

Untersuchungen zum Mechanismus der Kondensation  
zwischen *trans*-4-*n*-Propyl-L-prolin und  
 $\alpha$ -Methylthiolincosaminid in der Lincomycin A-Biosynthese  
aus *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936

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

eingereicht von Malte Haase

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

Zusammenfassung

Summary

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Merkmale der Streptomyceten   | 1         |
| 1.1.1    | Aufbau des Streptomycetengenoms   | 1         |
| 1.1.2    | Antibiotika-Biosynthese und -Resistenz                                    | 2         |
| 1.1.3    | Das Lincomycin A-Biosynthesecluster                                       | 3         |
| 1.2      | Lincosamid-Antibiotika  | 5         |
| 1.3      | Lincomycin-Biosynthese  | 7         |
| 1.3.1    | MTL-Biosynthese   | 9         |
| 1.3.2    | PPL-Biosynthese   | 11        |
| 1.3.3    | Der Kondensations-Mechanismus   | 12        |
| 1.3.3.1  | Das Adenylat-bildende Enzym   | 14        |
| 1.3.3.2  | Das Carrierprotein  | 16        |
| 1.4      | Zielsetzung dieser Arbeit   | 18        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>19</b> |
| 2.1      | Chemikalien und Enzyme  | 19        |
| 2.2      | Medien  | 21        |
| 2.2.1    | Nährmedien  | 21        |
| 2.2.1.1  | Medien für <i>E. coli</i>   | 21        |
| 2.2.1.2  | Medien für Actinomyceten  | 22        |
| 2.2.1.3  | Medien für <i>Micrococcus luteus</i>                                      | 23        |
| 2.2.2    | Antibiotika   | 24        |
| 2.3      | Bakterien und Plasmide  | 24        |
| 2.4      | Oligonucleotide   | 27        |
| 2.5      | Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien                              | 29        |
| 2.5.1    | Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>                                   | 29        |
| 2.5.2    | Anzucht und Lagerung von Actinomyceten                                    | 29        |
| 2.5.3    | Anzucht und Lagerung von <i>M. luteus</i>                                 | 29        |
| 2.6      | Biochemische Charakterisierung verwendeter <i>S. lincolnensis</i> -Stämme | 30        |
| 2.6.1    | Bioassay zum Nachweis von Lin A-Produktion                                | 30        |
| 2.6.2    | Bioautographie zum Nachweis von Lin A-/NDL-Produktion                     | 30        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.6.3    | Nachweis vom PPL aus <i>S. lincolnensis</i> -Kulturen   | 30        |
| 2.6.4    | Nachweis der Lin A-/NDL-Produktion mittels HPLC   | 31        |
| 2.7      | Molekularbiologische Methoden   | 31        |
| 2.7.1    | Isolierung von Nucleinsäuren  | 31        |
| 2.7.2    | Gelelektrophorese von Nucleinsäuren   | 32        |
| 2.7.3    | <i>In vitro</i> Manipulation von DNA  | 32        |
| 2.7.4    | Elution von DNA aus Agarosegelen  | 32        |
| 2.7.5    | Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten   | 32        |
| 2.7.6    | Southern Blotting und DNA-DNA-Hybridisierung  | 32        |
| 2.7.7    | Sequenzierung von DNA   | 33        |
| 2.7.8    | Polymerasekettenreaktion (PCR)  | 34        |
| 2.7.9    | Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA  | 35        |
| 2.7.10   | Herstellung von ss-DNA zur Transformation von <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936                              | 36        |
| 2.8      | Bestimmung der Proteinkonzentration   | 36        |
| 2.9      | Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)  | 36        |
| 2.10     | Immobilisierung von Proteinen auf PVDF-Membran  | 37        |
| 2.11     | Immunologischer Nachweis immobilisierter His-tag-Proteine   | 37        |
| 2.12     | Heterologe Genexpression  | 38        |
| 2.12.1   | Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter Kontrolle des Promotors P <sub>T7<math>\Phi</math>10</sub> | 38        |
| 2.12.2   | Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter Kontrolle des Promotors P <sub>rhaBAD</sub>                | 38        |
| 2.12.3   | Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i> unter Kontrolle des Promotors P <sub>ermE*</sub>             | 39        |
| 2.12.4   | Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i> unter Kontrolle des Promotors P <sub>tipA</sub>              | 39        |
| 2.13     | Gewinnung zellfreier Extrakte von <i>E. coli</i> und <i>Streptomyces</i>                                    | 39        |
| 2.14     | Reinigung von His-tag-Proteinen mittels Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose                                       | 40        |
| 2.15     | Enzymtests  | 41        |
| 2.15.1   | ATP/PPi-Austausch   | 41        |
| 2.15.2   | Posttranslationale Modifikation von His-tag-LmbN und –LmbPCP mit [3H]-4'-Phosphopantethein                  | 42        |
| 2.15.3   | Beladung von <i>holo</i> -His-tag-LmbN/-LmbPCP mit [3H]-PPL   | 42        |
| 2.15.4   | <i>In vitro</i> NDL-Synthese  | 43        |
| 2.16     | Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen  | 44        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>46</b> |
| 3.1      | Der Leserahmen <i>lmbC</i>  | 48        |
| 3.1.1    | Erzeugung und Isolierung einer <i>lmbC</i> -Knock-out-Mutante   | 48        |
| 3.1.1.1  | Konstruktion des Suizid-Vektors pMHW27  | 48        |

---

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.1.1.2 | Isolierung der <i>lmbC</i> -Mutanten   | 50 |
| 3.1.2   | Genetische Charakterisierung der <i>lmbC</i> -Knock-out-Mutante  | 51 |
| 3.1.3   | Biochemische Charakterisierung der <i>lmbC</i> -Knock-out-Mutante  | 53 |
| 3.1.4   | Komplementation der <i>lmbC</i> -Knock-out-Mutante   | 55 |
| 3.2     | Heterologe Expression des Gens <i>lmbC</i>   | 57 |
| 3.2.1   | Heterologe Expression des Gens <i>lmbC</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS  | 57 |
| 3.2.2   | Anreicherung von His-tag-LmbC aus <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS  | 58 |
| 3.3     | Nachweis der LmbC-katalysierten Enzymaktivität   | 60 |
| 3.3.1   | Qualitativer Nachweis der durch His-tag-LmbC-katalysierten ATP/PP <sub>i</sub> -Austauschreaktion in Abhängigkeit von <i>trans</i> -4- <i>n</i> -Propyl-L-prolin, L-DOPA und L-Tyrosin | 61 |
| 3.3.2   | Qualitativer Nachweis der His-tag-LmbC-katalysierten ATP/PP <sub>i</sub> -Austauschreaktion in Abhängigkeit verschiedener Aminosäuren mit ringhaltigen und offenkettigen Seitengruppen | 61 |
| 3.3.3   | Enzymkinetik und Substratspezifität von His-tag-LmbC   | 62 |
| 3.4     | Das Gen <i>lmbN</i>  | 70 |
| 3.4.1   | Sequenzüberprüfung des Gens <i>lmbN</i>  | 73 |
| 3.4.2   | Ist LmbN ein bifunktionelles Enzym?  | 73 |
| 3.4.3   | Expression von <i>lmbN</i>   | 77 |
| 3.4.3.1 | Expression von <i>lmbN</i> in <i>E. coli</i>   | 77 |
| 3.4.3.2 | Expression von <i>lmbN</i> in <i>S. lividans</i>   | 78 |
| 3.4.4   | Expression von <i>lmbPCP</i>   | 78 |
| 3.4.4.1 | Posttranslationale Modifikation von His-tag-LmbN und His-tag-LmbPCP mit [ <sup>3</sup> H]-4'-Ppant   | 82 |
| 3.4.5   | Beladung von His-tag-LmbN und His-tag-LmbPCP mit [ <sup>3</sup> H(U)]-PPL  | 84 |
| 3.4.5.1 | <i>In vitro</i> -Beladung des gereinigten His-tag-LmbN bzw. His-tag-LmbPCP mit [ <sup>3</sup> H(U)]-PPL  | 84 |
| 3.4.5.2 | <i>In vitro</i> Protein-Beladung mit [ <sup>3</sup> H(U)]-PPL in Extrakten LmbC-/LmbN-produzierender <i>E. coli</i>  | 85 |
| 3.4.5.3 | <i>In vitro</i> -Beladung mit [ <sup>3</sup> H(U)]-PPL in Extrakten LmbC-/LmbN-produzierender <i>S. lividans</i>   | 86 |
| 3.4.6   | Versuche zur <i>in vitro</i> ND <sub>L</sub> -Synthese aus PPL und MTL   | 87 |
| 3.5     | Erzeugung einer <i>lmbN</i> -Deletionsmutante  | 89 |
| 3.5.1   | Konstruktion des Suizid-Vektors pMHW16   | 89 |
| 3.5.2   | Konstruktion des Suizid-Vektors pMHW17   | 90 |
| 3.5.3   | Isolierung und genetische Charakterisierung der <i>lmbN</i> -Deletionsmutante  | 92 |
| 3.5.4   | Biochemische Charakterisierung und Komplementation der <i>lmbN</i> -Mutante  | 94 |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>                                    | <b>96</b>  |
| 4.1      | LmbC, die PPL-Adenylat Synthetase                    | 99         |
| 4.2      | LmbN/LmbPCP, eine Domänenfusion an ein Fremdprotein? | 107        |
| 4.3      | Perspektiven   | 114        |
| <b>5</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>                          | <b>116</b> |

## Abkürzungen

|           |  |                   |  |
|-----------|--|-------------------|--|
| 4-MHA     | 4-Methyl-3-hydroxyanthranilsäure       | HPLC              | Hochleistungsflüssigchromatographie<br>(High performance liquid chromatography)                            |
| 2,3-DHB   | 2,3-Dihydroxybenzoat                   | IPTG              | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid   |
| A         | Ampere                                 | k                 | Kilo-  |
| Å         | Angström                               | Kap.              | Kapitel  |
| aa        | Aminosäure                             | kat               | Katal  |
| Abb.      | Abbildung                              | kb                | Kilobasen  |
| ACP       | Acyl-Carrierprotein                    | kDa               | Kilodalton   |
| ADP       | Adenosindiphosphat                     | LC                | liquid chromatography  |
| AMP       | Adenosinmonophosphat                   | Lin               | Lincomycin   |
| APS       | Ammoniumpersulfat                      | $\lambda$         | Wellenlänge  |
| ATCC      | American Type Culture Collection (USA) | LTA               | Lipoteichonsäure   |
| ATP       | Adenosintriphosphat                    | <i>M.</i>         | <i>Micrococcus</i>   |
| <i>B.</i> | <i>Bacillus</i>                        | max               | maximal  |
| bp        | Basenpaare                             | Mb                | Megabasen  |
| BSA       | Rinderserumalbumin                     | min               | Minute(n)  |
| BUGH      | Bergische Universität Gesamthochschule | MTL               | $\alpha$ -Methylthiolinosaminid  |
| ca.       | circa                                  | MW                | Molekulargewicht   |
| Ci        | Curie                                  | mRNA              | messenger RNA  |
| CoA       | Coenzym A                              | NDL               | <i>N</i> -Demethylincomycin  |
| cpm       | counts per minute                      | nm                | Nanometer  |
| CTP       | Cytidintriphosphat                     | NMR               | magnetische Kernresonanz   |
| d         | Tag                                    | NRPS              | nicht-ribosomale Peptidsynthetase  |
| Da        | Dalton                                 | NRRL              | Northern Utilization Research and Development Division, U. S. Department of Agriculture, Peoria (Illinois) |
| DC        | Dünnschicht-Chomatographie             | nt                | Nucleotide   |
| Dcp       | D-Alanyl-Carrierprotein                | NTA               | Nitrilotriacetat   |
| dest.     | destilliert                            | NTP               | Nucleosidtriphosphat   |
| DMSO      | Dimethylsulfoxid                       | O.D. <sub>x</sub> | Optische Dichte bei x nm und 1 cm Schichtdicke   |
| DNA       | Desoxyribonucleinsäure                 | p. a.             | pro analysi  |
| DNase     | Desoxyribonuclease                     | PAA               | Polyacrylamid  |
| dNTP      | Desoxynucleosidtriphosphate            | PAG               | Polyacrylamid-Gel  |
| DOPA      | 3,4-Dihydroxyphenylalanin              | PAGE              | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| dTDP      | Desoxythymidintriphosphat              | PCP               | Peptidyl-Carrierprotein  |
| DTT       | Dithiothreitol                         | PCR               | Polymerase-Kettenreaktion  |
| <i>E.</i> | <i>Escherichia</i>                     | PEG               | Polyethylenglycol  |
| EDTA      | Ethylendiamintetraacetat               | pers.             | persönliche  |
| eV        | Elektronenvolt                         | PHA               | Propylhygrinsäure  |
| FPLC      | Fast protein liquid chromatography     |                   |  |
| h         | Stunde(n)                              |                   |  |
| His-tag   | oligo-Histidin (kodierende Sequenz)    |                   |  |

---

|                 |                                  |               |  |
|-----------------|----------------------------------|---------------|--|
| PKS             | Polyketidsynthase                | <i>Staph.</i> | <i>Staphylococcus</i>                                |
| Ppant           | Phosphopantethein                | <i>Str.</i>   | <i>Streptococcus</i>                                 |
| PP <sub>i</sub> | Pyrophosphat                     | Tab.          | Tabelle  |
| PPL             | <i>trans-4-n-Propyl-L-prolin</i> | TES           | N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-amino-ethansulfonsäure |
| PPTase          | Phosphopantethein-Transferase    | Tris          | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                       |
| psi             | pounds per square inch           | tRNA          | transfer Ribonukleinsäure                            |
| PVDF            | Polyvinylidendifluorid           | ÜN            | über Nacht   |
| RBS             | Ribosomenbindestelle             | ÜNK           | Übernachtkultur                                      |
| RNA             | Ribonucleinsäure                 | Upm           | Umdrehungen pro Minute                               |
| RNase           | Ribonuclease                     | UV            | Ultraviolettes Licht                                 |
| rRNA            | ribosomale RNA                   | V             | Volt   |
| RT              | Raumtemperatur                   | Vol           | Volumen  |
| s               | Sekunde(n)                       | vgl.          | vergleiche   |
| s.              | siehe                            | WT            | Wildtyp  |
| S               | Svedberg-Einheit                 | X-Gal         | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid              |
| <i>S.</i>       | <i>Streptomyces</i>              |               |  |
| SAM             | S-Adenosylmethionin              |               |  |
| SD              | Shine-Dalgarno (Sequenz)         |               |  |
| SDS             | Natriumdodecylsulfat             |               |  |

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der Lin A-Biosyntheseenzyme LmbC und LmbN, die als mögliche Komponenten des Multienzymkomplexes der „NDL-Synthetase“ postuliert wurden.

- Die vermutliche Beteiligung von LmbC an der Biosynthese wurde zunächst anhand der *lmbC*-Knock-out-Mutante nachgewiesen. Die Mutante zeigte den Lin A<sup>-</sup>-Phänotyp, der durch *trans*-Komplementation aufgehoben werden konnte. Im Anschluss konnte das heterolog in *E. coli* überproduzierte, lösliche His-tag-LmbC in der Funktion als PPL-Adenylat-bildendes Enzym bestätigt und sein Substratspektrum charakterisiert werden. Dabei wurde auch der Nachweis erbracht, dass PPL das natürliche Substrat von LmbC ist und das Strukturelement des Pyrrolidinrings die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Adenylierung darstellt.
- Im Verlauf dieser Arbeit wurde bei Aminosäuresequenz-Analysen am N-Terminus des ursprünglich als LmbN identifizierten Genprodukts die Konsensussequenz einer 4'-Phosphopantethein-Bindestelle eines Carrierproteins des Dcp-Typs lokalisiert. Daraufhin wurde durch erneute Sequenzierung bewiesen, dass es sich bei LmbN tatsächlich um eine Fusion zweier funktionsfremder Enzyme handelte, was zusätzlich durch Untersuchungen der heterologen Expressionsprodukte abgesichert werden konnte.
- Sowohl LmbN als auch ein Polypeptid bestehend aus den ersten 79 Aminosäuren des N-Terminus (LmbPCP) wurden als His-tag-Fusionsproteine überproduziert und angereichert, um die Funktion als Carrierenzym innerhalb der Biosynthese zu bestätigen. Zuerst wurde zu diesem Zweck versucht, die Carrierprotein-Domäne *in vitro* posttranslational mit der prosthetischen Gruppe 4'-Phosphopantethein aus Coenzym A zu modifizieren. Für das LmbPCP-Protein war dies teilweise mit der Phosphopantethein-Transferase AcpS (PPTase aus *B. subtilis*) gelungen. Jedoch konnte für das Gesamtprotein LmbN weder mit AcpS noch mit Sfp (PPTase aus *B. subtilis*) eine Phosphopantetheinylierung nachgewiesen werden. Bei den anschließenden Versuchen, LmbN bzw. LmbPCP mit der durch LmbC aktivierten Aminosäure [<sup>3</sup>H]-PPL zu beladen, konnte keine kovalente Bindung zwischen den Peptiden und dem Substrat gezeigt werden.
- Eine Beteiligung von LmbN an der Lin A-Biosynthese konnte nur mit Hilfe einer *lmbN*-Deletionsmutante eindeutig bewiesen werden. In der Mutante ließ sich der Wildtyp-Phänotyp in *trans* sowohl durch das verkürzte Gen *lmbPCP* als auch durch das komplette Gen *lmbN* wiederherstellen.



---

## Summary

This work on the Lin A-Biosynthesis set out to elucidate the enzymatic function of the enzymes LmbC and LmbN. Both polypeptides were proposed components of the „NDL-synthetase“, that was supposedly a multi enzyme complex.

- The essential participation of LmbC in the Lin A-biosynthesis was initially proven by an *lmbC* knock-out mutant. The mutant showed the expected Lin A<sup>-</sup>-phenotype that was readily complemented by plasmid encoded *lmbC* to regain the wild type phenotype. The heterologously overproduced His-tag-LmbC (*E. coli*) was confirmed in its presumed function as a PPL-adenylate forming enzyme and its substrate specificity was characterized. Moreover, the results implied PPL being the natural substrate of LmbC, and the structural element of the pyrrolidine ring system were fundamental for fitting the substrate binding pocket of the enzyme.
- In the course of this work the consensus sequence of a 4'-phosphopantetheine binding site characteristic for carrier proteins of the Dcp-type was identified at the *N*-terminal end of LmbN. By once again sequencing the *lmbN* reading frame it was determined that LmbN is a fusion of functionally independent enzymes and not resulting from sequence inaccuracies. This was confirmed by analyzing the product of the heterologous expression of *lmbN* in *S. lividans*.
- The protein LmbN as well as a polypeptide consisting of the 79 amino acids from the *N*-terminal end (LmbPCP) were overproduced as His-tag fusions. It was tested whether the carrier protein domains of both polypeptide chains could be posttranslationally modified with the prosthetic group 4'-phosphopantetheine. The LmbPCP protein was partially modified by the phosphopantetheine transferase AcpS (PPTase from *B. subtilis*), however, in assays with LmbN phosphopantetheinylation was neither observed with AcpS nor with Sfp (PPTase from *B. subtilis*). Finally, in experiments to load activated [<sup>3</sup>H]-PPL onto LmbN or LmbPCP no covalent binding between the carrier domains and the substrate were observed.
- The participation of LmbN in the biosynthesis of Lin A was merely proven by the Lin A<sup>-</sup>-phenotyp of a deletion mutant in *lmbN* that was complemented by plasmid encoded *lmbN* as well as by the shortend gene *lmbPCP*.

# 1 Einleitung

## 1.1 Merkmale der Streptomyceten

Die im Boden überwiegend obligat aerob lebenden Streptomyceten gehören wegen ihrer Sekundärmetabolite zur biotechnologisch interessantesten Gattung in der prokaryotischen Ordnung der *Actinomycetales* (Piepersberg, 1993; Korn-Wendisch und Kutzner, 1991).

Von den heutzutage in der Human- und Veterinärmedizin verwendeten antibiotisch, antiviral, zytotoxisch oder zytostatisch wirkenden Substanzen werden ca. 75% von Streptomyceten produziert (Weber *et al.*, 1985; Omura, 1992; Piepersberg und Zeeck, 1994; Piepersberg, 1997).

Streptomyceten zeigen auf festen Nährböden einen charakteristischen Lebenszyklus, der mit dem Auskeimen einer Spore beginnt. Die weitere morphologische Differenzierung verläuft über die Bildung eines verzweigten, fest mit dem Medium verbundenen Substratmycels. Gegen Ende des vegetativen Wachstums kommt es zur Ausbildung eines stark entwickelten Luftmycels mit septierten Hyphen, aus denen sich die Sporen entwickeln (Chater, 1993; Chater und Champness, 1993).

In submerser Kultur können oftmals außer der Sporenbildung die charakteristischen Entwicklungsstadien nicht beobachtet werden, stattdessen lässt sich nach einer „lag“-, eine logarithmische und schließlich eine stationäre Wachstumsphase beobachten (Blanco *et al.*, 1994). Neben der morphologischen ist auch eine physiologische Differenzierung zu beobachten, bei der, durch Umstellung der Stoffwechselprozesse, Biosynthesewege aktiviert werden, die zur Umwandlung von Primär- in Sekundärmetabolite führt (Holt *et al.*, 1992).

Darüber hinaus sind die Peptidoglykanstruktur mit L,L-Diaminopimelinsäure, das Vorkommen von Glycin in der Zellwand und ein hoher GC-Gehalt der DNA (70-78%), wobei der GC-Anteil in der dritten Kodonposition ca. 90% entspricht, charakteristische Merkmale für Streptomyceten.

### 1.1.1 Aufbau des Streptomycetengenoms

Das Genom der Streptomyceten besteht aus einem linearen Chromosom, dessen Enden an Proteine gebunden sind (Lin *et al.*, 1993). Bei *Streptomyces coelicolor* A3(2) beispielsweise

ist das Chromosom mit einer Größe von ca.  $8,7 \times 10^6$  bp etwa zweimal so groß wie das Genom von *E. coli* ( $4,7 \times 10^6$  bp). Die essentiellen Gene sind im Chromosom um den zentral lokalisierten „origin of replication“ (*oriC*) in einer Region von ca. Basenpaarposition 1,5 -  $6,4 \times 10^6$  bp angeordnet. Diese als „core“ bezeichnete Region des Chromosoms weist eine deutliche Übereinstimmung zu den Genomen der Actinomyceten *Mycobacterium tuberculosis* und *Corynebacterium diphtheriae* auf (Bentley *et al.*, 2002), was auf eine gemeinsame Abstammung schließen lässt. In den beiden Armen des *S. coelicolor* A3(2)-Chromosoms befindet sich folglich nachträglich ins Genom aufgenommene DNA.

In den beiden, bei *S. coelicolor* A3(2) mit 1,5 Mb (linker Arm) und 2,3 Mb (rechter Arm) unterschiedlich langen, DNA-Regionen außerhalb der „core“-Region verfügen Streptomyceten über eine hohe genetische Instabilität. Schon vor der Sequenzierung des kompletten *S. coelicolor* A3(2)-Chromosoms konnte durch Analyse von Mutanten, die aus spontaner oder induzierter Instabilität durch Deletionen und/oder Amplifikationen resultierten, Neuordnungen nachgewiesen werden (Birch *et al.*, 1990; Simonet *et al.*, 1992). Diese Mutanten waren vor allem durch den Verlust von vielen nicht lebensnotwendigen Funktionen gekennzeichnet, die insbesondere den Sekundärmetabolismus oder späte Zelldifferenzierungsprozesse betreffen, was durch die Ergebnisse der Sequenzierung von *S. coelicolor* A3(2) bestätigt werden konnte.

Es wurde gezeigt, dass die Gencluster für die Antibiotika Actinorhodin und Prodiginin, sowie für mindestens 18 weitere Sekundärmetabolite, nicht gleichmäßig über das Chromosom verteilt sind, sondern sich verstärkt an der Grenze der „core“-Region und dem rechten Arm befinden. Diese Gencluster sind dabei anhand von Genen für charakteristische Enzyme des Sekundärmetabolismus, darunter Polyketid-Synthasen (Typ I sowie Typ II), Chalcon-Synthasen, nicht-ribosomale Peptidsynthetasen und Terpenzyklen identifiziert worden (Bentley *et al.*, 2002).

### **1.1.2 Antibiotika-Biosynthese und -Resistenz**

Die von Streptomyceten produzierten Antibiotika werden aufgrund ihrer molekularen Struktur verschiedenen Substanzklassen zugeordnet, man findet zum Beispiel Polyketide (Tetracycline, Makrolide), Saccharide (Aminoglykoside, Lincosamide), Peptide (Actinomycin,  $\beta$ -Lactame etc.) und Nucleologe (Aminonucleoside). Die Produktionswege der einzelnen Antibiotika sind entsprechend der verschiedenen chemischen Strukturen sehr heterogen.

So unterschiedlich wie die Struktur ist auch die Wirkungsweise der aufgeführten biologisch

wirksamen Substanzen. Diese beruht auf verschiedenen Eingriffen in den Zellstoffwechsel, so werden beispielsweise die Zellwandsynthese, der Membrantransport, die DNA-Replikation, die RNA-Synthese, die Translation, der Nucleotid- und Fettsäureaufbau, sowie einzelne Enzyme des Intermediärmetabolismus inhibiert.

Eine Gemeinsamkeit in der Organisation von Antibiotika-Biosynthesegenen ist die Bildung von sogenannten Clustern, in denen die Gene für Resistenz, Produktion, Transport und Regulation in direkter Nachbarschaft, meist auf dem Chromosom, zusammengelagert sind (Martin und Liras, 1989; Vining und Stuttard, 1994; Chater und Hopwood, 1993).

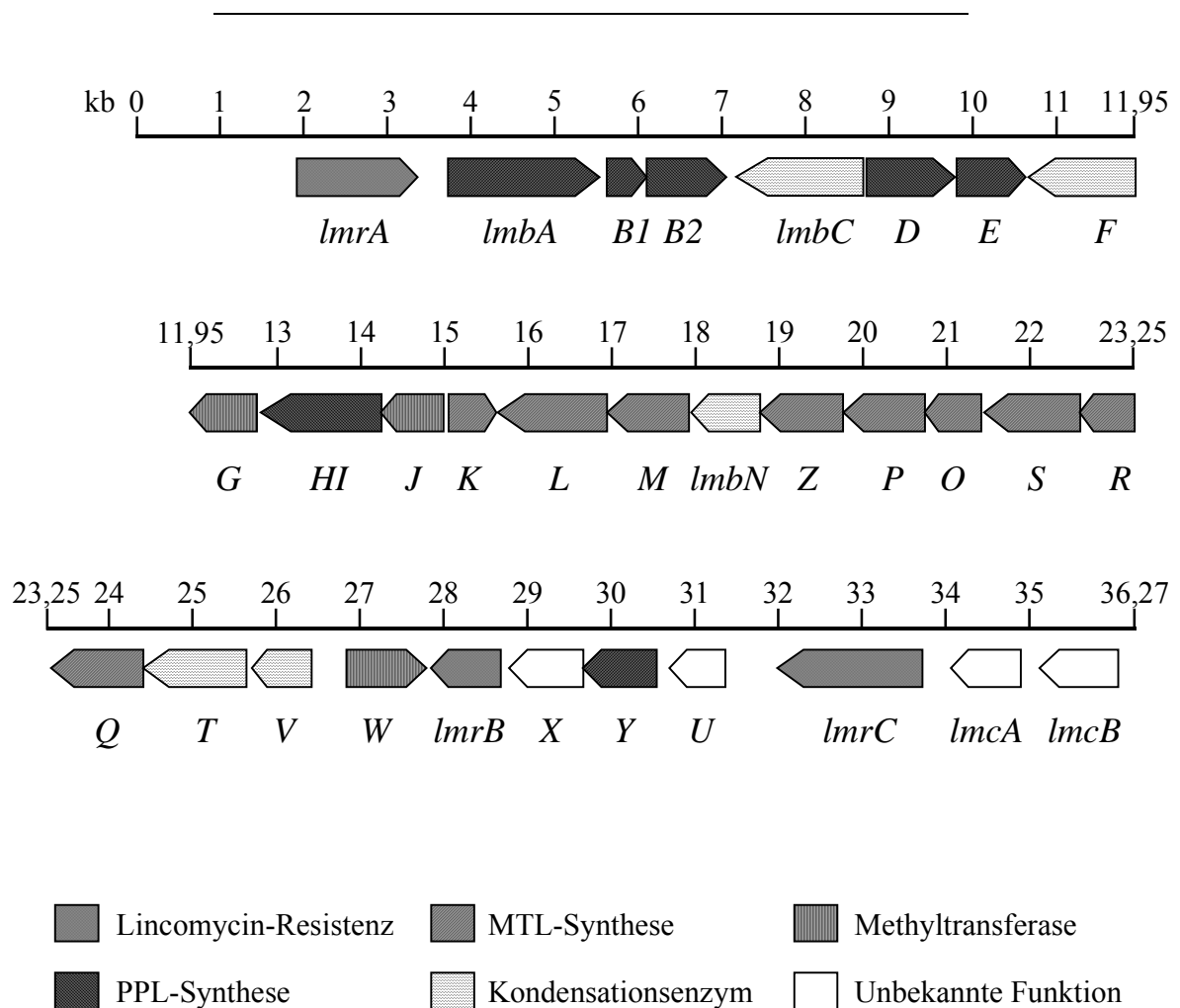
Die Produzenten schützen sich gegen die Toxizität der von ihnen synthetisierten Sekundärmetabolite durch Expression von resistenzvermittelnden Proteinen (Cundliffe, 1989). Die am weitesten verbreiteten Resistenzmechanismen in Streptomyceten basieren auf Modifikationen des Wirkortes durch Basenaustausch in der rRNA (Pernodet *et al.*, 1988) oder Methylierung der 23S rRNA (Weisblum, 1985) bzw. der 16S rRNA (Piendl *et al.*, 1982; Thompson *et al.*, 1985) und der Veränderung der Zellwanddurchlässigkeit durch aktiven Export (Ohnuki *et al.*, 1985; Neal und Chater, 1987). Alternativ wird das Antibiotikum in der Zelle durch Acetylierung (Lacalle *et al.*, 1989), Nucleotidylierung (Bozdogan *et al.*, 1999), Glycosylierung (Gourmelen *et al.*, 1998; Salas *et al.*, 1994) oder Phosphorylierung (O'Hara *et al.*, 1989; Skinner und Cundliffe, 1980) inaktiviert. Auch haben Streptomyceten vielfach Betalactamasen gegen  $\beta$ -Lactamantibiotika oder Bindeproteine für selbstproduzierte Peptidantibiotika (Gatignol *et al.*, 1988).

### **1.1.3 Das Lincomycin A-Biosynthesecluster**

Die für die Lincomycin A-Biosynthese verantwortlichen Gene (*lmb*) liegen in *S. lincolnensis* wie bei anderen Streptomyceten geclustert auf einem DNA-Fragment des Chromosoms, das ca. 34 kb umfasst (Abb. 1-1).

Durch Sequenzierung des Biosynthesegenclusters des Lin A-überproduzierenden *S. lincolnensis* 78-11 (Peschke *et al.*, 1995) wurden 29 Leserahmen identifiziert, die für postulierte Biosynthesenzyme kodieren (*lmb/lmc*-Gene), sowie drei resistenzvermittelnde Gene (*lmr*-Gene). Das Biosynthesegencluster wird flankiert von den beiden Resistenzgenen *lmrA* und *lmrC*, die Lin A in Abhängigkeit des Protonengradienten respektive der Hydrolyse von ATP aktiv aus der Zelle transportieren (Zhang *et al.*, 1992). Ein drittes Resistenzgen, *lmrB*, das etwa 4 kb (4 Leserahmen) stromaufwärts von *lmrC* lokalisiert ist, kodiert für eine 23S-rRNA-Methyltransferase (s. Kap. 1.2).

Das Gencluster wurde anhand der Ergebnisse der Untersuchungen von Lin A<sup>-</sup> Tn4556-Mutanten (Chung und Crose, 1990) in eine „linke“ und „rechte“ Hälfte unterteilt. In der linken Hälfte des Clusters sollten sich im wesentlichen die Gene der PPL-Biosynthese befinden, die Gene für die MTL-Biosynthese dagegen in einem eigenen Subcluster in der rechten Hälfte. Auffällig am MTL-Biosynthese-Subcluster war, dass alle Gene dieselbe Orientierung besaßen und zum Teil in Start- und Stoppkodon überlappten. Es wurde aus diesem Grund angenommen, dass die Gene ein einziges oder wenige gleichgerichtete Operone bilden. Die Gene, denen eine Funktion bei der Kondensation der beiden Untereinheiten aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz bzw. durch die phänotypische Untersuchung der Tn4556-Mutanten zugeschrieben wurde, scheinen dagegen über das gesamte Cluster verteilt zu sein (vgl. Abb. 1-1).

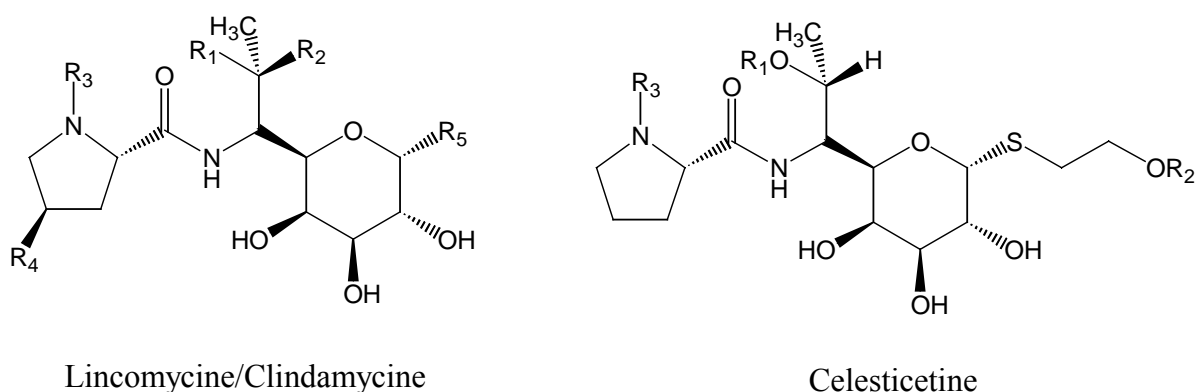


**Abb. 1-1:** Das Lincomycin A-Biosynthesecluster von *S. lincolnensis*. Die Struktur und Zuordnung ergibt sich aus den Sequenzierungsergebnissen von Peschke *et al.* (1995) und der Mutantenanalyse von Chung und Crose (1997).

## 1.2 Lincosamid-Antibiotika

Lincomycine und Celesticine sind von Bakterien produzierte Alkaloide mit der 6,8-Dideoxy-6-aminoctose Lincosamin als der zentralen und charakteristischen Leitstruktur.

Lincomycin und das semisynthetische Clindamycin, interagieren sowohl mit der A- (Aminoacyl)- als auch mit der P-(Peptidyl)-Bindestelle des bakteriellen Ribosoms, was mit Hilfe von hochauflösender Röntgenstrukturanalyse der 50S-Untereinheit des Ribosoms von *Deinococcus radiodurans* komplexiert mit Clindamycin nachgewiesen werden konnte (Schlünzen *et al.*, 2001). Das Clindamycin bildet dabei ausschließlich Wasserstoffbrückenbindungen mit der 23S-rRNA aus, jedoch nicht mit den ribosomalen Proteinen.



**Abb. 1-2: Strukturen der Lincosamide.** Die Strukturvarianten ergeben sich aus der Tabelle 1-1.

Um die ribosomale Peptidsynthese zu inhibieren, beeinflusst Clindamycin zusätzlich bereits die Bildung der 50S-Untereinheit negativ und stimuliert die vorzeitige Dissoziation der Peptidyl-tRNA vom Ribosom (Menninger *et al.*, 1994). Der Mechanismus der Interaktion zwischen Antibiotikum und Ribosom blieb lange Zeit ungeklärt bis die Aufklärung des Stereomodells erstmals ein molekulares Mimikry der Lincosamid-Antibiotika nahelegte. Lincosamide zeigen nämlich eine beachtliche Strukturähnlichkeit zu den 3'-Enden von L-Pro-Met-tRNA und deacylierter tRNA während der Initiationsphase der Pretranslokation des Peptid-Elongationszyklus (Fitzhugh, 1998).

Die Resistenz gegenüber Lincomycin bzw. Clindamycin beruht auf der Mono- bzw. Dimethylierung des N6 am Adenin 2058 (*E. coli*) der 23S-rRNA (Weisblum, 1985) durch

eine *S*-Adenosyl-Methionin (SAM)-abhängige Methyltransferase. Dadurch wird die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxylgruppen am C2- und C3-Kohlenstoff der Aminooctoseuntereinheit verhindert. Da auch Makrolid-Antibiotika, wie z.B. das Erythromycin, Wasserstoffbrücken mit N1 und N6 des Adenin 2058 ausbildet, ist die Dimethylierung des N6 von A2058 auch gegen diese Substanzklasse ein weit verbreiteter Resistenzmechanismus (Schlünzen *et al.*, 2001). Die Lincosamide werden wegen dieses Kreuzresistenzverhaltens zur MLS-Antibiotika-Familie zugeordnet, die Makrolid-, Lincosamid- und Streptogramin B-Antibiotika umfasst.

**Tab. 1-1:** Strukturvarianten von Lincomycin und Celesticetin.

| <b>Lincomycine</b>             | <b>R<sub>1</sub></b> | <b>R<sub>2</sub></b>             | <b>R<sub>3</sub></b>           | <b>R<sub>4</sub></b>            | <b>R<sub>5</sub></b>            |
|--------------------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Lincomycin A                   | -OH                  | -H                               | -CH <sub>3</sub>               | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -SCH <sub>3</sub>               |
| Lincomycin B                   | -OH                  | -H                               | -CH <sub>3</sub>               | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  | -SCH <sub>3</sub>               |
| Lincomycin C                   | -OH                  | -H                               | -CH <sub>3</sub>               | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |
| Lincomycin D                   | -OH                  | -H                               | -H                             | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -SCH <sub>3</sub>               |
| Lincomycin K                   | -OH                  | -H                               | -H                             | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |
| Lincomycin S                   | -OH                  | -H                               | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |
| Lincomycinsulfoxid             | -OH                  | -H                               | -CH <sub>3</sub>               | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -S(O)CH <sub>3</sub>            |
| Hydroxylincomycin              | -OH                  | -H                               | -H                             | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -OH                             |
| Pentyllincomycin               | -OH                  | -H                               | -H                             | -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | -SCH <sub>3</sub>               |
| Acetatlincomycin               | -OH                  | -C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O | -CH <sub>3</sub>               | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -SCH <sub>3</sub>               |
| <b>Clindamycine</b>            | <b>R<sub>1</sub></b> | <b>R<sub>2</sub></b>             | <b>R<sub>3</sub></b>           | <b>R<sub>4</sub></b>            | <b>R<sub>5</sub></b>            |
| Clindamycin                    | -H                   | -Cl                              | -CH <sub>3</sub>               | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -SCH <sub>3</sub>               |
| Ethylclindamycin               | -H                   | -Cl                              | -CH <sub>3</sub>               | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  | -SCH <sub>3</sub>               |
| Butylclindamycin               | -H                   | -Cl                              | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | -SCH <sub>3</sub>               |
| Pentylclindamycin              | -H                   | -Cl                              | -H                             | -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | -SCH <sub>3</sub>               |
| Hexylclindamycin               | -H                   | -Cl                              | -H                             | -C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> | -SCH <sub>3</sub>               |
| Demethylclindamycin            | -H                   | -Cl                              | -H                             | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -SCH <sub>3</sub>               |
| Epiclindamycin                 | -Cl                  | -H                               | -CH <sub>3</sub>               | -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>  | -SCH <sub>3</sub>               |
| <b>Celesticetine</b>           | <b>R<sub>1</sub></b> | <b>R<sub>2</sub></b>             | <b>R<sub>3</sub></b>           |                                 |                                 |
| Celesticetin A                 | -CH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>                 | -Salicylyl                     |                                 |                                 |
| Celesticetin B                 | -CH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>                 | -Isobutyryl                    |                                 |                                 |
| Celesticetin C                 | -CH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>                 | -Anthranilyl                   |                                 |                                 |
| Celesticetin D                 | -CH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>                 | -Acetyl                        |                                 |                                 |
| Desalicyl                      | -CH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>                 | -H                             |                                 |                                 |
| <i>O</i> -Demethylcelesticetin | -H                   | -CH <sub>3</sub>                 | -Salicylyl                     |                                 |                                 |
| <i>N</i> -Demethylcelesticetin | -CH <sub>3</sub>     | -H                               | -Salicylyl                     |                                 |                                 |
| Dedimethylcelesticetin         | -H                   | -H                               | -Salicylyl                     |                                 |                                 |
| <i>O</i> -Demethyl-desalicyl   | -H                   | -CH <sub>3</sub>                 | -H                             |                                 |                                 |
| Desalicylinsalicylat           | -CH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>                 | - <i>p</i> -Aminosalicylyl     |                                 |                                 |

### 1.3 Lincomycin-Biosynthese

Lin A wurde erstmals aus Kulturen von *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936 isoliert, doch wird es auch von einer Vielzahl weiterer Actinomycetenstämme produziert (Tab. 1-2).

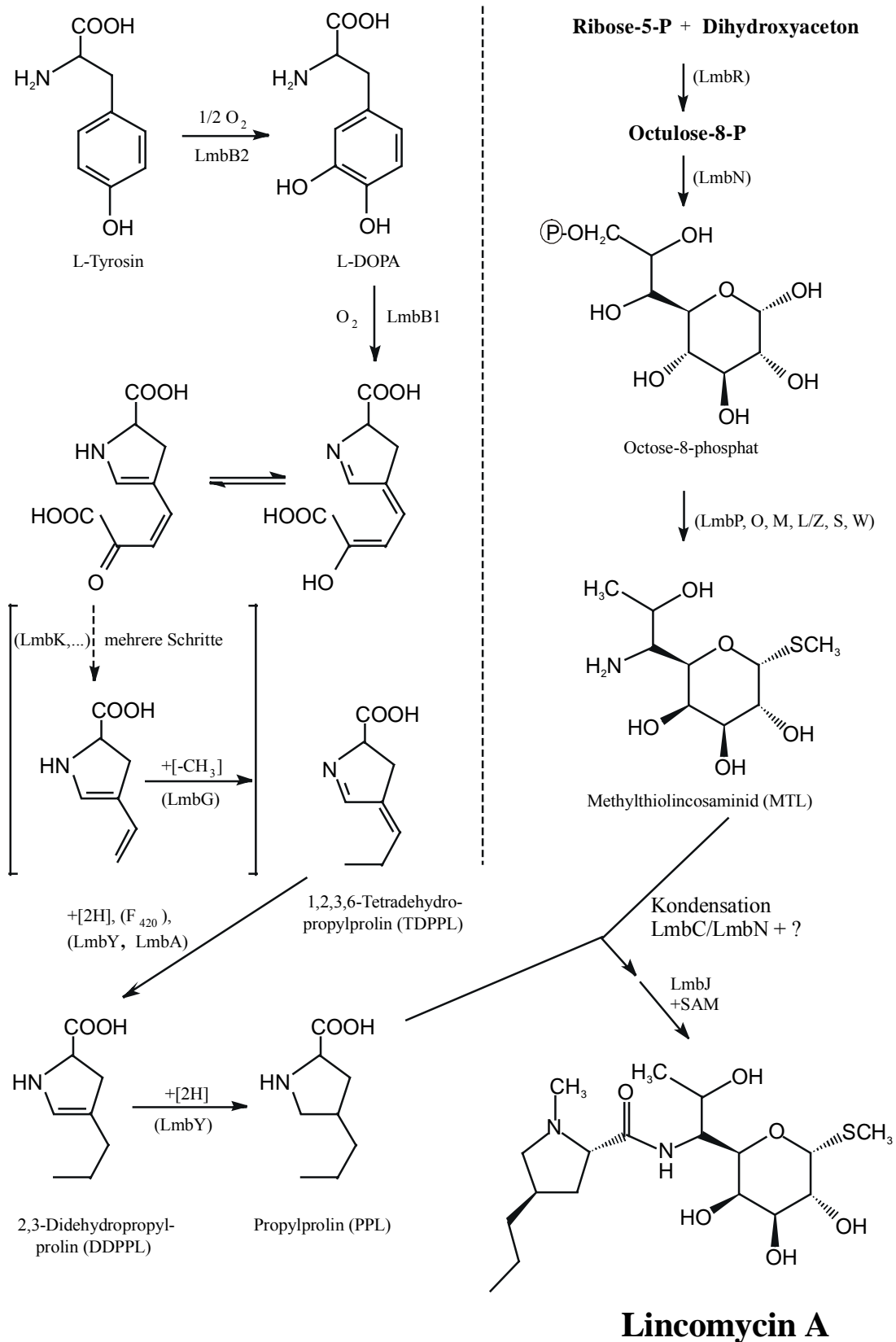
**Tab. 1-2:** Lincomycin- und Celesticetin-produzierende Organismen

| Antibiotikum                     | Organismus                          | Literatur                       |
|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Lincomycin                       | <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936    | Mason <i>et al.</i> (1963)      |
|                                  | <i>S. umbrinus</i>                  | Patterson <i>et al.</i> (1964)  |
|                                  | <i>S. espinosus</i> NRRL 5729       | Argoudelis <i>et al.</i> (1972) |
|                                  |                                     | Reusser und Argoudelis (1974)   |
|                                  | <i>S. pseudogriseolus</i> NRRL 3985 | Argoudelis und Coats (1973)     |
|                                  | <i>S. variabilis</i>                | Argoudelis und Coats (1974)     |
|                                  | <i>S. vellosus</i> NRRL8037         | Bergy <i>et al.</i> (1975)      |
| <i>Actinomyces roseolus</i> 1147 | Gause <i>et al.</i> (1975)          |                                 |
| Celesticetin                     | <i>S. caelestis</i> NRRL 2418       | Hoeksema <i>et al.</i> (1955)   |
|                                  |                                     | DeBoer <i>et al.</i> (1955)     |
|                                  |                                     | Argoudelis und Brodasky (1972)  |

Lin A besteht aus der Aminosäure-Untereinheit *trans*-4-*n*-Propyl-L-hygrinsäure (PHA; Hoeksema *et al.*, 1964; Magerlein *et al.*, 1967; Slomp und MacKellar, 1967) und der Zucker-Untereinheit  $\alpha$ -Methylthiolincosaminid (MTL). Die Carboxylgruppe des PHA ist mit der Aminogruppe an C6 des MTL durch eine Amidbindung verknüpft (Abb. 1-2). Die Biosynthese verläuft biphasisch: In der ersten Phase werden die Untereinheiten MTL und PPL auf separaten Biosynthesewegen synthetisiert und aktiviert, und in der zweiten Phase erfolgt die Kondensation und Modifikation (Abb. 1-3).

Bei der Fermentation der Lin A-Produzenten (vgl. Tab. 1-2) entsteht als Nebenprodukt stets das weniger antibiotisch wirksame Lincomycin B, bei dem an der C4-Position des Pyrrolidinrings eine Ethyl- statt einer *n*-Propylgruppe gebunden ist (vgl. Abb. 1-2 u. Tab. 1-1). Das Lincomycin C konnte unter Standard-Fermentationsbedingungen nur aus Kulturen von *Streptomyces umbrinus* var. *cyaneoninger* isoliert werden, wohingegen die anderen Lincomycine nur durch Supplementation des Kulturmediums mit Hemmstoffen wie Ethioninen, Sulfonamiden oder Sulfanilamiden nachgewiesen werden konnten (Argoudelis und Coats, 1973).





**Abb. 1-3: Postulierter Lincomycin A-Biosyntheseweg.** Grundlage für den dargestellten Biosyntheseweg sind die Ergebnisse von Brahme *et al.* (1984a,b), Kuo *et al.* (1992), Schmidt (1994), Neußer (1999), Peschke *et al.* (1995) und Arnold (2000).

### 1.3.1 MTL-Biosynthese

Nach einem Postulat von Brahme *et al.* (1984b) sollte die Biosynthese der MTL-Untereinheit mit dem Aufbau des C<sub>8</sub>-Grundgerüsts durch eine Transaldolasereaktion zwischen den Metaboliten des Pentosephosphat-Zyklus, Sedoheptulose-7-phosphat und Ribose-5-phosphat, beginnen. Anschließend sollte das C<sub>8</sub>-Kohlenhydrat durch eine Isomerase, Phosphomutase, Enolase, Octokinase, Tautomerase, Transaminase und einer Thiomethyltransferase in MTL überführt werden. Dieser Biosyntheseweg kam ohne nucleotidaktivierte Zwischenstufen aus und stand den Ergebnissen der Sequenzvergleiche der Gene des Biosynthesegenclusters (Peschke *et al.*, 1995) gegenüber. Die Analyse der abgeleiteten Proteinsequenzen der Biosynthesegene ergab, dass *lmbO*, *lmbM* und *lmbS* jeweils für Enzyme kodierten, die in vielen anderen Organismen für die Bildung von nucleotidaktivierten 6-Desoxyhexosen verantwortlich sind (Pissowotzki *et al.*, 1991; Piepersberg und Distler, 1997). Das Gen *lmbO* sollte demnach für eine vermutliche NDP-Zucker-Synthase, *lmbN* für eine NDP-Zucker-Dehydratase und *lmbS* für eine mögliche Zucker-Aminotransferase kodieren. Dieser Befund hätte eine Biosynthese nahegelegt, die mit der Nucleotidylylierung z.B. von Glucose-1-phosphat durch LmbO beginnt, gefolgt von einer Dehydratasereaktion katalysiert durch LmbM, die zur NDP-4-Keto-6-desoxyglucose führte, welches anschließend durch LmbS katalysiert zu NDP-6-Desoxy-4-glucosamin transaminiert wurde. Die Erweiterung des Kohlenhydrat-Grundgerüsts um zwei weitere Kohlenstoffe sollte zu einem späteren Zeitpunkt in der Biosynthese stattfinden. Jedoch erschien eine Kettenverlängerung an C6-Position der Aminohexose unwahrscheinlich, da dort nach der Dehydratisierungsreaktion eine biosynthetisch schwer zugängliche Methylgruppe entstanden sein sollte. Die Kettenverlängerung an C1 jedoch würde gleichzeitig zu einer Deaktivierung dieser Position führen (Arnold, 2000).

