben). Zur Überprüfung der Aktivitäten der mit His-tag fusionierten Proteine wurden daher die *eryB*-Mutanten für Komplementationsversuche mit dem jeweiligen nativen und dem His-tag-Fusionsprotein eingesetzt (vgl. 3.5). Da die *Sac. erythraea* Mutanten BII92, 335, BIV87 und BVII98, im Gegensatz zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzeugten *eryBVI*-Substitutionsmutanten, geringe Mengen antibiotisch wirksamer Metabolite produzierten, bei denen es sich teilweise sogar um Erythromycin A handelte (Salah-Bey et al. 1998; Gaisser et al. 1998), waren Bioassays zur Analyse der Komplementation alleine nicht ausreichend (vgl. Tab. 3-4). Aus diesem Grund wurden die Essigesterextrakte der Kulturüberstände der mit den verschiedenen Plasmiden zur Komplementation transformierten Mutanten-Stämme mittels ESI-MS analysiert und die relativen Signalintensitäten miteinander verglichen. Die Analysen der Komplementationsversuche lieferten im einzelnen die folgenden Ergebnisse:

Die von den komplementierten *eryB*-Mutanten produzierte antibiotische Aktivität war geringer als beim Wildstamm *Sac. erythraea* NRRL 2338

Auch bei erfolgreicher Komplementation sowohl mit den nativen Proteinen als auch mit den entsprechenden His-tag-Fusionsproteinen war die im Plattentest meßbare Antibiotikaproduktion immer deutlich geringer als diejenige im Wildstamm *Sac. erythraea* NRRL 2338 (vgl. Tab. 3-4). Dies deutete u. U. auf eine Produktion relativ geringer Mengen der rekombinanten Proteine hin. Der Grund hierfür ist möglicherweise eine nicht ausreichende Replikationsrate und/oder eine Instabilität der für die Komplementation verwendeten Plasmide, die sich in vielen Fällen nach mehreren Sporulationszyklen nur schlecht reisolieren ließen. Die verwendeten Expressionsplasmide sind Derivate des Plasmids pAL201, welches den einzigen verfügbaren für die Replikation in *Sac. erythraea* geeigneten Replikationsursprung des Plasmids pJV1 enthält. Dennoch ist dieser Replikationsursprung nicht optimal, und bereits früher wurde beobachtet, daß Plasmide mit diesem Replikationsursprung zu gewisser Instabilität in *Sac. erythraea* neigen (Tuan et al. 1990). Bis auf die *eryBVI*-Mutante 53M1 handelte es sich außerdem bei den für die Komplementationsversuche verwendeten *Sac. erythraea*-Mutanten BII92, 335, BIV87 und BVII98 um Deletions- oder Punktmutationsmutanten. Enthielt das für die Komplementation dieser Mutanten verwendete Plasmid das intakte homologe Gen, so könnten Rekombinationsereignisse stattgefunden haben. Darüber hinaus besaß das Plasmid pAL201 den Promotor P_{ermE^*} , der einen weiteren Ort für mögliche homologe Rekombinationsereignisse mit dem Chromosom von *Sac. erythraea* darstellte. Eine Störung des Regulationsmusters in den komplementierten plasmidtragenden Mutanten wäre eine alternative Erklärung für das Ergebnis. Zukünftig könnte diese Möglichkeit noch durch Transformation derselben Komplementationsplasmide in den Wildstamm von *Sac. erythraea* überprüft werden.

His-tag-EryB-Proteine sind *in vivo* aktiv

Die *eryB*-Mutanten BII92, 335, BIV87 und 53M1 ließen sich durch Plasmide, die die Gene für die entsprechenden His-tag-Fusionsproteine enthielten, komplementieren. Die im Plattentest meßbaren Antibiotikaproduktionen und die massenspektrometrisch detektierbaren relativen Mengen an Erythromycin A lagen zumeist in der gleichen Größenordnung wie bei den Mutanten, die mit Plasmiden, die die Gene für die entsprechenden nativen Proteine enthielten, transformiert worden waren. Daher sind die mit His-tag fusionierten Proteine *in vivo* etwa genauso aktiv wie die nativen Proteine ohne His-tag. Dies bedeutet für die im Anschluß an die heterologe Produktion der Proteine durchzuführenden enzymatischen Tests, daß diese offensichtlich alle mit den His-tag-modifizierten Proteinen durchgeführt werden können. Der an den C- oder N-Terminus der Proteine angefügte Poly-Histidin-Rest führte zumindest *in vivo* nicht zu negativer Beeinflussung der enzymatischen Funktionalität. Es zeigte sich jedoch, daß das Plasmid pPWW100, welches die genetische Information für das native EryBIII-Protein enthielt, die *eryBIII*-Mutante 335 nicht komplementieren konnte. Durch die massen-

spektrometrische Analyse des Kulturüberstandes konnte kein Erythromycin A nachgewiesen werden. Entweder enthielt das Plasmid pPWW100 eine Mutation im Gen *eryBIII*, so daß das Protein EryBIII nicht mehr oder nicht mehr funktionell intakt produziert werden konnte, oder es war bei diesem Plasmid aufgrund struktureller Eigenschaften besonders schnell zu seinem Verlust in der Mutante 335 gekommen.

Die kurze Version des EryBVI-Proteins ist ausreichend für seine Funktionalität

Beim Vergleich der Komplementationsfähigkeiten der langen und der kurzen Version des mit His-tag fusionierten EryBVI-Proteins zeigte sich, daß die im Plattentest nach Transformation der *eryBVI*-Mutante 53M1 mit den entsprechenden Plasmiden (pPWW42-s bzw. pPWW42-l) meßbaren Antibiotikaproduktionen identisch waren. Die Funktionalität des EryBVI-Proteins war also bei der kurzen Version vollständig ausgebildet. Die *upstream* des Startcodons für die kurze Version von *eryBVI* lokalisierte potentielle Ribosomenbindestelle deutete bereits darauf hin, daß *Sac. erythraea* die kurze Version des Proteins produzierte und daß diese für die Funktionalität ausreichend war (vgl. Abb. 1-9). Außerdem stimmte die Größe des kurzen EryBVI-Proteins deutlich besser mit der Größe der anderen bekannten potentiellen 2,3-Dehydratasen überein. Eine darüber hinaus gehende *N*-terminale Verkürzung des EryBVI-Proteins um weitere 56 Aminosäuren (vgl. Tab. 2-3) führte zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Innerhalb dieses Bereichs der 2,3-Dehydratase befinden sich demnach Aminosäuren, die für die enzymatische Aktivität von Bedeutung sind, obwohl im Bereich des *N*-Terminus die Sequenzähnlichkeit bei den Proteinen der 2,3-Dehydratase-Familie sehr gering ist (vgl. Anhang 15).

TylCVI, MidL und DnmT komplementieren die *eryBVI*-Substitutionsmutante 53M1

Die erfolgreiche Komplementation der *eryBVI*-Substitutionsmutante 53M1 durch die heterologen Proteine TylCVI aus *S. fradiae* T59-235, MidL aus *S. mycarofaciens* ATCC 21454 und DnmT aus *S. peucetius* DSM 40754 bestätigte, daß diese alternativen 2,3-Dehydratase-Proteine offensichtlich dieselbe enzymatische Funktionalität besitzen. Für *in vitro* Studien der enzymatischen Aktivität sollten daher diese Proteine gegeneinander austauschbar sein. Wie die mit His-tag versehenen EryB-Proteine war auch die 2,3-Dehydratase DnmT aus *S. peucetius* als mit His-tag versehenes Protein *in vivo* aktiv. Wie auch im Fall von EryBVI führte eine *N*-terminale Verkürzung von TylCVI zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität (vgl. Tab. 2-3).

DnmU komplementiert die *eryBVII*-Mutante BVII98

Die Sequenzidentität zwischen dem Protein DnmU aus *S. peucetius* DSM 40754 und dem Protein EryBVII aus *Sac. erythraea* beträgt 59,3%, so daß eine identische Funktionalität der beiden Proteine postuliert wurde (Otten et al. 1997). Um diese Hypothese zu belegen, wurden

Komplementationsversuche mit der *eryBVII*-Mutante BVII98 durchgeführt. Sowohl die native Version des DnmU-Proteins als auch das mit *N*-terminalem His-tag versehene Protein konnten dabei die Erythromycin A-Biosynthese in entsprechendem Umfang rekonstituieren. DnmU und EryBVII besitzen demnach identische Enzymaktivitäten. Da das Protein DnmU ebenso wie seine mit His-tag versehene Variante, im Gegensatz zu EryBVII sowohl in *E. coli* als auch in *S. lividans* in löslicher Form produziert werden konnte, bestand nun die Möglichkeit, in den enzymatischen Assays das EryBVII-Protein gegen das DnmU-Protein auszutauschen.

DnmU besitzt 3,5-Epimerase-Aktivität

Wurde das Substrat dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit über Ni-NTA-Agarose gereinigtem His-tag-DnmU, gereinigtem RmlD und dem Cofaktor NADPH inkubiert, fand eine quantitative Umsetzung zu einem Produkt statt, das bei den chromatographischen Analysen das Verhalten von dTDP-L-Rhamnose zeigte (vgl. 3.6.2). Die Bildung von dTDP-L-Rhamnose aufgrund von *E. coli*-Hintergrundaktivität konnte ausgeschlossen werden, da durch die Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose die Hintergrundaktivitäten von RmlC und RmlD aus *E. coli* eliminiert worden waren. Die massenspektrometrische Analyse des Enzymtestansatzes ergab, daß das Reaktionsprodukt eine Masse von 547,1 Da hatte (vgl. Abb. 3-44). Diese Masse stimmte gut mit dem berechneten Molekulargewicht von dTDP-L-Rhamnose überein. Der Vergleich des MS/MS-Spektrums der Verbindung mit dem MS/MS-Spektrum von dTDP-D-Glucose zeigte eindeutig, daß beide Verbindungen der gleichen Substanzklasse angehörten (vgl. Abb. 3-45). In beiden MS/MS-Spektren auftretende Fragmente identischer Massen konnten dem dTDP-Anteil der beiden Verbindungen zugeordnet werden. Diejenigen Fragmente, die vom jeweiligen Hexose-Anteil stammten, hatten immer eine Massendifferenz von 16 Da, die dem durch ein *O*-Atom bedingten Massenunterschied entsprach. Die durchgeführten Untersuchungen konnten allerdings keinen Aufschluß darüber geben, ob es sich bei DnmU um eine 3,5- oder nur um eine 5-Epimerase handelt. Hierzu dienten die im Anschluß an eine präparative Umsetzung und Reinigung des entstandenen Reaktionsproduktes durchgeführten ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen (vgl. 3.7.3). Diese zeigten eindeutig, daß es sich bei dem Reaktionsprodukt um dTDP-L-Rhamnose handelte. Somit besitzt DnmU *in vitro* zweifelsfrei 3,5-Epimerase-Aktivität. Die spezifische Enzymaktivität von His-tag DnmU wurde mittels eines gekoppelten Testsystems ermittelt (3.6.3). Da DnmU die *eryBVII*-Mutante BVII98 komplementierte, ist davon auszugehen, daß die Funktion von EryBVII ebenfalls die einer 3,5-Epimerase ist. L-Rhamnose-Derivate des Erythromycins, die bei verschiedenen *eryB*-Mutanten in geringen Mengen identifiziert wurden (Raynal 1999), sind durch die 3,5-Epimerase-Aktivität von EryBVII zu erklären. Die Tatsache, daß das *kde*-Gen aus *Sac. erythraea* die fehlende 3,5-Epimerase-Aktivität der Mutante BVII98 nicht komplementieren konnte, deutet, wie bereits von Gaisser et al. (1998) vermutet, darauf hin, daß der Zeitpunkt der Genexpression von *kde* und den *ery*-Genen unterschiedlich ist.

4.5 Der dTDP-L-Mycarose-Biosyntheseweg

Da eine komplette *in vitro* Biosynthese mit den angereicherten EryB-Enzymen (bzw. entsprechenden Ersatzproteinen wie DnmU) bisher nicht gelang, muß die Reihenfolge der Biosyntheseschritte weiterhin offen bleiben. Zusammenfassend kann derzeit das folgende Biosynthesemodell diskutiert werden:

Die Biosynthese von dTDP-L-Mycarose des Erythromycin A-Produzenten *Sac. erythraea* NRRL 2338 verlangt, ausgehend von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose, mindestens fünf weitere enzymatische Schritte, für die die Genprodukte der Gene *eryBII*, *eryBIII*, *eryBIV*, *eryBVI* und *eryBVII* zur Verfügung stehen (vgl. 1.5.4). Derzeit wird die Reihenfolge dieser Schritte und die exakte Funktionalität der beteiligten Enzyme noch kontrovers diskutiert (vgl. Abb. 4-2; Gaisser et al. 1997; Summers et al. 1997; Gaisser et al. 1998; Salah-Bey et al. 1998). Sequenzhomologien, die phänotypische Analyse von *eryB*-Mutanten und die von diesen erzeugten Zwischenprodukte der Erythromycin A-Biosynthese geben einige Hinweise für den in Abbildung 4-2 gezeigten Verlauf.

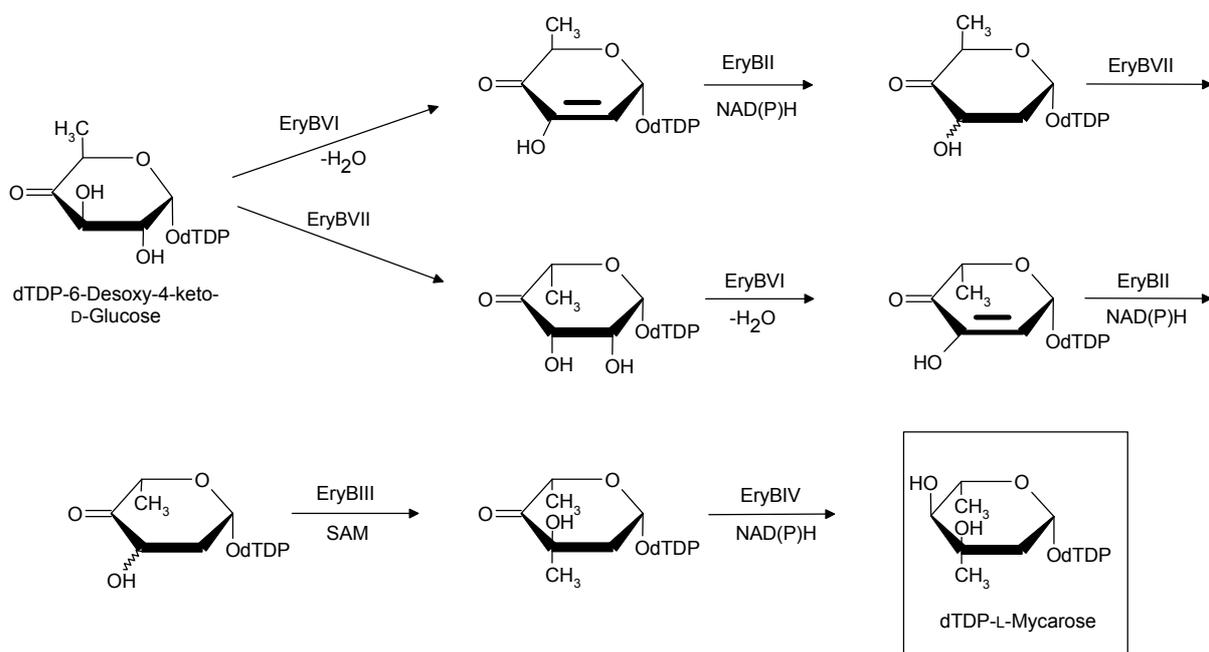


Abb. 4-2: Mögliche Biosynthesewege von dTDP-L-Mycarose. Ausgehend von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose wird dTDP-L-Mycarose in fünf enzymatischen Schritten gebildet. Die Abbildung entspricht weitgehend Abb. 1-8, wurde jedoch dahingehend modifiziert, daß die 3,5-Epimeraseaktivität von EryBVII dargestellt ist.

Derzeit erscheint es demnach wahrscheinlich, daß die vom EryBIV-Protein katalysierte Reduktion der 4-Ketogruppe der dTDP-aktivierten Hexose den letzten Schritt des dTDP-L-Mycarose-Biosynthesewegs darstellt. Zum einen erleichtert die Präsenz der 4-Ketogruppe die Reaktionen an den benachbarten Zentren (Summers et al. 1997), zum anderen deuteten Erythromycin-Derivate, die im Kulturüberstand der *eryBIV*-Mutante BIV87 in geringen

Mengen detektiert wurden und die anstelle der L-Mycarose-Komponente die entsprechende 4-Ketohexose enthielten, darauf hin (Salah-Bey et al. 1998). Ergebnisse von Draeger et al (1999) ließen vermuten, daß das Substrat für EryBVI möglicherweise dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose ist (vgl. 1.5.4), so daß der erste Schritt der Biosynthese von dTDP-L-Mycarose eventuell die 2,3-Dehydratisierung darstellt. Dieser Schritt sollte zumindest der Übertragung der Methylgruppe auf C3 vorausgehen, denn für die 2,3-Dehydratisierung wird das Proton an C3 benötigt. Andererseits ergaben Untersuchungen von Kim et al. (1999), daß EryBVII ebenfalls dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose als Substrat verwertet, so daß auch die von EryBVII katalysierte (3),5-Epimerisierung den ersten Schritt in der Reaktionsfolge der dTDP-L-Mycarose-Biosynthese darstellen könnte.

Um die Biosynthese von dTDP-L-Mycarose im Detail aufzuklären, ist eine Überproduktion der an der Biosynthese beteiligten Enzyme und eine detaillierte Charakterisierung ihrer Funktionen im einzelnen erforderlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bis auf EryBVII alle an der dTDP-L-Mycarose-Biosynthese von *Sac. erythraea* beteiligten Proteine heterolog produziert und standen für *in vitro* Enzymtests zur Verfügung (vgl. 3.2). Das fehlende Protein EryBVII konnte durch das Protein DnmU aus *S. peuceitius* substituiert werden, da Komplementationsversuche die identische Funktionalität der beiden Proteine *in vivo* bewiesen hatten (vgl. 4.3). Da keine dTDP-aktivierten Zwischenprodukte der dTDP-L-Mycarose-Biosynthese zur Verfügung standen, mußten alle *in vitro* Enzymtests ausgehend von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose durchgeführt werden. Dies bedeutete, daß die späteren Schritte des zu untersuchenden Biosynthesewegs nicht separat, sondern nur in Kombination mit den vorausgehenden Reaktionen in gekoppelten Testsystemen zu untersuchen waren. Alle *in vitro* Testansätze mit den einzelnen rekombinanten EryB-Enzymen sowie auch die „Eintopf“-Ansätze mit verschiedenen EryB-Kombinationen ergaben keinen meßbaren Substratumsatz in Richtung dTDP-L-Mycarose.

Die in *E. coli* produzierten Proteine wurden aufgrund der größeren produzierten Menge den in *S. lividans* produzierten Proteinen für die Testansätze vorgezogen. Die Hintergrundaktivitäten der *E. coli*-eigenen Proteine RmlC (dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose 3,5-Epimerase; Stevenson et al. 1994) und RmlD (dTDP-L-Rhamnose-Synthase; Stevenson et al. 1994) in den Gesamtzellextrakten bewirkten, die quantitative Umsetzung des eingesetzten Substrats dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose in dTDP-L-Rhamnose (vgl. 3.6.2). Um dies zu verhindern, wurden alle in *E. coli* produzierten mit His-tag fusionierten Proteine einer partiellen Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose unterzogen. Bei Verwendung der gereinigten Enzymfraktionen fand allerdings keine enzymatische Umsetzung des Substrates dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mehr statt. Eine Ausnahme stellte die Umsetzung von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose zu dTDP-L-Rhamnose durch DnmU und RmlD dar (s. oben). Es ist möglich, daß mindestens eines der an der dTDP-L-Mycarose-Biosynthese beteiligten Enzyme durch das Reinigungsverfahren

inaktiviert wurde bzw. aufgrund großer Empfindlichkeit/Instabilität bereits beim Zellaufschluß seine Aktivität verloren hat. Eventuell könnte man die geernteten Zellen der verschiedenen Produktionsstämme für die mit His-tag fusionierten Proteine vereinigen und den Zellaufschluß und die anschließende Äffinitätsreinigung mittels Ni-NTA-Agarose für alle Biosyntheseenzyme gemeinsam durchführen, so daß sich die verschiedenen mit His-tag fusionierten Proteine u. U. gegenseitig stabilisieren könnten. Das für die Testansätze verwendete Puffersystem könnte ebenfalls weiter variiert und optimiert werden. Die Reinigung der rekombinant produzierten Proteine könnte möglicherweise durch Verwendung der Zellextrakte der *S. lividans*-Expressionsstämme umgangen werden, da *S. lividans* keine dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose verbrauchende Hintergrundaktivität besitzt (Verseck 1997). Allerdings dürften diese Zellextrakte auch keine die enzymatischen Reaktionen hemmenden Komponenten besitzen. Das Problem der *E. coli*-Hintergrundaktivität könnte auch bei Produktion der zu testenden Biosyntheseenzyme in *E. coli*-Stämmen, bei denen durch Mutagenese der Gene *rmlC* und/oder *rmlD* die Produktion von aktivem RmlC bzw. RmlD-Protein inhibiert wurde, vermieden werden. Da allerdings für die heterologe Produktion der einzelnen Proteine in jedem einzelnen Fall ein geeigneter *E. coli*-Stamm und ein geeignetes Expressionssystem gefunden werden mußte (vgl. 3.2), müßte die Mutagenese bei den verschiedenen *E. coli*-Stämmen durchgeführt werden. Hinzu kommt, daß viele der für die Genexpression verwendeten *E. coli*-Stämme kein intaktes Rekombinationssystem besitzen, so daß die Herstellung von Mutanten durch homologe Rekombination nicht einfach möglich ist.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, einen Produzenten von dTDP-L-Mycarose dadurch zu erzeugen, daß alle Gene, die an der Biosynthese von dTDP-L-Mycarose beteiligt sind, z. B. in Form einer kompletten Kasette in ein Expressionsplasmid zu klonieren und dieses Plasmid in einen geeigneten Expressionsstamm zu transformieren. Hierdurch würde eine wichtige Grundlage für die Biokombinatorik geschaffen. Bei gleichzeitiger Expression von klonierten Mycarosyltransferasen könnte die aktivierte Hexose an variable Makrolidgerüste angeknüpft werden. An den Beispielen der Gene für die dTDP-L-Olivose- und die dTDP-L-Oleandrose-Biosynthese wurde dieser Ansatz bereits erfolgreich durchgeführt (Aguirrezabalaga et al. 2000).

