

**Biosynthesen von Aminoglycosidantibiotika:
Glycosyltransferasen und Deacetylasen**



Dem Fachbereich C – Mathematik und Naturwissenschaften – an der
Bergischen Universität Wuppertal vorgelegte Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

eingereicht von
Dipl.-Chem. Christian Mandt

Wuppertal, im Oktober 2008

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20080608

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20080608>]

Y.a.u.m.s.

„Ein Tag, an dem Du nicht lächelst, ist ein verlorener Tag.“

Charles Spencer Chaplin

Mein Dank gilt.....

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Piepersberg für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit zur freien Durchführung dieser Arbeit und seine Betreuung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Udo Wehmeier für seine Betreuung, Anregungen, stete Diskussionsbereitschaft sowie für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Walter Reineke und Herrn Priv.-Doz. Dr. Eberhard Schmidt für unsere zahllosen Gespräche und Diskussionen.

Meinen Laborkolleginnen, Frau Petra Kolkhof und Frau Sabine Stratmann, die mir vier Jahre in jeder Beziehung immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Frau Dr. Heike Schmidt-Beissner für ihre fachliche Unterstützung, ständige Hilfsbereitschaft und zahllose Zwerchfellrisse.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Chemische Mikrobiologie, insbesondere Frau Dipl.-Biol. Nadine Merettig, Frau Dipl.-Biol. Diana Clausnitzer und Frau Yvonne Rockser für die gute Atmosphäre und wertvolle Zusammenarbeit.

Und, last but not least, meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	V
	Zusammenfassung.....	VII
	Summary.....	VIII
1	Einleitung.....	1
1.1	Streptomyceten.....	1
1.2	Aminoglycosid-Antibiotika.....	3
1.2.1	Die Neomycinfamilie (NEO-Familie).....	6
1.2.2	Die Kanamycinfamilie (KAN-Familie).....	9
1.2.3	Hygromycin B.....	12
1.2.4	Wirkung der AGAs.....	13
1.3	Biosynthese von Neomycin und Kanamycin.....	15
1.3.1	Gemeinsame Biosyntheseschritte: Synthese von Paromamin.....	15
1.3.2	Biosyntheseschritte von Paromamin bis Neomycin.....	17
1.3.3	Biosyntheseschritte von Paromamin bis Kanamycin.....	20
1.4	Glycosyltransferasen.....	21
1.5	Medizinische Anwendung der AGAs.....	24
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	26
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Chemikalien und Enzyme.....	28
2.2	Anzuchtmedien.....	28
2.3	Puffer und sonstige Lösungen.....	32
2.4	Antibiotika.....	36
2.5	Bakterienstämme.....	36
2.6	Plasmide.....	38
2.7	Oligonukleotide.....	45
2.8	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	48
2.9	Anzucht und Lagerung von Streptomyceten.....	48
2.10	Isolierung von Plasmid-DNA.....	49

2.11	Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten.....	49
2.12	Isolierung von Gesamt-RNA aus Streptomycceten.....	50
2.13	Restriktionsspaltung von DNA.....	50
2.14	Agarosegelelektrophorese und Isolierung der DNA-Fragmente.....	50
2.15	Entfernung von Phosphatgruppen und Nukleotidüberhängen der DNA..	51
2.16	Ligation von DNA-Fragmenten.....	51
2.17	Amplifizierung von DNA mit der Polymerasekettenreaktion.....	51
2.18	RT-PCR.....	53
2.19	DNA Sequenzierung.....	54
2.20	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	55
2.21	Heterologe Überexpression der Gene.....	56
2.21.1	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	56
2.21.2	Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i> und <i>S. coelicolor</i>	57
2.22	Gewinnung zellfreier Rohextrakte.....	58
2.23	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	58
2.24	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
2.25	Western-Blot-Analyse mit immunologischem Nachweis.....	59
2.26	Markierung von DNA-Sonden mit ³² P oder Digoxigenin.....	60
2.27	<i>Southern</i> -Hybridisierung (SOUTHERN, 1975).....	61
2.28	Enzymtests.....	62
2.28.1	Aktivitätstests für die GTs NeoM, KanM1, KanM2, TobM2, NeoF und HygF.....	62
2.28.2	Aktivitätstests für NeoD und KanN.....	63
2.28.3	Acetylierungen mit AAC(2'), AAC(3) und KanA [AAC(6')].	65
2.29	Dünnschichtchromatographie (DC).....	66
2.30	Intergenerische Konjugation zur Generierung von <i>knock-out</i> Mutanten..	66
2.31	Bioassays zum Nachweis von Antibiotikaproduktion und Erstellung von Resistenzprofilen.....	68
3	Ergebnisse.....	69
3.1	Konstruktion der Plasmide zur heterologen Expression: Generelle Vorgehensweise.....	69
3.2	Die 2-DOS : <i>N</i> -Acetylglucosaminyltransferasen (<i>N</i> -Acetylparomaminsynthasen) NeoM & KanM1.....	70

3.2.1	Amplifikation und Klonierung der Gene <i>neoM</i> & <i>kanM1</i>	70
3.2.1.1	Überproduktion von NeoM.....	70
3.2.1.2	Überproduktion von KanM1.....	73
3.2.2	Nachweis der enzymatischen Aktivität von NeoM & KanM1.....	75
3.3	Die Proteine NeoD und KanN.....	78
3.3.1	Klonierung von <i>neoD</i> und <i>kanN</i>	79
3.3.1.1	Überproduktion von NeoD.....	79
3.3.1.2	Überproduktion von KanN.....	81
3.3.2	Nachweis der enzymatischen Aktivität von NeoD & KanN.....	82
3.4	Die Glycosyltransferase NeoF.....	85
3.4.1	Überproduktion von NeoF.....	85
3.4.2	Nachweis der Glycosyltransferaseaktivität von NeoF.....	87
3.5	Die Glycosyltransferase KanM2.....	90
3.5.1	Heterologe Überexpression von <i>kanM2</i>	91
3.5.2	Nachweis der Glycosyltransferaseaktivität von KanM2 & TobM2.....	93
3.6	Die Glycosyltransferase HygF.....	94
3.6.1	Heterologe Überproduktion von HygF.....	94
3.6.2	Erste Versuche zur Glycosyltransferaseaktivität von HygF.....	97
3.7	Generierung und Charakterisierung von <i>knock-out</i> -Mutanten von <i>S. fradiae</i> und <i>S. kanamyceticus</i>	97
3.7.1	Konstruktion der Mutageneseplasmide.....	98
3.7.1.1	Das Plasmid pMACP/ <i>neoMP</i> + zur Inaktivierung von <i>neoM</i>	99
3.7.1.2	Das Plasmid pMACP/ <i>neoD</i> Ω zur Inaktivierung von <i>neoD</i>	100
3.7.1.3	Das Plasmid pMACP/ <i>kanM2P</i> + zur Inaktivierung von <i>kanM2</i>	101
3.7.2	Intergenerische Konjugation.....	103
3.7.3	Charakterisierung der Exkonjuganten.....	105
3.7.3.1	Charakterisierung der möglichen Δ <i>neoM</i> -Mutanten.....	106
3.7.3.2	Charakterisierung der möglichen Δ <i>neoD</i> -Mutanten.....	110
3.7.3.3	Charakterisierung der möglichen Δ <i>kanM2</i> -Mutanten.....	113
3.7.4	Komplementation der <i>knock-out</i> -Mutanten.....	117
3.8	Erste Versuche zur biokombinatorischen Darstellung neuer AGAs.....	119
4	Diskussion	122
4.1	Allgemeine Probleme.....	122

4.2	Die Glycosyltransferasen der GT4-Familie.....	124
4.2.1	Die Glycosyltransferasen NeoM & KanM1	124
4.2.2	Die Glycosyltransferase NeoF	131
4.2.3	Die Glycosyltransferase KanM2	134
4.3	Die Glycosyltransferase der GT2-Familie: HygF.....	136
4.4	Die Proteine NeoD/KaN	140
4.5	<i>knock-out</i> -Mutanten	144
4.6	Biokombinatorische Darstellung neuer AGAs	147
4.7	Ausblick.....	151
5	Literaturverzeichnis	156
	Erklärung.....	176

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGA(s)	Aminoglycosidantibiotikum, (-ka)
AMP	Adenosinmonophosphat
APR / <i>apr</i> / Ap	Apramycin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BTR / <i>btr</i>	Butirosin
C	Cytosin
CDP	Cytosindiphosphat
CMP	Cytosinmonophosphat
CTP	Cytosintriphosphat
ca.	circa
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FOR / <i>for</i>	Fortimicin
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung / Gramm
Gal	Galactose
GDP	Guanosindiphosphat
GEN / <i>gen</i>	Gentamicin
ggf.	gegebenenfalls
GT (s)	Glycosyltransferase, (-n)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HYG / <i>hyg</i>	Hygromycin
IPTG	Isopropyl- β -D-1-Thiogalactopyranosid
IST / <i>ist</i>	Istamicin
l	Liter
KAN / <i>kan</i>	Kanamycin
kBp	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat

LIV / <i>liv</i>	Lividomycin
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MBp	Megabasenpaare
min	Minuten
M _w	Molekulargewicht
MeOH	Methanol
mRNA	Messenger RNA
μl	Microliter
NaOAc	Natriumacetat
NEO / <i>neo</i>	Neomycin
nm	Nanometer
O.D. ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
P	Phosphat
p.a.	pro analysi
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR / <i>par</i>	Paromomycin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PP _i	anorganisches Diphosphat
psi	pounds per square inch
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S / <i>S.</i>	Svedberg / <i>Streptomyces</i>
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPC / <i>spc</i>	Spectinomycin
STR / <i>str</i>	Streptomycin
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TDP-Glc	Thymidindiphospho-5'-D-Glucose
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TES	<i>N</i> -[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TOB / <i>tob</i>	Tobramycin
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glc	Uridindiphospho-5'-D-Glucose
UDP-GlcNAc	Uridindiphospho-5'- <i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
UpM	Umdrehungen pro Minute
vergl.	vergleiche
X-Gal	5'-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-1-Galactopyranosid

Zusammenfassung

Aminoglycosidantibiotika (AGAs) stellen therapeutisch wichtige Substanzen dar. Um vorhandene Resistenzmechanismen zu umgehen und Nebenwirkungen zu minimieren, sind gezielte Modifizierungen an den Molekülen notwendig. Eine effiziente Möglichkeit stellt die Biokombinatorik dar. Dafür ist ein detailliertes Verständnis der Biosynthesen der Aminoglycoside notwendig. Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der Glycosyltransferasen NeoM, NeoF, KanM1 und KanM2 sowie der Deacetylasen NeoD und KanN aus dem Neomycin- und Kanamycinbiosyntheseweg der Produzentenstämme *Streptomyces (S.) fradiae* und *S. kanamyceticus*. Erste Versuche zur biokombinatorischen Modifizierung dieser AGAs wurden durchgeführt.

- # Die homologen Enzyme NeoM und KanM1 konnten als 2-DOS : UDP-GlcNAc Glycosyltransferasen (*N*-Acetylparomaminsynthasen) identifiziert werden. Nach Optimierung der Expressionsbedingungen wurden *in vitro* Enzymtests durchgeführt, wobei die heterolog überproduzierten Proteine eine hohe Donorsubstratspezifität zeigten, TDP-Glc oder UDP-Glc wurden nicht umgesetzt. Eine *neoM*-Mutante von *S. fradiae* wurde erzeugt und genotypisch und biochemisch charakterisiert. Durch die *in trans* Komplementation mit den Genen *neoM*, *kanM1* und *hygF* konnte keine Bildung von AGAs nachgewiesen werden.
- # Die Tatsache, dass UDP-GlcNAc als einziges Substrat in den von NeoM und KanM1 katalysierten Glycosyltransferasereaktionen umgesetzt wurde, bedingte einen nachfolgenden Deacetylierungsschritt in den jeweiligen Biosynthesen. Es konnte gezeigt werden, dass die homologen Enzyme NeoD und KanN diese Reaktion katalysieren. Darüber hinaus wurde eine *neoD*-Mutante von *S. fradiae* erzeugt. Nach der genetischen und biochemischen Charakterisierung sollte die Mutante durch *neoD* und *kanN* komplementiert werden. Die Expression der Gene konnte nachgewiesen werden, eine Produktion von AGAs nicht.
- # Die in der Neomycinbiosynthese vorkommende Glycosyltransferase NeoF katalysiert die Bildung von 2''-*N*-Acetyl-6''-hydroxyneomycin C aus Ribostamycin und UDP-GlcNAc. Sie zeigt ebenso wie NeoM und KanM1 eine hohe Donorsubstratspezifität. TDP-Glc oder UDP-Glc konnten nicht mit Ribostamycin umgesetzt werden.
- # Die Bildung von 2''-*N*-Acetyl-6''-hydroxyneomycin C bedingt in der Neomycinbiosynthese einen weiteren Deacetylierungsschritt. Dieser wird von NeoD katalysiert. Die Bildung von 6''-Hydroxyneomycin C durch die Aktivität von NeoD konnte gezeigt werden. Das zu NeoD homologe KanN katalysiert diese Reaktion nicht.
- # Die in der Biosynthese von Kanamycin vorkommende Glycosyltransferase KanM2 konnte durch die Generierung einer entsprechenden Mutante charakterisiert werden. Diese Mutante bildete eine antibiotisch wirksame Substanz (Paromamin?).

Summary

Aminoglycoside antibiotics (AGAs) are important drugs in medical therapy. Specific modifications to these substances are necessary to circumvent resistance mechanisms of pathogens and to reduce toxic side-effects. An efficient way to modify these substances is represented by biocombinatorial approaches, for which a detailed understanding of the biosynthesis of the aminoglycosides is essential. Thus, the aim of this thesis was the characterization of the glycosyltransferases NeoM, NeoF, KanM1 and KanM2 and deacetylases NeoD and KanN of the neomycin and kanamycin biosyntheses from *Streptomyces (S.) fradiae* und *S. kanamyceticus* and, consequently, the further elucidation of the biosynthetic pathways. First biocombinatorial experiments to modify these substances were implemented.

- # The homologous enzymes NeoM and KanM1 were identified as 2-DOS : UDP-GlcNAc glycosyltransferases (*N*-acetylparomamine synthases). After optimization of expression, in vitro enzyme assays were carried out. The heterologously over-expressed proteins showed high-level specificity for the donor substrate. Neither TDP-Glc nor UDP-Glc were accepted as sugar donors by NeoM or KanM1. A *neoM*-knock-out mutant of *S. fradiae* was generated and genotypically and biochemically analysed. However, after in trans complementation with the genes *neoM*, *kanM1* and *hygF*, no production of AGAs was detected.
- # Due to the fact that UDP-GlcNAc was the only substrate accepted by NeoM and KanM1, a deacetylation step in the biosynthetic pathways was proposed. It was shown in this study that the enzymes NeoD and KanN catalyse this step in the respective pathway. A *neoD* mutant of *S. fradiae* was tried to be complemented by *neoD* and *kanN*, whereas the expression of the genes was detectable while no AGAs were produced.
- # The glycosyltransferase NeoF occurs in the neomycin biosynthetic pathway. It catalyses the formation of 2'''-*N*-acetyl-6'''-hydroxyneomycin C from ribostamycin and UDP-GlcNAc and showed, like NeoM and KanM1, high donor-substrate specificity. No glucose residue was transferred from TDP-Glc or UDP-Glc to ribostamycin by NeoF.
- # The formation of 2'''-*N*-acetyl-6'''-hydroxyneomycin C during neomycin biosynthesis requires a subsequent deacetylation reaction. This step is also catalysed by NeoD and resulted in the formation of 6'''-hydroxyneomycin C. The homologue to NeoD, KanN, was not able to catalyse this reaction.
- # The glycosyltransferase KanM2, which is specific for the kanamycin biosynthetic pathway, was characterised by knock-out mutagenesis of its gene. The mutant accumulated a substance which clearly showed antibiotic activity (paromamine?).

1 Einleitung

1.1 Streptomyceten

Die Familie der im Boden lebenden, überwiegend obligat aeroben Streptomyceten (Streptomycetaceae) gehören zu der großen Ordnung der Actinomyceten (Actinomycetales) in der Klasse Actinobacteria. Diese Gram-positiven Bakterien (WAKSMAN & LECHEVALIER, 1962) zeichnen sich unter anderem durch einen hohen GC-Gehalt der DNA aus (für das Genus *Streptomyces* liegt dieser zwischen 69 und 73 %, ENQUIST & BRADLEY, 1971) und wachsen meistens in Form langer, verzweigter Filamente (Hyphen). Diese Filamente werden auch Substratmycel genannt, da es morphologisch dem Mycel filamentöser Pilze ähnelt. Das Vorkommen der Aminosäure L,L-Diaminopimelinsäure im Peptidoglycan der Zellwand ist charakteristisch und wird neben der klassischen chemotaxonomischen und phänotypischen Klassifizierung als Möglichkeit genutzt, Streptomyceten rasch zu identifizieren (MIYADOH, 1990). Heute werden Streptomyceten über 16S rRNA-Vergleiche und Vorkommen bestimmter Fettsäuren eingruppiert (WELLINGTON *et al.*, 1992; MEHLING *et al.*, 1995a + b).

Für viele zelluläre Vorgänge ist ein definiertes Redoxpotenzial des Zellplasmas notwendig, da viele Enzyme freie SH-Gruppen für die Katalyse nutzen. Bakterienzellen produzieren Thiole, wie Glutathion, um eine reduktive Umgebung aufrecht zu erhalten (HOLMGREN, 1986; MEISTER, 1992). Im Gegensatz dazu bilden Actinobakterien zu diesem Zweck Mycothiol (NEWTON *et al.*, 1996). Darüber hinaus importieren Streptomyceten Zucker in die Zelle und phosphorylieren diese mit speziellen Kinasen (SABATER *et al.*, 1972; IKEDA *et al.*, 1984; NOVOTNA & HOSTALEK, 1985). Zucker scheinen generell über andere Wege in die Zelle transportiert zu werden (BERTRAM *et al.*, 2004) und nicht über ein Phosphoenolpyruvat : Zucker (PTS) System, wie es Gram-negative (POSTMA *et al.*, 1993 & 1996) oder die Gram-positiven firmikuten Bakterien (SAIER *et al.*, 1993) für Transport und simultane Phosphorylierung der Zucker benutzen. Eine Ausnahme bilden das PTS-System für Fructose (TITGEMEYER *et al.*, 1995) und N-Acetyl-D-glucosamin (WANG *et al.*, 2002a) bei wenigen Stämmen. Streptomyceten können aber eine Menge

extrazellulärer hydrolytischer Enzyme bilden, um Nährstoffe aus im Boden vorhandenen, unlöslichen Polymeren (Cellulose, Lignin, Chitin, etc.) zu gewinnen (PIEPERSBERG, 1993). Sind die Nährstoffe erschöpft, oder verschlechtern sich sonst die Lebensbedingungen, differenzieren sich die Streptomyceten und bilden ein Luftmycel aus, an dessen Ende sich durch Septierung lange Sporenketten bilden, die als Überdauerungsformen dienen (KIESER *et al.*, 2000). Diese Sporen sind nicht wie die Endosporen von *Bacillus sp.* hitzestabil, sie überstehen aber hervorragend trockene Bedingungen und dienen der Verteilung durch Wind, Tiere, etc. (MAYFIELD *et al.*, 1972; ENSIGN, 1978). Actinomyceten und insbesondere Streptomyceten bilden in dieser späten Wachstumsphase eine Vielzahl von sekundären Metaboliten, wie Antibiotika und andere bioaktive Stoffe (Immunosuppressiva, Wachstumsfaktoren, etc.). Die meisten Sekundärmetabolite haben dagegen keine nutzbare Wirkung (Geosmine, Pigmente, etc.). So werden etwa zwei Drittel der bekannten von Mikroorganismen produzierten Antibiotika von Actinomyceten (davon 80 % allein von Streptomyceten) hergestellt (OMURA, 1992; PIEPERSBERG, 1993; KIESER *et al.*, 2000). Warum antibiotisch wirksame Substanzen erst in einer späten Wachstumsphase (oder überhaupt) gebildet werden, ist bis heute unklar. Eine Theorie ist, dass sich die Kolonie so vor Konkurrenten schützt, die auf den bei der Lyse des Substratmycels frei werdenden Nährstoffen wachsen könnten, und damit die Sporulation negativ beeinflussen (CHATER & MERRICK, 1979). Darüber hinaus gibt es die Theorie, dass die als Sekundärmetabolismus zusammengefassten Stoffwechselvorgänge möglicherweise der Kommunikation dienen könnten, da viele Endprodukte des Sekundärmetabolismus Ähnlichkeit zu Zellkomponenten aufweisen, die der Zell-Zell-Erkennung und -kommunikation dienen (PIEPERSBERG, 1992, 1993, 2002).

Die Genome der drei vollständig sequenzierten Streptomyceten *Streptomyces (S.) coelicolor* A3(2) (BENTLEY *et al.*, 2002), *S. avermitilis* MA-4680 (IKEDA *et al.*, 2003) und *S. griseus* IFO 13350 (OHNISHI *et al.*, 2008) sind mit einer Größe von 6 bis 9 Mbp beinahe zweimal so groß wie das von anderen Actinobakterien, wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* CDC 1551 (4,4 Mbp, FLEISCHMANN *et al.*, 2002) und *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (3,3 Mbp, KALINOWSKI *et al.*, 2003), oder zum Vergleich des Gram-negativen Modellbakteriums *Escherichia (E.) coli* K12 (4,6 Mbp, BLATTNER *et al.*, 1997). Außerdem liegt die DNA des Chromosoms nicht kovalent geschlossen vor, sondern das Chromosom ist linear mit zwei terminalen invertierten Sequenzen und an Proteine gebunden, welche die Chromosomenenden zusammenhalten. Der Replikationsursprung des Chromosoms (*oriC*) liegt zentral in der sogenannten *core*-Region. Um ihn

herum angeordnet befinden sich alle Gene, die für den Primärstoffwechsel kodieren und damit für das Überleben notwendig sind. Gene für Sekundärmetabolite sind häufig in Form von Genclustern (vergl. Abb. 1.3 und 1.5) in den terminalen Bereichen („Arme“) des Chromosoms lokalisiert. Eine Ausnahme bildet das Streptomycingencluster von *S. griseus* subsp. *griseus* DSM 40236. Es befindet sich in der *core*-Region des Chromosoms (PIEPERSBERG *et al.*, 2007). Als Gencluster wird eine hintereinander liegende Anzahl an Genen bezeichnet, die in der Regel alle die für die Biosynthese eines Metaboliten wichtigen Enzymfunktionen codieren. Darüber hinaus befinden sich häufig Gene für spezifische Resistenzenzyme, Regulatoren und Transporter in diesen Abschnitten (CHATER & HOPWOOD, 1993; PIEPERSBERG, 2002). Die Arme des Chromosoms zeichnen sich durch eine hohe genetische Instabilität aus. Amplifikationen und Deletionen (bis über 1 Mbp) sind häufig (BIRCH *et al.*, 1990; LEBLOND *et al.*, 1990).