Durch zunehmende Verfügbarkeit von DNA- sowie Protein-Sequenzdaten konnte für LmbR eine signifikante Sequenzidentität zu Transaldolasen des MipB/TalC-Typs nachgewiesen werden, die eine reversible Kondensation von Dihydroxyaceton mit Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Fructose-6-phosphat katalysieren (Schürmann und Sprenger, 2001). Auch für LmbM konnte eine höhere Verwandtschaft zu 4-Epimerasen (GalE-Typ) festgestellt werden als zu den Dehydratasen StrE und TylY. Dementsprechend wurde im MTL-Biosyntheseweg (Abb. 1-4) postuliert, dass die C<sub>8</sub>-Ketose in einer Aldolkondensation zwischen Ribose-5-phosphat und Dihydroxyaceton entstehen und mit Hilfe von LmbN in eine Aldose isomerisiert werden sollte. Der Transfer der Phosphatgruppe von C8 zu C1 würde dann

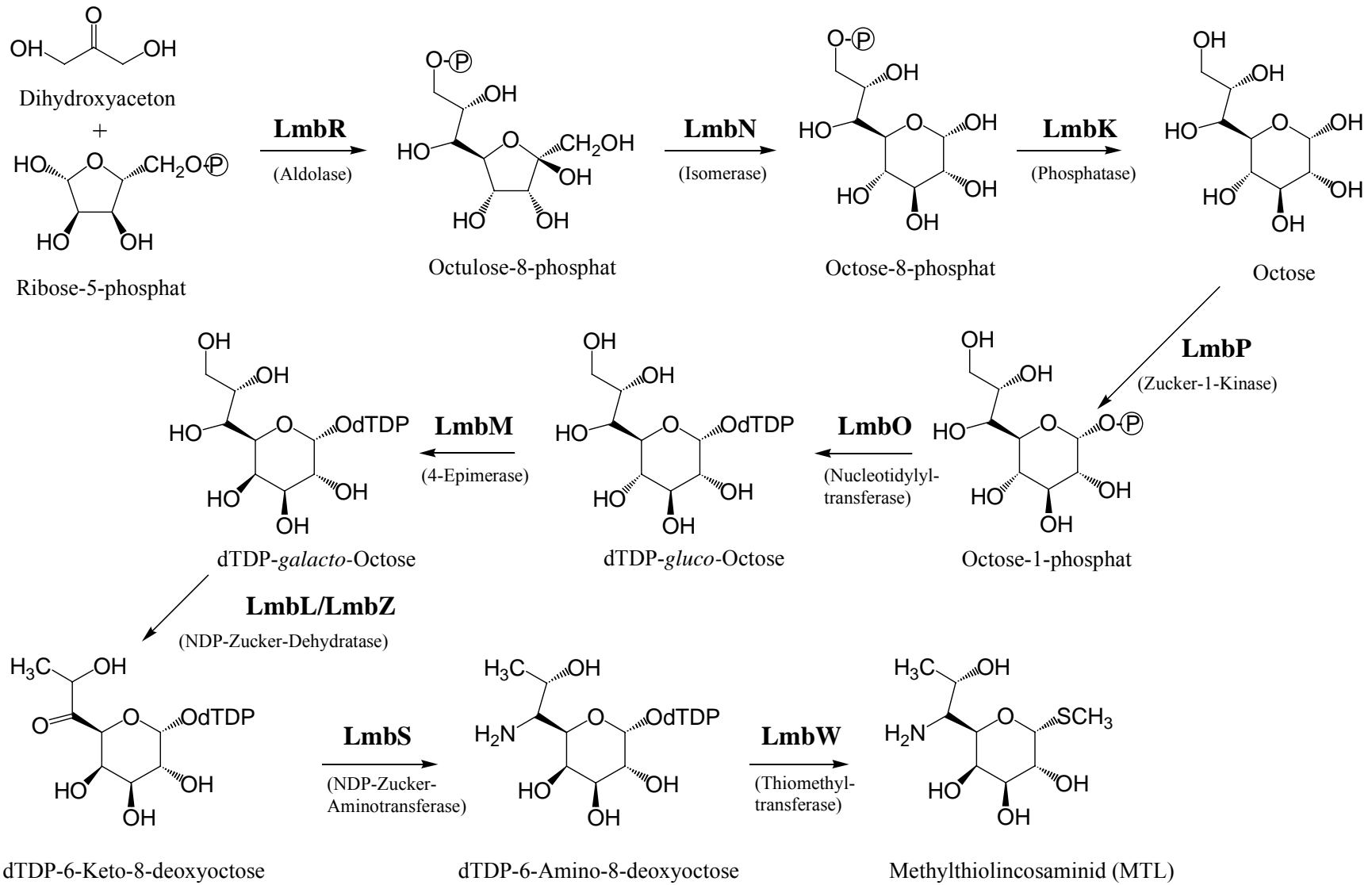


Abb. 1-4: Postulierter MTL-Biosyntheseweg nach Arnold (2000).

wahrscheinlich in zwei Biosyntheseschritten realisiert, wobei LmbK die Phosphatasereaktion und LmbP die anschließende 1-Phosphorylierung katalysieren sollten. Die Nucleotidylierung katalysiert durch LmbO sollte vermutlich erfolgen, bevor die NDP-Octose von der *gluco-* in die *galacto-*Konfiguration epimerisiert wird (vgl. Abb. 1-4). Für die Dehydratisierung kämen im Anschluss als Enzyme entweder LmbL oder LmbZ in Frage, durch deren Katalyse NDP-6-Keto-8-desoxyoctose entstünde, die an C6-Position durch LmbS transaminiert würde. Abschließend würde das MTL durch einen Thiomethylgruppen-Transfer gebildet, der von LmbW katalysiert werden könnte.

### 1.3.2 PPL-Biosynthese

Alle bisher durchgeführten Untersuchungen zur PPL-Biosynthese (vgl. Abb. 1-3) hatten bewiesen, dass L-Tyrosin ein Biosynthese-Vorläufer der Aminosäureuntereinheit darstellt. So wurde Lin A-produzierenden Zellen L-[1-<sup>14</sup>C]-Tyrosin gefüttert, wobei sich die gesamte im Lin A akkumulierte Radioaktivität in der Carboxylgruppe der Aminosäure-Untereinheit wiederfand. Darüber hinaus konnte anhand von Fütterungsexperimenten mit L-[(U)<sup>14</sup>C]-Tyrosin nachgewiesen werden, dass sieben der neun Kohlenstoffe der PHA aus L-Tyrosin stammten (Witz *et al.*, 1971).

Die Kohlenstoffatome, die nicht im L-Tyrosin ihren Ursprung hatten, wurden wahrscheinlich in SAM-abhängigen Methylierungsreaktionen übertragen. Mit Hilfe von L-[<sup>14</sup>C]-Methionin konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die terminale Methylgruppe des *n*-Propyl-Restes als auch die Methylgruppen am Stickstoffatom der PHA-Untereinheit und am Schwefelatom der MTL-Untereinheit vom C1-Donor Methionin stammten (Argoudelis *et al.*, 1969).

Auch durch Untersuchung des <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C-Spinnkopplungsmusters der PHA-Untereinheit nach Fütterung von D-[(U)<sup>13</sup>C]-Glucose konnte der Ursprung der Biosynthese bei L-Tyrosin bestätigt werden, welches in ersten Biosyntheseschritt zu L-DOPA umgesetzt wurde. Zudem wurde bei diesen Untersuchungen der Nachweis erbracht, dass die anschließende Ringöffnung von L-DOPA höchstwahrscheinlich zwischen den Kohlenstoffen C2 und C3 erfolgte (Brahme *et al.*, 1984a).

Kuo *et al.* (1989 u. 1992) stellten bei Komplementationsexperimenten fest, dass für die PPL-Biosynthese ein Cofaktor nötig war, dessen Struktur als 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin bestimmt werden konnte. Der Cofaktor war mit der Deazariboflavineinheit des aus methanogenen Bakterien bekannten F<sub>420</sub>- (F<sub>0</sub>-Fragment) strukturgleich (Coats *et al.*, 1989) und konnte zuvor bereits in der Tetracyclin-Biosynthese von *Streptomyces*

*aureofaciens* nachgewiesen werden (McCormick und Morton, 1982). Die Beteiligung des Cofaktors („cosynthetic factor“, CF) wurde für die Reduktion von 1,2,3,6-Tetradehydropropylprolin (TDPPL) zu 2,3-Didehydropropylprolin (DDPPL) postuliert. Für *LmbA* wurde vermutet, dass dieses Enzymprotein an der Bildung des CF beteiligt sein könnte, da es zur Enzymfamilie der  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidasen/Cephalosporin-Acy lasen gehört und das Redox-Coenzym  $F_{420}$  in seiner aktiven Form eine  $\gamma$ -Glutamyl-Seitengruppe besitzt (Eirich *et al.*, 1978). Allerdings konnte ein CF<sup>-</sup>-Phänotyp in den Lin A<sup>-</sup>-Mutanten, die aus der Integration des Transposons Tn4556 in ein DNA-Segment mit *lmbA* resultierten, nicht bestätigt werden. Der beobachtete Lin A<sup>-</sup>-Phänotyp ließ sich ebenso durch polare Effekte bei der Expression der stromabwärts des Operons *lmbB1B2* lokalisierten Gene erklären. Die heterolog exprimierten Genprodukte *LmbB1/B2* setzten L-Tyrosin nachweislich zu einer intensiv gelben, bisher unbekanntem Substanz um, die ein Zwischenprodukt der PPL-Biosynthese darstellen sollte (Neußer *et al.*, 1998).

### 1.3.3 Der Kondensations-Mechanismus

Zum Mechanismus des Kondensationsprozesses war vor Beginn dieser Arbeit vergleichsweise wenig bekannt. Wahrscheinlich stellt die Verknüpfung von MTL und PPL den vorletzten Biosyntheseschritt vor der N-Methylierung des ND L dar (Abb. 1-5). Durch die Fermentationsexperimente von Argoudelis *et al.* (1969) wurde gezeigt, dass es durch Zusatz einer hohen MTL-Konzentration neben der Produktion von Lin A zu einer Akkumulation von ND L im Medium kam. Die Funktion des Kondensationskomplexes der „NDL-Synthetase“ wurde weitergehend durch Hausknecht und Wolf (1986) mit Hilfe von [<sup>14</sup>C]-PPL untersucht. *In vitro* konnte es zusammen mit ATP, Mg<sup>2+</sup> und einem Überschuss an MTL durch Gesamtzellextrakte aus *S. lincolnensis* zu [<sup>14</sup>C]-NDL kondensiert werden. Wenn [<sup>14</sup>C]-PPL in diesem Assay jedoch durch [<sup>14</sup>C]-PHA ersetzt wurde, bildete sich kein [<sup>14</sup>C]-Lin A. Dies legte die N-Methylierung des ND L als letzten Biosyntheseschritt nahe, was durch die Untersuchungen von Stühler (1999) bestätigt werden konnte.

Durch die Analyse der Phänotypen von Tn4556-Mutanten des Biosyntheseklusters (Chung *et al.*, 1997) wurden insgesamt vier unterschiedliche Stämme isoliert, die einen ND L<sup>-</sup>-Phänotyp (*S. lincolnensis* B19, C4, 3-1 und 11-1) aufwiesen. Daraus wurde geschlossen, dass die ND L-Synthetase aus mehreren unterschiedlichen Untereinheiten bestand. Durch Verlust der ND L-Synthetase-Aktivität nach Gelfiltration des zellfreien *S. lincolnensis*-Extraktes bestätigte sich diese Hypothese, da die einzelnen Protein-Untereinheiten reversibel dissoziierbar waren. Die

Aktivität konnte durch Kombination spezifischer Fraktionen der Gelfiltration wiederhergestellt werden. Leider sind diese Ergebnisse in der Literatur so unzureichend dokumentiert, dass es bisher nicht gelang diese zu reproduzieren.

Für den postulierten Kondensationsprozess, der nach einem ähnlichen Mechanismus (vgl. Abb. 1-5) abläuft wie die Aminosäureverknüpfung an nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), werden vier Enzymfunktionen benötigt.

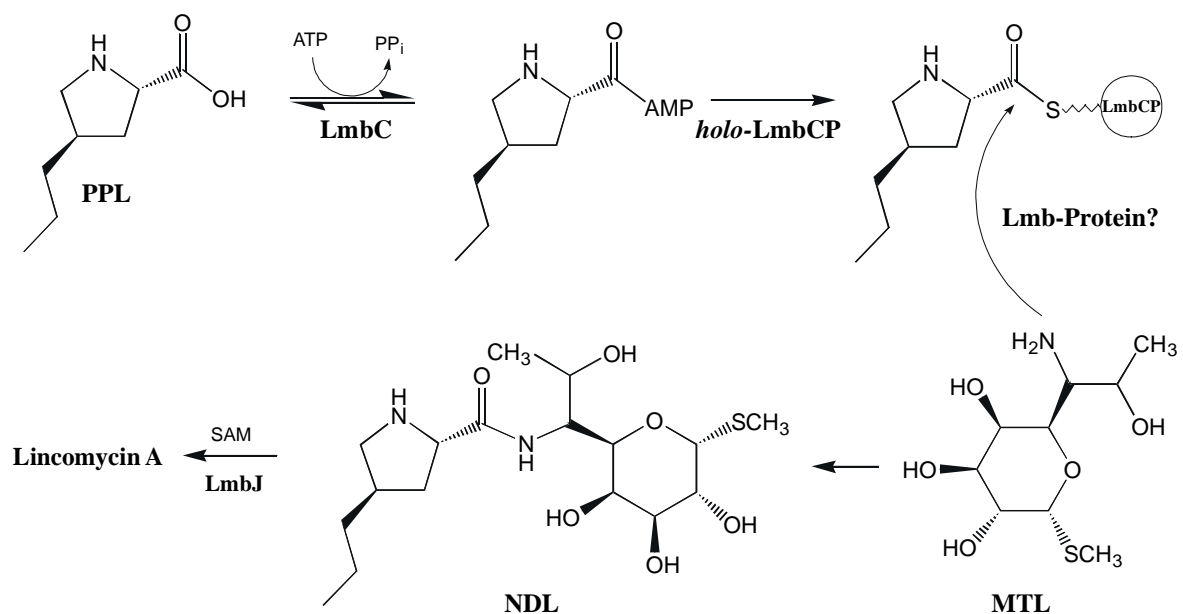


Abb. 1-5: Postulierter Mechanismus der Kondensation von PPL und MTL zu NDL.

Den Initiationschritt der Amidbindungsbildung sollte die Aktivierung von PPL als Aminoacyladenylat unter Verbrauch von ATP darstellen. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen von Hausknecht und Wolf (1986), die eine Bildung von NDL nur in Gegenwart von ATP, Mg<sup>2+</sup> und MTL beobachteten. Nach der Adenylylierung von PPL sollte es dann zur Bildung eines reaktiven Thioesters an einem Carrierprotein („LmbCP“) kommen, welches das aktivierte Substrat anschließend ins aktive Zentrum des kondensierenden Enzyms transferieren sollte. Schließlich würde zusätzlich eine 4'-Phosphopantethein-Transferase (PPTase) benötigt, die das Carrierprotein mit der prosthetischen Gruppe posttranslational modifizieren sollte.

### 1.3.3.1 Das Adenylat-bildende Enzym

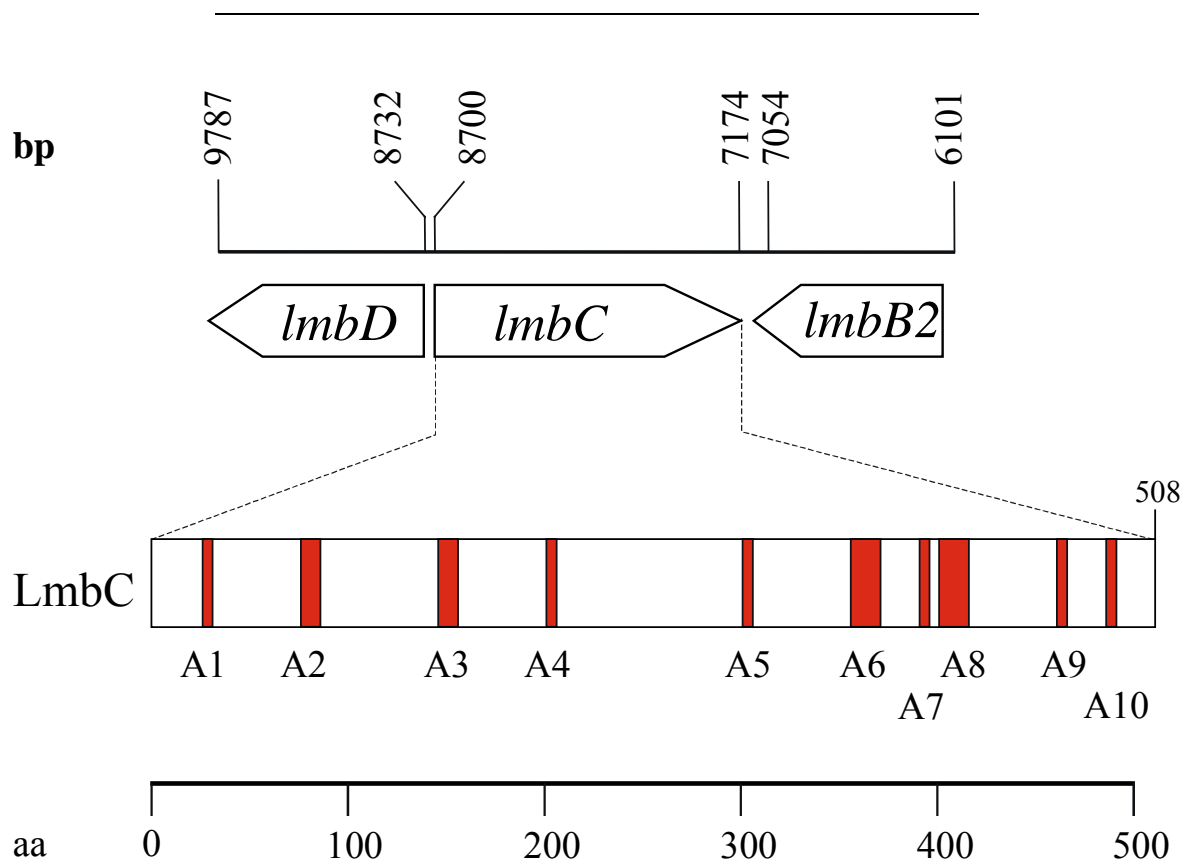
Von den Biosynthesefunktionen, die für den postulierten Mechanismus notwendig sein sollten, konnte bisher im *lmb/lmc/lmr*-Cluster lediglich das Gen *lmbC* identifiziert werden. Dessen abgeleitete Aminosäuresequenz kodierte für ein putativ adenilylierendes Enzym (Peschke *et al.*, 1995). Dass LmbC an der Kondensation beteiligt ist, wurde durch die Tatsache gestützt, dass der Mutanten-Stamm *S. lincolnensis* B19 das Transposon in ein das *lmbC*-tragende Clustersegment integriert hatte und den NDL<sup>-</sup>-Phänotyp besaß (Chung *et al.*, 1997). Die Aktivierung von PPL als Aminoacyladenylat, katalysiert durch LmbC, konnte *in vitro* bislang jedoch noch nicht nachgewiesen werden (Schmidt, 1994; Peschke *et al.*, 1995). Die Superfamilie der Adenylat-formenden Enzyme wird in zwei Gruppen unterteilt (Turgay *et al.*, 1992): Die Enzyme der Gruppe I, zu denen auch die A-Domänen der NRPS gehören, besitzen eine hochkonservierte 4'-Ppant-Bindestelle, die C-terminal von der Adenilylierungs-(A) Domäne lokalisiert ist. Dieser Cofaktor ermöglicht es dem Enzym das aktivierte Acyl-Substrat kovalent zu binden. Im Gegensatz dazu besitzen die Enzyme der Gruppe II, zu denen CoA-Ligasen, Luziferasen und Acetyl- und Fettsäure-CoA Synthasen gezählt werden, keine solche 4'-Ppant-Bindestelle. Sie aktivieren ihre Substrate zwar ebenfalls als Adenylate, jedoch ohne sie anschließend kovalent zu binden.

Die Aminosäure-Aktivierung verläuft generell in zwei Schritten: Zuerst wird die Aminosäure durch Hydrolyse von ATP als Aminoacyladenylat aktiviert, und anschließend wird ein energiereicher Aminoacylthioester unter Abspaltung von AMP gebildet (Cane und Walsh, 1999). Die Art der Aktivierung der Aminosäure ähnelt somit der Bildung von Aminoacyl-tRNAs für die ribosomale Peptidsynthese, wo zur Aktivierung das Aminoacyladenylat der Carboxylgruppe der Aminosäure zur Bildung eines Esters zwischen der 2'- bzw. 3'-OH Gruppe des 3'-Endes der tRNA entsteht (Stachelhaus und Marahiel, 1995).

Die A-Domänen stellen in den modularen NRPS die zentrale Funktion zum Kettenverlängerungsprozess dar. Für jede Aminosäure des zu synthetisierenden Peptids existiert eine dazugehörige A-Domäne, deren Position innerhalb der modular aufgebauten NRPS die Primärstruktur des Peptidprodukts bestimmt. Da die A-Domänen die Aufgabe der Substraterkennung übernehmen, sind sie intensiv charakterisiert worden. Von den 10 konservierten, essentiellen Sequenzmotiven der A-Domänen (Marahiel *et al.*, 1997) sind die fünf am stärksten konservierten „core“-Motive (Tab. 1-3) um das aktive Zentrum lokalisiert. Darüber hinaus sind die Positionen der variablen Aminosäurereste um das aktive Zentrum bekannt, die über die Spezifität entscheiden (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis *et al.*, 2001), so dass es in den meisten Fällen möglich ist, anhand der Primärstruktur einer unbekanntes A-

Domäne auf ihre Substratspezifität zu schließen. A-Domänen liegen zumeist als integrale Abschnitte innerhalb eines Moduls vor, das neben der A- eine Peptidyl-Carrierprotein (PCP)-Domäne, eine Kondensations (C)-Domäne und optional Domänen zur Substratmodifikation (Epimerisierung, *N*-Methylierung) besitzen kann. Zudem liegen häufig mehrere Module auf der Polypeptidkette einer NRPS vor (Marahiel *et al.*, 1997). Ein Minimalmodul besitzt neben der A-Domäne zumindest eine PCP-Domäne, die in der Polypeptidkette direkt auf die A-Domäne folgt.

Insgesamt umfasst ein solches Minimalmodul ca. 650 Aminosäurereste. Die A-Domäne selbst besitzt dabei eine Länge von etwa 550 Aminosäureresten und zeigt eine signifikante Homologie zu Acyl-CoA Synthasen und Luziferasen, die analoge Reaktionen katalysieren (Turgay *et al.*, 1992), so dass sie in der Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme zusammengefasst werden.



**Abb. 1-6:** Schematische Übersicht über die Anordnung der konservierten, für A-Domänen charakteristischen Sequenzmotive (A1-10, Tab. 1-3) in der Peptidsequenz von LmbC.

Das Polypeptid LmbC umfasst hingegen lediglich die Aminosäuresequenz einer



Aktivierungsdomäne (Abb.1-6), die C-terminal nicht von einer dazugehörigen Carrierprotein-Domäne gefolgt wird. Darüber hinaus ist LmbC für ein eigenständiges, Aminosäureaktivierendes Enzym außergewöhnlich kurz, obwohl es alle als essentiell charakterisierten Sequenzmotive einer A-Domäne besitzt. Es besteht lediglich aus 508 Aminosäureresten, und bei Sequenzvergleichen fiel auf, dass LmbC am C-Terminus gegenüber vergleichbaren Proteinen verkürzt ist, was besonders die Position des invarianten Lysinrests K<sub>493</sub> im Motiv A10 (vgl. Abb. 1-6 u. Tab. 1-3) deutlich macht. Der entsprechende Lysinrest ist in der L-Phenylalanin A-Domäne der Gramicidin S-Synthetase GrsA erst an Position K<sub>517</sub> zu finden (Conti *et al.*, 1997).

**Tab. 1-3:** Konservierte Aminosäuresequenzmotive der A-Domänen aus NRPS. [Motiv-Nomenklatur und die Konsensussequenzen nach Marahiel *et al.* (1997)].

| Motiv       | Position | Konsensussequenz <sup>1)</sup>   |
|-------------|----------|--|
| A1          | 32-37    | L( <u>TS</u> ) <u>Y</u> x <u>EL</u>                                    |
| A2 (core 1) | 77-88    | <u>LKAG</u> x <u>AYL</u> ( <u>VL</u> ) <u>P</u> ( <u>LI</u> ) <u>D</u> |
| A3 (core 2) | 152-167  | L <u>A</u> YxxY <u>TSG</u> ( <u>ST</u> ) <u>TG</u> x <u>PKG</u>        |
| A4          | 203-206  | <u>FD</u> x <u>S</u>   |
| A5          | 298-304  | <u>N</u> x <u>YGPTE</u>  |
| A6 (core 3) | 349-363  | <u>GEL</u> xIx <u>G</u> xG( <u>VL</u> ) <u>ARGYL</u>                   |
| A7 (core 4) | 385-390  | <u>Y</u> ( <u>RK</u> ) <u>TGDL</u>                                     |
| A8 (core 5) | 403-423  | <u>GR</u> x <u>D</u> xQV <u>KIRG</u> x <u>RIELGEIE</u>                 |
| A9          | 471-478  | <u>LP</u> xYM( <u>IV</u> ) <u>P</u>                                    |
| A10         | 491-497  | <u>NGK</u> ( <u>VL</u> ) <u>DR</u>                                     |

<sup>1)</sup>Die Aminosäurereste der Konsensussequenz, die mit der LmbC-Sequenz identisch sind, wurden durch Unterstreichen hervorgehoben.

### 1.3.3.2 Das Carrierprotein

Im postulierten Kondensationsmechanismus für NDH würde das PPL-AMP auf den Cysteaminrest eines an ein Carrierprotein gebundenen 4'-Phosphopantetheinylrests übertragen. Das PPL sollte an das Carrierprotein als Aminoacylthioester gebunden bleiben, bis es - vermittelt durch ein kondensierendes Enzym - auf die Aminogruppe an C6 des MTL übertragen würde.

Carrierproteine sind als Acyl-Carrierproteine (ACPs) aus der Fettsäurebiosynthese (FAS; Larrabee *et al.*, 1965) und den Polyketidsynthasen (PKS) sowie als Peptidyl-Carrierproteine (PCPs) oder Aryl-Carrierproteine (ArCP) aus NRPS-Systemen bekannt (Cane und Walsh,

1999). Abhängig von der Beschaffenheit der Multienzymkomplexe liegen die etwa 80-100 Aminosäuren langen Polypeptide als integrierte Domänen (ACPs der PKS vom TypI und PCPs der NRPS) oder individuelle Proteine (ACP der FAS bzw. der PKS vom TypII) vor (Mootz *et al.*, 2001). Schließlich sind aus der Lipoteichonsäure (LTA)-Biosynthese Gram-positiver Bakterien D-Alanyl-Carrierproteine (Dcps) als individuelle Proteine mit einer Länge von ca. 80 Aminosäuren bekannt (Heaton und Neuhaus, 1994; Kiriukhin und Neuhaus, 2001).

Alle Carrierproteine benötigen für ihre Aktivität die prosthetische Gruppe 4'-Phosphopantethein (Ppant), die kovalent an einen konservierten Serinrest gebunden wird und damit dem Enzym einen flexiblen Arm der Länge von 20 Å verleiht. Die inaktive *apo*-Form des Carrierproteins wird posttranslational mit der prosthetischen Gruppe, die aus Coenzym A unter Abspaltung von 3',5'-ADP übertragen wird, zur aktiven *holo*-Form modifiziert (Lambalot *et al.*, 1996).

Die Carrierproteine des ACP- bzw. PCP-Typs besitzen zwar ein entsprechendes, stark konserviertes Sequenzmotiv (Marahiel *et al.*, 1997) DxFFxxLGG(HD)S(LI) um den invarianten Serinrest (unterstrichen), doch werden sie von verschiedenen Enzymtypen modifiziert. Das Sequenzmotiv der Ppant-Bindestelle von Dcps unterscheidet sich jedoch geringfügig von dem der ACPs/PCPs. Dennoch können die Dcps von *Lactobacillus casei* und *Bacillus subtilis* durch *holo*-ACP Synthase (AcpS) der Fettsäure-Biosynthese modifiziert werden, wohingegen PCPs nicht modifiziert werden. Für die Phosphopantetheinylierung der PCPs gibt es spezifische Phosphopantethein-Transferasen (PPTasen). Beispielsweise überführt EntD aus dem Enterobactin-Biosynthesecluster von *E. coli* das ArCP EntB und die PCP-Domäne im EntF in die *holo*-Form (Gehring *et al.*, 1997). Analog modifiziert Sfp aus der Surfactin-Biosynthese von *B. subtilis* posttranslational alle PCPs der Surfactin-Biosynthese (Lambalot *et al.*, 1996).

Bisher konnte noch kein Protein im *lmr/lmb/lmc*-Cluster aufgrund von Sequenzdaten identifiziert werden, welches als Katalysator der Amidbindungsbildung zwischen MTL und des als Aminoacylthioester-aktivierten PPLs plausibel erschien. Dies liegt vermutlich begründet in der Einzigartigkeit dieser Reaktion. Das Polypeptid unterscheidet sich wahrscheinlich in der Primärstruktur sowohl von den Kondensations-(C) Domänen der NRPS, die ausschließlich Aminosäuren miteinander verknüpfen, als auch von Glycosyltransferasen, die nucleotidilylierte Zuckermoleküle übertragen.

Für eine spezifische PPTase konnte noch kein Gen in *S. lincolnensis* identifiziert werden. Bei Carrierproteinen, die von einer PPTase des AcpS-Typs als Substrat für die Umwandlung von der *apo*- in die *holo*-Form erkannt werden, ist jedoch auch keine spezifische PPTase

erforderlich. Sollte eine spezifische PPTase notwendig sein, so muss das Gen dafür nicht, wie in den Beispielen von EntD und Sfp beschrieben, in den jeweiligen Biosynthesegenclustern lokalisiert sein, sondern kann sich auch wie im Beispiel von Svp, der PPTase des Bleomycin-Produzenten *Streptomyces verticillus* ATCC15003, weit außerhalb des Clusters befinden (Sanchez *et al.*, 2001).

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit sollte sich mit der Identifizierung von Komponenten des Kondensationskomplexes der „NDL-Synthetase“ und dem Mechanismus der Verknüpfung von PPL und MTL während der Lincomycin A-Biosynthese in *S. lincolnensis* NRRL 2936 befassen.

Das Gen *lmbC*, dessen Produkt im Kondensationsprozess nach einem NRPS-ähnlichen Mechanismus die PPL-AMP-bildende Funktion übernehmen könnte, sollte der Ausgangspunkt der Untersuchungen sein. Es sollte, ebenso wie das erst im Laufe der Arbeit als Gen für ein vermutliches Carrierprotein identifizierte *lmbN*, durch gezielte Integration eines Resistenzgens mutagenisiert werden, um jeweilig eine Beteiligung an der Lin A-Biosynthese nachzuweisen. Beide Mutanten sollten biochemisch charakterisiert und auf genetischer Ebene komplementiert werden. Die jeweilige Biosynthesefunktion sollte anschließend in *in vitro* Enzymtests bestätigt und näher charakterisiert werden, was eine heterologe Überexpression beider Gene erforderlich machte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

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

#### Chemikalien:

|   |  |
|---|--|
| $\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dCTP           | Amersham Biosciences (Freiburg)  |
| [ <sup>3</sup> H]-PPL                       | Hartmann Analytik (Braunschweig)   |
| [ <sup>3</sup> H]-Coenzym A (CoA)           | Hartmann Analytik (Braunschweig)   |
| [ <sup>32</sup> P]-Tetranatriumpyrophosphat | NEN Life Science Products  |
| 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)   |
| Hybond N <sup>+</sup> /P-Membranen          | Amersham Biosciences (Freiburg)  |
| Medienbestandteile                          | Difco (Detroit, USA), Life Technologies (Karlsruhe) (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe) |
| Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose               | Qiagen (Hilden)  |
| CDP-Star (ready-to-use)                     | Roche Diagnostics (Mannheim)   |
| Röntgenfilme                                | Amersham Biosciences (Freiburg)  |
| Amplify                                     | Amersham Biosciences (Freiburg)  |
| Polygram Cel 300 UV <sub>254</sub>          | Macherey-Nagel (Düren)   |
| DC-Alufolien Kieselgel 60 F <sub>254</sub>  | Merck (Darmstadt)  |

#### Enzyme/Antikörper:

|                                  |                               |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Alkalische Phosphatase (CIP)     | Roche Diagnostics (Mannheim)  |
| DNA Polymerase I Klenow Fragment | Life Technologies (Karlsruhe) |
| Lysozym                          | Serva (Heidelberg)            |
| anti-Penta-His-Antikörper        | Qiagen (Hilden)               |

|  |   |
|--|---|
| Restriktionsendonucleasen                    | Roche Diagnostics (Mannheim), Life Technologies (Karlsruhe), New England Biolabs (Schwalbach) |
| Ribonuclease A                               | Sigma (Deisenhofen)   |
| Benzonase®                                   | Merck (Darmstadt)   |
| T4-DNA Ligase (einschl. Puffer)              | Life Technologies (Karlsruhe)   |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (einschl. Puffer) | Life Technologies (Karlsruhe)   |
| Vent-DNA-Polymerase (einschl. Puffer)        | New England Biolabs (Schwalbach)  |
| <b>Kits:</b>                                 |   |
| Advantage-GC cDNA PCR Kit                    | Clontech (Heidelberg)   |
| Bio-Rad Protein Assay Kit                    | Bio-Rad (München)   |
| CPD-Star (ready-to-use)                      | Roche Diagnostics (Mannheim)  |
| DIG High Prime Kit                           | Roche Diagnostics (Mannheim)  |
| DIG Nucleic Acid Detection Kit               | Roche Diagnostics (Mannheim)  |
| 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 Biosciences (Freiburg)   |
| Thermosequenase Cycle-Sequencing Kit         | Amersham Biosciences (Freiburg)   |
| Thermosequenase Cy5 Dye Terminator Kit       | Amersham Biosciences (Freiburg)   |

## 2.2 Medien

Alle eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung autoklaviert. Nicht hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Sartorius Membranfilter, 0,2  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium oder Puffer nach dem Erkalten zugesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde nur doppelt destilliertes 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

#### 2.2.1.1 Medien für *E. coli*

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

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| Trypton           | 10 g·l <sup>-1</sup> |
| Hefeextrakt       | 5 g·l <sup>-1</sup>  |
| NaCl              | 5 g·l <sup>-1</sup>  |
| ggf. Agar (Gibco) | 16 g·l <sup>-1</sup> |

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

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

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

|                        |                      |
|------------------------|----------------------|
| Bacto-Trypton          | 20 g·l <sup>-1</sup> |
| Hefeextrakt            | 5 g·l <sup>-1</sup>  |
| NaCl                   | 10 mM                |
| KCl                    | 2,5 mM               |
| nach dem Autoklavieren |                      |
| MgCl <sub>2</sub>      | 10 mM                |
| MgSO <sub>4</sub>      | 10 mM                |

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

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| SOB-Medium supplementieren mit: |       |
| Glucose (sterilfiltriert)       | 20 mM |

**2 × TY-Medium** (Miller, 1972)

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| Trypton           | 16 g·l <sup>-1</sup> |
| Hefeextrakt       | 10 g·l <sup>-1</sup> |
| NaCl              | 5 g·l <sup>-1</sup>  |
| ggf. Agar (Gibco) | 16 g·l <sup>-1</sup> |

**M9-Medium** (Sambrook *et al.*, 1989)

|   |                      |
|---|----------------------|
| Lösung 1 (4% Glucose)   | 10 %                 |
| Lösung 2 (2% MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)  | 1 %                  |
| Lösung 3 (0,2% CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)  | 1 %                  |
| Lösung 4 (3,5% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O,<br>1,5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,<br>2,5% NaCl,<br>5% NH <sub>4</sub> Cl) | 10 %                 |
| ggf. Agar (Gibco)   | 16 g·l <sup>-1</sup> |

**2.2.1.2 Medien für Actinomyceten****SPMR-Agar** (Babcock und Kendrick, 1988)

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Saccharose  | 103 g·l <sup>-1</sup> |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O              | 10 g·l <sup>-1</sup>  |
| D-Glucose   | 5 g·l <sup>-1</sup>   |
| Hefeextrakt (Difco)                               | 5 g·l <sup>-1</sup>   |
| TES-Puffer pH 7,6                                 | 20 mM                 |
| Bacto-Agar (Difco)                                | 22 g·l <sup>-1</sup>  |
| Spurenelement-Lösung                              | 2 ml·l <sup>-1</sup>  |
| nach dem Autoklavieren<br>CaCl <sub>2</sub> (5 M) | 2 ml·l <sup>-1</sup>  |

**R2YE-Agar** (Hopwood *et al.*, 2000)

|  |                        |
|--|------------------------|
| Saccharose                                   | 103 g·l <sup>-1</sup>  |
| D-Glucose                                    | 10 g·l <sup>-1</sup>   |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O         | 10,1 g·l <sup>-1</sup> |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>               | 250 mg·l <sup>-1</sup> |
| Casamino acids (Difco)                       | 100 mg·l <sup>-1</sup> |
| Bacto-Agar (Difco)                           | 22 g·l <sup>-1</sup>   |
| nach dem Autoklavieren:                      |                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5%)       | 10 ml·l <sup>-1</sup>  |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (3,68%) | 80 ml·l <sup>-1</sup>  |
| L-Prolin (20%)                               | 15 ml·l <sup>-1</sup>  |
| TES-Puffer pH 7,2 (5,73%)                    | 100 ml·l <sup>-1</sup> |
| Spurenelement -Lösung                        | 2 ml·l <sup>-1</sup>   |
| Hefeextrakt (Difco) (10%)                    | 50 ml·l <sup>-1</sup>  |
| NaOH (1 M)                                   | 5 ml·l <sup>-1</sup>   |

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

|                             |                      |
|-----------------------------|----------------------|
| Tryptone Soya Broth (Oxoid) | 30 g·l <sup>-1</sup> |
|-----------------------------|----------------------|

**TSB-Agar** (Hopwood *et al.*, 2000)

|            |                      |
|------------|----------------------|
| TSB-Medium |                      |
| Agar       | 20 g·l <sup>-1</sup> |

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

|                             |                      |
|-----------------------------|----------------------|
| Tryptone Soya Broth (Oxoid) | 30 g·l <sup>-1</sup> |
| PEG 8000                    | 50 g·l <sup>-1</sup> |
| nach dem Autoklavieren      |                      |
| Glycin                      | 5 g·l <sup>-1</sup>  |
| MgCl <sub>2</sub> (1 M)     | 5 ml·l <sup>-1</sup> |

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

|                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| Sojamehl (entfettet) | 20 g·l <sup>-1</sup> |
| Mannit               | 20 g·l <sup>-1</sup> |
| Agar                 | 22 g·l <sup>-1</sup> |
| Leitungswasser       |                      |

**Spurenelement-Lösung** (Hopwood *et al.*, 2000)

|  |                        |
|--|------------------------|
| ZnCl <sub>2</sub>  | 40 mg·l <sup>-1</sup>  |
| FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O   | 200 mg·l <sup>-1</sup> |
| CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O   | 10 mg·l <sup>-1</sup>  |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O   | 10 mg·l <sup>-1</sup>  |
| Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O                  | 10 mg·l <sup>-1</sup>  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O | 10 mg·l <sup>-1</sup>  |

**YEME** (Hopwood *et al.*, 2000)

|                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| Hefeextrakt (Difco)     | 3 g·l <sup>-1</sup>   |
| Bacto-Pepton (Difco)    | 5 g·l <sup>-1</sup>   |
| Malzextrakt             | 3 g·l <sup>-1</sup>   |
| D-Glucose               | 10 g·l <sup>-1</sup>  |
| Saccharose              | 340 g·l <sup>-1</sup> |
| nach dem Autoklavieren  |                       |
| MgCl <sub>2</sub> (1 M) | 5 ml·l <sup>-1</sup>  |

**2.2.1.3 Medien für *Micrococcus luteus*****SNA: Soft Nutrient-Agar** (Hopwood *et al.*, 2000)

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| Nutrient Broth     | 8 g·l <sup>-1</sup> |
| Bacto Agar (Difco) | 6 g·l <sup>-1</sup> |



## 2.2.2 Antibiotika

Wenn erforderlich wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

|   |   |
|---|---|
| Ampicillin                              | 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$<br>50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [ <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS]                |
| Apramycin                               | 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   |
| Chloramphenicol <sup>1)</sup> (Ethanol) | 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   |
| Hygromycin                              | 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  |
| Thiostrepton <sup>1)</sup> (DMSO)       | 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ( <i>S. lividans</i> )<br>15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ( <i>M. luteus</i> DN218) |
| Tobramycin                              | 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  |
| Kanamycin                               | 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   |

<sup>1)</sup> 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.

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

| Stamm                                 | Genotyp/Eigenschaften   | Referenz/Herkunft                                    |
|---------------------------------------|---|--|
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)             | $\lambda$ (DE3), F <sup>-</sup>   | Studier u. Moffat (1986)                             |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$           | <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>recA1</i> , F <sup>-</sup>                                 | Hanahan (1983)                                       |
| <i>E. coli</i> JM109                  | <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>recA1</i> , F'                  | Yanisch-Perron (1985)                                |
| <i>E. coli</i> JM109 (DE3)            | wie <i>E. coli</i> JM109, $\lambda$ (DE3)   | Promega (Mannheim)                                   |
| <i>E. coli</i> JM110                  | <i>dam</i> <sup>-</sup> , <i>dcm</i> <sup>-</sup> ,                                     | Promega (Mannheim)                                   |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue               | <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>recA1</i>                       | Stratagene(Heidelberg)                               |
| <i>Micrococcus luteus</i>             | Er <sup>S</sup> , Lm <sup>S</sup> , Ts <sup>S</sup> , Am <sup>R</sup> , Hy <sup>R</sup> | DSM 348  |
| <i>Micrococcus luteus</i> DN218       | Er <sup>S</sup> , Lm <sup>S</sup> , Am <sup>R</sup> , Hy <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup> | Neußer (1999)  |
| <i>Streptomyces lividans</i> 66 1326  | Actinorhodin, Prodigiosin   | John Innes Institut,<br>Hopwood <i>et al.</i> (2000) |
| <i>Streptomyces lividans</i> 66 TK 23 | Actinorhodin, <i>spc-1</i>  | John Innes Institut;<br>Hopwood <i>et al.</i> (2000) |

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

| Plasmid                   | Genotyp/Eigenschaften  | Referenz/Herkunft                      |
|---------------------------|--|--|
| pAAW9.11                  | 0,8 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbN</i> in pJOE2702 ( <i>NdeI/BamHI</i> )                                     | Arnold (2000)                          |
| pAAW9.22                  | 0,8 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbN</i> in pIJ4123 ( <i>NdeI/BamHI</i> )                                      | Arnold (2000)                          |
| pAAW24.1                  | <i>kan, cat, tsr, P<sub>tipA</sub>, ori</i> pIJ101, <i>ori</i> pAC184, <i>lmbP</i>                                   | Arnold (2000)                          |
| pAAW23.1                  | <i>kan, cat, tsr, P<sub>tipA</sub>, ori</i> pIJ101, <i>ori</i> pAC184, <i>lmbP</i> , His-tag                         | Arnold (2000)                          |
| pBlueskript II KS+        | ColE1, <i>bla, lacZ-<math>\alpha</math></i> , P <sub>lac</sub> , P <sub>T7<math>\Phi</math>10</sub> , P <sub>3</sub> | Stratagene (Heidelberg)                |
| pTU507-6                  | 4,2 kb <i>SphI</i> -Fragment <i>lmbF'GHJK</i> in pSPORT  | Zhang (1993)                           |
| pTU815-1                  | 13,0 kb <i>BamHI</i> -Fragment <i>lmrA/lmbAB1B2CDEFG'</i> in pSPORT  | Zhang (1993)                           |
| pEFBA                     | 1,5 kb <i>PstI/AatI</i> -Fragment mit Apramycinresistenz-Kassette <i>aacC4</i> in pBluescript II SK+                 | Fernández                              |
| pHP45 $\Omega$ <i>aac</i> | Austausch des <i>aadA</i> -Resistenzgens im $\Omega$ -Interposon von pHP45 durch das <i>aacC4</i> -Gen               | Blondelet-Rouault <i>et al.</i> (1997) |
| pET11a                    | ColE1, <i>bla, lacI<sup>q</sup></i> , P <sub>T7<math>\Phi</math>10</sub> , <i>lacO</i> , s10                         | Studier u. Moffat (1986)               |
| pET16b                    | ColE1, <i>bla, lacI<sup>q</sup></i> , P <sub>T7<math>\Phi</math>10</sub> , <i>lacO</i> , s10, His-tag                | Novagen(Schwalbach)                    |
| pHM8a                     | ColE1, <i>hyg, P<sub>ermE*</sub></i> , Minicircle, T <sub>fkmt</sub>   | Motamedi <i>et al.</i> (1995)          |
| pIJ4123                   | <i>kan</i> , His-Tag, P <sub>tipA</sub> , <i>ori</i> pIJ101  | Takano <i>et al.</i> (1995)            |
| pJOE2702                  | ColE1, <i>bla, P<sub>rhaBAD</sub>, rrnB</i>  | Volff <i>et al.</i> (1996)             |
| pJOE2775                  | wie pJOE2702 aber mit His-tag  | Altenbuchner (1999)                    |
| pSUT7                     | P15A, <i>cat, P<sub>T7<math>\Phi</math>10</sub></i>  | Pöhling (1997)                         |
| pUC18                     | ColE1, <i>bla, lacZ-<math>\alpha</math></i> , P <sub>lac</sub>   | Yanish-Perron (1985)                   |
| pUCPU21                   | ColE1, <i>bla, lacZ-<math>\alpha</math></i> , P <sub>lac</sub>   | Wehmeier                               |
| pLysS                     | pACYC184 mit $\Phi$ 3.8 und nachfolgendem Lysozym-Gen in der <i>BamHI</i> -Schnittstelle, Cm <sup>R</sup>            | Stratagene (Heidelberg)                |
| pUWL201                   | ColE1, <i>bla, tsr, ori</i> pIJ101, P <sub>ermE*</sub>   | Doumith <i>et al.</i> (2000)           |
| pUWL218                   | ColE1, <i>bla, tsr, ori</i> pIJ101   | Wehmeier (1995)                        |
| pPWW49                    | 1,3 kb <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment <i>eryBIV</i> in pUWL201PW ( <i>NdeI/HindIII</i> )                              | Doumith <i>et al.</i> (2000)           |
| pMHW13                    | 1,0 kb <i>HindIII lmbZ</i> -PCR-Fragment in pBluescript II KS+ ( <i>HindIII/EcoRV</i> )                              | Diese Arbeit                           |
| pMHW14                    | 0,8 kb <i>NdeI aacC4</i> -PCR-Fragment in pMHW13 ( <i>NdeI/SmaI</i> )  | Diese Arbeit                           |
| pMHW14.1                  | 0,8 kb <i>aacC4</i> -PCR-Fragment in pUC18 ( <i>HincII</i> )   | Diese Arbeit                           |
| pMHW15                    | 1,8 kb <i>HindIII/BamHI</i> -Fragment <i>lmbZaacC4</i> aus pMHW14 in pUC18 ( <i>HindIII/BamHI</i> )                  | Diese Arbeit                           |
| pMHW16                    | 1,3 kb <i>lmbML'</i> -PCR-Fragment <i>BclII/EcoRI</i> in pMHW15 ( <i>BclII/EcoRI</i> )                               | Diese Arbeit                           |
| pMHW16.1                  | 1,3 kb <i>lmbML'</i> -PCR-Fragment in pUC18 ( <i>EcoRI/BamHI</i> )   | Diese Arbeit                           |
| pMHW17                    | 3,1 kb <i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment <i>lmbZ-aacC4-lmbML'</i> aus pMHW16 in pUWL218 $\Delta$ <i>ori</i> -pIJ101     | Diese Arbeit                           |

Fortsetzung Tab. 2-2

| <b>Plasmid</b> | <b>Genotyp/Eigenschaften</b>   | <b>Referenz/Herkunft</b> |
|----------------|--|--------------------------|
| pMHW22         | 1,6 kb <i>lmbC</i> -PCR-Fragment in pUC18 ( <i>HincII</i> )  | Diese Arbeit             |
| pMHW23         | 1,6 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbC</i> aus pMHW22 in pET11a ( <i>NdeI/BamHI</i> )                      | Diese Arbeit             |
| pMHW24         | 1,6 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbC</i> aus pMHW22 in pET16b ( <i>NdeI/BamHI</i> )                      | Diese Arbeit             |
| pMHW25         | 3,3 kb <i>EcoRI/SstI lmbB1B2CD'</i> -Fragment aus pTU815-1 in pUC18 ( <i>EcoRI/SstI</i> )                      | Diese Arbeit             |
| pMHW26         | 1,7 kb <i>SmaI</i> -Fragment $\Omega$ <i>aacC4</i> aus pHP45 $\Omega$ <i>aac</i> in pMHW25 ( <i>Eco47III</i> ) | Diese Arbeit             |
| pMHW27         | 5,0 kb <i>EcoRI/PstI</i> -Fragment aus pMHW26 in pUWL218 $\Delta$ ori-pIJ101                                   | Diese Arbeit             |
| pMHW28         | 1,6 kb <i>NdeI/BamHI lmbC</i> -Fragment aus pMHW22 in pIJ4123 ( <i>NdeI/BamHI</i> )                            | Diese Arbeit             |
| pMHW29         | 1,9 kb <i>NdeI/HindIII lmbC</i> -Fragment aus pMHW22 in pPWW49 ( <i>NdeI/HindIII</i> )                         | Diese Arbeit             |
| pMHW30         | 1,6 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbC</i> aus pMHW22 in pSUT7 ( <i>NdeI/BamHI</i> )                       | Diese Arbeit             |
| pMHW31         | 0,8 kb <i>NdeI/SstI lmbN</i> -PCR-Fragment pUCPU21 ( <i>NdeI/SstI</i> )  | Diese Arbeit             |
| pMHW32         | 0,8 kb <i>NdeI/SstI</i> -Fragment <i>lmbN</i> aus pMHW31 in pET20a ( <i>NdeI/SstI</i> )                        | Diese Arbeit             |
| pMHW33.1-3     | 0,3 kb <i>lmbN'</i> -PCR-Fragment in pUC18 ( <i>HincII</i> )   | Diese Arbeit             |
| pMHW41         | 0,25 kb <i>NdeI/BclII lmbPCP</i> -PCR-Fragment in pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )                                | Diese Arbeit             |
| pMHW42         | 0,25 kb <i>NdeI/BclII lmbPCP</i> -PCR-Fragment in pET11a ( <i>NdeI/BamHI</i> )                                 | Diese Arbeit             |
| pMHW43         | 0,25 kb <i>NdeI/BclII lmbPCP</i> -PCR-Fragment in pET16b ( <i>NdeI/BamHI</i> )                                 | Diese Arbeit             |
| pMHW44         | 0,8 kb <i>NdeI/SstI lmbN</i> (S37C)-PCR-Fragment in pUCPU21 ( <i>NdeI/SstI</i> )                               | Diese Arbeit             |
| pMHW45         | 0,8 kb <i>NdeI/SstI</i> -Fragment <i>lmbN</i> (S37C) aus pMHW44 in pET20a ( <i>NdeI/SstI</i> )                 | Diese Arbeit             |
| pMHW46         | 0,8 kb <i>NdeI/SstI lmbN</i> (S37A)-PCR-Fragment in pUCPU21 ( <i>NdeI/SstI</i> )                               | Diese Arbeit             |
| pMHW47         | 0,8 kb <i>NdeI/SstI</i> -Fragment <i>lmbN</i> (S37A) aus pMHW46 in pET20a ( <i>NdeI/SstI</i> )                 | Diese Arbeit             |
| pMHW48         | 1,6 kb <i>NdeI/BamHI lmbC</i> -PCR-Fragment pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )                                      | Diese Arbeit             |
| pMHW49         | 1,6 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbC</i> aus pMHW48 in pJOE2775 ( <i>NdeI/BamHI</i> )                    | Diese Arbeit             |
| pMHW50         | 2,3 kb <i>SphI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbKIJ</i> aus pTU507-6 in pUC18 ( <i>SphI/BamHI</i> )                   | Diese Arbeit             |

Fortsetzung Tab. 2-2

| <b>Plasmid</b> | <b>Genotyp/Eigenschaften</b>   | <b>Referenz/Herkunft</b> |
|----------------|--|--------------------------|
| pMHW51         | 0,7 kb <i>NdeI/BamHI</i> <i>lmbV</i> -PCR-Fragment in pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )              | Diese Arbeit             |
| pMHW52         | 0,7 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbV</i> aus pMHW51 in pET11a ( <i>NdeI/BamHI</i> )        | Diese Arbeit             |
| pMHW53         | 0,7 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbV</i> aus pMHW51 in pET16b ( <i>NdeI/BamHI</i> )        | Diese Arbeit             |
| pMHW54         | 0,7 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbV</i> aus pMHW51 in pAAW23.1 ( <i>NdeI/BamHI</i> )      | Diese Arbeit             |
| pMHW55         | 0,7 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbV</i> aus pMHW51 in pAAW24.1 ( <i>NdeI/BamHI</i> )      | Diese Arbeit             |
| pMHW56         | 0,7 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbV</i> aus pMHW51 in pJOE2702 ( <i>NdeI/BamHI</i> )      | Diese Arbeit             |
| pMHW57         | 0,7 kb <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment <i>lmbV</i> aus pMHW52 in pPWW49 ( <i>NdeI/HindIII</i> )    | Diese Arbeit             |
| pMHW58         | 1,2 kb <i>NdeI/BamHI</i> <i>lmbT</i> -PCR-Fragment in pUCPU21 ( <i>NdeI/BamHI</i> )              | Diese Arbeit             |
| pMHW59         | 1,2 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbT</i> aus pMHW58 in pET11a ( <i>NdeI/BamHI</i> )        | Diese Arbeit             |
| pMHW60         | 1,2 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbT</i> aus pMHW58 in pET16b ( <i>NdeI/BamHI</i> )        | Diese Arbeit             |
| pMHW61         | 1,2 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbT</i> aus pMHW58 in pAAW23.1 ( <i>NdeI/BamHI</i> )      | Diese Arbeit             |
| pMHW62         | 1,2 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbT</i> aus pMHW58 in pAAW23.1 ( <i>NdeI/BamHI</i> )      | Diese Arbeit             |
| pMHW63         | 1,6 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment <i>lmbC</i> aus pMHW22 in pMH8a ( <i>NdeI/BamHI</i> )         | Diese Arbeit             |
| pMHW64         | 1,1 kb <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment <i>lmbN</i> aus pAAW9.11 in pPWW49 ( <i>NdeI/HindIII</i> )  | Diese Arbeit             |
| pMHW65         | 0,55 kb <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment <i>lmbPCP</i> aus pMHW42 in pPWW49 ( <i>NdeI/HindIII</i> ) | Diese Arbeit             |

## 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 unterstrichenen Basen kennzeichnen die eingefügten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen.