5. Literatur

Aguirrezabalaga I, Olano C, Allende N, Rodriguez L, Brana AF, Mendez C, Salas JA (2000) Identification and expression of genes involved in biosynthesis of L-oleandrose and its intermediate L-olivose in the oleandomycin producer *Streptomyces antibioticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1266-1275

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

Altenbuchner J (1999), persönliche Mitteilung

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic logical alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410

Amann E, Ochs B, Abel KJ (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69: 301-315

Anné J, Van Mellaert L (1993) *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. *FEMS Microbiol Lett* 114: 121-128

Aretz W, Koller KP, Riess G (1989) Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans* TK24. *FEMS Microbiol Lett* 53: 31-35

Arisawa A, Kawamura N, Takeda K, Tsunekawa H, Okamura K, Okamoto R (1994) Cloning of the macrolide antibiotic biosynthesis gene *acyA*, which encodes 3-*O*-acyltransferase, from *Streptomyces thermotolerans* and its use for direct fermentative production of a hybrid macrolide antibiotic. *Appl Environ Microbiol* 60: 2657-2660

Arisawa A, Kawamura N, Tsunekawa H, Okamura K, Tone H, Okamoto R (1993) Cloning and nucleotide sequences of two genes involved in the 4"-*O*-acylation of macrolide antibiotics from *Streptomyces thermotolerans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 2020-2025

Arisawa A, Tsunekawa H, Okamura K, Okamoto R (1995) Nucleotide sequence analysis of the carbomycin biosynthetic genes including the 3-*O*-acyltransferase gene from *Streptomyces thermotolerans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 582-588

Arnheim N, Erlich H (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem* 61:131-56

Arnold A (2000) Untersuchungen zur Biosynthese der Methylthiolincosaminid (MTL) Untereinheit des Antibiotikums Lincomycin A aus *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936. Dissertation BUGH Wuppertal

Babcock MJ, Kendrick KE (1988) Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 170: 2802-2808

- Bailey CR, Bruton CJ, Butler MJ, Chater KF, Harris JE, Hopwood DA (1986) Properties of in vitro recombinant derivatives of pJV1, a multi-copy plasmid from *Streptomyces phaeochromogenes*. J Gen Microbiol 132: 2071-2078
- Baltz RH (1995) Gene expression in recombinant microorganisms. In: Smith A (Eds.), Bioprocess Technology 22, p 309-381, Marcel Decker Verlag
- Bao W, Sheldon PJ, Hutchinson CR (1999) Purification and properties of the *Streptomyces peucetius* DpsC beta-ketoacyl:acyl carrier protein synthase III that specifies the propionate-starter unit for type II polyketide biosynthesis. Biochem 38: 9752-9757
- Bate N, Butler AR, Gandecha AR, Cundliffe E (1999) Multiple regulatory genes in the tylosin biosynthetic cluster of *Streptomyces fradiae*. Chem Biol 6: 617-624
- Bate N, Butler AR, Smith IP, Cundliffe E (2000) The mycarose-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin. Microbiol 146 : 139-146
- Bauer AJ, Rayment I, Frey PA, Holden HM (1992) The molecular structure of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* determined at 2.5 Å resolution. Proteins 12: 372-381
- Bevitt DJ, Cortes J, Haydock SF, Leadlay PF (1992) 6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*. Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. Eur J Biochem 204: 39-49
- Bevitt DJ, Cortes J, Haydock SF, Leadlay PF (1992) 6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*. Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. Eur J Biochem 204: 39-49
- Beyer S (1997) unveröffentlicht
- Beyer S, Distler J, Piepersberg W (1996) The *str* gene cluster for the biosynthesis of 5'-hydroxystreptomycin in *Streptomyces glaucescens* GLA.0 (ETH 22794): operons and evidence for pathway-specific regulation by StrR. Mol Gen Genet 250: 775-784
- Beyer S, Mayer G, 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: 1059-1067
- Bibb MJ, Findlay PR, Johnson MW (1984) The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. Gene 30:157-166
- Bibb MJ, Janssen GR, Ward JM (1985a) Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. Gene 38: 215-226
- Bibb MJ, Ward JM, Cohen SN (1985b) Nucleotide sequences encoding and promoting expression of three antibiotic resistance genes indigenous to *Streptomyces*. Mol Gen Genet 199: 26-36

- Binnie C, Cossar JD, Stewart DI (1997) Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. Trends Biotechnol 15: 315-320
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res 7: 1513
- Bjerrum OJ, Schafer-Nielsen C (1986) Buffer systems and transfer parameters for semi-dry electroblotting with a horizontal apparatus. In: Dunn MJ (Eds.) Analytical Electrophoresis, p. 315-327, Verlag Chemie, Weinheim
- Blackwell JR, Horgan R (1991) A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. FEBS Lett 295: 10-12
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254
- Bräu B, Piepersberg W (1985) Purification and characterization of a plasmid-encoded aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase IV from *Escherichia coli*. FEBS Lett 185: 43-46
- Brawner M, Poste G, Rosenberg M, Westpheling J (1991) *Streptomyces*: a host for heterologous gene expression. Curr Opin Biotechnol 2: 674-681
- Brawner ME (1994) Advances in heterologous gene expression by *Streptomyces*. Curr Opin Biotechnol 5: 475-81
- Bright GM, Nagel AA, Bordner J, Desai KA, Dibrino JN et al. (1988) Synthesis, in vitro and in vivo activity of novel 9-deoxo-9a-AZA-9a-homoerythromycin A derivatives; a new class of macrolide antibiotics, the azalides. J Antibiot 41: 1029-1047
- Brisson-Noel A, Trieu-Cuot P, Courvalin P (1988) Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. J Antimicrob Chemother 22 Suppl B: 13-23
- Brosius J, Erfle M, Storella J (1985) Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. Effect on its in vivo activity. J Biol Chem 260: 3539-3541
- Bujard H, Gentz R, Lanzer M, Stueber D, Mueller M, Ibrahim I, Haeuptle MT, Dobberstein B (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. Methods Enzymol 155: 416-433
- Caffrey P, Bevitt DJ, Staunton J, Leadlay PF (1992) Identification of DEBS 1, DEBS 2 and DEBS 3, the multienzyme polypeptides of the erythromycin-producing polyketide synthase from *Saccharopolyspora erythraea*. FEBS Lett 304: 225-228
- Chen S, von Bamberg D, Hale V, Breuer M, Hardt B, Muller R, Floss HG, Reynolds KA, Leistner E (1999) Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin. Identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* Tü 1892. Eur J Biochem 261: 98-107
- Chomczynski P (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. Anal Biochem 162: 156-159

Chu DT (1999) Recent developments in macrolides and ketolides. *Curr Opin Microbiol* 2: 467-474

Cong L (2000) Identification of the midecamycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces mycarofaciens* UC189B (ATCC21454) and analysis of the enzymes for dTDP-D-mycaminose biosynthesis. Dissertation BUGH Wuppertal

Cortes J, Haydock SF, Roberts GA, Bevitt DJ, Leadlay PF (1990) An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* 348: 176-178

Cupp-Vickery JR, Poulos TL (1995) Structure of cytochrome P450 EryF involved in erythromycin biosynthesis. *Nat Struct Biol* 2: 144-153

Davies J, Chadwick D, Whelan J, Widdows K (1992) Secondary Metabolites: Their Function and Evolution, Ciba Foundation Symposium No. 171. John Wiley & Sons, Chichester

Dhillon N, Hale RS, Cortes J, Leadlay PF (1989) Molecular characterization of a gene from *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*) which is involved in erythromycin biosynthesis. *Mol Microbiol* 3: 1405-1414

Dickens ML, Ye J, Strohl WR (1996) Cloning, sequencing, and analysis of aklaviketone reductase from *Streptomyces* sp. strain C5. *J Bacteriol* 178: 3384-3388

Distler J, Piepersberg W (1985) Cloning and characterization of a gene coding for a streptomycin-phosphorylating activity from *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol Lett* 28: 113-117.

Djokic S, Kobrehel G, Lazarevski G (1987) Erythromycin series. XII. Antibacterial in vitro evaluation of 10-dihydro-10-deoxy-11-azaerythromycin A: synthesis and structure-activity relationship of its acyl derivatives. *J Antibiot* 40: 1006-1015

Donadio S, Stassi D, McAlpine JB, Staver MJ, Sheldon PJ, Jackson M, Swanson SJ, Wendt-Pienkowski E, Wang Y, Jarvis B, Hutchinson CR, Katz L (1993) Recent developments in the genetics of Erythromycin formation. In: Baltz RH, Hegeman GD, Skatrud PL (Eds.) *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics*. p. 257-265, American Society for Microbiology, Washington DC

Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ, Katz L (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 252: 675-679

Doull JL, Vining LC (1989) Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* 53: 265-268

Doumith M, Legrand R, Lang C, Salas JA, Raynal MC (1999) Interspecies complementation in *Saccharopolyspora erythraea*: elucidation of the function of *oleP1*, *oleG1* and *oleG2* from the oleandomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* and generation of new erythromycin derivatives. *Mol Microbiol* 34: 1039-1048

- Doumith M, Weingarten P, Wehmeier UF, Salah-Bey K, Benhamou B, Capdevila C, Michel JM, Piepersberg W, Raynal MC (2000) Analysis of genes involved in the 6-deoxyhexose biosynthesis in *Sac. erythraea*. (eingereicht)
- Draeger G, Park S-H, Floss HG (1999) Mechanism of the 2-deoxygenation step in the biosynthesis of the deoxyhexose moieties of the antibiotics granaticin and oleandomycin. *J Am Chem Soc* 121: 2611-2612
- Dubendorff JW, Studier FW (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *J Mol Biol* 219: 45-59
- Egan SM, Schleif RF (1993) A regulatory cascade in the induction of *rhaBAD*: *J Mol Biol* 234: 87-98
- Elling L, Ritter E, Verseck S (1996) Expression, purification, characterization of recombinant phosphomannomutase and GDP- α -D-mannose pyrophosphorylase from *Salmonella enterica*, group B, for the synthesis of GDP- α -D-mannose from D-mannose. *Glycobiology* 6: 591-597
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- Feinberg AP, Vogelstein B (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal Biochem* 137: 266-267
- Fernández E Dpto. Biología Funcional (Microbiología): Universidad de Oviedo; Spanien, unveröffentlicht
- Fernandez-Moreno MA, Caballero JL, Hopwood DA, Malpartida F (1991) The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *blaA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* 66: 769-780
- Flowers HM (1981) Chemistry and biochemistry of D- and L-fucose. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 39: 279-345
- Fouces R, Mellado E, Diez B, Barredo JL (1999) The tylosin biosynthetic cluster from *Streptomyces fradiae*: genetic organization of the left region. *Microbiol* 145: 855-868
- Fritsche E, Bergner A, Humm A, Piepersberg W, Huber R (1998) Crystal structure of L-arginine:inosamine-phosphate amidinotransferase StrB1 from *Streptomyces griseus*: an enzyme involved in streptomycin biosynthesis. *Biochem* 37: 17664-17672
- Fujiwara A, Hoshino T (1983) Anthracyclic antibiotics. *Critical Rev Biotech* 3: 133-157
- Gabriel O (1982) Isolation and synthesis of sugar nucleotides. *Methods Enzymol* 83:332-351
- Gaisser S, Böhm GA, Cortés J, Leadlay PF (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

- Gaisser S, Böhm GA, Doumith M, Raynal MC, Dhillon N, Cortes J, Leadlay PF (1998) Analysis of *eryBI*, *eryBIII* and *eryBVII* from the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Gen Genet* 258: 78-88
- Gandecha AR, Large SL, Cundliffe E (1997) Analysis of four tylosin biosynthetic genes from the *tylLM* region of the *Streptomyces fradiae* genome. *Gene* 184: 197-203
- Gao X, Patel DJ (1990) Chromomycin dimer -DNA oligomer complexes: sequence selectivity and divalent cation specificity. *Biochem* 29: 10940-10956
- Geistlich M, Losick R, Turner JR, Rao RN (1992) Characterization of a novel regulatory gene governing the expression of a polyketide synthase gene in *Streptomyces ambofaciens*. *Mol Microbiol* 6: 2019-2029
- Gilbert M, Morosoli R, Shareck F, Kluepfel D (1995) Production and secretion of proteins by streptomycetes. *Crit Rev Biotechnol* 15: 13-39
- Giordano TJ, Deuschle U, Bujard H, McAllister WT (1989) Regulation of coliphage T3 and T7 RNA polymerases by the *lac* repressor-operator system. *Gene* 84: 209-219
- Gräfe U (1992) *Biochemie der Antibiotika: Struktur-Biosynthese-Wirkungsmechanismus*. Spektrum Verlag, Heidelberg
- Graninger M, Nidetzky B, Heinrichs DE, Whitfield C, Messner P (1999) Characterization of dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase, required for dTDP-L-rhamnose biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2. *J Biol Chem* 274: 25069-25077
- Hammes P, Wehmeier UF (1996) unveröffentlicht
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Hannig G, Makrides SC (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 16: 54-60
- Haydock SF, Dowson JA, Dhillon N, Roberts GA, Cortes J, Leadlay PF (1991) Cloning and sequence analysis of genes involved in erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: sequence similarities between EryG and a family of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Mol Gen Genet* 230: 120-128
- Hessler PE, Larsen PE, Constantinou AI, Schram KH, Weber JM (1997) Isolation of isoflavones from soy-based fermentations of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea*. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 398-404
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R (1991) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS* 8: 189-191
- Higuchi R (1990) Recombinant PCR. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, p. 177-183, Academic Press

Hoppe JE, Bryskier A (1998) *In vitro* susceptibilities of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to two ketolides (HMR 3004 and HMR 3647), four macrolides (azithromycin, clarithromycin, erythromycin A, and roxithromycin), and two ansamycins (rifampin and rifapentine). *Antimicrob Agents Chemother* 42: 965-966

Hopwood DA, Bibb MJ, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Ward JM, Schrempf H (1985) In: Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich.

Hopwood DA, Sherman DH (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* 24: 37-66

Hutchinson CR (1998) Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. *Curr Opin Microbiol* 1: 319-329

Ichinose K, Bedford DJ, Tornus D, Bechthold A, Bibb MJ, Revill WP, Floss HG, Hopwood DA (1998) The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22: sequence analysis and expression in a heterologous host. *Chem Biol* 5: 647-659

Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, Ohta T, Omura S (1999) Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci* 96: 9509-9514

Ikeda H, Wang LR, Ohta T, Inokoshi J, Omura S (1998) Cloning of the gene encoding avermectin B 5-*O*-methyltransferase in avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. *Gene* 206: 175-180

Ingrosso D, Fowler AV, Bleibaum J, Clarke S (1989) Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *J Biol Chem* 264: 20131-20139

Itoh Z (1997) Motilin and clinical application. *Peptides* 18: 593-608

Jenkins G, Cundliffe E (1991) Cloning and characterization of two genes from *Streptomyces lividans* that confer inducible resistance to lincomycin and macrolide antibiotics. *Gene* 108: 55-62

Jiang X-M, Neal B, Santiago F, Lee SJ, Romana LK, Reeves PR (1991) Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar *typhimurium* (strain LT2). *Mol Microbiol* 5: 695-713

Johnson DA, Liu H (1998) Mechanisms and pathways from recent deoxysugar biosynthesis research. *Curr Opin Chem Biol* 2: 642-649

Kane JF, Hartley DL (1991) Properties of recombinant protein-containing inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Bioprocess Technol* 12: 121-145

- Kaneda T, Butte JC, Taubman B, Corcoran JW (1962) Actinomycete antibiotics III. The biogenesis of erythronolide, the C₂₁ branched chain lactone in erythromycin. J Biol Chem 237: 322-327
- Katz E, Thompson CJ, Hopwood DA (1983) Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. J Gen Microbiol 129 (Pt 9): 2703-2714
- Katz L, McDaniel R (1999) Novel macrolides through genetic engineering. Med Res Rev 19: 543-558
- Kieser T, Hopwood DA (1991) Genetic manipulation of *Streptomyces*: integrating vectors and gene replacement. Methods Enzymol 204: 430-458
- Kim KS, Farrand SK (1996) Ti plasmid-encoded genes responsible for catabolism of the crown gall opine mannopine by *Agrobacterium tumefaciens* are homologs of the T-region genes responsible for synthesis of this opine by the plant tumor. J Bacteriol 178: 3275-3284
- Kim W, Kim C, Han O (1999) The function of *eryBVII* gene is to epimerize TDP-6-Deoxy-L-threo-D-glycero-4-hexulose in the biosynthesis of erythromycin A. J Biochem Mol Biol 32: 72-75
- Kirst HA (1998) Recent developments with macrolide antibiotics. Exp Opin Ther Patents 8: 111-120
- Kist HA (1990) Structural Modification of Macrolide Antibiotics. In: Lukacas G, Ohno M (Eds.) Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics. p. 39-63 Springer-Verlag, Heidelberg
- Krügel H (1998) persönliche Mitteilung
- Labeda DP (1987) Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a neotype strain for *Streptomyces erythraeus*. Int J Syst Bacteriol 37: 19-22
- Lacey J (1989) Genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, 77^{AL} In: Williams ST, Holt JG (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, p. 2382-2386, Williams & Wilkins, Baltimore
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Lai CJ, Weisblum B (1971) Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA 68: 856-860
- Lambalot RH, Cane DE, Aparicio JJ, Katz L (1995) Overproduction and characterization of the erythromycin C-12 hydroxylase, EryK. Biochem 34: 1858-1866

- Lemaire HG, Müller-Hill B (1986) Nucleotide sequences of the *galE* gene and the *galT* gene of *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 14: 7705-7711
- Lindqvist L, Kaiser R, Reeves PR, Lindberg AA (1993) Purification, characterisation and HPLC assay of *Salmonella* glucose-1-phosphate thymidyltransferase from the cloned *rfbA* gene. *Eur J Biochem* 211: 763-770
- Lindqvist L, Kaiser R, Reeves PR, Lindberg AA (1994) Purification, characterization, and high performance liquid chromatography assay of *Salmonella* glucose-1-phosphate cytidyltransferase from the cloned *rfbF* gene. *J Biol Chem* 269: 122-126
- Liu HW, Thorson JS (1994) Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu Rev Microbiol* 48: 223-256
- Lomovskaya N, Doi-Katayama Y, Filippini S, Nastro C, Fonstein L, Gallo M, Colombo AL, Hutchinson CR (1998) The *Streptomyces peucetius dpsY* and *dnrX* genes govern early and late steps of daunorubicin and doxorubicin biosynthesis. *J Bacteriol* 180: 2379-2386
- Lorimer GH (1996) A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo. *FASEB J* 10: 5-9
- MacNeil DJ (1995) Avermectins. In: Vining LC, Stuttard C (Eds.) *Genetics and biochemistry of antibiotic production*. p. 421-442, Butterworth Heinemann, Stoneham
- Madduri K, Kennedy J, Rivola G, Inveni-Solari A, Filippini S, Zanuso G, Colombo AL, Gewain KM, Occi JL, MacNeil DJ, Hutchinson CR (1998) Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*. *Nat Biotechnol* 16: 69-74
- Makrides SC (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. *Nucleic Acids Res* 16: 1829-1836
- Marsden AF, Wilkinson B, Cortes J, Dunster NJ, Staunton J, Leadlay PF (1998) Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase. *Science* 279: 199-202
- Martin SF, Hida T, Kym PR, Loft M, Hodgson A (1997) The asymmetric synthesis of erythromycin B. *J Am Chem Soc* 119: 3193-3194
- Marumo K, Lindquist L, Verma N, Weintraub A, Reeves P, Lindberg AA (1992) Enzymatic synthesis and isolation of thymidine diphosphate-6-deoxy-D-xylo-4-hexulose and thymidine diphosphate-L-rhamnose. *Eur J Biochem* 204: 539-545
- Matern H, Brillinger GU, Pape H (1973) Thymidin-diphospho-D-glucose-oxidoreductase aus *Streptomyces rimosus*. *Arch Mikrobiol* 88: 37-48
- McGuire JM, Bunch RL, Anderson RC, Boaz HE, Flynn EH, Powell HM, Smith JW (1952) Illotycin, a new antibiotic. *Antibiot Chemother* 2: 281-283

- Mehling A, Wehmeier UF, Piepersberg W (1995) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS Microbiol Lett* 128: 119-126
- Melo A, Glaser L (1968) The mechanism of 6-deoxyhexose synthesis. II. Conversion of deoxythymidine diphosphate 4-keto-6-deoxy-D-glucose to deoxythymidine diphosphate L-rhamnose. *J Biol Chem* 243: 1475-1478
- Merril CR (1990) Gel-staining techniques. *Meth Enzymol* 182: 477-488
- Merson-Davies LA, Cundliffe E (1994) Analysis of five tylosin biosynthetic genes from the *tylBA* region of the *Streptomyces fradiae* genome. *Mol Microbiol* 13: 349-355
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Minas W, Brunker P, Kallio PT, Bailey JE (1998) Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea*. *Biotechnol Prog* 14: 561-566
- Morimoto S, Misawa Y, Kondoh H, Watanabe Y, Omura S (1990) Chemical modification of erythromycins. V. Synthesis and antibacterial activity of 4"-O-methyl derivatives of erythromycin a 11,12-cyclic carbonate. *J Antibiot* 43: 566-569
- Morimoto S, Takahashi Y, Watanabe Y, Omura S (1984) Chemical modification of erythromycins. I. Synthesis and antibacterial activity of 6-O-methylerythromycins A. *J Antibiot* 37: 187-189
- Motamedi H, Shafiee A, Cai SJ (1995) Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces* spp. *Gene* 160: 25-31
- Murakami T, Holt TG, Thompson CJ (1989) Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 171: 1459-1466
- Neußer D (1999) Untersuchungen zur Biosynthese der Propylprolin-Untereinheit des Antibiotikums Lincomycin A aus *Streptomyces lincolnensis*. Dissertation, BUGH Wuppertal
- 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: 322-332
- Niemi J, Mantsala P (1995) Nucleotide sequences and expression of genes from *Streptomyces purpurascens* that cause the production of new anthracyclines in *Streptomyces galilaeus*. *J Bacteriol* 177: 2942-2945
- Oh SH, Chater KF (1997) Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms. *J Bacteriol* 179: 122-127

Olano C, Rodriguez AM, Michel JM, Méndez C, Raynal MC, Salas JA (1998) Analysis of a *Streptomyces antibioticus* chromosomal region involved in oleandomycin biosynthesis, which encodes two glycosyltransferases responsible for glycosylation of the macrolactone ring. *Mol Gen Genet* 259: 299-308

Olins PO, Lee SC (1993) Recent advances in heterologous gene expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 4: 520-525

Omura S. (1992a) The expanded horizon for microbial metabolites - a review. *Gene* 115: 141-149

Omura S. (1992b) The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York

Otten SL, Gallo MA, Madduri K, Liu X, Hutchinson CR (1997) Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius dnmZUV* genes encoding three enzymes required for biosynthesis of the daunorubicin precursor thymidine diphospho-L-daunosamine. *J Bacteriol* 179: 4446-4450

Otten SL, Liu X, Ferguson J, Hutchinson CR (1995) Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius dnrQS* genes encoding a daunosamine biosynthesis enzyme and a glycosyl transferase involved in daunorubicin biosynthesis. *J Bacteriol* 177: 6688-6692

Paget MS, Hintermann G, Smith CP (1994) Construction and application of streptomycete promoter probe vectors which employ the *Streptomyces glaucescens* tyrosinase-encoding gene as reporter. *Gene* 146: 105-110

Pape H, Brillinger GU (1973) Biosynthese von Thymidin-diphospho-mycarose durch ein zellfreies System aus *Streptomyces rimosus*. *Arch Mikrobiol* 88: 25-35