1.2 Aminoglycosid-Antibiotika

Das erste Aminoglycosid-Antibiotikum (AGA) Streptomycin (STR, siehe Abb. 1.1 und Tab. 1.1) wurde 1944 von Selman Waksman als Fermentationsprodukt von *S. griseus* isoliert (SCHATZ *et al.*, 1944; WAKSMAN, 1965). Es stellte das erste wirksame Therapeutikum gegen Tuberkulose und durch Gram-negative Bakterien verursachte Infekte dar. Da zu dieser Zeit nur Penicilline und Sulfonamide als wirksame Therapeutika zur Verfügung standen, wurde in den darauf folgenden Jahren intensiv nach ähnlichen Verbindungen gesucht. Durch die *screening*-Programme wurde neben ähnlichen Substanzen (STR-B, Dihydrostreptomycin) auch Neomycin (NEO, 1949, siehe Abb. 1.2 und Tab. 1.1) entdeckt (WAKSMAN *et al.*, 1949) und als Vertreter einer neuen Klasse von AGAs erkannt (siehe unten). Alle bis heute wichtigen und teilweise klinisch relevanten AGAs wurden bereits in den nächsten 15 bis 20 Jahren isoliert (u.a. Paromomycin, PAR, COFFEY *et al.*, 1959; Kanamycin, KAN, UMEZAWA *et al.*, 1957; Gentamicin, GEN, WEINSTEIN *et al.*, 1963; Butirosin, BTR, als erstes nicht von Actinomyceten produziertes AGA, WOO *et al.*, 1971) und nur durch halbsynthetische Verbindungen ergänzt (siehe 1.5). AGAs werden überwiegend von den Genera *Streptomyces*, *Micromonospora* (*M.*) und mit einer Ausnahme, BTR, von *Bacillus* (*B.*) produziert.

AGAs bestehen chemisch gesehen aus einem Aminocyclitol, an das glycosidisch ein oder mehrere, teilweise stark modifizierte (Amino-)Zuckerreste gebunden sind, weshalb man

besser von Aminocyclitol-Aminoglycosid-Antibiotika spricht (PIEPERSBERG, 1995, und 1997). Bei physiologischen pH-Werten liegen die Aminogruppen überwiegend protoniert vor, weshalb die AGAs eine positive Nettoladung tragen (BOTTO & COXON, 1983; KAUL *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Ladung können AGAs sehr gut mit (negativ geladenen) Oligo- oder Polynukleotiden wechselwirken (siehe 1.2.4). Die AGAs werden aufgrund ihres charakteristischen Cyclitols (Aglycon) grundsätzlich in vier Gruppen eingeteilt:

1. AGAs, die Streptamin als Grundbaustein enthalten, dazu zählen zum Beispiel STR und Spectinomycin (SPC, siehe Abb. 1.1).
2. Die 2-Desoxystreptamin (2-DOS) enthaltenden AGAs, wie BTR, GEN, KAN, Lividomycin (LIV), Nebramycine, NEO, PAR, Ribostamycin (RIB) und Tobramycin (TOB). Sie stellen biosynthetisch eine relativ homogene Gruppe dar, welche aufgrund ihres Substitutionsmusters am Cyclitol in zwei Familien unterteilt werden: Die Mitglieder der NEO-Familie sind 4,5-substituiert (vergl. Abb. 1.2), in der KAN-Familie sind diese 4,6-substituiert (vergl. Abb. 1.5). Apramycin (APR) und Hygromycin B (HYG-B) nehmen in dieser Gruppe eine Sonderstellung aufgrund ihrer Monosubstitution ein (vergl. Abb. 1.1).
3. Fortamin und 2-Desoxyfortamin enthaltende AGAs wie Fortimicin (FOR) und Istamicin (IST). Sie gehören zu den wenigen AGAs, die nur als ein Pseudodisaccharid vorliegen (vergl. Abb. 1.1).
4. Im weitesten Sinne werden auch die das C₇-Aminocyclitol Valienamin enthaltenden Substanzen Validamycin (VAL), ein antimycotisch wirkender Saccharasehemmer (PIEPERSBERG, 1997), und Acarbose (ACB) zu den AGAs gerechnet (siehe Abb. 1.1). Letzteres ist nicht antibiotisch aktiv, sondern wirkt als Glucosidasehemmer und wird deshalb als Blutzucker senkendes Mittel (GlucoBay[®]; Bayer AG) bei Diabetes mellitus Typ II eingesetzt. (WEHMEIER & PIEPERSBERG, 2004).

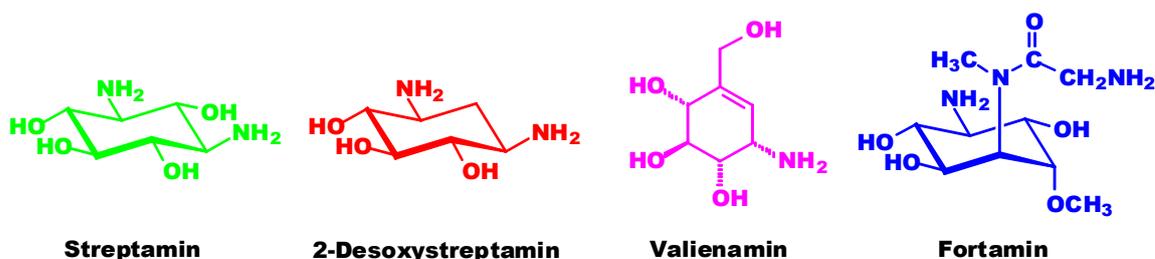


Abbildung -1.1- Chemische Strukturen wichtiger Aminoglycoside und ihrer Bausteine.
Die charakteristischen Cyclitolreste sind jeweils farblich markiert.

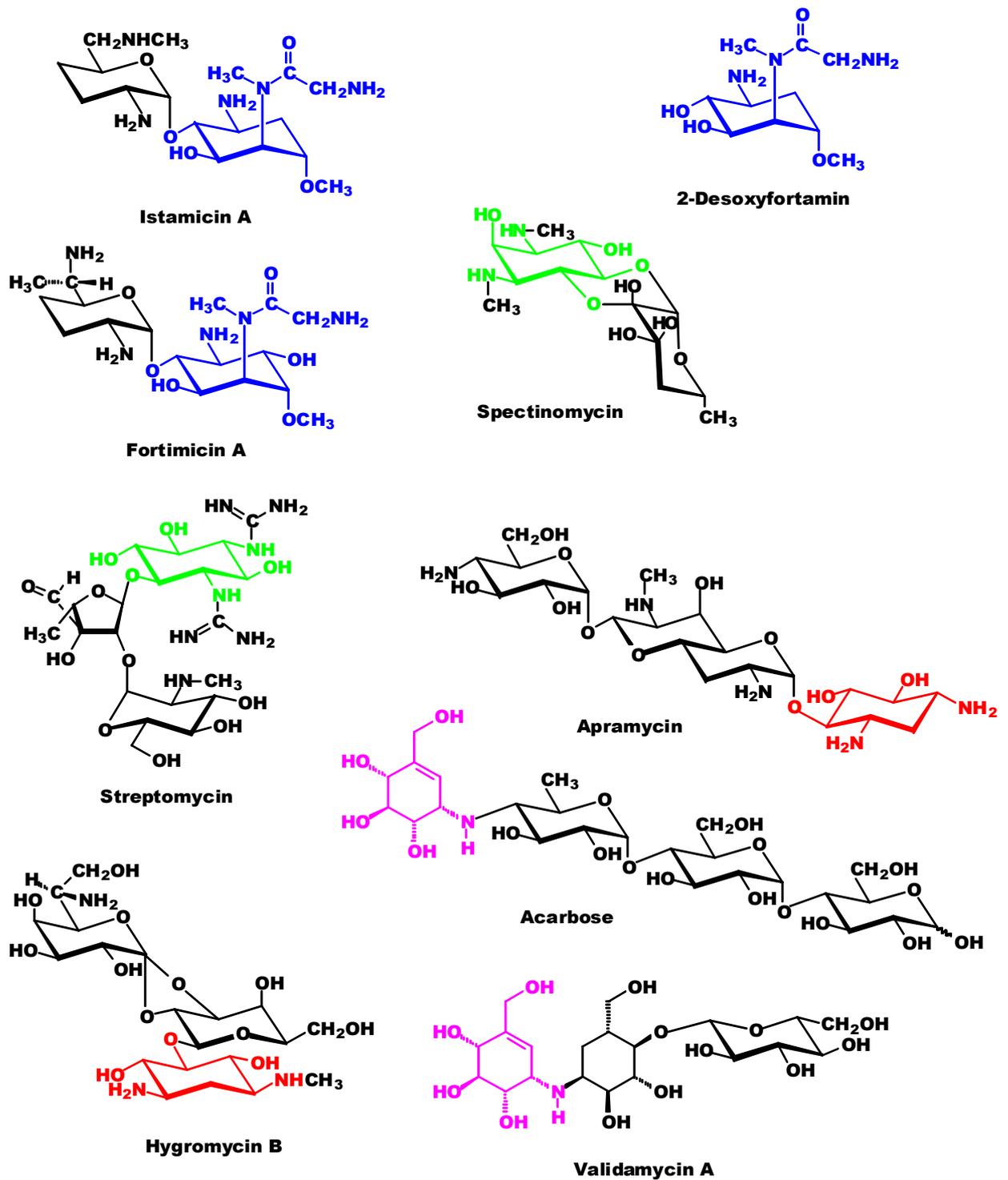


Abbildung -1.1- Chemische Strukturen wichtiger Aminoglycoside und ihrer Bausteine (Fortsetzung). Die charakteristischen Cyclitolreste sind jeweils farblich markiert.

Tabelle -1.1- Annotierte AGA-Biosynthesecluster.

Aminoglycosid	Produzent	Accession-Nr.	Gene im Cluster
<i>STR-Familie</i>			
Streptomycin (STR)	<i>S. griseus</i> ssp. <i>griseus</i> DSM 40236	AJ862840	23
Hydroxystreptomycin	<i>S. glaucescens</i> GLA.0 (DSM 40716)	AJ006985	26-31*
Spectinomycin (SPC)	<i>S. netropsis</i> DSM 40093	U70376	18
<i>NEO-Familie</i>			
Neomycin (NEO)	<i>S. fradiae</i> DSM 40063	AJ629247	22
Butirosin (BTR)	<i>B. circulans</i> ATCC 21557	AB097196	25
Ribostamycin (RIB)	<i>S. ribosidificus</i> NRRL B-11466	AJ744850	20
Paromomycin (PAR)	<i>S. rimosus</i> ssp. <i>paromomycinus</i> NRRL 2455	AJ628955	22
Lividomycin (LIV)	<i>S. sp. (lividus)</i> CBS 844.73	AJ748832	23
<i>KAN-Familie</i>			
Kanamycin (KAN)	<i>S. kanamyceticus</i> DSM 40500	AJ628422	21
Tobramycin (TOB)	<i>S. sp. (tenebrarius)</i> DSM 40477	AJ810851	21
Gentamicin (GEN)	<i>M. echinospora</i> DSM 43036	AJ628149	32
<i>Sonstige 2-DOS-AGAs</i>			
Apramycin (APR)	<i>S. sp. (tenebrarius)</i> DSM 40477	AJ629123	30
Hygromycin B (HYG-B)	<i>S. hygrosopicus</i> ssp. <i>hygrosopicus</i> DSM 40578	AJ628642	22
<i>FOR-Familie</i>			
Fortimicin (FOR)	<i>M. olivasterospora</i> DSM 43868	AJ628421	34*
Fortimicin (FOR)	<i>Frankia</i> sp. CcI3	NC_007777.1	34*
Istamycin (IST)	<i>S. tenjimariensis</i> ATCC 31603	AJ845083	26
<i>ACB-Familie</i>			
Acarbose (ACB)	<i>Actinoplanes</i> sp. SE 50/210	Y18523	22
Acarbose (ACB)	<i>S. glaucescens</i> GLA.0 (DSM 40716)	AM409314	25
Validamycin (VAL)	<i>S. hygrosoc. ssp. limoneus</i> IFO 12704	DQ223652	24

Die Sequenzen der Cluster sind in der EMBL-Datenbank hinterlegt.

* = die genaue Anzahl der zum Cluster gehörenden Gene ist unklar.

1.2.1 Die Neomycinfamilie (NEO-Familie)

NEO wurde das erste Mal 1949 als Fermentationsprodukt von *S. fradiae* in der Literatur beschrieben (WAKSMAN *et al.*, 1949). In den Screening-Programmen der 1950er, 1960er und frühen 1970er Jahre wurden weitere Streptomyceten, *Bacillus* sp. und *Micromonospora* sp. gefunden, die ebenfalls NEO und NEO-ähnliche (PAR, LIV, RIB und BTR) Substanzen produzieren (vergl. Abb. 1.2 und Tab. 1.1). Chemisch gesehen kann man diese AGAs entweder als direkte Vorläufersubstanzen von NEO (RIB, SHOMURA *et al.*, 1970; BAUD *et al.*, 1977; vergl. 1.5), als von diesen abgeleitete Substanzen (BTR,

WOO *et al.*, 1971; DION *et al.*, 1972), oder als strukturell gleich aufgebaute und nur an wenigen Positionen anders substituierte (PAR und LIV, HASKELL *et al.*, 1959; MORI *et al.*, 1972) Antibiotika betrachten. Einen Überblick über die chemischen Strukturen der NEO-Familie gibt die Abb. 1.2.. Tatsächlich konnte mit der Identifizierung und Sequenzierung der wichtigsten Biosynthesecluster der AGAs (siehe Tab. 1.1) auch die Ähnlichkeit der wahrscheinlichen Biosynthesewege belegt werden (PIEPERSBERG *et al.*, 2007).

Vergleicht man die Cluster der NEO-Familie (Abb. 1.3), so fällt die hohe Ähnlichkeit in der Anordnung und der Anzahl der Gene auf. Alle Cluster enthalten neben den für die Biosynthese notwendigen Genen auch solche, deren Produkte wahrscheinlich für die Regulation der Antibiotikaproduktion und den Export des AGAs verantwortlich sind. Von einigen Biosynthesegenen findet man Homologe auch in Clustern anderer AGAs (z.B. in den Clustern der KAN-Familie, siehe 1.2.2), während andere charakteristisch für die NEO-Familie sind, was sie auch für biokombinatorische Studien (vergl. 1.4 und 1.5) interessant macht. Das *rib*-Cluster (siehe Abb. 1.3) von *S. ribosidificus* NRRL B-11466 ist nahezu identisch mit dem *neo*-Cluster (siehe Abb. 1.3) von *S. fradiae* DSM 40063. Beide Cluster werden von Resistenzgenen, einem Phosphotransferasegen (*aph*) und einem Acetyltransferasegen (*aacC8*), siehe Abb. 1.3, flankiert. Vergleicht man die Strukturen von RIB und NEO (siehe Abb. 1.2), so fällt das Fehlen des D-Glucosaminrestes an der 3"-Position von RIB auf. Die Anheftung und die nachfolgende Modifizierung dieses Restes katalysieren in der NEO-Biosynthese vermutlich die Genprodukte von *neoF*, *neoX* und *neoN* (vergl. 1.3.2). Homologe Gene (*ribF*, *ribX* und *ribN*) befinden sich auch im *rib*-Cluster. Es gibt keine Anzeichen dafür, dass sie nicht funktional sind oder nicht exprimiert werden. Da *S. ribosidificus* trotzdem keine Neomycine produziert, könnte ein Grund dafür wahrscheinlich in zwei vorhandenen, sich gegenseitig kompensierenden Leserasterverschiebungen innerhalb des Gens *ribN* liegen (ABOSHANAB, 2005; PIEPERSBERG *et al.*, 2007).

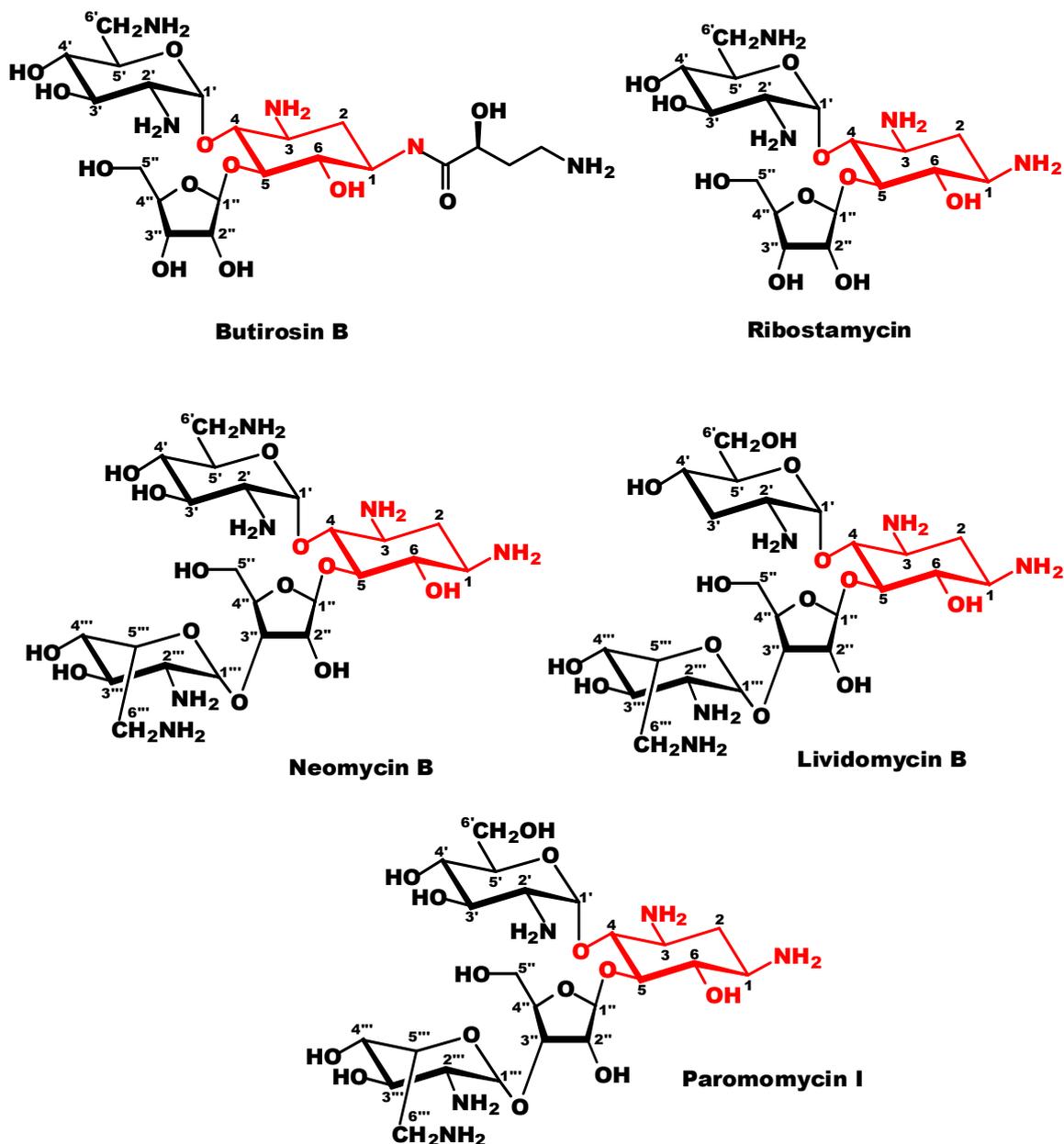


Abbildung -1.2- Chemische Strukturen der wichtigsten Vertreter der NEO-Familie.
Der charakteristische Cyclitolrest ist farblich markiert (siehe Abb. 1.1).

Die Cluster von *S. rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM 41429 (*par*-Cluster, Abb. 1.3) und *S. lividus* CBS 844.73 (*liv*-Cluster, Abb. 1.3) sind in weiten Teilen mit dem *neo*-Cluster identisch. Lediglich einige Gene sind an anderen Stellen oder sogar ganz außerhalb der Cluster lokalisiert. Das Gen für die Resistenz vermittelnde Acetyltransferase (*aacC7*) befindet sich bei *S. rimosus* in einem anderen Bereich des Chromosoms, während das Phosphotransferasegen (*pph*) im *rib*-Cluster liegt. Bei *S. lividus* konnten keine Resistenzgene im *liv*-Cluster identifiziert werden (vergl. Abb. 1.3

und PIEPERSBERG *et al.*, 2007). Das *btr*-Cluster von *Bacillus circulans* ATCC 21558 (Abb. 1.3) weist eine eher geringe Ähnlichkeit in Anordnung und Sequenz zu den übrigen Mitgliedern der NEO-Familie auf. *Bacillus* gehört taxonomisch zu den Firmicuten, die nur entfernt mit Actinomyceten verwandt sind und sich durch einen geringen GC-Gehalt ihrer DNA auszeichnen (32 – 69 %, GOLOVACHEVA *et al.*, 1975; DELEY, 1978), weshalb ihre Aminosäuren überwiegend durch AT-reiche Codons codiert werden.

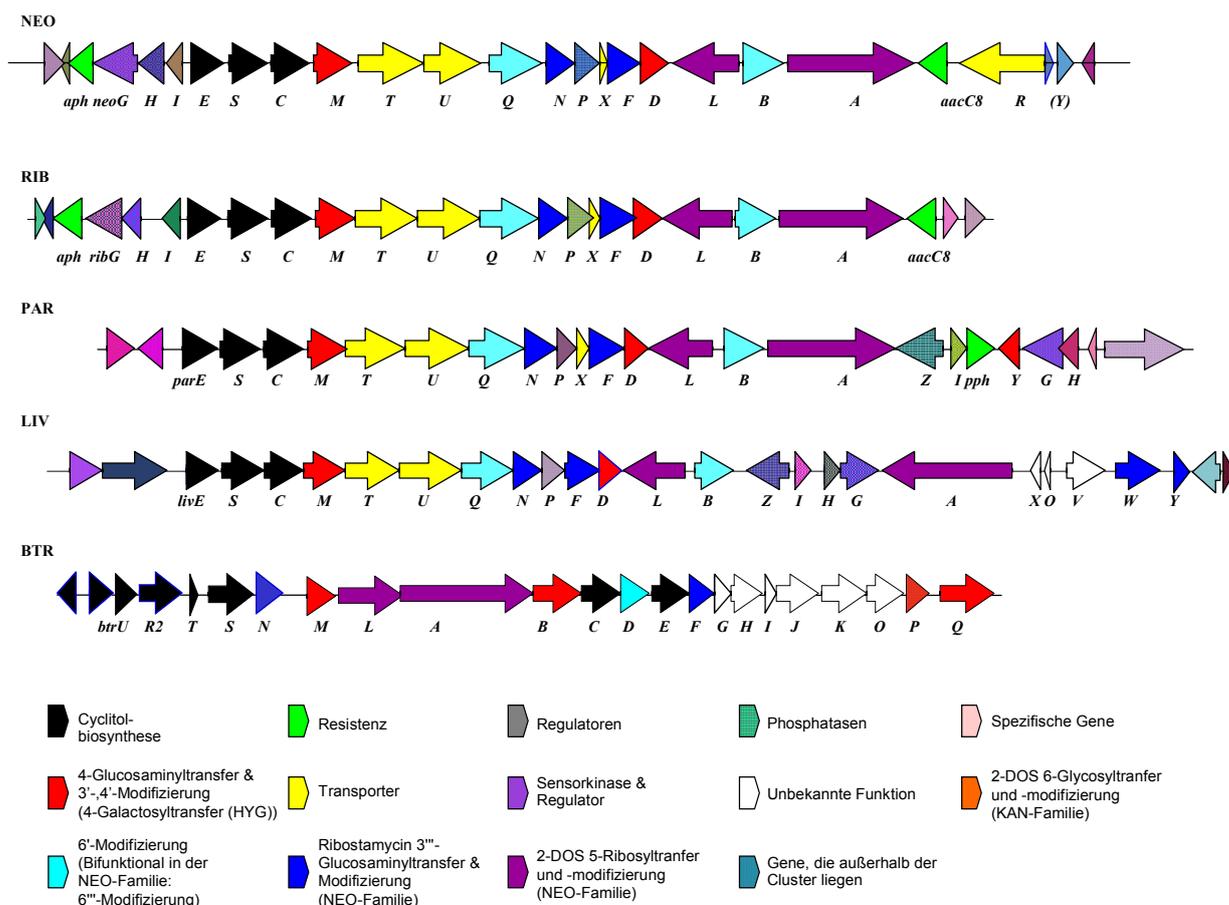


Abbildung -1.3- Gencluster der NEO-Familie. Die (putativen) Funktionen der Genprodukte sind angegeben und zu Gruppen geordnet. Die Accession-Nummern der Cluster in der EMBL-Datenbank sind in Tab. 1.1 angegeben. *neo*-Cluster = NEO; *rib*-Cluster = RIB; *par*-Cluster = PAR; *liv*-Cluster = LIV; *btr*-Cluster = BTR. Daten aus PIEPERSBERG *et al.*, 2007.