**Tab. 2-3:** Übersicht über verwendete Oligonucleotide

| Bezeichnung | Sequenz                              | Gen                                   |
|-------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| MH5         | 5'-CGCGAAGCTTGGCGGGCATGACC-3'        | <i>lmbZ-HindIII</i>                   |
| MH6         | 5'-GTCCAGAGTGCTCATATGTTCTCCCAGG-3'   | <i>lmbZ-NdeI</i>                      |
| MH7         | 5'-GGAGTGCAATCATATGAAATACGAATGG-3'   | <i>aacC4-NdeI</i>                     |
| MH8         | 5'-CCAAGGTCCTGATCATGAGCTCAG-3'       | <i>aacC4-BclI</i>                     |
| MH9         | 5'-GCACGCGCCCTGATCATGGAGAAGG-3'      | <i>lmbML'-BclI</i>                    |
| MH10        | 5'-GCCGGGCGAATTCGGCCACCGCCTG-3'      | <i>lmbML'-EcoRI</i>                   |
| MH11        | 5'-TCGACGTCCCATAATGTCGTCTCC-3'       | <i>lmbC-NdeI</i> (His-tag-LmbC)       |
| MH12        | 5'-CGCCC GGATCCAGGGCTCA-3'           | <i>lmbC-BamHI</i> (His-tag-LmbC)      |
| MH14        | 5'-CGAAGGCGCCCATATGGCTGCCG-3'        | <i>lmbT-NdeI</i>                      |
| MH15        | 5'-CCGACCCGGATCCCTCCTCCAGGCA-3'      | <i>lmbT-BamHI</i>                     |
| MH16        | 5'-ATTTACGCCATCCATATGCAGCGCAAGGG-3'  | <i>lmbV-NdeI</i>                      |
| MH17        | 5'-CCCCGTTGGATCCGCGCCGTCAC-3'        | <i>lmbV-BamHI</i>                     |
| MH18        | 5'-CCTGGGAGAACATATGAGCACTCTGGA-3'    | <i>lmbN-NdeI</i>                      |
| MH19        | 5'-CCTTCTCCAGGATCCGGG-3'             | <i>lmbN-BamHI</i>                     |
| MH20        | 5'-CAGGGATCCCTCCCCGCG-3'             | <i>lmbC-BamHI</i> (LmbC-His-tag)      |
| MH23        | 5'-ACTCACAGGGGTCTCTGATCAGGTGATACG-3' | <i>lmbPCP-BclI</i>                    |
| MH25        | 5'-CTGCTCGACTGTCTCGCCCTG-3'          | <i>lmbN</i> (LmbN: S <sub>37</sub> C) |
| MH26        | 5'-CAGGGCGAGACAGTCGAGCAG-3'          | <i>lmbN</i> (LmbN: S <sub>37</sub> C) |
| MH27        | 5'-CTGGGAGAACATATGAGCACTCTGGAC-3'    | <i>lmbN-NdeI</i>                      |
| MH28        | 5'-CTGCTCGACGCTCTCGCCCTG-3'          | <i>lmbN</i> (LmbN: S <sub>37</sub> A) |
| MH29        | 5'-CAGGGCGAGAGCGTCGAGCAG-3'          | <i>lmbN</i> (LmbN: S <sub>37</sub> A) |
| MH30        | 5'-CTTCTCCAGGAGCTCGGCGCGTGCC-3'      | <i>lmbN-SstI</i>                      |
| MTS1        | 5'-GTGAGCACTCTGGACG-3'               | Sequenzierprimer <i>lmbN</i>          |
| MTS2        | 5'-GCGGTCAGCCGGCC-3'                 | Sequenzierprimer <i>lmbN</i>          |
| up          | 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'              | Sequenzierprimer pUC-Derivate         |
| rp          | 5'-GAACAGCTATGACC ATG-3'             | Sequenzierprimer pUC-Derivate         |
| promo       | 5'-GAAATAAATACGACTCACTATAGG-3'       | Sequenzierprimer pET-Derivate         |
| termi       | 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG-3'          | Sequenzierprimer pET-Derivate         |

## 2.5 Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien

Plasmidtragende Bakterienstämme wurden immer unter entsprechendem Selektionsdruck (s. Kap. 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<sup>-1</sup> X-Gal zugesetzt. Dauerkulturen wurden aus Übernachtskulturen (ÜNK) durch Zugabe von 30% Glycerin hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Als Übernachtskulturen wurden Ansätze bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden.

### 2.5.2 Anzucht und Lagerung von Actinomyceten

Flüssigkulturen von Streptomyceten wurden bei 28-30°C unter starkem Schütteln (ca. 200 Upm) inkubiert. *S. lividans* wurde in TSB- oder YEME-Medium bzw. auf SMA-, R2YE- oder SPMR-Agarplatten inkubiert. *S. lincolnensis* wurde zudem in SPMR-Medium angezogen und zum Stempeln auf YMG-Agarplatten ausplattiert. Sporensuspensionen wurden nach Bebrütung der Stämme auf SMA-Agarplatten durch Abschwemmen der Sporen mit 30% Glycerin und Filtrieren durch sterile Baumwollwatte hergestellt und bei -20°C gelagert.

### 2.5.3 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 Biochemische Charakterisierung verwendeter *S. lincolnensis*-Stämme

### 2.6.1 Bioassay zum Nachweis von Lin A-Produktion

Zur Untersuchung der Antibiotikaproduktion von *S. lincolnensis* Stämmen wurden aus einem auf SPMR-Agar bis zur Sporulation kultivierten Bakterienrasen runde ( $\varnothing$  1 cm) Agarblöcke ausgestochen. Diese wurden auf TSB-Agarplatten platziert, die anschließend mit *M. luteus* bzw. *M. luteus* DN218 in SNA-Agar überschichtet wurden. Zunächst wurden die Platten für 1 h bei 4°C inkubiert und dann über Nacht bei 37°C bebrütet.

### 2.6.2 Bioautographie zum Nachweis von Lin A-/NDL-Produktion

Die Extrakte für die Bioautographie wurden mit 1-Butanol aus dem Agar der zu untersuchenden Kulturen isoliert.

Dazu wurden die Agarplatten in kleine Stücke zerschnitten, im 50 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß mit ca. 15 ml Tris-HCl Puffer, pH 9, versetzt und ausgiebig geschüttelt. Die Suspension wurde zweimal mit 10 ml 1-Butanol extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen wurden zweimal mit 10 ml 0,01 M HCl ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit NaOH auf pH 9 eingestellt und zweimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert, bevor das organische Lösungsmittel im Vakuum verdampft wurde. Der Rückstand wurde in zweifach destilliertem Wasser aufgelöst. Das Papierchromatogramm der 1-Butanol-Extrakte wurde anschließend auf Zellulose-DC-Platten (Polygram Cel 300 UV<sub>254</sub>) mit dem Laufmittel I (96% H<sub>2</sub>O, 4% 1-Butanol, 0,25% p-Toluolsulfonsäure) entwickelt.

Das Papierchromatogramm wurde in einer Sterilbank getrocknet, auf TSB-Agar aufgelegt und mit *M. luteus* bzw. *M. luteus* DN218 in SNA-Agar überschichtet. Zunächst wurden die Platten für 1 h bei 4°C inkubiert und dann über Nacht bei 37°C bebrütet.

### 2.6.3 Nachweis vom PPL aus *S. lincolnensis*-Kulturen

Zur Isolierung von PPL aus *S. lincolnensis*-Kulturen wurden 1-Butanol-Extrakte hergestellt. Von Flüssigkulturen wurden 10 ml des Kulturüberstandes mit 25 ml 1-Butanol und 15 ml einer 50%igen K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt. Für die Extraktion aus Agarkulturen wurde der Agar einer Platte in kleine Stücke geschnitten und zweimal mit je 25 ml 1-Butanol und 15 ml

einer 50%igen  $K_2CO_3$ -Lösung ausgeschüttelt.

Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingengt und der so erhaltene Extrakt auf Kieselgel DC-Folie (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck) mit dem Laufmittel II [80% 1-Butanol, 20% Eisessig, 20% H<sub>2</sub>O (v/v)] aufgetrennt. Mit Ninhydrin-Sprühreagenz [47,5 ml 1-Butanol, 1,5 ml Eisessig, 1 ml 85%ige Phosphorsäure, 0,15 g Ninhydrin) erfolgte anschließend der PPL-Nachweis durch eine charakteristische Rosafärbung, die sich nach leichter Erwärmung des Chromatogramms bildete (Witz *et al.*, 1971).

#### **2.6.4 Nachweis der Lin A-/NDL-Produktion mittels HPLC (Asmus *et al.*, 1983)**

Eine „Reversed Phase Ion-Pairing Liquid Chromatographie“-Methode wurde zur Bestimmung von Lin A bzw. NDL aus Extrakten der Kulturüberstände bzw. in den Enzymtestansätzen eingesetzt. Als Ionenpaar-Reagenz wurde anionisches Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Der Laufpuffer bestand aus 5,8 g SDS, 10 ml 85%ige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 330 ml Acetonitril und ca. 660 ml bidestilliertem Wasser. Bevor der Puffer sterilfiltriert wurde, wurde ein pH-Wert von 6 mit NH<sub>3</sub>-Lösung eingestellt. Die Trennung erfolgte über eine RP-8 Säule (Nucleosil, 5  $\mu$ m; 200×4 mm), und die Flussrate bei dem isokratisch geführten Prozess betrug 1,75 ml·min<sup>-1</sup>. Von der zu untersuchenden Probe wurden 100  $\mu$ l über eine entsprechende Probenschleife auf die Säule gegeben.

## **2.7 Molekularbiologische Methoden**

### **2.7.1 Isolierung von Nucleinsäuren**

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mittels Kochpräparation (Sambrock *et al.*, 1989) und alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Die Isolierung von Plasmiden aus *S. lividans* 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 Pospich und Neumann (1995) beschriebenen Methoden isoliert.



### 2.7.2 Gelelektrophorese von Nucleinsäuren

DNA wurde in Agarosegelen nach der bei Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode mit  $1 \times$  TAE (4,84 g Tris, 1,14 ml Eisessig, 0,08 g EDTA, H<sub>2</sub>O 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 Technologies, Karlsruhe) oder *EcoRI-HindIII*-hydrolysierte  $\lambda$ -DNA verwendet. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (366 nm) enthielt die Agarose  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ethidiumbromid.

### 2.7.3 *In vitro* Manipulation von DNA

Restriktionsendonucleasen, 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.

### 2.7.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) oder dem „Nucleo Spin Extract 2 in 1 Kit“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben der Hersteller.

### 2.7.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit dem „rediprime Random Primer Labelling Kit“ (Amersham Biosciences, Freiburg) und  $50 \mu\text{Ci } \alpha\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  ( $3000 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ) nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert.

### 2.7.6 Southern Blotting und DNA-DNA-Hybridisierung

Zur Übertragung gelelektrophoretisch getrennter hydrolysierter DNA auf positiv geladene Nylonmembran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences, Freiburg) wurde das Transfersystem

nach Chomczynski (1992) mit 0,4 N NaOH als Transferpuffer gewählt. Die Transferzeit betrug 8 bis 12 h. Die Membran wurde anschließend in  $2 \times \text{SSC}$  ( $20 \times \text{SSC}$ : 3 M NaCl, 300 mM Trinatriumcitrat, pH 7,2) geschwenkt.

Hybridisierungen erfolgten in Plastikschüsseln und temperierbaren Wasserbadschüttlern. Die Prähybridisierungs- und Hybridisierungstemperatur war  $68^\circ\text{C}$ , da es sich um homologe DNA-Sonden handelte. Bei DNA-DNA Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden wurde die Membran zunächst für 2-4 h in Hybridisierungslösung [ $6 \times \text{SSC}$ , 0,5% SDS, 1% Blockingreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)] geschwenkt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung erneuert und zu dieser die hitzedenaturierte ( $100^\circ\text{C}$ , 5 min) DNA-Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Nicht-gebundene Sonde wurde anschließend durch Waschen mit  $6 \times \text{SSC}$ , 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  $-70^\circ\text{C}$ .

### 2.7.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte nach dem von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Didesoxy-Nucleotid-Kettenabbruchverfahren. Für die Sequenzreaktion wurde das „Thermosequenase Cy5 Dye Terminator Kit“ oder das „Thermosequenase Cycle-Sequencing Kit“ (beide Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Abweichend von dem Protokoll des Herstellers wurden die Cycle-Parameter wie folgt modifiziert.

**Tab. 2-4:** Standardtemperaturprogramm für die Sequenzierreaktion.

| Schritt | Temperatur         | Dauer      |
|---------|--------------------|------------|
| 1       | $98^\circ\text{C}$ | 5 min      |
| 2       | $95^\circ\text{C}$ | 45 s       |
| 30 × 3  | $63^\circ\text{C}$ | 45 s       |
| 4       | $68^\circ\text{C}$ | 1 min 20 s |
| 5       | $68^\circ\text{C}$ | 1 min      |

Die Analyse der aus der Sequenzierreaktion resultierenden Fragmente erfolgte auf einem A.L.F. Express Sequencer (Amersham Biosciences, Freiburg) unter Verwendung von 6 M Harnstoff,  $1 \times \text{TBE}$ , 6% „HydroLink Long Ranger“-PAA-Gelen (Biozym, Hessisch Olden-

dorf) und  $0,5 \times$  TBE als Laufpuffer. Die Umsetzung der gemessenen Fluoreszenzspitzen zu einer DNA-Sequenz erfolgte durch das Computerprogramm A.L.F.Win 2.3.

### 2.7.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde nach Arnheim und Erlich (1992) in Thermocyclern (Biometra, Göttingen) mit einer Heizrate von  $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$  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 $\mu\text{l}$ ) | Vent-DNA-Polymerase                        | <i>Taq</i> -DNA-Polymerase                 |
|--|--|--|
| Templat-DNA  | 50 ng (chrom. DNA),<br>10 ng (Plasmid-DNA) | 50 ng (chrom. DNA),<br>10 ng (Plasmid-DNA) |
| Primer, je   | 0,5 $\mu\text{M}$                          | 0,5 $\mu\text{M}$                          |
| dNTP, je   | 0,2 mM                                     | 0,2 mM                                     |
| Mg <sup>2+</sup>   | (MgSO <sub>4</sub> ) 2,0 mM                | (MgCl <sub>2</sub> ) 2,0 mM                |
| <i>Taq</i> /Vent-DNA-Polymerasepuffer (10 $\times$ )                 | 10 $\mu\text{l}$                           | 10 $\mu\text{l}$                           |
| 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  $\mu\text{l}$  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. Tab. 2-3) optimiert (Tab. 2-6).

**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 (94°C) | 5 min (3 min) |
| 5 ×     | 2           | 95°C (94°C)   |
|         | 3           | variabel      |
|         | 4           | 72°C (68°C)   |
| 30 ×    | 5           | 95°C          |
|         | 6           | variabel      |
|         | 7           | 72°C (68°C)   |
|         | 8           | 72°C (68°C)   |

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  $1 \text{ min} \cdot \text{kb}^{-1}$  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.

### 2.7.9 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

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

Die Protoplastierung und Transformation von *S. lividans* und *S. lincolnensis* wurde in Anlehnung an das Protokoll von Babcock und Kendrick (1998) erreicht. Eine 30 ml Flüssigkultur in TSB-PEG 8000- bzw. YEME-Medium wurde für 4 bis 6 Tage bei 28°C bis 30°C unter starkem Schütteln (200 Upm) kultiviert. Das Mycel wurde abzentrifugiert und mit 10,3% Saccharose-Lösung gewaschen. Anschließend wurde in 5 ml P-Puffer [10,3% Saccharose, 0,25%  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 2,02%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $2 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$  Spurenelement-Lösung,  $10 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5%),  $100 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3,68%) und  $100 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$  TES-Puffer pH 7,2 (5,73%)]

mit  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Lysozym suspendiert, bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert und die Protoplastierung mikroskopisch verfolgt. Die Protoplastierung konnte bis zu 3 h dauern, und das Mycel wurde dabei etwa alle 30 min vorsichtig auf- und abpipettiert. Nach nahezu vollständiger Protoplastierung wurden weitere 5 ml P-Puffer hinzugegeben, bevor die Protoplasten durch sterile Baumwolle filtriert wurden. Die Protoplasten wurden zu  $500 \mu\text{l}$  aliquotiert und 3 min bei 7000 Upm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, und die Protoplasten wurden in  $50 \mu\text{l}$  frischem P-Puffer resuspendiert und zunächst für 12 h bei  $-20^\circ\text{C}$ , dann bei  $-80^\circ\text{C}$  zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Transformation der Protoplasten wurde mit ca.  $10 \mu\text{g}$  unmethylierter Plasmid-DNA in wäßriger Lösung (aus *E. coli* JM 110 präpariert) durchgeführt.

### **2.7.10 Herstellung von ss-DNA zur Transformation von *S. lincolnensis* NRRL 2936**

Zur alkalischen Denaturierung nach Oh und Chater (1997) wurden  $9 \mu\text{l}$  gelöster Plasmid-DNA ( $5\text{-}10 \mu\text{g}$  DNA) mit  $2 \mu\text{l}$   $1 \text{ M}$  NaOH versetzt und 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Abkühlung im Eisbad auf ca.  $4^\circ\text{C}$  wurden  $2 \mu\text{l}$   $1 \text{ N}$  HCl zur Lösung zugeben. Die auf diese Weise behandelte DNA wurde umgehend für die Transformation verwendet.

## **2.8 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).

## **2.9 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 10% und 16,5% betrug. War eine bessere Auflösung im Bereich kleiner Polypeptide mit einem Molekulargewicht unterhalb von 15 kDa erforderlich, wurde ein Gelsystem nach dem Protokoll von Schägger und v. Jagow (1987) mit Tris-

HCl/Tricin-Puffer und Acrylamid-Konzentrationen im Trenngel zwischen 10% und 12% verwendet. Analytische Gelelektrophoresen wurden in einer Minigel-Twin Gelkammer (Biometra, Göttingen) bei konstanter Stromstärke von 15 mA (Sammelgel) und 25 mA (Trenngel) durchgeführt. Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue R-250 bzw. G-250 (Merril 1990) gefärbt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Dalton Mark VII-Marker ( $M_r$ : 14 kDa [ $\alpha$ -Lactalbumin], 20 kDa [Trypsin-Inhibitor], 24 kDa [Trypsinogen, PMSF-behandelt], 29 kDa [Carboanhydrase], 36 kDa [Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase], 45 kDa [Ovalbumin], 66 kDa [Rinderserumalbumin]; Sigma, Deisenhofen) genutzt.

## 2.10 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 Biosciences, 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 Amidoschwarz-Färbung [(1:100 v/v) Amidoschwarzlösung (10,1 g Amidoschwarz in 40 ml Methanol, 10 ml Eisessig, 50 ml H<sub>2</sub>O) in H<sub>2</sub>O] mit anschließender Hintergrundentfärbung durch 25% Methanol-10% Eisessig-65% H<sub>2</sub>O (v/v) überprüft. Durch Inkubation in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) konnte die Färbung komplett rückgängig gemacht werden.

## 2.11 Immunologischer Nachweis immobilisierter His-tag-Proteine

Zum Nachweis immobilisierter His-tag-Proteine (vgl. 2.10) wurde die Membran 2-8 h mit Blocking Puffer (1% Casaminoäuren in TBS-Puffer) inkubiert und anschließend 60 min mit dem Erstantikörper [anti-Penta-His-Antikörper, Qiagen (Hilden)] behandelt, der 1:1000 ( $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) in Blocking Puffer verdünnt wurde. 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 ( $220 \text{ mU}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) mit Blocking-Puffer verdünnt wurde. Nach Entfernen des ungebundenen Zweitantikörpers ( $3 \times 10 \text{ min}$  Waschen mit TBST) wurde die Membran mit Assay-Puffer für Alkalische Phosphatase ( $200 \text{ mM Tris-HCl}$ , pH 9,8,  $10 \text{ mM MgCl}_2$ ) äquilibriert. Der indirekte Nachweis des Erstantikörpers erfolgte durch den Chemilumineszenz-Farbstoff CDP-Star (Roche Diagnostics, Mannheim) als Substrat der alkalischen Phosphatase nach Angabe des Herstellers. Die Membran wurde schließlich auf Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers exponiert.

## 2.12 Heterologe Genexpression

### 2.12.1 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter Kontrolle des Promotors $P_{T7\Phi10}$

Wenn die Transkription zu exprimierender Gene unter Kontrolle des Promotors  $P_{T7\Phi10}$  (Giordano *et al.*, 1989; Dubendorff und Studier, 1991) stand, wurden *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* JM109(DE3) als Wirtorganismen 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,  $2 \times$  TY-Medium oder LB-Medium mit  $1 \text{ M Sorbitol}$  und  $2,5 \text{ mM Betain}$  mit einer ÜK des plasmidtragenden *E. coli* T7-Expressionsstammes auf eine  $O.D._{600}$  von 0,05 beimpft und bei  $28\text{-}37^\circ\text{C}$  geschüttelt ( $180 \text{ Upm}$ ). Bei Erreichen einer  $O.D._{600} = 0,8$  wurde die Expression des T7-RNA-Polymerasegens durch IPTG-Zugabe (Endkonz.:  $0,4\text{-}1,0 \text{ mM}$ ) induziert. Die Probennahme erfolgte vor, sowie zu definierten Zeitpunkten nach IPTG-Zugabe.

### 2.12.2 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* DH5 $\alpha$  oder *E. coli* JM109 als Wirtorganismen verwendet. Zur Expression heterologer Gene wurden Kulturen LB-Medium,  $2 \times$  TY-Medium oder LB-Medium mit  $1 \text{ M Sorbitol}$  und  $2,5 \text{ mM Betain}$  mit einer ÜK des plasmidtragenden *E. coli* Expressionsstammes auf eine  $O.D._{600}$  von 0,05 beimpft und bei  $18\text{-}37^\circ\text{C}$  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.

### 2.12.3 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 1:50 Verdünnung einer 3 d 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 (s. Kap. 2.13).

### 2.12.4 Heterologe Genexpression in *S. lividans* unter Kontrolle des Promotors $P_{tipA}$

*S. lividans* 66 1326 wurde als Wirtorganismus 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 (10,3% Saccharose) bei 28-30°C für ca. 20-40 h inkubiert. Dann wurde der Promotor  $P_{tipA}$  durch Zugabe von Thiostrepton (Endkonzentration:  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) induziert. Nach weiteren 24-28 h wurden die Kulturen geerntet, zweimal mit 10,3%iger Saccharoselösung gewaschen und zur Herstellung von zellfreiem Extrakt verwendet (s. Kap. 2.13).

## 2.13 Gewinnung zellfreier Extrakte von *E. coli* und *Streptomyces*

Für den Zellaufschluß wurden 1,5 ml Aufschlußpuffer I (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT) pro 1 g Zell-Nassgewicht verwendet. Sollte der zellfreie Extrakt für Enzymansätze verwendet werden, erfolgte der Aufschluss durch die zweimalige Passage einer French Press Zelle bei einem internen Druck von 20000 psi (American Instruments Company, Silver Spring, USA). Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation



(30 min,  $30000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) abgetrennt. Der Überstand wurde in  $\text{N}_2$  (fl.) schockgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.14 Reinigung von His-tag-Proteinen mittels $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose

Die Reinigung der *N*-terminalen His-tag-Fusionsproteine von LmbC, LmbN, LmbPCP erfolgte im Batch-Verfahren in 50 ml Reaktionsgefäßen. 10 ml zellfreier Extrakt des jeweiligen Expressionsstammes, für dessen Herstellung Aufschlusspuffer II (50 mM Tris-HCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol,  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  BSA, pH 7,8) verwendet wurde, wurden für 60 min auf Eis mit 1 ml einer 50%igen Suspension  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) in Aufschlusspuffer II unter ständigem Rühren inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei  $15000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose wurde zweimal mit je 5 ml Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol,  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  BSA) gewaschen, und schließlich wurde das His-tag Protein mit Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 300 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol,  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  BSA) mit variierenden Imidazol-Konzentrationen von 40-500 mM eluiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils 10 min bei  $15000 \times g$  zentrifugiert.

Zur Reinigung größerer Volumina der His-tag-Fusionsproteine wurde eine HisTrap Affinity Column (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Auftragung des Rohextraktes auf die Säule wurde eine Peristaltikpumpe (Pump P-1; Amersham Biosciences, Freiburg) genutzt. Das Eluieren der Proteine erfolgte durch eine FPLC-Apparatur (Laufmittel A, Aufschlußpuffer II; Laufmittel B, Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol) mit einem Durchfluss UV-Monitor UV-1 und einem Fraktionssammler Frac 100 (Pharmacia, Freiburg).

Zur Abtrennung des Imidazols aus den Elutionsfraktionen wurden entweder Microcon Zentrifugen-Filtereinheiten YM10 (Millipore, Eschborn) oder PD-10 Gelfiltrationssäulen (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet.

## 2.15 Enzymtests

### 2.15.1 ATP/PP<sub>i</sub>-Austausch

Die ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion wurde nach einem modifizierten Protokoll von Lee und Lipmann (1975) durchgeführt. Ein Testansatz (Tab. 2-7) bestand aus dem gereinigtem His-tag-LmbC (s. Kap. 2.14), Tetranatriumpyrophosphat (<sup>32</sup>P]-markiert und ummarkiert), MgCl<sub>2</sub>, ATP und der zu untersuchenden L-Aminosäure (s. Kap. 3.2.2) in Puffer I (50 mM Tris-HCl Puffer pH 8 mit 10% Glycerin, 1 mM EDTA, and 8 mM DTT). Die Komponenten ATP, Pyrophosphat (mit und ohne <sup>32</sup>P]-Markierung) sowie MgCl<sub>2</sub> wurden für eine komplette Testreihe vorgemischt und im Reaktionsgefäß vorgelegt. Somit enthielten alle Testansätze identische Radioaktivitäts-mengen. Auf Eis wurde 4 × Puffer I, H<sub>2</sub>O und His-tag-LmbC hinzupipettiert, bevor die Austauschreaktion (vgl. Abb. 3-9) durch Zugabe des jeweiligen Aminosäure-Substrats gestartet wurde. Die Testansätze wurden bei 28°C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml einer Stopp-Lösung (0,75% Aktivkohle-Suspension, 7% Perchlorsäure und 0,1 M Tetranatriumpyrophosphat) wurde die Reaktion schließlich abgebrochen. Das an Aktivkohle adsorbierte ATP wurde auf Glasfaserfiltern (GF92, Schleicher & Schuell) gesammelt, zweimal mit ca. 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und bei 70°C getrocknet. Die Glasfaserfilter wurden mit 4 ml Rotiszint Eco Plus (Roth, Karlsruhe) Szintillationsflüssigkeit versetzt und im 1900CA Tri-Carb Szintillationszähler (Packard, Dreieich) vermessen.

**Tab. 2-7:** Zusammensetzung des Testansatzes zum Aminosäure-abhängigen ATP/PP<sub>i</sub>-Austausch

| Assay-Komponente                            | Konzentration               |
|---|-----------------------------|
| His-tag-LmbC                                | 0,79 μM                     |
| L-Aminosäure                                | variabel                    |
| Tetranatriumpyrophosphat                    | 50 μM                       |
| [ <sup>32</sup> P]-Tetranatriumpyrophosphat | ca. 1 × 10 <sup>6</sup> cpm |
| MgCl <sub>2</sub>                           | 5 mM                        |
| ATP   | 2,5 mM                      |
| 4 × Puffer I                                | 50 μl                       |
| H <sub>2</sub> O                            | ad 200 μl                   |

### 2.15.2 Posttranslationale Modifikation von His-tag-LmbN und -LmbPCP mit [<sup>3</sup>H]-4'-Phosphopantethein

Der Transfer von [<sup>3</sup>H]-4'-Phosphopantethein aus [<sup>3</sup>H]-CoA auf die angereicherten His-tag Fusionsproteine von LmbN (aus *S. lividans*; s. Kap. 3.4.2) und LmbPCP (aus *E. coli*; s. Kap. 3.4.3) wurde mit Hilfe der Phosphopantethein-Transfersen (PPTasen; Lambalot *et al.*, 1995), Sfp und AcpS (beide *B. subtilis*; Mofid *et al.* 2002), nach dem Protokoll von Quadri *et al.* (1998) durchgeführt.

Die Komponenten sowie ihre jeweilige Konzentration im Testansatz sind in Tabelle 2-8 aufgeführt. Die Reaktion in den Testansätzen wurde durch die PPTase-Zugabe gestartet, 30 min bei 37°C fortgesetzt und durch Hinzufügen von 800 µl 10%iger TCA (0°C) gestoppt. Die Proteine wurden zusammen mit 15 µl BSA-Lösung (25 mg·ml<sup>-1</sup>) sedimentiert (30 min, 13000 Upm, 4°C), zweimal mit 800 µl 10%iger TCA gewaschen und in 180 µl Ameisensäure resuspendiert. Die Suspension wurde mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und anschließend im Szintillationszähler vermessen.

**Tab. 2-8:** Zusammensetzung der Testansätze im Radioassay zum Nachweis der posttranslationalen Modifikation von His-tag-LmbN bzw. -LmbPCP.

| Assay-Komponente  | Konzentration   |
|---|-----------------|
| His-tag-LmbPCP/-LmbN  | 0,5 µM          |
| AcpS/Sfp  | 12,1 nM / 10 nM |
| [ <sup>3</sup> H]-CoA (40 Ci·mmol <sup>-1</sup> ; 0,95 mCi·ml <sup>-1</sup> ) | 200 nM          |
| CoA   | 20 µM           |
| MgCl <sub>2</sub>   | 10 mM           |
| Puffer <sup>1)</sup>  | 50 mM           |
| H <sub>2</sub> O  | ad 100 µl       |

<sup>1)</sup>Tris-HCl, pH 8,8 (AcpS) und MES-HCl pH 6,0 (Sfp), jeweils mit 5 mM DTT u. 250 mM NaCl.

### 2.15.3 Beladung von *holo*-His-tag-LmbN/-LmbPCP mit [<sup>3</sup>H]-PPL

Zum *in vitro* Nachweis der Carrierprotein-Funktion von LmbN bzw. LmbPCP sollten die jeweiligen *holo*-Enzyme mit dem als Aminoacyl-AMP aktivierten [<sup>3</sup>H]-PPL beladen werden. Die Komponenten des Beladungsassays mit ihren jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 2-9 aufgeführt.

Die angereicherten Proteine His-tag-LmbN und -LmbPCP wurden zusammen mit den PPTasen Sfp oder AcpS und dem Cosubstrat CoA für 30 min bei 37°C vorinkubiert.

Anschließend wurden die Assay-Ansätze mit His-tag-LmbC, [<sup>3</sup>H]-PPL und ATP für die *in situ*-Darstellung des [<sup>3</sup>H]-PPL-AMP weitere 4 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Fällen der Proteine mit 1 ml 10%iger TCA abgestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit 10%iger TCA wurden die Proteine entweder in 200  $\mu$ l Perchlorsäure für Szintillationsmessungen oder in Probenpuffer für eine SDS-PAGE resuspendiert. Die so gewonnen Proben wurden anschließend im Szintillationszähler vermessen, oder mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Das getrocknete PAA-Gel wurde danach einem Röntgenfilm exponiert, um die Protein-gebundene Radioaktivität sichtbar zu machen.

Alternativ zu den gereinigten Enzymen, His-tag-LmbC und -LmbN wurden die dialysierten S30-Extrakte der Kulturen *E. coli* JM109(DE3)/pMHW30/pAAW9.22 und *S. lividans* 66 1326::*lmbC*/pAAW9.11 verwendet.

**Tab. 2-9:** Zusammensetzung der Testansätze zum Nachweis der von His-tag-LmbN bzw. -LmbPCP mit AMP-aktiviertem [<sup>3</sup>H]-PPL.

| Assay-Komponente                                   | Konzentration  |
|--|----------------|
| His-tag-LmbN <sup>1)</sup> bzw. -LmbPCP            | 0,5 $\mu$ M    |
| His-tag-LmbC <sup>1)</sup>                         | 0,5 $\mu$ M    |
| AcpS bzw. Sfp                                      | 10-15 nM       |
| CoA  | 20 $\mu$ M     |
| ATP  | 2,5 mM         |
| [ <sup>3</sup> H]-PPL (1,5 Ci·mmol <sup>-1</sup> ) | 36 $\mu$ Ci    |
| MgCl <sub>2</sub>                                  | 10 mM          |
| DTT  | 5 mM           |
| Tris-HCl pH 8,8                                    | 50 mM          |
| H <sub>2</sub> O                                   | ad 120 $\mu$ l |

<sup>1)</sup>Bei Verwendung von dialysierten S30-Extrakten wurden 10  $\mu$ l bei einer anschließenden SDS-PAGE-Analyse und 50  $\mu$ l (in 200  $\mu$ l Gesamtvolumen) bei Szintillationsmessungen eingesetzt.

#### 2.15.4 *In vitro* NDL-Synthese

Bei den Versuchen zur *in vitro*-Synthese von NDL aus PPL und MTL wurden sowohl die angereicherten Enzyme His-tag-LmbC und His-tag-LmbN/-PCP verwendet sowie die Rohextrakte aus den rekombinanten Stämmen *E. coli* JM109(DE3)/pMHW30/pAAW9.22 und *S. lividans* 66 1326::*lmbC*/pAAW9.11. Um die möglichen Carrierproteine His-tag-LmbN/-PCP komplett in die *holo*-Form zu überführen, wurde zur Modifikation CoA und die

PPTasen Sfp und AcpS bzw. dialysierter S30-Extrakt von *S. lincolnensis* NRRL 2936 hinzugefügt.

Die Testansätze wurde zwischen 4 h und ÜN bei 28°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Testansatz 1 min auf 100°C erhitzt, so dass die denaturierten Protein sedimentiert werden konnten. Der Überstand wurde im Vakuum eingengt und anschließend in einer Bioautographie mit *M. luteus* als Indikatorstamm verwendet (s. Kap. 2.6.2). Alternativ wurden die Substanzen des Überstands mit Hilfe einer HPLC getrennt (s. Kap. 2.6.4) und im UV-Detektor bei 214 nm detektiert. Als Vergleichsstandard diente jeweils das aus der *lmbN*-Deletionsmutante isolierte NDL (Stühler, 1999).

**Tab. 2-10:** Zusammensetzung der Testansätze zum Nachweis der NDL-Synthese aus PPL und MTL.

| Assay-Komponente   | Konzentration       |
|--|---------------------|
| His-tag-LmbC   | 0,5 µM              |
| His-tag-LmbN bzw. -LmbPCP  | 0,5 µM              |
| S30-Extrakte von: <i>E. coli</i> JM109(DE3)/pMHW30/pAAW9.22<br>bzw. <i>S. lividans</i> 66 1326:: <i>lmbC</i> /pAAW9.11 <sup>1)</sup> | 20-50 µl            |
| AcpS od. Sfp bzw.<br>dialysierter S30-Extrakt von <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 <sup>2)</sup>                                     | 10-15 nM<br>5-15 µl |
| CoA  | 20 µM               |
| ATP  | 5 mM                |
| PPL u. MTL   | je 2 mM             |
| MgCl <sub>2</sub>  | 20 mM               |
| DTT  | 5 mM                |
| Tris-HCl pH 8,0  | 50 mM               |
| H <sub>2</sub> O   | ad 200 µl           |

<sup>1)</sup>Die S30-Extrakte der rekombinanten *E. coli* und *S. lividans* wurden anstelle der gereinigten Enzyme His-tag-LmbC und -LmbN bzw. -LmbPCP im Assay eingesetzt.

<sup>2)</sup>Der *S. lincolnensis*-Extrakt wurde bei einigen Testansätzen zugefügt, um eine mögliche spezifische PPTase für LmbN/LmbPCP bereit zu stellen.

## 2.16 Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen

Zur Identifikation von offenen Leserahmen wurde das Programm Frameplot eingesetzt (Bibb *et al.*, 1984; Ishikawa und Hotta, 1999; <http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl>). Multiple Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt. Paarweise Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen FASTA3 (Pearson und Lipman, 1988; <http://www.ebi.ac.uk>), BLAST (Altschul *et al.* 1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), WU-BLAST2 (<http://www.ebi.ac.uk>) und den

jeweiligen nicht-redundanten Sequenzdatenbanken bzw. SWISSPROT durchgeführt. Zur Identifikation von konservierten Proteindomänen wurde die PFAM- (Bateman *et al.*, 2000; <http://www.sanger.ac.uk>), die PROSITE- (<http://www.expasy.ch>) und die INTERPRO-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk>) eingesetzt.

### 3 Ergebnisse

Um die Genprodukte der *lmb*-Gene aus *S. lincolnensis* NRRL 2936 zu identifizieren, die an der Bildung der Amidbindung zwischen PPL und MTL beteiligt sind, sollten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deren Funktionen getestet werden. Den postulierten Biosyntheseweg-Genen, *lmbC* und *lmbN*, wurden aufgrund der Aminosäure-Sequenzhomologien ihrer Produkte eine Beteiligung an der Kondensationsreaktion zugeschrieben. Beide Gene sollten durch Knock-out-Mutationen inaktiviert werden. Dazu wurden die Gene durch Einführung des *aacC4*-Apramycinresistenzgens (Bräu und Piepersberg, 1985; Blondelet-Rouault *et al.*, 1997) auf verschiedene Weise ausgetauscht bzw. inaktiviert, um auf die Mutation positiv selektieren zu können.

Die Strategie der Funktionsaufklärung umfasste die folgenden Teilziele: Um die Proteine LmbC und LmbN *in vitro* zu untersuchen, war zunächst ihre heterologe Expression notwendig. Zur Isolierung der Gene wurden geeignete Primer (vgl. Tab. 2-3) aus der Nucleotidsequenz abgeleitet, die zur selektiven Amplifikation des jeweiligen Gens aus chromosomaler DNA des Wildtyps, *S. lincolnensis* NRRL 2936, in eine PCR eingesetzt wurden. In die Primer wurden zur Klonierung die Erkennungssequenzen ausgewählter Restriktionsendonucleasen eingeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in Vektoren ligiert, die eine Überprüfung der Sequenz der Amplifikate durch DNA-Sequenzierung erlaubten. Schließlich wurden die Gene in Expressionsvektoren kloniert. Als Wirtsstämme für die Expressionsversuche dienten geeignete Stämme von *E. coli* K12 und *S. lividans* 66. Zunächst wurde jeweils versucht die Proteine mit Hilfe des T7-Expressionssystems in *E. coli* zu produzieren. Wenn in den zellfreien Extrakten der rekombinanten *E. coli*-Stämme kein lösliches Protein nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression alternativ in einem *S. lividans* 66 Wirtssystem versucht.

Die Produktion der rekombinanten Proteine wurde anhand von SDS-PAGE überprüft, wobei die Proteine entweder durch Anfärbung oder durch eine Western-Blot-Analyse mittels anti-Penta-His-Antikörper der gebildeten His-tag-Fusionsproteine sichtbar gemacht wurden.

Die Ergebnisse der Expressionsversuche sind vorab in der Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die Details der einzelnen Expressionen werden in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben.

**Tab. 3-1:** Zusammenfassung der Expressionsergebnisse von *lmbC*, *lmbN* und *lmbPCP*.

| Gen / Protein<br>[bp] / [aa]       | Expression in <i>E. coli</i> |                            | Expression in <i>S. lividans</i> |         |
|------------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------|
|                                    | pET11a/16b/20a               | pJOE2702/2775              | pAAW23/pIJ4123                   | pUWL201 |
| <i>lmbC</i> / LmbC<br>1527 / 508   | +/+/n.d.<br>(CF)             | n.d./+<br>(AB)             | n.d.                             | +       |
| <i>lmbN</i> / LmbN<br>828 / 275    | -/-/+<br>(CF)                | + <sup>1)</sup> /-<br>(AB) | +                                | +       |
| <i>lmbPCP</i> / LmbPCP<br>240 / 79 | +/+/n.d.<br>(CF)             | n.d./n.d.                  | +                                | +       |
|                                    |                              |                            | (CF/AB/K)                        | (K)     |
|                                    |                              |                            | (CF)                             | (K)     |

<sup>1)</sup> Expression in *E. coli* JM109/pAAW9.22 (Arnold, 2000).

(+), Expression löslichen Proteins; (-), keine Expression bzw. unlösliches Protein; n.d., Expression nicht durchgeführt; CF, Expressionsnachweis nach SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung; AB, Expressionsnachweis durch Western-Blot Analyse mit Penta-His Primärantikörpern; K: Expressionsnachweis durch Wiederherstellung der Funktion in den jeweiligen Mutanten durch Komplementation.



## 3.1 Der Leserahmen *lmbC*

Aus vorangegangenen Arbeiten zum *lmb/lmc/lmr*-Biosynthesecluster war bekannt, dass der Leserahmen *lmbC* für ein Protein kodierte, welches auf der Ebene der Aminosäuresequenz eine signifikante Homologie zu Aminosäure-aktivierenden A-Domänen nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen besaß (vgl. Tab. 1-3; Peschke *et al.*, 1995; Marahiel *et al.*, 1997). *LmbC* wurde bereits erfolgreich in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS/pT7AdExC als teilweise lösliches Protein produziert und auf seine putative Funktion als adenylylierendes Enzym in einem ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschassay untersucht. In dieser ersten Funktionsuntersuchung konnte jedoch keine Abhängigkeit der ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion von den eingesetzten Substraten PPL, L-DOPA, oder L-Tyrosin nachgewiesen werden (Schmidt, 1994; Peschke *et al.*, 1995).

Da die Aminosäureaktivierung den Initiationsschritt im postulierten Mechanismus der Amidbindungsbildung (vgl. Abb. 1-5) darstellt, sollte zuerst die Beteiligung des Genprodukts *LmbC* an der Biosynthese des Lin A durch eine *lmbC*-Knock-out-Mutante bewiesen werden.

### 3.1.1 Erzeugung einer *lmbC*-Knock-out-Mutante

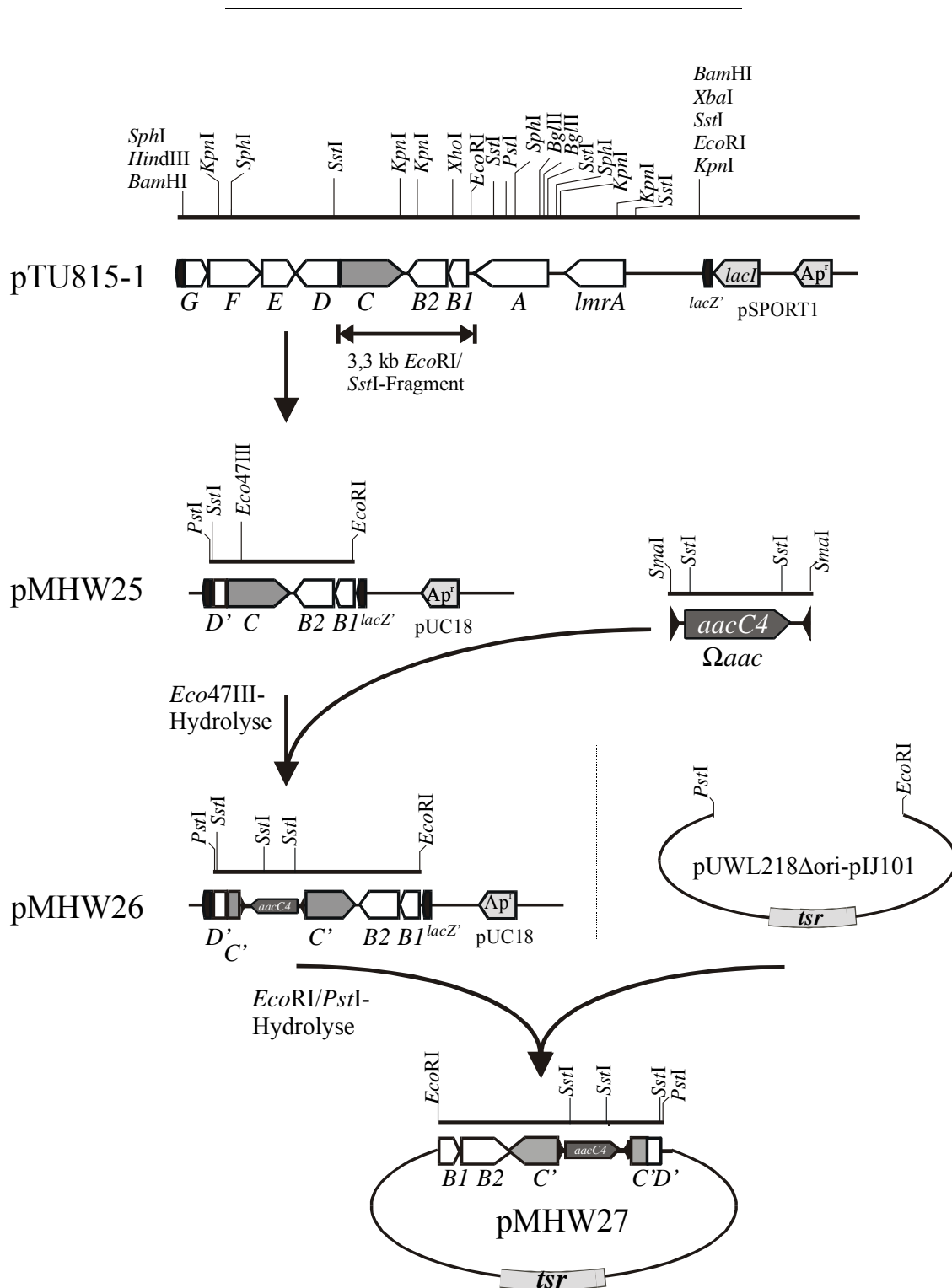
Die Mutation im Gen *lmbC* sollte durch homologe Rekombination im Wildtyp *S. lincolnensis* NRRL 2936 mit Hilfe eines Plasmids eingeführt werden, das sich in *S. lincolnensis* nicht autonom replizieren konnte. Dieser Suizid-Vektor wurde als Derivat von pUWL218Δori-pIJ101 in *E. coli* konstruiert (Abb. 3-1).

Die homologe Rekombination, die zur Erzeugung der Knock-out-Mutante führte, ist schematisch in Abbildung 3-3 dargestellt. Als Selektionsmarker für ein erfolgreiches Rekombinationsereignis wurde das *aacC4*-Gen aus *E. coli* verwendet, dessen Genprodukt in *E. coli* unter anderem Resistenz gegenüber Tobramycin und in Streptomyceten gegenüber Apramycin verleiht. Das Thiostrepton-Resistenzgen *tsr* wurde als zusätzliche Selektionshilfe genutzt, um zwischen Einzel- und Doppelcrossover-Mutanten unterscheiden zu können.