Parsons IC, Everett JR, Pacey MS, Ruddock JC, Swanson AG, Thompson CM (1999) Structural elucidation of a novel erythromycin, 13-cyclopentyl-13-desethyl-erythromycin B, from a recombinant *Saccharopolyspora erythraea* strain, NRRL 2338 pIG/1. *J Antibiot* 52: 190-192

Paulus TJ, Tuan JS, Luebke VE, Maine GT, DeWitt JP, Katz L (1990) Mutation and cloning of *eryG*, the structural gene for erythromycin *O*-methyltransferase from *Saccharopolyspora erythraea*, and expression of *eryG* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 2541-2546

Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-2448

Pereda A, Summers R, Katz L (1997) Nucleotide sequence of the *ermE* distal flank of the erythromycin biosynthesis cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* 193: 65-71

Peschke U, Schmidt H, Zhang HZ, Piepersberg W (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* 16: 1137-1156

-
- Piepersberg W (1994) Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. *Crit Rev Biotechnol* 14: 251-285
- Piepersberg W (1995) Streptomycin and related aminoglycosides. *Biotechnology* 28: 531-570
- Piepersberg W (2000) persönliche Mitteilung
- Piepersberg W, Distler J (1997) Aminoglycosides and Sugar components in other secondary metabolites. In: Rehm HJ, Reed G (Eds.) *Biotechnology Vol. 7 Products of secondary metabolism*. p. 397-487, Verlag Chemie, Weinheim
- Piepersberg W, Zeek A (1994) Mikrobieller Sekundärstoffwechsel. In: Präve P, Faust U, Sittig W, Sukatsch DA (Eds.) *Handbuch der Biotechnologie*, 4. Auflage, p. 141-177, Oldenbourg Verlag, München
- Pissowotzki K, Mansouri K, Piepersberg W (1991) Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes *strELMB2N*. *Mol Gen Genet* 231: 113-123
- Pöhling S (1997) Analyse des allgemeinen Proteinsekretionsapparates von *Streptomyces griseus* und *Streptomyces galbus*. Dissertation, BUGH Wuppertal
- Pospiech A, Neumann B (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends. Genet.* 11: 217-218
- Ptitsyn OB (1996) A determinable but unresolved problem. *FASEB J* 10: 3-4
- Quiros LM, Aguirrezabalaga I, Olano C, Mendez C, Salas JA (1998) Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. *Mol Microbiol* 28: 1177-1185
- Quiros LM, Aguirrezabalaga I, Olano C, Mendez C, Salas JA (1998) Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. *Mol Microbiol* 28: 1177-1185
- Quiros LM, Salas JA (1995) Biosynthesis of the macrolide oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*. Purification and kinetic characterization of an oleandomycin glucosyltransferase. *J Biol Chem* 270: 18234-18239
- Raynal MC (1995) persönliche Mitteilung
- Raynal MC (1999) persönliche Mitteilung
- Reeves AR, English RS, Lampel JS, Post DA, Vanden Boom TJ (1999) Transcriptional organization of the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea*. *J Bacteriol* 181: 7098-7106
- Reeves AR, Post DA, Vanden Boom TJ (1998) Physical-genetic map of the erythromycin-producing organism *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbiol* 144: 2151-2159

Reinert RR, Bryskier A, Luttkicken R (1998) *In vitro* activities of the new ketolide antibiotics HMR 3004 and HMR 3647 against *Streptococcus pneumoniae* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1509-1511

Ryll T, Wagner R (1991) Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells. *J Chromatogr* 570: 77-88

Salah-Bey K, Blanc V, Thompson CJ (1995) Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene (*ptr*) in various *Streptomyces* spp. and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 17: 1001-1012

Salah-Bey K, Doumith M, Michel JM, Haydock S, Cortes J, Leadlay PF, Raynal MC (1998) Targeted gene inactivation for the elucidation of deoxysugar biosynthesis in the erythromycin producer *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Gen Genet* 257: 542-553

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sanger F, Nicklan S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-determination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467

Sasaki J, Mizoue K, Morimoto S, Omura S (1996) Microbial glycosylation of macrolide antibiotics by *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 31080 and distribution of a macrolide glycosyl transferase in several *Streptomyces* strains. *J Antibiot* 49: 1110-1118

Sassa K, Mizushima Y, Fujishita T, Oosaki R, Kobayashi M (1999) Therapeutic effect of clarithromycin on a transplanted tumor in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 67-72

Schein CH (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *BioTechnology* 7: 1141-1149

Schein CH, Noteborn MHM (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favoured by lower growth temperature. *BioTechnology* 6: 291-294

Schluckebier G, O'Gara M, Saenger W, Cheng X (1995) Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. *J Mol Biol* 247: 16-20

Schnaitman CA, Klena JD (1993) Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev* 57: 655-682

Scotti C, Hutchinson CR (1996) Enhanced antibiotic production by manipulation of the *Streptomyces peucetius* *dnrH* and *dnmT* genes involved in doxorubicin (adriamycin) biosynthesis. *J Bacteriol* 178: 7316-7321

Sorokin A, Bolotin A, Purnelle B, Hilbert H, Lauber J, Dusterhoft A, Ehrlich SD (1997) Sequence of the *Bacillus subtilis* genome region in the vicinity of the *lev* operon reveals two new extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factors SigV and SigZ. *Microbiol* 143: 2939-2943

- Stassi D, Donadio S, Staver MJ, Katz L (1993) Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis. *J Bacteriol* 175: 182-189
- Stassi D, Post D, Satter M, Jackson M, Maine G (1998) A genetically engineered strain of *Saccharopolyspora erythraea* that produces 6,12-dideoxyerythromycin A as the major fermentation product. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 725-731
- Stassi DL, Kakavas SJ, Reynolds KA, Gunawardana G, Swanson S, Zeidner D, Jackson M, Liu H, Buko A, Katz L (1998) Ethyl-substituted erythromycin derivatives produced by directed metabolic engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7305-7309
- Staunton J, Wilkinson B (1997) Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. *Chem Rev* 97: 2611-2629
- Stein A (1995) Kombinierte Enzymatische Synthese von dTDP-6-Desoxy-4-keto-D-Glucose mit Saccharose-Synthase und dTDP-D-Glucose-4,6-Epimerase. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Stein A, Kula M-R, Elling L, Verseck S, Klaffke W (1995). Synthesen von dTDP-6-Desoxy-4-ketoglucose und deren Analoga mit nativer und rekombinanter dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase. *Angew Chem* 107: 1881-1883 [*Angew Chem Int Ed Engl* 34: 1748-1749]
- Stevenson G, Neal B, Liu D, Hobbs M, Packer NH, Batley M, Redmond JW, Lindquist L, Reeves P (1994) Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *J Bacteriol* 176: 4144-4156
- Stockmann M, Piepersberg W (1992) Gene probes for the detection of 6-deoxyhexose metabolism in secondary metabolite-producing streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett* 69: 185-189
- Strickler JE, Berka TR, Gorniak J, Fornwald J, Keys R, Rowland JJ, Rosenberg M, Taylor DP (1992) Two novel *Streptomyces* protein protease inhibitors. Purification, activity, cloning, and expression. *J Biol Chem* 267: 3236-3241
- Strohl WR (1992) Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res* 20: 961-974
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 60-89
- Studier WF, Moffat BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-130
- Summers RG, Donadio S, Staver MJ, Wendt-Pienkowski E, Hutchinson CR, Katz L (1997) Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiol* 143: 3251-3262

- Takano E, White J, Thompson CJ, Bibb MJ (1995) Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* 166: 133-137
- Thompson CJ, Gray GS (1983) Nucleotide sequence of a streptomycete aminoglycoside phosphotransferase gene and its relationship to phosphotransferases encoded by resistance plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5190-5194
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22: 4673-4680
- Thorson JS, Kelly TM, Liu H-W (1994) Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the α -D-glucose-1-phosphat cytidyltransferase gene isolated from *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 176: 1840-1849
- Tonetti M, Sturla L, Bisso A, Zanardi D, Benatti U, De Flora A (1998) The metabolism of 6-deoxyhexoses in bacterial and animal cells. *Biochimie* 80: 923-931
- Torkkell S, Ylihonko K, Hakala J, Skurnik M, Mantsala P (1997) Characterization of *Streptomyces nogalater* genes encoding enzymes involved in glycosylation steps in nogalamycin biosynthesis. *Mol Gen Genet* 256: 203-209
- Toscano L, Fioriello G, Spagnoli R, Cappelletti L (1983) New semisynthetic fluorinated "hybrid" macrolides. *J Antibiot* 36: 1585-1588
- Trefzer A, Salas JA, Bechthold A (1999) Genes and enzymes involved in deoxysugar biosynthesis in bacteria. *Nat Prod Rep* 16: 283-299
- Tuan JS, Weber JM, Staver MJ, Leung JO, Donadio S, Katz L (1990) Cloning of genes involved in erythromycin biosynthesis from *Saccharopolyspora erythraea* using a novel actinomycete-*Escherichia coli* cosmid. *Gene* 90: 21-29
- Van Dyke MW, Dervan PB (1983) Chromomycin, mithramycin and olivomycin binding sites on heterogeneous deoxyribonucleic acid. Footprinting with (methidiumpropyl-EDTA)iron(II). *Biochem* 22: 2373-2377
- van Wageningen AM, Kirkpatrick PN, Williams DH, Harris BR, Kershaw JK, Lennard NJ, Jones M, Jones SJ, Solenberg PJ (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem Biol* 5: 155-162
- Vara JA, Hutchinson CR (1988) Purification of thymidine-diphospho-D-glucose 4,6-dehydratase from an erythromycin-producing strain of *Saccharopolyspora erythraea* by high resolution liquid chromatography. *J Biol Chem* 263: 14992-14995
- Verseck S (1997) Klonierung und Expression von bakteriellen Enzymen der Biosynthese von 6-Desoxyhexose-Derivaten und deren Verwendung zur präparativen Herstellung von dTDP-aktivierten Hexosen. Dissertation, BUGH Wuppertal
- Vester B, Nielsen AK, Hansen LH, Douthwaite S (1998) ErmE methyltransferase recognition elements in RNA substrates. *J Mol Biol* 282: 255-264

Vieira J, Messing JR (1982) The pUC plasmids and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.

Vilches C, Hernandez C, Mendez C, Salas JA (1992) Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism, *Streptomyces antibioticus*. *J Bacteriol* 174: 161-165

Volff JN, Eichenseer C, Viell P, Piendl W, 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

Wahl HP, Grisebach H (1979) Biosynthesis of streptomycin. dTDP-dihydrostreptose synthase from *Streptomyces griseus* and dTDP-4-keto-L-rhamnose 3,5-epimerase from *S. griseus* and *Escherichia coli* Y10. *Biochim Biophys Acta* 568: 243-252

Wang S-F, Gabriel O (1969) Biological mechanisms involved in the formation of deoxy sugars. V. Isolation and crystallization of thymidine diphosphate-D-glucose oxidoreductase from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* 244: 3430-3437

Weber JM, Leung JO, Maine GT, Potenz RH, Paulus TJ, DeWitt JP (1990) Organization of a cluster of erythromycin genes in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Bacteriol* 172: 2372-2383

Weber JM, Leung JO, Swanson SJ, Idler KB, McAlpine JB (1991) An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*. *Science* 252: 114-117

Weber JM, Schoner B, Losick R (1989) Identification of a gene required for the terminal step in erythromycin A biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *Gene* 75: 235-241

Weber JM, Wierman CK, Hutchinson CR (1985) Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *J Bacteriol* 164: 425-433

Wehmeier UF (1995) New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors allowing blue-white screening on XGal plates. *Gene* 165: 149-150

Weisblum B (1995a) Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 577-585

Weisblum B (1995b) Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 797-805

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

Wierenga RK, Hol WG (1983) Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer-associated variant. *Nature* 302: 842-844

Wilkinson DL, Harrison RG (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 9: 443-448

Wilms B, Wiese A, Syldatk C, Mattes R, Altenbuchner J, Pietzsch M (1999) Cloning, nucleotide sequence and expression of a new L-N-carbamoylase gene from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 in *E. coli*. J Biotechnol 68: 101-113

Wilson VT, Cundliffe E (1998) Characterization and targeted disruption of a glycosyltransferase gene in the tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. Gene 214: 95-100

Wong WK, Ali A, Chan WK, Ho V, Lee NT (1998) The cloning, expression and characterization of a cellobiase gene encoding a secretory enzyme from *Cellulomonas biazotea*. Gene 207: 79-86

Woodward RB, Logusch E, Nambiar KP, Sakan K, Ward DE et al. (1981) Asymmetric total synthesis of erythromycin, I, II, III. J Am Chem Soc 103: 3213-3215

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

Wyk P, Reeves P (1989) Identification and sequence of the gene for abequose synthase, which confers antigenic specificity on group B salmonellae: homology with galactose epimerase. J Bacteriol 171: 5687-5693

Xiang S-H, Hobbs M, Reeves PR (1994) Molecular analysis of *rfb* gene cluster of a group D2 *Salmonella enterica* strain: Evidence for its origin from an insertion sequence-mediated recombination event between group E and D1 strains. J Bacteriol 176: 4357-4365

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

Yamamoto H, Maurer KH, Hutchinson CR (1986) Transformation of *Streptomyces erythraeus*. J Antibiot 39: 1304-1313

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

Ylihonko K, Tuikkanen J, Jussila S, Cong L, Mantsala P (1996) A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway. Mol Gen Genet 251: 113-120

Yu Y, Russel RN, Thorson JS, Liu L-D, Liu H-W (1992) Mechanistic studies of the biosynthesis of 3,6-dideoxyhexoses in *Yersinia pseudotuberculosis*. Purification and stereochemical analysis of CDP-D-glucose oxidoreductase. J Biol Chem 267: 5868-5875

Zarkowsky H, Glaser L (1969) The mechanism of 6-desoxyhexose synthesis. III. Purification of deoxythymidine diphosphate-glucose oxidoreductase. J Biol Chem 244: 4750-4756

6. Anhänge

Anhang 1: Vergleich von EryBI aus <i>Sac. erythraea</i> mit β -Glucosidasen.	135
Anhang 2: Vergleich von EryBII aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	137
Anhang 3: Vergleich von EryBIII aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	138
Anhang 4: Vergleich von EryBIV aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	139
Anhang 5: Vergleich der beiden Glycosyltransferasen EryBV und EryCIII aus <i>Sac. erythraea</i> mit weiteren Glycosyltransferasen.	140
Anhang 6: Vergleich von EryBVI aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	142
Anhang 7: Vergleich von EryBVII aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	144
Anhang 8: Vergleich von EryCI aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	145
Anhang 9: Vergleich von EryCII aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	146
Anhang 10: Vergleich von EryCIV aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	147
Anhang 11: Vergleich von EryCV aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	148
Anhang 12: Vergleich von EryCVI aus <i>Sac. erythraea</i> mit homologen Genprodukten.	149
Anhang 13: GenBank Eintrag des 3,7 kbp <i>Apa</i> I-Fragmentes (Acc. No. AF210634) aus genomischer DNA von <i>S. fradiae</i> .	150
Anhang 14: Codonverwendung und G + C-Gehalt der Gene <i>tylCVI</i> und <i>tylR</i>	152
Anhang 15: Vergleich von homologen potentiellen 2,3-Dehydratasen	153
Anhang 16: Vergleich von <i>TylR</i> aus <i>S. fradiae</i> (Acc. No. AF210634) mit dem homologen Genprodukt <i>AcyB2</i> aus <i>S. thermotolerans</i> (Acc. No. JC2032).	155
Anhang 17: DNA-Sequenz des Gens <i>midL</i> aus <i>S. mycarofaciens</i> und die zugehörige Aminosäuresequenz des abgeleiteten Genproduktes <i>MidL</i> .	156
Anhang 18: Codonverwendung und G + C-Gehalt des Gens <i>midL</i> aus <i>S. mycarofaciens</i> ATCC 21454	158

Anhang 1

```

EryBI      MTGGERVK--R-----LVIRIAPLLLVLVPLLVAAVS-----PVRHSQRVDELIGQL
OleR              M
DesR      MTGKTRIPRVRGRRTTPRAFTLAVVGTLLAGTTVAAAAPGAADTANVQYTSRAAELVAQM
β-Glucosidase      MGTSDDEEIDRLLGKL
Cba              MTSQTALDPAALVASL
              :

EryBI      TLDEKLSFVYWDYNEKDPLAKLWLPGVPRLGIPQIRGTDGPAGVT----IH-QPAIAMPA
OleR      TLEEKLSFVHWSYHTSDESAKVYLPVPRLGIPEMRATDGPAGIT----IH-RPSLALPA
DesR      TLDEKISFVHWALDP-DRQNVGYLPGVPRLGIPELRAADGPNRIR----LVGQTATALPA
β-Glucosidase      TPRARALLNG-----ATTWRTRAEPAVELRELVMSDGPAGVRGEAWDERSTSLLLPS
Cba      PLETKVRLLTG-----ATAFTLAPEESIGLGEVRLSDGPTGVRGLKFSGGRTVALFPN
              .   :   ::           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
              :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

EryBI      PVALASAFDDRLAHEYGTVLGREGRAFEQDIILGPMVNNIRVPQAGRNFETFSEDPLVTA
OleR      PVALASTFDDGLARSYGAVIGREGRAFGQDVVFAPMVNSIRVPYAGRNFETFSEDPLVTS
DesR      PVALASTFDDTMADSYGKVMGRDGRALNQDMVLGPMMNIRVPHGRNYETFSEDPLVSS
β-Glucosidase      ASALAATWDEALVEDLGGLLAAEARRKGVVDVLLAPTLNLHRSPLGGRHFCELSDEPELTG
Cba      ATLLASAWSEESTTEVGRLLAEALAQQIHVVVLGPTINLHRSVLGGRLFEAYSSEDPLLTG
              .   **::: . . * :: . . . . . : * * . ** : * **** ::

EryBI      RTAAAIQIRGIHSQGLMTSAKHAAANTQETDRFTIDVDVDQRTLRELELPGFEAAVAAG-A
OleR      RMAAAEIKGIQSQGLIAATKHYAANNQEKNRFSVNVNDEQTLRERELPGFESAVAAG-T
DesR      RTAVAQIKGIQAGLMTTAKHFAANNQENNRFSVNAVDEQTLREIEFFAFEASSKAG-A
β-Glucosidase      RIGAALVRGIQAHGVAATAKHVANDSETDRLTVDVRVGERALREVYLLAPFEAAVAAG-V
Cba      RLAAAYVRGLQDLGVGACLKHLVANESETERNTMNSVVDPATLRELYLLPFEIIVDESDEP
              * ..* ::: * : : ** .** .*: * : : * . :*** : ** : .

EryBI      TSVMCAYPKVNGTHACGHRQLLTELILKEQWGFKGWVMSDWTATHATEDLVAGLDQEMGVE
OleR      GSVMCAYNKVNGQPACGSDELLNKVLKEQWKFRGWVTSDWLATQSTDALTKGLDQELGIE
DesR      ASFMCAYNGLNGKPCSGNDELNNVLRQTQWGFQGWVMSDWLATPGTDAITKGLDQEMGVE
β-Glucosidase      RLVMAAGYNAVNGTTMTAN-ALLTDPLKSEWGFQGVVSDWGAVRGTGTAR-----AGLD
Cba      WSVMAAYNDVNGVPATEHHHVNEVLKGEWGYTGLVMSDWFAITRPAAPAAA-----GGLD
              . *..* : **           : : . * : * * * * * . : . * : :

EryBI      VREDGS----LFRGKYLGEALKKAIREGRIPESALDASVRRILTQFERFGLLD-----
OleR      LDHEPAPGEPPIPGGKFFGDPLKTAIREGRIPESALDEAVTRIVSQMARFRLLD-----
DesR      LPGDVPKGEPSPPAKFFGEALKTAVLNGTVPEAAVTRSAERIVGQMEKFGLL-----
β-Glucosidase      LAMPGP-----DGPWGEALARAVAEGAVPEPAVDDKARRLLRLAALWLGALGGRDVSRS
Cba      LVMPGP-----DGPWGDALVAAVRSGELDESVDHDLRLLVLAARVVALG-----
              :   .           * : . * * : * : * : * : * : * : * : * : *

EryBI      ---ETKPPRPERDVAGGTR-----IAQEVAE
OleR      ---EDPPARPARDLAGGLK-----VARQVAE
DesR      ---ATPAPRPERDKAGAQA-----VSRKVAE
β-Glucosidase      PVPGRPADSPGAEGADGGAGAGPSSGAEGLPGRGPAHGAKPSGPRRRAGDGRALARRAV
Cba      DLRDYPDDLPAAPDSAVRRE-----QLTRLAA
              *   :   *

EryBI      SGAVLLRNEGGVPLDPAAGQDIAVIGPSAQPKVTGLGSSYVEPDFANAPLDTITQRV
OleR      DGAVLLRNEGATLPLTTETAADIAVIGPTAKVPKVTGLGSSYIVPDGASAPLDTIRERAG
DesR      NGAVLLRNEGQALPLAGDAGKSIAVIGPTAVDPKVTGLGSAHVVPDSAAAPLDTIKARAG
β-Glucosidase      AAGAVLLANKDVLPLDPEHLGTVAVIGAHAARTRTQGGGSAGVFPRGEVSVLDGIRAELE
Cba      AGMTVLTNADDTLPLARGTR--VALVGRHALETIDMGGGSATVNPYPYQVVAEGLTALLG
              . . : *           . ***           : * : * * * * * * * * : : * : :