1.2.2 Die Kanamycinfamilie (KAN-Familie)

Zur KAN-Familie zählen GEN, KAN, Nebramycine und TOB (vergl. Abb. 1.5). „Nebramycin“ stellte sich als ein Komplex von AGAs heraus, dessen wirkungsvollsten Bestandteile TOB und APR waren. Produzenten für TOB oder APR wurden durch

Züchtung und Stammentwicklung gefunden. Es war zunächst unbekannt, dass TOB und Nebramycine einerseits und APR andererseits von zwei verschiedenen Genclustern produziert werden. Erst die genaue genetische Untersuchung der Produzenten ergaben, dass es sich um zwei verschiedene Biosynthesecluster handelte (vergl. PIEPERSBERG *et al.*, 2007). KAN wurde zuerst 1957 als das Fermentationsprodukt von *S. kanamyceticus* DSM 40500 beschrieben (TAKEUCHI *et al.*, 1957; UMEZAWA *et al.*, 1957). Es enthält, wie die Mitglieder der NEO-Familie, 2-DOS als Cyclitol (vergl. 1.2), ist aber in 4,6-Stellung substituiert (vergl. Abb. 1.5). Demzufolge findet man im *kan*-Cluster (KAN in Abb. 1.4) die entsprechenden Gene für die 2-DOS-Synthese, wie in den Clustern der NEO-Familie. Ebenfalls sind Gene vorhanden, deren Produkte als Exporter, Regulatoren und der Resistenz dienen. Im Unterschied zu den Produzenten der NEO-Familie werden aber überwiegend Methyltransferasen als Resistenzenzyme verwendet, die den Wirkort und nicht das Antibiotikum modifizieren (siehe 1.5). Auch sind einige Gene in den Clustern vorhanden, deren Produkten noch keine eindeutige Funktion zuzuweisen ist. Für den Aufbau bzw. die Modifizierung dieser AGAs sind sie möglicherweise nicht erforderlich.

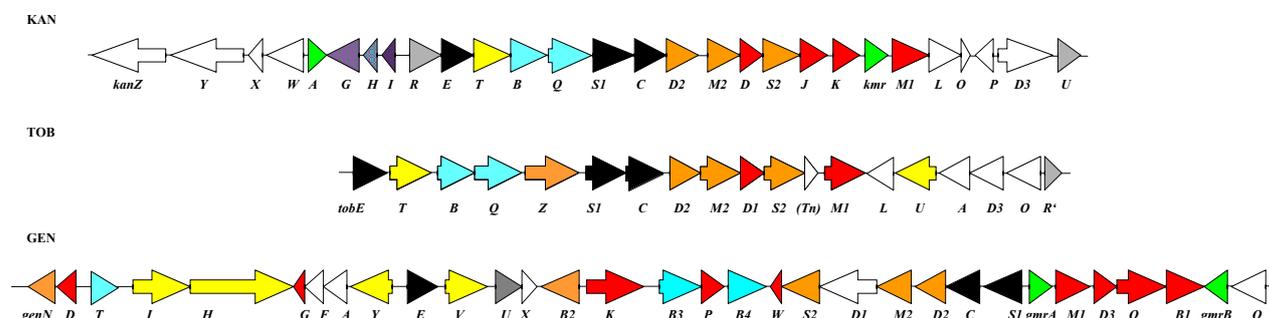


Abbildung -1.4- Gencluster der KAN-Familie. Eine Legende zu den putativen Enzymfunktionen ist in Abb. 1.3 gegeben. Die Accession-Nummern der Cluster in der EMBL-Datenbank sind in Tab. 1.1 angegeben. *kan*-Cluster = KAN; *tob*-Cluster = TOB; *gen*-Cluster = GEN. Daten aus PIEPERSBERG *et al.*, 2007.

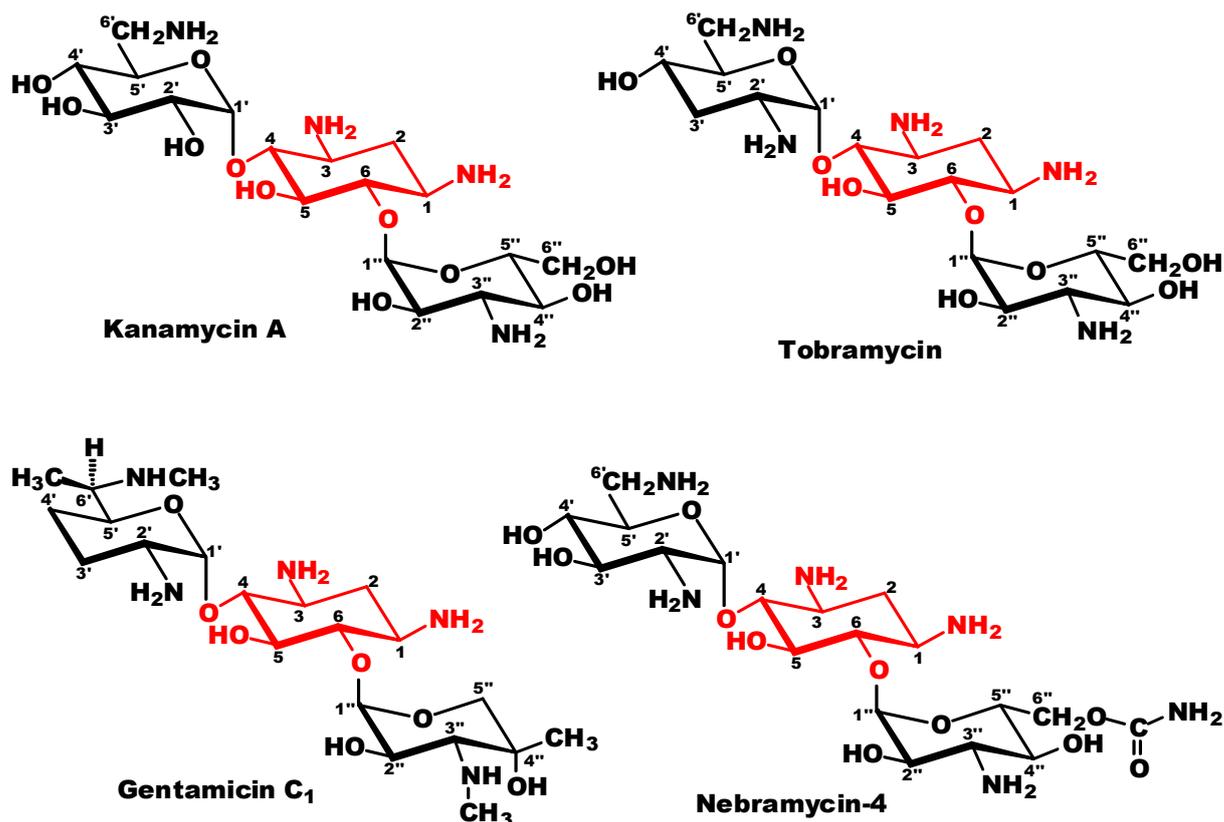


Abbildung -1.5- Chemische Strukturen der wichtigsten Vertreter der KAN-Familie. Der charakteristische Cyclitolrest ist farblich markiert (siehe Abb. 1.1).

Chemisch gesehen ist TOB 3'-Desoxy-KAN-B (vergl. Abb. 1.5). Das *tob*-Cluster (Abb. 1.4) von *S. sp. „tenebrarius“* DSM 40477 ist deshalb dem *kan*-Cluster sehr ähnlich. Es enthält alle Gene, die für die Synthese von KAN-B notwendig sind (vergl. 1.3), allerdings fehlen einige spezifische Gene, z.B. für die Resistenzenzyme und für die Enzyme, die die charakteristische 3'-Dehydroxylierung katalysieren. Vermutlich werden diese Funktionen von Enzymen übernommen, deren Gene im *apr*-Cluster liegen, welches in *S. sp. „tenebrarius“* ebenfalls vorkommt. So katalysieren z.B. die Genprodukte von *aprD3* und *aprD4* vermutlich die 3'-Dehydroxylierung in der Biosynthese von APR. In *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten in *S. kanamyceticus* konnte die 3'-Dehydroxylierung von KAN-B zu TOB durch AprD3 / AprD4 nachgewiesen werden (U. WEHMEIER, pers. Mitteilung). Sie sind deshalb ebenfalls gute Kandidaten für die 3'-Dehydroxylierung in der TOB-Biosynthese. Ein weiterer Hinweis auf eine gemeinsame Nutzung spezifischer Gene ist die Tatsache, dass das *tob*- und das *apr*-Cluster auch in anderen Produzenten, wie in *Streptoalloteichus hindustanus* DSM 44523 und *Saccharopolyspora hirusta* DSM 43463, nur zusammen vorkommen (vergl. PIEPERSBERG *et al.*, 2007). Darüber hinaus enthält das

tob-Cluster das Gen *tobZ*, dessen Produkt vermutlich eine Carbamoyltransferase ist, die für die Bildung der von *S. sp. „tenebrarius“* produzierten Nebramycine verantwortlich ist. Die Anordnung der Gene im *gen*-Cluster von *M. echinospora* DSM 43036 (Abb. 1.4) unterscheidet sich erheblich von der im *tob*- und *kan*-Cluster. Es gibt gute Hinweise darauf, dass das *gen*-Cluster durch Fusion eines *kan*-Clusters mit dem *for*-Biosynthesecluster entstanden sein könnte (vergl. PIEPERSBERG *et al.*, 2007), da einige Gene im *gen*-Cluster signifikante Ähnlichkeit mit Genen im *kan*-Cluster (z.B. die „S1“- , „D2“- und „M2“-Gene) und *for*-Cluster (z.B. *forD2 / genQ*, *forB / genB3* und *forH / genH*) aufweisen. Vergleicht man außerdem die chemischen Strukturen von GEN, KAN und FOR, so erkennt man einerseits den typischen Aufbau von KAN (siehe Abb. 1.5) mit 4,6-verknüpftem 2-DOS und andererseits das typische, komplexe Modifikationsmuster des 4-substituierten Aminozuckers, das sich in GEN und FOR stark ähnelt (siehe Abb. 1.1).

1.2.3 Hygromycin B

HYG-B wurde 1953 das erste Mal als Produkt von *S. hygroscopicus* ssp. *hygroscopicus* in der Literatur beschrieben (PITTENGER *et al.*, 1953 und MANN *et al.*, 1953). Es lagert sich an einer anderen Stelle (BRODERSEN *et al.*, 2000, 2002, 2003) als die anderen 2-DOS-AGAs an die 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms (siehe 1.2.4) und wirkt bakteriostatisch (BROWN *et al.*, 1993 und PFISTER *et al.*, 2003). Da in der Literatur keine *in vivo*-Fütterungsstudien mit *S. hygroscopicus* oder biochemische Charakterisierungen einzelner Enzyme beschrieben sind, konnte der Biosyntheseweg nur auf Basis der im *hyg*-Cluster codierten Gene postuliert werden (PIEPERSBERG *et al.*, 2007). Das Gencluster von *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* DSM 40578 enthält den charakteristischen Satz an Genen für die Synthese von 2-DOS (siehe oben). Betrachtet man weiterhin die chemische Struktur von HYG-B (siehe Abb. 1.1), so fällt die Inversion der C-4'-OH-Gruppe auf. Entweder wird anstelle von aktivierter D-Glucose aktivierte D-Galactose in der Glycosylierung von 2-DOS umgesetzt oder diese Position wird erst später epimerisiert. Wenn es sich bei dem Substrat wirklich um aktivierte D-Galactose handelt, wäre das wahrscheinlich als Galactosyltransferase verwendete Protein Hyg F für biokombinatorische Zwecke (vergl. 1.4) interessant, da dieser Transfer bei den Synthesen anderer AGAs nicht vorkommt.

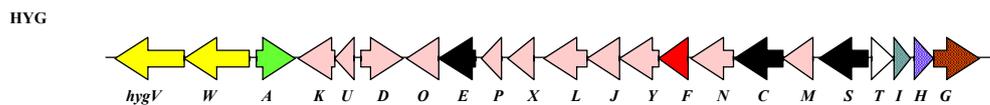


Abbildung -1.6- Das Gencluster von HYG-B. Eine Legende zu den putativen Enzymfunktionen ist in Abb. 1.3 gegeben. Die Accession-Nummer des Clusters in der EMBL-Datenbank ist in Tab. 1.1 angegeben. Daten aus PIEPERSBERG *et al.*, 2007.

1.2.4 Wirkung der AGAs

AGAs sind klinisch wichtige Substanzen (siehe 1.5), welche zum größten Teil bakterizid sowohl gegen Gram-positive wie auch Gram-negative Bakterien wirken (KOTRA *et al.*, 2000). Die meisten AGAs lagern sich über spezifische Wechselwirkungen einzelner chemischer Gruppen an die 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms (MOAZED & NOLLER, 1987; CECH, 2000). Durch die immer bessere Auflösung der Struktur des Ribosoms durch Röntgenstrukturanalysen (BAN *et al.*, 1998, 1999, 2000; CLEMONS *et al.*, 1999) und NMR-Untersuchungen (FOURMY *et al.*, 1996) war es möglich die genauen Wirkorte und -mechanismen zu identifizieren. Die Genauigkeit der Proteinbiosynthese wird durch die spezifische Interaktion der Ribonukleotide A1492 und A1493 der ribosomalen A-Stelle mit den ersten beiden mRNA-Codon-tRNA-Anticodon-Basenpaaren sichergestellt (OGLE *et al.*, 2001). Diese Wechselwirkung bewirkt eine lokale Konformationsänderung der A-Stelle von „Aus“ nach „An“, so dass das gesamte Ribosom von dem offenen in den geschlossenen Komplex übergeht (OGLE *et al.*, 2002).

Die 2-DOS enthaltenden AGAs (außer HYG-B) benutzen alle die in diesem Bereich gleiche Bindestelle und erzielen dieselbe Wirkung (CARTER *et al.*, 2000; SCHLÜNZEN *et al.*, 2001; WIRMER & WESTHOF, 2006): Sie bilden Wasserstoffbrücken zwischen der 6'-OH- (PAR, LIV, vergl. Abb. 1.2) bzw. 6'-NH₂-Gruppe (NEO, RIB, KAN, GEN, vergl. Abb. 1.2 und Abb. 1.5) und dem Ribonukleotid A1408 aus (siehe Abb.1.7). Zusätzliche Wasserstoffbrücken mit dem Phosphatrest zwischen den Ribonukleotiden A1492 und A1493 bewirken eine Konformationsänderung dieser beiden Nukleotide, so dass sie mit benachbarten Oligonukleotiden in Wechselwirkung treten, was die Interaktion von tRNA und mRNA simuliert. Diese Struktur wird durch weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminogruppen des 2-DOS-Ringes und G1494 und U1495 stabilisiert (siehe Abb. 1.7). Darüber hinaus gibt es AGA-spezifische Wechselwirkungen (FRANCOIS *et al.*,

2005). Die Konsequenz ist, dass die A-Stelle in der „Ein“-Position gehalten wird (CARTER *et al.*, 2000) und dadurch die Proteinbiosynthese empfindlich gestört wird (PAPE *et al.*, 2000).

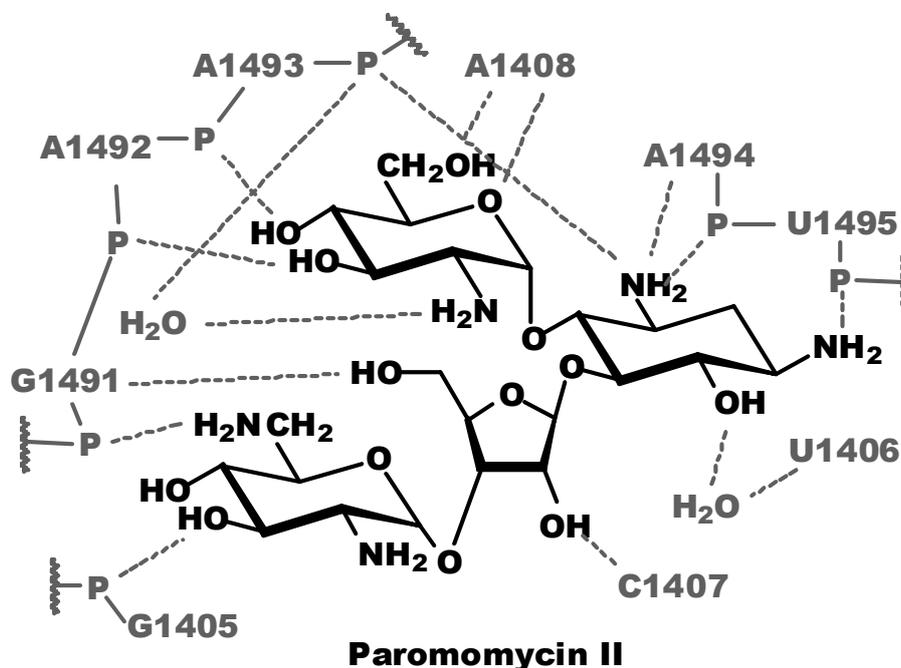


Abbildung -1.7- Schematische Darstellung der Interaktion von PAR mit der A-Stelle der 30S-Untereinheit. Die Ribonukleotide sind nach der *E. coli*-Nummerierung angegeben. Relevante Phosphatgruppen sind durch ein P dargestellt.

Streptomycin bindet ebenfalls in der Nähe der A-Stelle. Es tritt aber überwiegend mit den Phosphatgruppen der Ribonukleotide A913, A914, G526, G527, C1490, G1491 und dem Lysin46-Rest des Proteins S12 in Wechselwirkung, so dass es zu Störungen bei der Bindung der tRNA an die A-Stelle kommt (GREGORY *et al.*, 2005).

Hygromycin B bindet oberhalb der A-Stelle, wobei durch die Bindung keine Konformationsänderungen der rRNA ausgelöst werden (BRODERSEN *et al.*, 2000). Es entstehen Wasserstoffbrücken zu den Ribonukleotiden in der Region von 1400 – 1410 und 1490 – 1500 und schwache Wechselwirkungen mit der mRNA. Diese Interaktionen verhindern die Translokation des Ribosoms während der Elongation (FRANK & AGRAWAL, 2000).

AGAs werden seit Jahrzehnten ebenfalls in der Veterinärmedizin und Landwirtschaft, sowie als Selektionsmarker in molekulargenetischen Studien genutzt. Neueste Berichte deuten auch auf antivirale Aktivität u.a. gegen das Hepatitis-Delta-Virus (SCHROEDER *et al.*, 2000) und das Humane-Immunschwäche-Virus (HIV) durch Wechselwirkungen mit

der viralen RNA hin (TOK *et al.*, 2001; BERNACCHI *et al.*, 2007). Durch diese Wechselwirkungen können bestimmte virale Proteine nicht mehr mit ihrer Bindestelle an dem viralen Ribozym interagieren, wodurch die Transkription des viralen Genoms gestört wird (ELSON-SCHWAB & TOR, 2007).

1.3 Biosynthese von Neomycin und Kanamycin

1.3.1 Gemeinsame Biosyntheseschritte: Synthese von Paromamin

2-DOS, Paromamin, Neamin und RIB konnten von mehreren Gruppen durch Fütterungsexperimente mit radioaktiv markierten Substanzen (RINEHART *et al.*, 1974; FANG *et al.*, 1984) und Isolierung von *knock-out* Mutanten (SHIER *et al.*, 1969, 1974; CLARIDGE *et al.*, 1974; BAUD *et al.*, 1977) als Intermediate in der NEO- bzw. KAN-Biosynthese identifiziert werden. Desweiteren sind beide Biosynthesecluster sequenziert worden (vergl. Abb. 1.3 und Abb. 1.5). Durch *in silico*-Analysen (Datenbankvergleiche und Überprüfung auf funktionsspezifische Aminosäuren der translatierten Sequenzen), den Vergleich mit anderen sequenzierten Biosyntheseclustern (vergl. ABOSHANAB, 2005 und PIEPERSBERG *et al.*, 2007), und bereits bekannte Enzymfunktionen (überwiegend aus der BTR-Biosynthese von *B. circulans*, BtrC: KUDO *et al.*, 1999; BtrS: HUANG *et al.*, 2002; TAMEGAI *et al.*, 2002) konnte für beide Produzenten ein Biosyntheseweg postuliert werden: Sowohl die NEO- als auch die KAN-Biosynthese geht von D-Glucose-6-phosphat, einem ubiquitären Primärstoffwechselprodukt aus, welches in Gegenwart von NAD⁺ und Co²⁺ in einer von KanC bzw. NeoC katalysierten Zyklisierungsreaktion in 2-Desoxy-*scyllo*-inosose umgewandelt wird (KUDO *et al.*, 2005; ABOSHANAB, 2005). Diese wird durch das PLP-abhängige Enzym KanS1 bzw. NeoS zu 2-Desoxy-*scyllo*-3-inosamin mit L-Glutamin als Donor transaminiert (HUANG *et al.*, 2002; ABOSHANAB, 2005) und anschließend die Hydroxylgruppe an Position 1 oxidiert (katalysiert durch KanE / NeoE, KUDO *et al.*, 2005; ABOSHANAB, 2005). Die so entstandene Ketogruppe wird analog zu dem zweiten Schritt durch KanS1 / NeoS aminiert, so dass 2-DOS entsteht (KUDO *et al.*, 2005; ABOSHANAB, 2005). Die Kristallstruktur des zu KanS1 / NeoS homologen BtrS wurde veröffentlicht (POPOVIC *et al.*, 2006). Die S-Enzyme der 2-DOS-AGAs sind stark

verwandt, auch zu StsA/StrS aus der STR-Biosynthese, deshalb wurden sie als Sonde zur Suche von AGA-Clustern verwendet (KHAREL *et al.*, 2004a,b,c; Aboshanab, 2005; SUBBA *et al.*, 2005).

Für die auf 2-DOS folgenden Biosyntheseschritte gab es länger bereits Hinweise: Aus Fütterungsexperimenten mit radioaktiv markierter D-Glucose und D-Glucosamin weiß man, dass D-Glucose von *S. kanamyceticus* in alle drei Ringeinheiten der KANs gleichermaßen inkorporiert wird. D-Glucosamin wird dagegen bei der Bildung von Paromamin direkt eingebaut, während 2-DOS und die Kanosamin-Einheit (entspricht 3-Amino-D-glucose) durch D-Glucosamin wesentlich schwächer markiert werden (KOJIMA *et al.*, 1975). Der direkt Einbau von D-Glucosamin bedingt aber eine spätere Desaminierung der C-2'-Position, um die Bildung von KAN A (siehe 1.3.3) erklären zu können. Die Bildung des Pseudodisaccharids Paromamin aus 2-DOS kann auf zwei Arten erfolgen: Es entsteht entweder direkt oder es wird zuerst 2'-N-Acetylparomamin gebildet. Diese Bildungsreaktion wird vermutlich durch die Glycosyltransferasen NeoM bzw. KanM1 katalysiert. Die entsprechenden homologen Gene sind in allen Biosyntheseclustern der NEO- und KAN-Familie identifiziert worden (siehe Abb. 1.3, Abb. 1.4 und PIEPERSBERG *et al.*, 2007). Diese Enzyme wurden bisher enzymologisch noch nicht in der Literatur beschrieben. Als Substrat wird wahrscheinlich UDP-D-Glucosamin oder UDP-N-Acetyl-D-glucosamin aus den Primärstoffwechselwegen benutzt. Die mögliche anschließende Deacetylierung durch KanN bzw. NeoD führt zum letzten gemeinsamen Intermediat Paromamin, welches bereits schwache antibiotische Aktivität aufweist (DUTCHER *et al.*, 1951).