#### 3.1.1.1 Konstruktion des Suizid-Vektors pMHW27

Zuerst wurde ein 3,3 kb großes *SstI/EcoRI* DNA-Fragment mit den Genen *lmbB1B2CD'* vom Plasmid pTU815-1 mit einem entsprechend hydrolysierten pUC18 ligiert. Das resultierende Plasmid pMHW25 wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *Eco47III* 180 bp

stromabwärts des Startkodons von *lmbC* hydrolysiert und mit dem 1,7 kb *SmaI*-DNA-



**Abb. 3-1: Konstruktion des Suizid-Vektors pMHW27 zur Erzeugung einer *lmbC*-Knock-out-Mutante.** Schematische Darstellung der Genanordnung innerhalb der Plasmide pTU815-1, pMHW25, pMHW26 und pMHW27. Die *lmb*-Biosynthesegene sind mit Großbuchstaben unterhalb gekennzeichnet, wobei Genfragmente durch ein Apostroph markiert wurden. Schnittstellen relevanter Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. Die Restriktionskarte des Plasmids pTU815-1 wurde durch Restriktionsanalyse überprüft.

Fragment der  $\Omega$ -Kassette des Plasmids pHP45 $\Omega$ *aac* (Blondelet-Rouault *et al.*, 1997) ligiert, was zum Plasmid pMHW26 führte. In der verwendeten  $\Omega$ -Kassette ist das *aacC4*-Resistenzgen unter Kontrolle des eigenen Promotors und ist an beiden Enden von kurzen umgekehrten Wiederholungssequenzen mit Transkriptions- und Translationsstopp-Sequenzen eingerahmt. Alle isolierten und einer Restriktionskontrolle unterzogenen Klone des pMHW26-Plasmids hatten die  $\Omega$ -Kassette so in *lmbC* orientiert, dass Resistenz- und Biosynthesegen entgegengesetzte Orientierungen besaßen.

Aus dem Plasmid pMHW26 wurde anschließend das 5,0 kb-DNA-Fragment bestehend aus den in *lmbC* durch die  $\Omega$ -Kassette unterbrochenen Lincomycin-Biosynthesegenen als *PstI/EcoRI*-Fragment in einen entsprechend hydrolysierten pUWL218 $\Delta$ ori-pIJ101 ligiert. Diese Klonierung brachte den Suizid-Vektor pMHW27 hervor, der für die homologe Rekombination zur Einführung der Mutation genutzt werden sollte.

Um die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination mit dem Genom von *S. lincolnensis* NRRL 2936 zu erhöhen, wurde alkalisch denaturierte, einzelsträngige Plasmid-DNA des nicht *dam-/dcm*-methylierenden *E. coli* JM110 zur Transformation eingesetzt (s. Kap. 2.7.10; Oh und Chater, 1997).

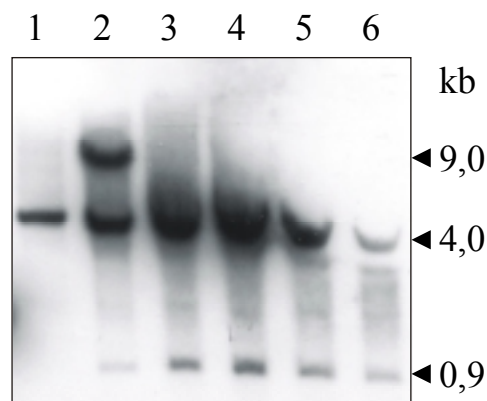
### 3.1.1.2 Isolierung der *lmbC*-Knock-out-Mutanten

Zur Selektion der Mutanten wurde das Resistenzverhalten der Transformanten gegenüber Apramycin und Thiostrepton verwendet (Abb. 3-3), da der Verlust des *tsr*-Gens des Plasmids pMHW27 bei gleichzeitiger Apramycin-Resistenz auf das gewünschte Doppelcrossover-Ereignis hinwies. Die Transformanten wurden während der Regeneration mit Apramycin überschichtet, und die rekombinanten Einzelkolonie-Isolate von *S. lincolnensis* wurden anschließend jeweils auf Agarplatten ausplattiert, die den Selektionsmarker Apramycin bzw. Thiostrepton beinhalten.

Es wurden 54 Apramycin-resistente Klone eines Transformationsansatzes isoliert, von denen vier Klone zusätzlich sensitiv gegenüber Thiostrepton waren. Die vier Apramycin-resistenten und Thiostrepton-sensitiven Klone, *S. lincolnensis* CDC6/CDC17/CDC30/CDC50 und ein gegen beide Antibiotika resistenter Klon wurden sowohl genetisch als auch biochemisch näher untersucht.

### 3.1.2 Genetische Charakterisierung der *lmbC*-Knock-out-Mutante

Die chromosomale DNA einer ihrem Phänotyp entsprechenden Einzelcrossover-Mutante (*S. lincolnensis* CSC1), der vier möglichen Doppelcrossover-Mutanten (*S. lincolnensis* CDC6/CDC17/CDC30 und CDC50), sowie des Wildtyps *S. lincolnensis* NRRL 2936 wurde isoliert (s. Kap. 2.7.1).



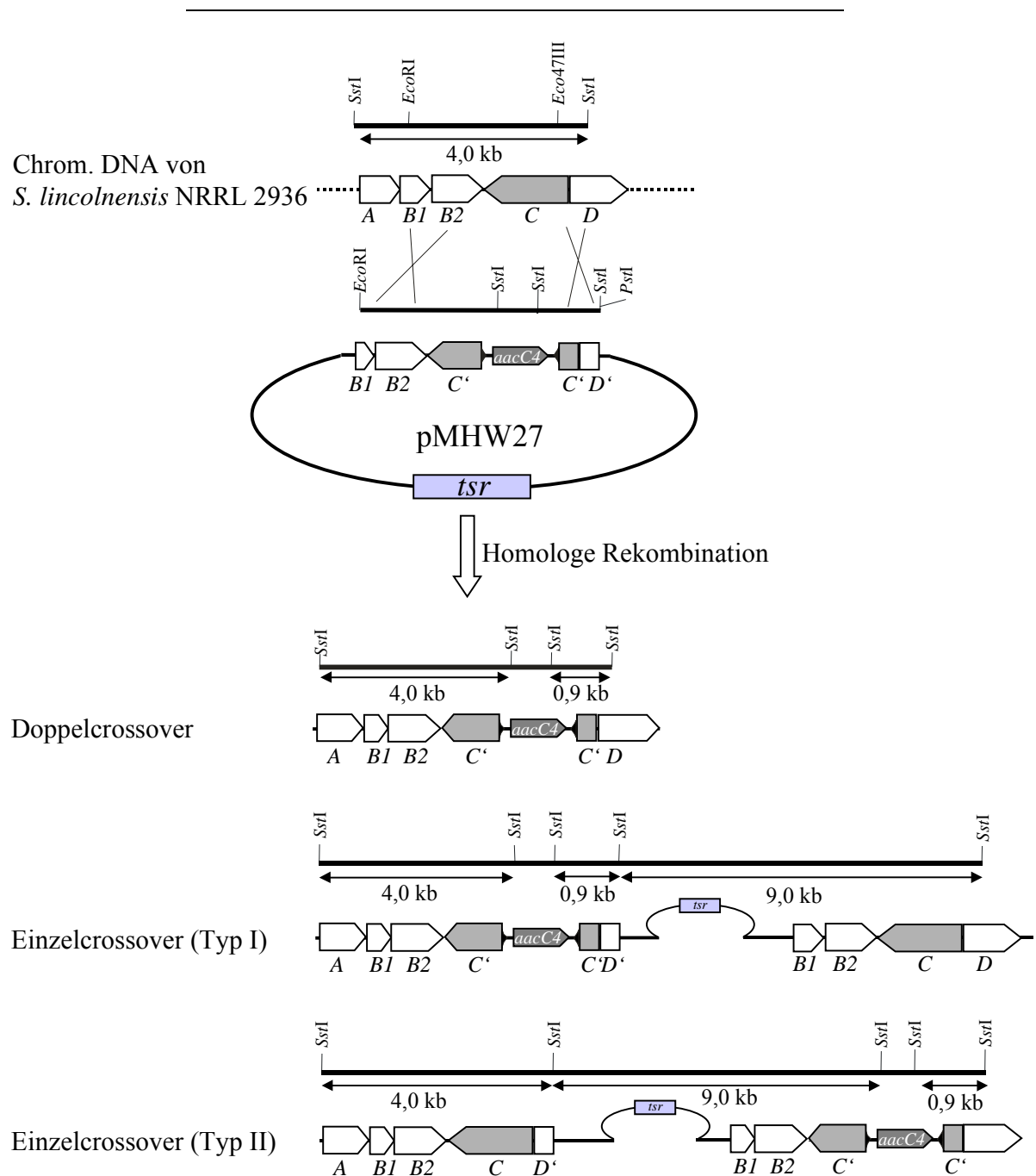
**Abb. 3-2: Southern Hybridisierung der *lmbC*-Mutanten.** Die Pfeilspitzen markieren die Bandenpositionen der zu erwartenden, mit der *lmbC*-Sonde hybridisierenden Fragmente. *S. lincolnensis* NRRL2936 (1), *lmbC*-Einzelcrossover-Mutante (2), *lmbC*-Doppelcrossover-Mutanten CDC6 (3), CDC17 (4), CDC30 (5) und CDC50 (6).

Nach *Sst*I-Hydrolyse der chromosomalen DNA und Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 2.7.2) wurde eine Southern Hybridisierung (s. Kap. 2.8.6; Abb. 3-2) durchgeführt. Als Hybridisierungssonde diente das *lmbC*-Gen, welches als *Nde*I/*Bam*HI-Fragment aus dem Plasmid pMHW22 isoliert wurde. In Abbildung 3-3 ist die Genanordnung in den Genomen des Wildtyps, der beiden möglichen Einzelcrossover- und der Doppelcrossover-Mutante sowie die Größen der hybridisierenden Fragmente dargestellt.

In der Spur mit Wildtyp-DNA hybridisierte wie erwartet nur ein Fragment mit der Größe von 4 kb (vgl. Abb. 3-2, Spur 1). In der chromosomalen DNA der Einzelcrossover-Mutante *S. lincolnensis* CSC1 ergaben sich wegen der Genverdopplung durch Integration des gesamten Suizid-Vektors drei hybridisierende Fragmente mit den Größen von 0,9, 4,0 und 9,0 kb (vgl. Abb. 3-2, Spur 2). Im Genom der gewünschten Doppelcrossover-Mutanten *S. lincolnensis* CDC6/CDC17/CDC30/CDC50 hybridisierten jeweils zwei Fragmente der Größen 0,9 und 4,0 kb (vgl. Abb. 3-2, Spuren 3-6) mit der radioaktiv-markierten *lmbC*-DNA-

Sonde.

Die Analyse durch Southern-Hybridisierung zeigte, dass der Genotyp aller getesteten Mutan-



**Abb. 3-3: Einführung der  $\Omega$ aac-Kassette in das Gen *lmbC* durch homologe Rekombination.** Schematische Darstellung der Genanordnung des Wildtyps *S. lincolnensis* NRRL 2936, des gewünschten Doppelcrossover-Ereignisses und der beiden möglichen Einzelcrossover-Ereignisse, die durch homologe Rekombination mit pMHW27 entstehen konnten. Die *lmb*-Biosynthesegene sind mit Großbuchstaben unterhalb gekennzeichnet, wobei Genfragmente durch ein Apostroph markiert wurden. Die Größen der *Sst*I-DNA-Fragmente, die mit einer *lmbC*-Gensonde hybridisieren sollten, sind jeweils oberhalb der Genschemata durch Doppelpfeile gekennzeichnet.

ten dem Phänotyp in Bezug auf das Resistenzverhalten gegenüber den Selektionsmarkern Apramycin und Thiostrepton entsprach.

Da die Orientierung des Resistenzgens zur Leserichtung von *lmbC* durch Restriktionsanalyse bekannt war, und es unerheblich war, welche Variante der Einzelcrossover-Mutante vorlag, wurde darauf verzichtet, die Mutanten weitergehend genetisch zu charakterisieren.

### 3.1.3 Biochemische Charakterisierung der *lmbC*-Knock-out-Mutante

Um die Produktion von Lin A zu untersuchen, wurde ein Bioassay mit Lin A-sensitiven *Micrococcus luteus* durchgeführt (s. Kap. 2.6.1). Dazu wurden die Mutanten *S. lincolnensis* CSC1/CDC6/CDC17/CDC30/CDC50 sowie der Wildtyp auf SPMR-Agar bis zur sichtbaren Sporulation angezogen und Agar-Blöcke der verschiedenen Kulturen wurden anschließend auf Akkumulation von Lin A überprüft.

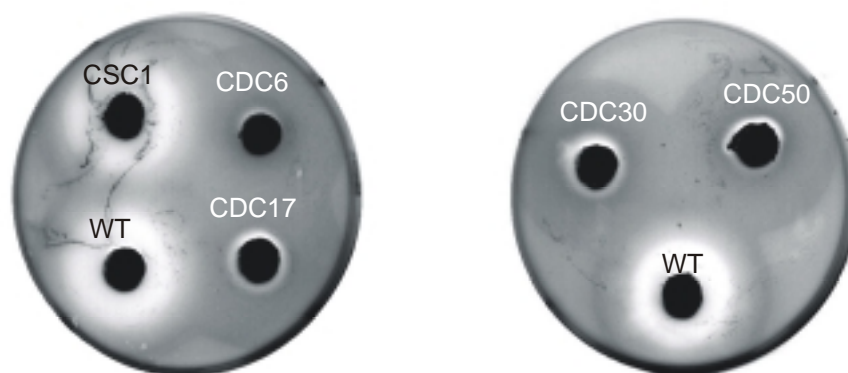
Im Bioassay wurde das nach der Hybridisierung erwartete Ergebnis hinsichtlich der Lin A-Produktion bestätigt. Bei allen vier Doppelcrossover-Mutanten konnte keine Antibiotika-Produktion mehr nachgewiesen werden (Abb. 3-4). Die Agarblöcke aus den Plattenkulturen der Einzelcrossover-Mutante *S. lincolnensis* CSC1 und der Wildtyp-Kontrolle verursachten vergleichbar große Hemmhöfe im *M. luteus*-Bakterienrasen, die den für Lin A charakteristischen, weichen Randverlauf aufwiesen. Da in der Einzelcrossover-Mutante das *lmbC*-Gen neben der durch die  $\Omega$ -Kassette unterbrochenen Form zusätzlich als intaktes Gen mit eigenem Promotor vorlag (Abb. 3-3), war auch eine dem Wildtyp vergleichbare Lin A-Produktion zu erwarten gewesen.

Um sicherzustellen, dass der Hemmhof im *M. luteus*-Bakterienrasen durch Lin A hervorgerufen wurde, wurde zusätzlich eine Bioautographie (s. Kap. 2.6.2) durchgeführt. Auf dem mit dem Indikatorstamm überschichteten Papierchromatogramm zeigten sich nur in den Spuren mit den Extrakten aus dem Wildtyp und der Einzelcrossover-Mutante ein Hemmhof im Bakterienrasen, der den gleichen  $R_f$ -Wert von ca. 0,85 aufwies wie die Lin A-Reinsubstanz. In den Spuren mit den Extrakten aus den Kulturen der Doppelcrossover-Mutanten ließ sich keine Substanz nachweisen, die das Wachstum des Indikatorstamms inhibiert oder verlangsamt hätte (ohne Abb.). Die Bioautographie bestätigte somit die Ergebnisse des Bioassays. Das ließ den Schluß zu, dass das *lmbC*-Genprodukt essentiell für die Biosynthese von Lin A in *S. lincolnensis* ist.

Da in den *lmbC*-Knock-out-Mutanten kein Lin A mehr produziert und dem Genprodukt eine Beteiligung an der Kondensation als adenylylierendes Enzym zugeschrieben wurde, wurde

untersucht, ob sich nicht aus den Kulturüberständen der Mutanten die vermeintlichen Edukte der Kondensationsreaktion nachweisen ließ. Aus Arbeiten von Hausknecht und Wolf (1986) war bekannt, dass MTL die Zellmembran nur sehr schlecht passieren kann. Unter Standard-Fermentationsbedingungen wurde MTL erst bei einer Konzentration von  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  nachweislich in die Zellen aufgenommen, was durch Anreicherung von NDL im Kulturüberstand einer MTL<sup>-</sup>-*S. lincolnensis*-Mutante bewiesen worden war.

Daher wurde angenommen, dass PPL als zweites postuliertes Edukt der Kondensation im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann. Die aus den Kulturüberständen erhaltenen Extrakte wurden mit Hilfe von Dünnschicht-Chromatographie (s. Kap. 2.8.1) aufgetrennt und durch Besprühen mit Ninhydrin-Sprühreagenz wurde versucht, PPL anhand seiner charakteristischen Rosafärbung nachzuweisen (Witz *et al.*, 1971). Doch aus den dem Kulturmedium der *lmbC*-Mutanten, die für 5 d unter Standardbedingungen in SPMR-Flüssigmedium angezogen wurden, ließ sich keine Substanz isolieren, welche einen mit der PPL-Reinsubstanz vergleichbaren Retentionswert und die charakteristische Rosa-Färbung auf dem Dünnschicht-Chromatogramm gezeigt hätte.



**Abb. 3-4: Bioassay zum Nachweis der Lin A-Produktion.** Untersucht wurden *S. lincolnensis* NRRL 2936 (WT), die *lmbC*-Doppelcrossover-Mutanten CDC6/CDC17/CDC30/CDC50 und die Einzelcrossover-Mutante CSC1.

Es wurde daraufhin versucht PPL ebenfalls aus dem Agar der Mutanten-Kulturen zu isolieren, da schon das Lin A-Endprodukt, um es in Bioassays nachzuweisen, reproduzierbar nur aus Agarkulturen isoliert werden konnte. Auf den entwickelten Dünnschicht-Chromatogrammen der Agar-Extrakte der *lmbC*-Mutantenkulturen waren im Vergleich zu den Extrakten aus Flüssigkulturen deutlich weniger Substanzen mit Ninhydrin nachweisbar. PPL ließ sich nicht

in den Extrakten der *lmbC*-Knock-out-Mutanten identifizieren.

### 3.1.4 Komplementation der *lmbC*-Knock-out-Mutante

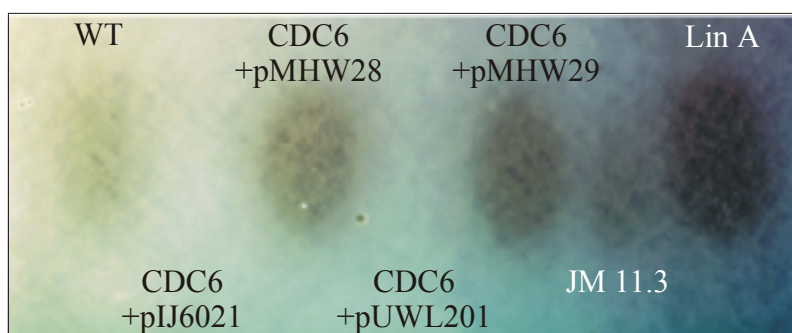
Die *lmbC*-Knock-out-Mutante *S. lincolnensis* CDC6 konnte nicht über Fütterungsversuche getestet werden, da das Produkt der inaktivierten Biosynthesereaktion, NDL, selbst bereits antibiotische Aktivität besitzt. Daher wurde die Mutante über *trans*-Komplementation mit dem expressionsfähigen *lmbC*-Gen auf einem Plasmid getestet. Die Ergebnisse der Komplementationsexperimente sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Das *lmbC*-Gen wurde in die Streptomyceten-Vektoren pIJ4123 (*redD*-Dreivat von pIJ6021) und pUWL201 kloniert, wodurch die Plasmide pMHW28 respektive pMHW29 entstanden. Als Negativkontrollen dienten die Stämme *S. lincolnensis* CDC6/pIJ6021 bzw. pUWL201. Bei den Komplementationsversuchen stand *lmbC* im Plasmid pMHW28 unter der Kontrolle des Thiostrepton-induzierbaren  $P_{tipA}$ -Promotors aus *S. lividans* (Takano *et al.*, 1995) und im Plasmid pMHW29 unter der Kontrolle des konstitutiven  $P_{ermE^*}$ -Promotors (Bibb *et al.*, 1985). In beiden Fällen konnte die *lmbC*-Doppelcrossover-Mutante auf DNA-Ebene komplementiert werden, was durch Bioautographie nachgewiesen wurde (Abb. 3-5).

In den Spuren der Extrakte aus den Kulturen *S. lincolnensis* CDC6/pMHW28 und pMHW29 bildete sich im darüber liegenden *M. luteus* DN218-Bakterienrasen jeweils ein Hemmhof, der sich in Abbildung 3-5 als dunkler Schatten zeigt. Der Retentionswert der antibiotisch wirkenden Substanz war vergleichbar mit dem der Lin A-Reinsubstanz. Aus einer Kultur des Wildtyp-Produzenten, die als Positivkontrolle diente, konnte aus dem Agar ca.  $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Lin A extrahiert werden. Aus dem Agar der Kulturen von *S. lincolnensis* CDC6/pMHW28 bzw. pMHW29 ließen sich vergleichsweise geringe Lin A-Mengen isolieren, die bei jeweils ca.  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  lagen. Für die Bioautographie wurden die jeweiligen Lincomycin-Mengen so eingestellt, dass nach Überschichten mit *M. luteus* DN218 vergleichbar große Hemmhöfe von ca. 2 cm Durchmesser entstanden. In den Kontrollstämmen mit den Vektorplasmiden pIJ6021 und pUWL201 war keine Produktion von Lin A nachzuweisen (Tab. 3-2).

Aus der *lmbJ*-Mutante *S. lincolnensis* JM11.3 (Stühler, 1999) wurde NDL entsprechend extrahiert, welches einen etwas geringeren Retentionswert besaß und eine deutlich geringere biologische Aktivität als Lin A zeigte. Das NDL sollte in späteren *in vitro* Kondensationsversuchen als Positivkontrolle dienen.





**Abb. 3-5:** Bioautographie der Extrakte aus den Komplementationsexperimenten der *lmbC*-Mutante *S. lincolnensis* CDC6.

Insbesondere konnte mit der Bioautographie gezeigt werden, dass die Komplementation der *lmbC*-Mutante durch das für das His-tag-LmbC Fusionsprotein kodierende Plasmid pMHW28 die Lin A-Produktion wiederherstellte. Die Funktion von LmbC wurde somit durch die N-terminale His-tag-Fusion nicht eingeschränkt.

**Tab. 3-2:** Qualitative Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung hinsichtlich der Lin A-Produktion in verschiedenen *S. lincolnensis*-Stämmen mit und ohne Plasmid.

| Stamm   | <i>S. lincolnensis</i> CDC6 |         |         |        | <i>S. lincolnensis</i> NRRL 2936 |      |
|---------|-----------------------------|---------|---------|--------|----------------------------------|------|
| Plasmid | ohne                        | pIJ6021 | pUWL201 | pMHW28 | pMHW29                           | ohne |
| Lin A   | –                           | –       | –       | +      | +                                | ++   |

(–): keine Lin A-Produktion nachweisbar, (+):  $\leq 10$  mg Lin A l<sup>-1</sup> Medium, (++) :  $\leq 100$  mg Lin A l<sup>-1</sup> Medium; Werte oberhalb von 100 mg Lin A l<sup>-1</sup> Medium wurden in keinem Fall erreicht.

## 3.2 Heterologe Expression des Gens *lmbC*

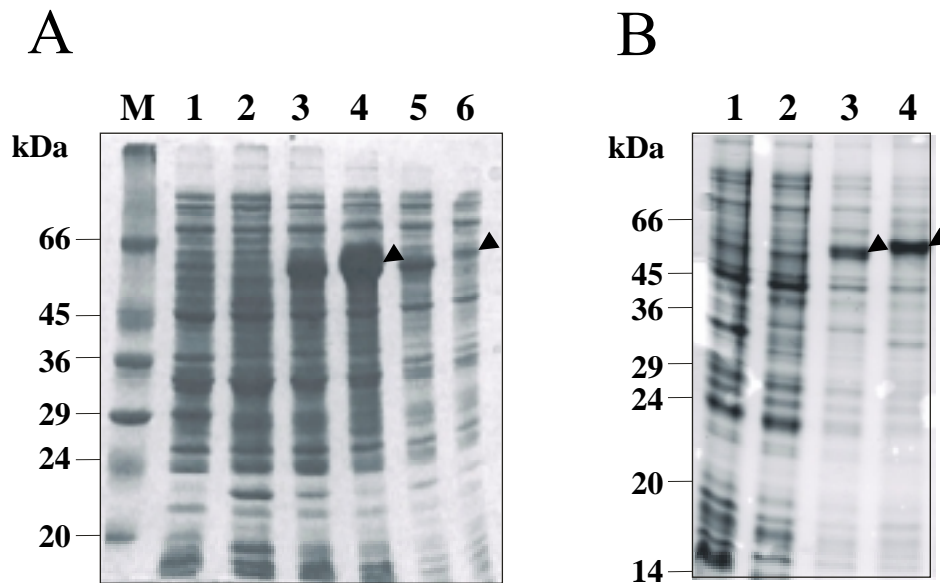
Die Überproduktion und Anreicherung von löslichem und aktivem LmbC-Protein war von besonderem Interesse, da die Aktivierung der Aminosäureuntereinheit als Aminoacyladenylat den Initiationsschritt der Kondensationsreaktion zu ND<sub>L</sub>, der direkten Vorstufe des Lin A, darstellen sollte (vgl. Abb.1-5).

### 3.2.1 Heterologe Expression des Gens *lmbC* in *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Das Gen *lmbC* wurde mittels PCR aus genomischer DNA des Wildtyp-Lin A-Produzenten, *S. lincolnensis* NRRL 2936, mit dem Primerpaar (MH11/MH12; vgl. Tab. 2-3) amplifiziert. Durch den Primer MH11 wurde am Translationsstartpunkt eine *Nde*I- und 120 bp stromabwärts des Stoppkodons eine *Bam*HI-Schnittstelle mit Hilfe des Primers MH12 neu eingeführt. Das so erhaltene 1,6 kb DNA-Fragment wurde in einen mit *Hinc*II behandelten pUC18-Vektor ligiert, was zum rekombinanten Plasmid pMHW22 führte, und durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Zur heterologen Expression in einem *E. coli*-Wirtssystem wurde *lmbC* als *Nde*I/*Bam*HI-Fragment in die *Nde*I/*Bam*HI-hydrolysierten Vektoren pET11a (pMHW23) bzw. pET16b (pMHW24) kloniert.

Nach Transformation der Plasmide pMHW23 und pMHW24 in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS wurden die Zellen in LB-Medium unter Standardbedingungen kultiviert (s. Kap. 2.13.1). Die Produktion von LmbC wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Die Gesamtzellextrakte sowie die zellfreien S30-Extrakte (s. Kap. 2.14) wurden anschließend mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) auf Überproduktion und Löslichkeit der Proteine LmbC bzw. His-tag-LmbC untersucht (s. Kap. 2.10). Die erwarteten Proteinbanden von 53 kDa (LmbC) bzw. 55,5 kDa (His-tag-LmbC) konnten weder in den Gesamtzellextrakten noch den löslichen Fraktionen oder im Sediment nach Zellaufschluss nachgewiesen werden. Die Reduktion der IPTG-Konzentration von 1 mM auf 0,4 mM bzw. der Wechsel zum *E. coli* JM109(DE3) Expressionsstamm führten ebenfalls nicht zu einer sichtbaren Proteinproduktion. Erst durch die Zugabe von Betain und Sorbitol (Chen *et al.*, 1999) konnte sowohl das native LmbC als auch das His-tag-LmbC Fusionsprotein in den löslichen Fraktionen der Zellaufschlüsse nachgewiesen werden (Abb. 3-6 A).



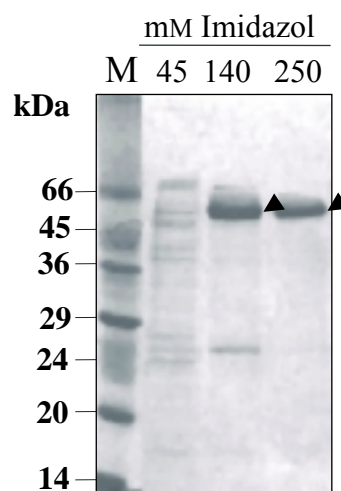
**Abb. 3-6: Heterologe Produktion von LmbC in *E. coli* BL21(DE3)pLysS.** (A): SDS-PAGE Analyse der Gesamtzell-extrakte (Spur 1-4) der *E. coli*-Expressionsstämme mit den Plasmiden pET11a (1), pET16b (2), pMHW23 (3), pMHW24 (4). Zellfreie Extrakte wurden in Spur 5 (pMHW23) und Spur 6 (pMHW24) aufgetragen. Das SDS-PAA Gel (12.5%iges Trenngel) nach Laemmli wurde Coomassiegefärbt und es wurden ca. 40  $\mu$ g Protein je Spur aufgetragen. Die Pfeilspitzen markieren das His-tag Fusionsprotein im Gesamtzell-extrakt sowie in der löslichen Fraktion. (B): 12.5% SDS-PAA Gel nach Laemmli mit den zellfreien Extrakten (ca. 35  $\mu$ g Protein je Spur) der Klone *E. coli* BL21(DE3)pLysS pMHW23 (Spur 2 und 3) und pMHW24 (Spur 1 und 4) vor Induktion mit IPTG (Spur 1 und 2) und zum Zeitpunkt der Zellernte (Spur 3 und 4). Die rekombinanten *E. coli* wurden bei 28°C in LB-Medium mit Betain und Sorbitol kultiviert. Die Pfeilspitzen markieren die Banden mit LmbC und His-tag-LmbC.

Wie ebenfalls aus Abbildung 3-6 A ersichtlich wird, war sowohl das native als auch das His-tag-LmbC nur teilweise löslich. Von den Banden der beiden überproduzierten Proteine mit den Molekulargewichten von ca. 53 kDa und 55,5 kDa, die in den Gesamtzell-extrakten als deutlich überproduziert zu erkennen waren, konnte lediglich ein Bruchteil nach Zellaufschluss in den löslichen Überständen nachgewiesen werden. Der Anteil an löslichem Protein konnte bei einer Anzucht-Temperatur von 28°C jedoch deutlich erhöht werden (Abb. 3-6 B).

### 3.2.2. Anreicherung von His-tag-LmbC aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Aus den Komplementationsexperimenten war bereits bekannt, dass die Lin A-Biosynthese in der *lmbC*-Mutante erfolgreich durch Plasmid-kodiertes His-tag-LmbC wiederhergestellt werden konnte, so dass für die *in vitro* Enzymassays angereichertes His-tag-Fusionsprotein herangezogen werden sollte.

Das His-tag-LmbC wurde aus den Rohextrakten von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pMHW24-Zellen im „Batch“-Verfahren durch Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose angereichert (s. Kap. 2.15). Die Elution erfolgte unter Verwendung eines Stufengradienten. Nach Waschen der mit Protein beladenen Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose mit 20 mM Imidazol im Elutionspuffer wurden Fraktionen mit 45 mM, 140 mM, 250 mM und 500 mM Imidazol gesammelt. Auf dem SDS-PAA Gel mit den Fraktionen der Anreicherung des His-tag-LmbC war zu erkennen (Abb. 3-7), dass in der Fraktion, die mit 140 mM Imidazol im Elutionspuffer von der Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose elutiert werden konnte, noch eine deutliche Verunreinigung durch ein Protein der ungefähren Molekülmasse von 24 kDa vorlag.



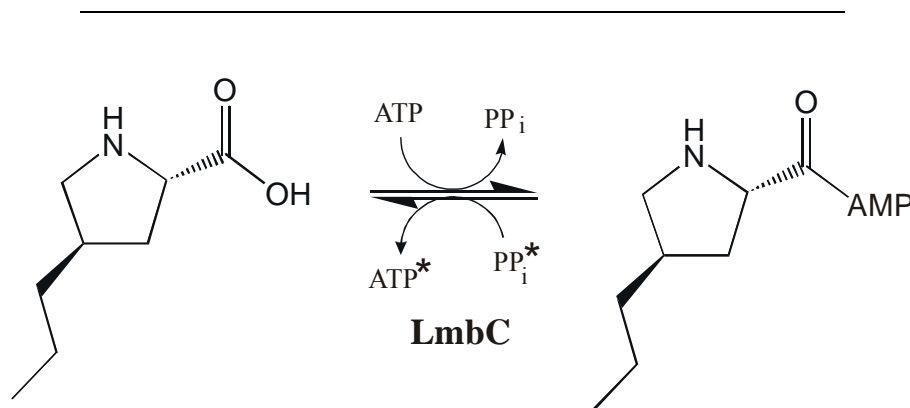
**Abb. 3-7:** SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie zur Anreicherung von His-tag-LmbC. Die Pfeilspitzen markieren die Bande des His-tag Fusionsproteins.

In der Fraktion mit 250 mM Imidazol im Elutionspuffer war die Verunreinigung im Coomassie-gefärbten SDS-PAA Gel nicht mehr sichtbar, sie wurde komplett im vorangehenden Elutionsschritt entfernt, und es war nur noch die Bande des putativen His-tag-LmbC-Fusionsproteins mit dem ungefähren Molekulargewicht von 55,5 kDa sichtbar. In der Fraktion mit 500 mM Imidazol konnte schließlich kein Protein mehr nachgewiesen werden (nicht abgebildet).

### 3.3 Nachweis der LmbC-katalysierten Enzymaktivität

Die substratabhängige ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion (Lee und Lipmann, 1975) sollte als Standardmethode zum Nachweis adenylierender Enzyme angewendet werden, um die Aktivität von LmbC als ATP-abhängiges Enzym zu charakterisieren (s. Kap 2.15.1).

Der Enzymtest beruht dabei darauf, dass die Aktivierung als Aminoacyladenylat eine reversible Reaktion darstellt. Durch Einsatz von radioaktiv-markiertem Pyrophosphat konnte sich durch die Rückreaktion der Adenylierung von PPL die radioaktive Markierung im ATP anreichern und war somit ein Maß der Substratmenge, die zuvor in der Hinreaktion aktiviert worden war (Abb. 3-8).



**Abb. 3-8: Mechanismus der LmbC-katalysierten Aktivierung von PPL als Aminoacyladenylat.** Das Symbol (\*) zeigt die mit [<sup>32</sup>P] radioaktiv markierten Substanzen an.

Da die Gesamtradioaktivität der Stoffmenge an nicht-radioaktivem Pyrophosphat je Ansatz proportional war, konnte aus gemessener Radioaktivität die Stoffmenge an Aminoacyladenylat berechnet werden. Die Stoffmenge des radioaktiv-markierten Pyrophosphats wurde bei der Berechnung der Stoffmengen nicht berücksichtigt, da sie im Vergleich zum nicht radioaktiv-markierten Pyrophosphat vernachlässigbar gering war.

### **3.3.1 Qualitativer Nachweis der durch His-tag-LmbC-katalysierten ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion in Abhängigkeit von *trans*-4-*n*-Propyl-L-prolin, L-DOPA und L-Tyrosin**

Um den störenden Einfluss ATP-verbrauchender Fremdaktivitäten, vor allem ATP-hydrolysierender Enzyme, möglichst weitgehend zu unterdrücken, wurden die Tests mit angereichertem His-tag-LmbC (s. Kap. 3.2.2) durchgeführt. Die ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion wurde wie in Kapitel 2.15.1 beschrieben durchgeführt und nach 15 min durch Zugabe von Perchlorsäure und einem Überschuss nicht-radioaktiven Tetranatriumpyrophosphats abgestoppt.

Von den  $1,26 \times 10^5$  cpm Gesamtradioaktivität, die in Form von [<sup>32</sup>P]-Tetranatriumpyrophosphat im Testansatz mit 1 mM PPL eingesetzt wurden, konnten nach Abstoppen der Reaktion  $9,1 \times 10^4$  cpm (72% der Gesamtradioaktivität) als [<sup>32</sup>P]-ATP an Aktivkohle gebunden nachgewiesen werden. Bei Vergleichstestansätzen ohne PPL beziehungsweise ohne ATP blieben lediglich 526 cpm respektive 431 cpm in Form von unspezifisch-gebundenem [<sup>32</sup>P]-Tetranatriumpyrophosphat an der Aktivkohle gebunden. Dass L-Tyrosin und L-DOPA durch His-tag-LmbC adenylyliert wurden, konnte nicht nachgewiesen werden, da sich keine wesentlichen Unterschiede in den Radioaktivitätsmengen bestimmen ließen, unabhängig davon, ob der Test mit oder ohne Substrat durchgeführt wurde (Tab. 3-1).

Damit konnte in einer ersten Charakterisierung LmbC als ein PPL-adenylylierendes Enzym bestätigt werden. Hingegen konnten die Metabolite der PPL-Biosynthese L-Tyrosin und L-DOPA als Substrate ausgeschlossen werden, da sie keinen ATP/PP<sub>i</sub>-Austausch zeigten.

### **3.3.2 Qualitativer Nachweis der His-tag-LmbC-katalysierten ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion in Abhängigkeit verschiedener Aminosäuren mit ringhaltigen und offenkettigen Seitengruppen**

Nachdem His-tag-LmbC als ein PPL-AMP synthetisierendes Enzym identifiziert worden war, wurden zur Aufklärung des Substratspektrums weitere strukturverwandte Substanzen (Abb. 3-9) im ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschassay getestet. Durch die Auswahl der Aminosäuren sollte analysiert werden, welche Strukturelemente für eine *in vitro* Adenylylierung notwendig sind.

Für den qualitativen Nachweis der Aminoacyl-AMP-Bildung wurden die verschiedenen Substrate (vgl. Abb. 3-9) in einer Konzentration von 1 mM 15 min bei 28°C in Gegenwart von His-tag-LmbC und ca.  $1,3 \times 10^5$  cpm [<sup>32</sup>P]-Tetranatriumpyrophosphat inkubiert.

**Tab. 3-1:** Absolute Radioaktivitätsmengen der Aminosäure-abhängigen ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion.

| Substrat <sup>1)</sup>           | Ansatz mit Substrat<br>[ <sup>32</sup> P]-ATP [cpm] <sup>2)</sup> | Ansatz ohne Substrat<br>[ <sup>32</sup> P]-ATP [cpm] <sup>2)</sup> | Relat. Umsatz<br>(%) |
|----------------------------------|---|--|----------------------|
| L-Propylprolin (PPL)             | 91206   | 526  | 100 <sup>3)</sup>    |
| L-Prolin                         | 1176  | 355  | 0,9                  |
| <i>trans</i> -4-Hydroxy-L-prolin | 704   | 361  | 0,4                  |
| <i>N</i> -Methyl-L-leucin        | 536   | 306  | 0,3                  |
| L-Pipecolinsäure                 | 478   | 384  | 0,1                  |
| L-Acetidincarbonsäure            | 508   | 466  | 0                    |
| Sarcosin                         | 324   | 357  | 0                    |
| <i>N</i> -Methyl-L-valin         | 365   | 402  | 0                    |
| <i>N</i> -Methyl-L-isoleucin     | 388   | 426  | 0                    |
| L-Tyrosin                        | 429   | 399  | 0                    |
| L-DOPA                           | 502   | 489  | 0                    |

<sup>1)</sup> Die Substratkonzentration im Testansatz betrug jeweils 1 mM.

<sup>2)</sup> Radioaktivität, die an Aktivkohle adsorbiert wurde. Die Messwerte wurden als Mittelwert aus drei unterschiedlichen Testansätzen berechnet.

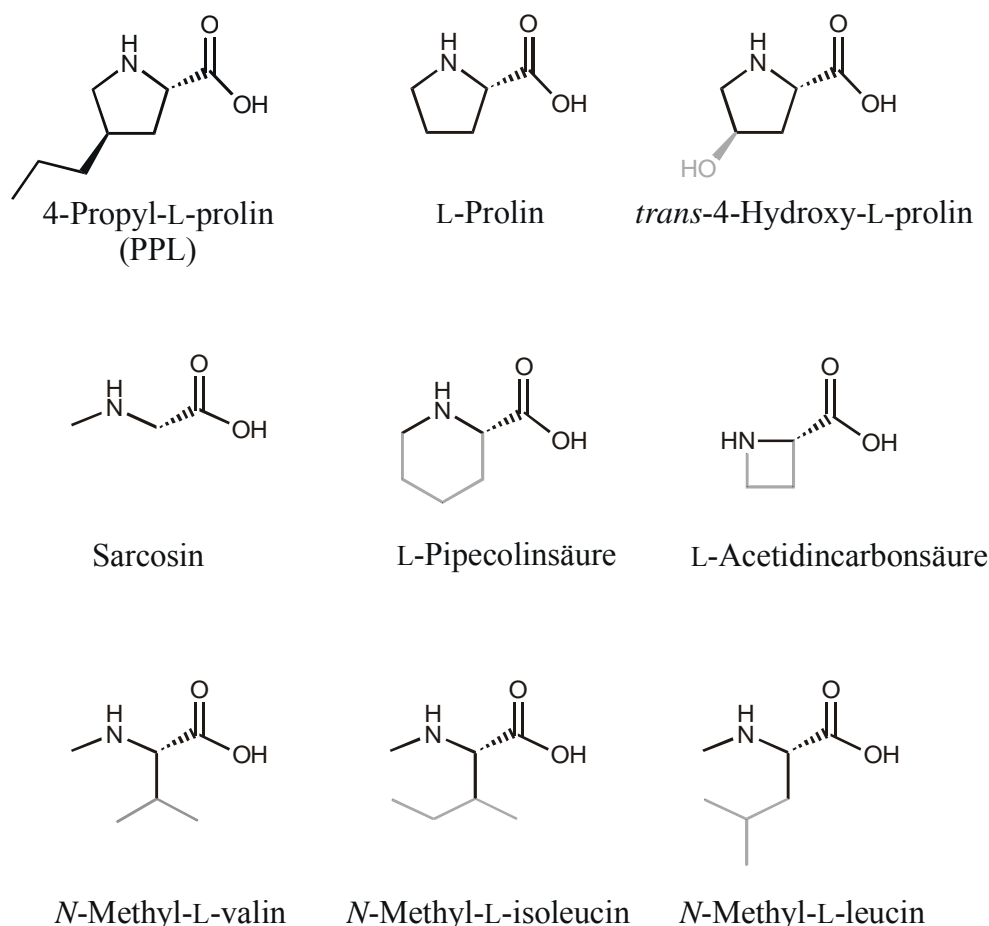
<sup>3)</sup> Der relative Umsatz wurde für PPL mit 100% festgelegt.

Lediglich bei den Substanzen L-Prolin, *trans*-4-Hydroxy-L-prolin und *N*-Methyl-L-leucin konnte eine höhere Radioaktivitätsmenge im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Substrat nachgewiesen werden (Tab. 3-1). Von den vier Substraten, PPL, L-Prolin, *trans*-4-Hydroxy-L-prolin und *N*-Methyl-L-leucin, bei denen eine Substratabhängigkeit in der ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion nachgewiesen werden konnte, wurden jeweils kinetische Messungen bei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt.

### 3.3.3 Enzymkinetik und Substratspezifität von His-tag-LmbC

Um die Substratspezifität von His-tag-LmbC *in vitro* zu untersuchen, wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit verschiedener, geeigneter Substratkonzentrationen bestimmt.

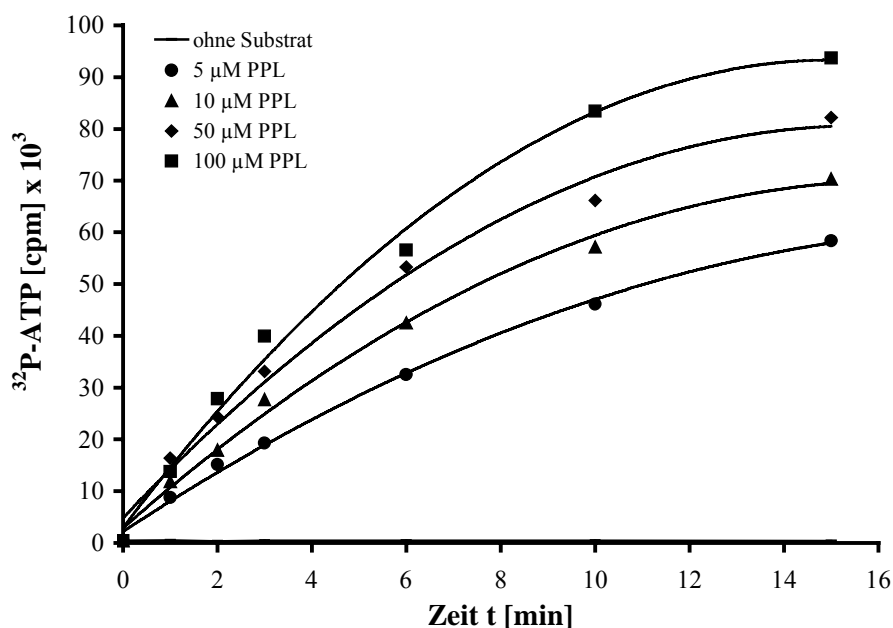
Da bereits festgestellt wurde, dass die Umsatzraten mit PPL als Substrat um ein Vielfaches höher lagen als bei den anderen Aminosäuren (s. Kap. 3.3.2), wurde die Substratkonzentration bei PPL in den Grenzen von 5 bis 100 μM variiert, wohingegen die Reaktionsgeschwindigkeiten bei L-Prolin, Hydroxy-L-prolin und *N*-Methyl-L-leucin zwischen 1 und 10 mM bestimmt wurden.



**Abb. 3-9:** Strukturen der Aminosäuren, deren substratabhängiger ATP/PPi-Austausch katalysiert durch Histag-LmbC untersucht wurde. Bei allen Substanzen handelte es sich um L- Aminosäuren. Die von der Struktur des PPL abweichenden Strukturmerkmale sind grau gezeichnet.

Bei Betrachtung der Umsatzraten fiel auf, dass beim Substrat PPL schon in der geringsten untersuchten Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  die Umsatzrate über den Zeitraum von 15 min nicht linear zeitabhängig verlief (Abb. 3-10). Da die Umsatzrate bei einer PPL-Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  zumindest über die ersten drei Minuten linear zeitabhängig verlief, wurden für alle vier untersuchten PPL-Konzentrationen nur die ersten drei Minuten der kinetischen Messungen berücksichtigt. In einer separaten Probe wurde die gesamte im Assay eingesetzte Radioaktivität mit 135000 cpm bestimmt, die einer Stoffmenge von 10 nmol Pyrophosphat entsprach. Aus den gemessenen cpm-Werten konnten daher die Konzentrationen des gebildeten Aminoacyladenylats und dessen jeweilige Bildungsgeschwindigkeit berechnet werden (Tab. 3-2). Eine Vergleichsprobe ohne Substrat diente dazu die gemessenen Radioaktivitätswerte um den Wert zu bereinigen, der durch unspezifisch gebundenes [ $^{32}\text{P}$ ]-Pyrophosphat verursacht wurde.





**Abb. 3-10:** His-tag-LmbC katalysierte Anreicherung von [ $^{32}\text{P}$ ] in ATP in Gegenwart von PPL als Substrat in Abhängigkeit von der Zeit und der Substratkonzentration. Im Inset sind die Symbole der jeweiligen Messreihen mit den dazugehörigen Substratkonzentrationen aufgeführt.

**Tab. 3-2:** Zusammenfassung der für die Berechnung kinetischer Daten ( $K_M$ ,  $V_{\max}$  und  $k_{\text{cat}}$ ) von PPL als Substrat notwendigen Messdaten und den daraus berechneten Werten für  $1/[S]$ ,  $V$  und  $1/V$ .

| [S] (PPL)<br>[mM] | $1/[S]$<br>[mM $^{-1}$ ] | $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}^{1)}$<br>[cpm] | $V$<br>[nmol·min $^{-1}$ ] | $1/V$<br>[nmol $^{-1}$ ·min] |
|-------------------|--------------------------|--|----------------------------|------------------------------|
| 0,005             | 200                      | 19297                                      | 0,476                      | 2,10                         |
| 0,010             | 100                      | 27742                                      | 0,687                      | 1,46                         |
| 0,050             | 20                       | 33138                                      | 0,820                      | 1,22                         |
| 0,100             | 10                       | 39952                                      | 0,987                      | 1,01                         |

<sup>1)</sup>gemessene Radioaktivität nach 3 min Inkubationsdauer.

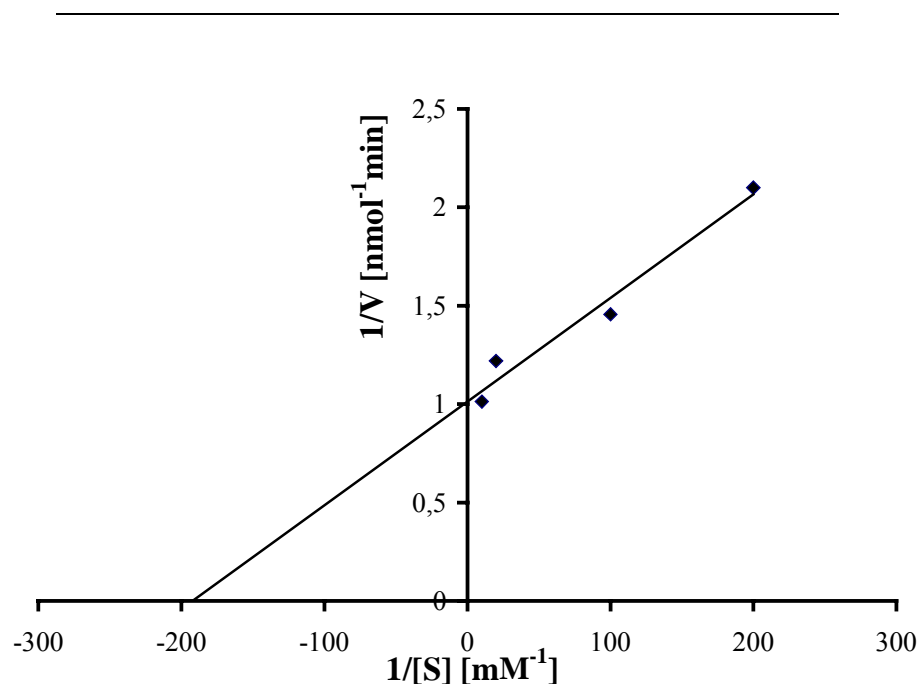
Bei der doppelt-reziproken Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration nach Lineweaver-Burk (Abb. 3-11) wurde für die in Tabelle 3-2 aufgeführten Werte die Geradengleichung:

$$\frac{1}{V} = 5.27 \times 10^{-3} \text{ min} \frac{1}{[S]} + 1.01 \text{ nmol}^{-1} \text{ min}$$

mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.984 berechnet. Aus dem Achsenabschnitt berechnete sich daraus die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\max}$  von  $9.87 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$ . Der Durchtritt der Gerade durch die x-Achse wurde mit  $-192 \text{ mM}^{-1}$  bestimmt, was dem negativen, reziproken Betrag des  $K_M$ -Werts von  $5.2 \mu\text{M}$  entsprach. Die Proteinkonzentration

wurde nach Bradford mit  $85 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  bestimmt, so dass die Konzentration an His-tag-LmbC 152 pmol im Testansatz betrug. Aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit konnte der Wert für  $k_{\text{cat}}$  berechnet werden.