```

EryBI	SGGRVGYSVGEELKGAPIETA-LQPAFVPGE-----
OleR	AGSTVRYSTGEETVGVFVQSAFLPRRPSGE-----
DesR	AGATVTYETGEETFGTQIPAGN-LSPAFNQGH-----
β-Glucosidase	GRARVVHVPGPRPDGPAPLPDPTCTDPRSGLPGVLLRMLDADGRELYAERRRGGRLLEP
Cba	DAVDVVDGVEVRTR--PVPARPGFVVDPTGRPGLHLLTLLAADG-TVLDERHDAPSTVMV
	* . * *
EryBI	VTPPPSGGVIYDGRKVDADGLYRIAARIDGG-----NGSLQI
OleR	VFPAGGGGVLYDGTITVPTGGSYRIAARAQGG-----NAYVEL
DesR	QLEPGKAGALYDGTLTVPADGEYRIAVRATGG-----YATVQL
β-Glucosidase	RLVPGAHTVEIRARLCPRTGGSWSLGVAGFGR-----MSLTTDGRTLLEGEF
Cba	GFDDDFPQAVARVFRARVAGEALEVGAIGVGRWQVTAGGTELAWTLATSGTGFAEEML
	. : . * : . *
EryBI	DGGAPIGVG-DVFGPLTSPVWLTKEHTIQMTGAAPVGGGSLDVD-----LTWV
OleR	DGQEPFGRRPWYGDVSSRPMRLAAGTHKLRITGAA-LAKSPMTFE-----LTWV
DesR	GSHTIEAG--QVYGVVSSPLLKLTGKTHKLTISGFA-MSATPLSLE-----LGWV
β-Glucosidase	PPSTDDPAVMHVNPPAQYATADLTAGRDTLVARRELAPGTGRATV-----LVAAP
Cba	APPTRTDQVHVGSDAVVDATVVLRSSTRSVTVGDADPGTDAGAAAEPLAGVGLFGLVARP
	* . . : :
EryBI	TPGHAQREFDAEVERARDSDVAVVFA---YDDGAETADRTSLSLPGTQDKLIDAVASVNP
OleR	TPQAAQEAIIDRAVSIARTARTAVVFA---YDDGSEDGDRSLSLPGRQDDLI SAVAANP
DesR	TPAAADATI AKAVESARKARTAVVFA---YDDGTEGVDRPNLSLPGTQDKLISAVADANP
β-Glucosidase	PAPDVTASLAEAVRAAGAADA VVVVGTTEHGESEGYDRDLDALGATQDALVRVAAAANP
Cba	APEAEDDVI TRAAAAAQAADVAVVVVGLTEEEETESVDKSTIALPGAQDALVRVAAAAAR
	.. : * . * : .***. . : * * : . : * * * * * * * * *
EryBI	NTVVVLTGSSVTMPWLDKTRAVLDMWYPGQAGAEATTALLFGDAEPGGRLTQTFPVSQE
OleR	RTVVVLTGSSLTMPWLKTA AVLTMWYPGQAGAEATTALLFGDADPGGRLTQTFPADEG
DesR	NTIVVLTGSSVLPWLSKTRAVLDMWYPGQAGAEATAALLYGDVNP SGKLTQSFPAEEN
β-Glucosidase	RTVAVVNSGGPVELPWREQAGAVLLAWFPQEGGGGLADVLFGHAEPGGRLPTTWPVAVLA
Cba	RTVVVVNAATPVLMPWLDDVDVAVLWAGLPGQEGGHAVAAALLGDQEPTGRLVTTFFPAADG
	.* : . * : . : * * . . *
EryBI	RTPVGGDPAFPVGDGKVHYSEGI FSGYR-WYDREGVDPLFPFGHGLSYTTTFERTDPVVE
OleR	QTPFAGDARRYPGVDDQLDYSEGI YSGYR-WYEQQGVQPLFSFGHGLCYTSFDYRDLKVT
DesR	QHAVAGDPTSYPGVNDQQT YREGIHVGYR-WFDKENVKPLFPFGHGLSYTSFTQSAPTIV
β-Glucosidase	DAPVTRTRP----DGGRLDYDEGLHLGHRG-WLRHHRTPAYWFGHGLGYTTWRYEELTVP
Cba	AAPAWSVTP----VDGDLEYTEGRFVGYRGHWADRAPAPAFWLGHGLGYATWEYADATLD
	. . . * * * . * : * : *
EryBI	R--TRDG-LDVTVTVRNTGQRRGSDVVQVYLGPSQPVLDPQAPRQLAGYQKVELAPGETK
OleR	A--TADGGLDVCFTLRNTGTRTGKEVPQVYVGPSPHVRVAQAKRALAAYGKVELRPGESR
DesR	R--TSTGGLKVTVTVRNSGKRAGQEVVQAYLGASPNVTAPQAKKKLVGYTKVSLAAGEAK
β-Glucosidase	PVTRAGDGLTVRVRVNTGARAGREVVQVYLARPASA-LDRPARWLAGYTAVRARPGETV
Cba	---TDGDAPAVTVTVTNTGARTSREVVQVYLEPASS---DEPVR-LVGWADATVDAGASA
	. * . : * * * . : *
EryBI	RVRVHVAERALQHWDEAAGGWKLGKRAVEIGSSSRDIDLADINL
OleR	RLTLHVERRALQNWDGSAHTWVTGPG-RQVMVGPVSLGRLPLSATAP
DesR	TVTVNVDRRQLQTGSSSADLRGS----ATVNVW
β-Glucosidase	TATVRVPARALRHWSVAEHAWRTEAGPCRVLAGRSAGDVPLAAEVEVVPTASA
Cba	RVTVTADARMWRRWDEAAGGWSRLADGGRLLVARGLDVVR---ATLALPTA
	: . * : . . :

Anhang 1: Vergleich von EryBI aus *Sac. erythraea* mit β-Glucosidasen. Zur β-Glucosidase OleR aus *S. antibioticus* S. (Acc. No. AF055579, Quiros et al 1998) besitzt EryBI 60,9% Identität; zu DesR aus *S. venezuelae* (Acc. No. AF079762, Xue et al. 1998) 56,9% Identität, zu einer potentiellen β-Glucosidase aus *S. coelicolor* (Acc. No. AL031013) 35,3% Identität und zur Cellobiose und β-Glucosidase Cba aus *Cellulomonas biazotea* (Acc. No. AF005277, Wong et al. 1998) 28,9% Identität. In allen Sequenzen identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*), stark konservative Aminosäureaustausche durch einen Doppelpunkt (:), und schwach konservative Aminosäureaustausche durch einen Punkt (.) unterhalb der Sequenzen gekennzeichnet (Thompson et al. 1994).

Anhang 2

EryBII	MTT-----DAATHVRLGRSALLTSRLWLGTVNFS-----GRVEDDDAL
TylCII	MS-----GMYVQLGRGATLVSRLWLGTVNFS-----GRVPDDQAI
AveBVIII	MMPTTAEPAPVQSDSNSSAPLHTELGRTRLRISRLALGTVNIG-----GRVEEPEAR
YrpG	MRVSRLCLGTMNFG-----VDTDEKTAF
MocA	MEYRLLGRSGLKVSTLTVGTMFTGGVGWAKTVGDLGVTEAK
	* * : ** : . . . *
EryBII	RLMDHARDRGINCLDTADMYGWRLYKGHTEELVGRWLAQGGGRREDTVLATKVGEMSE-
TylCII	RLMDEALDRGVNCVDTADIYGWRLYKGHTEELVGRWLR-GSGRRDDVVLATKVGEPMSD-
AveBVIII	RLMDHALAQGITLFDTANTYGWRVHKGYTEEVIGRWLADRPARREQVVLATKVGDPMGS-
YrpG	RIMDEALDNGIQFFDTANIYWGKNAGLTESIIGKWFAQGGQRREKVVLATKVEPISDP
MocA	RLVDLCLDAGINLIDTADVY----SDGKSEEILGEILG--GKRKGGALVATKARFNMGP-
	* : * . * : . *** : * * : * . . . * . : * : . . . *** . . .
EryBII	--RVNDS-GLSARHI IASCEGSLRRLGVDHIDVYQMHHIDRSAPWDEVWQAMDSLVASGK
TylCII	--RVNDR-GLSARHVIRSCEASLRRLGVDHIDLYQMHRMDRTVRWDELWQAMDQLVASGK
AveBVIII	--GPNDH-GLSVRNIVAACDASLRRLRTDWIDLYQLHHIDRRAGWDEVWQAMDLLITQGK
YrpG	NDGPNDRGLSLYKIRRHLEGLSKRLQTDHIELYQMHHIDRRTPWDEIWEAFETQVRSRK
MocA	--GPNDG-GLSRQYLIAACEASLRRLKTDVIDLYQLHEWDGQTPLEETMEALDTLVRQGK
	** *** : . : ** : * * : * : * . * . : * : * : : . **
EryBII	VSYVGSSNFAGWHIAAAQENAARRHSLGMVSHQCLYNLAVRHAEEVLPAQAAYGLGVFA
TylCII	VRYIGSSNFAGWHLAAGQESAARRGSLGLVSEQCLYNLAVRHAEEVLPAARAYGIGVFA
AveBVIII	VRYVGSSNFAGWDIASAQEAARRRNALGLASEQCYNLVTRHAEEVIPAASAYGVGVLV
YrpG	VDYIGSSNFAGWHLVKAQAEAEKRRFMGLVTEQHKYSLLETAEMEVLPAARDLGLGVVA
MocA	VRYIGCSNFTGWQIMKALGISEKDKRQRFVSSQIHYTLEARDAEYELLPI SVDQGLGVLI
	* * : * . *** : * : . : : . . . * * * * * : * : * : * .
EryBII	WSPLHGGLLSGALEKLA---AGTAVKS-AQGRAQVLLPSLRPAIEAYEKFCRNLGEDPAE
TylCII	WSPLHGGLLSGALRKLA---EGTAVKS-GQGRAQRTLPALRDTIARYERFCARVGRDPAE
AveBVIII	WSPLHGGLLGGVLRKTR---ENTAVKS-AQGRAVEALEHRTTIAAYEDVCADHGLDPAH
YrpG	WSPLAGGLLGGKALKSN---AGTRT-----AKRADLIEKHRLQLEKFSDLCKELGEKEAN
MocA	WSPLAGGLLSGKHRRNQSAPEGSRQFAGWTEPPVRDEERLWNIVDTLLSVADGRGVSAAQ
	**** * * * . * : . : : . . . * . * .
EryBII	VGLAWVLSRPGIAGAVIGPRTPEQLDSALKASAMTLDEQALSELDEI-----FPAVASG
TylCII	VGLAWLLSRPGVSGAVIGPRTTGHLVLSALRAVELELSEEHRELEAL-----FPPVGS
AveBVIII	VGMWVLSRPGVTGLVIGPRTQHVVDGALHALRTPLEPEVLARLEEL-----FPPVGRG
YrpG	VALAWVLANPVLTAPIIGPRTVEQLRDTIKAVEISLDKEILRLNNDI-----FP--GPG
MocA	VALAWLIGRKAITSIIIGGRTEAQFKDNLAAADLQLSAEERKRLDDVSLQLLQPYWHQR
	* . : * : . . . : * * * . : . . : * * * : : * :
EryBII	GAPEAWLQ
TylCII	GEVPEAWQN
AveBVIII	GSAPDAWLS
YrpG	GETPEAYAW
MocA	NNASDRLSEADLELLAPHLKKG
	. . . :

Anhang 2: Vergleich von EryBII aus *Sac. erythraea* mit homologen Genprodukten. Die größte Sequenzidentität von 74,0% besitzt EryBII zu TylCII (Acc. No. AF147704, Bate et al. 1999), einer potentiellen NDP-Hexose 2,3-Enoyl-Reductase aus *S. fradiae*. Zu der potentiellen dTDP-6-Desoxy-4-keto-L-Hexose 2,3-Reductase AveBVIII (Acc. No. AB032523, Ikeda et al. 1999) aus *S. avermilitis* bestehen 61,5% Identität. Desweiteren besitzt EryBII 48,4% Identität zu YrpG mit bisher unbekannter Funktion (Acc. No. U93875, Sorokin et al 1997) aus *Bacillus subtilis* und 37,3% Identität zu MocA (Acc. No. U19620, Kim und Farrand 1996), einer potentiellen Oxidoreduktase aus *Agrobacterium tumefaciens*. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 3

EryBIII MIFLVG-----LGKCRICGNHDLSEVLHLGDQALTGVFPRNRDEIVPSVPLELVKCAPPG
 TylCIII MPAVPREDQMIISACRVCGNRELLPVLDLGEQALTGVFPRRTREETVPSIPLLELVKCSPOG
 DnrX MEPNESTCRICGG-RVREFFDFGRQPLSDYFPSEEE-LDNEFFFRFRLAVGMCVT
 PCZA361.22 MSVTSQCRICDG-TVKEFIDFGRQPLSDAFVVPD-EKGEFFFRFRLATGICDS
 SnoG MDNRETVRPVSVCRCVCGNDWQDVDFGDVPLANGFLSPADSYENERRYPLGVLSGRA
 . **:*.. . .:* .*.. * : . *

Motiv I

EryBIII CGLVQLRESADFGMLYNEGYGYRSGIRPFMINHLHGKVAKLRGMVPGPDDLVVDIGSND
 TylCIII CGLVQLRHTPDPLMYGEGYGYRSGIRPFMIGHLRRKVAIRELVDLGPDDLVLDIGSND
 DnrX CTMVQLLEEVPRDRMFYDYPYHSSGSRMREHFAATARRLIGTELGTGRDPFCVEIGSND
 PCZA361.22 CTMVQLMEEVPRDLMFHDAYPYLSSGSFAFMRTHFNELAKRLLTTELGTGDPFIVELGCSND
 SnoG CRLMSLTHVVDPEVLYR-DYAYTTPDSEMITQHMRHITALCRTRFELPPDSLVELGSNTG
 * :.* . : : * * : : * : . * : :.*.* .

EryBIII TLLRGYLPDAPKLAGFDLVGEKFRDLYPEADLVTGFFSADAFEERYGER-RAKVVTSIAM
 TylCIII TLLKAY-PEGRLVGDIPSGDKFRELYPPHAELIAEYFSRDVFTARFGTR-RARVITSIAM
 DnrX VMLRTVRDAGVRHLGVESPSGVADVSRAGEIQVRTAFFEESTAREIAQEHGPANVIYAANT
 PCZA361.22 IMLKAMAEAGVRQLGVESPSGVADLAAAKGIRVRKDFEETAADIRETDGPADVIYAANT
 SnoG RQLMAFREAGMRTLGVDPARNLTDVARRNGIETFPDFFSHDVARTIRRDHGQARLVLRHV
 * . : *.: :*. . * :. .

Motiv II

EryBIII FYDLPEPMRDMRDVHDILADDGLWLMEQSYLPSMLDAGAYDVVCHHEHLEYALAQIEWMAQ
 TylCIII FYDLPDPLAFMRDVHDVLDADDGIWVMEQSYLPAMLEADAYDIVCHEHLEYALQIEWMAE
 DnrX ICHIPYLDVSVFRGIDALLAPDGVFVDFEDPYLGDIVEKNTFDQIYDEHFYLFRTARSVSTTAQ
 PCZA361.22 LCHIPYMDSILKGVTTLLGPNVGFVDFEDPYLGDIVERTSFDQIYDEHFFFTARSVQEMAK
 SnoG FAHIDVDSDIAAGVRELLSPDGVFAIEVPYVLDLLEKVAFDTIYHEHLSYFTMRSFVTLFA
 : . : . :.* :*.: * .*: :.* : .** : : . .

Motiv III

EryBIII RVGLKVVDAEITDVYGGSLCAVLAKQSGHPVDEAGLERIRAREAAKLDTMAPYEAFARE
 TylCIII RAGLTVLRAELTDVYGGSLCVTLARASSPHPRDEAGPARIRARETEAKINTMAPFEFARR
 DnrX HGFELVDVERLPVHGGEVRYTIARAGRRQPS--PRVGEIAEESRRGLADLTLEKFGAQ
 PCZA361.22 RNLGELVDVERIPVHGGEVRYTLALAGARQPT--EAVAELLAWEAERKLAEYATLERFATN
 SnoG RHGLRVLVDVERFGVHGGSVLVFGVHEDGWPWER-PSVPELLRVERQRGLYDDATYRTFAQR
 : * : :.* * :*.: :. . * :. : * : :. . * . .

EryBIII TERQRDQLLEFLAKSRAEGKLTLYGASTKGNVILQYCGLTEQDLPCIGEVSPKSGCYTP
 TylCIII VEHQDALRDFLDRSRAAGRLTLGYGASTKGNVILQYCGIGERDLPCIGEVSPKAGRFTP
 DnrX VKRVCCDLVARLRELRLDLGFVYVGYGATAKSATVNLNYAGIGPDLLPCVYDTPPAKIGRRLP
 PCZA361.22 VKKIKDDLIALLTKLRAEGKRVVGYGATAKSATVNFNFCGTPDLVEFISDTPPAKQNRLLP
 SnoG IERVTELPELLRSLVAQGRIVGYGAPAKGNTILTVCGLGLKELEYCTDTTELKQGRVLP
 : : * * * :****.*. :. :.* : : :. : * . *

EryBIII GTGIPIVSEEEAKSRPDQLLVLPWIYRDGFVEREQEFLAGGGKLIFFLPRLEV
 TylCIII GTGIPIVSEEDAKAMRPDQLLVLPWIYREGFVERERDFLAGGGRLVFFLPRLDV
 DnrX GSHIPIRSAEEFRAPYPDYALLFAWNHLDEVQAREAETFKQGRWIRSG
 PCZA361.22 GQHIPVREPKEFAADYPDYALLFAWNHADEIMNAEQAFRDAGGQWILYVNVHVS
 SnoG GTHIPVHAPEHAKEHIPDYLLLAWNYATEILDKETAFRDNGGRFVPIPRPSILTSPPSGS
 * ** : :. ** * :.* : . * * ** : :

Anhang 3: Vergleich von EryBIII aus *Sac. erythraea* mit homologen Genprodukten. Die mit Abstand größte Sequenzidentität von 71,8% besitzt EryBIII zu TylCIII aus *S. fradiae* (Acc. No. AF147704, Bate et al. 1999). Zu SnoG (Acc. No. AF187532, Torkell et al. 1997) aus *S. nogalater*, bestehen 30,3% Identität, zu DnrX (Acc. No. AF048833, Lomovskaya et al. 1998) aus *S. peucetius*, 28,3% Identität und zu dem hypothetischen Protein PCZA361.22 (Acc. No. AJ223998) aus *Amycolatopsis orientalis* 27,8% Identität. Sequenzbereiche, die Consensussequenzen von SAM-abhängigen Methyltransferasen darstellen, sind fett hervorgehoben und nach Gandeche et al. (1997) mit Motiv I bis Motiv III bezeichnet. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 4

EryBIV	MNGIS----	DSRQLITLL GASGFVGS AVLRELRDHPVRLRAVSRGG
TylCIV	MSMPLVPGPARD	GRRPLVVLL GASGFLGS AVAAELARRPVRLRLVARRP
AveBIV	MGRFVCP	PPRPTGILKSMLTGMCDRPLVVVL GASGYIG SAVAAELARWPVLLRLVARRP
PCZA361.4		MKLITV L GASGFIG SAVTRALAQQPIRLRAVARR-
GrsB	MTGADVP---	GRPPLVT V L GGVGLRGP WSWRRRCRGAPSGCAPVARGP
		.:: * * * * *
EryBIV	APAVPPGAAEVEDL	RADLLEPGRAAAAIEDADVIHLVAHAAGGSTWR-SATS
TylCIV	SPVPAGAVAEIEV	RRRDLSPGEVTEAVEDADAVVHLVAHTGGEKSWR-AAGE--
AveBIV	GVVPPGAAETETRT	ADLTAASEVALAVTDADVVIHLVARLTQGAAR-AAESDPVAERV
PCZA361.4	QFTPAPGQAETTV	VAADLDRVALADAVAGSDAVVYLLL--S-DGGWR-AVETED-AERV
GrsB	VAVPRGARADVERCT	GDLTDRDVLRAAVAGSDAIVHLVSH---GAGWRGEGASDEALGRA
	.	. * : * * * * * * * * :
EryBIV	NVGLMHDLVGALHDR---	RRSTPPVLLYA-STAQANPSA-----ASR----- YAQQKT
TylCIV	NVGLMRELAEALRPT	GADATRAPVLLFG-STLQAGMEQA-----HTPG----- TYAAQKL
AveBIV	NVGVMHDVVAALRSGRR--	AGPEPVVVFAGSVYQVGRPGR--VDGSEPDEPVT YA QKL
PCZA361.4	NVGVMRDLIDVTGSDN---	GTPPVVVFGGTVSQVGVPPREPLDGSEPDNPAT YDIQKL
GrsB	NAGVMSALLEALLERG-	HARGAAALVLFAGSTSQAGPGAPIPVDESAPDAPT SPYDRQKQ
	.:* : : . * . . * * *
EryBIV	EA E ERILRKATDEGRV	RGVILRLPAVYQSGPSGPM-GRGVVAAMIRRALAGEPLTMWHDG
TylCIV	AA E RVLHRADAEGAVR	GVVLRLLTVIGRSPLTGSP-GRGVIAVTAGRALAGDPITMWHDG
AveBIV	DA E RTLKSATVEGVLR	GISLRLPTVYGAGPGPQGN---GVVQAMVLRALADEALTVWNGS
PCZA361.4	TAEQILKKATANGQVR	GISLRLPTIFGETTAQGANHDRGVVSSMARRALDGQALTIWGDG
GrsB	AA E RELLAAAAQGTVR	GASLRLPTVYGRGAPAGRK-DRGVLAAMVRRALAGEPLTMWHDG
	**:* * * * :	* *
EryBIV	GVRDDLHV	EDVATAFAAALEHHDALAGGTWALGADRSEPLGDI
TylCIV	SVERDLLDVRDAATA	FTTAALEHADQLRGKHWVVGTRRRHLDRVFGTVAALAAEHTGRPP
AveBIV	VVERDLVHVEDVAQAF	VSCLAHADALAGRHLLGSGRPVTVPHLFGAIAAGVSARTGRPA
PCZA361.4	SVRRDVHVEDVAAAF	TAAANPDSLIVGGHWLIGAGRGDQLGEIFRLVAREVAEQTGQRP
GrsB	SVLRDLLHVDDTARA	FLAALDHPEAVTGRHWVLGTGQGEPLGRVFRSIADGVAARTGRPP
	* * * * . : *	* *
EryBIV	VDVVTVP	PAPEHAEANDFRSDDIDSTEFRSRTGWRPRVSLTDGIDRTVAALT-----PTEE
TylCIV	VPVVTVD	PPGYAEVCDFRTPDSDPSAFRAVTGWRPRAEPADGIAAAIAAVAGAGDSPEPE
AveBIV	VPVTA	VDPAMATAADFHGTVDSSAFRAVTGWRPRLSLQEGLDHMVAAYV
PCZA361.4	VEVTC	VEPPSHAPEMDFRSVTIDSSPFRAVTGWRPEISLSEGVRRRTVAALTT----S-VH
GrsB	VPVTA	VPPPAAHALPTDLRSTVANSTRFRTAEGWRPLTPLDAGLADLIADLAD----APPD
	* * . * * *	* *
EryBIV	H	
TylCIV	GAGKRGGGTERR	
AveBIV		
PCZA361.4	GKARA	
GrsB		

Anhang 4: Vergleich von EryBIV aus *Sac. erythraea* mit homologen Genprodukten. EryBIV besitzt 50,3% Sequenzidentität zu AveBIV (Acc. No. AB032523, Ikeda et al. 1999) aus *S. avermitilis*, 48,6% Identität zu TylCIV (Acc. No. AF147704, Bate et al. 1999) aus *S. fradiae*, 47,7% zu dem hypothetischen Protein PCZA361.4 (Acc. No. AJ223998) aus *Amycolatopsis orientalis* und 43,5% Identität zu GrsB (Acc. No. AF128273) aus *S. griseus*. Die stark konservierten Motive GxxGxxG und YxxxKxxxE sind fett hervorgehoben. Sonstige Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 5

EryBV MRVLLTSFAHRTHFQGLVPLAWALRTAGHDVRVAAQPALTDVIGAGLTAVPVGSDHRLF
 EryCIII MRVVFSSMASKSHLFGVPLAWAFRAAGHEVRVVASPALTEDITAAGLTAVPVGTDVLDLV
 OleG2 MRVLLTCFANDTHFHGLVPLAWALRAAGHEVRVASQPALSDTITQAGLTAVPVGRDTAFL
 OleG1 MMTTFAANTHFQPLVPLAWALRTAGHEVRVVSQPSSLDVVTQAGLTSVPVGTAPVE
 DnrS MKVLVTAFAMDAHFNGVVPLAWALRAAGHDVRVASQPALTDSTITRAGLTAVPVGTDHQQV
 SnogE MRVLLTSFAMDAHFCTAVPLAWALRSAGHEVRVAGQPALTSTITGAGLTAVPVGRDHTHG
 TylMII MRVLLTCIAHNTHYYNLVPAWALRAAGHEVRVAAQPALTDITASGLTAVPVGGNESVL
 DesVII MRVLLTSFAHHTHYGLVPLAWALLAAGHEVRVASQPALTDITGSGLAAPVGTDLHLI
 DauH MRVLFATMAARSHVYAQVTLASALRTAGHEVLVASQPDLDDIVRAGLTRVRIGEDLNIE
 : : : : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