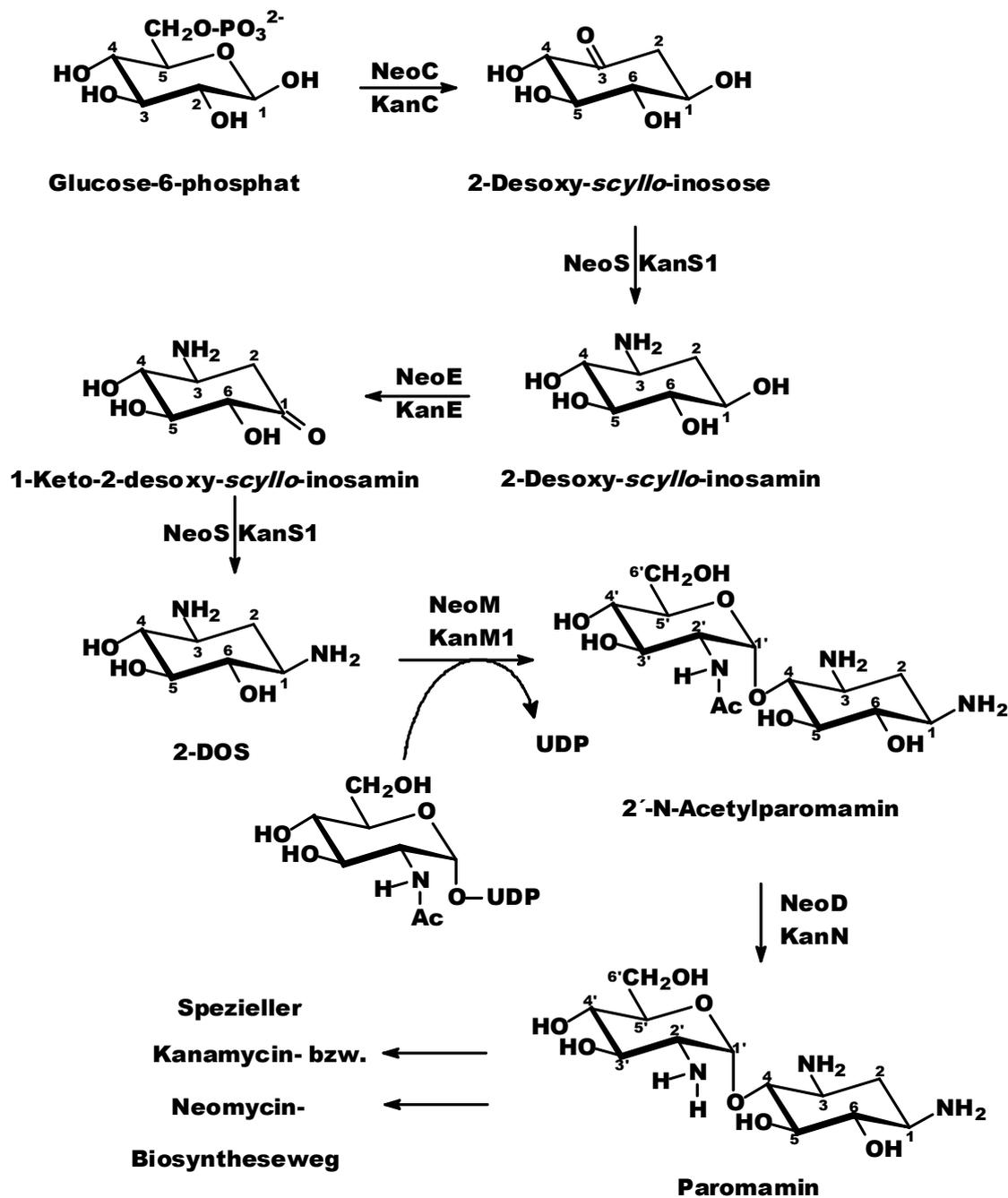


Abbildung -1.8- Der untere NEO- und KAN-Biosyntheseweg.
Die Enzyme, die die einzelnen Reaktionen katalysieren, sind angegeben.

1.3.2 Biosyntheseschritte von Paromamin bis Neomycin

HUANG *et al.*, 2007, zeigen, dass der nächste Schritt in der NEO-Biosynthese eine Aminierung des C-6'-Kohlenstoffs des Paromamins ist. Dies geschieht durch die Oxidation der 6'-Hydroxylgruppe durch NeoQ (Dehydrogenase). Die so gebildete

Carbonylgruppe wird als Akzeptorgruppe für die NeoB-katalysierte Übertragung einer Aminogruppe von Glutamin verwendet (Transaminierung). Das entstandene Produkt Neamin (NEO A) war schon aus Komplementationsversuchen mit idiotrophen Mutanten als Zwischenprodukt in der Neomycinbiosynthese identifiziert worden (PEARCE *et al.*, 1976). Es wird anschließend an der 5-Position, wahrscheinlich durch NeoA und NeoL, mittels 5-Phospho-1-Diphosphoribose (PRPP) ribosyliert; die homologen Proteine BtrA und BtrL von *B. circulans* katalysieren jedenfalls diese Reaktion in der Biosynthese von Butirosin (KUDO *et al.*, 2007). Es entsteht Ribostamycin, welches bei *S. ribosidificus* NRRL B-11466 das hauptsächliche Endprodukt im Kulturfiltrat und antibiotisch aktiv ist (SHOMURA *et al.*, 1970). Als nächster Schritt folgt eine erneute Kondensation mit UDP-GlcNAc an der 3"-Position des Ribosylrestes von RIB. Wie bei der Bildung von Paromamin könnte die Glycosyltransferase NeoM das kondensierende Enzym sein und es entsteht 2"-*N*-Acetyl-6"-hydroxy-NEO-C. Dass wiederum UDP-aktiviertes (*N*-Acetyl-) D-Glucosamin als Substrat der Glycosyltransferasereaktion verwendet wird, zeigten Fütterungsexperimente (RINEHART *et al.*, 1974). Allerdings sind die Akzeptoren in beiden Reaktionen sehr unterschiedlich, was eine hohe Substratflexibilität von NeoM voraussetzen würde. Es wurde beispielsweise eine Mutante von *S. fradiae* isoliert, die nur Ribostamycin produziert (BAUD *et al.*, 1977), was auf eine zweite (andere?) Glycosyltransferasefunktion hindeuten könnte. Die Reaktion würde dann vermutlich durch die Glycosyltransferase NeoF, die ebenfalls im *neo*-Cluster kodiert ist, unter Verwendung von UDP-*N*-Acetyl-D-glucosamin oder UDP-D-Glucosamin katalysiert. Damit ist das Zuckergerüst vollständig aufgebaut. Die letzten Schritte der Biosynthese von NEO stellen Modifikationen an einzelnen Positionen dar. Z.B. wird in der 2"-Position eine weitere *N*-Deacetylierung benötigt, welche ebenfalls durch NeoD katalysiert werden könnte. Die Aminierung der 6"-Position wird wieder durch NeoQ und NeoB katalysiert. HUANG *et al.*, 2007, konnten zeigen, dass NeoB wahrscheinlich bifunktional ist und die Übertragung der 6"-Aminogruppe von Neomycin B auf α -Ketoglutarensäure (Rückreaktion) katalysiert. Das postulierte 6"-Aldehyd-enthaltende Intermediat konnten sie ebenfalls isolieren und identifizieren. Dass 6"-Hydroxy-NEO-C und nicht UDP-D-Glucosamin vor der Glycosylierung von RIB durch NeoQ und NeoB transaminiert wird, konnte durch die Isolierung und Identifizierung von 6"-Hydroxy-NEO-C aus Kulturen von *S. fradiae* bewiesen werden (AUTISSIER *et al.*, 1981). Die Epimerisierung von Neomycin B zu Neomycin C wird vermutlich von NeoN und NeoX katalysiert (PIEPERSBERG *et al.*, 2007).

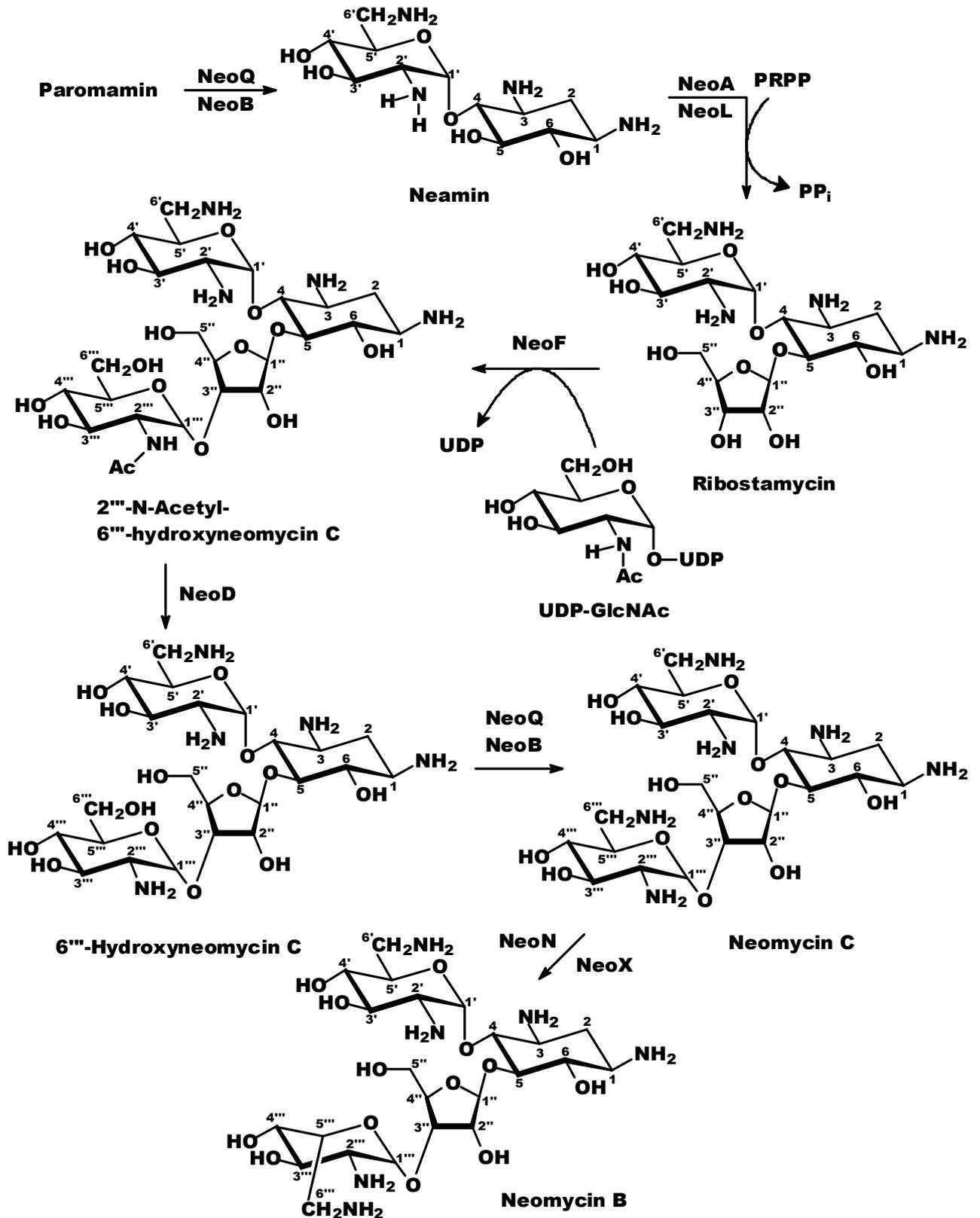


Abbildung -1.9- Der spezielle Neomycinbiosyntheseweg.
Die postulierten Genprodukte, die die einzelnen Reaktionen katalysieren, sind angegeben.

1.3.3 Biosyntheseschritte von Paromamin zu Kanamycin

Über den auf die Bildung von Paromamin folgenden KAN-Biosyntheseweg ist wenig an experimentellen Daten verfügbar. Durch *in silico*-Analysen (vergl. ABOSHANAB, 2005 und PIEPERSBERG *et al.*, 2007) war es möglich, einen weiteren Weg zu postulieren: Aus Paromamin und nukleotidaktivierter D-Glucose (wahrscheinlich UDP-Glucose) entsteht mit Hilfe von KanM2 6-*O*-Glucosylparomamin, welches durch die Wirkung von KanD2 (Dehydrogenase) und KanS2 (Aminotransferase) in der 3"-Position aminiert wird. Alternativ könnte die Oxidation und Transaminierung von UDP-D-Glucose zu UDP-Kanosamin auch vor der Glycosyltransferasereaktion stattfinden. Eine solche Reaktion wurde in *B. aminoglucosidicus* beobachtet (UMEZAWA *et al.*, 1968). Das Produkt KAN-C ist bereits im natürlichen Produktspektrum von *S. kanamyceticus* vorhanden (CRON *et al.*, 1958; MURASE *et al.*, 1970). Die folgende Aminierung der C-6'-Hydroxylgruppe wird vermutlich durch KanQ und KanB katalysiert, die mit NeoQ und NeoB (siehe 1.3.2) verwandt sind (NeoQ / KanQ 40 %, NeoB / KanB 35 % identische Aminosäuren). Diese Enzyme können aber nicht bifunktional sein und sollten auch Paromamin nicht als Substrat erkennen, da sonst die Bildung von KAN-C einen zusätzlichen Desaminierungs- und Hydrolyseschritt beinhalten müsste. Entsprechende Gene sind in den Clustern bisher nicht identifiziert worden. Die postulierte Desaminierung des entstandenen KAN-B an der C-2'-Position durch KanJ und KanK führt zu KAN-A, dem natürlichen Hauptprodukt.

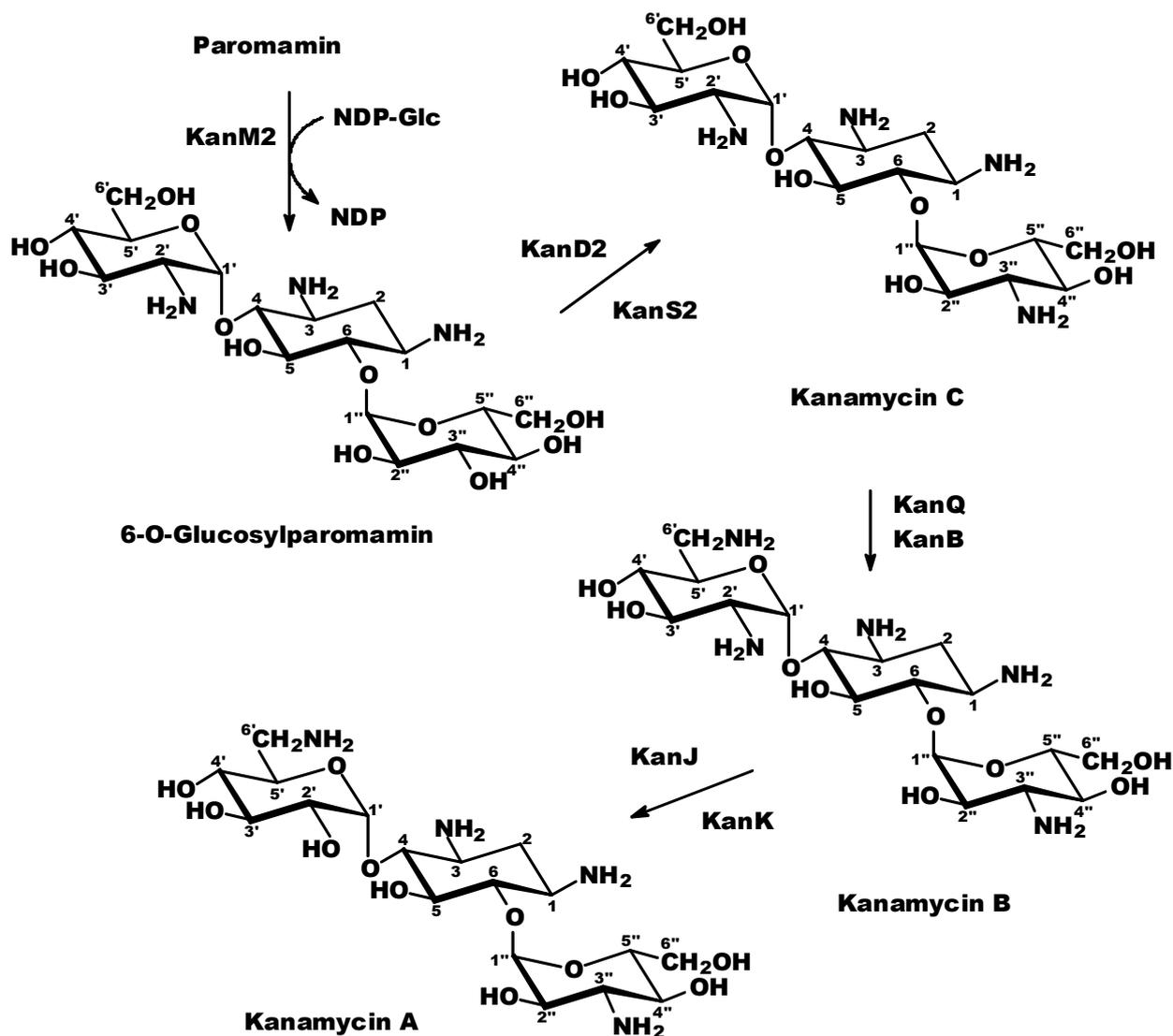


Abbildung -1.10- Der spezielle Kanamycinbiosyntheseweg.
Die postulierten Genprodukte, die die einzelnen Reaktionen katalysieren, sind angegeben.

1.4 Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen (EC 2.4.) kommen ubiquitär in allen Organismen vor. Sie sind verantwortlich für den Transfer einer (aktivierten) Zuckereinheit auf einen Saccharid- (Mono- und Oligosaccharide) oder Nicht-Saccharidakzeptor (Phosphat, Proteine, Fettsäuren und viele verschiedene Sekundärmetabolite). Sie stellen damit eine wichtige Möglichkeit der Zelle dar, komplexe Kohlenhydrate und Polysaccharide als Speicher-, Gerüst-, Erkennungs- und Signalstoffe zu synthetisieren und in Kombination mit

Glucosidasen zu prozessieren. Die Knüpfung einer glycosidischen Bindung erfordert unter physiologischen Bedingungen die Zufuhr freier Enthalpie ($\Delta G^0 = 16 \text{ kJ/mol}$). Diese freie Enthalpie steht oft in Form von Nukleotiddiphosphaten, welche in der Regel an die anomere reduzierende Gruppe der Zuckereinheit gebunden sind, zur Verfügung. Das Nukleotid am anomeren C-Atom des Zuckers stellt eine gute Abgangsgruppe dar und ermöglicht so die Bildung einer glycosidischen Bindung mit einem Akzeptor-Molekül in einer von Glycosyltransferasen katalysierten Reaktion. Die Irreversibilität der Reaktion wird durch die Spaltung des Pyrophosphates, das bei der Pyrophosphorylase-Reaktion gebildet wird, erreicht. Die meisten Glycosyltransferasen nutzen einen nukleotidaktivierten Zucker als Donor und werden klassisch auch als Leloir-Enzyme, nach dem Entdecker der ersten nukleotidaktivierten Zucker, Luis F. Leloir (Nobelpreis 1970), bezeichnet. Es können aber auch lipidverknüpfte Zuckerphosphate (Polyprenolmono- und -diphosphat) oder Zuckerphosphate (Glucose-1-diphosphat) von Glycosyltransferasen umgesetzt werden (SCHULZ & ELBEIN, 1974; WHITHERS *et al.*, 2002). Einige Pflanzen sind in der Lage *myo*-Inositol-aktivierte Galactose (Galactinol) als Zuckerdonor für die Synthese von Raffinose, Stachyose und Verbascose zu nutzen (LEHLE & TANNER, 1973; PETERBAUER & RICHTER, 1998; PETERBAUER *et al.*, 2001).

Glycosyltransferasen zeichnen sich durch eine hohe Regio- und Stereospezifität aus. Der Transfer des Zuckers auf das Akzeptormolekül kann entweder unter Retention oder unter Inversion der Konfiguration am anomeren Kohlenstoff des Zuckers verlaufen (SINNOT, 1990). Auch brauchen sie zweiwertige Metallionen, meistens Magnesium- oder Manganionen, als Cofaktor im aktiven Zentrum, welche als Lewis-Säure an die Phosphatreste der Abgangsgruppe binden. Zur Klassifizierung der Glycosyltransferasen dienen der Donor-Typ sowie die Position und die Stereochemie des Transfers auf den Akzeptor (PALCIC, 1999). Wie bei anderen Klassen von Enzymen, die auf Kohlenhydrate wirken, z. B. Glucosidasen, hat man auch die Glycosyltransferasen aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in Familien eingeteilt (COUTINHO *et al.*, 2003). So sind heute über 90 Familien (vergl. <http://www.cazy.org>) beschrieben. Betrachtet man dagegen ihre dreidimensionale Struktur, so findet man nur zwei Topologien, in die sich fast alle bekannten Glycosyltransferasen falten, die GT-A- und die GT-B-Topologie (UNLIGIL & RINI, 2000; BOURNE & HENRISSAT, 2001; HU & WALKER, 2002; COUTINHO *et al.*, 2003). Die GT-A-Topologie besteht aus zwei so dicht beieinander liegenden Rossmann-Domänen (β -Faltblatt- α -Helix- β -Faltblatt, typisch für nukleotidbindende Proteine; RAO & ROSSMANN, 1973), dass eine zentrales, ununterbrochenes β -Faltblatt entsteht (UNLIGIL &

RINI, 2000). Die beiden Rossmann-Domänen der GT-B-Faltung liegen weniger dicht und etwas flexibler nebeneinander (UNLIGIL & RINI, 2000). Eine dritte Topologie (GT-C) wurde von LIU & MUSHEGIAN, 2003, für Transmembranglycosyltransferasen vorgeschlagen. Diese konnte aber noch nicht durch experimentelle Daten bestätigt werden.

Glycosylierung spielt eine essentielle Rolle für die Bioaktivität vieler Sekundärmetabolite (SCHLÜNZEN *et al.*, 2001; THORSON *et al.*, 2001). Die Aktivität kann durch Erhöhung der Polarität und damit der Löslichkeit gesteigert werden, so dass sie überhaupt erst biologisch verfügbar sind (z.B. sind viele Polyketidantibiotika unglycosyliert in Wasser praktisch unlöslich). Ebenfalls ist die chemische Stabilität der glycosylierten Verbindung gegenüber dem Aglycon höher (GACHON *et al.*, 2005). Oft sind auch bestimmte Gruppen an den Zuckerresten für die Interaktion mit dem Wirkort verantwortlich. Viele dieser Zuckereinheiten sind einzigartige Desoxyhexosen, welche aus Intermediaten des primären Zuckerstoffwechsels synthetisiert werden (PIEPERSBERG & DISTLER, 1997; FAUST *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2002; FISCHER *et al.*, 2003; OGASAWARA *et al.*, 2004).