Da von analogen Enzymen bekannt ist, dass nur ein aktives Zentrum vorhanden ist, ergab sich ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $65 \text{ min}^{-1}$ . Dies entsprach einem Substratumsatz bei halber maximaler Substratsättigung von je einem PPL-Molekül pro Enzymmolekül und Sekunde unter der Voraussetzung, dass alle His-tag-LmbC-Moleküle aktiv waren.



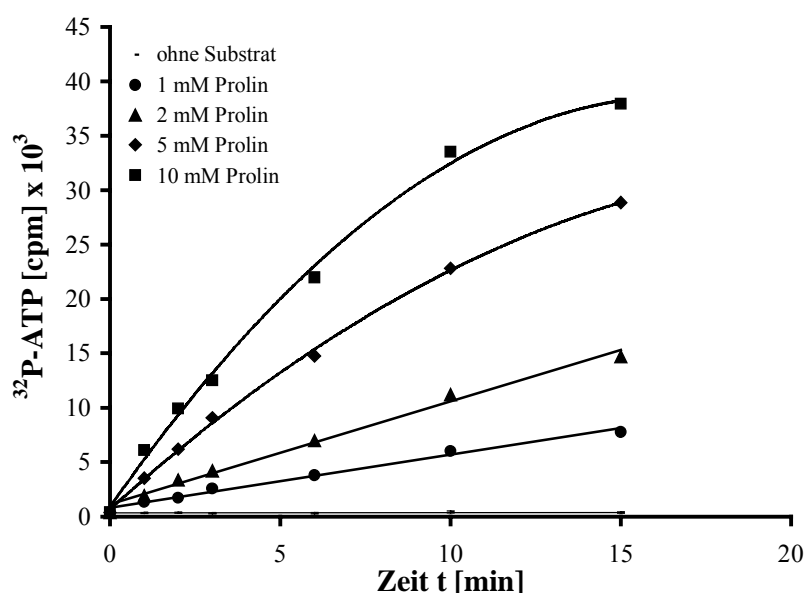
**Abb. 3-11: Lineweaver-Burk Auftragung der ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion in Abhängigkeit von PPL als Substrat.**

Bei L-Prolin war der Umsatz nur für 1 und 2 mM über die 15 min Inkubationsdauer linear zeitabhängig, jedoch nicht für die Konzentrationen von 5 und 10 mM (Abb. 3-12). Daher wurden auch bei Prolin nur die Werte der ersten drei Minuten für die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeiten herangezogen. Bei diesen Assays wurde eine Gesamt-Radioaktivitätsmenge von 119500 cpm pro Assay eingesetzt. Nach drei Minuten Inkubation wurden die in Tabelle 3-3 aufgeführten cpm-Werte für  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  gemessen.

**Tab. 3-3:** Zusammenfassung der für die Berechnung kinetischer Daten ( $K_M$ ,  $V_{max}$  und  $k_{cat}$ ) für verschiedene Konzentrationen L-Prolin bestimmten Messwerte und den daraus berechneten Werten für  $1/[S]$ ,  $V$  und  $1/V$ .

| [S] (Prolin)<br>[mM] | $1/[S]$<br>[mM <sup>-1</sup> ] | $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}^{1)}$<br>[cpm] | $V$<br>[nmol·min <sup>-1</sup> ] | $1/V$<br>[nmol <sup>-1</sup> ·min] |
|----------------------|--------------------------------|--|----------------------------------|------------------------------------|
| 1                    | 1,0                            | 2578                                       | 0,072                            | 13,9                               |
| 2                    | 0,5                            | 4222                                       | 0,118                            | 8,47                               |
| 5                    | 0,2                            | 9073                                       | 0,253                            | 3,95                               |
| 10                   | 0,1                            | 12513                                      | 0,350                            | 2,86                               |

<sup>1)</sup>gemessene Radioaktivität nach 3 min Inkubationsdauer.



**Abb. 3-12:** His-tag-LmbC katalysierte Anreicherung von  $[^{32}\text{P}]$  in ATP in Gegenwart von L-Prolin als Substrat in Abhängigkeit von der Zeit und der Substratkonzentration. Im Inset sind die Symbole der jeweiligen Messreihen mit den dazugehörigen Substratkonzentrationen aufgeführt.

Aus der Lineveaver-Burk-Auftragung (Abb. 3-13) wurde für die in Tabelle 3.3 aufgeführten Werte die Geradengleichung:

$$\frac{1}{V} = 12.4 \text{ min} \frac{1}{[S]} + 1.73 \text{ nmol}^{-1} \text{ min}$$

mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.997 berechnet. Daraus berechnete sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  von  $5.84 \times 10^{-1} \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$ , ein  $K_M$ -Wert von 7.3 mM und die Wechselzahl  $k_{cat}$  für die Adenylierung von L-Prolin von  $3.84 \text{ min}^{-1}$  bei

maximaler Substratsättigung. Vorausgesetzt, dass alle His-tag-LmbC-Moleküle im Assay aktiv waren, entsprach dies der Bildung von einem L-Prolin-AMP alle 16 Sekunden je Enzymmolekül.

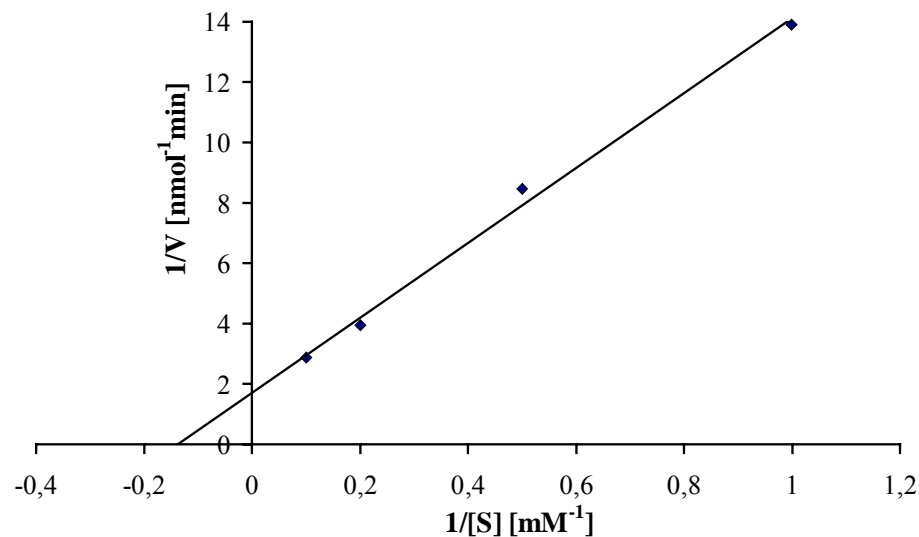


Abb. 3-13: Lineweaver-Burk Auftragung der ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion in Abhängigkeit von L-Prolin als Substrat.

Für Hydroxy-L-prolin war auch bei der höchsten getesteten Substratkonzentration von 10 mM der Verlauf der Umsatzrate über den gesamten Zeitraum linear zeitabhängig, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit aus dem Substratumsatz nach 15 min ermittelt werden konnte (Abb. 3-14).

Nachdem die Reaktionsgeschwindigkeiten der Aminoacyl-AMP-Bildung für das Substrat *trans*-4-Hydroxy-L-prolin, wie in Tabelle 3-4 zusammengefasst, bestimmt wurden, konnten die kinetischen Werte berechnet werden. Aus der Lineweaver-Burk-Auftragung (Abb. 3-15) mit der Geradengleichung:

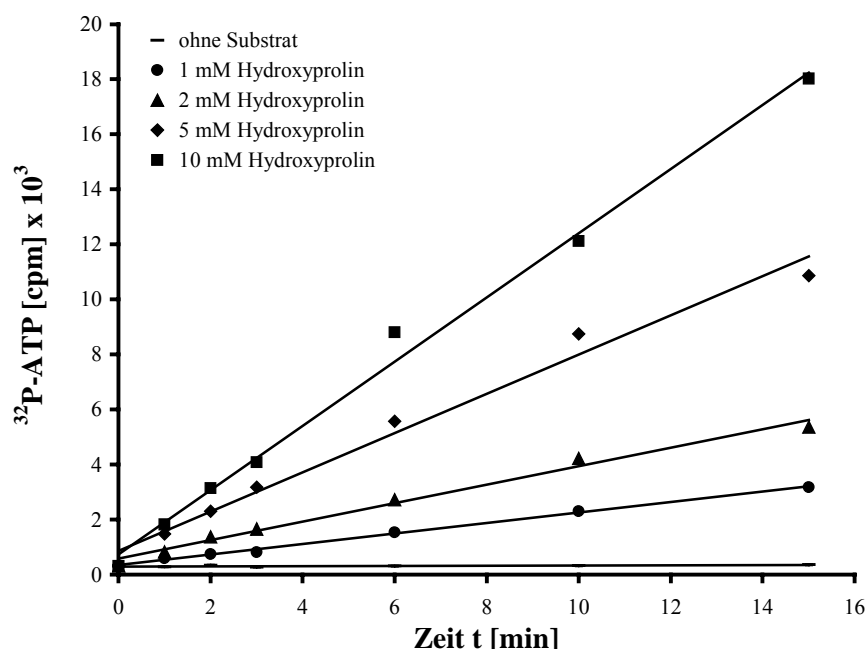
$$\frac{1}{V} = 52,97 \text{ min} \frac{1}{[S]} + 6,26 \text{ nmol}^{-1} \text{ min}$$

und einem Korrelationskoeffizienten von 0,998 berechneten sich die Werte  $K_M$ ,  $V_{\max}$  und  $k_{\text{cat}}$  mit 8,5 mM,  $1,60 \times 10^{-1} \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$  respektive  $1,02 \text{ min}^{-1}$ . Bei *trans*-4-Hydroxy-L-prolin war die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  verglichen mit derjenigen für L-Prolin nochmals geringer. Es wurde nur ein einziges Substratmolekül je Minute zum Hydroxyprolin-Adenylat umgesetzt.

**Tab. 3-4:** Zusammenfassung der für die Berechnung kinetischer Daten ( $K_M$ ,  $V_{max}$  und  $k_{cat}$ ) für die Adenylylierung von *trans*-4-Hydroxy-L-prolin notwendigen Messdaten und den daraus berechneten Werten für  $1/[S]$ ,  $V$  und  $1/V$ .

| [S]<br>(Hydroxyprolin)<br>[mM] | $1/[S]$<br>[mM <sup>-1</sup> ] | $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}^{1)}$<br>[cpm] | $V$<br>[nmol·min <sup>-1</sup> ] | $1/V$<br>[nmol <sup>-1</sup> ·min] |
|--------------------------------|--------------------------------|--|----------------------------------|------------------------------------|
| 1                              | 1,0                            | 3178                                       | $1,71 \times 10^{-2}$            | 58,4                               |
| 2                              | 0,5                            | 5364                                       | $2,89 \times 10^{-2}$            | 34,6                               |
| 5                              | 0,2                            | 10868                                      | $5,85 \times 10^{-2}$            | 17,1                               |
| 10                             | 0,1                            | 18023                                      | $9,71 \times 10^{-2}$            | 10,3                               |

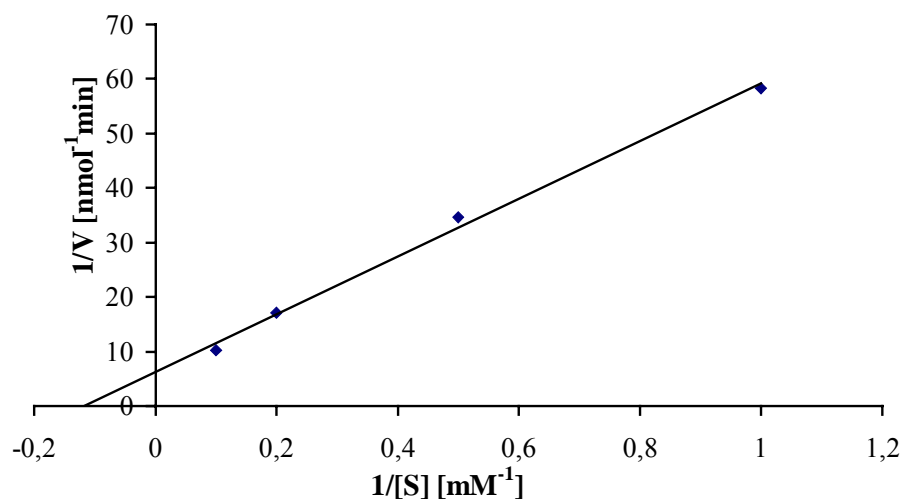
<sup>1)</sup>gemessene Radioaktivität nach 15 min Inkubationsdauer.



**Abb. 3-14:** Auftragung der im  $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  gemessenen Radioaktivitätsmenge mit *trans*-4-Hydroxy-L-prolin als Substrat gegen die Inkubationsdauer in Gegenwart von His-tag-LmbC. In der Legende sind die Symbole der jeweiligen Messreihen mit den dazugehörigen Substratkonzentrationen aufgeführt.

Ein Vergleich der enzymkinetischen Daten der His-tag-LmbC-katalysierten Umsetzung der drei Substrate ist in Tabelle 3-5 zusammengefasst. Dabei wurde PPL 17- bzw. 64-mal schneller umgesetzt als L-Prolin respektive 4-Hydroxy-L-prolin. Aus den kinetischen Daten ergab sich darüber hinaus, dass für PPL die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei einer um mehr als drei Größenordnungen geringeren Substratkonzentration erreicht wurde als für die beiden anderen Aminosäuren. Es wurde daher geschlossen, dass PPL das natürliche

Substrat von His-tag-LmbC ist. Der  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert lag für das Substrat PPL  $2.5 \times 10^4$  fach höher im Vergleich zu L-Prolin und sogar  $1 \times 10^5$  fach höher als bei Hydroxy-L-prolin.



**Abb. 3-15:** Lineweaver-Burk Auftragung für die ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion in Abhängigkeit von *trans*-4-Hydroxy-L-prolin als Substrat.

**Tab. 3-5:** Zusammenfassung der kinetische Daten für den substratabhängigen ATP/PP<sub>i</sub>-Austausch mit PPL, L-Prolin, 4-Hydroxy-L-prolin.

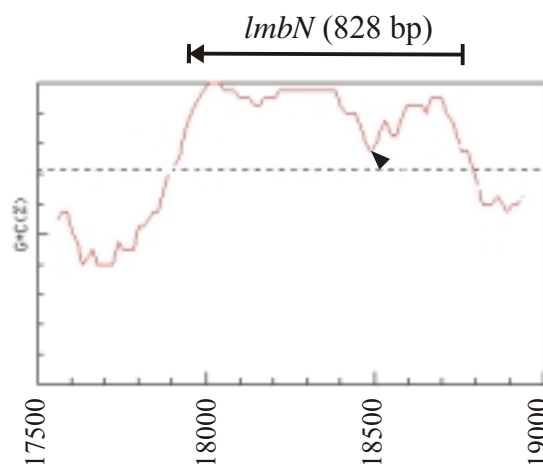
| Substrat           | $V_{\text{max}}$<br>[nmol·min <sup>-1</sup> ] | $K_{\text{M}}$ | $k_{\text{cat}}$<br>[min <sup>-1</sup> ] | $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$<br>[min <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> ] | $C^{1)}$<br>[nkat·mg <sup>-1</sup> ] |
|--------------------|---|----------------|--|---|--------------------------------------|
| PPL                | 9,87  | 5,2 μM         | 65                                       | 12500   | 19,5                                 |
| L-Prolin           | 0,58  | 7,6 mM         | 3,84                                     | 0,51  | 1,2                                  |
| 4-Hydroxy-L-prolin | 0,16  | 8,5 mM         | 1,02                                     | 0,12  | 0,3                                  |

<sup>1)</sup>Spezifische Aktivität  $C$  von His-tag-LmbC.

Für *N*-Methyl-L-leucin konnte die Adenylylierungsreaktion katalysiert durch His-tag-LmbC nicht bestätigt werden, da auch bei der Substratzkonzentration von 10 mM keine Bildung von [<sup>32</sup>P]-ATP nachgewiesen werden konnte.

### 3.4 Das Gen *lmbN*

Vorliegenden Ergebnissen (Peschke *et al.*, 1995 und Arnold, 2000) zufolge, umfasst der offene Leserahmen *lmbN* 828 bp und kodiert für ein Polypeptid einer Länge von 275 Aminosäuren. Der GC-Gehalt über den gesamten Leserahmen wurde mit 71,9 % und an der dritten Position eines jeweiligen Kodons mit durchschnittlich 93,1 % bestimmt, was jeweils einem typischen Wert für Streptomycetengene entsprach. Jedoch nahm nach ca. 250 bp stromabwärts des Genstarts der GC-Gehalt in der dritten Kodonposition deutlich ab, wie aus der Abbildung 3-16 zu entnehmen ist. Die Leserasterverschiebung, auf die dieses Phänomen hindeutete, würde einen vorzeitigen Stopp verursachen, so dass sich ein deutlich verkürztes Protein bilden würde.



**Abb. 3-16:** Darstellung des prozentualen GC-Gehalts in der dritten Kodonposition der DNA-Region um den offenen Leserahmen *lmbN* (Accession Nummer: X79146, Basenpaare 17500-19000) erstellt mit FramePlot 2.3.2. (Ishikawa, 1999). Der Pfeil über der Grafik zeigt die Länge und Orientierung des *lmbN*-Leserahmens an. Die Pfeilspitze in der Grafik markiert die Position (bei ca. 18500) mit ungewöhnlich geringem GC-Gehalt in der dritten Kodonposition.

Weitere Hinweise dafür, dass es sich bei dem annotierten Leserahmen *lmbN*<sub>1-828</sub> um zwei separate Gene handeln könnte, stützten sich im wesentlichen auf die Beobachtung, dass bei der heterologen Expression von *lmbN* durch *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11 ein zweites Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 23 kDa neben dem erwarteten His-tag-LmbN (31 kDa) durch Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE nachzuweisen war (Arnold, 2000).

In der postulierten Lin A-Biosynthese wurde LmbN aufgrund seiner Aminosäure-Sequenzhomologie die Funktion einer Zuckerphosphat-Isomerase zugewiesen (vgl. Abb. 1-3).

Bei BLAST- bzw. FASTA-Sequenzanalysen (Altschul *et al.*, 1990; Pearson und Lipman, 1988) war jedoch aufgefallen, dass LmbN *N*-terminal deutlich länger war als vergleichbare Enzyme. Die 190 Aminosäurereste des Carboxyterminus wiesen eine signifikante Homologie zu Phosphoheptose-Isomerasen des GmhA-Typs (Brooke und Valvano, 1996a u.b) auf (Abb. 3-18). Alle Enzyme dieses Typs besitzen das für Zuckerphosphat-Isomerasen charakteristische Motiv (PF013080), welches über das Pfam-Domänen-Suchprogramm (Bateman *et al.*, 2000) auch in der Sequenz von LmbN identifiziert werden konnte.

Des Weiteren konnte am *N*-Terminus von LmbN, der somit um ca. 85 Aminosäuren gegenüber dem der anderen Isomerasen des GmhA-Typs verlängert war, eine mögliche 4'-Phosphopantethein (4'-Ppant)-Bindestelle (InterPro-Motiv: IPR003230) lokalisiert werden. Die Aminosäuresequenz der 4'-Ppant-Bindestelle, wie sie im LmbN vorkommt, war charakteristisch für D-Alanyl-Carrier-Proteine (Dcp) der Lipoteichonsäure-Biosynthese Gram-positiver Bakterien (Abb. 3-17, vgl. Abb. 3-18) und unterschied sich geringfügig von der aus Acyl- (ACP), Aryl-(ArCP) oder Peptidyl-Carrierproteinen (PCP) des Primär- bzw. Sekundärmetabolismus.

---

|                    |   |                |    |                |     |      |          |      |
|--------------------|---|----------------|----|----------------|-----|------|----------|------|
| Konsensus ACP/PCP: | D | x              | FF | x <sub>2</sub> | LGG | (HD) | <u>S</u> | (LI) |
| Konsensus Dcp:     | D | x <sub>2</sub> | LF | EX             | GLL | D    | <u>S</u> | x    |

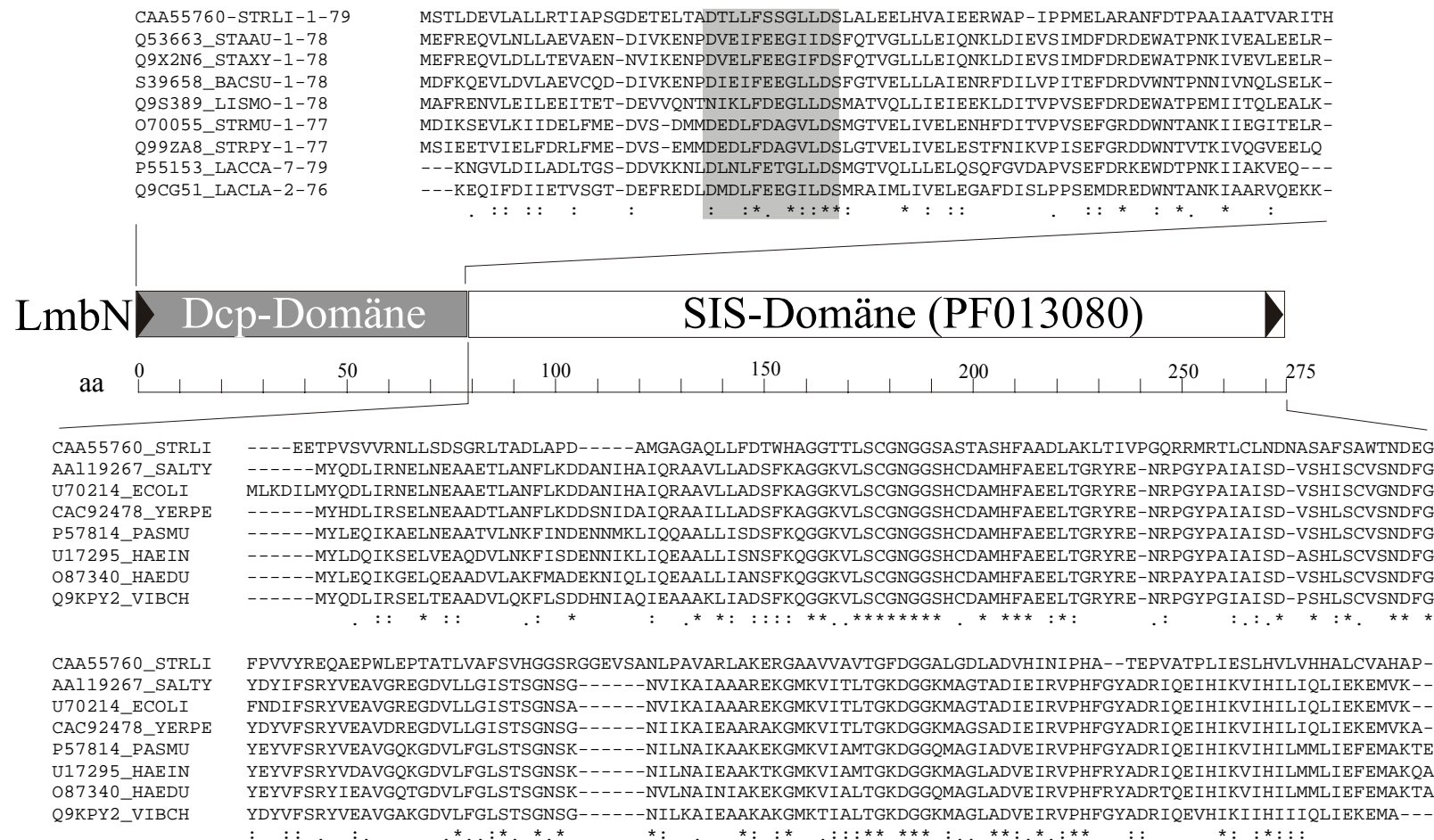
**Abb. 3-17:** Vergleich der 4'-Ppant-Bindestellen von ACPs/PCPs (Marahiel *et al.*, 1997); und Dcps (Volkman *et al.*, 2001). Das Serin (unterstrichen) wird posttranslational mit 4'-Ppant aus CoA modifiziert.

---

Ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass die Domäne am *N*-Terminus durch einen separaten Leserahmen kodiert sein könnte, war dadurch gegeben, dass es sich bei den D-Alanyl-Carrierproteinen um kleine und vor allem eigenständige Enzyme der Länge von ca. 80 Aminosäureresten handelt.

Es wurde daher überprüft, ob es sich bei der ursprünglich als *lmbN*<sub>1-828</sub> bestimmten Sequenz tatsächlich um zwei offene Leserahmen handelte.





**Abb. 3-18: Domänenstruktur von LmbN.** Oberhalb der schematischen Darstellung der beiden Domänen von LmbN ist das Alignment der D-Alanyl-Carrierproteine mit den ersten 79 Aminosäuren von LmbN (LmbPCP) abgebildet. Accession Nummern: Q53663, *Staphylococcus aureus* Dcp; Q9X2N6, *Staphylococcus xylosus* Dcp; Q9S389, *Listeria monocytogenes* Dcp; S39658, *Bacillus subtilis* Dcp; O70055, *Streptococcus mutans* GLG3; Q99ZA8, *Str. pyogenes* GLG3; P55153, *Lactobacillus casei* Dcp; Q9CG51, *Lactobacillus lactis* Dcp. Die graue Schattierung markiert das konservierte Sequenzmotiv um den Serinrest, an den das 4'-Ppant posttranslational gebunden wird. Unterhalb ist das Alignment der Phosphoheptose-Isomerasen (EC 5.-.-.) mit dem C-Terminus von LmbN (aa 80-275) dargestellt. AAL19267, *Salmonella typhimurium* GmhA; U70214, *E. coli* Yaffl; CAC92478, *Yersinia pestis* GmhA; P57814, *Pasteurella multocida* GmhA; U17295, *Haemophilus influenza* Isn; O87340, *Haemophilus ducreyi* GmhA; Q9KPY2, *Vibrio cholerae* GmhA.

### 3.4.1 Sequenzüberprüfung des Gens *lmbN*

Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten war davon auszugehen, dass das Gen *lmbN* für zwei funktionell ganz verschiedene und sonst nicht in einem Protein vereinigte Domänen kodierte. Daher lag nicht auf der Hand, ob der Leserahmen nur aufgrund eines Sequenzierungsfehlers zu einer nur scheinbar vorhandenen Domänenfusion führte. Der Klon pAAW9.1 wurde bereits mit Cy5-markierten Primern sequenziert (s. Kap. 2.7.7). Die Sequenzierungsergebnisse zeigten dabei eine Unsicherheit zwischen den Basenpositionen 244 und 245, wo ein zusätzliches Cytosin nicht auszuschließen war (Arnold, 2000). Die durch die zusätzliche Base hervorgerufene Leserasterverschiebung würde dann ein Stoppkodon nach 252 bp generieren. Die Sequenzierung mit Cy5-markierten Didesoxynucleotiden (s. Kap. 2.7.8) neu isolierter Klone aus chromosomaler Wildtyp-DNA sollte die Sequenz im Bereich des verringerten GC-Gehalts in der dritten Kodonposition (vgl. Abb. 3-16) aufklären.

Es wurden drei voneinander unabhängige Klone pMHW33.1-3 mit dem Primerpaar MHS1/MHS2 (vgl. Tab. 2-3) durch Amplifikation chromosomaler DNA von *S. lincolnensis* NRRL 2936 erzeugt. Das aus der PCR resultierende 296 bp große DNA-Fragment des 5'-Endes von *lmbN* wurde mit *HincII*-hydrolysiertem pUC18 ligiert, und drei der erhaltenen Klone wurden jeweils doppelsträngig sequenziert. Alle untersuchten pMHW33-Klone wiesen eine identische Sequenz auf, die an der fraglichen Position (zwischen bp 244 u. 245) kein zusätzliches Cytosin besaß, so dass es sich nach dem Ergebnis der Sequenzierung bei *lmbN*<sub>1-828</sub> um einen kontinuierlichen Leserahmen handelte.

### 3.4.2 Ist LmbN ein bifunktionelles Enzym?

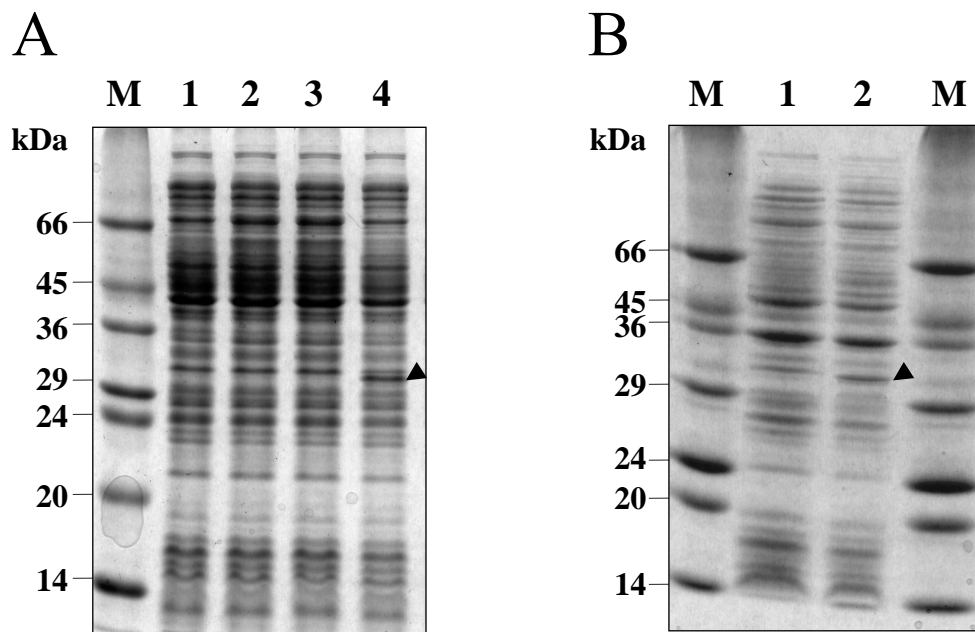
Trotz des Ergebnisses der Sequenzierung musste noch geklärt werden, ob LmbN nicht posttranslational durch eine Streptomyceten-spezifische Protease zwischen den zwei Domänen hydrolysiert wurde. Dazu wurde die Expression des Klons *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11 näher untersucht. Beim Versuch, His-tag-LmbN heterolog in *S. lividans* zu produzieren, kam es zur Produktion eines zweiten, kleineren Polypeptids (ca. 23 kDa), das bei der Überproduktion in *E. coli* Wirtssystemen nicht beobachtet worden war (Arnold, 2000).

Bei den Versuchen, die Produktion der 23 kDa-Komponente zu reproduzieren, wurden die Anzuchtbedingungen hinsichtlich des Mediums, des Zeitpunkts der Induktion und der Zellernte variiert. Eine zusätzliche 23 kDa-Proteinbande konnte jedoch in keinem Expressionsversuch im Vergleich zur Vektor-Kontrolle *S. lividans* 66 1326/pIJ6021

nachgewiesen werden.

Stattdessen erbrachte die Überproduktion von His-tag-LmbN in *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11 nach der Induktion (36 h) eine zusätzliche Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht für His-tag-LmbN (31 kDa) im Vergleich zum Extrakt der Vektor-Kontrolle *S. lividans* 66 1326/pIJ6021 (Abb. 3-19 A; Abb. 3-21/1-4).

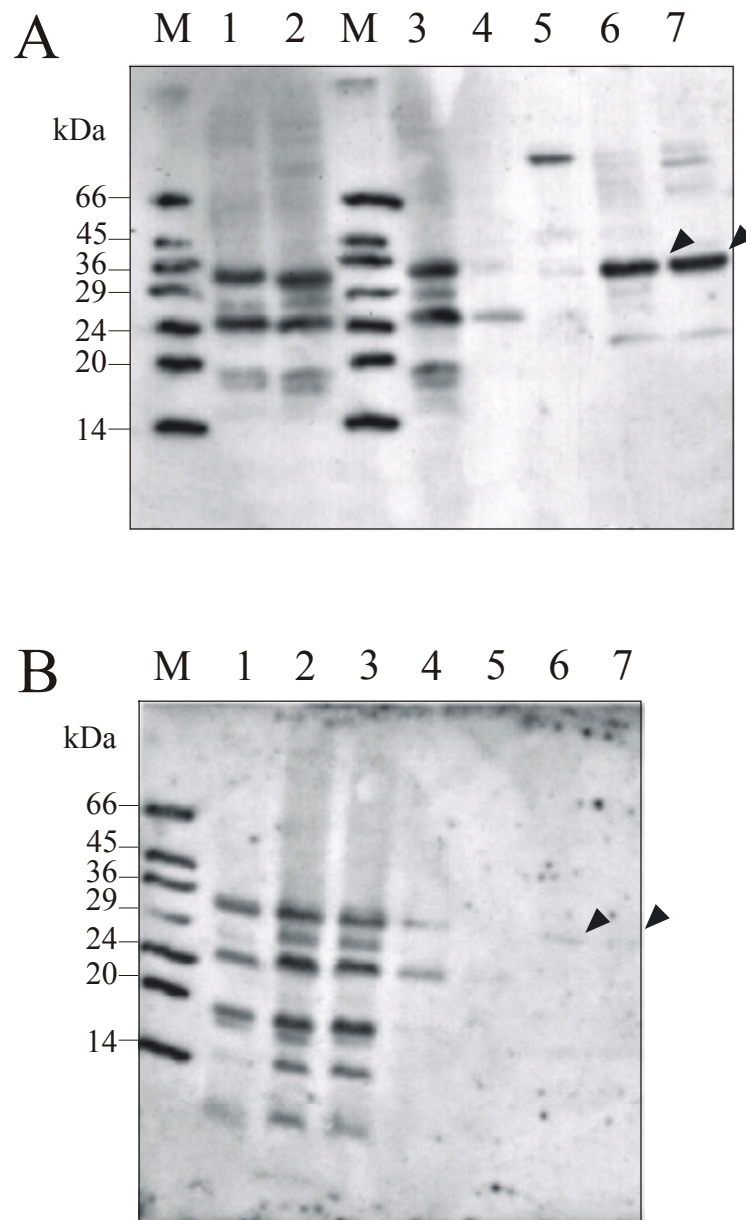
Da die Ausprägung der putativen Carrierprotein- bzw. Isomerase-Funktion von LmbN nicht durch Enzymassays bestätigt werden konnte, wurden die Extrakte in einer Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose fraktioniert. Die jeweiligen Fraktionen der Elution wurden einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend in einer Western-Blot Analyse mit anti-Penta-His-Antikörpern untersucht, um die Produktion eindeutig nachzuweisen.



**Abb. 3-19: SDS-PAGE zur Überprüfung der Produktion von LmbN in *S. lividans* u. *E. coli*.** (A) Coomassie-gefärbtes, 12,5%iges PAA-Gel. Es wurden ca. 40 µg Protein je Spur aufgetragen. (1) S30-Extrakt *S. lividans* 66 1326/pIJ6021; (2)-(4), *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11 induziert mit 10 µg·l<sup>-1</sup> Thioestrepton 12, 20 und 36 h nach Inokulation. (B) Coomassie-gefärbtes, 12,5%iges PAA-Gel. Es wurden ca. 30 µg Protein je Spur aufgetragen. (1) S30-Extrakt *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET20a; (2) *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pMHW32; (M) Dalton Mark VII Protein-Molekulargewichtsmarker.

Die Analyse des Western-Blots (Abb. 3-20 A u. B) zeigte nur bei Fraktionen des Überexpressionsklons *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11 die Anreicherung eines Proteins, die mit einem Molekulargewicht von 31 kDa dem His-tag-LmbN entsprach und sich mit anti-Penta-His-Antikörpern nachweisen ließ. Das Protein war zudem stark an die Ni<sup>2+</sup>-NTA

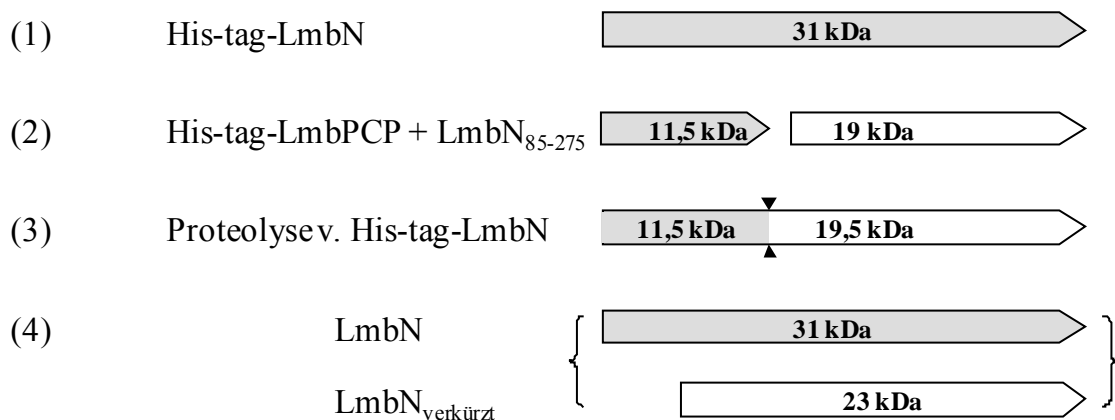
Agarose gebunden und konnte erst mit einer Imidazol-Konzentration von 250 mM in der Pufferlösung eluiert werden.



**Abb. 3-20: Western-Blot Analyse der Expression von His-tag-LmbN in *S. lividans*.** (A) Die Spuren enthielten: (1) S30-Extrakt von *S. lividans* 66 1326/pIJ6021, (2) S30-Extrakt von *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11, (3) Fraktion nicht-gebundener Proteine bei 20 mM Imidazol. Fraktion bei 40 mM (4), bei 100 mM (5), bei 250 mM (6) und bei 500 mM Imidazol (7) im Elutionspuffer. (M) Dalton Mark VII Protein-Molekulargewichtsmarker. Die Pfeilspitzen markieren His-tag-LmbN. (B), Western-Blot der Kontrolle. (1) u. (2) S30-Extrakt, (3)-(7) Fraktion der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie entsprechend (A) aus *S. lividans* 66 1326/pIJ6021-Extrakten. Die Pfeilspitzen markieren die gleichen Positionen (in A).

Aus dem S30-Extrakt des Kontrollstamms *S. lividans* 66 1326/pIJ6021, der ebenso auf die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule gegeben und mit denselben Elutionspuffern eluiert wurde, konnte kein Protein mit dem Molekulargewicht von 31 kDa angereichert werden. (vgl. Abb. 3-20 B). Die Gelspuren der zellfreien Extrakte aus *S. lividans* 66 1326/pIJ6021 bzw. pAAW9.11 und die jeweiligen Fraktionen der nicht-gebundenen Proteine der Affinitätschromatographie zeigten in der Western-Blot-Analyse ein nahezu identisches Bandenmuster (vgl. Abb. 3-20 A und B, Spur: 1-3). Bei ca. 19, 25 und 32 kDa waren in allen oben genannten Spuren dominante Banden zu sehen. In der Spur mit dem *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11-Extrakt war die Bande bei 32 kDa jedoch etwas intensiver und leicht zu einem geringeren Molekulargewicht verschoben. Daraus wurde geschlossen, dass das His-tag-LmbN des verwendeten Klons nur relativ schwach produziert worden war und sich unter der Bande mit dem Molekulargewicht von 32 kDa verborgen hatte. Das Fusionsprotein ließ sich jedoch gut an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose anreichern.

Die dominanten Banden bei 19, 25 und etwa 32 kDa in den S30-Extrakten und den Fraktionen der nicht-gebundenen Proteine auf beiden Western-Blots (vgl. Abb. 3-20 A u. B) wurde offensichtlich durch unspezifische Kreuzreaktion mit den anti-Penta-His-Antikörpern hervorgerufen, da sie in den Extrakten des Expressionsklons gleichermaßen zu beobachten waren wie in denjenigen des Kontrollstamms. Ein weiteres Penta-His-haltiges Polypeptid mit etwa 11,5 kDa, wie es bei zwei separaten Genen bzw. bei proteolytischer Abspaltung des Carrierproteins zu erwarten gewesen wäre (vgl. Abb. 3-20, Spur 2 u. 3; Abb. 3-21), tauchte nicht auf.



**Abb. 3-21:** Schematische Darstellung der hypothetischen in einer SDS-PAGE bzw. im Western-Blot nachweisbaren Proteine. Grau schattierte Polypeptide sind mit anti-Penta-His-Antikörpern nachweisbar.

Es erschien daher nach den Ergebnissen der Expressionsversuche als ausgeschlossen, dass das (PCP-) LmbN-Protein posttranslational gespalten wurde (vgl. Abb. 3-19 A u. Abb. 3-21/3). Auch die Produktion des früher in Extrakten von *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11 beobachteten Proteins von 23 kDa (Arnold, 2000; vgl. Abb. 3-21/4), welches durch einen alternativen Genstart erklärt worden war, konnte nicht beobachtet werden. Somit sprach alles dafür, dass LmbN ein typisches bifunktionelles Fusionsprotein und möglicherweise an zwei verschiedenen Biosyntheseschritten beteiligt ist.

Die Carrierprotein-Funktion, die zuvor im Biosynthesecluster noch unentdeckt war (Peschke *et al.*, 1995), sollte daraufhin näher untersucht werden. Für eine Kondensationsreaktion nach dem postulierten NRPS-ähnlichen Mechanismus (vgl. Abb. 1-5) zwischen PPL und MTL ist ein solches Überträgerprotein (LmbPCP) mit der prosthetischen Gruppe 4'-Ppant zwingend notwendig.

Da anfänglich noch keine *lmbN*-Deletions-Mutante vorlag, wurde versucht, diese Enzymfunktion in *in vitro* Enzymansätzen nachzuweisen. Zu diesem Zweck sollte das Protein zum einen in seiner natürlichen Form (LmbN) und zum anderen nur die putative Carrierprotein-Domäne (LmbPCP) überproduziert und angereichert werden.

### 3.4.3 Expression von *lmbN*

In den vorliegenden Klonen *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11 und *E. coli* JM109/pAAW9.22 (Arnold, 2000) lag *lmbN*<sub>1-828</sub> bereits isoliert und kloniert vor. Zudem wurde LmbN mit Hilfe beider Klone bereits heterolog produziert, so dass diese auch für die weiteren Überproduktionsversuche herangezogen wurden.

#### 3.4.3.1 Expression von *lmbN* in *E. coli*

Bei der Produktion von LmbN in *E. coli* JM109/pAAW9.22 stand *lmbN* unter der Kontrolle des Rhamnose-induzierbaren Promotors P<sub>rhaABD</sub>. Nachdem die Kulturen unter Standardbedingungen angezogen wurden, ließ sich keine Produktion des nativen LmbN-Proteins in den zellfreien Extrakten in einer SDS-PAGE nachweisen, woraufhin ein Klon konstruiert wurde, durch den LmbN mit Hilfe des T7-Expressionssystems mit einem C-terminalen His-tag fusioniert produziert wurde.

Dazu wurde *lmbN* mit dem Primerpaar MH27/MH30 (vgl. Tab. 2-3) von chromosomaler Wildtyp-DNA amplifiziert und in einen *NdeI/SstI*-hydrolysierten pUCPU21 ligiert, was zum

Plasmid pMHW31 führte. Das ca. 0,8 kb große DNA-Fragment wurde anschließend in einen entsprechend vorbereiteten pET20a-Vektor kloniert, wodurch das Plasmid pMHW32 entstand.

Im zellfreien Extrakt des Expressionsklons *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pMHW32, der zur Produktion von LmbN-His-tag herangezogen wurde, konnte ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 31 kDa auf einer SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 3-19 B). In der Gelspur des zellfreien Extrakts des Kontrollstamms *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pET20a konnte dieses Protein nicht beobachtet werden.

#### 3.4.3.2 Expression von *lmbN* in *S. lividans*

Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, konnte mit dem rekombinanten Klon *S. lividans* 66 1326/pAAW9.11 lösliches His-tag-LmbN für *in vitro* Enzymtests überproduziert und angereichert werden.

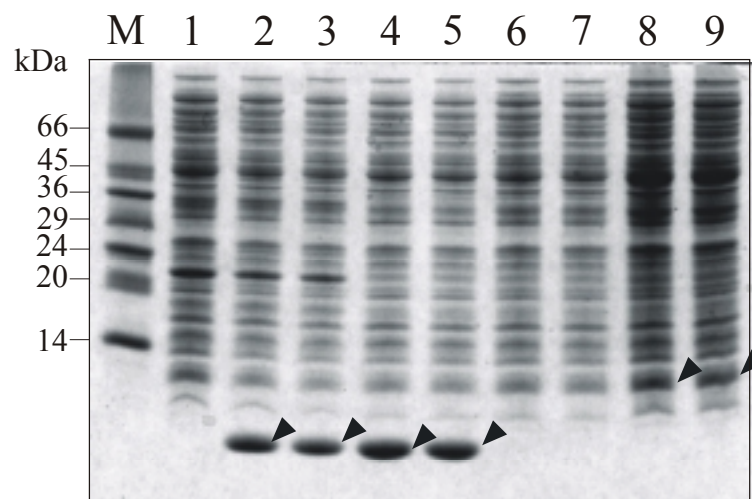
#### 3.4.4 Expression von *lmbPCP*

Die möglicherweise für die Carrierprotein-Funktion im postulierten Mechanismus der Kondensationsreaktion verantwortliche Domäne LmbPCP (kodiert durch *lmbN*<sub>1-237</sub>) sollte separat von der Zuckerphosphat-Isomerase-Domäne heterolog überproduziert werden, um die Funktion *in vitro* nachzuweisen. Zuerst wurde aus chromosomaler DNA des Wildtyp-Lin A-Produzenten das Carrierprotein-kodierende Fragment amplifiziert. Das in der PCR verwendete Primerpaar MH22/MH23 (vgl. Tab. 2-3) generierte eine *NdeI*-Schnittstelle am Genstart, und durch die Einführung der *BclI*-Schnittstelle wurde der Leserahmen durch ein neues Stoppcodon auf 237 bp verkürzt. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BclI* hydrolysiert und in entsprechend vorbereitete Vektorplasmide kloniert. Durch Ligation mit dem Vektor pUCPU21 entstand das Plasmid pMHW41, und mit den Vektoren pET11a und pET16b entstanden die Expressionsplasmide pMHW42 bzw. pMHW43. Die Sequenz des PCR-Produkts wurde anhand der Sequenzierung von pMHW41 überprüft.

Die Plasmide pMHW42 und pMHW43 wurden zur Produktion der Carrierprotein-Domäne in *E. coli*-Wirtsstämmen BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS transformiert und jeweils bei Standardbedingungen angezogen. In beiden *E. coli*-Wirtsstämmen fiel auf, dass das native

Protein sehr stark überproduziert wurde (Abb. 3-22). Das His-tag-Fusionsprotein hingegen wurde nur schwach überproduziert und konnte im Coomassie-gefärbten PAA-Gel im Vergleich zur Kontrolle nicht nachgewiesen werden. Es konnte jedoch aus zellfreien Extrakten von *E. coli* BL21(DE3)/pMHW43 durch Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose angereichert werden (Abb. 3-24 A-C).

Bei der Positionierung des vorzeitigen Genstopps in den *lmbN*-Leserahmen wurde die Sekundärstruktur der Carrier-Domäne im Vergleich zu anderen Carrierproteinen des Dcp-Typs berücksichtigt. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe des PHDsec-Algorithmus (Rost und Sander, 1993) die Sekundärstruktur der Proteine berechnet. Die Tertiärstruktur des apo-D-Alanyl-Carrier Proteins aus *Lactobacillus casei* war von Volkman *et al.* (2001; PDB-Eintrag: 1DV5) durch NMR-Experimente aufgeklärt worden. Alle D-Alanyl-Carrierproteine, die in Abbildung 3-23 verglichen wurden, besitzen C-terminal eine dritte bzw. vierte  $\alpha$ -Helix, die sowohl in der Länge als auch in ihrer Position in dieser Enzymfamilie wenig variiert. Das Stoppkodon wurde dementsprechend so im Leserahmen von *lmbN* positioniert, dass auch die  $\alpha$ -Helix im verkürzten Protein (LmbPCP) komplett kodiert wurde.



**Abb. 3-22: SDS-PAGE zur *lmbPCP*-Expressionskontrolle in *E. coli*.** Coomassie-gefärbtes 10%iges PAA-Gel (nach Schagger u. von Jagov) Die Spuren enthielten: (1) *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET11a; (2)/(3) *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pMHW42; (4)/(5), *E. coli* BL21(DE3)pMHW42; (6)/(7), *E. coli* BL21(DE3)pMHW43; (8)/(9), *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pMHW43; (M) Dalton Mark VII Protein-Molekulargewichtsmarker (Sigma).