EryBV DIVPEVAAQVH--RYSFYLDYFHREQLHSWEFLLGMQEATSRWVYPVNNDSFVAELVD
 EryCIII DFMTHAGHDII--DYVRSDFSERDPATLTWEHLLGMQTVLTPTFYALMSPDTLIEGMVS
 OleG2 ELMGEIGADVQ--KYSTGIDL-GVRAELTSWEYLLGMHTTLVPTFYSLVNDPEFVDGLVA
 OleG1 QFAATWGDDAY--IGVNSIDFTGNDPGLWTPYLLGMETMLVPAFYELLNNEFVDGVVE
 DnrS AAMGAMAPGVF--ALHLNPDYLENRPELDDLEFLEASTSMLTAAFYAQINNDMSMIDEMVD
 SnogE SLLGRVGS DIL--ALHDEADYLEARHDALGFELKGHNTVMSALFYSQINNDMSMIDEMVD
 TylMII EEFVTEIGGDPG--PYQRGMDFAEITCGEPLSYEHALGQQTAMSALCFAPFNCDSITDDMVA
 DesVII EYRVRMAGEPR--PNHPAIAFDEARPEPLDWDHALGIEAILAPYFHLLANNDMSMIDEMVD
 DauH EETREANASFEDDRNLGGLAMSNTRDDPLPWHALGMFTAMTAMVFQNVCPPEMVDLVD
 : : : : *

EryBV FARDWRPDLVLWEFPFTFAGAVAARACGAHARLLWGSDLTGYFRGRFQAQRLRRPPEDRP
 EryCIII FCRKWRPDLVIWEPLTFAAPIAAAVTGTPHARLLWGPDIITRARQNFLGLLPDQPEEHRE
 OleG2 LTRAWRPDLILWEHFSFAGALAAARATGTPHARVLWGS DLIVFRFRDFLAERANRPAEHRE
 OleG1 FARDWRPDLVIWEPLTFAAGVAARVTGAHARLPWGQEITLRGRQAFLAERALQPFHRE
 DnrS FAAWWRPDLVWEFPFTFGGAVAAQVTGAAQARLLWGPDLFLRVHDFRQQLVHEVPAERRD
 SnogE FARHWRPDLVWEFPFTFAGAVAARASGAHARLLSFPDLFLSTRRLFLERMARQPEPHHD
 TylMII LARSWRPDLVLWEFPFTYAGPIAAHACGAHARLLWGPDVILNARAQFRRLAAGQPEERRE
 DesVII FARSWQPDVLWEPTTYAGAVAAQVTGAAHARVLWGPDMVMSARRKFVALRDRQPEEHRE
 DauH LARDWRPDLVWDPLTLAGPVAARLSGAHARLLFGPDQMGRNRTAFRALLDRQRPSCVT
 : * : * * : : * : : . . . : * * * : * : * : * : * : * : *

EryBV DPLGTWLTVEVAGFRG----VEFGEDLAVGQWSVDQLPPSFRLDT--GMETVVARTLPYNG
 EryCIII DPLAEWLTWLTLEKYGG---PAFDEEVVVGQWTIDPAPAAIRLDT--GLKTVGMRYVDYNG
 OleG2 DPMAEWLWAAERLG----STFDEELVTGQWTIDPLPRSMRLPT--GTTTVPVMRYVPYNG
 OleG1 DPTAEWLGRMLDRYG----CSFDEEMVTGQWTIDTLPRSMRLELSEELRTLDMRYVPYNG
 DnrS DALEEWLTWTLERHG----AAFGEVVISGHWTIDQMPPSVRFAT--ARPTVPMRFVPYNG
 SnogE DTLAEWLDWTLGRHG----HSFDEEIVTGQWSIDQTPAPVRLDA--GGPTVPMRYVPYSG
 TylMII DPVAEWLWTLERHGLTAERETVEELIGGQWTLDPTAESLRLPA--AGRVVPPFRFVPYNG
 DesVII DPTAEWLTWTLDRYG----ASFEEELLTGQFTIDPTPPSLRLDT--GLPTVGMRYVPYNG
 DauH TRCAEWLTWTLERWRRQ-RLDMSEELVLGQWTIDPTPPSMRIPL--DLPCVPVRYVPYNG
 * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

EryBV --ASVVPDWLKKGSATTR-ICITGGFSGGL- AADADQFARTLAQLARFDGEIVVTGSGP
 EryCIII --PSVVPDWLHDEPERRR-VCLTLGISSREN-SIGQVSI EELLGAVGDVDAEIIATFDAQ
 OleG2 --RAVVPWVVRQARRPR-ICLTLGVSARQT-LGDGVSLAEVLAALGDVDAEIVATLDAS
 OleG1 --PAVVPWVWEP CERPR-VCLTIGTSQRDS-GRDHVPLDHLDSLADVDAEIVATLDTT
 DnrS PVPVAVPPWLRADPGRPR-VLLTQGITERSSTGFTGLPRAGELLASIAELDAEVVATVKA
 SnogE LVPTVVPDWLRRPPERPR-VLVTLGITSRRVKSFLAVSVDDLFEAVAGLGEVVATLDAD
 TylMII --RSVLPDWLRLKPRPR-VFCTLGVSARETYGRDAVPFHELLAGLDLDAEIVATLDPG
 DesVII --TSVVPDWLSEPPARPR-VCLTLGVSAREVLGGDGVSQGDILEALADLDIELVATLDAS
 DauH --PSLLPDWLREPPRHRRLCLTLGVS LGATGAGTVAASDVLAAVDGLDVEVVATLSRN
 : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

EryBV	DT----SAVPDNIRLVDFVPMGVLLQNCAAI IHHGGAGTWATALHHGIPQISVA-HEWDC
EryCIII	QLEGVAN-IPDNVRTVGFVPMHALLPTCAATVHHGGPGSWHTAAIHGVPQVILP-DGWDT
OleG2	QR-KLLGPVPDNVRLVDFVPLHALMPTCSAIVHHGGAGTWLTAAVHGVQPQIVLG-DLWDN
OleG1	QQERLRGAAPGNVRLVDFVPLHALMPTCSAIVHHGGPGTWSTAALHGVQPQIILD-TSWDT
DnrS	EREGLPP-LPGNVRVVDLSLHVLPSCAAVVHHGGAGTWATAALHGVQQLALA-WQWDD
SnogE	QRELLGR-VPDHFRIVEHVPLDAVLPPTCSAIVHHGGAGTWSTAAYVGVQPQVSLG-SMWDH
TylMII	QLSG-AGEVPRNVRAVDFVPMDALLPTCSAVVHHGGAGTCFTATLNGLPQIVVA-ALWDA
DesVII	QRAEIRN-YPKHTRFTDFVPMHALLPSCSAI IHHGGAGTYATAVINAVPQVMLA-ELWDA
DauH	CQEL--GTLPANVRAVDFVRLNALLPSCSGI IHHGSGTFMTALAHATPQLIVPDMMWDA
	* : * . : : .:: .*:. :****.*: ** . **: : **
EryBV	MLRGQQTAELGAGIYLR-PDEVDDADSLASALTQVVEDPTYTENAVKLRREEALS DPTPQE
EryCIII	GVRAQRTQEFAGIALP-PELTPDQ-LRESVKRVLDDPAHRAGAARMRDDLAEPSPAE
OleG2	LLRARQTAAGAGLFIH-PSEVTAAG-LGEGVRRVLTDPSSIRAAAQRVRDEMNAEPTPGE
OleG1	PVRAQRMQQLGAGLSMP-VGELGVEA-LRDRVLRLLGEPFRAGAERIRAEMLAMPAPGD
DnrS	VFRAGQLEKLGAGIFLPPHGE GASAGRVRDRLAQVLAEPSFRQGAARIRAEMLRTPAPGA
SnogE	FYRARRLEELGAGLRLP-SGELTAEG-LRTRLERVLGEPSTGTAQAALSDTIAAEPSPSE
TylMII	PLKGAQLAEAGAGVSI A-PEKLDAAAT-LRAGVVRALDDPSVATAAHLRREETFDPPTAG
DesVII	PVKARAVAEQGAGFFLP-PAELTPQA-VRDAVVRILDDPSVATAAHLRREETFDPPTAG
DauH	MEKAHGLARSGAGGYVD-AKDVS PDL-LRERVLDLFDPSYAAGARRVRAEIVGTSPND
	:. *** : . : : . : * : **:*
EryBV	IVPRLEELTRRHAG
EryCIII	VVGICEELAAGRREPR
OleG2	VVTVLERLAASGGRRGGGNHAG
OleG1	VVPDLERLTAEHATGAMAGR
DnrS	VVPTLEQLTARHRAPAGQVVRH
SnogE	VVPVLEELTGRHRPGTREPFRALRA
TylMII	LVPQLERLTALHRNGRSRSAPER
DesVII	IVPELERLAAQHRRPPADARH
DauH	IVPVLERLTAEHQAGGPERSPALKSPSTGGA
	:* *.*:

Anhang 5: Vergleich der beiden Glycosyltransferasen EryBV und EryCIII aus *Sac. erythraea* mit weiteren Glycosyltransferasen. Die höchste Sequenzidentität von EryBV besteht zu der Oleandrosyltransferase OleG2 (Acc. No. AJ002638, Doumith et al. 1999) aus *S. antibioticus* mit 50,6%. Zu der Desosaminyltransferase OleG1 (Acc. No. AJ002638, Doumith et al. 1999) aus *S. antibioticus* besitzt EryBV 44,0% Identität, 48,4% zu der Desosaminyltransferase DesVII aus *S. venezuelae* (Acc. No. AF079762, Xue et al. 1998), 43,5% zur Desosaminyltransferase EryBIII (Acc. No. Y14332) aus *Sac. erythraea*, 45,1% zu DnrS aus *S. peuceitius* (Acc. No. AAD15267, Otten et al. 1995), 39,5% zu DauH (Acc. No. U43704, Dickens et al. 1996) aus *Streptomyces* sp. C5. Zur Mycaminosyltransferase TylMII aus *S. fradiae* (Acc. No. X81885, Gandeche et al. 1997) beträgt die Identität mit EryBV 47,0% und zur Glycosyltransferase SnogE (Acc. No. AF187532) aus *S. nogatater* 45,6%. Die Sequenzidentität von EryCIII zu OleG2 (Acc. No. AJ002638) beträgt 54,4%, zu OleG1 (Acc. No. AJ002638) 54,1%, zu DesVII (Acc. No. AF079762) 51,7%, zu TylMII (Acc. No. X81885) 49,3%, zu SnogE (Acc. No. AF187532) 49,4%, zu DnrS (Acc. No. AAD15267) 46,9% und zu DauH (Acc. No. U43704) 42,6%. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 6

```

EryBVI      MRVLIDNARRQQAEPSTTPQGESMGDRGTGDRTIPESSQTATRFLLGDGGIPTATAETHDW
OleV        MIWGIPAMS---EAMG-----SVPTAGSEVS-----STCAFLSW
gra-ORF27   MR-----I-----T-----DTAGFHAH
AveBVI      MSVRADADHTEPSTAHRAARRRPARVPRPLRRRGRHR-----RRTSLDAFTGW
LanS        MLSSLVRTGSGTGRLRPRHDPVAERIAASAAAVTG-----ASLRTEDFPQW
PCZA361.3   MSSFVVPSTLAVRPRDHHDYADRIALSAATTDG-----VQMRTEDEVRAW
DnmT        MTAQIARSVLARDGLGS-----GMDRFWAW
ORF3        MRRHSAAATTVQIARSVLARDGLCS-----GMDRFWAW
SnogH      MTKLSAHPAAPAHGAVPDPPLRLAASARSAGVWLP-----RTTEVVHHW
                                                    *
    
```

SBerA



```

EryBVI      LTRNGAEQRLEVARVFPFSAMDWSFQPEDGRLAHESGRFFSIEGLHVRT-----NFGWRR
OleV        LDARRRANRLTVEHVFPFRELSGWQFDENTGNLRHTSGRFFSIEGLRVRT-----DHCWFG
gra-ORF27   FAERGAHRYRITRTPPLHDLEGWYTPASGDVRRHRSGRFFSIEGLRYGR-----QEPDGP
AveBVI      WTRRSGAHRFRVERIPFHGMDAWSFHPGTGNLAHRSGRFFSVEGLHVGR-----GEQPPF
LanS        LEGRRRAHRFTVDRI PFDALDGWSFDDATGNLVHRSGRFFSVEGLHVTR-----DEGPHR
PCZA361.3   IAERRDANVFHVERIPFADLDQWWFEGVTGNLVHRSGRFFTIEGLHVIEHDGPHGDGPYR
DnmT        YADRSAQVVHRTERIPDDLDKGWSRHPVTGTVSHHTGRFFSIEGLDVHIP-----G-APVP
ORF3        YAERSARVVHRTERIPDLALKGWSRHPVTGTI SHHTGRFFSIEGLDVHIP-----G-APVP
SnogH      LATVQGQHARAQVERVPLAELDGWLRDPATGNIAHRSGGFFTVEGLDVTIP-----R-APVP
          : * : . : * . * : * : * * * : * * * * *
    
```

```

EryBVI      DWIQPIIVQPEIGFLGLIVKEFDGVLHVLAQAKAEPGNINAVQLSPTLQATRNSNYTGVHR
OleV        SWTQPIIVQPEIGILGLLVKRFDGLIHLVIVQAKNEPNIIGGLQLSPTVQATRNSNYTRVHR
gra-ORF27   AWTQPIIRQPETGVLGVLIKWFDGVPHLLMQAKMEPGNINTLQVSPVQATFSNYTRVHH
AveBVI      EWQQPIIHQPEIGILGILAKKFDGVLHFLMQAKMEPGNINLVQLSPTVQATRNSNYTKVHG
LanS        EWYQPIIKQPEVGILGILVKEFDGVLHFLMQAKMEPGNRNLLQLSPTVQATRNSNYTKVHK
PCZA361.3   EWQQPVIRQPEVGILGILAKEFDGVLHFLMQAKMEPGNPNLVQLSPTVQATRNSNYTKAHG
DnmT        RWSQPIVNQPEVGILGFLVKERHGVHLHCLVQAKFEPGNPGLQLSPTVQATRNSNYTRVHG
ORF3        RWSQPIVNQPEVGILGFLVKERGGIHLHCLVQAKFEPGNPGLQLSPTVQATRNSNYTRVPG
SnogH      HWEQPIINQPEVGLLGIVVKEFDGVLHCLMQAKLEPGNCNGIQLSPTVQATRNSNYTRVHR
          * * * : * * * * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

SBerB



```

EryBVI      GSKVRFIEYFNGTR-PSRILVDVLQSEQGAWFLRKRNRNMVVEVFDLPEHPNFRWLTVA
OleV        GGGVRYLEYFASPRGRVLDVLDVQSEQGSWFLHKKRNRNMVVEALDDVPLDDDFHWISLG
gra-ORF27   GSPVRYIDHFLTTPGAGDRVHYDALQSEQGSWFLGKRNRNIVVETTGEIPVHEDFCWVPRP
AveBVI      GAAVKYLEYFTQPR-RATVVVDVLQSEHGAWFHRKFNRNIVVETDEDVPLDDDFRWLTG
LanS        GADVKEYIEYFTQPG-RGRFIADVLDVQSEHGSWFFHKSNRNMIVEAVGVPLDDDFCWLTG
PCZA361.3   GTNVKLIIEYFAPPD-PERVIDVLDVQAEQGSWFFRKSNRNMIVETVDDVPLWDDFCWLTG
DnmT        GKAIPLYLEHFRDTAER-QVVADVLQSEQGSWFFYRKRNRNMIVQVIDEVPLHEDFHWLTG
ORF3        GKTIPSWSTSATPPDR-QVVADVLQSGQGSWFFYRKRNRNMIVQVFDEVPLREDFHWLTG
SnogH      GRPVPYLEHFQDPARRSRILADVRLQSEQGSWFFHKKRNRNMVVEVEEDIDVHDGFCWLSLG
          * : . . . * . * : * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

```

EryBVI      QLRAMLHHDNVNMDLRTVLACVPTAVERD----RADDVLARLPEG-----
OleV        GLRKLRLRPHLVNMDTRTVLSCLPPDP-----APDGRQPPAPAA-----
gra-ORF27   VMAELLRVDNLVNMDSRTVLAGLPDDP-----
AveBVI      QIGELMHRDNLVNMDARTVLA CLPTPF-----
LanS        QIGQLLHRDNLVNMDSRTVLA CAPFPD-----
PCZA361.3   QIAELMHEDETINMNSRVSLSCLPYQD-----
DnmT        QLHRLLGVENLVNMDARTVLA CLPFASEG AHPLADAE PAGADGPGG-GHPVVPAR-PDGG
ORF3        QLHRLLGVENLVNMDARTVLA CLPSRARERARWPTRSPPELTAPGASAHVVPVSLGPTAA
SnogH      QLHELLTVDNLINMDTRTVLSCLPFAHAG-----LAAVAAPGA-----D-----P-
          : : . : * * : * * * * *
    
```

```

EryBVI      -----SFQARLLHSFIGAGTPANNMNSLLSWISDVARREFFVQGRPLPDIERSGWIRR
OleV        -----PFAAAVTRSLTRGATALHTMGEILGWLTDESRRELQQRVPLEETAFSGWRRD
gra-ORF27   -----GEGSVPRR--AVEKPLHDTAALLHWFTGAKVRHRPERTTIPLSRVG--GWRRD
AveBVI      -----DEPAALHSDAELLSWYAAERSRHSVHARRVPLAGIP--GWTTG
LanS        -----DGADALLSDTELVSWFTAERSRHDVRAERVPLHDLF--GWVRG
PCZA361.3   -----ITPRALFSDVQLLSWFTNERSRHDVRRRIPLADV--GWKQG
DnmT        EGRVDTGFHRSLVRSAAAEGSLHSTVDIVSWIADLRSRTDVVTRPAALNALP--HWYER
ORF3        GLRWTPGFHHSVRSAAAEGSLHSTVDIVSWIATCAAG-PMWSPARQANSLP--HWIER
SnogH      -----FRRALVASCAPDGYSRHSISGLDLSWITDVRTRTEVRTEMVPLDGLR--SWRRT
          . : * :
    
```

EryBVI	DD--GIEHEEKKYFDVFGVTVATS DREVNSWMQPLLS PANNGLLALLVKDIGGTLHALVQ
OleV	DH--AIAHKDGDYFRVIGVSVRASSREVSSWSQPLLPVGPGLA AFVTRRIRGVLHVLH
gra-ORF27	DDRGEIVHETG RYFR IIGVDVEADSREVT SWSQPMLAPVGRGVVAFVSK EIHGERHLLVQ
AveBVI	AE--SIAHHADRYFRVAVRVEASNREVAAWTQPLIEPCGHGITAF LTRRIGGVP HLLAH
LanS	TS--TIDHELGRYFRVAVSVEAGSREVTGWTQPLFEPLGLGVTA FLTRRIGGVP HVLVH
PCZA361.3	AE--EIEHEDGRYFKVLAVAVKGSNREKISWTQPLVESVDLGVVA FLVRKIDGVP HVLVQ
DnmT	DG--AIAHESGRFLEVMADVTAASREVPGWSQPMIEPKDQGVAA FLVRRIDGVLHVLH
ORF3	DG--VIATRAGRFL EVMADVTAASREVPGWSQPMIEPKGRGVA AFVLRRIDGVLHALGT
SnogH	DE--RISHEDGGFFDVIGVRVTRGREVAEWTQPMIEPHAKGVVA FLVVRPIEGVLHVLVH
	* . : : : . * * . * * * : . . * : * : : * * * *
EryBVI	LRTEAGGMDVAELAPT VHCQPDNYADAPEEFRPAYVDYVLNVPR SQ-VRYDAWHSEEGR
OleV	ARTEAGLLNGPEMAP TVQCRPLNYRAVPAEYRPA YLDYVLSADPGR-IRYDTLQSEEGR
gra-ORF27	ARAEAGTFDAVELGPTVQCNPGNLPDG--APRPPYLDTVLTARPEQ-VLFDTVHSEEGR
AveBVI	GRVEGGFLDTIELGPTVQYTPRNYAHLTGPARPRFLDLVLEAAPDR-IRYAAVHSEEGR
LanS	ARVEGGFLDTVELGPTVQYTPDNYGHLTGEDRPPFLDLVLDADPAR-IQYEAVHSEEGR
PCZA361.3	ARVDGGFLDTVELAPT VQCTPLNYAHLPAEERPPFLDLVQNA PRSR-IRYEAIHSEEGR
DnmT	ARVEPGYVDVVEIAPT VQCTPGSLHALPAEARPRFLDAVLEAPPER-VRYATVLAEEGR
ORF3	ARVEPGYVDVVEIAPT VQCTPGSLHALPAGARPRFLDAVLEAPPEAACATTTDLAEEGR
SnogH	ARVEPGYVDIVELAPT VQCTPDSYERLPARARPLFLDEVLPARADR-VRFDAELSEEGR
	* . : * : . * * : * . * * : : * * . : : * * * *
EryBVI	FYRNENRYMLIEVPAD-FDASAAPDHRWMTFDQITYLLGHSHYVNIQLRSIIACASAVYT
OleV	FHHAENRYVVVEAEDD-FPVEVPRDFRWLTLHQILALLHHSNYVNVVEARSLVACIQALS
gra-ORF27	FYHAENRYLVLDG-DD-VPVDVPEDYTWMTVRQLTRAGRIGNLV DVEARTLLACVRTLPD
AveBVI	FLHAQARYLFVEADESQAPNDPPPGRWCTPGQLTQLLRYGRYVNVQARTLLSLLTTRAV
LanS	FLNAESRYLLIEADEEQAPLDPPAGFQWVTPAQLTSLVRHGHYVNVQARTLLACLNATAV
PCZA361.3	FLGVRARYLVIDADEA---IDPPPGYAWVTPAQLTALTRHGHYVNVVEARTLLACINAAAA
DnmT	FYHAVNTYMIVEADHD-IP-DGG-EYRWLTLHQLVGLLRHSHYVNVQARTLVACLHSLSV
ORF3	FHHAVENTYMIVEADDD-IP-DGG-EFRWLTLHQLVELLRHSHYVNVQARTLVACLHSLSV
SnogH	FYHARNRYLVAETDLA-AGFDHP-DFRWVTLAQLVELLRHSHYVNIQARSLVACLGLAT
	* * : . : . . * * * : . . * : : * : : :
EryBVI	R-----TAG
OleV	H-----GASR
gra-ORF27	H-----GASR
AveBVI	E-----L
LanS	L-----SG
PCZA361.3	Q-----PRGGA
DnmT	GS-PVTRS AVPSAPPR
ORF3	GHRPSTRS AVPSAPPR
SnogH	-----APPR