Manche Glycosyltransferasen besitzen eine gewisse Substratflexibilität, d.h. es können auch andere aktivierte Zuckereinheiten auf ihre Akzeptormoleküle übertragen werden, und es werden auch andere Akzeptormoleküle umgesetzt, so dass bereits einige „unnatürliche“ Verbindungen erzeugt werden konnten (LUTZHETSKYY & BECHTHOLD, 2005; BLANCHARD & THORSON, 2006; ZHANG *et al.*, 2006). Die biotechnologische Verwendung der Glycosyltransferasen scheitert aber oft an der Verfügbarkeit nukleotidaktivierter Zucker. Eine interessante Möglichkeit, bisher nicht zugängliche nukleotidaktivierte Zucker zu erhalten, zeigten MINAMI *et al.*, 2005 und ZHANG *et al.*, 2006. Sie nutzten die Tatsache, dass Glycosyltransferasen nicht nur die Übertragung eines nukleotidaktivierten Zuckers auf ein Aglycon, sondern auch die reverse Reaktion katalysieren. So konnten aus natürlichen Glycosiden durch Reaktion mit verschiedenen Nukleotid-Diphosphaten in durch Glycosyltransferasen katalysierten Reaktionen neue NDP-aktivierte Zucker dargestellt werden.

Neue Berichte zeigen, dass es ebenfalls möglich ist, durch gezielte Mutationen im aktiven Zentrum der Glycosyltransferasen, die Zucker-Donor Spezifität zu erweitern. Es gelang nicht nur natürliche Zucker umzusetzen, sondern auch chemisch modifizierte Zucker, die einen „chemischen Handgriff“ zur späteren Modifikation (Kupplung eines Radionuklides oder cytotoxische Verbindungen) enthielten. Diese Zuckerreste sollen z.B. an Antikörper gebunden (konjugiert) werden und so als therapeutische Substanzen in der Krebstherapie

eingesetzt werden (OUZZINE *et al.*, 2002; KHIDEKEL *et al.*, 2003; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2005; QASBA *et al.*, 2006 & 2008).

In den Biosynthesewegen der 2-DOS-AGAs kommen prinzipiell 4 verschiedene Glycosyltransferasefunktionen vor: Die Bildung des Pseudodisaccharides Paromamin wird durch Glycosyltransferasen katalysiert (NeoM, LivM, KanM1, TobM1, usw.), von denen homologe Gene in allen Clustern für AGAs, die auf einer Cyclitol-Glucosamin-Struktur aufbauen, gefunden worden sind. Spezielle Glycosyltransferasefunktionen werden von den Ribosyltransferasen („A“- und „L“-Enzyme in der NEO-Familie), den „M2“-Enzymen in der KAN-Familie und den „F“-Enzymen in der NEO-Familie übernommen und weisen untereinander keine Homologien auf. Die putative Galactosyltransferase aus der HYG-B-Biosynthese weist keinerlei Ähnlichkeit zu den anderen Glycosyltransferasen auf, ist aber biochemisch wahrscheinlich trotzdem mit diesen verwandt, da eine analoge Reaktion katalysiert wird. Gleiches gilt für die Glycosyltransferasen in der STR/SPC-Gruppe von AGAs. Experimentell charakterisiert sind außer BtrA und BtrL (vergl. 1.3.2) bisher noch keine Vertreter dieser Glycosyltransferasen.

Die „M“- und „F“-Glycosyltransferasen der AGA-Biosynthesen stellen eine eigene Familie dar, die bis jetzt noch nicht in der aktuellen Literatur beschrieben worden ist, und zu anderen Glycosyltransferasefamilien nur sehr geringe Übereinstimmungen aufweist. Im Moment sind sie aufgrund bestimmter Sequenzmotive und Sekundärstrukturvorhersagen (KELLEY *et al.*, 2000) in die Familie GT4 eingruppiert (vergl. www.cazy.org) worden, wonach sie eine GT-B-Topologie (siehe oben) aufweisen und die Katalyse unter Retention des anomeren Kohlenstoffs abläuft. Kristallstrukturdaten existieren bisher nicht.

Wie andere Glycosyltransferasen auch, sind auch die Glycosyltransferasen der AGAs für biokombinatorische Zwecke interessant. So könnten durch Austausch oder Zusatz bestimmter Glycosyltransferasefunktionen modifizierte AGAs erzeugt werden, die weniger Nebenwirkungen (siehe 1.5) besitzen könnten und gegen die es noch keine resistenten Stämme gibt (siehe 1.5).

1.5 Medizinische Anwendung der AGAs

AGAs werden bei oraler Aufnahme nur sehr schlecht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert und unverändert über den Stuhl wieder ausgeschieden. Sie eignen sich deshalb

zur Behandlung von Magen-Darm-Infektionen oder zur Sterilisation des Darms vor Operationen. Ebenfalls werden oberflächliche Infektionen, z.B. bei Verbrennungen oder Augenkrankheiten, mit AGAs behandelt. Systemische Infektionen können mit AGAs behandelt werden, wenn sie intravenös oder intramuskulär gespritzt werden. Aufgrund der hohen Nephro- und Ototoxizität (MINGEOT-LECLERCQ & TULKENS, 1999; BRUMMETT & FOX, 1989) sind sie aber nur in schweren Fällen (z.B. in Intensivpatienten oder bei Lepra und Tuberkulose) indiziert und die Behandlung muss streng überwacht werden (WALKER & DUGGIN, 1988; ZEMBOWER *et al.*, 1998; PRINS *et al.*, 1998).

Schon seit den 1960er Jahren häufen sich die Berichte über Resistenzen von pathogenen Bakterien gegen AGAs. Diese Resistenzen konnten sich weltweit stark ausdehnen, da sie meistens über R-Plasmide, Transposons, Insertionselemente und Integrons verbreitet werden (UMEZAWA *et al.*, 1967; DOI *et al.*, 1968; YAMANE *et al.*, 2004; GONZALEZ-ZORN *et al.*, 2005a, 2005b; GALIMAND *et al.*, 2005). Trotz der Entdeckung weiterer (LIV, BTR) und der Einführung von chemisch modifizierten (halbsynthetischen) AGAs wie Amikacin, Isepamicin und Arbekacin (vergl. Abb 4.17), die auch gegen vorher resistente Stämme gute Wirksamkeit zeigten, gibt es heute mehr und mehr AGA-resistente Stämme, so dass die AGAs an Bedeutung verlieren. Man kennt drei Arten der spezifischen Resistenz gegen AGAs, die auch von ihren Produzenten als Schutz genutzt werden (MINGEOT-LECLERCQ *et al.*, 1999): Erstens kann eine Bindestelle des AGAs im Ribosom mutiert sein (SKEGGS *et al.*, 1987; DE STASIO *et al.*, 1989) oder aktiv durch Methyltransferasen methyliert werden, so dass eine Bindung nicht mehr möglich ist (VASILJEVIC & CUNDLIFFE, 1990; BASSO & BLANCHARD, 1998; RECHT *et al.*, 1999; DOI *et al.*, 2004). So ist die N1-Position des Ribonukleotids A1408 und die N7-Position von G1405 häufig in Bakterien methyliert, die 4,5-disubstituierte AGAs produzieren. Zweitens kann der Import des AGAs in die Zelle durch Mutationen an bestimmten Membranproteinen gestört sein (MCENROE & TABOR, 1984; YOUNG *et al.*, 1992), oder das AGA wird durch bestimmte Exportersysteme aktiv wieder ausgeschleust (ROSENBERG *et al.*, 2000; POOLE, 2005). Der dritte und bisher häufigste gefundene Mechanismus allerdings ist die enzymatische Modifikation der AGAs (*N*-Acetylierung, *O*-Nukleotidylierung und *O*-Phosphorylierung, vergl. Abb. 1.11), so dass sie nicht mehr mit dem Ribosom in Wechselwirkung treten können (SHAW *et al.*, 1993; DAVIES & WRIGHT, 1997; RATHER, 1998). So führt z.B. die Acetylierung der 6'-Aminogruppe von 2-DOS-AGAs dazu, dass sich der Komplex zwischen dem Ribonukleotid A1408 und dieser Aminogruppe aufgrund der veränderten Ladungsverhältnisse und der sterischen Hinderung nicht mehr ausbilden kann, was die

Bindung des AGAs unmöglich macht. Die verantwortlichen Resistenzenzyme (Acetyltransferasen [AACs], Nukleotidyltransferasen [ANTs] und Phosphotransferasen [APHs], vergl. Abb. 1.11) weisen häufig trotz der hohen Regioselektivität auch eine hohe Substratflexibilität auf, so dass von einem Enzym strukturell unterschiedliche AGAs modifiziert werden können. Außerdem existieren von jedem Enzym eine ganze Reihe von Isoenzymen, die alle dieselbe Stelle modifizieren, aber verschiedene AGAs als Substrate erkennen können (FONG & BERGHUIS, 2002).

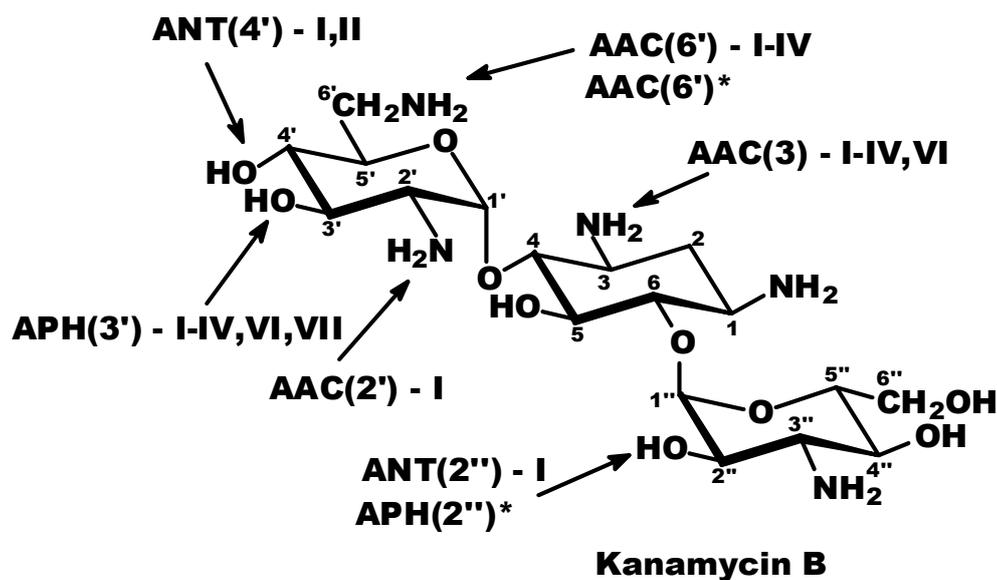


Abbildung -1.11- Modifizierung von KAN-B durch Resistenzenzyme. Jedes Enzym modifiziert nur eine bestimmte Stelle, welche durch die Angabe des C-Atoms in Klammern hinter dem Namen gekennzeichnet ist. Isoenzyme sind durch römische Zahlen gekennzeichnet. * = bifunktionales Enzym, AAC = *N*-Acetyltransferase, ANT = *O*-Nukleotidyltransferase, APH = *O*-Phosphotransferase. Daten aus SHAW *et al.*, 1993.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die weitere Aufklärung der Biosynthesewege des Kanamycins und Neomycins in den Produzentenstämmen *S. kanamyceticus* DSM 40500 und *S. fradiae* DSM 40063. Die Biosynthese des gemeinsamen Intermediates 2-DOS ist mittlerweile aufgeklärt (vergl. 1.3.1), während über die weiteren Schritte wenig bis nahezu gar nichts an experimentellen Erkenntnissen veröffentlicht ist. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Glycosyltransferasen, welche das Zuckerrückgrat der Verbindungen aufbauen, wobei die Enzyme NeoM und KanM1 die gleiche Reaktion in den jeweiligen Biosynthesen

katalysieren. Die für die einzelnen Biosynthesen spezifischen Glycosyltransferasen NeoF, KanM2 und HygF sollten ebenfalls charakterisiert werden, womit 3 der 4 vorkommenden Glycosyltransferasefunktionen (vergl. 1.4) experimentell bestätigt wären. Mit diesen neuen Funktionalitäten sollten erste biokombinatorische Versuche zur Erzeugung neuer AGAs (vergl. 1.4) durchgeführt werden. Zusätzlich sollten die homologen Deacetylasen NeoD und KanN untersucht werden. Von beiden Stämmen sollten durch gezielte Integration eines Resistenzgens in eines der Glycosyltransferase- bzw. Deacetylasegene *knock-out*-Mutanten erzeugt werden, die biochemisch und genotypisch charakterisiert und auf genetischer Ebene komplementiert werden sollten, um eine jeweilige Beteiligung an der Biosynthese nachzuweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien hatten alle mindestens die Qualitätsstufe „pro analysi, p.a.“ und wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Merck, Darmstadt
- Roth, Karlsruhe
- Sigma /Aldrich, Taufkirchen
- Fluka, Buchs (Schweiz)
- Serva, Heidelberg

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Alkalische Phosphatasen, Proteinase K, Lysozym, Nukleasen und DNA-Polymerasen wurden von den Firmen New England Biolabs, Frankfurt a.M.; Roche Diagnostics, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Sigma / Aldrich, Taufkirchen; und Invitrogen, Karlsruhe; bezogen und nach Anleitung des jeweiligen Herstellers benutzt.

2.2 Anzuchtmedien

Alle eingesetzten Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung bei 121 °C 15 min autoklaviert. Nicht hitzestabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Membranfilter mit 0,22 µm Porendurchmesser der Firma Roth, Karlsruhe) und dem autoklavierten Medium nach Erkalten zugesetzt. Es wurde, falls nicht anders vermerkt, nur doppelt destilliertes Wasser verwendet.

Medien für *Escherichia coli*:**LB-Medium**

(modifiziert nach MILLER, 1972)

Trypton	10 g / l
Hefeextrakt	5 g / l
NaCl	10 g / l
	pH = 7,2
ggf. Agar	16 g / l

LB-Betain/Sorbitol-Medium(CHEN *et al.*, 1999)

LB-Medium	
Betain	2,5 mM
Sorbitol	1 M

2xYT-Medium (MILLER, 1972)

Trypton	16 g / l
Hefeextrakt	10 g / l
NaCl	5 g / l
	pH = 7,2

SOB-Medium (HANAHAH, 1983)

Bacto-Trypton	20 g / l
Hefeextrakt	5 g / l
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

nach dem Autoklavieren

MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

SOC-Medium (HANAHAH, 1983)

SOB-Medium

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

Minimalmedium (modifiziert nach
SAMBROOK & RUSSEL, 2001)

Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O	50 mM
KH ₂ PO ₄	20 mM
NH ₄ Cl	20 mM
NaCl	1 mM
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	5 mM
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,1 mM
ggf. Agar	16 g / l

nach dem Autoklavieren

ggf. Vitamine	0,01 % (w/v)
ggf. AS	je 0,05 % (w/v)

Medien für Streptomyceten:**TSB-Medium**(KIESER *et al.*, 2000)

Tryptone Soy Broth	30 g / l
ggf. Agar	20 g / l

TSB/PEG8000-Medium

(BABCOCK & KENDRICK, 1988)

Tryptone Soy Broth	30 g / l
Polyethylenglycol ($M_w \approx 8000u$)	50 g / l
nach dem Autoklavieren	
Glycin	133 mM
MgCl ₂	10 mM

SPMR-Medium

(BABCOCK & KENDRICK, 1988)

Saccharose	103 g / l
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	10 g / l
D-Glucose	5 g / l
Hefeextrakt	5 g / l
TES, pH = 7,6	20 mM
Spurenelement-Lösung	2 ml / l
ggf. Bacto-Agar	22 g / l
nach dem Autoklavieren	
CaCl ₂	10 mM

Medium 65 (DSMZ, Braunschweig)

D-Glucose	4 g / l
Hefeextrakt	4 g / l
Malzextrakt	10 g / l
pH = 7,2	
ggf. CaCO ₃	2 g / l
ggf. Agar	12 g / l
ggf. lösliche Stärke	5 g / l

YEME-Medium (KIESER *et al.*, 2000)

Hefeextrakt	3 g / l
Bacto-Pepton	5 g / l
Malzextrakt	3 g / l
D-Glucose	10 g / l
Saccharose	340 g / l oder 103 g / l
nach dem Autoklavieren	
MgCl ₂	5 mM

AGA-Produktionsmedium(WAKSMAN *et al.*, 1949)

Pepton	15 g / l
Hefeextrakt	5 g / l
NaCl	5 g / l
D-Glucose	10 g / l
CaCO ₃	10 g / l
nach dem Autoklavieren	
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	1 mg / l

SMA-Medium (KIESER *et al.*, 2000) **ST-Medium** (WAKISAKA *et al.*, 1982)

Sojamehl, fettarm		Pepton	10 g / l
(Fa. Hensel Feinkost)	20 g / l	Casein	5 g / l
D-Mannitol	20 g / l	NaCl	3 g / l
Agar	22 g / l	D-Glucose	5 g / l
Leitungswasser		lösliche Stärke	10 g / l
		Saccharose	100 g / l
		Glycin	10 g / l
		nach dem Autoklavieren	
		Na ₂ HPO ₄	3,2 mM
		NaCl	48 mM
		KCl	0,25 mM

AS1-Medium (modifiziert nach
RAO & TURNER, 1996)

Hefeextrakt	1 g / l
L-Alanin	0,2 g / l
L-Arginin	0,2 g / l
L-Asparagin	0,2 g / l
lösliche Stärke	5 g / l
NaCl	2,5 g / l
NaSO ₄	10 g / l
Bacto-Agar	20 g / l
	pH = 7,5
nach dem Autoklavieren	
MgCl ₂	10 mM

Minimalmedium (modifiziert nach
HODGSON, 1982)

(NH ₄) ₂ SO ₄	1 mM
Tris/HCl	50 mM
NaCl	20 mM
K ₂ SO ₄	3 mM
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	1 mM
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	1 mM
	pH = 7,2
nach dem Autoklavieren	
KH ₂ PO ₄	2,5 mM
Minor-Elements-Lsg.	10 ml / l
ggf. Casaminoacids	6,25 g / l

ISP4-Medium

ISP4-Medium (Difco)	38 g / l
---------------------	----------

2.3 Puffer und sonstige Lösungen

Die Rezepte für die gebräuchlichsten Puffer und sonstigen Lösungen sind hier alphabetisch aufgelistet. Die Zusammensetzung einzelner spezieller Puffer wird in dem entsprechenden Kapitel aufgeführt. Es wurde ausschließlich doppelt destilliertes Wasser verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Vorschriften aus der Literatur (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) entnommen und ggf. modifiziert. Abweichungen von den hier genannten Rezepten sind in den einzelnen Abschnitten vermerkt.

Alkalische Lyse Lösung I (modifiziert nach BIRNBOIM & DOLY, 1979)		Alkalische Lyse Lösung II (BIRNBOIM & DOLY, 1979)	
Tris/HCl, pH = 8,0	50 mM	SDS	1 % (w/v)
EDTA, pH = 8,0	10 mM	NaOH	0,2 M
Alkalische Lyse Lösung III (modifiziert nach BIRNBOIM & DOLY, 1979)		Denaturierungslösung für <i>Southern</i> -Hybridisierungen	
Kaliumacetat	3 M	NaOH	0,5 M
	pH = 5,5	NaCl	1,5 M
100x Denhardts-Puffer für <i>Southern</i> -Hybridisierungen		Depurinierungslösung für <i>Southern</i> -Hybridisierungen	
BSA	20 g / l	HCl	250 mM
Ficoll 400	20 g / l		
Polyvinylpyrrolidon	20 g / l		
Detektionspuffer (ROCHE, Mannheim)		DIG-Waschpuffer (ROCHE, Mannheim)	
Tris/HCl	100 mM	Maleinsäure	100 mM
NaCl	100 mM	NaCl	150 mM
	pH = 9,5	Tween-20	0,3 % (w/v)
			pH = 7,5

DIG-Maleinsäurepuffer

(ROCHE, Mannheim)

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM
	pH = 7,5

5x DNA-Auftragspuffer

EDTA, pH = 8,0	100 mM
Glycerin	43 % (v/v)
Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
Xylencyanol	0,5 % (w/v)

FSB-Puffer (HANAHAH,1983)

MnCl ₂ • 4 H ₂ O	45 mM
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	1 mM
KCl	100 mM
[(NH ₃) ₆ Co]Cl	3 mM
Glycerin	10 % (v/v)
KOAc, pH = 7,5	10 mM
	pH = 6,4

Hybridisierungspuffer für Southern-

Hybridisierungen

Denhardts-Puffer	5x
SDS	0,5 % (w/v)
SSC-Puffer	5x

Kolloidal-Coomassie für SDS-PAGE

(NH ₄) ₂ SO ₄	100 g / l
H ₃ PO ₄ (85 %)	12 ml / l
Coomassie Brilliant	
Blue G250	1 g / l

10x Laemmli-Puffer für SDS-PAGE

Tris/HCl	30,3 g / l
Glycin	144 g / l
SDS	10 g / l

Minor-Elements-Lösung

(HODGSON,1982)

ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	1 g / l
Fe(II)SO ₄ • 7 H ₂ O	1 g / l
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	1 g / l
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	1,32 g / l

Autoklavieren

Neutralisierungslösung für Southern-

Hybridisierungen

Tris/HCl	0,5 M
NaCl	1,5 M
	pH = 7,5

Phenol/CHCl₃ (KIESER *et al.*, 2001)

Phenol	5 g
CHCl ₃	5 ml
Wasser	1 ml

P-Puffer (KIESER *et al.*, 2001)

Saccharose	375 mM
K ₂ SO ₄	2 mM
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	12 mM
100x Spurenelement-Lsg.	2,5 ml / l

nach dem Autoklavieren

KH ₂ PO ₄ (0,5 % (w/v))	12,5 ml / l
CaCl ₂ • 2 H ₂ O (3,68 % (w/v))	125 ml / l
TES (5,73 % (w/v), pH = 7,2)	125 ml / l

4x SDS-Sammelpuffer für SDS-PAGE

Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
	pH = 6,8

2x SDS-Probenpuffer für SDS-PAGE

Tris/HCl	15,2 g / l
Glycerin	200 ml / l
SDS	20,0 g / l
β-Mercaptoethanol	20 ml / l
Bromphenolblau	10 mg / l
	pH = 6,8

4x SDS-Trennpuffer für SDS-PAGE

Tris/HCl	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
	pH = 8,8

Semi-Dry-Blotting-Puffer

(QIAGEN, Hilden)

Tris/HCl	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol	20 % (v/v)

20x SSC-Puffer

NaCl	3 M
Trinatriumcitrat	300 mM
	pH = 7,1

100x Spurenelement-Lösung

(KIESER *et al.*, 2000)

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

Autoklavieren

Stripping-Puffer für *Southern-*

Hybridisierungen

NaOH	0,2 M
SDS	0,1 % (w/v)

50x TAE

Tris/HCl	2 M
Essigsäure	57,1 ml / l
EDTA (0,5 M, pH = 8,0)	100 ml / l
	pH = 8,3 bis 8,5

TBS-Puffer (QIAGEN, Hilden)

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

TBST-Puffer (QIAGEN, Hilden)

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

5x TBE-Puffer

Tris/HCl	450 mM
H ₃ BO ₃	450 mM
EDTA	10 mM
	pH = 8,0

TE-Puffer

Tris/HCl, pH = 8,0	10 mM
EDTA, pH = 8,0	1 mM
	Autoklavieren
ggf. RNase A	20 mg / l

TE25S-Puffer (KIESER *et al.*, 2000)

Tris/HCl, pH = 8,0	25 mM
EDTA, pH = 8	25 mM
Saccharose	300 mM
	Autoklavieren

TMFI-Puffer (HANAHAAN,1983)

CaCl ₂ • 2H ₂ O	100 mM
RbCl	50 mM
MnCl ₂ • 4H ₂ O	40 mM
	Autoklavieren

X-Gal-Stammlösung (1000x)

X-Gal	40 g / l
Lösungsmittel:	DMF

Zellaufschlußpuffer

Tris/HCl, pH = 7,6	50 mM
MgCl ₂	10 mM
β-Mercaptoethanol	3 mM

2.4 Antibiotika

Die folgenden Antibiotika wurden als Selektionsmarker in *E. coli* und Streptomyceten eingesetzt. Sie wurden von den Firmen Sigma / Aldrich, Taufkirchen; Serva, Heidelberg; Squibb & Sons, Princeton (U.S.A.); und Roussel Uclaf, Romainville (Frankreich); bezogen. Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und bei Bedarf auf Eis aufgetaut. Wenn nicht anders angegeben wurde doppelt destilliertes Wasser als Lösungsmittel verwendet.