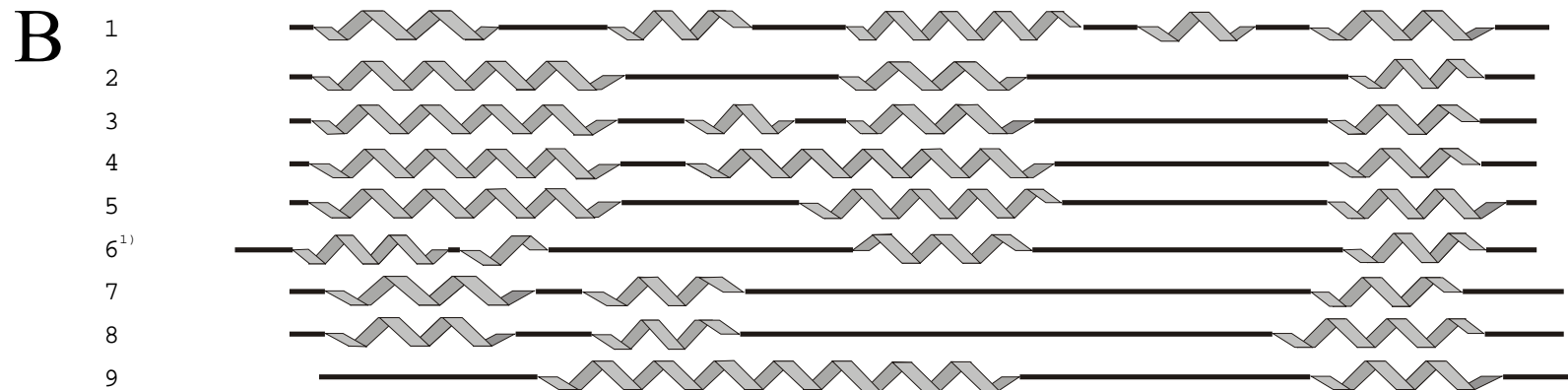


**A**

```

1  ---MSTLDEVLALLRTIAPSGDETELTA D T L L F S S G L L D S L A L E E L H V A I E E R W - A P I P P M E L A R A N F D T P A A I A A T V A R I T H ---
2  ---MEFREQVLNLLAEVA-EN D I V K E N P D V E I F E E G I I D S F Q T V G L L L E I Q N K L D I E V S I M D F D R D E W A T P N K I V E A L E E L R ---
3  ---MEFREQVLDLLTEVA-EN N V I K E N P D V E L F E E G I F D S F Q T V G L L L E I Q N K L D I E V S I M D F D R D E W A T P N K I V E V L E E L R ---
4  ---MDFKQEVLDVLA E V C - Q D D I V K E N P D I E I F E E G L L D S F G T V E L L L A I E N R F D I L V P I T E F D R D V W N T P N N I V N Q L S E L K ---
5  ---MAFREN V L E I L E E I T - E T D E V V Q N T N I K L F D E G L L D S M A T V Q L L I E I E E K L D I T V P V S E F D R D E W A T P E M I I T Q L E A L K ---
6  MADEAIKNGVLDILADLT-GSDDVKKNLDLNLFETGLLDSMGTVQLLLELQSQFGVDAPVSEFDRKEWDTPNKIIAKVEQAQ---
7  ---MSIEETVIELFDRLF-MED-VSEMMDEDLFDAGVLDLSLGTVELIVELESTFNKVPISEFGRDDWNTVTKIVQGVEELQHA-
8  ---MDIKSEVLKIIDELF-MED-VSDMMDEDLFDAGVLDSMGTVELIVELENHFDITVPVSEFGRDDWNTANKIIEGITELRNA-
9  ----MKEQIFDIIETVS-GTDEFREDLDMDLFEEGILDSMRAIMLIVELEGAFDISLPPSEMDREDWNTANKIAARVQEKKDEN
      .  ::  ::  :      :      :      : * . * : : * * * * * * : : : .  :: * : * * :

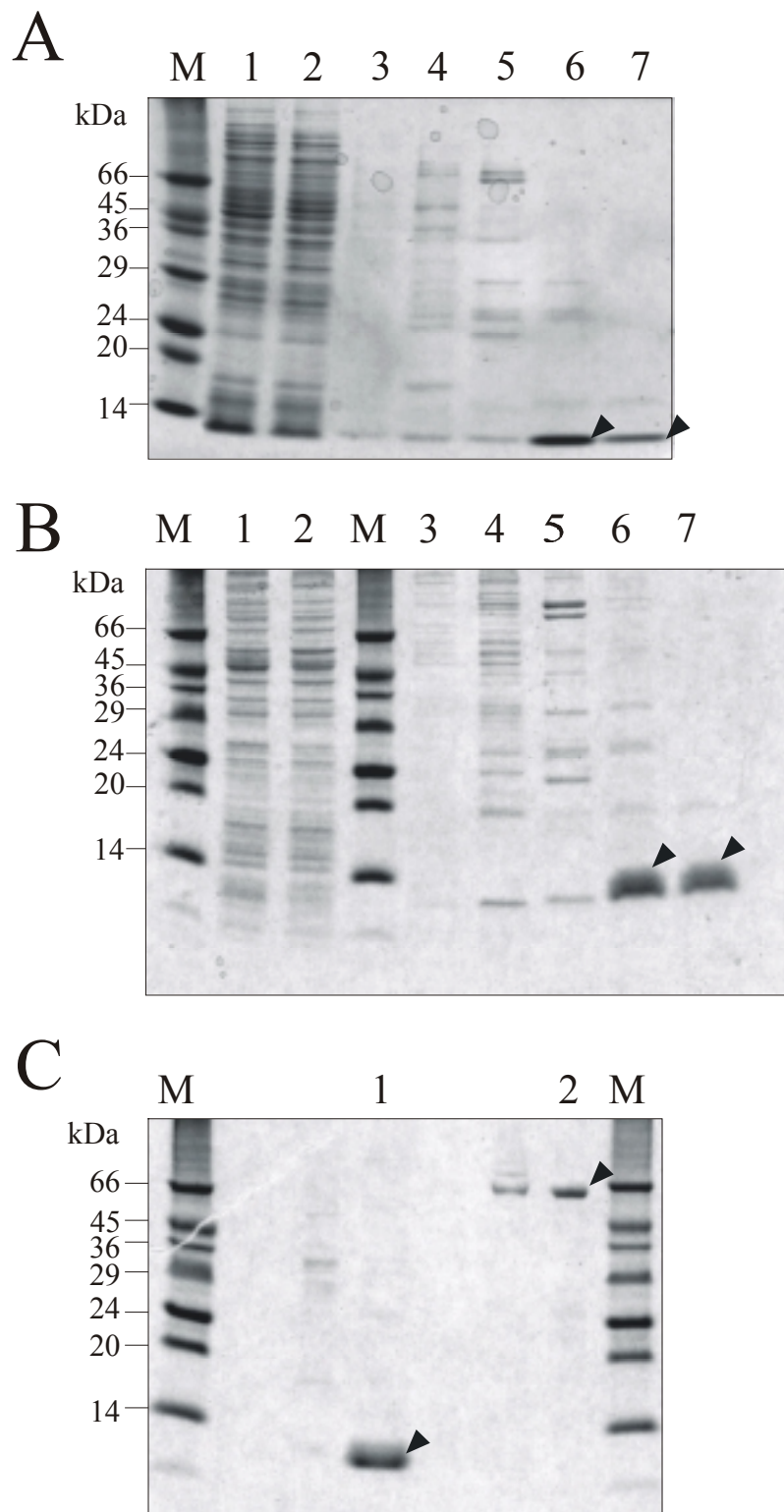
```



**Abb. 3-23: Vergleich der Primär- und Sekundärstruktur der putativen Carrierprotein-Domäne am N-Terminus von LmbN mit D-Alanyl-Carrierproteinen aus verschiedenen Gram-positiven Bakterien.**

(A) ClustalX-Alignment von (1) LmbPCP mit Dcp-Carrierproteinen aus (2) *Staph. aureus* ssp. aureus N<sup>1</sup>, (3) *Staph. xylosus*, (4) *B. subtilis*, (5) *Listeria monocytogenes*, (6) *Lactobacillus casei*, (7) *Streptococcus pyogenes*, (8) *Str. mutans*, (9) *Lac. lactis* ssp. lactis. (B) Vergleich der Sekundärstrukturen der Proteine aus A nach PHD<sub>sec</sub> (Rost u. Sander, 1993). Die schematische Darstellung Sekundärstruktur der Proteine ist am Alignment in A ausgerichtet.

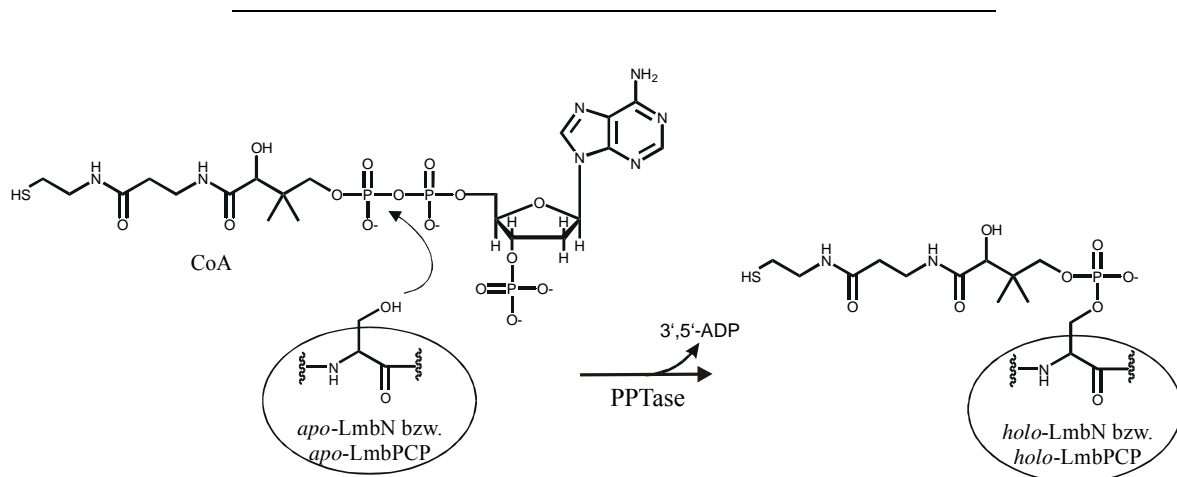
<sup>1)</sup> Die Sekundärstruktur des Dcp-Proteins aus *Lac. casei* basiert auf NMR-Daten (Volkman *et al.*, 2001).



**Abb. 3-24:** SDS-PAGE Analyse der Anreicherung von His-tag-LmbPCP mit Hilfe von  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pMHW43 Kulturen. (A) Coomassie-gefärbtes 12,5%iges SDS-PAA Gel nach Laemmli. Zellfreie Extrakte von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pMHW43 (1) und pET16b (2); Fraktionen der Elution mit: 20 mM (3), 40 mM (4), 100 mM (5), 250 mM (6) und 500 mM (7) Imidazol im Elutionspuffer. (B) Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-PAA Gel nach Schagger u. von Jagov. (1)-(7) s. (A). (C) Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-PAA Gel nach Schagger u. von Jagov. (1) Angereichertes His-tag-LmbPCP nach Gelfiltration an Sephacryl S-100 HR u. (2) angereichertes His-tag-LmbC. (M) Dalton Mark VII Protein-Molekulargewichtsmarker. Durch die Pfeilspitzen werden jeweils die angereicherten Proteine markiert.

### 3.4.4.1 Posttranslationale Modifikation von His-tag-LmbN und His-tag-LmbPCP mit [<sup>3</sup>H]-4'-Ppant

Für die Funktionsaufklärung war entscheidend zu wissen, ob die Carrierprotein-Domäne in LmbN/LmbPCP tatsächlich posttranslational mit 4'-Ppant modifiziert werden kann. Nur durch diese prosthetische Gruppe wäre das Protein in der Lage, das als Aminoacyl-AMP-aktivierte PPL in Form eines Thioesters zu binden.



**Abb. 3-25:** Mechanismus der durch PPTasen katalysierten posttranslationalen Modifikation der *apo*-Form von LmbN bzw. LmbPCP zur *holo*-Form.

Die Konversion der inaktiven *apo*-Form in die aktive *holo*-Form wurde in einem Assay mit [<sup>3</sup>H]-CoA und den 4'-Phosphopantethein-Transferasen (PPTasen) AcpS und Sfp (Lambalot *et al.*, 1996) durchgeführt (Abb. 3-25). AcpS (*B. subtilis*), welches in der Fettsäure-Biosynthese (Lambalot und Walsh, 1995) ACP-Proteine modifiziert, wurde eingesetzt, da bekannt war, dass es in der Lage ist, auch D-Alanyl-Carrier-Proteine zu modifizieren. Und das die PCP-Domänen der Surfactin-Biosyntheseproteine phosphopantetheinylierende Sfp aus *B. subtilis* wurde in den Assays verwendet, weil es die Synthese der *holo*-Form von Carrierproteinen des ACP-, ArCP- und PCP-Typs eines sehr breiten Substratspektrums katalysiert (Lambalot *et al.*, 1996).

In den Enzymansätzen wurde sowohl His-tag-LmbN als auch His-tag-LmbPCP alternativ eingesetzt. Als Positivkontrolle diente jeweils *apo*-ACP aus der Fettsäure-Biosynthese von *B. subtilis*, welches mit Hilfe beider PPTasen modifiziert werden konnte (Mootz *et al.*, 2001; Tab. 3-6).

Wurde His-tag-LmbN in Gegenwart von AcpS oder Sfp mit [<sup>3</sup>H]-CoA inkubiert, so ergab sich

kein Unterschied in der an Protein gebundenen Radioaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle, die ohne Zugabe einer PPTase durchgeführt wurde. Für His-tag-LmbN konnte somit eine posttranslationale Modifikation durch keine der beiden verwendeten PPTasen erzielt werden. Die messbare Protein-gebundene Radioaktivität war unabhängig davon, ob dem Testansatz eine PPTase hinzugegeben wurde, und sie konnte auch nicht durch Erhöhung der eingesetzten His-tag-LmbN Enzymmenge gesteigert werden. Bei der gemessenen Radioaktivität konnte es sich demnach nur um eine unspezifische Bindung zwischen [<sup>3</sup>H]-CoA und His-tag-LmbN gehandelt haben.

Durch Zugabe der PPTase Sfp konnte auch für LmbPCP keine Phosphopantetheinylierung nachgewiesen werden. Mit AcpS jedoch konnte die durch posttranslationale Modifikation von LmbPCP nachweisbare Radioaktivität deutlich über den Wert der Negativkontrolle angehoben werden. Die an LmbPCP gebundene Radioaktivität entsprach dabei, relativ zur eingesetzten Proteinmenge von 50 pmol je Ansatz, ca. 8% der ACP-gebundenen Radioaktivität. Dies gilt unter der Annahme, dass das *apo*-ACP unter den gewählten Reaktionsbedingungen zu 100% zu *holo*-ACP modifiziert worden war. Die Ergebnisse der Szintillationsmessungen sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst.

Dieses Ergebnis ließ sich wie folgt interpretieren: Da AcpS auch während der Expression in *E. coli* im Cytosol zugegen war, wurde das His-tag-LmbPCP bereits während der Expression in die *holo*-Form überführt, so dass lediglich ein Bruchteil der eingesetzten Proteinmenge überhaupt in Form von *apo*-His-tag-LmbPCP vorlag und noch phosphopantetheinyliert werden konnte.

**Tab. 3-6:** Absolute, Protein-gebundene Radioaktivität durch posttranslationale Modifikation mit [<sup>3</sup>H]-Ppant katalysiert durch AcpS bzw. Sfp.

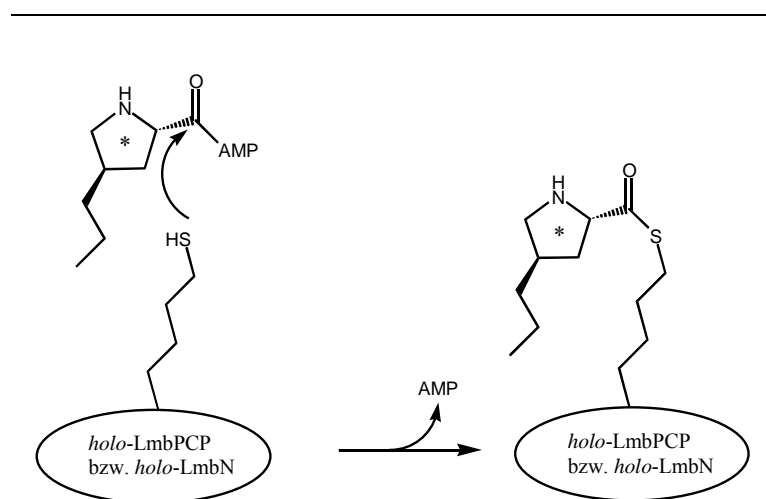
| Protein                               | + AcpS <sup>2)</sup> ( <i>B. subtilis</i> ) | + Sfp <sup>3)</sup> ( <i>B. subtilis</i> ) | – PPTase |
|---------------------------------------|---|--|----------|
| <i>apo</i> -His-tag-ACP <sup>1)</sup> | 94306 dpm                                   | 35143 dpm                                  | 795 dpm  |
| His-tag-LmbN                          | 929 dpm                                     | 743 dpm                                    | 1197 dpm |
| His-tag-LmbPCP                        | 7468 dpm                                    | 1460 dpm                                   | 1437 dpm |

Es wurden jeweils drei Messungen unterschiedlicher Enzymsätze durchgeführt. <sup>1)</sup> gereinigtes *apo*-His-tag-ACP u. <sup>2)</sup> His-tag-AcpS (R. Finking). <sup>3)</sup> gereinigtes His-tag-Sfp (M. Mofid)

### 3.4.5 Beladung von His-tag-LmbN und His-tag-LmbPCP mit [<sup>3</sup>H(U)]-PPL

Nachdem aus den Ergebnissen der Experimente zur posttranslationalen Modifikation nicht auszuschließen war, dass LmbN und LmbPCP schon während der Expression vollständig, respektive größtenteils, in die *holo*-Form überführt worden war, sollte die Beteiligung des Carrierproteins an der Lin A-Biosynthese nachgewiesen werden. Der Beweis der postulierten Funktion durch Beladen des jeweiligen *holo*-Enzyms mit [<sup>3</sup>H]-markiertem PPL erbracht werden.

Zu diesem Zweck wurden die Experimente parallel sowohl mit den gereinigten Enzymen, His-tag-LmbC und His-tag-LmbN bzw. His-tag-LmbPCP, als auch mit LmbC-/LmbN-haltigen Rohextrakten durchgeführt. Die gereinigten bzw. angereicherten Enzyme wurden gemeinsam mit [<sup>3</sup>H]-PPL und ATP eingesetzt, so dass PPL *in situ* aktiviert wurde, bevor es auf das Carrierprotein übertragen werden konnte (s. Kap. 2.15.3; Abb. 3-26).



**Abb. 3-26:** Mechanismus der Thioester-Bildung zwischen Aminoacyl-AMP-aktiviertem PPL und *holo*-LmbN bzw. -LmbPCP. (\*) symbolisiert die [<sup>3</sup>H]-Markierung des PPL.

#### 3.4.5.1 *In vitro*-Beladung des gereinigten His-tag-LmbN bzw. His-tag-LmbPCP mit [<sup>3</sup>H(U)]-PPL

Zum einen sollte der Nachweis anhand des sedimentierten, mit [<sup>3</sup>H]-PPL-beladenen Proteins nach Inkubation des jeweiligen Carrier-Enzyms mit [<sup>3</sup>H]-PPL, LmbC sowie ATP in Szintillationsmessungen erfolgen. Und zum anderen sollte die am Carrierprotein spezifisch-gebundene Radioaktivität nach in einer SDS-PAGE auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht

werden.

Jedoch konnte auch hierbei in keinem Enzymansatz eine nennenswerte Anreicherung der Radioaktivität im sedimentierten Protein nachgewiesen werden. Auch durch Vorinkubation des His-tag-LmbPCP mit CoA und AcpS zur vollständigen Phosphopantetheinylierung ließ sich die Protein-gebundene Radioaktivität nicht steigern.

Der Nachweis Protein-gebundenen [<sup>3</sup>H]-PPLs durch SDS-PAGE und anschließende Röntgenfilm-Exposition brachte ebenso wenig einen Beweis für eine erfolgreiche Beladung mit PPL.

### 3.4.5.2 *In vitro* Protein-Beladung mit [<sup>3</sup>H(U)]-PPL in Extrakten LmbC- und LmbN-produzierender *E. coli*

Des Weiteren wurden *E. coli*- und *S. lividans*-Stämme erzeugt, die LmbN und LmbC gleichzeitig heterolog produzieren, um die Beladungsassays mit [<sup>3</sup>H]-PPL direkt mit dialysierten S30-Extrakten dieser Zellen durchführen zu können.

Für die Produktion beider Enzyme in *E. coli* JM109 (DE3) wurde der Klon mit pAAW9.22 bzw. pJOE2702 (Kontrolle) zusätzlich mit pMHW30 transformiert. In diesem rekombinanten Stamm stand *lmbC* unter der Kontrolle des T7-Expressionsystems, und die Produktion von LmbN war Rhamnose-induzierbar. Bevor die Extrakte im Beladungsassay eingesetzt wurden, wurde die Expression mit Hilfe einer SDS-PAGE überprüft, wobei nur die Produktion von LmbC jeweils sichtbar war (ohne Abb.). LmbN konnte in den Extrakten dieses Klons nicht eindeutig nachgewiesen werden. Trotzdem wurden die Extrakte in den Testansätzen zur PPL-Beladung eingesetzt, da selbst bei einer geringen LmbN-Produktion, aufgrund der Empfindlichkeit des Nachweissystems, die kovalente Bindung des [<sup>3</sup>H]-PPLs ans Enzym hätte nachzuweisen sein müssen.

Allerdings ließ sich keine Beladung von Proteinen mit dem radioaktiv-markierten PPL auf der nach Beendigung des Assays durchgeführten SDS-PAGE durch Exposition eines Röntgenfilms nachweisen. Dies ließ sich auch durch den Zusatz von *S. lincolnensis*-Extrakt und CoA zum Assay, um möglicherweise inaktives LmbN durch die *S. lincolnensis*-eigene PPTase zu modifizieren, nicht ändern.

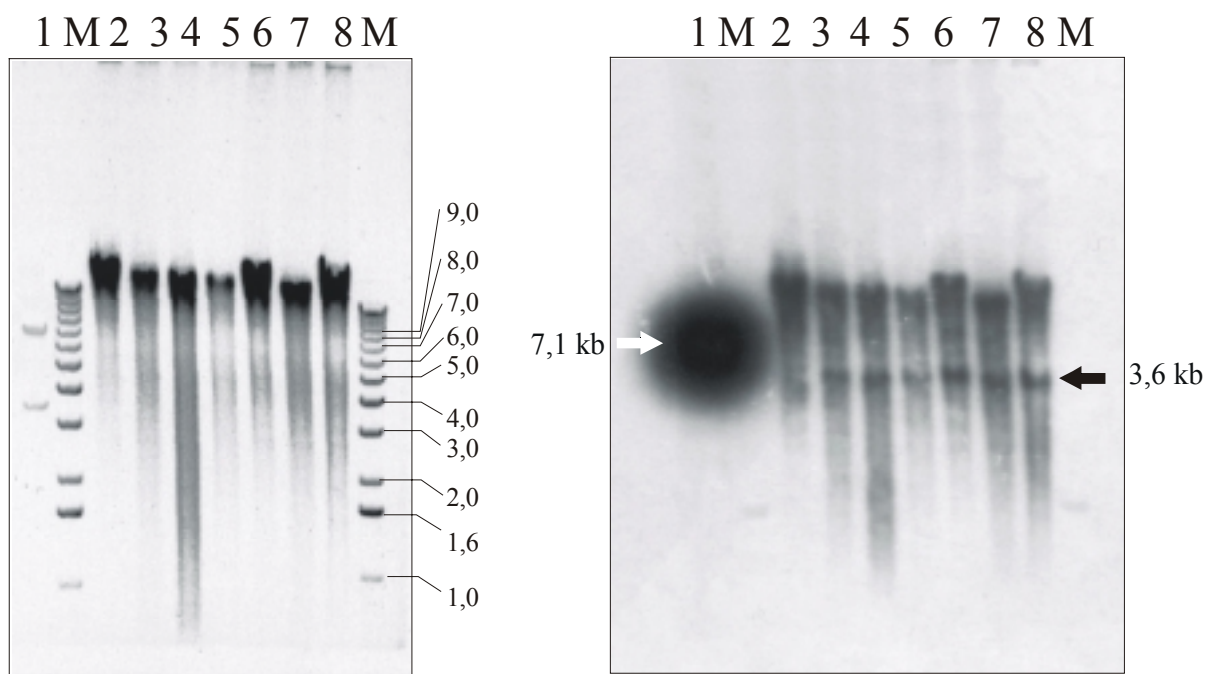
Die Enzymansätze wurden ebenfalls gefällt und die Protein-gebundene Radioaktivität wurde vermessen. Auch beim Nachweisversuch Protein-gebundener Radioaktivität bestand kein Unterschied zwischen den Ansätzen mit (pAAW9.22) bzw. ohne LmbN (pJOE2702).

### 3.4.5.3 *In vitro*-Beladung mit [<sup>3</sup>H(U)]-PPL in Extrakten LmbC- und LmbN-produzierender *S. lividans*

Analog wurde ein LmbN-/LmbC-produzierender *S. lividans* generiert, da angenommen wurde, dass LmbN in diesem Wirt während der Produktion vollständig phosphopantetheinyliert werden würde (Pfennig *et al.*, 1999).

Für die Entwicklung eines solchen *S. lividans*-Stamms wurde zuerst *lmbC* mit Hilfe des Vektors pMH8a (Motamedi *et al.*, 1995) durch gerichtete Rekombination in die *att*-Site für das „mini-circle“ Integrationselement (Lydiate *et al.*, 1986) ins Chromosom integriert. Die Integration von *lmbC* wurde anschließend durch Southern-Hybridisierung (Abb. 3-27) chromosomaler DNA bestätigt, bevor der Stamm nachträglich mit dem Plasmid pAAW9.11 transformiert wurde.

Für die Southern-Hybridisierung wurde sowohl pMHW63-Plasmid-DNA und chromosomale DNA von *S. lividans* 66 1326 und der sechs isolierten Hygromycin B-resistenten Klone einer *Bgl*III-Hydrolyse unterzogen. Als Sonde diente das *Nde*I/*Bam*HI-Fragment mit *lmbC* aus pMHW22.



**Abb. 3-27: Southern Hybridisierung zum Nachweis der *lmbC*-Integration ins *S. lividans*-Chromosom.** Agarosegel der *Bgl*III-Hydrolyse (links) und Southern-Hybridisierung mit der *lmbC*-Sonde aus pMHW22 (rechts). Die Spuren enthielten: pMHW63 (1), *S. lividans* 66 1326 (2), *S. lividans* 66 1326::*lmbC* (3)-(8). 1 kb ladder (M, Sigma). Die Pfeilspitzen markieren die spezifischen Hybridisierungssignale.

Auf dem Röntgenfilm der Hybridisierung war ein sehr starkes Signal in der Spur mit Plasmid-DNA zu sehen. Mit einer Größe von ca. 7,1 kb entsprach es der des *lmbC*-beinhaltenden Fragments aus der *Bgl*III-Hydrolyse. In den Spuren der *S. lividans* mit integriertem pMHW63 war jeweils ein hybridisierendes Fragment mit der Größe von ca. 3,6 kb zu erkennen. In der Kontrolle mit *S. lividans* 66 1326-DNA war dieses Signal jedoch nicht zu beobachten, so dass es weder von freiem Plasmid noch durch unspezifische Hybridisierung verursacht worden sein konnte (vgl. Abb. 3-27). Das Hybridisierungssignal wurde somit durch das integrierte *lmbC* ins *S. lividans*-Chromosom hervorgerufen. Da der verwendete „mini-circle“-kodierende Vektor pHM8a neben der integrierten Form ebenso auch als freies Plasmid vorliegen kann, jedoch in einer Kopienanzahl von weniger als eins je zehn Chromosome (Motamedi *et al.*, 1995), war diese Bande wegen der geringen DNA-Menge in der Southern-Analyse vermutlich nicht sichtbar. Bemerkenswerterweise hatten alle untersuchten Hygromycin B-resistenten Klone das *lmbC*-tragende Plasmid ins Chromosom integriert.

Einer der Stämme *S. lividans* 66 1326::*lmbC* wurde protoplastiert und mit pAAW9.11 bzw. pIJ6021 (Kontrolle) transformiert. Die dialysierten S30-Extrakte wurden entsprechend Kapitel 3.4.4.2 anschließend in Beladungsassays eingesetzt. Doch auch bei diesen Experimenten ließ sich keine von LmbN abhängige Erhöhung der Protein-gebundenen Radioaktivität nachweisen.

### 3.4.6 Versuche zur *in vitro* NDL-Synthese aus PPL und MTL

Um zu untersuchen, ob die beiden Enzyme LmbC und LmbN ausreichen würden, um die Untereinheiten PPL und MTL zu kondensieren, wurde versucht, NDL *in vitro* zu synthetisieren. Dabei wurden zum einen die überproduzierten und angereicherten Proteine eingesetzt, und zum anderen wurden Extrakte der rekombinanten *E. coli* und *S. lividans*, die beide Biosynthesegene trugen, verwendet. Als Positivkontrolle diente das NDL, das aus einer Kultur der *lmbJ*-Deletionsmutante *S. lincolnensis* JM11.3 (Stühler, 1999) extrahiert wurde (vgl. Abb. 3-5). Bei keinem der zahlreichen durch Bioautographie (o. Abb.) untersuchten Testansätzen wurde die Bildung von NDL nachgewiesen. Dabei war es unerheblich, ob das vermutete Carrierprotein mit den PPTasen AcpS und Sfp oder dialysiertem *S. lincolnensis* NRRL 2936-Extrakt und CoA vorinkubiert wurde, um es vollständig in die *holo*-Form zu überführen. Die Ergebnisse der Bioautographie konnten durch HPLC-Analysen (s. Kap. 2.6.4) der Testansätze bestätigt werden, denn auch hierbei wurde in keinem Ansatz die Bildung von NDL nachgewiesen.



Dieses Ergebnis zusammen mit den erfolglosen Versuchen LmbN bzw. LmbPCP mit [<sup>3</sup>H]-PPL zu beladen, ließ folgende Schlussfolgerungen zu: (i) Die Proteine LmbC und LmbN sind nicht ausreichend, um NDL synthetisieren zu können, und es gehören noch weitere Biosyntheseproteine zum Multienzymkomplex der NDL-Synthetase, oder (ii) die Peptide sind *in vitro* nicht aktiv.

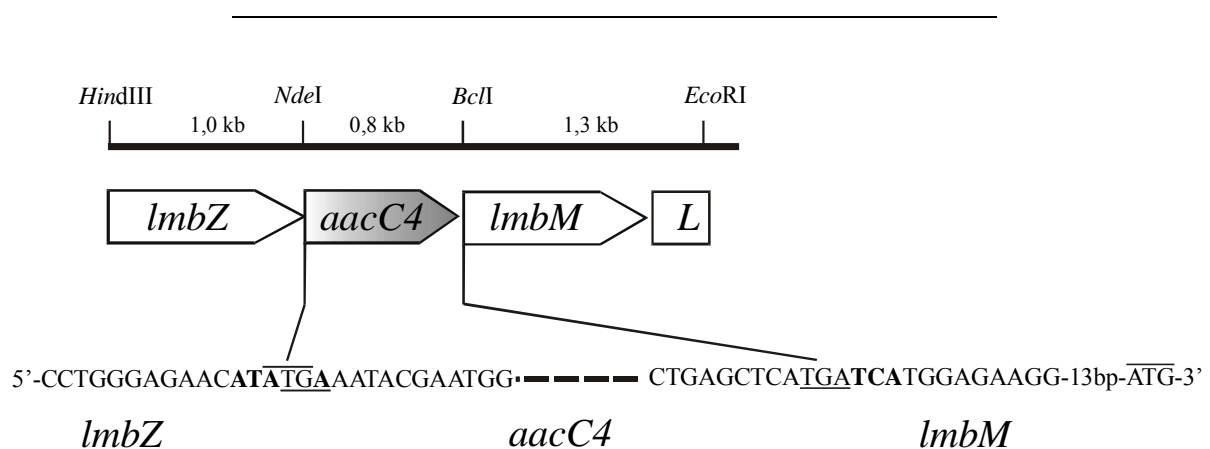
Da alle Experimente, [<sup>3</sup>H]-PPL *in vitro* kovalent an LmbN oder LmbPCP zu binden oder NDL *in vitro* aus PPL und MTL zu synthetisieren, erfolglos waren, wurde versucht die Biosynthese-Funktion *in vivo* mit Hilfe einer *lmbN*-Mutante zu untersuchen.

### 3.5 Erzeugung einer *lmbN*-Deletionsmutante

Da das Gen *lmbN* Bestandteil einer größeren Transkriptionseinheit sein konnte, wurde das komplette *lmbN*-Gen gegen dasjenige der Aminoglycosid-3-Acetyltransferase IV (*aacC4*) ausgetauscht, um durch Einführung der Mutation keine polaren Effekte in den stromabwärts lokalisierten Genen zu verursachen. Dafür wurden in drei PCR-Ansätzen die DNA-Fragmente *lmbZ*, *aacC4* und *lmbML*' amplifiziert und entsprechend der in den Abbildungen 3-28 und 3-29 dargestellten Anordnung miteinander fusioniert.

#### 3.5.1 Konstruktion des Suizid-Vektors pMHW16

Die Primer wurden so konstruiert, dass die Fusion der DNA-Fragmente in der Art erfolgen konnte, dass das Leseraster der jeweiligen Gene nicht verändert wurde. Bei den Genen *lmbZ* und *lmbN* überlappten Stopp- und Startkodon, so dass, um das natürliche Stoppkodon von *lmbZ* zu erhalten, die Sequenz des *aacC4*-Gens in der ersten Kodonposition des zweiten Kodons von Cytosin nach Adenin geändert werden musste. Dadurch ergab sich ein Austausch des Aminosäurerests Glutamin gegen Lysin. Zur Einführung der *NdeI*-Restriktionsschnittstelle am Startkodon von *lmbN* wurde das Kodon für den letzten Aminosäurerest in *lmbZ* von Prolin nach Isoleucin verändert. Die *BclI*-Restriktionsschnittstelle hingegen konnte eingeführt werden, so dass lediglich Basenaustausche im intercistronischen Bereich zwischen *lmbN* und *lmbM* vorgenommen werden mussten und keine Veränderungen auf Proteinebene resultierten.

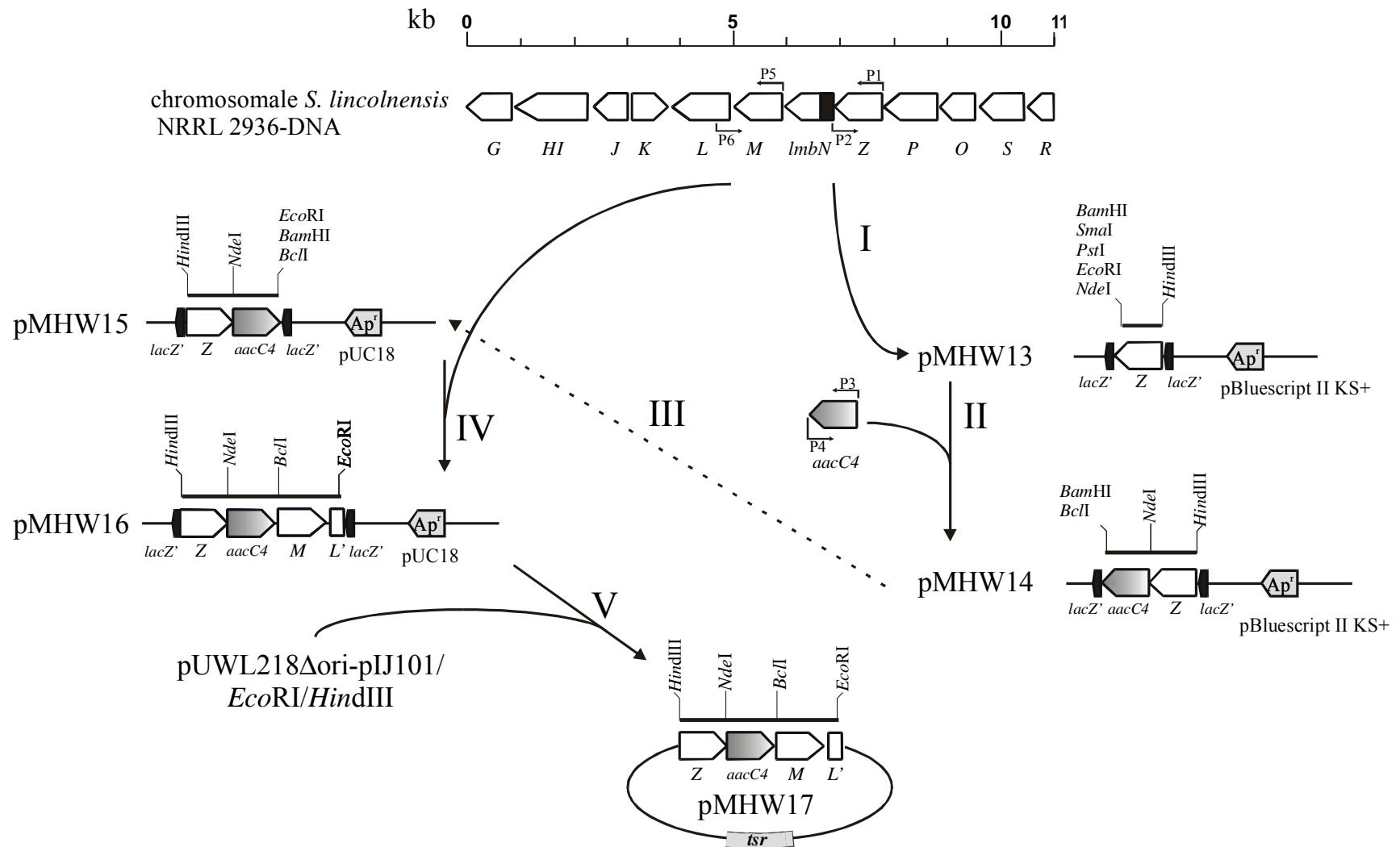


**Abb. 3-28:** Darstellung der Fusionsstellen zwischen den Genen *lmbZ* und *aacC4* sowie zwischen *aacC4* und *lmbN*. Unterhalb der schematischen Darstellung ist die DNA-Sequenz an den Genübergängen gezeigt. Basen, die für die Einführung der Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BclI* geändert wurden, sind fett hervorgehoben. Die Startkodons sind in der Abbildung unterstrichen und die Stoppkodons wurden durch einen Strich oberhalb der Sequenz markiert.

Das ca. 1 kb große *lmbZ*-PCR-Produkt (Primerpaar MH5/6) wurde mit dem Restriktionsenzym *HindIII* hydrolysiert und mit dem *HindIII/EcoRV*-hydrolysierten Vektor pBluescript II KS+ ligiert (pMHW13). Das 0,8 kb große DNA-Fragment mit dem *aacC4*-Gen, das durch PCR vom Plasmid pEFBA mit dem Primerpaar MH7/8 amplifiziert worden war, wurde an das *lmbZ*-Gen fusioniert, indem das PCR-Produkt nach *NdeI*-Hydrolyse mit dem Plasmid pMHW13/*NdeI/SmaI* ligiert wurde (pMHW14). Das Plasmid pMHW14 wurde daraufhin mit den Enzymen *HindIII* und *BamHI* hydrolysiert und das 1,8 kb große DNA-Fragment (*lmbZ-aacC4*) wurde in einen entsprechend vorbereiteten pUC18-Vektor kloniert (pMHW15). Schließlich wurde das Produkt der PCR des Primerpaars MH9/10 (*lmbML'*) nach *BclI/EcoRI*-Hydrolyse stromabwärts des *aacC4*-Resistenzgens in pMHW15/*BclI/EcoRI* kloniert, so dass das Plasmid pMHW16 entstand. Die rekombinanten *E. coli*-Zellen zeigten jedoch nicht die erwartete Apramycin- bzw. Tobramycin-Resistenz. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass das *aacC4*-Gen unter der Kontrolle des wahrscheinlich in *E. coli* nicht funktionellen *lmbN*-Promotors stand. Analog zur Erzeugung der *lmbC*-Mutante in *S. lincolnensis* NRRL 2936 (s. Kap. 3.1.2) wurden Protoplasten des Wildstamms mit pMHW16 transformiert, wobei keine Apramycin-resistenten Klone isoliert werden konnten.

### 3.5.2 Konstruktion des Suizid-Vektors pMHW17

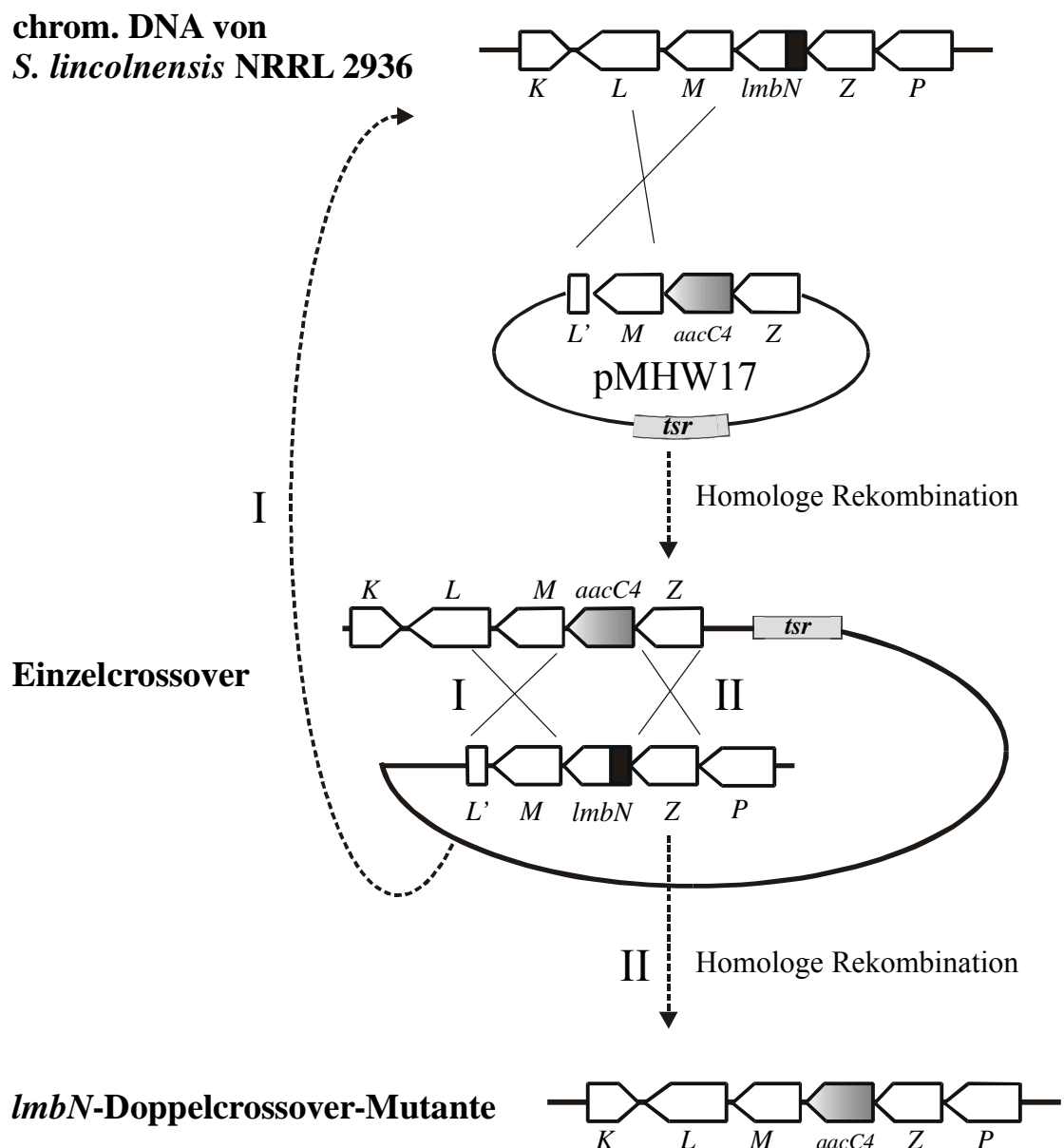
Schließlich wurde eine zweistufige Strategie verfolgt, um die gewünschte *lmbN*-Deletionsmutante zu erhalten. Zuerst wurde auf ein Einzelcrossover-Ereignis selektiert. In einem zweiten Schritt wurde dann auf Doppelcrossover-Mutante untersucht, was jedoch neben der Apramycin-Resistenz einen zweiten Plasmid-kodierten Selektionmarker notwendig machte. Dafür wurde das ca. 3,1 kb große *EcoRI/HindIII* DNA-Fragment aus pMHW16 in einen entsprechend vorbereiteten, Thiostrepton-Resistenz-vermittelnden pUWL218 $\Delta$ ori-pIJ101 kloniert, wodurch der Suizid-Vektor pMHW17 entstand (Abb. 3-29).



**Abb. 3-29: Konstruktion des Suizid-Vektors pMHW17 zur Erzeugung einer *lmbN*-Mutante.** (I), PCR mit dem Primerpaar MH5/6 (P1 u. P2) und chromosomaler *S. lincolnensis* NRRL2936-DNA als Template; Hydrolyse des PCR-Produkts mit *Hind*III und Ligation mit pBluescript II KS+/*Hind*III/*Eco*RV. (II), PCR mit dem Primerpaar MH7/8 (P3 u. P4) mit pEFBA Plasmid-DNA als Template; Hydrolyse des PCR-Produkts mit *Nde*I und Ligation mit pMHW13/*Nde*I/*Sma*I. (III), Klonierung des *Hind*III/*Bam*HI-DNA-Fragments aus pMHW14 in pUC18/*Hind*III/*Bam*HI. (IV), PCR mit dem Primerpaar MH9/10 (P5 u. P6) und chromosomaler *S. lincolnensis* NRRL2936-DNA als Template; Hydrolyse des PCR-Produkts mit *Bcl*I/*Eco*RI und Ligation mit pMHW15/*Bcl*I/*Eco*RI. (V), Klonierung des *Eco*RI/*Hind*III-DNA-Fragments aus pMHW16 in pUWL218Δori-pIJ101/*Eco*RI/*Hind*III.

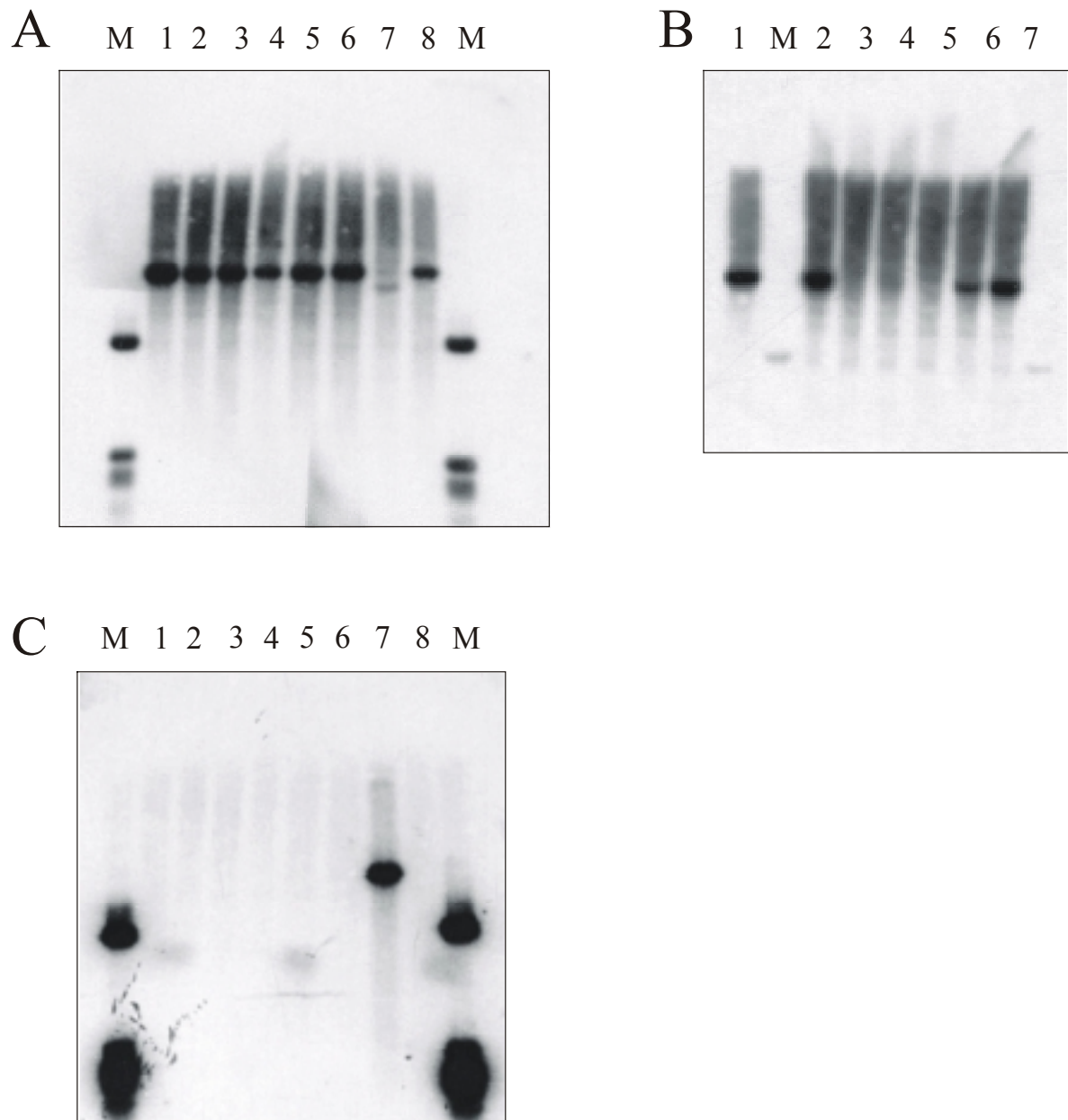
### 3.5.3 Isolierung und genetische Charakterisierung der *lmbN*-Deletionsmutante

Die *S. lincolnensis* NRRL 2936-Protoplasten wurden mit alkalisch denaturierter, einzelsträngiger pMHW17-DNA transformiert und auf Thiostrepton-Resistenz selektiert. Dieser Phänotyp sollte für eine Plasmidkointegration per Einzelcrossover-Ereignis charakteristisch sein. Es wurden etwa 100 Transformanten mit diesem Phänotyp selektiert.



**Abb.3-30: Genanordnung im Wildtyp, in der Einzelcrossover- (nach dem ersten Rekombinationsereignis) und der Doppelcrossover-Mutante.** Wenn das zweite Rekombinationsereignis wie in (I) dargestellt erfolgte, wurde das Wildtyp-Genom erhalten. Bei einer Rekombination nach (II) wurde die *lmbN*-Deletionsmutante erhalten.

Ein rekombinanter Klon wurde anschließend über mehrere Zyklen des Inokulierens von sporulierten Zellen ohne Selektionsdruck kultiviert. Nach jedem Zyklus wurde überprüft, ob Thiostrepton-sensitive Klone in der Kultur vorhanden waren. Durch ein zweites Rekombinationsereignis konnte entweder der Genotyp des Wildtyps wiederhergestellt bzw. der der gewünschten *lmbN*-Deletionsmutante erzeugt werden (Abb. 3-30). Nach einem



**Abb. 3-31: Southern-Hybridisierung der potentiellen *lmbN*-Mutanten.** Die Spuren auf den Membranen enthalten: (A): (2) *S. lincolnensis* NDC1, (3) NDC2, (4) NDC4, (5) NDC5, (6) NDC7, (7) NDC9 und (8) NDC10. (B): (2) *S. lincolnensis* NDC3, (3) NDC6, (4) NDC8, (5) NDC11, (6) NDC12 und (7) NDC13. Zur Kontrolle wurde jeweils (1) *S. lincolnensis* NRRL 2936 verwendet. Die Membranen A und B wurden mit einer *lmbN*-Sonde hybridisiert. (C): Die Membran A wurde nachträglich mit einer *aacC4*-Sonde hybridisiert.. (M) 1 kb ladder (Sigma).