Anhang 6: Vergleich von EryBVI aus *Sac. erythraea* mit homologen Genprodukten. Die größte Sequenzidentität von 50,6% zu EryBVI besitzt OleV (Acc. No. AF055579) aus *S. antibioticus*. Zu SnogH (Acc. No. AJ224512, Torkkell et al. 1997) aus *S. nogalater* bestehen 49,5% Identität, zu AveBVI (Acc. No. AB032523, Ikeda et al. 1999) aus dem Produzenten von Avermectin, *S. avermitilis*, 47,2%, zum hypothetischen Protein PCZA361.3 (Acc. No. AJ223998, van Wageningen et al. 1998) aus *Amycolatopsis orientalis* 45,0%, zu LanS (Acc. No. AF080235, Westrich et al. 1999) aus dem Produzenten von Anthracyclin-Antibiotikums Landomycin *S. cyanogenus* 44,9%, zum Genprodukt des Orfs27 (Acc. No. AJ011500, Ichinose et al. 1998) des Granaticin-Produzenten *S. violaceoruber* 43,5%, zu DnmT (Acc. No. U77891, Scotti und Hutchinson 1996) aus *S. peucetius* 42,6% und zum Genprodukt von Orf3 (Acc. No. U43704, Dickens et al. 1996) aus *Streptomyces* sp. C5 bestehen 40,2% Sequenzidentität. Die Oligonukleotide SberA, SberB und SberC, die aus den grau hinterlegten hoch konservierten Bereichen der *eryBVI*-homologen Gene abgeleitet wurden, sind entsprechend ihrer Orientierung symbolisch als schwarze Pfeile eingezeichnet. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 7

EryBVII		MAGGFEFTPDPKQ-DRRGLFVSPILQD
DnmU		MKAREL-AVQGAYTFEPEVFP-DEGLFVSPFRE
SnogF		MESRTL-LVEGAHAFTPRVFP-DARGCFVSPFQQ
PCZA361.16		MQARKL-AVDGAIEFTPRVFA-DDRGLLILPYQE
AveBV	MTLGRPRRSSADRPAPPAGARATAAGVTVRRL-VVEGAVEFTPTVFP-DEGLFVTPYQE	
gra-ORF25		MDIQELREVPGAYVITPRQWP-DPRGTFEFESLRT
LanZ1		MQAVEA-KVPGVHVLAPWTGSKDERGAFFESLRT
TylCVII		MIITET-RVRDAYRITPEPIP-DHRGSLYESLRY
StrM		MRPLSVQGAWLSETRAFA-DDRGEFQELYS
OleL		MELLDVDGAWLYTPEIMR-DEGEFLEWFRG
TylJ		MRDTRPLGIEGAWVIQPEIHP-DDRGEFHAWFQS
		: . . * ** :
EryBVII	EAFVGAVGHR-FPVAQMNHIVSARGVLRGLHFTTTPPGQCKYVYCARGRALDIVDIRVG	
DnmU	DAFTAAGVGHPLFPVRQTNHSRSTRRGVVRGVHYTVTPPGSAKYVYCARGRSLDIVVDIRVG	
SnogF	TPVAEALGHRLFPVAQTNHSRSTRRGVVRGAHFTLTPPGIAKYVYCARGRARDYVIDIRVG	
PCZA361.16	EAFVEAHGGPLFRVAQTIHSMKRGVVRGIHYTVTPPGTAKYVYCARGKAMDIVIDIRVG	
AveBV	PVLSEAVGHR-FPTAQTCSVSRRGVVRGVHFTATPPGQAKYVHCARGRALDFVVDLRTG	
gra-ORF25	DLVSEAVGRP-FEVRQINYSTSRNTRLRGVHGVLI PPGQAKYVTCVRGALRDMVVDLRTG	
LanZ1	DLQDVVGHGHP-FEVKQINYSVSRNHLRGIHVSPTSPPGQAKYVSCVRGAFRDFVVDLRTG	
TylCVII	ETLRRATGHA-IEIRQVNHTVNRNTRLRGIHGTTPPGQKIVTCVRGAARTMVVDLRTG	
StrM	RSLRGALGYD-PGVAQVNRSVSRRGVLRGVHFAQLPPSQAKYVTCVSGAVLDVVVDIRTG	
OleL	RTFQEKIGHP-LSLAQANCSVSRKAFCAASTSPTPPGQAKYVTCASGTVLDVVVDVRRG	
TylJ	SEFRRLTGHS-FSVPQVNIIVSRKALRGIHFSEVPPGQAKYSACVQAGVEVVVDIRLG	
	. * * . : . ** . * * * : : * * *	
EryBVII	SPTFGKWDAVEMDTEHFRAVYFPRGTAHAFLALEDLMSYLVSTPYVAEYEQAIDPFD	
DnmU	SPTYGRWDAVELEPREFRAVYFVGVGHAFVALEDLTVMSYMLSGEYVQANELAVSVLDP	
SnogF	SPTFGQWDSVLLDDRNFRAMYFPVGVHAFAFALEDLTVMSYMLSGEYVADNELALSVD	
PCZA361.16	SPTFGQWDSVLLMDQDPRAVYLPVGVGHAFVALEDLTVMSYMLSRSYVTQDELALSALDP	
AveBV	SPTFGQWDSVLLDQERFRSVYLPVGVGHAFVALEDLTVMSYMLSSGYVPPQNEHALSPEDP	
gra-ORF25	SPTFGQSASTLLTPENGVAVHVAEGLGHGFLALTDTCISYALSTAHVPGTQFEIDPLDP	
LanZ1	SPTFGQYDVNLLDAASGRALYIPEGVGHGFLTLTEDACICYVLSSTYVPGTQIDIDPLDP	
TylCVII	SPTFGGHDDVVGQDAESGVAVYLPDGLGLGYVALADDCMNYLYTREYTPGMIIDIDALDP	
StrM	SPTYRAWAAVRLDDP-HRSLYVEAGLGHSMALTDVAVVYVLTSSQGYAAGREHGVHPLDP	
OleL	SPTFGRWAAVRLDAARHQGLYLAEGLGHAFMALTDVAVVYVLTSSQPYVAEAERAVDPLDP	
TylJ	SPTYGQWRAPVDEYNRTAVYVPAAGLGRAFVALTDRTTLVYVLTSSQPYVAEAERAVDPLDP	
	***: . : . * . : : * : : : * : : . : **	
EryBVII	ALGLPWPADL--EVVLSDRDRTVAVDLETARRR-GMLPDYADCLGEEPASTGR	
DnmU	ALGLPVPDGL--EPLLSGRDRAAPPLEQARAA-GTLPEYAACRAVESELWPPAGSRGDG	
SnogF	DLALELPGDT--PLLSERDTAAPTRELESD-GRLPRYECCVLEHDL--AG	
PCZA361.16	ALGLPIDIGV--EPIVSDRDRVAITLAEARQ-RLLPDYTTTQEIERRLTAVPVST	
AveBV	DLALPLGHHLGRAPILSERDRRAPTLQALRR-GMLPEYRASRGLDEKL	
gra-ORF25	DLALPWGFDE--PPLLSAKDAGAPSLRTALER-GILPRWLGR--GTP	
LanZ1	DLALPWGFTE--PPLISEKDRRTARSLAATLEA-GLLSEWPG---GN	
TylCVII	GLGLPWNLTE--PPVRSERDAAAPSLAEAAA-GTLPGYEQCLRAYPAM	
StrM	DLGIAWPDGI--EPVLSKDRQAPGIAEMERR-GLLPDYEECL-AFRRLCERGTG	
OleL	AIGIEWPTDI--DIVPVGEGTPTHRPWRPRRPGILPDYEGVPGALHRGGGRRGTGP	
TylJ	DLAIAWPEDV--ELLLSERDTRAPTLAEARR-GILPSYQEYR-EHHGLPPEHARR	
	: : : : . : : * * . :	

Anhang 7: Vergleich von EryBVII aus *Sac. erythraea* mit homologen Genprodukten. Die höchste Sequenzidentität von 59,3% besteht zu DnmU aus *S. peucetius* (Acc. No. AF006633, Otten et al. 1997). Zu AveBV aus *S. avermitilis* (Acc. No. AB032523, Ikeda et al. 1999) bestehen 58,2% Sequenzidentität, zu SnogF (Acc. No. AJ224512, Torkell et al. 1997) aus *S. nogalater* hat EryBVII 57,3% Sequenzidentität, zum Protein PCZA361.16 (Acc. No. AJ223998, Wageningen et al. 1998) aus *Amycolatopsis orientalis* 57,1%, zu StrM (Acc. No. X62567, Pissowotzki et al. 1991) aus *S. griseus* 47,7% und zu TylJ (Acc. No. AF055922, Fouces et al. 1999) aus *S. fradiae* 46,7%. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 8

EryCI	MDVPFLDLQ--AAYLELRSDIDQACRRVLGSGWYLHGPENEAFEAEFAAYCE
DesV	MSSRAETPRVPFLDLK--AAYEELRAETDAAIARVLDSEGRYLLGPELEGFEAEFAAYCE
OleN2	MDVPFLDLR--AAYLELKHDI DAATGRVLDSEGRYLLGPELAAFETEWAAAYCG
TylB	MTGLPRPAVRVPFHDLRDVHAATGVSEIIGGALLRVAARGRYLLGAELAAFEERFAEYCG
PCZA361.5	MTTRVWDYLTEYQAERADLLDAVETVFNSGQLVLGASVRGFEEAEFAAYHG
DnrJ	VSTYVWQYLNEYREERADILDVAVETVFESGQLILGTSVRSFEEAEFAAYHG
	:. : * * * : * . . . * * . : * *
EryCI	NAHCVTVGSGDALELSLVALGVGQGEDEVIVPSHTFIATWLGVPVG--AVPVPVEPE----
DesV	TDHAVGVNSGMDALQLALRGLGIGPGDEVIVPSHTYIASWLAVSATGATPVPVEPH----
OleN2	ARHCVAVGSGDALELALRAMDIGPGEDEVIVPAHTFAATWLAVSATGAEPVAVEPE----
TylB	NAHCVAVGSLDDARLALWALGVGGEDEVIVPSHTFIASWLAVSATGATPVPVEPGDPE
PCZA361.5	VEHCVSLDNGTNAIKLGLQALGVGPGDEVIVSNTAAPTVAIDGTGATPVFVDVDR----
DnrJ	LPYCTGVDNGTNALVLGLRALGIGPGEVTVSNTAAPTVAIDAVGATPVFVDVH----
	:. . . . * : * . * . . . * * * * . : * : : : * * * *
EryCI	--GVSHTLDPALVEQAITPRTAAILPVHLYGHPADLDALRAIADRHGLALVEDVAQAVGA
DesV	--EDHPTLDPLLVEKAITPRTTRALLPVHLYGHPADMALRELADRHLHIVEDAAQAHGA
OleN2	--PATFTLDPERVEAAITSRTRVILPVHLYGHPADLAALSEVAERHGVRILEDAAQAHGA
TylB	PGPGAFLDDPDRLEAALTPRTRAVMPVHLYGHPVDLDPVGAFAEPHGLAVVEDAAQAT-A
PCZA361.5	--EDDFLMDTSQVAAAITDRTKCLLPVHLYGQCVNMAPLKEKELATKHGLSILEDCAQAHGA
DnrJ	--EENYLMDTGRLRSVIGPRTRCLLPVHLYGQSVDMTPVLELAAEHLKLVLEDCAQAHGA
	: * . : : * * : * * * * * : : : : * * * * * * * *
EryCI	RHRGHRVAGSNAAAF SFYPGKNL GALDGGAVVTTDPALAEIRLLRNYSKQ-KYVHE
DesV	RYRGRRI GAGSSVAAF SFYPGKNL GCFDGGAVVTGDEPELAERLRMLRNYSRQ-KYSHE
OleN2	QAYGRRVGAWS-TTAFS FYPGKNLGGFGDGGAVVTDDELAERVLLRNYSRE-KYRHE
TylB	RYRGRRI GSGH-RTAFS FYPGKNL GALDGGAVVTSDEPELADRLRLRNYSRE-KYRHE
PCZA361.5	RQNGTIAGSTGDAAAF SFYPTKVLGAYDGGGATITSDQSVEQRLRRLRYGMEKTYTVE
DnrJ	RRHGRLVGTQGHAAAF SFYPTKVLGAYDGGGAVVTPDAEVDRLRRLRYGMEKTYTVE
	: * * : : * * * * * * * * * * * * : * * * * * * * *
EryCI	VRGTNARLDELQAAVLRVKLRHLDDWNARRTTLAQHYQTELKDVPGITLPETHPWADS AW
DesV	TKGTNSRLDEMQAAVLRIRLAHLDSWNGRRSALAAEYLSGLAGLPGIGLPTAPDTPVW
OleN2	VRATNFRLDELQAAVLRVKLAHLDAWTERRAAVAARYLDGLAGLDGIVLPRPAPWADPVW
TylB	ERGTSNRLDELQAAVLSVKLPYLDWNTRRREIAARYGEALAGLPGVTVPE-GRVAEPVW
PCZA361.5	TPAHNSRLDEVQAEILRRKLRRLDITYTAGRRRAIAQRYVDGLGDTLKLQTPV-GNEHVY
DnrJ	TPGHNSRLDEVQAEILRRKLRRLDAYVEGRRAVARRYEGLGDLGLVLPPTIAEGNDHVV
	. * * * * : * * : * * * * : * * : * * * * * . : : :
EryCI	HLFVLRCENRDHLQRHLTDAGVQTLIHYPTPVHLSPAYADLGLPPG-SFPVAESLAGEVL
DesV	HLFTVTRTERDELRSHLDARGIDTLTHYPVPVHLSPAYAGEAPPEG-SLPRAESFARQVL
OleN2	HLFVIRSADRSALRERLAAAGVETLIHYVPVHRSEAYAGS-RQAARAQFVAERLAREVL
TylB	HQYVLRSPYRDLRRLRLAEAGVETLVHYPVAVHASGAYAGGPCPAGGLPRAERLAGEVL
PCZA361.5	YVYVVRHPRRDDI IERLKAYDIHLNISYPWPVHTMTGFAKLGYAEG-SLPVTERLAKEIF
DnrJ	YVYVVRHPRDRILEALTAYDIHLNISYPWPVHTMSGFAHLGYGPG-DLPVTERLAGEIF
	: : : * * . : * . . . * * * * . : * . * * * * * : * * * * * :
EryCI	SLPIGPHLSREAADHVIATLKAGA
DesV	SLPIGPHLERPQALRVIDAVREWAERVDQA
OleN2	SLPIGPHLSDDAVKAVIEAVRGAVAAC
TylB	SLPIGPHLPDEAVEVVIAAVQSAALDSWEEGP
PCZA361.5	SLPMYPALSADLQDKVIHAVREVLSTL
DnrJ	SLPMYPSLRPDAQEKVIDAVREVVVGS
	* * * : *

Anhang 8: Vergleich von EryCI aus *Sac. erythraea* mit homologen Genprodukten. Zu DesV aus *S. venezuelae* (Acc. No. AF079762, Xue et al. 1998) bestehen 66,8%, zu OleN2 aus *S. antibioticus* (Acc. No. AF055579) 64,1%, zu TylB aus *S. fradiae* (Acc. No. S49052, Merson-Davies und Cundliffe 1994) 59,2%, zum hypothetischen Protein PCZA361.5 aus *Amycolatopsis orientalis* (Acc. No. AJ223998) 42,6% und zu DnrJ aus *S. peucetius* (Acc. No. B43306) 43,3% Sequenzidentität. Sonstige Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 9

```

EryCII          MTTTDRAGLGRQLQMIRGLHWGYGSNGDPYPMLLCGHDDDDPQ
SnogN          MVMKLT DSELGRALLSLRGYQWLRGIHHDYPYALLLRAESDDPA
DnrQ          MPTPTSAPPAAPT DSELGRHLLTVRGFHFVFGALGDPYARRLRGEADH-L
DesVIII       MTDDL T GALTQPPLGRTVRAVADRELGTHLLETRGIHWIHAANGDPYATVLRGQADDPY
TylMIII       MNTAAGPTGTAAGGTAPAAAHDLSRAGRRLQLTRAAQWFAGNQGDYPGMILRAGTADPA
                * * * . : : . ** * . .

EryCII       RRYRSMRESG--VRRSRTETWVVDHATARQVLD DPAFTRATG-----RTPEW
SnogN       QLGRLLRERGR-LHRSDTGTWVTADHATASRLLDPRFVLRPPAGPATGTGDVMPWEEA
DnrQ       SLGELVDRGP-LHGSALGTWVTADGGISARLLDDPLLGP RHPASEG PQEHVLENVWETW
DesVIII    PAYERV RARGA-LSFSPTG SWVTADHALAASILCSTDFGVSG-----ADGVPVQQVVL
TylMIII    PYEEEIRERGP L FHSSELLGTWVTGSRHVADAVTADDAFGALTADGARPGVRELPLSGSAL
                . : * * . . : ** . . : : . :

EryCII       MRAAGAPPAEWAQPF RDVHAASWEGEVDPVGE LAESFAGLLPGAG--AR-----LDL
SnogN       T LSDLPLDEARLTTDRARCRLGATAARIAADGPVATRLADLAGARAEQVRSTG-HFDL
DnrQ       RTCHVTPLGEDLLT PAAADSDRLAALLG PVLGPRTCTAWQVDAGRAVHRVLDGLPPHFV
DesVIII    SYGEGCPLEREQVLP AAGDVPEGGQRAVVEGIHRETLEGLAPDP-----SASYAFEL
TylMIII    DAAHGNPGGPPLPGWPHRPPDREERDDPDRHAADLLNAAGPGQ-----VLD
                *

EryCII       VGDFAWQVPVQGM TAVLGAAGVLRGAAWDARVSL----DAQLS PQQLAVTEA AVALP--
SnogN       RADYALPYAVEAACALLGLPAGQCSLFGAFSPAV--LLDATVVP PRLPEARALIAST---
DnrQ       VSDLARPAIAGSLAAV LGLPDEARAE L PDLAACGPVLD S ALCPPRLPVARAMTQALRRV
DesVIII    LGGFVRPAV TAAAAAVLGPVADRRADFADLLERLRPLSDSLLAPQSLRTVRAADGAL---
TylMIII    LVPFARRLAARTTGAWLGVPAERLPRFETALTGCRRALDALLCPQLLADARAGLAAEEAL
                . . * ** . * : : * * ..* :

EryCII       -----ADPALRALFAG-----AEMTANTVVDAV
SnogN       -----AELTALWPRLAPSLSKTVP-----EDEAPDLFLLTAVLLVPVHVLVCEAV
DnrQ       RELMAAAVANHLTAPADGAVSALLAVDPGGGRDPGDTV TAAV LSTVVGAE TAITTVNAV
DesVIII    -----AELTALLADSDDSPGALLS-----ALGV TAAVQLTGN AV
TylMIII    R-----AVLGETPEARGRPPGAVEAAR-----AHAVSAAEPIAVLLCNAV
                . . : **

EryCII       LAVSAEPGLAERIADDPAAAQRTVAEVLRLHPALHLERR TATAEVL RGEHVIGEGEEVVV
SnogN       AALSHDPGQAGLLRDDPVLAAPAVEETLRHAPPARLFTLHATGPERVADVDLPAGAEVAV
DnrQ       MALLKHDEQWSLLRADPGRAADAVEETLRWAPPVTLRSLITQGEVQIGGETLEADQHVVV
DesVIII    LALLAHPEQWRELCDRPG LAAA AVEETLR YDPPVQLDARVV RGETELAGRRLPAGAHVVV
TylMIII    RELMERPAQWRALTADPGLAGAAITETLLWAPPVRLESRVARETAVLAGRTLPA GTHLVV
                : : * * : : * * * . * . : . : . : *

EryCII       VVAAANRDPEVFAEPDRLDVDRPDAD-----RALSAHRGHPGRLEELVTALATAALRAA
SnogN       VVAAHRDPSWC PDPDRFDLTRNER-----HLALPPDLPLGALAPLLRVCATAAVAL
DnrQ       LVDAAQRDPALYEDPDRFRLDRPRS PG---FTHMALAGR DHLGLVAPLVRVQCTAVLRAL
DesVIII    LTAATGRDPEVFTDPERFDLARPDA A-----AHLALHPAGPYGPVASLVRLQAEVALRTL
TylMIII    LAAAANRDACRNAGPAVTGFDVLRRASDGGPQPHGLPEDLHFRLSGPLVRR TAEAGLRAL
                : . * : ** . * . * : : . . : :

EryCII       AKALPGLTPSGPVVRRRRSPVLRGTNRCPVEL
SnogN       AAGLLPLRAVGPPVRRRLRAPVTRSVLRFVAPC
DnrQ       AERLPLRAEGEPLRRGRSPVVRAPLSRLAQK
DesVIII    AGRFPGLRQAGDVLRRRAPVGRGPLSVPVSSS
TylMIII    AERFPGLRPAGPAVRVRRSPVLRGLRPLVAPYVPE
                * : * * : * * : ** * . :

```

Anhang 9: Vergleich von EryCII aus *Sac. erythraea* mit homologen Genprodukten. Die größten Sequenzidentitäten von jeweils 35,9% bestehen zu SnogN aus *S. nogalater* (Acc. No. AF187532) und DesVIII aus *S. venezuelae* (Acc. No. AF079762, Xue et al. 1998). Zu TylMIII aus *S. fradiae* (Acc. No. X81885, Gandecha et al. 1997) bestehen 34,5% Identität und zu DnrQ aus *S. peucetius* (Acc. No. AAD15266, Otten et al 1995, 1997) 30,5%. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 10

```

EryCIV      MKRALTDLAIFFGGPEAFHLHTLYVGRPTVGDREFFARLEWALNNNWLTTNGGPLVREFEGR
OleNI       MKRGVHDLALFGGDAAFLQPLYMGRPNTGDRKRLDRLEWALDNRWLTNGGPLVREFEQR
DesI        MKSALSDLAFAFFGGPAAFDQPLLVRPNRIDRARLYERLDRALDSQWLSNGGPLVREFEER
StrS        MSSSVELPRWPQLSDDDDVEAAVAALRANRLVGLGNPVVEQFESA
              :  . : : * . . : . . : *.*.*.*.*

EryCIV      VADLAGVRHCVATCNATVALQLVLRASDVSG--EVMPSMTFAATAHAASWLGLEPVFCD
OleNI       IADLAGVRNCVATCNATAGLQLLLREAEVTG--EVIMPSMTFVATAHAVRWLGLRPVFC
DesI        VAGLAGVRHAVATCNATAGLQLLAHAAGLTG--EVIMPSMTFAATPHALRWIGLTPVFAD
StrS        LAESQAVEHAVAVSTGTAAVHLHALDVGPGDEVIVPAHTFIGSASPIAYLGARPVFAD
              :* .*.:.**.....*...:* : : **::*: ** .:. . ::* ***.*

EryCIV      VDPETGLLDPEHVASLVTPTGAIIGVHLWGRPAPVEALEKIAAEHQVKLFFDAAHALGC
OleNI       IDPDTGCLDPKLVAAVTPRTGAILGVHLWGRPSRVDELAAIAAEHGLKLFYDAAHALGC
DesI        IDPDTGNLDPDQVAAVTPRTSAVVGVHLWGRPCAADQLRKVADEHGLRLYFDAHALGC
StrS        VTPDTHCLDPDSVKSLITERTKAIIVVHINGVAADMASLSAIATDAGVPLVEDMAQALGT
              : :* ***. * : :* ** *:: **: * .. * :* : : * * :***

EryCIV      TAGGRPVGAFGNAEVFSFHATKAVT-SFEGGAIVTDDGLLADRIRAMHNFGIAPDKLVT-
OleNI       TSRQRRLLGSFGDAEVFSFHATKVVN-SFEGGGIVTDDDTRAERLRALHNFGLGHDGVG--
DesI        AVDGRPAGSLGDAEVFSFHATKAVN-AFEGGAVTDDADLAARIRALHNFGFDLPGGSP-
StrS        SIGGRPVGGFDLACVSLFEQKVIITSGGEGGAVLTNNPGYAERVRLRSHGEGPIADRP
              : * *.*:* .*:. *:. . ***.::*: : * ** * :...*

EryCIV      -----DVGTTNGKMSECAAAMGLTSLDAFAETRVHNRNLNHALYSDELRDVRGISVHAFDPG
OleNI       -----AGINAKMSEAAAAAMGLTSLDAFADAVASNRANYELYRQELSGLPVRLIDYDPA
DesI        -----AGGTNAKMSEAAAAAMGLTSLDAFPEVIDRNRNHAAYREHLADLPGVLVADHDRH
StrS        LIWAYEVGYNYRLTAVQAAVGLSQHGRLGEMVEARRRNAAYLSERLADVEGLELPEPE
              * * :: : **:*:* . : : . * * :.* . : * : :

EryCIV      EQNNYQYVIISVDSAATGIDRDQLQAILRAEKVVAQPYFSPGCHQMOPYRTEPPLRLENT
OleNI       ERNNYHYVIALIDAGVTGLHRDLLLTLRAENVVAQPYFSPGCHQREPYRTEHPVSLPHT
DesI        GLNNHQYVIVEIDEATTGIHRDLVMEVLKAEVHTRAYFSPGCHQREPYRQPHAPLPHT
StrS        TVHAFWKYVVRVAVPAGGRPTAAEIAATLRSRGVPVLLRYPFPLHKQPAFAEHQVSVLPVA
              : . : . : *::* . . . * : . : . * :

EryCIV      EQLSDRVLALPTGPAVSSIEDIRRVCDIIRLAATSGELINAQWDQRTNRNGS
OleNI       EHLAEQVIALPTGPAVSREDIRRVCDIIRVAAAHGPRITAQAGA
DesI        ERLAARVLSLPTGTAIGDDDIRRVADLLRLCATRGRELTARHRDTAPAPLAAPQTSTPTIGRSR
StrS        ERLSQELLALPSPALTERHLDHVAEVRKAFTG
              *:* :.::** :.* : . : :* . :* . :