Ampicillin, Natriumsalz (1000x)	100 mg / ml
Apramycinsulfat (1000x)	50 mg / ml
Carbenicillin, Dinatriumsalz (1000x)	50 mg / ml
Chloramphenicol (100x)	2,5 mg / ml (in Ethanol)
Hygromycin B (1000x)	60 mg / ml
Kanamycinsulfat (1000x)	50 mg / ml
Nalidixinsäure (100x)	400 mg / ml (in 0,1 M NaOH)
Neomycinsulfat (1000x)	50 mg / ml
Phosphomycin, Dinatriumsalz (1000x)	120 mg / ml
Tetracyclin-HCl (1000x)	400 mg / ml (in Ethanol)
Thiostrepton (1000x)	30 mg / ml (in DMSO)

2.5 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme zeigt Tabelle 2.1. Sie stammen alle aus der Stammsammlung der Bergischen Universität. Die ursprünglichen Bezugsquellen bzw. Referenzen sind angegeben.

Tabelle -2.1- Verwendete Bakterienstämme.

Stammbezeichnung	Eigenschaften / Genotyp	Referenz / Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	HANAHAN, 1983
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^fZ</i> Δ M15]	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	wie <i>E. coli</i> JM109, λ (DE3)	PROMEGA (Mannheim)
<i>E. coli</i> JR(DE3)	wie <i>E. coli</i> JM109(DE3), [pRARE, Cam ^R]	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r_B^- , m_B^-), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)	STUDIER & MOFFAT, 1986
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	wie <i>E. coli</i> BL21(DE3), [pRARE, Cam ^R]	NOVAGEN (Madison, U.S.A.)
<i>E. coli</i> ET12567	F ⁻ , <i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>recF143</i> , <i>zjj201::Tn10</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>xyl-5</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>hisG4</i> , <i>tsx-78</i> , <i>mtlI</i> , <i>glnV44</i>	MACNEIL <i>et al.</i> , 1992
<i>E. coli</i> ET+	wie <i>E. coli</i> ET12567, [pUB307, Kan ^R , Tet ^R]	FLETT <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> ETZ	wie <i>E. coli</i> ET12567, [pUZ8002, Kan ^R , Tet ^R]	PAGET <i>et al.</i> , 1999
<i>B. subtilis</i> DSM 618	Neo ^S , Kan ^S , Apr ^S , Tc ^S , Hyg ^S	DSMZ, Braunschweig
<i>S. lividans</i> 66 1326	SLP2 ⁺ , SLP3 ⁺	KIESER <i>et al.</i> , 2000
<i>S. lividans</i> 66 TK23	<i>spc-1</i> , SLP2 ⁻ , SLP3 ⁻	KIESER <i>et al.</i> , 2000
<i>S. lividans</i> 66 TK64	<i>pro-2</i> , <i>str-6</i> , SLP2 ⁻ , SLP3 ⁻	KIESER <i>et al.</i> , 2000
<i>S. coelicolor</i> M145	Act ⁺ , Upd ⁺	KIESER <i>et al.</i> , 2000

Tabelle -2.1- Verwendete Bakterienstämme (Fortsetzung).

Stammbezeichnung	Eigenschaften / Genotyp	Referenz / Herkunft
<i>S. kanamyceticus</i> DSM 40500	Kanamycinproduzent	DSMZ, Braunschweig
<i>S. fradiae</i> DSM 40063	Neomycinproduzent	DSMZ, Braunschweig
<i>S. sp. «tenebrarius»</i> DSM 40477	Tobramycin- & Apramycinproduzent	DSMZ, Braunschweig
<i>S. hygroscopicus</i> ssp. <i>hygroscopicus</i> DSM 40578	Hygromycin B-Produzent	DSMZ, Braunschweig
<i>S. kasugaensis</i> M338- M1 (DSM 40819)	Kasugamycinproduzent	DSMZ, Braunschweig

2.6 Plasmide

Eine Übersicht über die verwendeten Klonierungsvektoren und neukonstruierten rekombinanten Plasmide geben Tabelle 2.2 und 2.3

Tabelle -2.2- Verwendete Klonierungs- und Expressionsvektoren und sonstige Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften / Genotyp	Referenz
pUCPU21	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , <i>lacZ</i> - α , <i>P_{lac}</i>	U. WEHMEIER, unveröffentlicht
pUCPU20	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , <i>lacZ</i> - α , <i>P_{lac}</i> , invertierter Polylinker	U. WEHMEIER, unveröffentlicht
pUWL201PW	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>ori</i> pIJ101, <i>P_{ermE*}</i>	DOUMITH <i>et al.</i> , 2000
pUWLoriTapra	<i>ori</i> ColE1, <i>tsr</i> , <i>ori</i> pIJ101, <i>P_{ermE*}</i> , <i>oriT</i> RK2, <i>aac</i> (3)IV	BLAESING <i>et al.</i> , 2005
pUWLoriTaph	<i>ori</i> ColE1, <i>tsr</i> , <i>ori</i> pIJ101, <i>P_{ermE*}</i> , <i>oriT</i> RK2, <i>aphII</i>	BLAESING <i>et al.</i> , 2005
pUWLoriTbla	<i>ori</i> ColE1, <i>tsr</i> , <i>ori</i> pIJ101, <i>P_{ermE*}</i> , <i>oriT</i> RK2, <i>bla</i>	BLAESING <i>et al.</i> , 2005
pET11aP	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , <i>lacI^f</i> , <i>P_{T7Φ10}</i> , <i>lacO</i> , <i>s10</i> , pUCPU21-Polylinker	U. WEHMEIER, unveröffentlicht

Tabelle -2.2- Verwendete Klonierungs- und Expressionsvektoren und sonstige Plasmide (Fortsetzung).

Plasmid	Eigenschaften / Genotyp	Referenz
pET16b	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , <i>lacI^q</i> , P _{T7Φ10} , <i>lacO</i> , s10, N-terminaler His-Tag	NOVAGEN (Madison, U.S.A.)
pET16bP	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , <i>lacI^q</i> , P _{T7Φ10} , <i>lacO</i> , s10, N-terminaler His-Tag, pUCPU21-Polylinker	U. WEHMEIER, unveröffentlicht
pJOE2702	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , P _{rhaBAD} , <i>rrnB</i>	VOLFF <i>et al.</i> , 1996
pJOE2775	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , P _{rhaBAD} , <i>rrnB</i> , C-terminaler His-Tag	STUMPP <i>et al.</i> , 2000
pOJ436	<i>ori</i> ColE1, <i>aac(3)IV</i> , <i>oriT</i> RK2, <i>attP</i> ΦC31, <i>int</i> ΦC31	BIERMAN <i>et al.</i> , 1992
pSUT7	P15A, <i>cat</i> , P _{T7Φ10}	PÖHLING, 1997
pT7-7	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , P _{T7Φ10}	TABOR & RICHARDSON, 1985
pHM8a	<i>ori</i> ColE1, P _{ermE*} , <i>hyg</i> , T _{fkmt} , Minicircle	MOTAMEDI <i>et al.</i> , 1995
pIJ4123	<i>ori</i> pIJ101, <i>tsr</i> , <i>kan</i> , P _{tipΔ} , <i>redD</i> , N-terminaler His- Tag	TAKANO <i>et al.</i> , 1995
pIJ6021	<i>ori</i> pIJ101, <i>tsr</i> , <i>kan</i> , P _{tipΔ}	TAKANO <i>et al.</i> , 1995
pMAC-P	<i>ori</i> ColE1, <i>oriT</i> RP4, <i>aph(3')</i> IIa, <i>hyg</i>	U. WEHMEIER, unveröffentlicht
pCJR29	<i>ori</i> ColE1, <i>tsr</i> , <i>ori</i> SCP2*, <i>bla</i> , <i>actII</i> -ORF4, P _{actI} , P _{actIII}	ROWE <i>et al.</i> , 1998
pCR2.1-TOPO	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , <i>lacZ-α</i> , P _{T7Φ10} , <i>kan</i> , <i>ori</i> fl	INVITROGEN (Karlsruhe)
pGM102	<i>ori</i> pACYC184, <i>ori</i> pSG5, <i>tsr</i> , <i>cat</i> , <i>aphII</i>	MUTH <i>et al.</i> , 1988
pUC19/ΩC4	<i>ori</i> ColE1, <i>bla</i> , <i>lacZ-α</i> , P _{lac} , <i>aacC4</i> , P _{aac} , Ω- Interposon	BLONDELET-ROUAULT <i>et al.</i> , 1997

Tabelle -2.3- Neukonstruierte rekombinante Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften / Genotyp
pUCPU/<i>neoM</i>+	<i>neoM</i> -PCR-Produkt mit Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) 1,2 kb in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/<i>neoM</i>-	<i>neoM</i> -PCR-Produkt ohne Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) 1,2 kb in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pJOE/<i>neoM</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoM</i> - (<i>NdeI/BamHI</i>) in pJOE2775 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pJOE02/<i>neoM</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoM</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pJOE2702 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET11/<i>neoM</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoM</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET16/<i>neoM</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoM</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/<i>neoMP</i>+	Ligation des 870 bp <i>aac(3)IVP</i> + -PCR-Fragmentes (<i>SmaI</i>) in pUCPU21/ <i>neoM</i> + (<i>BsaAI</i>)
pMACP/<i>neoMP</i>+	2,2 kb DNA-Fragment <i>neoMP</i> + -aus pUCPU/ <i>neoMP</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pMACP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pLoriTbla/<i>neoM</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoM</i> + (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTbla (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pLoriTapra/<i>neoM</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoM</i> + (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTapra (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pHM8aM	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoM</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pHM8a (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pT7-7/<i>neoM</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoM</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pT7-7 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pCJR29/<i>neoM</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pT7-7/ <i>neoM</i> (<i>NdeI/XbaI</i>) in pCJR29 (<i>NdeI/XbaI</i>) ligiert
p201PW/<i>neoM</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoM</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
p201PW/<i>neoMHis</i>	1,2 kb <i>neoM</i> -DNA-Fragment aus pJOE/ <i>neoM</i> (<i>NdeI/HindIII</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/HindIII</i>) ligiert
pUCPU/<i>neoD</i>+	<i>neoD</i> -PCR-Produkt mit Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) 0,8 kb in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/<i>neoD</i>-	<i>neoD</i> -PCR-Produkt ohne Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) 0,8 kb in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pJOE/<i>neoD</i>	0,8 kb <i>neoD</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoD</i> - (<i>NdeI/BamHI</i>) in pJOE2775 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert

Tabelle -2.3- Neukonstruierte rekombinante Plasmide (Fortsetzung).

Plasmid	Eigenschaften / Genotyp
pET11/neoD	0,8 kb <i>neoD</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoD</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET16/neoD	0,8 kb <i>neoD</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoD</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/neoDΩ	Ligation der 1,8 kb <i>aac(3)IVΩ</i> -Kassette (<i>SmaI</i>) aus pUC19/ΩC4 in pUCPU21/ <i>neoD</i> + (<i>HincII</i>)
pMACP/neoDΩ	2,5 kb <i>neoDΩ</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoDΩ</i> (<i>NdeI/SmaI</i>) in pMACP (<i>NdeI/EcoRV</i>) ligiert
p201PW/neoD	0,8 kb <i>neoD</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoD</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pT7-7/neoD	0,8 kb <i>neoD</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoD</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pT7-7 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pLoriTbla/neoD	0,8 kb <i>neoD</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>neoD</i> + (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTbla (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pUCPU/kanN+	<i>kanN</i> -PCR-Produkt 0,8 kb mit Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/kanN-	<i>kanN</i> -PCR-Produkt 0,8 kb ohne Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pJOE/kanN	0,8 kb <i>kanN</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanN</i> - (<i>NdeI/BamHI</i>) in pJOE2775 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET11/kanN	0,8 kb <i>kanN</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanN</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET16/kanN	0,8 kb <i>kanN</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanN</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
p201PW/kanN	0,8 kb <i>kanN</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanN</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pT7-7/kanN	0,8 kb <i>kanN</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanN</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pT7-7 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pLoriTbla/kanN	0,8 kb <i>kanN</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanN</i> + (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTbla (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pUCPU/kanM1+	<i>kanM1</i> -PCR-Produkt 1,2kb mit Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/kanM1-	<i>kanM1</i> -PCR-Produkt 1,2 kb ohne Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pJOE/kanM1	1,2 kb <i>kanM1</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM1</i> - (<i>NdeI/BamHI</i>) in pJOE2775 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert

Tabelle -2.3- Neukonstruierte rekombinante Plasmide (Fortsetzung).

Plasmid	Eigenschaften / Genotyp
pET11/<i>kanM1</i>	1,2 kb <i>kanM1</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM1</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET16/<i>kanM1</i>	1,2 kb <i>kanM1</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM1</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pLoriTapra/<i>kanM1</i>	1,2 kb <i>kanM1</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM1</i> + (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTapra (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pLoriTbla/<i>kanM1</i>	1,2 kb <i>kanM1</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM1</i> + (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTbla (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pUCPU/<i>kanM1P</i>+	Ligation des 870 bp <i>aac(3)IVP</i> + -PCR-Fragmentes (<i>SmaI</i>) in pUCPU21/ <i>kanM1</i> + (<i>HincII</i>)
pMACP/<i>kanM1P</i>+	2 kb <i>kanM1P</i> + -Fragment aus pUCPU/ <i>kanM1P</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pMACP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
p201PW/<i>kanM1</i>	1,2 kb <i>kanM1</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM1</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pT7-7/<i>kanM1</i>	1,2 kb <i>kanM1</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM1</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pT7-7 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pCJR29/<i>kanM1</i>	1,2 kb <i>kanM1</i> -DNA-Fragment aus pT7-7/ <i>kanM1</i> (<i>NdeI/XbaI</i>) in pCJR29 (<i>NdeI/XbaI</i>) ligiert
pHM8a/<i>kanM1</i>	1,2 kb <i>kanM1</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM1</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pHM8a (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/<i>kanM2</i>-	<i>kanM2</i> -PCR-Produkt 1,2 kb ohne Stopp (<i>NdeI/BglII</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/<i>kanM2</i>+	<i>kanM2</i> -PCR-Produkt 1,2 kb mit Stopp (<i>NdeI/BglII</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pT/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM2</i> + (<i>NdeI/EcoRI</i>) in pT7-7 (<i>NdeI/EcoRI</i>) ligiert
pSUT7/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM2</i> + (<i>NdeI/EcoRI</i>) in pSUT7 (<i>NdeI/EcoRI</i>) ligiert
pPU21Pst/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pT/ <i>kanM2</i> (<i>NdeI/PstI</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/PstI</i>) ligiert
p2702/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pPU21Pst/ <i>kanM2</i> (<i>NdeI/PstI</i>) in pJOE2702 (<i>NdeI/PstI</i>) ligiert
pET11/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pPU21Pst/ <i>kanM2</i> (<i>NdeI/SstI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/SstI</i>) ligiert
pET16bP/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pPU21Pst/ <i>kanM2</i> (<i>NdeI/SstI</i>) in pET16bP (<i>NdeI/SstI</i>) ligiert

Tabelle -2.3- Neukonstruierte rekombinante Plasmide (Fortsetzung).

Plasmid	Eigenschaften / Genotyp
p201PW/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pT/ <i>kanM2</i> (<i>NdeI/HindIII</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/HindIII</i>) ligiert
p4123/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM2+</i> (<i>NdeI/EcoRI</i>) in pIJ4123 (<i>NdeI/ EcoRI</i>) ligiert
p6021/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM2+</i> (<i>NdeI/EcoRI</i>) in pIJ6021 (<i>NdeI/ EcoRI</i>) ligiert
pLoriTbla/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM2+</i> (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTbla (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pLoriTapra/<i>kanM2</i>	1,2 kb <i>kanM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>kanM2+</i> (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTapra (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pUCPU/<i>kanM2P+</i>	Ligation des 800 bp <i>aac(3)IVP+</i> -Fragmentes (<i>SmaI</i>) in pUCPU21/ <i>kanM2+</i> (<i>BsaAI</i>)
pUCPU/<i>kanM2Ω</i>	Ligation der 1,8 kb <i>aac(3)IVΩ</i> -Kassette (<i>SmaI</i>) aus pUC19/ <i>ΩC4</i> in pUCPU21/ <i>kanM2+</i> (<i>BsaAI</i>)
pMACP/<i>kanM2P+</i>	2,1 kb <i>kanM2P+</i> -Fragment aus pUCPU/ <i>kanM2P+</i> (<i>NdeI/ SmaI</i>) in pMACP (<i>NdeI/EcoRV</i>) ligiert
pMACP/<i>kanM2Ω</i>	3 kb <i>kanM2Ω</i> -Fragment aus pUCPU/ <i>kanM2Ω</i> (<i>NdeI/SmaI</i>) in pMACP (<i>NdeI/EcoRV</i>) ligiert
pUCPU/<i>tobM2-</i>	<i>tobM2</i> -PCR-Produkt 1,2 kb ohne Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/<i>tobM2+</i>	<i>tobM2</i> -PCR-Produkt 1,2 kb mit Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET11/<i>tobM2</i>	1,2 kb <i>tobM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>tobM2+</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET16/<i>tobM2</i>	1,2 kb <i>tobM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>tobM2+</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pJOE/<i>tobM2</i>	1,2 kb <i>tobM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>tobM2-</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pJOE2775 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
p201PW/<i>tobM2</i>	1,2 kb <i>tobM2</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>tobM2+</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
p201PW/<i>tobM2His</i>	1,2 kb <i>tobM2</i> -DNA-Fragment aus pJOE/ <i>tobM2</i> (<i>NdeI/ HindIII</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/HindIII</i>) ligiert
pUCPU/<i>hygF+</i>	<i>hygF</i> -PCR-Produkt 850 bp mit Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) 850 bp in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUCPU/<i>hygF-</i>	<i>hygF</i> -PCR-Produkt 850 bp ohne Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert

Tabelle -2.3- Neukonstruierte rekombinante Plasmide (Fortsetzung).

Plasmid	Eigenschaften / Genotyp
pET11/hygF	850 bp <i>hygF</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>hygF</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET16/hygF	850 bp <i>hygF</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>hygF</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pJOE/hygF	850 bp <i>hygF</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>hygF</i> - (<i>NdeI/BamHI</i>) in pJOE2775 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pLoriTbla/hygF	850 bp <i>hygF</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>hygF</i> + (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTbla (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pLoriTapra/hygF	850 bp <i>hygF</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>hygF</i> + (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTapra (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
p201PW/hygF	850 bp <i>hygF</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>hygF</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pT7-7/hygF	850 bp <i>hygF</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>hygF</i> + (<i>NdeI/EcoRI</i>) in pT7-7 (<i>NdeI/EcoRI</i>) ligiert
pUC20/neoF+	<i>neoF</i> -PCR-Produkt 1,1 kb mit Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU20 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pUC20/neoF-	<i>neoF</i> -PCR-Produkt 1,1 kb ohne Stopp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU20 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET11/neoF	1,1 kb <i>neoF</i> -DNA-Fragment aus pUC20/ <i>neoF</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET16/neoF	1,1 kb <i>neoF</i> -DNA-Fragment aus pUC20/ <i>neoF</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pT7-7/neoF	1,1 kb <i>neoF</i> -DNA-Fragment aus pUC20/ <i>neoF</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pT7-7 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pJOE/neoF	1,1 kb <i>neoF</i> -DNA-Fragment aus pUC20/ <i>neoF</i> - (<i>NdeI/BamHI</i>) in pJOE2775 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
p201PW/neoF	1,1 kb <i>neoF</i> -DNA-Fragment aus pUC20/ <i>neoF</i> + (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pTOPO/aac2'	<i>aacC2'</i> -PCR-Produkt 540 bp in pCR2.1-TOPO integriert
pET11/aac2'	540 bp <i>aacC2'</i> -DNA-Fragment aus pTOPO/ <i>aac2'</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET16/aac2'	540 bp <i>aacC2'</i> -DNA-Fragment aus pTOPO/ <i>aac2'</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
p201PW/aac2'	540 bp <i>aacC2'</i> -DNA-Fragment aus TOPO/ <i>aac2'</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert

Tabelle -2.3- Neukonstruierte rekombinante Plasmide (Fortsetzung).

Plasmid	Eigenschaften / Genotyp
pUCPU/<i>aacC4</i>	<i>aacC4</i> -PCR-Produkt ohne Promotor (<i>NdeI/BamHI</i>) 830 bp in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pLoriTbla/<i>aacC4</i>	850 bp <i>aacC4</i> -DNA-Fragment aus pUCPU/ <i>aacC4</i> (<i>EcoRI/HindIII</i>) in pUWLoriTbla (<i>EcoRI/HindIII</i>) ligiert
pPU21/<i>kanA</i>	<i>kanA</i> -PCR-Produkt 550 bp (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUCPU21 (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET11/<i>kanA</i>	550 bp <i>kanA</i> -DNA-Fragment aus pPU21/ <i>kanA</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET11aP (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
pET16/<i>kanA</i>	550 bp <i>kanA</i> -DNA-Fragment aus pPU21/ <i>kanA</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pET16b (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert
p201PW/<i>kanA</i>	550 bp <i>kanA</i> -DNA-Fragment aus PU21/ <i>kanA</i> (<i>NdeI/BamHI</i>) in pUWL201PW (<i>NdeI/BamHI</i>) ligiert

2.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Die unterstrichenen Sequenzen kennzeichnen die eingefügten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen. Die optimalen Sequenzen der Primerpaare für ähnliche Anlagerungstemperaturen und die Anlagerungstemperaturen mutagener Primerpaare wurden mit Hilfe des Programms PrimerFind, Version 3.0 der Firma Fröbel Labor Geräte, Lindau, ermittelt. Die Temperaturen sind in den entsprechenden Abschnitten im Teil „Ergebnisse“ dieser Arbeit angegeben. Die Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech bezogen.