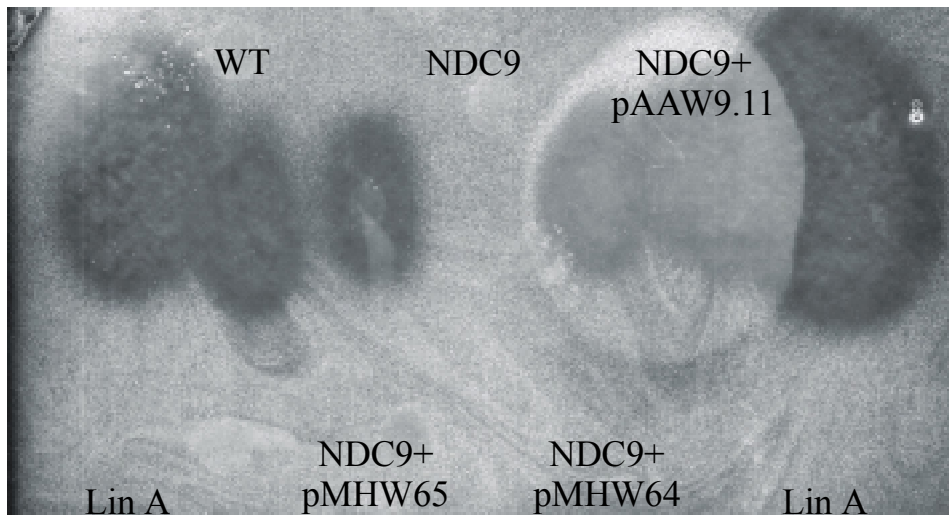
Screening von insgesamt etwa 5000 Klonen konnten 13 isoliert werden, die keine Thiostrepton-Resistenz mehr zeigten. Die Genome aller 13 Thiostrepton-sensitiven Klone wurden zunächst durch Southern-Hybridisierung mit dem *lmbN*-umfassenden *NdeI/BamHI*-Fragment aus pAAW9.22 als Sonde genetisch charakterisiert (Abb. 3-31). Von den 13 untersuchten Klonen konnte in vier Genomen kein Hybridisierungssignal mit der *lmbN*-Sonde nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3-31 A u. B). In den anderen neun Klonen wurde daher der Genotyp des Wildstamms wiederhergestellt (vgl. Abb. 3-30).

Die Membran aus Abb. 3-31 A wurde zusätzlich mit einer *aacC4*-Gensonde hybridisiert (Abb. 3-31 C). Lediglich der Klon in Spur (7), zeigte das nach der ersten Hybridisierung zu erwartende Signal mit der *aacC4*-Gensonde. Die in Abbildung 3-31 B dargestellte Membran wurde nachträglich nicht mehr mit der *aacC4*-Sonde hybridisiert, da mit *S. lincolnensis* NDC9 bereits die angestrebte *lmbN*-Deletionsmutante zur weiteren Untersuchung isoliert worden war und das Hybridisierungsergebnis mit der *lmbN*-Sonde eindeutig den Genotyp der drei anderen Mutanten nachwies.

#### **3.5.4 Biochemische Charakterisierung und Komplementation der *lmbN*-Mutante**

Die *lmbN*-Deletionsmutante *S. lincolnensis* NDC9 wurde weitergehend untersucht. In der Bioautographie besaß diese Mutante den erwarteten Lin A<sup>-</sup>-Phänotyp (Abb. 3-32). Dieses Ergebnis ließ nur die Schlussfolgerung zu, dass zumindest eine der von *lmbN* kodierten Funktionen für die Lin A-Biosynthese notwendig war.

Um zu überprüfen, ob beide möglichen Funktionen von LmbN für die Lin A-Biosynthese benötigt wurden, sollten unterschiedliche *trans*-Komplementationen durchgeführt werden. Dazu wurden die Gene *lmbN* (pMHW64) und *lmbPCP* (pMHW65) jeweils als *NdeI/HindIII*-Fragment in den entsprechend hydrolysierten Vektor pPWW49 ligiert, bei dem die Genexpression jeweils unter der Kontrolle des P<sub>*ermE*\*</sub>-Promotors stand. Beide Plasmide und zusätzlich pAAW9.11 wurden in Protoplasten der Mutante NDC9 transformiert. Die isolierten Transformanten wurden jeweils auf festem Medium angezogen. Der Agar der Kulturen wurde dem Extraktionsverfahren zur Lin A-Isolierung unterzogen und erneut in einer Bioautographie (Abb. 3-32; s. Kap. 3.1.4) eingesetzt.



**Abb. 3-32:** Bioautographie der *trans*-Komplementationen von *S. lincolnensis* NDC9 mit den Plasmiden pMHW64/65 und pAAW9.11. Die dunklen ovalen Flächen entsprechen Hemmhöfen im Bakterienrasen von *M. luteus* DN218, die eine Lin A-Produktion anzeigen. Lin A-Reinsubstanz wurde als Standard eingesetzt.

Bei der Analyse der Bioautographie (vgl. Abb. 3-32) fiel auf, dass die *lmbN*-Mutante durch alle eingesetzten Plasmide komplementiert wurde und das lediglich für die Carrierprotein-Domäne LmbPCP kodierende Plasmid ausreichte, um die Lin A-Produktion wiederherzustellen. Auch bei der plasmidkomplementierten *lmbN*-Mutante (NDC9) war die Lin A-Produktion deutlich geringer als im zum Vergleich herangezogenen Wildtyp. Die aus dem Kulturagar isolierbaren Lin A-Konzentrationen lagen bei ca. 0,5-1,0 mg·l<sup>-1</sup>. Aus Wildtyp-Medium konnte dagegen ca. 40-50 mg·l<sup>-1</sup> Lin A extrahiert werden. Das entspricht in etwa dem Ergebnis, was auch schon für die *lmbC*-Mutante erhalten worden war, jedoch mit dem Unterschied, dass bei der *lmbN*-Deletionsmutante die Bildung von Revertanten ausgeschlossen war.



## 4 Diskussion

Die bisherigen Untersuchungen zur Biosynthese des Lincomycins (Lin A) mit seinen biochemisch ungewöhnlichen Untereinheiten, Methylthiolincosaminid (MTL) und Propylprolin (PPL), sowie deren Kondensation zum *N*-Demethylincosaminid (NDL) ließen viele Fragen offen. In den bei der Fa. Upjohn durchgeführten, frühen Experimenten zum Kondensationsprozess (Argoudelis *et al.*, 1965; Hausknecht *et al.*, 1986; Hausknecht und Wolf, 1987) blieb vor allem ungeklärt, nach welchem Mechanismus die Verknüpfung zwischen den beiden Untereinheiten stattfindet und welche Enzyme daran beteiligt sind. Die Experimente waren ausnahmslos *in vivo* bzw. *in vitro* mit Gesamtzellextrakten durchgeführt worden. Insbesondere die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der Tn4556-Transposon-induzierten Mutanten von Chung *et al.* (1997) konnten wegen des Mangels an [<sup>14</sup>C]-markierten Substanzen und der sehr ungenügenden Dokumentation in der Literatur nicht reproduziert werden. Da jedoch die Sequenzdaten des Lin A-Biosyntheseclusters komplett vorlagen und LmbC bereits als mögliches Adenylat-formendes Enzym aufgrund der Sequenzähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenz postuliert worden war (Peschke *et al.*, 1995), wurde die Aufklärung des Mechanismus der Bildung der Amidbindung und die Suche nach weiteren dazu notwendigen Biosynthese-Funktionen in *S. lincolnensis* NRRL 2936 erneut aufgegriffen.

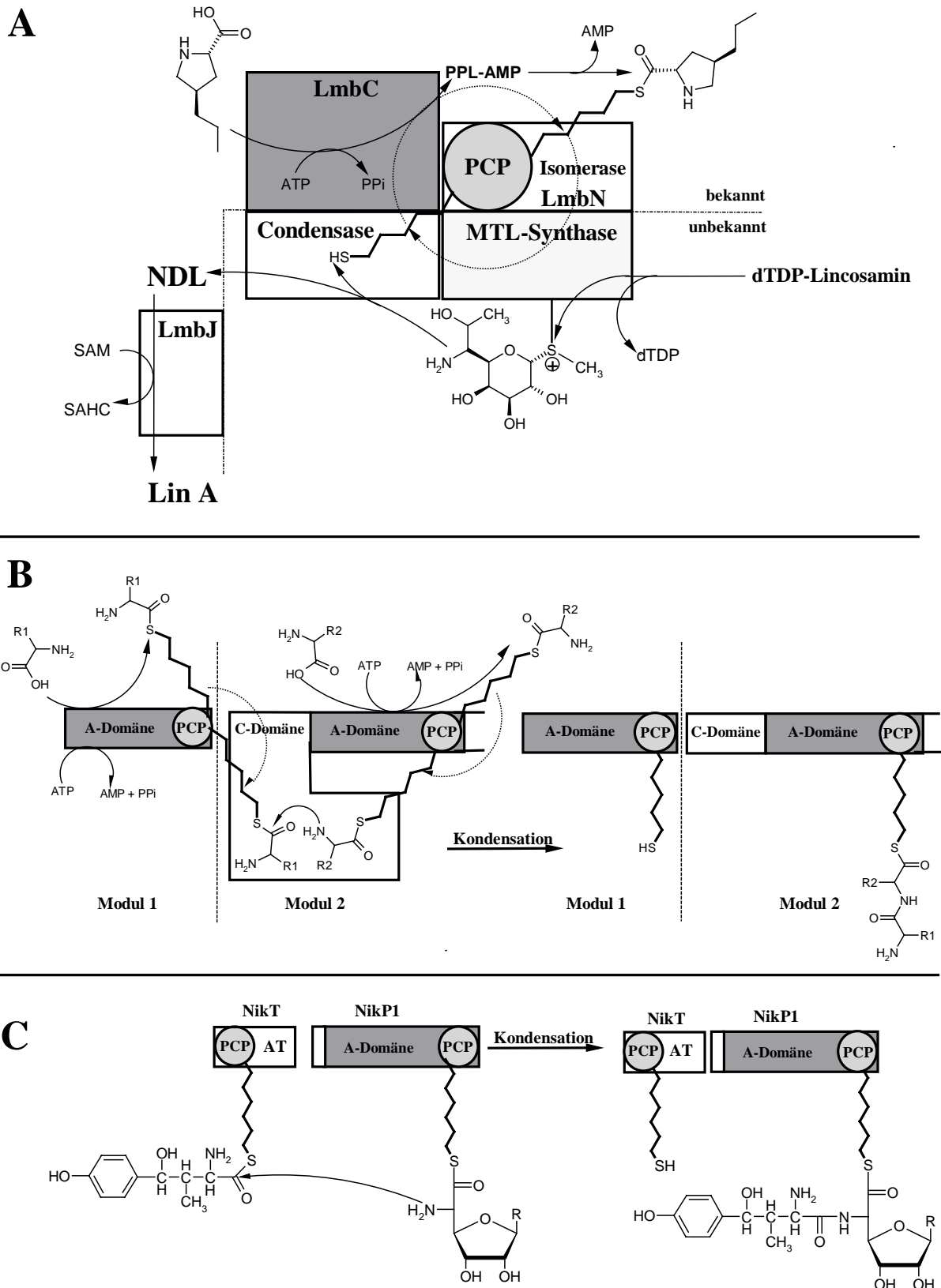
In den modular aufgebauten nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) ist für gewöhnlich eine Carrierproteindomäne [Peptidyl-Carrierprotein (PCP)- bzw. Thiolation (T)-Domäne] an den C-Terminus der Adenylierungsdomäne (A-Domäne) fusioniert (Marahiel *et al.*, 1997). Jedoch war weder stromabwärts noch stromaufwärts von *lmbC* eine Basensequenz identifiziert worden, die für ein mögliches Carrierprotein kodierte. Statt dessen wurden in der direkten Nachbarschaft nur Gene für mögliche oder bekannte Biosyntheseenzyme der PPL-Synthese gefunden (Peschke *et al.*, 1995). Da LmbC in seiner Aminosäuresequenz kein Motiv für eine 4'-Phosphopantethein (Ppant)-Bindestelle enthielt, lag eine Zuordnung zur Gruppe II (s. Kap. 1.3.3.1) der Adenylat-formenden Enzyme nahe, obgleich die Sequenz eine deutlich ausgeprägtere Homologie zu den A-Domänen der modular aufgebauten NRPS-Systeme (Gruppe I) aufwies. LmbC-ähnliche Enzyme ohne Carrierproteindomänen mit einer 4'-Ppant-Bindestelle sind jedoch aus diversen Peptidantibiotika-Produzenten bekannt und katalysieren die Aktivierung der diversen Startereinheiten mit aromatischen Seitengruppen. Beispielsweise werden 2,3-Dihydroxybenzoat (2,3-DHB) in der Enterobactin-Biosynthese durch EntE (Rusnak *et al.*, 1989) oder 4-Methyl-3-hydroxyanthranilsäure (4-MHA) in der Actinomycin-

Biosynthese durch ACMS I als Aminoacyladenylat aktiviert und auf Carrier-Enzymproteine einer separaten Polypeptidkette (*trans*) übertragen, die wie im bifunktionellen EntB (Gehring *et al.*, 1997) entweder mit einer zusätzlichen Funktion (Isochorismat-Lyase) fusioniert sind oder als eigenständige Carrierproteine (AcmACP; Pfennig *et al.*, 1999) vorkommen.

Im Verlauf dieser Arbeit gelang es, die von Peschke *et al.* (1995) vermutete Funktion des Enzyms LmbC innerhalb der Lin A-Biosynthese zu bestätigen und sein Substratspektrum aufzuklären. Darüberhinaus wurde ein mögliches Aminoacyl-Carrierprotein am *N*-Terminus von LmbN identifiziert. Dieses potentielle Carrierprotein besaß erstaunlicherweise die Eigenschaft, dass die Signatur in der Primärstruktur der Bindestelle der prosthetischen Gruppe derjenigen eines D-Alanyl-Carrierproteins entsprach. Die Carrierproteine dieses Typs waren bisher ausschließlich aus der D-Alanylierung der Lipoteichonsäure (LTA) Gram-positiver Bakterien als etwa 9-10 kDa große, eigenständige Polypeptide bekannt. Die Besonderheit bestand somit darin, dass das Lmb-Carrierprotein an eine andere Biosynthesefunktion fusioniert war und in dieser Form noch aus keiner weiteren Sekundärmetabolit-Biosynthese bekannt war.

Es galt daher die Beteiligung dieses Carrierproteins an der Lin A-Biosynthese zu beweisen. Dies gelang aufgrund seines einzigartigen Charakters im Verlauf dieser Arbeit nicht zweifelsfrei. Allerdings schlossen die Hinweise, die sich aus den durchgeführten Experimenten ergaben, die Beteiligung an der Biosynthese auch nicht aus. Die Ergebnisse, die sich bei den Untersuchungen zur Funktion der beiden Leserahmen, *lmbC* und *lmbN*, ergaben, werden im Folgenden eingehend diskutiert.

Als Grundlage der Diskussion soll die in Abbildung 4-1 A dargestellte, detaillierte Arbeitshypothese zur Zusammensetzung des Kondensationskomplexes sowie zum Mechanismus der NDL-Synthese dienen. Bei der Entwicklung dieser Modellvorstellung wurden die Ergebnisse, die während dieser Arbeit erbracht wurden, kombiniert mit den Analogien, die zu den Mechanismen der Peptidbindungsbildung an NRPS (Abb. 4-1 B) sowie zu der Nikkomycin-Biosynthese (Abb. 4-1 C) existieren. Ausgangspunkt der Untersuchung des NDL-Synthetase-Komplexes war das PPL-AMP-bildende Enzym LmbC.



**Abb. 4-1:** Vergleich der Mechanismen bei der: (A), NDL-Synthese durch Lin A-Biosyntheseenzyme (hypothetisch), (B) Bildung eines Dipeptids an einer modularen NRPS, (C) der Kondensationsreaktion der beiden Untereinheiten in der Nikkomycin-Biosynthese (Peptidyl-Nucleosid Antibiotikum). A-Domänen sind dunkelgrau und PCP-Domänen hellgrau schattiert. AT, Aminotransferase.

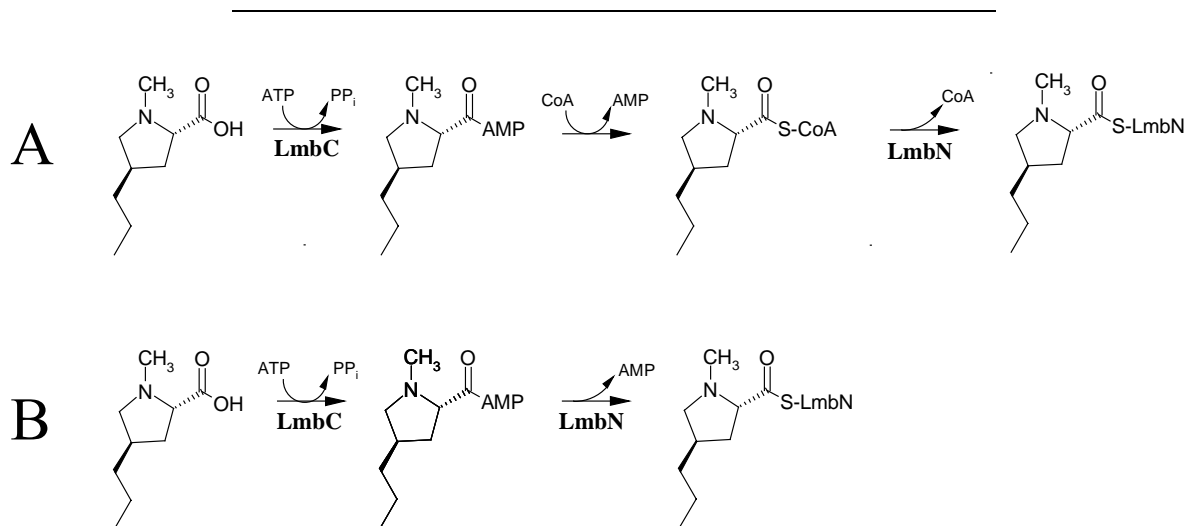
## 4.1 LmbC, die PPL-Adenylat Synthetase

Erste Versuche zum Nachweis einer PPL-aktivierenden Funktion von LmbC waren erfolglos gewesen, und das heterolog in *E. coli* produzierte LmbC hatte trotz starker Überproduktion an löslichem Enzym nicht die erwartete Aktivität gezeigt (Peschke *et al.*, 1995). In Abhängigkeit keines der daneben untersuchten analogen Substrate, L-DOPA, L-Tyrosin bzw. PPL, war ein ATP/PP<sub>i</sub>-Austausch messbar gewesen.

Darüberhinaus war vor dieser Arbeit kein Gen für ein Carrierprotein im *lmb*-Gencluster identifiziert worden. Folglich konnte ein Mechanismus für die Kondensationsreaktion nicht ausgeschlossen werden, wie er aus der Novobiocin-Biosynthese bekannt war (Steffensky *et al.*, 2000). Im Aminocoumarin Novobiocin werden 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoat und 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin durch ein einziges Enzym, die Novobiocinsäure-Synthetase NovL, in einer ATP-abhängigen/CoA-unabhängigen Reaktion ohne Beteiligung einer Carrierprotein-Funktion über eine Amidbindung miteinander verknüpft. NovH, das als weiteres potentiell Adenylat-formendes Enzym im Novobiocin-Biosynthesecluster in Frage kam, jedoch im Unterschied zu NovL eine Carrierproteindomäne (Gruppe I) besaß, erfüllte keine Funktion bei der Kondensation der beiden Untereinheiten. Durch Chung *et al.* (1997) waren indes für die Lin A-Biosynthese Hinweise dafür publiziert worden, dass die Kondensation zum NDL durch einen Komplex („NDL-Synthetase“) aus mehreren nicht-identischen Untereinheiten vermittelt wurde, was einem entsprechenden Mechanismus widersprach.

Folglich mussten für den Initiationsschritt der Kondensation, die PPL-Aktivierung, zwei alternative Mechanismen in Betracht gezogen werden, die im Einklang mit dem Befund eines Multienzymkomplexes standen. Zum einen war der „CoA-Ligase“-Mechanismus (Admiraal *et al.*, 2001) zu berücksichtigen, wie er für die Aktivierung der 3-Amino-5-hydroxybenzoat-Startereinheit des Ansamycins in der Rifamycin-Biosynthese in *Amycolotopsis mediterranei* (Schupp *et al.*, 1998; August *et al.*, 1998; Ghisalba und Nüesch, 1981) postuliert wurde. Diesem Mechanismus entsprechend (Abb. 4-2 A) müsste PPL zuerst als Aminoacyladenylat aktiviert werden, um darauf folgend einen freien CoA-Ester bilden zu können. Schließlich würde das CoA durch den Cysteamin-Rest der 4'-Ppant-Gruppe substituiert, so dass ein Thioester mit dem Carrierprotein (LmbN) entstehen würde. Da jedoch bei keiner der vorangegangenen Untersuchungen festgestellt worden war, dass CoA als essentieller Cofaktor am Kondensationsprozess beteiligt war, wurde dieser Mechanismus nicht vorrangig untersucht.

Somit war nach wie vor ein NRPS-ähnlicher Mechanismus (Abb. 4-2 B), bei dem es nach der PPL-Adenylatbildung durch nukleophilen Angriff der prosthetischen Gruppe 4'-Ppant direkt zum Transfer auf das Carrierprotein kommen würde, der einzige naheliegende Mechanismus. Der Zweck der Herstellung einer *lmbC*-Knock-out-Mutante bestand daher zunächst darin, die Beteiligung von LmbC an der Lin A-Biosynthese zu bestätigen. Die in dieser Arbeit erzeugte *lmbC*-Mutante (s. Kap. 3.1) zeigte den dafür erwarteten Lin A<sup>-</sup>-Phänotyp; ferner ließ sich die Mutante anschließend durch Plasmid-kodiertes *lmbC* komplementieren, was bewies, dass durch die Integration der  $\Omega$ -Kassette ( $\Omega aac$ ) auch keine polaren Effekte induziert wurden. Ein Einfluss auf die stromabwärts lokalisierten Gene war auch nicht zu erwarten gewesen, da es sich bei *lmbC* um ein monocistronisches Gen handelte.



**Abb. 4-2:** Gegenüberstellung der möglichen Mechanismen der PPL-Aktivierung: (A) „CoA-Ligase“- (Admiraal *et al.*, 2001) und (B) NRPS-ähnlich (Marahiel *et al.*, 1997).

Dennoch überraschte es, dass in Kulturen der komplementierten *lmbC*-Mutante *S. lincolnensis* CDC6/pMHW28 bzw. pMHW29, trotz erhöhter *lmbC*-Genexpression, eine deutlich reduzierte Lin A-Produktion nachzuweisen war. Da jedoch die Expression des Plasmid-kodierten LmbC-Proteins nicht durch SDS-PAGE überprüft worden war, wäre es möglich, dass die effektiv produzierte LmbC-Enzymkonzentration deutlich unter der des Wildtyps lag. Die beiden für die Komplementationsexperimente verwendeten Promotoren  $P_{tipA}$  und  $P_{ermE^*}$  waren zuvor nur qualitativ in *S. lincolnensis* getestet worden (Arnold, 2000); wobei in diesen Untersuchungen keine Aussagen über die Stärke der Promotoren gemacht werden konnten. Beide Promotoren mussten in diesen Komplementationsexperimenten erkannt worden sein, da alternative Promotorstrukturen für eine Antibiotika-Produktion kaum in Frage kamen.

Ansonsten hätte das nachgewiesene Lin A nur durch „Revertanten“ produziert werden können, die den *lmbC*-Leserahmen wieder exakt einrekombiniert hatten. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da keine homologen Regionen flankierend zum *lmbC*-Gen mehr auf den Plasmiden pMHW28 und pMHW29 vorhanden waren. Auch unter der Voraussetzung, dass die Revertanten- und Wildtyp-Zellen gleiche Lin A-Produktionsraten besaßen, hätte es sich in den Fermentationskulturen bei ca. 2-3% der Zellen um Revertanten handeln müssen, was für eine Rate illegitimer Rekombination nicht in Frage kam. Die Beteiligung von LmbC an der Lin A-Biosynthese konnte somit zweifelsfrei bewiesen werden.

Das Genprodukt LmbC war von Beginn an der wichtigste Kandidat für ein PPL-aktivierendes Enzym im Lin A-Biosynthesecluster gewesen. Durch den Nachweis des PPL-abhängigen ATP-Verbrauchs konnte diese Vermutung experimentell bestätigt werden. Es erschien im Folgenden sinnvoll das Substratspektrum von LmbC zu analysieren.

Dem *n*-Propylrest an C4-Position des PPL kommt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung zwischen dem natürlichen Substrat PPL und dem ebenfalls intrazellulär vorhandenen L-Prolin zu. Dies zeigte sich am deutlichen Unterschied in der enzymatischen Effizienz, gemessen in  $k_{cat} \cdot K_M^{-1}$ . Durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem *n*-Propylrest und den Aminosäureresten in der Substrattasche des Enzyms LmbC kommt es wahrscheinlich im Verhältnis zu stark voneinander abweichenden Bindungsenthalpien zwischen PPL und L-Prolin. Dieser Unterschied verlagert die enzymatische Effizienz offensichtlich extrem zugunsten des natürlichen Substrats. Um diese Vermutung zu unterstützen, wurde die Substratbindetasche von PPL mit denjenigen aus bekannten NRPS der drei Substrate und L-Prolin, L-Pipecolinsäure und L-Tyrosin verglichen (Abb. 4-3).

Aus der Kristallstruktur der Phenylalanin-aktivierenden Domäne der Gramicidin S-Synthetase GrsA (Conti *et al.*, 1997) waren die zehn Aminosäurereste bekannt, die die Substratbindetasche formen und an der Ausrichtung des Substrats beteiligt sind. Aus den Aminosäuresequenzdaten von 160 A-Domänen wurde daraufhin eine Signatur abgeleitet, auf dessen Grundlage sich die zu aktivierende Aminosäure in verwandten, aber bisher unbekanntem A-Domänen allein anhand der Primärstruktur bereits herleiten lässt (Stachelhaus *et al.*, 1999). Challis *et al.* (2000) gingen bei ihrer Analyse der Substratbindetasche noch einen Schritt weiter: Sie berechneten die Tertiärstrukturen mit dem jeweilig entsprechenden Substrat, um die Spezifität der A-Domänen anhand der dreidimensionalen Anordnung zu verdeutlichen (vgl. Abb. 4-3). Die Reste Aspartat (D<sub>235</sub>) und Lysin (K<sub>517</sub>), die an der Ausrichtung der zu aktivierenden Aminosäure durch elektrostatische Wechselwirkungen beitragen, sind dabei invariant.

**Tabelle 4-1:** Die Selektivität-vermittelnde Signatur der A-Domänen für PPL, L-Prolin, L-Pipecolinsäure und L-Tyrosin.

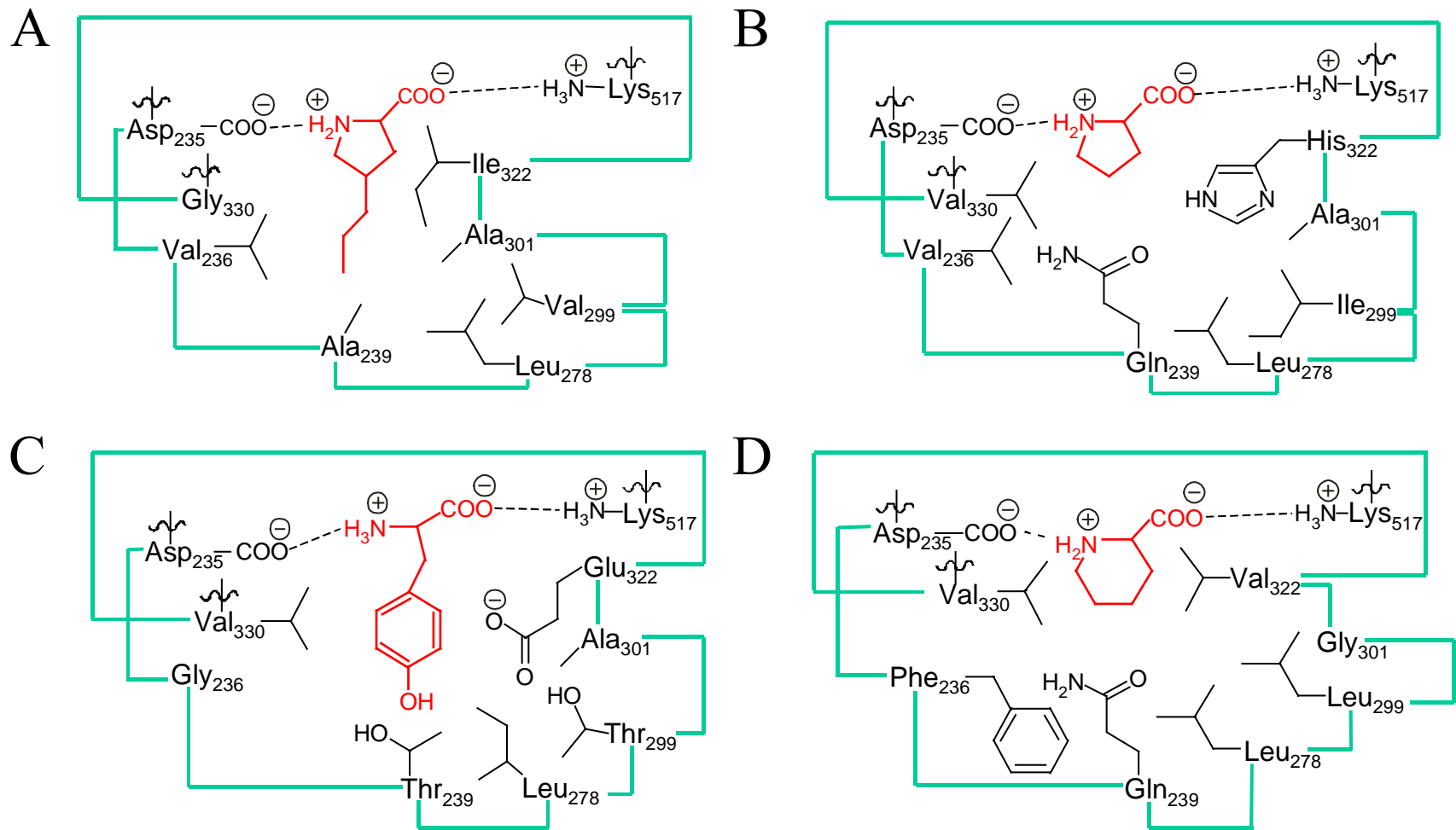
| Domäne | Position <sup>1)</sup> |     |     |     |     |     |     |     |     |     | NRPS                          |
|--------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------------|
|        | 235                    | 236 | 239 | 278 | 299 | 301 | 322 | 330 | 331 | 517 |                               |
| PPL    | D                      | V   | A   | L   | V   | A   | I   | G   | C   | K   | LmbC                          |
| Pro    | D                      | V   | Q   | L   | I   | A   | H   | V   | V   | K   | GrsB, FenA, Pps4, SnbDE, TycB |
| Pip    | D                      | F   | Q   | L   | L   | G   | V   | A   | V   | K   | FkbP, RapP, SnbA, SnbDE       |
| Tyr(1) | D                      | G   | T   | I   | T   | A   | E   | V   | A   | K   | FenA, Pps2, Pps4              |
| Tyr(2) | D                      | A   | L   | V   | T   | G   | A   | V   | V   | K   | TycB, TycC                    |
| Tyr(3) | D                      | A   | S   | T   | V   | A   | A   | V   | C   | K   | BacC, CepA, CepB              |

<sup>1)</sup>Die Positionen der angegebenen Aminosäurereste beziehen sich auf die Sequenz der PheA-Domäne im GrsA (Conti *et al.*, 1997). Die Zuordnung der anderen Reste beruht auf deren Position in Bezug auf die in A-Domänen hochkonservierten Sequenzmotive (vgl. Tab. 1-3).

Voraussichtlich am stärksten diskriminierende Reste in LmbC sind grau hinterlegt.

Vergleicht man die Zentren der Substratbindung der PPL- mit derjenigen von L-Prolin-, L-Pipecolinsäure- und L-Tyrosin-aktivierenden Domänen, so ist augenfällig, dass die variablen Reste um das PPL im LmbC hydrophob oder neutral sind (vgl. Tab. 4-1 u. Abb. 4-3). Die Substratbindetaschen in den A-Domänen von L-Prolin- und L-Pipecolinsäure-aktivierenden Enzymen sind dagegen deutlich hydrophilerer Natur, vor allem durch die Reste in den beiden Positionen 239 und 322, was wahrscheinlich die Polarität ihrer Substrate reflektiert (Challis *et al.*, 2000). Dies könnte auf die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken bei der Substratbindung hinweisen.

Das bei der *S. lincolnensis*-Fermentation zusätzlich anfallende Nebenprodukt Lin B (Depropyl-ethyl-Lin A) wird der postulierten Biosynthese entsprechend als Folge eines fehlenden Methylgruppentransfers gebildet (Chung *et al.*, 1997). Offensichtlich ist daher LmbC nicht in der Lage strikt zwischen *trans*-4-Ethyl-L-prolin (EPL) und PPL zu differenzieren, denn im Gegensatz zu den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen besitzen A-Domänen keine sogenannte „Proof-reading“-Funktion, so dass es immer auch zu Fehlerkennungen kommen kann, wenn ein nahe verwandtes Analogsubstrat vorliegt. Ob nun der geringe prozentuale Anteil des Nebenprodukts Lin B bei der Lin A-Produktion darauf zurückzuführen ist, dass die intrazelluläre EPL-Konzentration deutlich geringer ist als die des PPL, oder nur durch den Unterschied in der Bindungsenthalpie verursacht wird, müsste durch entsprechende Experimente geklärt werden. In diesem Zusammenhang wäre es u.a. auch interessant, ob auch (Methyl-, Ethyl- etc.) Ether des 4-Hydroxy-L-prolins durch LmbC adenyliert werden können.

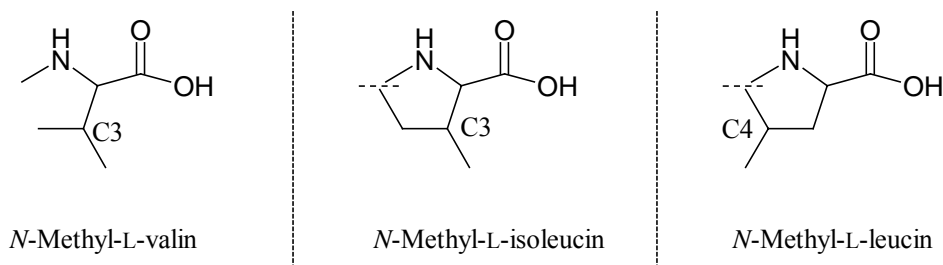


**Abb. 4-3: Schematische Darstellung der Bindetaschen in den aktiven Zentren verschiedener NRPS Aktivierungsdomänen.** (A) PPL A-Domäne in LmbC; (B) L-Pro A-Domäne in Pps4-M1; (C) L-Tyr A-Domäne in FenA; (D) L-Pipecolinsäure A-Domäne in SnbDE. (B)-(D) sind 2-dimensionale Darstellungen von Challis *et al.* (2000), die aus den Tertiärstrukturen entwickelt wurden. (A) Die PPL Substrat-Bindetasche wurde in Anlehnung an (B)-(D) unter Berücksichtigung der Daten aus Tab. 4-1 konstruiert.



Die kinetischen Untersuchungen an LmbC zeigten, dass die Hydroxyl-Gruppe des 4-Hydroxy-L-prolins die hydrophoben Wechselwirkungen mit LmbC noch stärker beeinträchtigt als dies beim L-Prolin bereits der Fall war, infolgedessen wurde das 4-Hydroxy-L-prolin praktisch nicht umgesetzt.

Mit Hilfe der zyklischen Aminosäuren, Pipecolinsäure und Acetidincarbonsäure, konnte eindeutig unter Beweis gestellt werden, dass die Erkennung des Strukturelements Pyrrolidinring am Enzym optimiert wurde. Ringsysteme anderer Größen, wie beispielsweise Acetidin bzw. Piperidin, besitzen dagegen keine geeigneten Passformen. Für Pipecolinsäure lässt sich dies möglicherweise anhand der sterisch anspruchsvolleren Reste Ile<sub>322</sub> und Ala<sub>301</sub> im LmbC im Vergleich zu Val<sub>322</sub> und Gly<sub>301</sub> im SnbDE nachvollziehen (vgl. Abb. 4-3). Bei der Analyse der LmbC-Substratspezifität für die aliphatischen *N*-Methyl-Aminosäuren, Sarkosin, *N*-Methyl-L-valin, *N*-Methyl-L-isoleucin und *N*-Methyl-L-leucin, fiel auf, dass offensichtlich keiner der Aminosäurereste eine geeignete Konformation einnehmen konnte, um hydrophobe Wechselwirkungen mit den tieferliegenden Resten der LmbC-Bindungstasche auszubilden. Ihnen gegenüber konnte somit effektiv differenziert werden, wobei z.T. sicher auch sterische Hinderung eine Rolle spielte. In einer dem PPL nachempfundenen, idealen Konformation befänden sich die Methylgruppen der verzweigten aliphatischen Reste im *N*-Methyl-L-valin und -isoleucin in einer *pseudo*-C3 Position. Hingegen wäre die entsprechende Methylgruppe im *N*-Methyl-L-leucin in der entsprechenden *pseudo*-C4 Position (Abb. 4-4). Bei der Betrachtung der theoretisch möglichen Konformation des *N*-Methyl-L-leucins war es daher überraschend, dass es von LmbC nicht zum Aminoacyladenylat umgesetzt wurde, obwohl es deutlich ein „molekulares Mimikry“ zum natürlichen Substrat PPL zeigt.



**Abb. 4-4:** Darstellung der für die Aminosäuren *N*-Methyl-L-valin, -isoleucin und -leucin möglichen Konformationen zur Illustration des „molekularen Mimikry“ von *N*-Methyl-L-leucin als *pseudo*-4-Methyl-L-prolin.

Bei einem Vergleich der  $K_M$ -Werte der durch A-Domänen katalysierten Aktivierungsreaktionen an proteinogenen Aminosäuren mit denen für Sekundärmetabolit-spezifische Substrate (Tab. 4-2) scheinen erstere um einige Größenordnungen höher zu liegen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die proteinogenen Aminosäuren intrazellulär unter den Bedingungen der Sekundärmetabolit-Produktion in deutlich höheren Konzentrationen vorliegen. Da die Edukte der durch modulare NRPS-Systeme produzierten Antibiotika z.T. identisch sind mit denjenigen, die für die ribosomale Peptidsynthese verwendet werden, ist möglicherweise ein hoher  $K_M$ -Wert zwingend notwendig und Folge der Selektion bei der Etablierung der NRPS in den produzierenden Organismen. Während der vegetativen Produktionsphase für Antibiotika konkurrieren Polymer- (d.h. Translations-) und Sekundärmetabolismus um die Aminosäurepools. Wenn jedoch die Zellen in die stationäre Wachstumsphase übergehen und der Bedarf an Protein-Neusynthese nachlässt, stehen vermutlich die Aminosäuren als Substrate für die Produktion der Sekundärmetabolite verstärkt zur Verfügung. Bei der von LmbC in *S. lincolnensis* katalysierten Reaktion wird indes die zu aktivierende Aminosäure PPL ausschließlich für die Lin A-Biosynthese benötigt. Die *in vitro* L-Prolin-Aktivierung, durch LmbC katalysiert, findet unter den *in vivo* Bedingungen wahrscheinlich wegen der dort zu geringen L-Prolin-Konzentration nicht statt. Bislang wurden jedenfalls keine entsprechenden Lincomycin-Derivate beobachtet.

Von einigen NRPS A-Domänen ist allerdings bekannt, dass sie auch *in vivo* verschiedene Aminosäuren aktivieren und ins wachsende Oligopeptid einbauen. Dadurch entstehen unterschiedliche Derivate der biologisch-aktiven Substanz. Den Einfluss des Austauschs Substrat-differenzierender Aminosäurereste erkennt man an der entspannten Substratspezifität der L-Tyrosin-aktivierenden Domänen in den Tyrocidin-Synthetasen TycB und TycC (vgl. Tab. 4-1) im Vergleich zur entsprechenden A-Domäne in der Fengycin-Synthetase FenA. TycB und TycC besitzen beide eine deutlich hydrophobere Enzymtasche (V<sub>239</sub> und A<sub>322</sub>), so dass es nicht weiter verwunderlich ist, dass sie auch in der Lage sind, L-Tryptophan anstelle von L-Tyrosin zu aktivieren. Die L-Tyrosin-aktivierende Domäne des FenA-Proteins ist umgeben von den drei polaren Resten Threonin (T<sub>239</sub>/T<sub>299</sub>) und Glutamat (E<sub>322</sub>), die Wasserstoffbrücken mit der Hydroxylgruppe des L-Tyrosins ausbilden können, so dass das Enzym strikt gegenüber strukturverwandten, hydrophoben Substraten wie beispielsweise L-Tryptophan oder L-Phenylalanin differenzieren kann.

Vergleicht man die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}} \cdot K_M^{-1}$ ) der einzelnen A-Domänen miteinander, so fällt auf, dass diejenigen, die Sekundärmetabolit-spezifische Substrate aktivieren, durchschnittlich eine um etwa eine Größenordnung höhere Effizienz besitzen (vgl. Tab. 4-2).

Dies kann als Bestätigung der obigen Hypothese angesehen werden. Da auch der für das Enzym LmbC und sein Substrat PPL gemessene Wert in diesen Rahmen fiel und für die anderen bisher getesteten Substrate dagegen keine Aktivierungen *in vivo* – falls die Substanzen überhaupt vorkommen - in Frage kommen konnte, da ihre intrazellulären Konzentrationen zu gering wären, wurde die Annahme bestätigt, dass PPL das eigentliche Substrat der NDL-Synthetase ist.

**Tabelle 4-2:** Vergleich der kinetischen Daten von LmbC mit A-Domänen verschiedener NRPS, deren Substrate proteinogene Aminosäuren bzw. Sekundärmetabolismus-spezifische Substanzen sind.

|                                       | A-Domäne<br>(Substrat) | $k_{\text{cat}}$<br>[min <sup>-1</sup> ] | $K_M$<br>[μM] | $k_{\text{cat}} \cdot K_M^{-1}$<br>[min <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ] | Literatur                    |
|---------------------------------------|------------------------|--|---------------|---|------------------------------|
| proteinogene<br>Aminosäuren           | GrsA (L-Phe)           | 690                                      | 70            | 9,9   | Luo <i>et al.</i> , 2001     |
|                                       | HMWP2 (L-Cys)          | 560                                      | 310           | 1   | Keating <i>et al.</i> , 2000 |
|                                       | VibF (L-Thr)           | 920                                      | 2200          | 0,4   | Keating <i>et al.</i> , 2000 |
|                                       | EntF (L-Ser)           | 670                                      | 600           | 1,1   | Ehmann <i>et al.</i> , 2000  |
|                                       | PchF (L-Cys)           | 415                                      | 537           | 0,8   | Quadri <i>et al.</i> , 1999  |
|                                       | PchE (L-Cys)           | 38                                       | 110           | 0,4   | Quadri <i>et al.</i> , 1999  |
| Sek.-metabolismus-<br>spez. Substrate | PchD (Salicylat)       | 74                                       | 2,8           | 27  | Quadri <i>et al.</i> , 1999  |
|                                       | YbtE (Salicylat)       | 230                                      | 4,6           | 50  | Gehring <i>et al.</i> , 1998 |
|                                       | EntE (2,3-DHB)         | 330                                      | 2,7           | 122   | Rusnak <i>et al.</i> , 1989  |
|                                       | VibE (2,3-DHB)         | 138                                      | 0,46          | 63,5  | Keating <i>et al.</i> , 2000 |
|                                       | LmbC (PPL)             | 65                                       | 5,2           | 12,5  | Diese Arbeit                 |

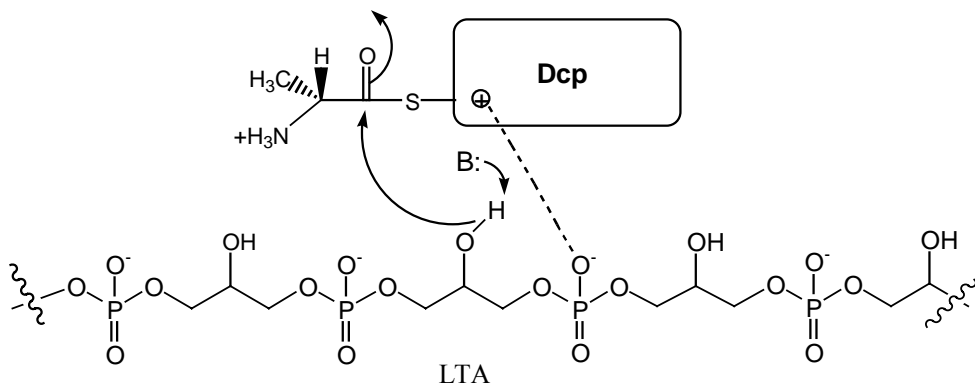
## 4.2 LmbN/LmbPCP, eine Domänenfusion an ein Fremdprotein?

Als zweite Komponente in dem unbekanntem Enzymkomplex der NDH-Synthetase (vgl. Abb. 4-1 A) kam ein Aminoacyl-Carrierprotein (PCP) bzw. eine entsprechende Domäne in Frage, die in ersten Analysen der durch die *lmb*-Gene kodierten Proteine des Lin A-Clusters nicht entdeckt worden war (Peschke *et al.*, 1995). Erst die durch jüngere Daten vermehrten Vergleichsmöglichkeiten erlaubten es im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Carrierprotein-domäne als *N*-terminalen Bestandteil des zuvor als LmbN bezeichneten Genprodukts zu identifizieren (s. Kap. 3.4), so dass sich die Hinweise auf einen NRPS-ähnlichen Kondensationsmechanismus katalysiert durch einen Komplex mit entsprechenden Enzymfunktionen verdichteten.

Acyl-Carrierproteine (ACPs) mit der prosthetischen Gruppe 4'-Ppant waren ursprünglich im Primärmetabolismus bei der Fettsäuresynthese (FAS) entdeckt worden (Larrabee *et al.*, 1965). Später jedoch wurden FAS-ACP-Homologe auch in anderen modular aufgebauten „Biosynthese-Maschinerien“ wie den Polyketidsynthasen (PKS) als Acyl-Carrierproteine (ACPs) und den NRPS als Peptidyl-Carrierproteine (PCPs; Stachelhaus *et al.*, 1996) nachgewiesen. Schließlich wurde der Dcp-Carrierprotein-Typ (Perego *et al.* 1995; Kiriukhin und Neuhaus, 2001; Debabov *et al.*, 1996) nachgewiesen, der in der Lipoteichonsäure-Biosynthese bei der D-Alanylierung als Trägerpeptid des D-Alanylrests diente. Dcps stellen insofern eine spezialisierte Form der ACPs dar und werden wie auch FAS-ACP posttranslational von der Phosphopantethein-Transferase (PPTase) der Fettsäurebiosynthese, AcpS, zur aktiven *holo*-Form modifiziert (Lambalot und Walsh, 1995 und 1997; Debabov *et al.*, 1996). Die Homologie von Dcp zu ACP wurde zusätzlich dadurch untermauert, dass die aktiven *holo*-Formen beider Carrierproteine in Gegenwart von Dcl (Ligase) mit D-Alanylresten beladen werden konnten. Jedoch war im Anschluss nur D-Alanyl-Dcp fähig, den D-Alanylrest auf membrangebundene LTA zu übertragen (Volkman *et al.*, 2001; Abb. 4-5). Abgesehen von den Dcps waren bislang alle Carrierprotein-Typen entweder als integrale Domänen multifunktionaler Polypeptide (in PKS und NRPS vom Typ I) oder als monofunktionale Proteinketten (in PKS und NRPS vom Typ II) bekannt (Du und Chen, 1999). Um so erstaunlicher war die Entdeckung, dass sich am *N*-Terminus des LmbN-Genprodukts die für Dcp-Carrierproteine charakteristische Konsensussequenz der 4'-Ppant Bindestelle befand (s. Kap. 3.4).

Bei der Untersuchung der LmbN-Enzymfunktion wurde daher zunächst versucht, die Konversion der inaktiven *apo*- zur aktiven *holo*-Form nachzuweisen (s. Kap. 3.4.4). Da die

vermutete Carrierproteindomäne gerade an der Bindestelle der prosthetischen Gruppe eine ausgeprägte Ähnlichkeit zu den Dcps aufwies, wurde *E. coli* AcpS (*holo*-ACP Synthase; Flugel *et al.*, 2000) als PPTase eingesetzt, um LmbN bzw. die Carrierproteindomäne LmbPCP mit [<sup>3</sup>H]-4'-Ppant zu modifizieren. Von PPTasen des AcpS-Typs ist bekannt, dass sie lediglich ein enges Substratspektrum besitzen, jedoch in der Lage sind, ACPs der FAS sowie der PKS vom Typ II (Mofid *et al.*, 2002) und Dcps (Debabov *et al.*, 1996) zu modifizieren. Dies war für die Untersuchung von LmbN von besonderem Interesse. Ergänzend wurde die PPTase Sfp aus der Surfactin-Biosynthese von *B. subtilis* (Quadri *et al.*, 1998) zur *in vitro*-Phosphopantetheinylierung des Carrierproteins eingesetzt. Diese besitzt ein deutlich breiteres Substratspektrum und eine Vielzahl von ACP-, PCP- bzw. ArCP-Substraten werden von ihr phosphopantetheinyliert (Lambalot *et al.*, 1996, Mofid *et al.*, 2002); sie ist dagegen wiederum nicht in der Lage, Dcps zu modifizieren.



**Abb. 4-5:** Postulierter Mechanismus der Bildung von membran-assoziiertem D-Alanyl-LTA mit D-Alanyl-Dcp. (B:) symbolisiert einen Protonenakzeptor (nicht identifiziert, möglicherweise Aminosäurerest des Dcp). Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen LTA und Dcp ist durch die gestrichelte Linie angedeutet (Kiriukhin und Neuhaus, 2001).