```

Anhang 10: Vergleich von EryCIV aus *Sac. erythraea* mit homologen Genprodukten. Die höchste Identität von 65,8% hat EryCIV zu OleNI aus *S. antibioticus* (Acc. No. AF055579). Zu DesI aus *S. venezuelae* (Acc. No. AF079762, Xue et al. 1998) bestehen 59,9% Sequenzidentität und zu StrS aus *S. glaucescens* (Acc. No. AJ006985, Beyer et al. 1996) 34,4%. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 12

EryCVI	MYEGGFAELYDRFYRGRGKDYAAEAAQVARLVRDRLPSASS LLDVACG
SnogX	MTRVYGTTELTOIYELVHEGRGKDYGAEAEIEITRRIRARLPGART LLDVACG
RdmD	MYGADLARVYDLVHRERGRKDYRARDRGGRRRGPAEQAGAGR LLDVACG
OleM1	MRADTEPTTGYEDEF AEIYDAVYRGRGKDYAGEAKDVADLVRDRVPDASS LLDVACG
TylMI	MAHSSATAGPQADYSGEIAELYDLVHQGKDYHREAADLAALVRRHSPKAAS LLDVACG
DesVI	MYEVDHADVYDLFYLRGKDYAAEASDIADLVRSRTP EASS LLDVACG
SnogA	MYGRELADVYEMVYRSRGKSWADEAERVTAEIRSRPGRARS LLDVACG
SrmX	MYENDSAAEVYD LLYQDR-KDYAGEAARVTDLIRERTPDAAS LLDIACG
	: : * : . : : * . : . . * *** : ***
EryCVI	TGTHL RRFADLFDDVTGLELSAAMIEVARPQLGGIPVLQGD MRDFALDREFDAVTCMFSS
SnogX	TGAHL RAFATRFEEVEGVELSEAMCAVARRRLPGVALHRADMRDFRLGRTFHAVTCMFSS
RdmD	TGGHL RHFADLFAHVEGVELSEPMAEERAAALPGVTVHAGD MRDFRLGRTTFDVTVMFSS
OleM1	TGAHL RHFATLFD DARGLELSADMLDIARSRMPGVPLHQGD MRDFRLGRTTFDVTVMFSS
TylMI	TGMHL RHLADSFGTVEGLELSADMLAIARRRNPDAVLH HGD MRDFSLGRRFSAVTCMFSS
DesVI	TGTHL EHFTKEFGDTAGLELSEDM LTHARKRLPDATLHQGD MRDFRLGRKFSAVVSMFSS
SnogA	TGAHL EAFRGLFAHTEGLELSEDMRALAERRLP GPVPRPGD MRDFALSGRFDVAVVCLFCS
SrmX	TGTHL EAFKLYDRVSGLELSEWMAARAEERLP GVT LHRGDMRAF DLGETFDVAVVCMFSS
	** * . : : . * : *** * * . . . * . : * *
EryCVI	IGHMRDGAELDQALAS FARHLAPGGVVVVEPWWFPEDFLDGYVAGDVVRD G--DLTISR V
SnogX	IGYARTPQELTATLRCFAAHLAPGGVAAVDPWWFPETYLDGYVSGDTMTVD--GRTVSRV
RdmD	VGYMTSVAELGRALRMFARHLEPGGVAVVDPWWF YETFADGHVSADIVTVD--GVTVSRV
OleM1	VGHLATTAELDATLRCFARHTRPGGVAVIEPWWFPETFTDGYVAGDIVRVD--GRTISR V
TylMI	IGHLAQAE L DAALERFAAHVLPDGVVVVEPWWFPENFTPGYVAAGTVEAG--GTTVTRV
DesVI	VGYLKTTEELGAAVASFAEHLEPGGVVVVEPWWFPETFADGWSADVVRD--GRTVARV
SnogA	IGYLETVADMRAAVRTMAAHLVPGGVLVVEPWWFPERFLEGYVAGDLARGE--GRTVARV
SrmX	IGYLETTADLEDAVAAMARHLTADGVLAVEPWYFPDTFLDGHVSTHALRTAPGDQGVARV
	: * : : : * * . . * . : : * * : : * * : : * *
EryCVI	SHSVRAGGATRMEIHVVVADAVNGPRHHVEHYEITL FERQQYEKAFTAAGCAVQYLEGGP
SnogX	SHSTREGTASVMRVHYLVADAALGVRHFSESHRISLFSREQYEEAFSRAGFAVEYV PRLH
RdmD	SHSARRGRTSHMDVHFVVAEPGAGA QHFVDTHIISLFSRSEYEQAFRDAGFAVEYLP EAP
OleM1	SHSVRDGGATRMEIHYVIADAEHGPRHLVEHHRITLFP RHAYTAAYEKAGYTVEYLDGGP
TylMI	SHSSREGEATRIEVHYLVAGPDRGITHEESH RITLFTREQYERAFTAAGLSVEFMPGGP
DesVI	SHSVREGNATRMEVHFTVADPGKGV RHFSDVHLITLHFQAEYEA AFTAAGLRVEYLEGGP
SnogA	SHSTRQGRTRMEVRFVLG-EATGIREFTEIDL LTLFTREEYLA AFEDAGCPAEFLDDGL
SrmX	SHSTREGGRTRMEIHYLIAHTAEGIRHRSEVDY LTLFSRAEYEAAYRKAGLDVEYVVTGE
	*** * * : : : : . * . : : * * : * * : * * . : : *
EryCVI	SGRGLFVGVRG
SnogX	AGRGLFLGVRKSGRAG
RdmD	SGRGLFVGVRG
OleM1	SGRGLFVGTRT
TylMI	SGRGLFTGLPGAKGETR
DesVI	SGRGLFVGVP A
SnogA	TGRGLFVGVRGAG
SrmX	GSPGFFLGTRR
	. * : * *

Anhang 12: Vergleich von EryCVI aus *Sac. erythraea* mit homologen Genprodukten. Die höchste Sequenzidentität besteht zu OleM1 aus *S. antibioticus* (Acc. No. AJ002638, Olano et al. 1998) von 68,1% und zu DesVI aus *S. venezuelae* (Acc. No. AF079762, Xue et al. 1998) von 63,0%. Die Identität zu TylMI aus *S. fradiae* (Acc. No. X81885, Gandecha et al. 1997) beträgt 59,7%, zu SnogX aus *S. nogalater* (Acc. No. AJ224512) 55,1%, zu RdmD aus *S. purpurascens* (Acc. No. U10405, Niemi und Mäntsälä 1995) 54,8%, zu SnogA aus *S. nogalater* (Acc. No. AF187532, Ylihonko et al. 1996) 53,2% und zu SrmX aus *S. ambofaciens* (Acc. No. S25204, Geistlich et al. 1992) 51,9%. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 13

LOCUS AF210634 3672 bp DNA BCT 19-DEC-1999
 DEFINITION *Streptomyces fradiae* TDP-6-deoxy-4-ketohexose 2,3-dehydratase (tylCVI) and TylR (tylR) genes, complete cds.
 ACCESSION AF210634
 VERSION AF210634.1 GI:6601475
 KEYWORDS .
 SOURCE *Streptomyces fradiae*.
 ORGANISM *Streptomyces fradiae*
 Bacteria; Firmicutes; Actinobacteria; Actinobacteridae;
 Actinomycetales; Streptomycineae; Streptomycetaceae; *Streptomyces*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 3672)
 AUTHORS Weingarten,P. and Piepersberg,W.
 TITLE Analysis of the L-mycarose pathway in *Saccharopolyspora erythraea*:
 induction of mutants and cross-complementation by genes from other
streptomycetes
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 3672)
 AUTHORS Weingarten,P. and Piepersberg,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-DEC-1999) Microbiology, Bergische Universitaet
 Wuppertal, Gauss-Str. 20, Wuppertal D-42097, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..3672
 /organism="*Streptomyces fradiae*"
 /strain="T59235"
 /db_xref="taxon:1906"
 gene 18..1454
 /gene="tylCVI"
 CDS 18..1454
 /gene="tylCVI"
 /function="involved in the 2-deoxygenation step of the
 dTDP-L-mycarose biosynthesis"
 /note="TylCVI"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="TDP-6-deoxy-4-ketohexose 2,3-dehydratase"
 /protein_id="AAF18990.1"
 /db_xref="GI:6601476"
 /translation="MADRDETARRVLASAEVPSGVTSPSEISGWLAERAAAGRFDVA
 LIPFEAMRGWHFDPANGNLRHESGRFFSIEGLRVRRGDGPGRVWGQPIIVQPEVGLLG
 IVAREIHGVLHFLVQAKMEPGNINTLQISPTVQATRSNFTGVHRGRGIRFLDLFLEPG
 RARVLVDVLQSEQAEWFLAKRNRNMVVEIGPDEELETGEDFRWLTLGQIRALLTADNL
 VNMDARSGAGLSAHAGGGQVAGDDFAAVVRRLLHRTARRPPCAAPPELGSWFTGVRAL
 EELVQRLIPLDAVAHGWHEGPDIEAHRSGHFRVLAADITASNREVARWSQPLIQQR
 HPSLLALIVKRV DGV LHALVQARVDVGHNLVAELAPT VHC RPADHRAPEAAPAPPYLD
 VVLGASPAQFRYD TVQSEEGGRFYHARNRYAIVEVPESFDAA SGTDEDTAGDYAWVTF
 GQLTELLAHGNYVNVELRTL IACAHALY"
 gene complement (1596..2888)
 /gene="tylR"
 CDS complement (1596..2888)
 /gene="tylR"
 /note="putative regulatory protein; similar to
Streptomyces thermotolerans AcyB2 deposited in GenBank
 Accession Number D31821"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="TylR"
 /protein_id="AAF18991.1"
 /db_xref="GI:6601477"
 /translation="MRPSPARRPVTEPVWPLPGRASVPAVRTPDAAGDPCAAGDLCTD
 VLATLRRSDQRRKGERYVHGLLHTPGRKTIRNIAAWIGE HAGEQSLHHFISSTWDWS
 LLRARLARRLEQELAPRAWVVRP MVGSQRRATPSRVGVDRRYVPHLRQTVNSQHSWGL
 WYASESGAVPVNWQLSIGDGLWGD EGLRRRAAI PRELRARPSEAVAAGIVGETAGWGL
 PRKPLVMDARELPVASLIRALSAAGQPFMLRIDNGTLLAPGLSGAGR PVTATCADRR
 AGEVPAAPGGMVDPAEPVPR TSL LALLPVCWPGLLPVPGTVARPGGAAGNGTRRPPA
 RSLVLVAEWQPDRSRVVELWVTNM TDAGRGTLLRLGKFLRRVETGSAGAGHDVGLRDF
 EGRSYPGWHRHVTLASLAHAMWSSPPGHPAAGGRRATA"

```

BASE COUNT      515 a    1320 c    1355 g    482 t
ORIGIN
1   gggcccgcgg  gtggccgggtg  gccgaccgcg  acgagacggc  ccgcccgggtc  ctgcctcgg
61  cggagggtccc  ggacagcggc  gtgacgccc  ccccgggat  atccggatgg  ctgcgagc
121 gggccgcgcg  gggacgcttc  gatgtcgccc  tgatcccgtt  cgaggccatg  cggggctggc
181 acttcgacc  cgcaacggc  aatctccgc  atgagtcgg  gcggttcttc  tccatcgagg
241 gcctgcgcgt  ccgcccgggg  gacggcccgc  gccgggtgtg  gggccagccg  atcatcgtgc
301 agccggaggt  ggggctgctc  ggcacgtgg  cccgtgagat  ccacgggggtg  ctgcacttcc
361 tgggtgcagg  caagatggag  ccgggcaaca  tcaacacgct  gcagatatcg  ccgaccgtgc
421 agggcaccgc  gagcaacttc  acgggggttc  accggggggc  cggcatccgc  ttctctgatc
481 tgttcctgga  accgggcagg  gccagggtgc  tgggtggacgt  cctccagtc  ggtgtccggc
541 agtggttcct  cgccaaacgg  aaccggaaca  tggtcgtgga  gatcggcccc  gacgaggagc
601 tggagaccgg  tgaggacttc  cgctggctga  cgctcggta  gatccgcgca  ctgctgacgg
661 cggacaacct  ggtcaacatg  gacgccaggt  ccggtgctgg  cctgtctgcc  caccgcccgc
721 gcgggcagg  ggccggcgac  gacttcgccc  cggtcgtg  ccggctcctt  caccggaccg
781 ctcgccgccc  accctgtgca  gcgcccggg  agctcgggag  ctggttcacc  ggtgtccggg
841 cgctggagga  gctggtgcag  cggtgatcc  cgctggacgc  cgctcccgc  caggctggg
901 agcacggccc  ggacgagata  gcgaccgca  gcggccacca  ctccgggtg  ctggccggcc
961 acatcaccgc  gagcaaccgc  gagggtggcc  ggtggagcca  gccgctcctc  cagcagcggc
1021 atcccagcct  gctggcgctg  atcgtcaagc  gcgtcgacgg  ggtactgcac  gcgctggtgc
1081 aggccagggt  ggacgtcggc  catctcaacg  tggcggaact  cgcccacc  gtgcactgcc
1141 ggccggccga  ccaccgagcc  ccggaggccg  ctcccgtcc  gccctaccct  gatgtggtcc
1201 tgggcccctc  ccccgcgag  tccgctatg  acaccgtgca  gtcggaggag  gggggcgct
1261 tctatcacgc  aaggaaccgc  tacgcgatc  tggagggtcc  cgagagcttc  gacgcccct
1321 ccggtacgga  cgaggacacg  gccggcact  acgctgggt  gaccttcggc  cagctccgg
1381 agctcctgga  ccacggcaac  tacgtcaacg  tggaaactcg  cacactcctc  gctcggcgc
1441 acgcccctta  ctgatccggt  cctgccgcgc  ggcacgcgag  ttcaccccgc  cgccccttc
1501 ccgtccgtcc  ggccgagggc  gcccccggc  gtgaccggcc  ccgcccggcc  acccctccc
1561 ccgcccgggg  gcggtgcg  ggggggggga  cgggggtcatg  ccgtcgtct  gggcccgcc
1621 gcggcgggat  gtccggggcg  cgaggaccac  atggcgtggg  cgagcgacg  gacgtcaca
1681 tgcgggtg  agccgggta  cgagcggcc  tcgaagtccc  gcaggcccac  gctgtggcc
1741 gcccggcg  agccggtctc  caccggcg  aggaacttgc  ccagccgag  cagcgtgcc
1801 gcggcgct  cggtcatg  ggtgaccac  agctccacga  cccgcgacc  gtcggctgc
1861 cactccgcca  ccaggaccag  cgaccgtgc  ggaggacggc  gcgtcccgt  cccggccgc
1921 ccaccgggac  gggcgaccgt  gccgggacc  ggaagcagtc  cgggcccag  caccggcagc
1981 agcccgaca  agccgggta  cggtaaccgc  ggttccgccc  ggtccaccat  tccacgggc
2041 gctgctggga  cctcgccagc  tcggcgatcc  gcgcaggtgg  ccgtcaccgg  ccgcccggcc
2101 ccggagagtc  cgggggccc  cagcgtcgtg  ccgttgctga  tgcgcagcat  gaacggctgt
2161 ccggccgccc  acagcgcgc  gatcaggag  gcgacgggca  gctctctcgc  gtccatcacc
2221 agcggtttgc  ggggcaggcc  ccagccggca  gtctcccga  cgatcccggc  cgccaccgc
2281 tcggaggcc  tggcccagc  ctcccgggg  atccggcgc  gcccccgaa  cccctcgtc
2341 ccgagccagc  cgtcgccat  ggacagttgc  cagttgacgg  ggacggcgc  gctctcggag
2401 gcgtaccaca  gtcccagct  gtgctggctg  ttgacgtct  gccggagatg  cggcacatag
2461 gcgcggtcca  cgccgaccgc  acttgggggt  gccgccttt  gggaaccaac  catgggagct
2521 accaccag  cgccggggg  gaggttcctg  tccaggcggc  gacgagccg  ggcgcgcaac
2581 agggaccagt  cccagggtga  ggagctgatg  aagtgatgga  ggctctgctc  acccgcgtgc
2641 tcgcccagtc  aggcggcgat  attgcccgat  gtcttgcgcc  ccgggggtgtg  cagcaggccg
2701 tgtacgtagc  gctcccctt  ccgcccgtgg  tcgctcggc  ggagtggtgc  gactacgtcg
2761 gtgcacaggt  ccccggggc  gcacgggtcc  ccggcggcgt  ccggcgtccg  gacggcgggg
2821 acggaggcgc  ggccggggag  cggccatacg  ggttcgggta  cggggcgtcg  cgccgggtgac
2881 ggccctatga  cacctctggt  gaagggggc  agctcagctc  acccccgatc  cggacaccgc
2941 ggggtcgccg  gggagtcccc  gcggcaccgc  cgcttcgtca  acgcagcggg  gcgagcaca
3001 gtctcgtttc  acatctctcc  ttggggggc  gaggccggcg  cccggccgtc  gcagctttcg
3061 tgaatgcgg  gaggagcgt  actgcaacg  cgatgcacga  gtccggggag  acttctcgaa
3121 cccgagaagg  aaggggattc  ggcgatacgg  ttccggaata  ccgcccgtcg  tcacgaagcc
3181 ggttccggat  cagcgggtgc  gccgttccag  ggcacaccac  gcctgttccc  cggagcgtga
3241 caggacgctc  atccgggtgt  caacgcacca  ttgcagggag  ggagttgggc  cgcaccggcc
3301 ggagggttcc  gaccaggcct  accgggccc  atcgagaaac  actcgagaag  cggcgaaaa
3361 caccgtgcgg  ctgcccggac  ccaggcgcca  cccgttcttc  atcggctctc  cagccgctt
3421 gacgcccgg  ccgcccacc  cgagaaacgg  accaggatcc  gatccggat  ggtttctga
3481 gcaggcctcg  cccggcagcc  gacgggccc  ggccggaacc  ggcccggcg  gctcggggg
3541 tgtgcgcgg  gccggccgaa  gggggggcc  gagcgcggac  ccgagcggc  tgtcagcgc
3601 gtgtcaggcc  tttgggggg  gcacctcaca  tactcgacc  gcgttcacgg  agaggaaggc
3661 agggaagggc  cc

```

Anhang 13: GenBank Eintrag des 3,7 kbp *Apal*-Fragmentes (Acc. No. AF210634) aus genomischer DNA von *S. fradiae*. Die DNA-Sequenz umfaßt die vollständigen offenen Leserahmen von *tylCVI* und *tylR*.

Anhang 14

As	Codon	<i>tylCVI</i>	<i>tylR</i>	As	Codon	<i>tylCVI</i>	<i>tylR</i>
Ala	gca	3	3	Leu	ctt	1	1
	gcc	35	32		tta	0	0
	gcg	18	18		ttg	0	2
Arg	gct	4	2	Lys	aaa	1	1
	aga	0	2		aag	2	3
	agg	5	3	Met	atg	4	7
	cga	1	2		Phe	ttc	18
	Asn	cgc	19	23	ttt	0	0
		cgg	19	20	Pro	cca	1
cgt		1	3	ccc		10	20
aac		13	5	ccg		17	17
Asp	aat	1	1	Ser	cct	0	1
	gac	23	16		agc	8	7
Cys	gat	3	1		agt	0	1
	tgc	2	4		tca	0	1
Gln	tgt	1	0	tcc	8	12	
	caa	0	2	tcg	3	6	
Glu	cag	17	7	tct	1	0	
	gaa	3	4	Stop	taa	0	0
Gly	gag	30	14		tag	0	0
	gga	2	6		tga	1	1
	ggc	25	23	Thr	aca	1	1
	ggg	10	13		acc	10	12
ggt	5	4	acg		8	9	
His	cac	17	8	act	0	1	
	cat	3	4	Trp	tgg	9	15
Ile	ata	3	1		Tyr	tac	5
	atc	16	8	tat		2	1
Leu	att	0	0	Val	gta	1	5
	cta	0	0		gtc	16	15
	ctc	18	12		gtg	27	13
	ctg	28	28		gtt	0	1
S Codons						479	431

Anhang 14-1: Codonverwendung der Gene *tylCVI* und *tylR*.