Tabelle -2.4- Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
KanM2 Start	5'-AAGTTCGACC <u>CATATGGGCGGCATG</u> -3'	Präparative PCR
KanM2 Stopp (JOE)	5'-GACGAGGAGGA <u>AGATCTCAGCCC</u> GATCTCC-3'	Präparative PCR
KanM2 Stopp (pET)	5'-GGTGGGGGG <u>AGATCTGGAGGACCCT</u> -3'	Präparative PCR
kanM2 for oMM	5'-ATGGGCGGCATGCACCTG-3'	Anal. PCR / Sonde
kanM2 rev oMM	5'-TCACAGCCCGATCTCCCGG-3'	Anal. PCR / Sonde
kanM2 RT Start	5'-ACGATGTCACCGCCCAAGGTG-3'	RT-PCR
kanM2 RT Stopp	5'-CCGCCACTTGGCGATCG-3'	RT-PCR
KanM1 Start	5'-GATGGAGGTAC <u>CATATGCGCGTACTCCGG</u> -3'	Präparative PCR
KanM1 StoppDel	5'-GGGTGTCGTACGG <u>GGATCCTTCTTTGCC</u> -3'	Präparative PCR
KanM1 Stopp	5'-CAGGACGT <u>CGGATCCC</u> GTACGGCT-3'	Präparative PCR
kanM1 for oMM	5'-GTGCGCGTACTCCGGCTCAC-3'	Anal. PCR / Sonde
kanM1 rev oMM	5'-CTACCGTTCTTTGCCGAGTACCCG-3'	Anal. PCR / Sonde
NeoM Start	5'-CCCCCGTG <u>CATATGCTGCGGCTC</u> -3'	Präparative PCR
NeoM Stopp Del	5'-GCCGCAGCGGGAT <u>CCCGCGCGCCC</u> -3'	Präparative PCR
NeoM Stopp	5'-GGGCGCGGAT <u>CCGGCGCAC</u> -3'	Präparative PCR
neoM Start oMM	5'-CCGTGCGTGTGCTGCGGC-3'	Anal. PCR / Sonde
neoM Stopp oMM	5'-CAGCGACGTCACGGCGCC-3'	Anal. PCR / Sonde
neoM RT Start	5'-CTGACCTCGCGCACCGCG-3'	RT-PCR
neoM RT Stopp	5'-ACCGGTGAACACGAACCGGTCC-3'	RT-PCR
KanN Start	5'-GGGAGATCGG <u>CATATGAGGGTCTCTCC</u> -3'	Präparative PCR
KanN Stopp (pJOE)	5'-GCCAGCTTCT <u>GGATCCTAGCGACTCCT</u> -3'	Präparative PCR
KanN Stopp (pET)	5'-ACGGGGGAT <u>CCGCCGAACAG</u> -3'	Präparative PCR
Start neoD	5'-GGGAGGAGGAGC <u>CATATGGGTGAGCCG</u> -3'	Präparative PCR
Stopp neoD (pJOE)	5'-ACGAGGCCGGAT <u>CCCCGGG</u> -3'	Präparative PCR
neoD Stopp (pET)	5'-GCGCCGTGGAT <u>CCACGAGGC</u> -3'	Präparative PCR
neoD Start oMM	5'-AGGAGGAGCACGGTGGGTGAGC-3'	Anal. PCR / Sonde

Tabelle -2.4- Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung).

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
neoD Stopp oMM	5'-GAGGCCGGGTACCGGGC-3'	Anal. PCR / Sonde
neoF Start	5'-GCCGGAGGTGC <u>CATATGGCTGAGGCG-3'</u>	Präparative PCR
neoF Stopp (pJOE)	5'-CCACGT <u>CGGATCCCC</u> ACCG-3'	Präparative PCR
neoF Stopp (pET)	5'-CTCCG <u>CCGGATCCC</u> ACGTCCGC-3'	Präparative PCR
aac2' Start	5'- <u>CATATGCCCC</u> GCATGACCGAG-3'	Präparative PCR
aac2' Stopp	5'- <u>GGATCC</u> CTCTACCAGAGATCCCCGTT-3'	Präparative PCR
aac4-F	5'-GTGCAATACGAATGGCGAAAAGC-3'	Anal. PCR / Sonde
aac4-R	5'-TGAGCTCAGCCAATCGACTGG-3'	Anal. PCR / Sonde
aacC4 Stopp	5'-TCTCGTTCT <u>CCCCGGGTG</u> AGCTCAG-3'	Präparative PCR
aacC4 StoppBam	5'-TCATCT <u>GGATCCCC</u> GTC-3'	Präparative PCR
aacC4 Start -Prom	5'-TGCTATGAT <u>CATATG</u> ATGTCATCA-3'	Präparative PCR
aacC4 Start +Prom	5'-GCAAAAGGGGAT <u>CCCGGGTTTATCACC-3'</u>	Präparative PCR
tobM2 Start	5'-CAGAC <u>CATATG</u> CGGCGGCGGGC-3'	Präparative PCR
tobM2 Stopp	5'-CGGGGCGAGGAT <u>CCTCAGAC</u> GCA-3'	Präparative PCR
tobM2 Frame	5'-GGCGAGGAGGAT <u>CCGACGC</u> ATAC-3'	Präparative PCR
hygF Start	5'-AGCGGCGTACG <u>CATATGGCGGTCACC-3'</u>	Präparative PCR
hygF Stopp	5'-CAGAGGAT <u>CCTCATGCTC</u> GCC-3'	Präparative PCR
hygF Stopp Del	5'-CATCAGAGGTT <u>CCGGATCCTC</u> GCC-3'	Präparative PCR
hygF RT Start	5'-GAAGTCGT <u>CCCGGAAC</u> GGCA-3'	RT-PCR
hygF RT Stopp	5'-GACGACAACGAGTGGGAGCCG-3'	RT-PCR
neoT RT Start	5'-GCGCACATCCAGCGCCTC-3'	RT-PCR
neoT RT Stopp	5'-CCGCCCCGAACACCTTCAGC-3'	RT-PCR
neoE RT for	5'-GTCGTACAGGATCGCCAGGCTGC-3'	RT-PCR
neoE RT rev	5'-CCAGGTGTGCCGGCGGTG-3'	RT-PCR
neoQ RT for	5'-GGTTGAGGCCGCCCGGGTAC-3'	RT-PCR
neoQ RT rev	5'-GACAACCGGGTGCGGCTGTC-3'	RT-PCR
neoA RT for	5'-ACCGCCGCGTCCGGGAAG-3'	RT-PCR
neoA RT rev	5'-TCGCTCTTCGACGGCTCGTACG-3'	RT-PCR
kanA II Start	5'-CACCTTCCATATGCGGGCACATCGG-3'	Präparative PCR
kanA II Stopp	5'-CCGGGATCCGACGGGCCGA-3'	Präparative PCR

Tabelle -2.4- Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung).

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
aph Rib Start	5'-TGATGCCGC <u>CATATG</u> GAAAGCACG-3'	Präparative PCR
aph Rib Stopp	5'-AGAGGGGGG <u>GATCCC</u> GTCTCC-3'	Präparative PCR
M13 up	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Sequenzierung
M13 rp	5'-GAACAGCTATGACCATG-3'	Sequenzierung
PHRT	5'-CTTCTTCTGCAGGTACCGTCA-3'	RT-PCR
PART	5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3'	RT-PCR

Die zur Ligation der Gene verwendeten Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

2.8 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

E. coli-Stämme wurden typischerweise in 5 ml LB- oder 2x YT-Flüssigmedium bei 37 °C unter Schütteln über Nacht (mindestens 15 Stunden) kultiviert. Aus diesen Übernachtskulturen wurden Hauptkulturen durch Verdünnen angeimpft oder Dauerkulturen durch Mischung im gleichen Verhältnis mit 100 % Glycerin (steril) hergestellt und diese bei –80 °C gelagert. Erneutes Anziehen aus diesen Dauerkulturen erfolgte durch direktes Inokulieren in LB- oder 2x YT-Flüssigmedium und Bebrütung bei 37 °C über Nacht. Bei plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium der entsprechende Selektionsmarker in den unter 2.4 angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

2.9 Anzucht und Lagerung von Streptomyceten

Flüssigkulturen von Streptomyceten wurden generell in 15 ml TSB-, YEME- oder SPMR-Medium bei 28 bis 30 °C unter starkem Schütteln (180 bis 200 UpM) für mehrere Tage bis in die spätlogarithmische Phase inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden Hauptkulturen angeimpft oder zur Sporulation 500 µl auf SMA- oder ISP4-Agarplatten ausplattiert und bei 28 °C bis 30 °C einige Tage bebrütet. Sporensuspensionen wurden durch Abschwemmen der Sporen mit 30 % (v/v) Glycerin (steril) und Filtration durch sterile Wolle hergestellt und diese bei –80 °C gelagert. Erneutes Anziehen aus diesen Dauerkulturen erfolgte durch direktes Inokulieren in TSB-Flüssigmedium und Bebrütung

bei 28 °C bis 30 °C. Falls notwendig wurden den Medien die entsprechenden Selektionsmarker in den unter 2.4 angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

2.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse nach BIRNBOIM & DOLY, 1979, aus 1 bis 1,5 ml Übernachtskultur. Für Sequenzierungsreaktionen wurde die DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) oder Ultra Pure Kits (Roche, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Plasmidisolierung aus Streptomycceten erfolgte nach dem Protokoll von KIESER *et al.*, 2000, welches stark modifiziert wurde. Typischerweise wurde das Mycel aus 1,5 ml einer spätlogarithmischen Kultur in 500 µl TE25S-Puffer, welcher 2 mg / ml Lysozym enthielt, suspendiert und unter gelegentlichem Invertieren 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Suspension wurde dann 250 µl einer 0,3 M NaOH / 2 % (w/v) SDS Lösung zugegeben, stark durchmischt (Vortex) und anschließend 15 Minuten unter gelegentlichem Invertieren bei 70 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 200 µl Phenol / Chloroform-Lösung zugesetzt, durchmischt und mindestens 15 Minuten bei 14500 • g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 60 µl 3 M NaOAc und 600 µl Isopropanol versetzt, gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmid-DNA sedimentierte durch erneutes Zentrifugieren (mindestens 15 Minuten) bei 14500 • g, wurde mit 500 µl eiskaltem 70 % (v/v) EtOH gewaschen und in 100 µl sterilem TE / RNase Puffer aufgenommen.

2.11 Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten

Die Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten erfolgte im 2 ml Maßstab nach der so genannten CTAB-Methode (KIESER *et al.*, 2000) mit dem Zusatz einer Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol Extraktion und anschließender Isopropanol-fällung der DNA.

2.12 Isolierung von Gesamt-RNA aus Streptomycceten

Zellen aus denen RNA isoliert werden sollte, wurden durch Zentrifugation (14500 • g, Raumtemperatur) sedimentiert, das Zellpellet in RNAprotect Bacteria Reagent-Lösung der Firma Qiagen, Hilden, resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Total RNA Kits (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers präpariert und nach zusätzlicher DNaseI-Spaltung (1 Stunde, 37 °C) bei –20 °C gelagert.

2.13 Restriktionsspaltung von DNA

Für analytische Zwecke wurden etwa 0,1 bis 0,2 µg DNA mit 1,5 bis 2 Units (U) Endonuklease in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit dem mitgelieferten Reaktionspuffer nach Angaben des Herstellers für 1 bis 2 Stunden bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

Bei präparativen Restriktionen wurden 1,0 bis 1,2 µg DNA mit 2 bis 4 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 30 bis 50 µl unter ansonsten gleichen Bedingungen umgesetzt.

2.14 Agarosegelelektrophorese und Isolierung der DNA-Fragmente

DNA-Fragmente wurden in 0,8 % (w/v) bis 1,0 % (w/v) Agarosegelen nach der bei SAMBROOK & RUSSEL, 2001, beschriebenen Methode mit 1x TAE als Elektrophoresepuffer getrennt. Elektrophoriert wurde mit einer Spannung von etwa 10 V / cm. Als Längenstandard wurde der Gene Ruler DNA Ladder Mix (10; 8; 6; 5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1,2 kBp; 1031; 900 bis 100 Bp) der Firma MBI Fermentas, St.-Leon-Rot, oder die 2-Log DNA Ladder (10; 8; 6; 5; 4; 3; 2; 1,5; 1,2; 1 kBp; 900 bis 100 Bp) der Firma New England Biolabs, Frankfurt a.M., nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Zur Visualisierung der DNA unter langwelligem UV-Licht (366 nm) enthielt die Agarose 0,2 µg / ml Ethidiumbromid.

Zur anschließenden Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen, Hilden, das Ultra Pure Gel Extraction Kit

der Firma GenScript, Piscataway, U.S.A., nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers verwendet.

2.15 Entfernung von Phosphatgruppen und Nukleotidüberhängen der DNA

DNA-Fragmente ohne Nukleotidüberhänge wurden 20 bis 30 Minuten mit 1 - 2 U alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP) oder alkalischer Phosphatase aus Garnelen (SAP) in dem jeweils mitgelieferten Puffer bei 37 °C inkubiert, um 5'-Phosphatgruppen der DNA zu entfernen. Beide Enzyme wurden durch Hitzebehandlung (10 Minuten bei 70 °C) inaktiviert.

Sollten 5'-Nukleotidüberhänge entfernt oder 3'-Nukleotidüberhänge aufgefüllt werden, um überhangfreie DNA-Enden zu erhalten, wurde das DNA-Fragment mit 1 - 2 U des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I nach Angaben des Herstellers für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

2.16 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl in einem Fragment zu Vektor Verhältnis von etwa 4 : 1 (DNA mit 3'- oder 5'-Nukleotidüberhängen) bzw. 5 : 1 (DNA ohne Nukleotidüberhänge) bei 16 °C über Nacht durchgeführt. T4-DNA-Ligase und Puffer wurden dabei in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration eingesetzt.

2.17 Amplifizierung von DNA mit der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde nach ERLICH & ARNHEIM, 1992, in einem Personal Thermocycler der Firma Biometra, Göttingen durchgeführt. Es wurde *Taq*-DNA-Polymerase der Firma Invitrogen, Karlsruhe, und Vent-DNA-Polymerase der Firma New England Biolabs, Schwalbach, verwendet. Tabelle 2.5 zeigt die Standardzusammensetzung der PCR-Ansätze. Die DNA-Polymerasen wurden dabei

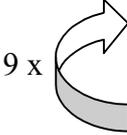
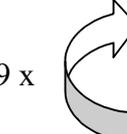
zwischen dem ersten und zweiten Schritt (siehe Tabelle 2.6) zugesetzt. Das Standardvolumen der Ansätze betrug 50 μl , bei analytischen PCRs wurden sie halbiert. Sie wurden jeweils mit 100 μl sterilem Mineralöl überschichtet. Tabelle 2.6 zeigt das verwendete Programmschema. Die Anlagerungstemperaturen modifizierender Primerpaare wurden wie unter 2.7 beschrieben berechnet und in Schritt 3 mit kleinen Angleichungen verwendet. Die Anlagerungstemperatur in Schritt 6 entsprach der von der Herstellerfirma der Oligonukleotide angegebenen Temperatur. Enthielten die verwendeten Primerpaare keine Fehlpaarungen, z. B. bei der Generierung markierter Sonden (vergleiche 2.25), so wurden die Schritte zwei bis vier in Tabelle 2.6 übersprungen und 30 Zyklen anstelle von 19 durchlaufen.

Die PCR-Fragmente wurden wie unter 2.14 beschrieben gereinigt und aus dem Gel isoliert, bei präparativen PCRs zusätzlich mit Restriktionsendonukleasen behandelt und in pUCPU21 ligiert (vergl. 2.13 bis 2.16).

Tabelle -2.5- Zusammensetzung der PCR-Ansätze

	<i>Taq</i>-DNA- Polymerase	Vent-DNA- Polymerase
10x <i>Taq</i>- / Vent- Reaktionspuffer	5 μl	5 μl
dNTPs	je 0,2 mM	je 0,2 mM
Primer	je 100 μM	je 100 μM
Q-Lösung / GC-Rich-Lsg.	10 μl / 5 μl	10 μl / 5 μl
Mg²⁺	(MgCl ₂) 2 mM	(MgSO ₄) 2 mM
Matrizen-DNA	1 – 100 ng	1 – 100 ng
Polymerase	2,5 U	2,5 U

Tabelle -2.6- Verwendetes PCR Standardprogramm

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
1	98	300	
9 x 	2	95	45
	3	variabel	60
	4	72	60 pro 1 kb PCR-Produkt
	5	95	45
19 x 	6	variabel	60
	7	72	60 pro 1 kb PCR-Produkt
	8	72	300
	9	15	∞

2.18 RT-PCR

Neben der biochemischen Charakterisierung der *knock-out* Mutanten (vergl. 2.30 und 2.31) wurde zusätzlich überprüft, ob einzelne Gene der Biosynthesecluster transkribiert wurden. Dazu wurde aus der unter 2.12 gewonnenen Gesamt-RNA die m-RNA der zu untersuchenden Gene mit Hilfe spezifischer Primer (vergl. Tab. 2.4) durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese DNA als Matrize in einer PCR amplifiziert. Dies geschah in einer so genannten „Ein-Gefäß-Reaktion“ mit Hilfe des OneStep RT-PCR Kits der Firma Qiagen, Hilden, nach Anleitung des Herstellers. Die dabei verwendeten Lösungen wurden durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) und anschließendes Autoklavieren von RNAsen befreit. Es wurden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurden die Ansätze halbiert und 2 µl Gesamt-RNA in der Reaktion eingesetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze, die während der reversen Transkription nicht bei 50 °C sondern auf Eis inkubiert wurden, um eventuelle DNA-Kontaminationen in der eingesetzten Gesamt-RNA ausschließen zu können. Zusätzlich wurde spezifisch die 16S cDNA nach reverser Transkription der 16S rRNA mit den Primern PHRT und PART amplifiziert, um die Qualität der RNA zu überprüfen und die Reaktion zu standardisieren.

2.19 DNA Sequenzierung

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde neben einer Restriktionsanalyse die DNA sequenziert. Dies erfolgte nach der Strangabbruchmethode von SANGER *et al.*, 1977, mit dem Thermosequense Cycle-Sequencing Kit der Firma Amersham Biosciences, Freiburg, und fluoreszenzmarkierten Primern (vergleiche Tabelle 2.4) der Firma Thermo Electron, Dreieich. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde folgendes Programm für die Sequenzierreaktion verwendet:

Tabelle -2.6- Verwendetes Sequenzierprogramm

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1	98	300
2	95	45
3	63	45
4	68	80
5	68	60

30 x 

Die Trennung und Detektion der aus der Sequenzierungsreaktion erhaltenen Fragmente erfolgte mit Hilfe des A.L.F. Express Sequencers der Firma Amersham Biosciences, Freiburg. Dabei fanden 6 %ige Hydrolink Long Ranger Polyacrylamidgele (Firma Biozym, Hessisch Oldendorf), welche 6 M Harnstoff und 1x TBE enthielten, Verwendung. 0,5x TBE wurde als Laufpuffer verwendet. Das Gel wurde während des gesamten Laufes auf 64 °C temperiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des mitgelieferten Programms A.L.F. Win 2.3.

2.20 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen und die Transformation mit Plasmid-DNA wurde analog dem Protokoll von HANAHAN, 1983, bzw. SAMBROOK & RUSSEL, 2001 durchgeführt. Als weitere Methode zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine Variante der RbCl-Methode benutzt (A. STRATMANN, persönliche Mitteilung). Dabei wurde eine 25 ml Hauptkultur (SOB-Medium) auf eine optische Dichte bei 600 nm (O.D.₆₀₀) von 0,05 eingestellt und bei 37 °C so lange geschüttelt bis eine O.D.₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreicht war. Die Bakterienzellen wurden abzentrifugiert (4000 • g, 4 °C), in 25 ml TMFI-Puffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 x g, 4 °C) wurde das Zellsediment vorsichtig mit einer 10 ml Pipette in 5 ml TMFI / 25 % Glycerin resuspendiert, auf Eis in 200 µl Aliquote überführt und direkt verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Die Transformation mit Plasmid-DNA erfolgte nach HANAHAN, 1983, wobei abweichend von diesem Protokoll 250 µl des Transformationsansatzes pro Agarplatte ausgespatelt wurden. Die Agarplatten enthielten die nötigen Selektionsmarker in den unter 2.4 genannten Konzentrationen. Wurden Konstrukte auf der Grundlage von pUCPU21 oder pUCPU20 transformiert (vergl. Tab. 2.2 und Tab. 2.3), konnte eine Auswahl der Transformanden mit Hilfe des *lacZ*- α -Fragmentes erfolgen (Blau/Weiss-Selektion). Die Platten enthielten dann zusätzlich X-Gal in einer Endkonzentration von 40 µg / ml.

Die Protoplastierung von *S. lividans* und *S. coelicolor* wurde in Anlehnung an das Protokoll von BABCOCK & KENDRICK, 1988, herbei geführt. Eine 25 ml TSB/PEG 8000-Kultur wurde für mehrere Tage bei 30 °C unter starkem Schütteln kultiviert. Das Mycel wurde abzentrifugiert, zwei- bis dreimal mit einer 10,3 %igen Saccharose-Lösung gewaschen, in 4 ml P-Puffer mit 1 mg / ml Lysozym resuspendiert und 30 bis 60 Minuten unter gelegentlichem, vorsichtigem Auf- und Abziehen des Mycels mit einer 10 ml Glaspipette bei 30 °C inkubiert. Die Protoplastierung wurde dabei mikroskopisch verfolgt. Nach vollständiger Protoplastierung wurden 5 ml P-Puffer hinzugegeben, durch Auf- und Abziehen des Inhalts mit einer 10 ml Glaspipette gemischt und Mycelreste durch Filtrierung mittels steriler Baumwolle entfernt. Das Filtrat wurde 7 Minuten bei 4000 • g (4 °C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Protoplasten vorsichtig in 1 ml P-Puffer auf Eis suspendiert. Verteilt auf 100 µl Aliquote wurden sie zunächst über Nacht bei –20 °C und dann bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Die

Transformation der Protoplasten wurde nach KIESER *et al.*, 2000, mit P-Puffer / 25% (w/v) PEG1000 anstelle von T-Puffer als Transformationspuffer durchgeführt. Als Regenerationsmedium wurde abweichend SPMR-Medium verwendet. Die Agarplatten wurden nach 12 h mit dem entsprechenden Selektionsmarker in der unter 2.4 angegebenen Konzentration überschichtet. Zur Transformation von *S. coelicolor*-Protoplasten wurde nur unmethylierte DNA benutzt, die aus dem Methylase-defizienten Stamm *E. coli* ET12567 präpariert wurde.

2.21 Heterologe Überexpression der Gene

2.21.1 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Grundsätzlich wurden zwei verschiedene Promotorsysteme zur heterologen Genexpression in *E. coli* verwendet: Der T7 Φ 10-Promotor des Bakteriophagen T7 (TABOR & RICHARDSON, 1985; GIORDANO *et al.*, 1989; DUBENDORFF & STUDIER, 1991) kann nur durch die T7-RNA-Polymerase abgelesen werden. Als Expressionsstämme wurden *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* Rosetta(DE3), *E. coli* JM109(DE3) und *E. coli* JM109(DE3)/pRARE verwendet. Alle Stämme enthalten das Gen für die DNA-abhängige-RNA-Polymerase des Phagen T7 unter Kontrolle des *E. coli lacUV5*-Promotors, das stabil ins Chromosom integriert wurde. Zur Expression heterologer Gene wurden 20 ml Hauptkultur (LB-Medium, LB-Betain / Sorbitol-Medium oder Minimalmedium mit entsprechendem Antibiotikum) mit einer ÜNK des plasmidtragenden Expressionsstammes auf eine O.D.₆₀₀ von 0,05 eingestellt und bei 25 °C bis 37 °C geschüttelt (150 UpM). Die Expression des T7-RNA-Polymerasegens wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,5 oder 1,0 mM) bei einer O.D.₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 induziert. Vor und zu definierten Zeitpunkten nach der IPTG-Zugabe wurde je 1 ml als Probe entnommen, die Zellen abzentrifugiert und das Sediment ohne Überstand bei -20 °C gelagert.

Als zweites System wurde der durch L-Rhamnose induzierbare Promotor P_{rhaBAD} verwendet (EGAN & SCHLEIF, 1993). Als Wirtsorganismen zur heterologen Überexpression wurden *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* Rosetta(DE3), *E. coli* JM109(DE3), *E. coli* JM109(DE3)/pRARE und *E. coli* DH5 α eingesetzt. Dabei wurden 20 ml Hauptkultur (LB-Medium oder LB-Betain / Sorbitol-Medium mit entsprechendem

Antibiotikum) mit einer Übernachtskultur des plasmidtragenden Expressionsstammes auf eine O.D.₆₀₀ von 0,05 eingestellt und bei 25 °C bis 37 °C geschüttelt (150 UpM). Durch Zugabe von 0,2 % (w/v) steriler L-Rhamnose wurde bei einer O.D.₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 die Expression des heterologen Gens induziert und wie zuvor beschrieben Proben genommen.