Das heterolog produzierte LmbN konnte jedoch weder durch Sfp noch durch AcpS nachweislich mit [<sup>3</sup>H]-4'-Ppant modifiziert werden. Dies ließ die Schlussfolgerungen zu, dass es entweder von keiner der beiden PPTasen als Substrat erkannt wurde oder aber dass das untersuchte LmbN aus der *S. lividans*-Expression bereits vollständig modifiziert vorlag und deswegen keine zusätzliche Bindung von [<sup>3</sup>H]-4'-Ppant an das *holo*-LmbN nachgewiesen werden konnte. Für ersteres sprach die Tatsache, dass LmbN zwar von AcpS nicht phosphopantetheinyliert wurde, aber durch Entfernen der putativen Zuckerphosphat-Isomerase zumindest eine teilweise Modifikation von LmbPCP (einem „*pseudo*-Dcp“) erzielt

werden konnte. Dass die Bildung von *holo*-LmbPCP nicht durch Sfp katalysiert werden konnte, deckte sich mit den Erwartungen. Und das Ergebnis, dass sich LmbPCP nachträglich nur zu einem Bruchteil mit der radioaktiv-markierten 4'-Pant-Gruppe modifizieren ließ, lässt sich einleuchtend dadurch erklären, dass das *E. coli* AcpS die posttranslationale Modifikation des *apo*-Proteins wahrscheinlich während der Überexpression katalysiert hatte (Guerra *et al.*, 1988; Gehring *et al.*, 1997; Broadwater und Fox, 1999; Cox *et al.*, 1997).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnten zur Erklärung des Mechanismus, der zur Verknüpfung der beiden biochemisch einzigartigen Untereinheiten PPL und MTL führt, drei alternative Hypothesen entwickelt werden:

1. Die minimale Enzymausstattung, die für die Verknüpfung der beiden Untereinheiten des Lin A denkbar war, bestand aus (i) dem PPL-AMP-bildenden LmbC, welches gleichzeitig die Substratspezifität bezüglich der Aminosäureuntereinheit gewährleistet und aus (ii) LmbN, dem Carrierprotein des Dcp-Typs. Dafür müsste LmbN in seiner *holo*-Form mit PPL beladen werden können und anschließend dazu in der Lage sein, die aktivierte Aminosäure auf freies MTL zu übertragen. Für diese Hypothese sprach allerdings nur die Ähnlichkeit zu Dcps und die Tatsache, dass das D-Alanyl-Dcp fähig ist, seinen D-Alanylrest auf eine Hydroxylgruppe sowohl membrangebundener als auch freier LTA zu übertragen (vgl. Abb. 4-5). Für die Dcp-Carrierproteine wurde daher postuliert, dass es zwischen einem positiv geladenen Argininrest (Arg<sub>67</sub> im Dcp aus *Lactobacillus casei*) und der negativen Ladung des polymeren Phosphorsäurediesters LTA zu elektrostatischen Wechselwirkungen kommt, die die Übertragung des D-Alanylrests ermöglichen (Kiriukhin und Neuhaus, 2001). Die Komplementationsergebnisse der *lmbN*-Mutanten würden diese Theorie sogar unterstützen, da das Genfragment, das allein für die Carrierproteindomäne kodierte, die Antibiotika-Biosynthese ebenso wiederherstellen konnte wie das komplette *lmbN*<sub>1-828</sub>-Gen. Jedoch erscheint es nicht plausibel, dass eine Kondensation zwischen enzymgebundenem PPL und löslichem MTL alleine an LmbPCP in gerichteter Weise ablaufen sollte. Die Voraussetzungen der Dcp- und LmbN-katalysierten Reaktionen sind dahingehend in entscheidender Weise unterschiedlich, dass Lipoteichonsäure ein Polymer mit vielen für die D-Alanylierung gleichwertigen Hydroxylgruppen ist, während die Aminogruppe des monomeren MTLs mit den im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen konkurriert und somit einer viel strikteren Substratbindung bedarf. Daher war es wahrscheinlich auch nicht gelungen, ND<sub>L</sub> aus MTL und PPL *in vitro* durch die Enzyme LmbC und LmbN zu synthetisieren.

2. Eine gerichtete Kondensation zwischen Thioester-gebundenem PPL und der Aminogruppe des MTL kann nur dann ohne eine separate „Condensase“ ablaufen, die die eigentliche Verknüpfung der Untereinheiten katalysiert, wenn die die Aminogruppe präsentierende Zuckeruntereinheit zumindest ebenfalls enzymgebunden vorliegt. Ein entsprechender Mechanismus liegt nach Lauer *et al.* (2000) der Peptidbindungsbildung zwischen Hydroxypyridylhomothreonin und einem Nucleosidbaustein in der Nikkomycin-Biosynthese in *Streptomyces tendae* Tü901 zugrunde. Auch in der Nikkomycin-Biosynthese konnte bislang noch keine Kondensationsdomäne identifiziert werden, allerdings sind beide zu verknüpfenden Untereinheiten jeweils an ein PCP gebunden (vgl. Abb. 4-3 C). Ein naheliegendes Polypeptid, welches die MTL-Bindung übernehmen könnte, wäre die mit dem Carrierprotein fusionierte Isomerase-Domäne des LmbN, die ein typisches Zuckerbindemotiv besitzt. Jedoch ist dieses Zuckerbindemotiv nur charakteristisch für Isomerasen, die phosphorylierte Zuckermoleküle umsetzen. Über die Eigenschaften des Bindemotivs bezüglich beispielsweise thiomethylierter (MTL) Zucker ist nichts bekannt. Allerdings widerspricht diese Hypothese den Ergebnissen aus den Komplementationsexperimenten der *lmbN*-Mutante *S. lincolnensis* NDC9 (s. Kap. 3.5.4), wonach der Isomerase-Domäne keine Funktion in der Biosynthese zukommt. Ihre ebenfalls postulierte Funktion in der MTL-Synthese könnte hingegen durch eine andere, zweite Isomerase kompensiert werden. Die zur Überprüfung der ersten beiden Thesen generierten, rekombinanten *E. coli*- und *S. lividans*-Stämme, die mit *lmbC* und *lmbN* bzw. *lmbPCP* transformiert und deren Rohextrakte für die *in vitro* NDL-Synthese eingesetzt wurden, konnten diese Annahmen nicht bestätigen. Die Bildung von NDL konnte in keinem der während dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* und *in vitro* Experimente nachgewiesen werden. Da davon ausgegangen werden muss, dass das heterolog produzierte LmbC in allen Rohextrakten aktiv war, muss einer der darauf folgenden Biosyntheseschritte unterbrochen gewesen sein. Der entscheidende Schritt könnte dabei z.B. die Synthese der aktiven *holo*-Form des Carrierproteins gewesen sein. Es muss angenommen werden, dass es in *S. lincolnensis* für das bifunktionelle LmbN-Protein eine eigene, spezifische PPTase gibt. Offensichtlich hatte die Konversion der *apo*- in die *holo*-Form bei heterologer Expression nicht ausgereicht, um genügend NDL durch die zellfreien Extrakte zu bilden.

3. Ein Kondensationsmechanismus, der ähnlich demjenigen der NRPS verläuft (vgl. Abb. 4-1 C) und neben den beiden Enzymproteinen LmbC und LmbN noch mindestens zwei weitere Enzyme erfordern würde, ist nach wie vor am besten mit allen bisherigen Ergebnissen vereinbar. Gene für ein MTL-bindendes Enzym (bzw. eine „MTL-Synthase“) und eine

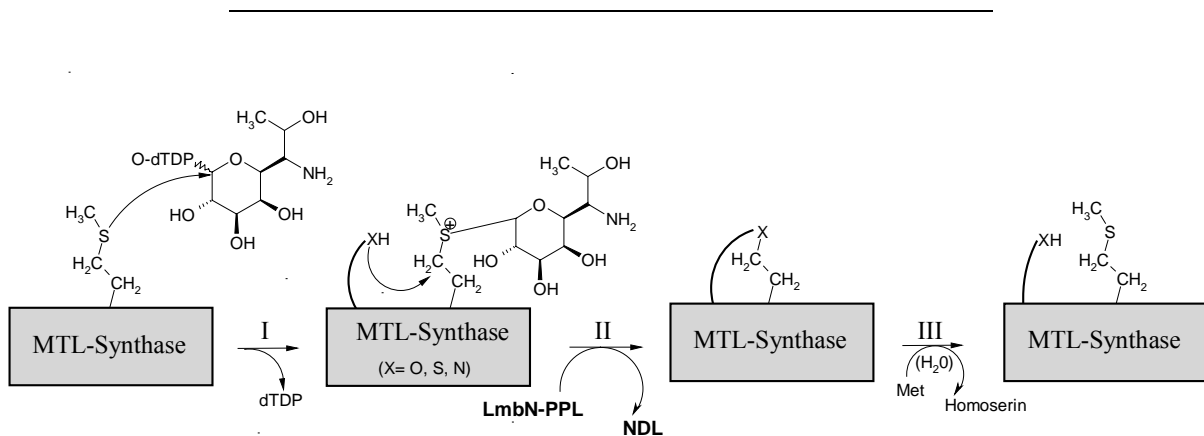
„Condensase“ konnten bislang jedoch im *lmb*-Biosynthesecluster noch nicht identifiziert werden. Diese Condensase allein aufgrund ihrer Aminosäuresequenz unter den potentiellen Lin A-Biosyntheseenzymen zu identifizieren, ist derzeit unmöglich, da es keine vergleichbaren Beispiele gibt; z.B. wurde keine typische Glykosyltransferase gefunden, so dass auch die Einführung der Thiomethylgruppe am C1 der Lincosamin-Untereinheit noch offen ist und in den Kondensationsschritt einbezogen sein kann. Für diese Hypothese spricht u.a., dass für die Kondensation ein Komplex aus mehreren, reversibel dissoziierbaren Untereinheiten verantwortlich sein könnte (Chung *et al.*, 1997). Darüber hinaus steht sie im Einklang mit den Ergebnissen der phänotypischen Untersuchungen der Tn4556-Transposonmutagenese (Chung *et al.*, 1997), der Komplementationsexperimente, sowie den in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur *in vitro* NDL-Synthese.

Die Vermutung ist naheliegend, dass es neben LmbC und LmbN zusätzlicher Komplex-Komponenten bedarf, die die aktive NDL-Synthetase bilden (vgl. Abb. 4-1 A), denn damit könnte nachvollziehbar argumentiert werden, warum die Beladung der *holo*-Form des Carrierproteins mit [<sup>3</sup>H]-PPL nicht gelang. Die Beladung von autonomen PCPs in *trans* mit aktivierten Aminosäuren durch heterologe A-Domänen war lange Zeit untersucht aber nicht nachweisbar gewesen. Sie konnte selbst bei homologen A-Domänen (gewöhnlich in *cis* vorliegend) nur in wenigen Fällen und mit nur geringer Effizienz nachgewiesen werden (Stachelhaus, *et al.*, 1996; Weinreb *et al.*, 1998). Das BlmI des Bleomycin-Biosyntheseapparates, in dem PKS und NRPS kombiniert vorliegen (Du *et al.*, 2000), ist das bisher einzige separat vorkommende PCP-Protein (Typ I), das heterolog aminoacyliert werden konnte (Du und Chen, 1999): BlmI wurde *in vitro* durch die nicht-komplementäre Valin-aktivierende A-Domäne desselben Organismus beladen. Unter den *in vitro* Reaktionsbedingungen bei den Versuchen zur Aminoacylierung von LmbN mit PPL war das Carrierprotein anscheinend nicht in der Lage mit LmbC Wechselwirkungen einzugehen, die für eine physiologische *trans* Erkennung nötig gewesen wären. Beide Enzyme verhielten sich so wie ein nicht verwandtes A-Domänen/Carrierprotein-Paar, so dass es zu keiner nachweisbaren Bindung der aktivierten Aminosäure an das Trägerprotein kam. Allem Anschein nach ist daher LmbN nur im intakten Komplex aktiv, oder aber die Proteine waren *in vitro* inaktiv.

Darüber hinaus ist es immer noch fraglich, ob freies MTL überhaupt das direkte Substrat der Kondensation ist, oder ob ein z.B. kovalent enzymgebundener Metabolit der eigentliche Reaktionspartner ist. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse sind in dieser Hinsicht weder eindeutig noch gut dokumentiert. Bei den Fütterungsexperimenten (Argoudelis *et al.*, 1965)



war ein enormer Überschuß an MTL im Fermentationsmedium notwendig, um in sogenannten „ruhenden“ *S. lincolnensis*-Zellen neben Lin A auch NDL zu akkumulieren. In späteren Experimenten, die zum Ziel hatten, [ $^{14}\text{C}$ ]-markiertes NDL zu produzieren, wurde eine Mutante eingesetzt, die weder fähig war MTL zu synthetisieren noch die *N*-Methylierung des NDLS durchzuführen. Auch bei diesen Experimenten war MTL in einem hohen Überschuss zugefüttert worden (Hausknecht *et al.*, 1987). Beide Ergebnisse wurden darauf zurückgeführt, dass MTL schlecht in die Zellen aufgenommen worden war. Jedoch wurde der MTL-Flux in die Zelle nie untersucht. Es wäre daher ebenso denkbar, dass der nucleotid-aktivierte Zucker dTDP-Lincosamin das natürliche Substrat des Kondensationskomplexes ist und die Thiomethylierung der anomeren Position erst im Komplex durch eine mit der Condensase gekoppelte MTL-Synthase (vgl. Abb. 4-1 A; Abb. 4-6) erfolgt.



**Abb. 4-6:** Postulierter Mechanismus einer MTL-Synthase. (I) Bildung einer enzymgebundenen MTL-Zwischenstufe; (II) Reaktion von MTL mit LmbN-gebundenem PPL in der NDLSynthetase und Freisetzung von NDLS; (III) Regeneration der MTL-Synthase durch Verbrauch von Methionin als Thiomethylgruppen-Donor.

Der postulierte Mechanismus der MTL-Synthase könnte die für die Kondensation essentielle Bindung der Zuckeruntereinheit gewährleisten, indem als Zwischenprodukt ein ans Enzym gebundenes MTL aus dTDP-Lincosamin gebildet würde. In einer derartigen Reaktion, in der die MTL-Synthase in der von ihr katalysierten Reaktion „verbraucht“ wird, indem sie die Thiomethylgruppe eines Methioninrests überträgt, müsste es einen gleichzeitig ablaufenden Mechanismus der Regeneration der Methioninseitenkette geben. Möglicherweise wird die Freisetzung des NDLS durch ein intramolekulares Nukleophil eingeleitet, so dass anschließend die Regeneration der MTL-Synthase durch Thiomethylgruppen-Transfer aus Methionin stattfinden kann. Die Existenz einer derartigen MTL-Synthase mit dem dTDP-

Lincosamin als Substrat würde erklären, warum MTL fast nicht in NDL eingebaut wurde. Entgegen den bisherigen Annahmen wäre MTL in dem neu entwickelten Mechanismus des Kondensationsprozesses kein Substrat der NDL-Synthetase.

Allerdings ist das Protein LmbF vermutlich eine ACC-Synthase (1-Aminocyclopropan-1-carboxylat Synthase, E.C. 4.4.1.14; *S*-Adenosyl-L-methionin-Methylthioadenosin-Lyase), die das für die Thiomethylierung an einer Transferase benötigte Coenzym Methylthioadenosin bereitstellen könnte.

### 4.3 Perspektiven

Aus biokombinatorischer Sicht bot die Knock-out-Mutation in *lmbC* die Aussicht auf die Synthese neuer Leitstrukturen, da die A-Domänen neben der designierten Aktivierungsfunktion zusätzlich auch die Substratselektion übernehmen. Somit wäre es theoretisch möglich durch heterologe Komplementation der *lmbC*-Mutante mit Genen anderer A-Domänen solche Lincomycin-Derivate zu erhalten, die statt PPL andere Amino-, Hydroxy- oder Carboxysäuren besitzen. Dies hätte zur Voraussetzung, dass es auch mit den „Fremdenzymen“ zur Bildung eines aktiven Synthetasekomplexes kommen würde. Da es jedoch beim Zustandekommen eines aktiven NDLSynthetase-Enzymkomplexes möglicherweise wesentlich auf Protein-Protein-Wechselwirkungen ankommt, ist das Risiko des Entstehens inaktiver Kondensationskomplexe sehr groß. Als Alternative wäre der Austausch einiger zentraler, die Spezifität bestimmender Aminosäurereste der Substratbindetasche (vgl. Abb. 4.3, Tab. 4-1) sinnvoll, um potentiell neue Leitstrukturen *in vivo* zu synthetisieren. Die Proteinoberfläche stünde nämlich nach der Einführung der nötigen Mutationen weiter unverändert für Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Verfügung. Erste Erfolge mit diesem rationalen Ansatz, die Spezifität von A-Domänen *in vitro* und *in vivo* durch selektive Mutation einzelner Aminosäurereste zu verändern, gelangen bereits Eppelmann *et al.* (2002). Dabei war es gelungen, durch Mutation eines einzelnen Aminosäurerests (K<sub>239</sub>Q) die Selektivität der Glutamin A-Domäne in der Surfactin Synthetase A *in vitro* so zu verändern, dass sie zu einer Glutamat-aktivierenden Domäne wurde, ohne dass die katalytische Effizienz beeinträchtigt war. Die erzielte Änderung der Enzymspezifität entsprach dabei genau den Erwartungen auf der Basis des Selektivitäts-vermittelnden Codes der Signatursequenz. Darüber hinaus wurde eine *B. subtilis*-Mutante mit einem singulären Austausch (H<sub>322</sub>E) im zweiten Modul der Surfactin-Synthetase B hergestellt, dessen Substratspezifität von Aspartat zu Asparagin geändert war und die tatsächlich *in vivo* das bis dahin unbekannte Lipopeptid [Asn(5)]-Surfactin synthetisierte.

Biotechnisch ebenso interessant wäre z.B. ein Lincomycin-Derivat, das aus der Verknüpfung von MTL mit 4-Hydroxy-L-prolin hervorgehen würde, da die Hydroxylgruppe z.B. als Ether oder Ester weiter funktionalisierbar wäre. Hierfür könnte zumindest *LmbC* durch entsprechende Aminosäureaustausche in wenigen der in der Tabelle 4-1 genannten Substrat-Erkennungspositionen umprogrammiert werden. Es könnte dazu z.B. ausreichen, den Aminosäurerest Ala<sub>239</sub> gegen einen polaren, sterisch anspruchsvolleren auszutauschen.

Aus den oben genannten Gründen war die Identifizierung weiterer Untereinheiten der NDL-Synthetase bisher unmöglich. Lin A-Biosynthesepoteine, die für diese beiden neben LmbC und LmbN noch notwendigen Biosynthese-Funktionen in Frage kommen könnten, sind LmbT und LmbV. Beiden Enzymprodukten wurde bislang noch keine Funktion innerhalb der Biosynthese zugeschrieben und in den dazugehörigen Genen führte die Integration des Tn4556-Transposons zu einem Phänotyp, der auf eine Unterbrechung der Kondensationsreaktion schließen ließ (Chung *et al.*, 1997). Da es bislang noch nicht gelungen ist, die NDL-Synthetase als intakten Enzymkomplex zu isolieren, könnte zukünftig durch *in vitro* Rekonstitution des Komplexes aus den überexprimierten Proteinen der Beweis für die Beteiligung einzelner Komponenten erfolgen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Admiraal, S.J., Walsh, C.T. und Khosla, C. (2001) The loading module of rifamycin synthetase is an adenylation-thiolation didomain with substrate tolerance for substituted benzoates. *Biochemistry*, **40**: 6116-23.
- Altenbuchner, J. (1999) pers. Mitteilung.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990) Basic logical alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410.
- Argoudelis, A.D. und Brodasky, T.F. (1972) Studies with *Streptomyces caelestis*: I. New celesticetins. *J. Antibiot.*, **25**: 194-6.
- Argoudelis, A.D. und Coats, J.H. (1973) U.S. Patent No. 3,726,766.
- Argoudelis, A.D. und Coats, J.H. (1974), U.S. Patent No. 3,812,014.
- Argoudelis, A.D., Coats, J.H. und Pyke, T.R. (1972) U.S. Patent No. 3,697,380.
- Argoudelis, A.D., Eble, T.E. und Mason, D.J. (1970) Effect of ethionine on fermentations of *S. lincolnensis*. *J. Antibiot.*, **23**: 1-8.
- Argoudelis, A.D., Eble, T.E., Fox, J.A. und Mason, D.J. (1969) Studies on the biosynthesis of lincomycin. IV. The origin of methyl groups. *Biochemistry*, **8**: 3408-11.
- Argoudelis, A.D., Fox, J.A., Mason, D.J. und Eble, T.E. (1964) New lincomycin related antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**: 5044-5.
- Argoudelis, A.D., Johnson, L.E. und Pyke, T.R. (1973) Effect of methylation inhibitors on fermentations of *S. lincolnensis*-production of N-demethylincomycin. *J. Antibiot.*, **26**: 429-36.
- Arnold A. (2000) Untersuchungen zur Biosynthese der Methylthiolincosaminid (MTL) Untereinheit des Antibiotikums Lincomycin A aus *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936. Dissertation BUGH Wuppertal.
- Asmus, P.A. und Landis, J.B. (1983) Liquid chromatographic determination of lincomycin in fermentation beers. *J. Chromatogr.*, **264**: 241-8.
- August, P.R., Tang, L., Yoon, Y.J., Ning, S., Müller, R., Yu, T.-W., Taylor, M., Hoffmann, D., Kim, C.-G., Zhang, X., Hutchinson, C.R. und Floss, H.G. (1998) Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.*, **5**: 69-79.
- Babcock, M.J. und Kendrick, K.E. (1988) Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, **170**: 2802-8.

- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S.R., Howe, K.L. und Sonnhammer, E.L. (2000) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 263-6.
- Bauer, B.A., Stevens, M.K. und Hansen, E.J. (1998) Involvement of the *Haemophilus ducreyi* *gmhA* gene product in lipooligosaccharide expression and virulence. *Infect. Immun.*, **66**: 4290-8
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L. *et al.* und Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, **417**: 141-7.
- Bergy, M.E., Coats, J.H. und Malik, V.S (1975) Belgium Patent No. 830,068.
- Bibb, M.J., Findlay, P.R. und Johnson, M.W. (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**: 157-66.
- Bibb, M.J., Janssen, G.R. und Ward, J.M. (1985) Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, **38**: 215-26.
- Birch, A., Häusler, A. und Hütter, R., (1990 ) Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.*, **172**: 4138-42.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**: 1513.
- Bjerrum, O.J. und Schäfer-Nielsen, C. (1986) Buffer systems and transfer parameters for semi-dry electroblotting with a horizontal apparatus. In: Dunn M.J. (Eds.) Analytical Electrophoresis, S. 315-327, Verlag Chemie, Weinheim.
- Blanco, G., Rodico, M.R., Puglia, A.M., Mendez, C., Thompson, C.J. und Salas, J.A. (1994) Synthesis of ribosomal proteins during growth of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.*, **12**: 375-85.
- Blondelet-Rouault, M.H., Weiser, J., Lebrihi, A., Branny, P. und Pernodet, J.L. (1997) Antibiotic resistance gene cassettes derived from the omega interposon for use in *E. coli* and *Streptomyces*. *Gene*, **190**: 315-7.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. und Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.*, **11**: 731-53.
- Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M.S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J. und Leclercq, R. (1999) A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**: 925-9.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-54.

- Brahme, N.M., Gonzalez, J.E., Rolls, J.P., Hessler, E.J., Mizensak, S. und Hurley, L.H. (1984b) Biosynthesis of the lincomycins. 2. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of methylthiolincosaminide moiety of lincomycin A. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**: 7878-83.
- Brahme, N.M., Gonzalez, J.E., Rolls, J.P., Hessler, E.J., Mizensak, S. und Hurley, L.H., (1984a) Biosynthesis of the lincomycins. 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycins A and B. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**: 7873-8.
- Bräu, B. und Piepersberg, W. (1985) Purification and characterization of a plasmid-encoded aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase IV from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **185**: 43-6.
- Broadwater, J.A. und Fox, B.G. (1999) Spinach holo-acyl carrier protein: overproduction and phosphopantetheinylation in *Escherichia coli* BL21(DE3), in vitro acylation, and enzymatic desaturation of histidine-tagged isoform I. *Protein Expr. Purif.*, **15**: 314-26.
- Brook, J.S. und Valvano, M.A. (1996a) Molecular cloning of the *Haemophilus influenzae* *gmhA* (*lpcA*) gene encoding a phosphoheptose isomerase required for lipooligosaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **178**: 3339-41.
- Brook, J.S. und Valvano, M.A. (1996b) Biosynthesis of the inner core lipopolysaccharide in enteric bacteria identification and characterization of a conserved phosphoheptose isomerase. *J. Biol. Chem.*, **271**: 3608-14.
- Bruntner, C., Lauer, B., Schwarz, W., Möhrle, V. und Bormann C. (1999) Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tü901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *Mol. Gen. Genet.*, **262**: 102-14.
- Cane, D.E. und Walsh, C.T. (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.*, **6**: 319-25.
- Challis G.L., Ravel J. und Townsend C.A. (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.*, **3**: 211-24.
- Champness, W.C. und Chater, K.F. (1993) Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp. In: Piggot P., Youngman P. und Moran C. (Hrsg.) Regulation of Bacterial Differentiation. S. 61-93, Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.
- Chater, K.F. (1993) Genetics of differentiation in Streptomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**: 685-713.
- Chen, S., von Bamberg, D., Hale, V., Breuer, M., Hardt, B., Müller, R., Floss, H.G., Reynolds, K.A. und Leistner, E. (1999) Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin. Identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* 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**: 156-9.
- Chung, S.T. und Crose, L.L. (1990) Transposon Tn4556 mediated DNA insertion and site-directed mutagenesis. In: *Genetics of Industrial Microorganisms 1990 Proceedings, Vol. I.*, Ed.: Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L., Durand, G. und Penasse, L., S. 207-218. Strasbourg: Société Française de Microbiologie.
- Chung, S.T., Manis, J.J., McWethy, S.J., Patt, T.E., Witz, D.F., Wolf, H.J. und Wovcha, M.G. (1997) Fermentation, biosynthesis, and molecular genetics of lincomycin. In: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, 2<sup>nd</sup> Edn. Strohl, W.R. (ed.). Marcel-Dekker, Inc. New York.
- Coats, J.H., Li, G.P., Kuo, M.T. und Yurek, D.A. (1989) Discovery, production, and biological assay of an unusual flavenoid cofactor involved in lincomycin biosynthesis. *J. Antibiot.*, **42**: 472-4.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. und Brick, P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.*, **14**: 4174-83.
- Cox, R.J., Hitchman, T.S., Byrom, K.J., Findlow, I.S., Tanner, J.A., Crosby, J. und Simpson, T.J. (1997) Post-translational modification of heterologously expressed *Streptomyces* type II polyketide synthase acyl carrier proteins. *FEBS Lett.*, **405**: 267-72.
- Cundliffe, E. (1989) How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.*, **43**: 207-33.
- de Crecy-Lagard, V., Saurin, W., Thibaut, D., Gil, P., Naudin, L., Crouzet, J. und Blanc, V. (1997) Streptogramin B biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* and *Streptomyces virginiae*: molecular characterization of the last structural peptide synthetase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**: 1904-9.
- Debabov, D.V., Heaton, M.P., Zhang, Q., Stewart, K.D., Lambalot, R.H. und Neuhaus, F.C. (1996) The D-alanyl carrier protein in *Lactobacillus casei*: cloning, sequencing, and expression of *dltC*. *J. Bacteriol.*, **178**: 3869-76.
- Debabov, D.V., Kiriukhin, M.Y. und Neuhaus FC. (2000) Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: role of DltD in D-alanylation. *J. Bacteriol.*, **182**: 2855-64.
- DeBoer, C., Dietz, A., Wilkins, J.R., Lewis, C.N. und Savage, G.M. (1955), Celesticetin-a new, crystalline antibiotic. I. Biologic studies of celesticetin. *Antibiot. Ann.*, **2**: 831-6.
- Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Döhren, H. und Kleinkauf, H. (1995) Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett.*, **357**: 212-6.



- Distler, J. und Piepersberg, W. (1985) Cloning and characterization of a gene coding for a streptomycin-phosphorylating activity from *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **28**: 113-7.
- Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U.F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.M., Piepersberg, W. und Raynal, M.C. (2000) Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.*, **264**: 477-85.
- Du, L. und Shen, B. (1999) Identification and characterization of a type II peptidyl carrier protein from the bleomycin producer *Streptomyces verticillus* ATCC 15003. *Chem. Biol.*, **6**: 507-17.
- Du, L. und Shen, B. (2001) Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **4**: 215-28.
- Du, L., Sanchez, C., Chen, M., Edwards, D.J. und Shen, B. (2000) The biosynthetic cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem. Biol.*, **7**: 623-42.
- Dubendorff, J.W. und Studier, F.W. (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, S.M. und Schleif, R.F. (1993) A regulatory cascade in the induction of *rhaBAD*: *J. Mol. Biol.*, **234**: 87-98.
- Ehmann, D.E., Shaw-Reid, C.A., Losey, H.C. und Walsh, C.T. (2000) The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 2509-14.
- Eirich, L.D., Vogels, G.D. und Wolfe, R.S. (1978) Proposed structure for coenzyme F<sub>420</sub> from *Methanobacterium*. *Biochemistry*, **17**: 4583-93.
- Eppelmann, K., Doekel, S. und Marahiel, M.A. (2001) Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **276**: 34824-31.
- Eppelmann, K., Stachelhaus, T. und Marahiel, M.A. (2002) Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry*, **41**: 9718-26.
- Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1992) Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genet.*, **26**: 479-506.
- Ferretti, J.J., McShan, W.M., Ajdic, D.J. *et al.* und McLaughlin, R. (2001) Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 4658-63.

- Fitzhugh, A.L. (1998) Antibiotic inhibitors of the peptidyl transferase center. 1. Clindamycin as a composite analogue of the transfer RNA fragments L-Pro-Met and the D-ribose ring of adenosine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**: 87-92.
- Flugel, R.S., Hwangbo, Y., Lambalot, R.H., Cronan, J.E. Jr. und Walsh, C.T. (2000) Holo-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **275**: 959-68.
- Gatignol, A., Durand, H. und Tiraby, G. (1988) Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett.*, **230**: 171-5.
- Gause, G.F., Lapchinskaya, O.A., Sveshnikova, M.A., Preobrazhenskaya, T.P., Ukholina, R.S., Nechaeva, N.P., Pogozheva, V.V., Korobkova, T.P. und Trenina, G.A. (1975) UDSSR Patent No. 287,743.
- Gehring, A.M., Bradley, K.A. und Walsh, C.T. (1997) Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry*, **28**: 8495-503.
- Gehring, A.M., Lambalot, R.H., Vogel, K.W., Drückhammer, D.G. und Walsh, C.T. (1997) Ability of *Streptomyces* spp. acyl carrier proteins and coenzyme A analogs to serve as substrates in vitro for *E. coli* holo-ACP synthase. *Chem. Biol.*, **4**: 17-24.
- Ghisalba, O. und Nüesch J. (1981) A genetic approach to the biosynthesis of the rifamycin-chromophore in *Nocardia mediterranei*. IV. Identification of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid as a direct precursor of the seven-carbon amino starter-unit. *J. Antibiot.*, **34**: 64-71.
- Giordano, T.J., Deuschle, U., Bujard, H. und McAllister, W.T. (1989) Regulation of coliphage T3 and T7 RNA polymerases by the *lac* repressor-operator system. *Gene*, **84**: 209-19.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C. *et al.* und Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, **294**: 849-52.
- Glaser, P., Kunst, F., Arnaud, M., Coudart, M.P. *et al.* und Danchin, A. (1993) *Bacillus subtilis* genome project: cloning and sequencing of the 97 kb region from 325 degrees to 333 degrees. *Mol. Microbiol.*, **10**: 371-84.
- Gourmelen, A., Blondelet-Rouault, M.H. und Pernodet, J.L. (1998) Characterization of a glycosyl transferase inactivating macrolides, encoded by *gimA* from *Streptomyces ambofaciens*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**: 2612-9.
- Guerra, D.J., Dziewanowska, K., Ohlrogge, J.B. und Beremand, P.D. (1988) Purification and characterization of recombinant spinach acyl carrier protein I expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **263**: 4386-91.
- Haese, A., Pieper, R., von Ostrowski, T. und Zocher, R. (1994) Bacterial expression of catalytically active fragments of the multifunctional enzyme enniatin synthetase. *J. Mol. Biol.*, **243**: 116-22.

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-80.
- Hausknecht, E.C. und Wolf, H.J. (1986) Preparation and purification of [<sup>14</sup>C] labelled N-demethyl lincomycin and propylproline from [<sup>14</sup>C] tyrosine. *J. labelled Compounds Radiopharmaceuticals*, **24**: 247-253.
- Heaton, M.P. und Neuhaus, F.C. (1994) Role of the D-alanyl carrier protein in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid. *J. Bacteriol.*, **176**: 681-90.
- Higuchi, R. (1990) Recombinant PCR. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, S. 177-83, Academic Press.
- Hoeksema, H., Bannister, B., Birkenmayer, R.D., MacKellar, F.A., Kagan, F., Magerlein, B.J., Schroeder, W., Slomp, G., und Herr, R.R. (1964) Chemical studies on lincomycin. I: The structure of lincomycin. *J. Am. Chem. Soc.*, **68**: 4223-4
- Hoeksema, H., Crum, G.F. und deVries, W.H. (1955) Isolation and purification of celesticetin. *Antibiot. Ann.*, **2**: 837-841.
- Holt, T.G., Chang, C., Laurent-Winter, C., Murakami, T., Garrels, J.I., Davies, J.E. und Thompson, C.J. (1992) Global changes in gene expression related to antibiotic synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Mol. Microbiol.*, **6**: 969-80.
- Hori, K., Yamamoto, Y., Tokita, K., Saito, F., Kurotsu, T., Kanda, M., Okamura, K., Furuyama, J. und Saito, Y. (1991) The nucleotide sequence for a proline-activating domain of gramicidin S synthetase 2 gene from *Bacillus brevis*. *J. Biochem. (Tokyo)*, **110**: 111-9.
- Husi, H., Schörgendorfer, K., Stempfer, G., Taylor, P. und Walkinshaw, M.D. (1997) Prediction of substrate-specific pockets in cyclosporin synthetase. *FEBS Lett.*, **414**: 532-6.
- Ishikawa, J. und Hotta, K. (1999) FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiol. Lett.*, **174**: 251-3.
- Jackowski, S. und Rock, C.O. (1983) Ratio of active to inactive forms of acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **258**: 15186-91.
- Jackowski, S. und Rock, C.O. (1984) Metabolism of 4'-phosphopantetheine in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **158**: 115-20.
- Keating, T.A., Marshall, C.G. und Walsh, C.T. (2000a) Vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*: VibH is an amide synthase homologous to nonribosomal peptide synthetase condensation domains. *Biochemistry*, **39**: 15513-21.
- Keating, T.A. und Walsh, C.T. (1999) Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**: 598-606

- Keating, T.A., Suo, Z., Ehmann, D.E. und Walsh, C.T. (2000b) Selectivity of the yersiniabactin synthetase adenylation domain in the two-step process of amino acid activation and transfer to a holo-carrier protein domain. *Biochemistry*, **39**: 2297-306.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. und Hopwood, D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, John Innes Foundation.
- Kiriukhin, M.Y. und Neuhaus, F.C. (2001) D-alanylation of lipoteichoic acid: role of the D-alanyl carrier protein in acylation. *J. Bacteriol.*, **183**: 2051-8.
- König, A., Schwecke, T., Molnar, I., Bohm, G.A., Lowden, P.A., Staunton, J. und Leadlay, P.F. (1997) The pipecolate-incorporating enzyme for the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin—nucleotide sequence analysis, disruption and heterologous expression of rapP from *Streptomyces hygroscopicus*. *Eur. J. Biochem.*, **247**:526-34.
- Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K. und Marahiel, M.A. (1997) The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem. Biol.*, **4**: 927-37.
- Korn-Wendisch, F. und Kutzner, H.J. (1991) The family Streptomycetaceae. In: *The Prokaryotes Vol. II*, Ed.: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer, K.H., S. 921-95, New York: Springer Verlag.
- Kuo, M.S., Yurek, D.A., Coats, J.H. und Li, G.P. (1989) Isolation and identification of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin, an unusual cosynthetic factor in *Streptomyces* from *Streptomyces linconensis*. *J. Antibiot.*, **42**: 475-8.
- Kuo, M.S., Yurek, D.A., Coats, J.H., Chung, S.T. und Li, G.P. (1992) Isolation and identification of 3-propylidene- $\Delta^7$ -pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *J. Antibiot.*, **45**: 1773-7.
- Lacalle, R.A., Pulido, D., Vara, J., Zalacain, M. und Jiminez, A. (1989) Molecular analysis of the *pac* gene encoding a puromycin N-acetyl transferase from *Streptomyces alboniger*. *Gene*, **79**: 375-80.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-5.
- Lambalot, R.H. und Walsh, C.T. (1995) Cloning, overproduction, and characterization of the *Escherichia coli* holo-acyl carrier protein synthase. *J. Biol. Chem.*, **42**: 24658-61.
- Lambalot, R.H. und Walsh, C.T. (1997) Holo-[acyl-carrier-protein] synthase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, **279**: 254-62.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M, Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. und Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.*, **11**: 923-36.

- Larrabee, A.R., McDaniel, E.G., Bakerman, H.A. und Vagelos, P.R. (1965) Acyl carrier protein. V. Identification of 4'-phosphopantetheine bound to a mammalian fatty acid synthetase preparation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**: 267-73.
- Lauer, B., Süssmuth, R., Kaiser, D., Jung, G. und Bormann C. (2000) A putative enolpyruvyl transferase gene involved in nikkomycin biosynthesis. *J. Antibiot.* (Tokyo), **53**: 385-92.
- Lee, S.G. und Lipmann, F. (1975) Tyrocidine synthetase system. *Methods Enzymol.*, **43**: 585-602.
- Lin, G.H., Chen, C.L., Tschen, J.S., Tsay, S.S., Chang, Y.S. und Liu, S.T. (1998) Molecular cloning and characterization of fengycin synthetase gene *fenB* from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **180**: 1338-41.
- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A. und Chen, C.W. (1993) The chromosomal DNA of *S. lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.*, **10**: 923-33.
- Lydiate, D.J., Ikeda, H. und Hopwood, D.A. (1986) A 2.6 kb DNA sequence of *Streptomyces coelicolor* A3(2) which functions as a transposable element. *Mol. Gen. Genet.*, **203**: 79-88.
- Magerlein, B.J., Birkenmayer, R.D. und Kagan, F. (1967) Lincomycin V. Amino acid fragment. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**: 2459-64.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. und Mootz, H.D. (1997) Modular Peptide Synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.*, **97**: 2651-73.
- Martin, J.F. und Liras, P. (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.*, **43**: 173-206.
- Mason, D.J., Dietz, A. und DeBoer, C. (1963) Lincomycin, a new antibiotic. I. Discovery and biological properties. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1962**: 554-9.
- May, B.J., Zhang, Q., Li, L.L., Paustian, M.L., Whittam, T.S. und Kapur, V. (2001) Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 3460-5
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W. *et al.* und Wilson, R.K. (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Nature*, **413**: 852-6.
- McCormick, J.R.D. und Morton, G.O. (1982) Identity of cosynthetic factor 1 of *Streptomyces aureofaciens* and fragment F<sub>0</sub> from coenzym F<sub>420</sub> of *Methanobacterium* species. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**: 4014-5.
- Menninger, J.R., Coleman, R.A. und Tsai, L.-N. (1994) Erythromycin, lincosamides, peptidyl-tRNA dissociation, and ribosom editing. *Mol. Gen. Genet.*, **243**: 225-33.

- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mofid, M.R., Finking, R. und Marahiel, M.A. (2002) Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp. *J. Biol. Chem.*, **277**: 17023-31.
- Mootz, H.D. und Marahiel, M.A. (1997) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.*, **179**: 6843-50.
- Mootz, H.D., Finking, R. und Marahiel, M.A. (2001) 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **276**: 37289-98.
- Motamedi, H. und Shafiee, A. (1998) The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *Eur. J. Biochem.*, **256**: 528-34.
- Motamedi, H., Shafiee, A. und Cai, S.J. (1995) Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces* spp. *Gene*, **160**: 25-31.
- Murakami, T., Holt, T.G. und Thompson, C.J. (1989) Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.*, **171**: 1459-66.
- Neal, R.J. und Chater, K.F. (1987) Nucleotide sequence analysis reveals similarities between proteins determining methlenomycin A-resistance in *Streptomyces* and tetracycline resistance in eubacteria. *Gene*, **58**: 229-41.
- 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. und Piepersberg, W. (1998) The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *Arch. Microbiol.*, **169**: 322-32.
- Nielsen, J.B., Hsu, M.J., Byrne, K.M. und Kaplan L. (1991) Biosynthesis of the immunosuppressant immunomycin: the enzymology of pipecolate incorporation. *Biochemistry*, **30**: 5789-96.
- O'Hara, K., Kanda, T., Ohmiya, K., Ebisu, T. und Kono, M. (1989) Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of *Escherichia coli* that is highly resistant to erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**: 1354-7.
- Oh, S.H. und Chater, K.F. (1997) Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms. *J. Bacteriol.*, **179**: 122-7.

- Ohnuki, T., Imanaka, T., Katoh, T. und Aiba, S. (1985) Molecular cloning of tetracycline resistance genes from *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces griseus* and characterization of the cloned genes. *J. Bacteriol.*, **161**: 1010-6.
- Omura, S. (1992) The expanded horizon for microbial metabolites-a review. *Gene*, **115**: 141-9.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W. *et al.* und Barrell, B.G. (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, **413**: 523-7.
- Patterson, E.L., Hash, J.H., Lincks, M., Miller, P.A. und Bohonos, N. (1964) Ethylation: biological formation of an S-ethyl homolog of Lincomycin. *Science*, **146**: 1691-2.
- Pavela-Vrancic, M., Dieckmann, R., von Döhren, H.V. und Kleinkauf H. (1999) Editing of non-cognate aminoacyl adenylates by peptide synthetases. *Biochem. J.*, **342**: 715-9.
- Pearson, W.R. und Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2444-8.
- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M.A., Leopold, K. und Fischer, W. (1995) Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J. Biol. Chem.*, **270**: 15598-606.
- Pernodet, J.L., Boccard, F., Alegre, M.T., Blondelet-Rouault, M.H. und Guérineau, M. (1988) Resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics due to a mutation in a rRNA operon of *Streptomyces ambofaciens*. *EMBO J.*, **7**: 277-82.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G. und Gotz, F. (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.*, **274**: 8405-10.
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.Z. und Piepersberg, W. (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.*, **16**: 1137-56.
- Pfennig, F., Schauwecker, F. und Keller, U. (1999) Molecular characterization of the genes of actinomycin synthetase I and of a 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid carrier protein involved in the assembly of the acylpeptide chain of actinomycin in *Streptomyces*. *J. Biol. Chem.*, **274**(18): 12508-16.
- Piendl, W., Böck, A. und Cundliffe, E. (1984) Involvement of 16S ribosomal RNA in resistance of the aminoglycoside-producers *Streptomyces tenjimarinesis*, *Streptomyces tenebrarius* and *Micromonospora purpurea*. *Mol. Gen. Genet.*, **197**: 24-9.
- Piepersberg, W. (1993) *Streptomyces* and *Corynebacteria*. In: Biotechnology. 2<sup>nd</sup> Edn., Vol. I, Ed.: Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P., S. 433-468. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.

- Piepersberg, W. (1997) Molecular biology biochemistry, and fermentation of aminoglycoside antibiotics. In: Strohl, W.R. (Hrsg.) Biotechnology of antibiotics. 2<sup>nd</sup> Edn., S. 81-163, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong.
- Piepersberg, W. und Distler, J. (1997) Aminoglycosides and Sugar components in other secondary metabolites. In: Rehm, H.J. und Reed, G. (Eds.) Biotechnology Vol. 7 Products of secondary metabolism. S. 397-487, Verlag Chemie, Weinheim.
- Piepersberg, W. und Zeeck, A. (1994) Mikrobieller Sekundärstoffwechsel. In: Präve, P., Faust, U., Sittig, W. und Sukatsch, D.A. (Hrsg.) Handbuch der Biotechnologie. 4. Edn., S. 141-177, Oldenbourg Verlag, München.
- Pissowotzki, K., Mansouri, K. und Piepersberg, W. (1991) Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes *strELMB2N*. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 113-23.
- Pöhling, S. (1997) Analyse des allgemeinen Proteinsekretionsapparates von *Streptomyces griseus* und *Streptomyces galbus*. Dissertation, BUGH Wuppertal.
- Pospiech, A. und Neumann, B. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.*, **11**: 217-8.
- Preston, A., Maskell, D., Johnson, A. und Moxon, E.R. (1996) Altered lipopolysaccharide characteristic of the I69 phenotype in *Haemophilus influenzae* results from mutations in a novel gene, *isn*. *J. Bacteriol.*, **178**: 396-402.
- Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. und Walsh, C.T. (1998) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*, **37**: 1585-95.
- Reusser, F. und Argoudelis, A.D. (1974) U.S. Patent No. 3,833,475.
- Ritsema, T., Gehring, A.M., Stuitje, A.R., van der Drift, K.M., Dandal, I., Lambalot, R.H., Walsh, C.T., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J. und Spaink, H.P. (1998) Functional analysis of an interspecies chimera of acyl carrier proteins indicates a specialized domain for protein recognition. *Mol. Gen. Genet.*, **257**: 641-8.
- Rost, B. und Sander, C. (1993) Secondary structure prediction of all-helical proteins in two states. *Protein Eng.*, **6**: 831-6.
- Rusnak, F., Faraci, W.S. und Walsh, C.T. (1989) Subcloning, expression, and purification of the enterobactin biosynthetic enzyme 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase: demonstration of enzyme-bound (2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate product. *Biochemistry*, **28**: 6827-35.
- Rusnak, F., Liu, J., Quinn, N., Berchtold, G.A. und Walsh, C.T. (1990) Subcloning of the enterobactin biosynthetic gene *entB*: expression, purification, characterization, and substrate specificity of isochorismatase. *Biochemistry*, **29**: 1425-35.



- Rusnak, F., Sakaitani, M., Drückhammer, D., Reichert, J. und Walsh, C.T. (1991) Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the *entF* gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry*, **30**: 2916-27.
- Salas, J.A., Hernandez, C., Mendez, C., Olano, C., Quiros, L.M., Rodriguez, A.M. und Vilches C. (1994) Intracellular glycosylation and active efflux as mechanism for resistance to oleandomycin in *Streptomyces antibioticus*, the producer organism. *Microbiologia*, **10**: 37-48.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez, C., Du, L., Edwards, D.J., Toney, M.D. und Shen, B. (2001) Cloning and characterization of a phosphopantetheinyl transferase from *Streptomyces verticillus* ATCC15003, the producer of the hybrid peptide-polyketide antitumor drug bleomycin. *Chem. Biol.*, **8**: 725-38.
- Sanger, F., Nicklan, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-determination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-7.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**: 368-79.
- Schlumbohm, W., Vater, J. und Kleinkauf, H. (1985) Reactive sulfhydryl groups involved in the aminoacyl adenylate activation reactions of the gramicidin S synthetase 2. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **366**: 925-30.
- Schlünzen F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A. und Franceschi, F. (2001) Struktural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, **413**: 814-21.
- Schmidt, H. (1994) Lincomycin-Biosynthese in *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Analyse von zwölf Genen mit vermuteter Beteiligung an der Synthese der Propylprolin-Untereinheit. Dissertation, BUGH Wuppertal.
- Schupp, T., Toupet, C., Engel, N. und Goff, S. (1998) Cloning and sequence analysis of the putative rifamycin polyketide synthase gene cluster from *Amycolatopsis mediterranei*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **159**: 201-7.
- Schürmann, M. und Sprenger, G.A. (2001) Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *J. Biol. Chem.*, **276**: 11055-61.
- Simonet, J.M., Schneider, D., Volff, J.N., Dary, A. und Decaris, B. (1992) Genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*: inducibility and associated genome plasticity. *Gene*, **115**: 49-54.

- Skinner, R.H. und Cundliffe, E. (1980) Resistance to the antibiotics viomycin and capreomycin in the *Streptomyces* species which produce them. *J. Gen. Microbiol.*, **120**: 95-104.
- Slomp, G. und MacKellar, F.A. (1967) Lincomycin IV. Nuclear magnetic resonance studies on the structure of lincomycin, its degradation products and some analogs. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**: 2454-9.
- Spatafora, G., Rohrer, K., Barnard, D. und Michalek, S. (1995) A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo. *Infect. Immun.*, **63**: 2556-63.
- Stachelhaus, T. und Marahiel, M.A. (1995) Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J. Biol. Chem.*, **270**: 6163-9.
- Stachelhaus, T., Hüser, A. und Marahiel, M.A. (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.*, **3**: 913-21.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D. und Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.*, **6**: 493-505.
- Steffensky, M., Li, S.M. und Heide, L. (2000) Cloning, overexpression, and purification of novobiocin acid synthetase from *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891. *J. Biol. Chem.*, **275**: 21754-60.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques, P., Thonart, P. und Vater J. (1999) Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chem. Biol.*, **6**: 31-41.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**: 113-30.
- Stühler, K. (1999) Lincomycin-Biosynthese in *Streptomyces lincolnensis* NRRL 2936 : Mutagenesestudien zur Charakterisierung der N-Methyltransferase LmbJ. Diplomarbeit, BUGH Wuppertal.
- Sykes, R.B. und Matthew, M. (1976) The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2**: 115-57.
- Takano, E., White, J. Thompson, C.J. und Bibb, M.J. (1995) Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene*, **166**: 133-7.
- Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I.V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D. und Koonin, E.V. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.*, **29**: 22-8.

- Thibaut, D., Bisch, D., Ratet, N., Maton, L., Couder, M., Debussche, L. und Blanche, F. (1997) Purification of peptide synthetases involved in pristinamycin I biosynthesis. *J. Bacteriol.*, **179**: 697-704.
- Thompson, J., Skeggs, P. A. und Cundliffe, E. (1985) Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to the aminoglycoside antibiotics gentamicin and kanamycin determined by DNA from the gentamicin-producer *Micromonospora purpurea*. *Mol. Gen. Genet.*, **201**: 168-73.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **24**: 4876-82.
- Trauger, J.W. und Walsh, C.T. (2000) Heterologous expression in *Escherichia coli* of the first module of the nonribosomal peptide synthetase for chloroeremomycin, a vancomycin-type glycopeptide antibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 3112-7.
- Turgay, K., Krause, M. und Marahiel, M.A. (1992) Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.*, **6**: 529-46.
- Vining, L.C. und Stuttard, C. (1995) Chloramphenicol. *Biotechnology*, **28**: 505-30.
- Volff, J., Eichenseer, C., Viell, P., Piendl, W. und Altenbuchner, J. (1996) Nucleotid sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Microbiol.*, **21**: 1037-47.
- Volkman, B.F., Zhang, Q., Debabov, D.V., Rivera, E., Krescheck, G.C. und Neuhaus, F.C. (2001) Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: the tertiary structure of apo-D-alanyl carrier protein. *Biochemistry*, **40**: 7964-72.
- Weber, M., Wierman, C. K. und Hutchinson, R.R. (1985) Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythraeus*. *J. Bacteriol.*, **164**: 425-33.
- Wehmeier, U.F. (1995) New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors allowing blue-white screening on Xgal plates. *Gene*, **165**: 149-50.
- Weinreb, P.H., Quadri, L.E., Walsh, C.T. und Zuber, P. (1998) Stoichiometry and specificity of in vitro phosphopantetheinylation and aminoacylation of the valine-activating module of surfactin synthetase. *Biochemistry*, **37**: 1575-84.
- Weisblum, B. (1985) Inducible resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity, and structural elements that regulate expression – a review. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**: 63-90.
- Witz, D.F., Hessler, E.J. und Miller, T.L. (1971) Bioconversion of tyrosine into the propylglyric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry*, **10**: 1128-32.

- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**: 103-19.
- Zhang, H. (1993) Genetik und Biochemie der Lincomycin-Biosynthese in *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Klonierung und Analyse der Produktions- und Resistenzgene. Dissertation, BUGH Wuppertal.
- Zhang, H., Schmidt, H. und Piepersberg W. (1992) Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* und *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.*, **6**: 2147-57.