Gen	G + C-Gehalt gesamt [%]	G + C-Gehalt Position 1 [%]	G + C-Gehalt Position 2 [%]	G + C-Gehalt Position 3 [%]
<i>tylCVI</i>	71,3	74,5	47,4	91,9
<i>tylR</i>	74,5	74,2	61,3	87,9

Anhang 14-1: G + C-Gehalt der Codons der Gene *tylCVI* und *tylR*

Anhang 15

```

MidL          MAHRRQIGQVARVGVKRVQHHHLGLAELRQRAVQQGVHKAWTDE
TylCVI        MADRDETARRVLASAEVPDQSVTPSPETSGWLAERAAAGRFDV
EryBVI        MRVLIDNARRQQAEPSTTPQGESMGDRTPESSTQATRFLLGDGGIPTAT
OleV          MIWGI PAMSEAMGSVPTAGSEVSSCAFLSWLDARRRANRLTV
gra-Orf27     MRITDTAGFHAWFAERGAHRYRI
AveBVI        MSVRADADHTEPSTAHRAARRRPARVPRPLRRRGRHRRRTSLDAFTGWWRTRSGAHRFRV
LanS          MLSSLVVRTGSGTGRLRPRHDPVAERIAASAAAVTGASLRTEDFPQWLEGRRRRAHRFTV
PCZA361.3    MSSFVVPVSLTAVRPRDHDYADRIALSAAATDGVQMRTEDVRAWIAERRDANVFHV
DnmT          MTAQIARSVLARDGLGSGMDRFWAWYADRSAQVVHRT
Orf3          MRRHSAAAATTVQIARSVLARDGLCSGMDRFWAWYAERSARVVHRT
SnogH        MTKLSAHPAAPAHGAVPDPRLRLAASARSAGVWLPRTTEVHHWLATVQGARAQV

```

```

MidL          AGPSGDQD-----PLHACRRWSFEDGTGNLRHETGRFFSVEGLRTSSDL---
TylCVI        ALIP-----FEAMRGWHFDPANGNLRHESGRFFSIEGLRVRRGD---
EryBVI        AETHDWLTRNGAEQRLEVARVPFSAMDRWSFQPEDGRLAHESGRFFSIEGLHVRTNF---
OleV          EHVP-----FRELSGWQFDENTGNLRHTSGRFFSIEGLRVRTDH---
gra-Orf27     TRTP-----LHDLEGWYTD PASGDVRRHRSGRFFSIEGLRYGRQE---
AveBVI        ERIP-----FHGMDAWSFHPGTGNLAHRSGRFFSVEGLHVRRGGE---
LanS          DRIP-----FDALDGSFDDATGNLVHRSGRFFSVEGLHVTRDE---
PCZA361.3    ERIP-----FADLDQWVFEVGTGNLVHRSGRFFSIEGLHVIEHDGPH
DnmT          ERIP-----LDDLKGSWRHPVTGTVSHHTGRFFSIEGLDVHPIPG---
Orf3          ERIP-----LDALKGSWRHPVTGTISHHTGRFFSIEGLDVHPIPG---
SnogH        ERVP-----LAELDGWLRDPATGNIAHRSGGFFTVEGLDVTI PR---
              :      * . * : * : * * : * *

```

```

MidL          --DP-VDRIQPIIVQPEVGLLGILAREFDGVLHFLMQAKPEPGNVNGLQLSPTVQATRSN
TylCVI        --GPGRVWVQPIIVQPEVGLLGIVAREIHGVLHFLVQAKMEPGNINTLQISPTVQATRSN
EryBVI        --GWRRDWIQPIIVQPEIGFLGLIVKEFDGVLHVLQAQAKAEPGNINAVQLSPTLQATRSN
OleV          --CWFGSWTQPIIVQPEIGILGLLVKRFDGILHVLVQAKNEPGNIGGLQLSPTVQATRSN
gra-Orf27     --PDGPAWTQPIIRQPETGVLGVLKWFVPHLLMQAKMEPGNINTLQVSPVQATFSN
AveBVI        --QPFPEWQPIIHQPEIGILGILAKKFDGVLHFLMQAKMEPGNINLVQLSPTVQATRSN
LanS          --GPHREWYQPIIKQPEVGIILGILVKEFDGVLHFLMQAKMEPGNRNLLQLSPTVQATRSN
PCZA361.3    GDGPPYREWQPPVIRQPEVGIILGILAKEFDGVLHFLMQAKMEPGNPNLVQLSPTVQATRSN
DnmT          --APVPRWSQPIVNVQPEVGIILGFLVKERHGVHLHCLVQAKFEPGNPGGLQLSPTVQATRSN
Orf3          --APVPRWSQPIVNVQPEVGIILGFLVKERGGILHCLVQAKFEPGNPGGLQLSPTVQATRSN
SnogH        --APVPHWEQPIINQPEVGLLGIVVKEFDGVLHCLMQAKLEPGNCNGIQLSPTVQATRSN
              * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

MidL          FDEVHRGRSTPFLDRFIQRPRGR-RVLVDVAIQSEQADWFLHKNRNRNMVVEIDSG--VAEHC
TylCVI        FTGVHRGRGIRFLDLFLEPGRA-RVLVDVLQSEQAEWFLAKRNRNRNMVVEIGPDEELETGE
EryBVI        YTGVRHRSKVRFIYFNGTRPS-RILVDVLQSEQGAWFLRKRNRNRNMVVEVFD--LPEHP
OleV          YTRVHRGGGVRYLEYFASPRGRGRVLDVQLQSEQGSWFLHKNRNRNMVVEALDD--VPLDD
gra-Orf27     YTRVHHGSPVRYIDHFLTPGAGDRVHYDALQSEQGSWFLGKRNRNRNIVVETTGE--IPVHE
AveBVI        YTKVHGGAAVKYLEYFTQPRRA-TVVVDVLQSEHGAWFHRKFNRNIVVETDED--VPLDD
LanS          YTKVHKGADVKEYEYFTQPPRG-RFIADVQLQSEHGSWFFHKSNRNRNIVEAVGD--VPLDD
PCZA361.3    YTKAHGGTNVKLIYFAPPDPE-RVIVDVLQAEQGSWFFRKSNRNRNIVETVDD--VPLWD
DnmT          YTRVHGGKAIPLYEHFRDTAER-QVVADVQLQSEQGSWFFYRKRNRNRNIVQVIDE--VPLHE
Orf3          YTRVPGGKTIPSWSTSATPPDR-QVVADVQLQSGQGSWFFYRKRNRNRNIVQVFDE--VPLRE
SnogH        YTRVHRGRPVPLYEHFDQPARRSRILADVRLQSEQGSWFFHKNRNRNMVVEEED--IDVHD
              : . * . . * . * : : * * * * * * * * * * * *

```

```

MidL          SFRWLTGQIRLLLLRDDLVNMDTRSVLACLPCARRTRRRR-----
TylCVI        DFRWLTGQIRALLTADNLVNM DARSAGLSAHAGGGQVAGDDFAAV-----
EryBVI        NFRWLTVAQLRAMLHHDNVNMDLRTVLACVPTAVERDRADDVLARLPEGS-----
OleV          DFHWISLGLRKLRLRPHLVNMDTRTVLSCLPPDPAPDGR--QPAPAAP-----
gra-Orf27     DFCWVPRPVMAELLRVDNLVNMDSRTVLAGLPDDPGEGS-----
AveBVI        DFRWLTGQIGELMHRDNLVNM DARTVLAACLPTPF-----
LanS          DFCWLTGQIGQLLHRDNLVNMDSRTVLACAPFPDD-----
PCZA361.3    DFCWLTGQIAELMHEDETINMNSRSVLSCLPYQDI-----
DnmT          DFHWLTGQLHRLLGVENLVNMDARTVLAACLPFASEGAHPLADAE PAGADGPGG-GHPVV
Orf3          DFHWLTGQLHRLLGVENLVNMDARTVLAACLPSRARERARWPTRSPPELTAPGASHPVV
SnogH        GFCWLSLGLHELLTVDNLTTRTVLSCLPFAHAGLAAVAAP-----
              . * * : : * * * * * * * * * * * *

```

```

MidL      -----RRLPGGAEALLRETELNAITGCLIDVQALRVLRRQOSVPLNQV
TylCVI    -----VRRLLHRTARRPPCAAPPELGSWFTGVRALEELVQRLIPLDAV
EryBVI    -----FQARLLHSFIGAGTPANNMNSLLSWISDVRARREFVQRGRPLPDI
OleV      -----FAAAVTRSLTRGATALHTMGEILGWLTDEERSRRELVQQRVPLEET
gra-Orf27 -----VPRRAVEKPLHDTAALLHWFTGAKVRHRPERTTIPLSRV
AveBVI    -----EPAALHSDAELLSWYAAERSRHSVHARRVPLAGI
LanS      -----GADALLSDTELVSWFTEAERSRHDVRAERVPLHDL
PCZA361.3 -----TPRALFSDVQLLSWFTNERSRHDVRRRIPLADV
DnmT      PAR-PDGGEGRVDTFGHRSLVRSAAAEGSLHSTVDIVSWIADLRSDVVTTRPAALNAL
Orf3      PSLGPTAAGLRWTPGFHHSVLRSCAAAEGSLHSTVDIVSWIATCAAG-PMWSPARQANSL
SnogH     ADP-----FRRALVASCAPDGYSRHSLGDLLSWITDVRTRTEVTRTEMVPLDGL
:

MidL      YEDGWQRTGATIRHRSGEFGEIMAVEVTAEQREVASWTQPLLRPCSQGLMALVRRINGA
TylCVI    AAHGWEHGPDEIAHRSGHFRVLAADITASNREVARWSQPLIQQRHPSLLALIVKRVGDV
EryBVI    ERSGWIRRDDGIEHEEKKYFDVFGVTVATSDREVNSSWMPLLSPANGLLALLVKDIGGT
OleV      AFSGWRRDDHAIHKDGDYFRVIGVSVRASSREVSWSQPLLAIVPGPLAAVTRRIRGV
gra-Orf27 GGWRRDDDRGEIVHETGTRYFRIIGVDVEADSREVTSSWQPMPLAPVGRGVAVFVSKEIHGE
AveBVI    PGWTTGA--ESIAHHDTRYFRVAVRVEASNREVAAWTQPLIEPCGHGITAFLTRRIGGV
LanS      PGWVRGT--STIDHELGRYFRVAVSVEAGSREVTGWTQPLFEPLGLGVTAFLTRRIGGV
PCZA361.3 CGWKQGA--EEIEHEDGRYFKVLAVAVKGSNREKISWTQPLVESVDLGVVAFVLRKIDGV
DnmT      PHWYERD--GAIAHESGRFLEVMADVTAASREVPGWSQPMIEPKDQGVAFLVRRIDGV
Orf3      PHWIERD--GVIAFRAGRFLEVMADVTAASREVPGWSQPMIEPKGRGVAAFLVRRIDGV
SnogH     RSWRRTD--ERISHEDGGFFDVIGVRVTRGREVAEWTQPMIEPHAKGVVAFVLRPIEGV
          * . : :... : ** * *... . : * : : : *

MidL      LHALVAARSDVGTLNFAEFGPTVQLRSAWPRG--KGNPPPYLEYVQSAAPGRVRYDA-VL
TylCVI    LHALVQARVDVGHNLNVAELAPTVHCRPADHRAPEAAPAPPYLDVVLGASPAQFRYDT-VQ
EryBVI    LHALVQLRTEAGMDVAELAPTVHCQPDNYADAPEEFRPAYVDVVLNVPRSQVRYDA-WH
OleV      LHVLLHARTEAGLLNGPEMAPTVQCRPLNYRAVPAEYRPAYLDYVLSADPGRIRYDT-LQ
gra-Orf27 RHLVQARAEAGTFDAVELGPTVQCNPGLPDG--APRPPYLDVTLTARPEQVLFDT-VH
AveBVI    PHLLAHGRVEGGFLDTIELGPTVQYTPRNYAHLTGPARPRFLDLVLEAAPDRIRYAA-VH
LanS      PHVLVHARVEGGFLDTVELGPTVQYTPDNYGHLTGEDRPPFLDLVLDADPARIQYEA-VH
PCZA361.3 PHVLVQARVDGGFLDTVELAPTVQCTPLNYAHLPAEERPPFLDLVQNAAPRSRIRYEA-IH
DnmT      LHVLAHARVEPGYVDVVEIAPTQVQCTPGSLHALPAEARPRFLDAVLEAPPERVRYAT-VL
Orf3      LHALGTRARVEPGYVDVVEIAPTQVQCTPGSLHALPAGARPRFLDAVLEAPPEAACATTTDL
SnogH     LHVLVHARVEPGYVDIVELAPTVQCTPDSYERLPARARPLFLDEVLPARADRVRFDA-EL
          * * * : * . : * : * : * : * : * : * : * : *

MidL      SEEGGRFYHARNRYTVVEAGP-----ELPVDPCPPGFRWATLGLQTELLAHGNYLNVLELR
TylCVI    SEEGGRFYHARNRYAIVEVPEFSDAASGTDEDTAGDYAWVTFGQTELLAHGNYVNVLELR
EryBVI    SEEGGRFYRNENRYMLIEVPA-----DFDASAAPDHRWMTFDQITYLLGHSHYVNIQLR
OleV      SEEGGRFHHAENRYVVVEAED-----DFP-VEVPRDFRWLTLHQIALLHHSNYVNVEAR
gra-Orf27 SEEGGRFYHAENRYLVLDGDD-----VP--VDVPEDYTWMTVRQLTRAGRIGNLVDEAR
AveBVI    SEEGGRFLHAQARYLFVEADE-----SQAPNDPPPGRWCTPGQLTQLLRYGRYVNVQAR
LanS      SEEGGRFLNAESRYLLIEADE-----EQAPLDPPAGFQWVTPAQLTSLVRHGHYVNVQAR
PCZA361.3 SEEGGRFLGVRARYLVIDAD-----EA--IDPPPGYAWVTPAQLTALTRHGHYVNVQAR
DnmT      AEEGGRFYHAVNTYMIVEADH-----DIP--DGG-EYRWLTLHQLVGLLRHSHYVNVQAR
Orf3      AEEGGRFHAVNTYMIVEADD-----DIP--DGG-EFRWLTLLHQLVELLRHSHYVNVQAR
SnogH     SEEGGRFYHARNRYLVAETDL-----AAG--FDHPDFRWVTLAQLVELLRHSHYVNIQAR
          :***** * . : . * * * : . . : : : *

MidL      TLIACAHASY
TylCVI    TLIACAHALY
EryBVI    SIIACASAVYTRTAG
OleV      SLVACIQALS
gra-Orf27 TLLACVRTLPDHGASR
AveBVI    TLLSLLTTRAVEL
LanS      TLLACLNATAVLSG
PCZA361.3 TLLACINAAAAQPRGGA
DnmT      TLVACLHSLSVGS--PVTRSAPVPSAPPRR
Orf3      TLVACLHSLSVGHRPSTRSAVPSAPPRR
SnogH     SLVACLYGLAT-----A---PPRR
          : : :

```

Anhang 15: Vergleich von homologen potentiellen 2,3-Dehydratasen. Die verglichenen Sequenzen sind: MidL aus *S. mycarofaciens*, TylCVI aus *S. fradiae* (Acc. No. AF210634), EryBVI aus *Sac. erythraea* (Acc. No. Y11199), OleV aus *S. antibioticus* (Acc. No. AF055579), gra-ORF27 aus *S. violaceoruber* (Acc. No. AJ011500), AveBVI aus *S. avermitilis* (Acc. No. AB032523), LanS aus *S. cyanogenus* (Acc. No. AF080235), das hypothetische Protein PCZA361.3 aus *Amycolatopsis orientalis* (Acc. No. AJ223998), DnmT aus *S. peucetius* (Acc. No. U77891), ORF3 aus *Streptomyces* sp. C5 (Acc. No. U43704) und SnogH aus *S. nogalater* (Acc. No. AJ224512). Sonstige Erläuterungen s. Legende zu Anhang 1.

Anhang 17

GTG GCC CAC CGG CGC CAG ATT GGC CAG GTT GCC CGC GTA GGT AAG CGC GTC CAG CAC
 V A H R R Q I G Q V A R V G K R V Q H

CAC CAC CTC GGG CTT GCC GAA CTC CGG CAG CGA GCC GTT CAG CAG GGC GTT CAC AAA
 H H L G L A E L R Q R A V Q Q G V H K

GCG TGG ACC GAT GAA GCC GGC CCC TCC GGT GAC CAG GAT CCT CTG CAT GCC TGC AGG
 A W T D E A G P S G D Q D P L H A C R

CGG TGG TCC TTC GAA GAC GGC ACC GGC AAT CTG CGC CAC GAG ACG GGT CGC TTC TTC
 R W S F E D G T G N L R H E T G R F F

TCC GTC GAA GGT CTG CGT ACC AGC TCC GAC CTC GAC CCC GTC GAC CGC ATC CAG CCG
 S V E G L R T S S D L D P V D R I Q P

ATC ATC GTG CAG CCC GAA GTG GGG CTG CTG GGC ATC CTG GCG CGC GAG TTC GAC GGG
 I I V Q P E V G L L G I L A R E F D G

GTG TTG CAC TTT CTG ATG CAG GCG AAG CCG GAA CCC GGC AAC GTC AAC GGG CTC CAG
 V L H F L M Q A K P E P G N V N G L Q

CTC TCC CCT ACG GTG CAG GCC ACC CGC AGC AAC TTC GAC GAG GTG CAT CGC GGC CGC
 L S P T V Q A T R S N F D E V H R G R

TCG ACG CCG TTC CTG GAC CGC TTC ATC CAG CGA CCG GGG CGC CGG GTG CTG GTC GAT
 S T P F L D R F I Q R P G R R V L V D

GCC ATT CAG TCG GAG CAA GCC GAC TGG TTC CTG CAC AAA CGC AAC CGC AAC ATG GTC
 A I Q S E Q A D W F L H K R N R N N M V

GTC GAG ATC GAC TCG GGC GTG GCG GAG CAC TGC TCG TTC CGC TGG CTG ACG CTC GGC
 V E I D S G V A E H C S F R W L T L G

CAG ATC CGT CGC CTG CTG CTC CGG GAC GAC CTC GTC AAT ATG GAC ACC CGC AGC GTG
 Q I R R L L L R D D L V N M D T R S V

CTG GCC TGC CTG CCG AAC TGC GCA CGG CGC ACC CGG CGA CGA CGA CGA AGG CTT CCC
 L A C L P N C A R R R T R R R R R R L P

GGC GGC GCT GAG GCG CTC CTT CTA CGG GAG ACC GAG CTC AAC GCG ATC ACC GGC TGT
 G G A E A L L L R E T E L N A I T G C

CTC ATC GAC GTC CAG GCG CTG CGT GTG CTG CGC CAG CAG AGC GTC CCG CTC AAC CAG
 L I D V Q A L R V L R Q Q S V P L N Q

GTG TAC GAG GAC GGC TGG CAA CGG ACC GGG GCC ACC ATC CGG CAC CGC AGC GGC GAG
 V Y E D G W Q R T G A T I R H R S G E

GGC TTC GAG ATC ATG GCG GTC GAG GTC ACC GCG GAG CAG CGC GAG GTG GCG TCC TGG
 G F E I M A V E V T A E Q R E V A S W

ACC CAG CCG CTG CTG CGC CCG TGC TCC CAG GGG CTG ATG GCC CTG GTC GTC CGG CGG
 T Q P L L R P C S Q G L M A L V V R R

ATC AAC GGG GCG TTG CAC GCC CTG GTG GCG GCC CGG TCG GAC GTG GGC ACG CTG AAC
 I N G A L H A L V A A R S D V G T L N

TTC GCC GAG TTC GGC CCC ACC GTG CAG CTC AGG TCG GCG TGG CCG CGC GGC AAG GGC
 F A E F G P T V Q L R S A W P R G K G

AAC CCG CCG CCG TAT CTG GAG TAC GTG CAG TCC GCT GCT CCG GGC CGC GTA CGG TAC
 N P P P Y L E Y V Q S A A P G R V R Y

GAC GCG GTG CTC TCG GAG GAG GGT GGG CGC TTC TAC CAC GCG CGC AAC CGG TAC ACG
 D A V L S E E G G R F Y H A R N R Y T

GTC GTC GAG GCC GGC CCT GAG CTG CCG GTG GAC TGC CCG CCC GGC TTC CGC TGG GCG
 V V E A G P E L P V D C P P G F R W A

ACC CTC GGG CAG CTC ACC GAA CTG CTC GCG CAC GGC AAC TAC CTC AAT GTG GAG CTG
 T L G Q L T E L L A H G N Y L N V E L

CGC ACA CTG ATC GCC TGC GCA CAC GCC TCC TAC TGA
 R T L I A C A H A S Y .

Anhang 17: DNA-Sequenz des Gens *midL* aus *S. mycarofaciens* ATCC 21454 und die zugehörige Aminosäuresequenz des abgeleiteten Genproduktes MidL

Anhang 18

As	Codon	<i>midL</i>	As	Codon	<i>midL</i>
Ala	gca	2	Leu	ctt	3
	gcc	18		tta	0
	gcg	17		ttg	2
	gct	3	Lys	aaa	2
Arg	aga	0		aag	3
	agg	3	Met	atg	5
	cga	6	Phe	ttc	14
	cgc	28		ttt	1
	cgg	15		Pro	cca
cgf	3	ccc	7		
Asn	aac	13	ccg		15
	aat	3	cct		3
Asp	gac	18	Ser		agc
	gat	3		agt	0
Cys	tgc	7		tca	0
	tgt	1		tcc	9
Gln	caa	2		tcg	7
	cag	25	tct	0	
Glu	gaa	7	Stop	taa	0
	gag	22		tag	0
Gly	gga	0		tga	1
	ggc	24	Thr	aca	1
	ggg	10		acc	15
	ggf	5		acg	6
His	cac	14	act	0	
	cat	2	Trp	tgg	8
Ile	ata	0		Tyr	tac
	atc	13	tat		1
	att	2	Val	gta	2
Leu	cta	1		gtc	16
	ctc	18		gtg	19
	ctg	28		gtt	3
S Codons					468

Anhang 18-1: Codonverwendung des Gens *midL* aus *S. mycarofaciens* ATCC 21454

Gen	G + C-Gehalt gesamt [%]	G + C-Gehalt Position 1 [%]	G + C-Gehalt Position 2 [%]	G + C-Gehalt Position 3 [%]
<i>midL</i>	69,0	72,4	46,8	87,8

Anhang 18-2: G + C-Gehalt der Codons des Gens *midL*

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Doumith M, Weingarten P, Wehmeier UF, Salah-Bey K, Benhamou B, Capdevila C, Michel J-M, Piepersberg W, Raynal MC (2000) Analysis of genes involved in the 6-deoxyhexose biosynthesis in *Sac. erythraea*. Mol Gen Genet (in press)

Vorträge/Poster

Weingarten P, Piepersberg W (1999) Investigations of the L-mycarose biosynthetic pathway of *Saccharopolyspora erythraea*. Vortrag auf der VAAM Herbsttagung der Biologie der Actinomyceten, Dresden

Weingarten P, Piepersberg W (1997) Cloning and expression of genes involved in the L-mycarose portion of the erythromycin biosynthetic pathway. Vortrag auf dem HYGLIDE Meeting II, Paris

Weingarten P, Piepersberg W (1998) Attempts to identify the enzymology of the L-mycarose pathway. Vortrag auf dem HYGLIDE Meeting III, Cambridge

Weingarten P, Piepersberg W (1999) Investigations of the L-mycarose biosynthetic pathway of *Saccharopolyspora erythraea*. Vortrag auf dem HYGLIDE Meeting V, Jülich

Weingarten P, Beyer S (1998) A bifunctional plasmid which facilitates the heterologous expression of genes in *E. coli* and Streptomycetes. Poster auf der VAAM Frühjahrstagung, Frankfurt/Main