2.21.2 Heterologe Genexpression in *S. lividans* und *S. coelicolor*

Für die Überexpression einzelner Gene in Streptomyceten wurden drei verschiedene Systeme verwendet. Das auf dem Thiostrepton-induzierbaren P_{tipA} Promotor (MURAKAMI *et al.*, 1989) basierende Expressionssystem der pIJ-Vektoren (TAKANO *et al.*, 1995) wurde vor allem zur Expression in *S. lividans* 1326 und TK64 benutzt. Die plasmidtragenden Stämme wurden in einer 25 ml Hauptkultur (TSB-Medium, YEME-Medium mit 34 % (w/v) oder 10,3 % (w/v) Saccharose und entsprechendem Selektionsmarker) bei 30 °C 24 bis 36 Stunden geschüttelt. Das System wurde mit 20 µg / ml Thiostrepton induziert und die Kulturen weiter bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Unmittelbar vor der Induktion und innerhalb der nächsten 24 bis 36 Stunden wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben (1 ml) genommen. 24 bis 36 Stunden nach der Induktion wurden die Kulturen geerntet. Das sedimentierte Mycel wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

Die Expression des heterologen Gens wird im Vektor pHM8a (MOTAMEDI *et al.*, 1995) und in den pUWL-Plasmiden (DOUMITH *et al.*, 2000; BLAESING *et al.*, 2005) durch den konstitutiven Promotor P_{ermE*} (BIBB *et al.*, 1985) kontrolliert. Als Wirte für die heterologe Expression wurden alle *S. lividans*-Stämme und *S. coelicolor* verwendet. 20 ml Hauptkultur (TSB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker) wurden mit 1 ml Vorkultur der plasmidtragenden Stämme angeimpft, bei 30 °C 24 bis 56 Stunden inkubiert und die Kulturen dann geerntet. Innerhalb dieses Zeitraumes wurde zu festgelegten Zeitpunkten jeweils eine 1 ml Probe genommen, das Mycel abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

Das dritte Expressionssystem basierte auf dem Vektor pCJR29 (ROWE *et al.*, 1998) mit den aus der Actinorhodinbiosynthese stammenden natürlichen Promotoren P_{actI} und P_{actIII}. Die Überexpression des unter der Kontrolle dieser Promotoren stehenden Gens wird erst in der spätlogarithmischen Wachstumsphase des Wirtsstammes *S. coelicolor*, zeitgleich mit der Biosynthese von Actinorhodin, induziert. Je 20 ml Hauptkultur (TSB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker) wurden dazu mit 1 ml Vorkultur des plasmidtragenden

Stammes angeimpft, bei 30 °C so lange inkubiert (40 bis 66 Stunden) bis eine deutliche Blaufärbung auftrat und die Kulturen dann geerntet. Bis zur weiteren Verwendung wurde das abzentrifugierte Mycel bei –20 °C gelagert.

2.22 Gewinnung zellfreier Rohextrakte

Für den Zellaufschluss wurden die abzentrifugierten und bei –20 °C gelagerten Zellen in der Hälfte des Originalvolumens in Zellaufschlusspuffer auf Eis resuspendiert. Die Zellen wurden entweder durch zweimalige Passage durch eine vorgekühlte French Press Zelle der Firma American Instruments Company, Silver Spring, USA, bei einem Druck von 20000 psi, oder durch mehrmaliges Sonifizieren auf Eis (85 % der maximalen Leistung, *E. coli* 4 Zyklen, Streptomyces 6 bis 8 Zyklen, 10 Sekunden mit je 10 Sekunden Pause) mit einer Sonorex-Ultraschallsonde der Firma Bandelin, Berlin, aufgeschlossen (= Gesamtzellextrakt). Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 13200 • g (30 Minuten bei 4 °C) sedimentiert. Der Überstand (= lösliche Fraktion) wurde abgetrennt und das Sediment im gleichen Volumen Zellaufschlusspuffer resuspendiert.

Um His-Tag-Fusionsproteine zu reinigen, wurde das HIS-Select Nickel Affinity Kit der Firma Sigma / Aldrich, Taufkirchen, im Batch Verfahren mit Imidazol nach dem Protokoll des Herstellers benutzt.

Eine Konzentrierung des zellfreien Rohextraktes wurde mit VivaSpin 500 Konzentratoren der Firma VIVASCIENCE, Stonehouse, U.K., nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 30 kDa als Ausschlussgrenze gewählt.

2.23 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Proteinbestimmungskits der Firma BioRad, München, nach der Methode von BRADFORD, 1976, spektralphotometrisch bei 595 nm bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA) der Firma Sigma / Aldrich, Taufkirchen.

2.24 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach der Methode von LAEMMLI, 1970, mit einem 5 %igen Sammel- und einem Trenngel, dessen Acrylamid / Bis-acrylamid-Konzentration je nach Größe des überproduzierten Proteins zwischen 10 % und 15 % betrug. Die Gele wurden in einer Minigel-Single- oder Minigel-Twin-Gelkammer der Firma Biometra, Göttingen, bei einer konstanten Spannung von 70 V (Sammelgel) und 110 V (Trenngel) elektrophoriert. Als Molekulargewichtsstandard wurden der DALTON MARK VII-L (66; 45; 36; 29; 24; 20,1; 14,2 kDa) der Firma Sigma / Aldrich, Taufkirchen, die PageRuler Protein Ladder (200; 150; 120; 100; 85; 70; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 10 kDa) der Firma MBI Fermentas, St.-Leon-Rot, und der Perfect Protein Marker 10-225 kDa (225; 150; 100; 75; 50; 32; 25; 15; 10 kDa) der Firma Novagen, Madison, U.S.A., nach Anleitung des jeweiligen Herstellers benutzt. Sollten die Gele anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen werden, wurden sie wie unter 2.25 beschrieben weiter behandelt. Anstelle der oben genannten Molekulargewichtsstandards wurde dann der vorgefärbte Standard SeeBlue Plus 2 Pre-Stained (250; 148; 98; 64; 50; 36; 22; 16; 6; 4 kDa) der Firma MBI Fermentas, St.-Leon-Rot, verwendet. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie-Brilliant-Blue G-250 (Serva) gefärbt. Dazu wurden die Gele über Nacht in einer 80 : 20 (v/v) Mischung aus Kolloidal-Coomassie und Methanol inkubiert.

2.25 Western-Blot-Analyse mit immunologischem Nachweis

Heterolog überproduzierte Fusionsproteine, die einen 6x (produziert mit pJOE2775 oder pIJ4123) oder 10x (produziert mit pET16b) Histidin-Tag besaßen, wurden nach der SDS-PAGE mittels einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell der Firma BioRad, München, auf Hybond P-Membran der Firma Amersham Biosciences, Freiburg, übertragen. Die Membran und das Gel wurden vor dem Transfer 10 Minuten in Semi-Dry-Transfer-Puffer äquilibriert und dann gemäß der Anleitung der Firma BioRad, München, weiter behandelt. Der Transfer erfolgte, je nach Größe des zu detektierenden Proteins 20 bis 25 Minuten bei konstanten 20 Volt Spannung in Semi-Dry-Transfer-Puffer. Die Übertragung der Proteine wurde durch reversible Färbung der Membran mit Ponceau S (0,5 % (w/v) in 1 % (v/v)

Essigsäure) überprüft. Nach Entfärbung mit bidest. H₂O wurde, falls nötig, die Membran an der Luft getrocknet und zwischen Whatman-Papier über Nacht bei 8 °C aufbewahrt. Ansonsten wurde direkt nach zweimaligem Waschen bei Raumtemperatur (je 10 Minuten) mit TBS-Puffer die Membran 1 bis 1,5 Stunden bei Raumtemperatur mit Blocking-Puffer (3 % (w/v) BSA in TBS-Puffer) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je 10 Minuten bei Raumtemperatur) mit TBST-Puffer und einmaligem Waschen (10 Minuten bei Raumtemperatur) mit TBS-Puffer, wurde die Membran mit dem Anti-His HRP Conjugate Antikörper (enthält die Meerrettich-Peroxidase, HRP) der Firma QIAGEN, Hilden, in einer 1 : 1500 Verdünnung in Blocking-Puffer 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen der Membran mit TBST-Puffer (2 mal 10 Minuten bei Raumtemperatur) und TBS-Puffer (10 Minuten bei Raumtemperatur) entfernt. Die Visualisierung der gebundenen Antikörper erfolgte im Dunkeln innerhalb von 15 Minuten durch Zugabe der HRP-Färbelösung der Firma Roche Diagnostics, Mannheim.

2.26 Markierung von DNA-Sonden mit ³²P oder Digoxigenin

Die radioaktive Markierung von gereinigten (siehe 2.14) DNA-Fragmenten, die als Sonden benutzt werden sollten, erfolgte mit dem Rediprime II Random Prime Labeling System und 50 µCi Redivue [α -³²P]-dCTP (3000 Ci / mmol) der Firma Amersham Biosciences, Freiburg, nach Anleitung des Herstellers bei 37 °C für 20 Minuten. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung (5 Minuten bei 100 °C) gestoppt und die Sonde in 30 ml Hybridisierungspuffer verdünnt.

Sollte die DNA mit Digoxigenin (DIG) markiert werden, wurde in einer Polymerasekettenreaktion eine Mischung aus normalen Nukleosidtriphosphaten und DIG-DNA Labelling Mix (enthält DIG-11-dUTP) der Firma Roche Applied Science, Mannheim, im Verhältnis 1 : 1 eingesetzt. Das entstandene markierte PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt (Isolation der DNA nach 2.14) und in 30 ml Hybridisierungspuffer verdünnt.

Alle Sonden wurden bei -20 °C oder +8 °C gelagert, vor der Verwendung (siehe 2.27) durch zehnmünütige Inkubation bei 100 °C denaturiert und maximal dreimal verwendet.

2.27 *Southern-Hybridisierung (SOUTHERN, 1975)*

Chromosomale DNA von Streptomyceten wurde mit passenden Restriktionsendonukleasen, wie unter 2.13 beschrieben, über Nacht verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt (vergl. 2.14). Die Agarosegele wurden anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Depurinierungslösung geschwenkt. Denaturierung der Fragmente wurde durch zweimalige Inkubation (je 15 Minuten) der Gele in Denaturierungslösung erreicht. Nach Abspülen mit bidest. H₂O und Neutralisierung (zweimalige 15-minütige Inkubation in Neutralisierungslösung), wurden die Gele durch zehninütige Inkubation in Transferpuffer (siehe unten) äquilibriert.

Der Transfer der DNA aus Agarosegelen erfolgte auf Hybond-XL Nylon-Membranen der Firma Amersham Biosciences, Freiburg, in der Kapillar-Blot-Technik entweder nach der Methode von REED & MANN, 1985, mit 400 mM NaOH als Transferpuffer oder nach Anleitung des DIG Application Manuals der Firma Roche Applied Science, Mannheim, mit 20x SSC als Transferpuffer über Nacht.

Die Membranen wurden mit 2x SSC befeuchtet und die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm, 10 Minuten bei Raumtemperatur) kovalent an diese gebunden. Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten in Kunststoffschüsseln in temperierbaren Wasserbadschüttlern bei 60 bis 68 °C jeweils über Nacht. Nach der Hybridisierung erfolgte ein zusätzlicher Waschschriff (10 Minuten bei Raumtemperatur) mit frischem Hybridisierungspuffer, ansonsten wurden die Membranen analog den o.g. Protokollen bis zu einer Stringenz von 0,5x SSC / 0,5 % (w/v) SDS weiter behandelt.

Der Nachweis radioaktiv markierter Sonden erfolgte mit Hybond MP-Röntgenfilmen der Firma Amersham Biosciences, Freiburg, und Röntgenverstärkerfolien in Exponierboxen bei Raumtemperatur.

DIG-markierte Sonden wurden mit dem DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II für Chemilumineszenz-Reaktionen der Firma Roche Applied Science, Mannheim, nach dem Protokoll des Herstellers unter Verwendung von Hyperfilm ECL-Chemilumineszenzfilmen der Firma Amersham Biosciences, Freiburg, nachgewiesen.

2.28 Enzymtests

2.28.1 Aktivitätstests für die GTs NeoM, KanM1, KanM2, TobM2, NeoF und HygF

Es wurden Gesamtzellextrakte, lösliche Fraktionen oder angereichertes Enzym in die Reaktionen mit maximal 25 % (v/v) eingesetzt, das Gesamtvolumen wurde mit bidest. H₂O auf 300 µl aufgefüllt. Die Inkubationszeit betrug maximal sechs Stunden, wobei bereits nach einer, zwei und vier Stunden je 50 µl als Probe entnommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

Die Aktivitäten der verschiedenen Glycosyltransferasen wurden bei 30 °C und 37 °C getestet. Es wurde folgende Standardzusammensetzung für die Tests benutzt:

Tris/HCl, pH = 7,5	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NDP-Zucker	2 mM
Akzeptorsubstrat	1 mM

In Ausnahmefällen wurde auch Natriumphosphatpuffer mit gleichem pH-Wert in gleicher Konzentration verwendet. Das Verhältnis von NDP-Zucker zum Akzeptorsubstrat wurde ebenfalls variiert, um das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Produkte zu verlagern. Folgende aktivierte Zucker dienten als Testsubstrate: UDP-D-Glucose, TDP-D-Glucose und UDP-*N*-Acetyl-D-glucosamin.

Die Auswertung der Tests erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (siehe 2.29).

Ebenfalls wurde eine mögliche Katalyse der Rückreaktion von KanM2 und TobM2 getestet. Dazu wurden in einem 300 µl-Ansatz analog zu ZHANG *et al.*, 2006, Gesamtzellextrakte oder lösliche Fraktionen mit dNDPs (dADP, dCDP, dGDP, dTDP) und KAN oder TOB bei 37 °C für maximal 8 h inkubiert und mittels Dünnschichtchromatographie (siehe 2.29) analysiert. Die Ansätze hatten die folgende Zusammensetzung:

Tris/HCl, pH = 7,5	10 mM
MgCl ₂	1 mM
NDP	2 mM
Kanamycin/Tobramycin	0,1 – 1 mM
Proteinextrakt	bis 10 % (v/v)

2.28.2 Aktivitätstests für NeoD und KanN

Eine postulierte Nukleotidyltransferaseaktivität dieser Enzyme (KUDO *et al.*, 2005a) wurde mit folgenden dNTPs / NTPs untersucht: ATP, CTP, GTP, UTP, dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Die Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Tris/HCl, pH = 8,0	50 mM
MgCl ₂	10 mM
D-Glucosamin-1-Phosphat	5 mM
dNTPs / NTPs	je 2 mM
Lösliche Fraktion	100 µl

Es wurde mit bidest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 300 µl aufgefüllt, bei 37 °C inkubiert, nach 2 Stunden 150 µl abgenommen und der Rest 18 Stunden weiter inkubiert. Die Proben wurden 1 Minute bei 100 °C gekocht, 5 Minuten bei 13200 • g zentrifugiert (Raumtemperatur) und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines HPLC-Systems (Firma Dionex, Germering) auf einer Reprosil Polyamin 5 µm Säule der Firma Trentec Analystechnik, Gerlingen, mit einem Gradientenprogramm (siehe Tabelle 2.8) und einer Flussrate von 1 ml / min.

Puffer A: Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	5,1 mM
Acetonitril	2,0 % (v/v)
KH ₂ PO ₄	21,5 mM
K ₂ HPO ₄	8,5 mM

Puffer B: Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	5,1 mM
Acetonitril	40,0 % (v/v)
KH ₂ PO ₄	24,0 mM
K ₂ HPO ₄	6,0 mM

Tabelle -2.8- HPLC-Gradientenprogramm

Zeit [Minuten]	Gradient
0	100 % Puffer A
15	5 % Puffer B
30	15 % Puffer B
45	40 % Puffer B
60	100 % Puffer B
90	100 % Puffer A

Die Detektion der nukleotidaktivierten D-Glucose erfolgte mit einem angeschlossenen UV / VIS-Detektor (UVD340S) der Firma Dionex, Germering. Dazu wurde das Spektrum im Bereich von 200 bis 595 nm gescannt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Chromeleon Client Version 6.40 der Firma Dionex, Germering.

Die von PIEPERSBERG *et al.*, 2007, postulierte Deacetylaseaktivität dieser Enzyme wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl bei 37 °C über Nacht bestimmt. Da weder *N*-Acetylparomamin noch 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C in reiner Form zur Verfügung standen, wurden die Substrate mit NeoM, KanM1 und NeoF wie oben beschrieben hergestellt und ohne weitere Aufbereitung in die Tests eingesetzt. Die Tests hatten folgende Standard-zusammensetzung:

Tris/HCl, pH = 7,5	50 mM
MgCl ₂	10 mM
Substrat	20 µl
Lösliche Fraktion	10 µl

Die Auswertung der Tests erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, wobei die Bildung von Paromamin bzw. 6'''-Hydroxy-NEO C nach Färbung mit Ninhydrin gut beobachtet werden konnte (siehe 2.29).

Die alternativ postulierte Deacetylierung (KUDO *et al.*, 2005a) von UDP-*N*-Acetyl-D-glucosamin (UDP-GlcNAc) wurde unter den gleichen Bedingungen wie oben mit 5 mM UDP-GlcNAc als Substrat untersucht. Die Bildung von UDP-Glucosamin wurde photometrisch mit der HPLC unter den oben genannten Bedingungen bestimmt.

2.28.3 Acetylierungen mit AAC(2'), AAC(3) und KanA [AAC(6')]

Mit Hilfe der *N*-Acetyltransferasen AAC(2'), AAC(3) und KanA [AAC(6')] sollten Aminogruppen in den AGAs selektiv acetyliert werden, um Vergleichssubstanzen mit bekannter Acetylierungsposition zu gewinnen. Die Enzyme wurden heterolog in *E. coli* oder *S. lividans* produziert und die zellfreien Rohextrakte (vergl. 2.22) in die Reaktion eingesetzt. Für Acetylierungen mit AAC(3) wurde die lösliche Fraktion des Zellaufschlusses von *E. coli* DH5 α -pOJ436 aus einer ÜNK verwendet. Das Gen *kanA* wurde aus chromosomaler DNA von *S. kanamyceticus* mit den Primern „kanA II Start“ und „kanA II Stopp“ amplifiziert und in pUCPU21, pUWL201PW, pET11aP und pET16b ligiert (Tab. 2.3). Zur Acetylierung wurde die lösliche Fraktion des Zellaufschlusses von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16/*kanA* (2 h bei 37 °C; LB; Induktion mit 1 mM IPTG) verwendet. Das Gen *aacC2'* wurde mit den Primern „aac2' Start“ und „aac2' Stopp“ aus der chromosomalen DNA von *S. kasugaensis* amplifiziert und in pCR-2.1TOPO integriert. Daraus wurde das isolierte Fragment in pET11aP, pET16b und pUWL201PW ligiert (vergl. Tab. 2.3). Die lösliche Fraktion des Zellaufschlusses von *S. lividans* TK23-p201PW/*aac2'* (48 h bei 28 °C; TSB) wurde zur Acetylierung verwendet.

Es wurde die folgende Standardzusammensetzung (modifiziert nach HOTTA *et al.*, 2000) für die Tests benutzt:

KH ₂ PO ₄ , pH = 7,2	100 mM
Acetyl-CoA (Li-Salz)	4 mM
Lösliche Fraktion	10 % (v/v)
AGA	0,5 μ l (50 mg / ml Stammlsg.)
	2 - 4 μ l (Enzymtest)

Das Gesamtvolumen wurde mit bidest. H₂O auf 50 µl gebracht. Die Tests wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und dann bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Die Bildung der acetylierten AGAs wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nach Färbung mit Ninhydrin (vergl. 2.29) beobachtet.

2.29 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Auftrennung und der Nachweis der AGAs erfolgte auf Normal- und Umkehrphasen-(RP₁₈)-Kieselgeldünnschichtchromatographiefolien der Firma Merck, Darmstadt. Als mobile Phasen kamen folgende Fließmittel zum Einsatz (Angaben in Volumenanteilen): **(I)** Methanol / Chloroform / 12,5 % (w/v) NH₃-Lsg. 1 : 0,2 : 1; **(II)** 37 mM KH₂PO₄; **(III)** 1-Propanol / Pyridin / Eisessig / Wasser 39,5 : 26,3 : 7,9 : 26,3.

Zur Sättigung der Dampfphase wurden die DC-Kammern vor Benutzung mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Laufmittel inkubiert. Nach der Entwicklung der DC-Folien wurden diese bei Raumtemperatur getrocknet. Die Detektion erfolgte durch Besprühen der Folien mit Ninhydrin-Lösung (300 mg Ninhydrin, 100 ml n-Butanol, 3 ml Eisessig) oder Cer-Reagenz-Lösung (2,5 g Phosphomolybdänsäure-Hydrat, 1 g Cer(IV)-Sulfat-Tetrahydrat, 6 ml konz. H₂SO₄, ad 100 ml mit H₂O) und anschließender Hitzebehandlung.

2.30 Intergenerische Konjugation zur Generierung von *knock-out* Mutanten

Da sich weder *S. fradiae* noch *S. kanamyceticus* erfolgreich protoplastieren und / oder transformieren ließen, wurde zur Übertragung der Mutagenese- und Komplementationsplasmide die intergenerische Konjugation verwendet (SIMON *et al.*, 1983). Dabei lagen die Protokolle von FLETT *et al.*, 1997, KIESER *et al.*, 2000, und BIERMAN *et al.*, 1992, zugrunde, die aber stark abgewandelt wurden.

Für die Konjugation wurden 20 ml Hauptkultur in einem 500 ml Schikanekolben (2xYT-Medium, ½ der normalen Antibiotikakonzentration) mit 500 µl ÜNK (2xYT-Medium,

normale Antibiotikakonzentration) des Donorstammes *E. coli* ET+ oder ETZ beimpft und bei 37 °C für 3 Stunden geschüttelt (150 UpM). Die Zellen wurden geerntet (10 Minuten, 4000 • g, 4 °C), in 20 ml frischem 2xYT-Medium ohne Antibiotika vorsichtig resuspendiert und eine Stunde bei 37 °C langsam geschüttelt (90 UpM). 1 ml einer Sporensuspension von *S. fradiae* (Rezipient) wurden in 9 ml TSB verdünnt, 10 Minuten bei 50 °C unter gelegentlichem Invertieren inkubiert und 4 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Dann wurden Donor und Rezipient im Verhältnis von etwa 1 : 1 gemischt und je 1 ml auf AS1-Medium (+ 10 mM MgCl₂) ausgespatelt. Die Platten wurden 6 Stunden bei 37 °C inkubiert, danach mit APR (oder Thiostrepton) und Phosphomycin in sterilem Wasser überschichtet (Gesamtvolumen 2 ml pro Platte, Endkonzentrationen: APR: 35 µg / ml, Thiostrepton: 15 µg/ml, Phosphomycin: 120 µg / ml), getrocknet und für mehrere Tage bei 28 °C inkubiert. Sporen von *S. kanamyceticus* wurden analog behandelt, allerdings wurden diese 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann alle weiteren Schritte bei 30 °C durchgeführt. Die Dauer der Keimungsphase betrug 5 Stunden, die der Konjugation betrug 8 Stunden. Als Konjugationsmedien wurden hier SPMR- und TSB-Medium verwendet.

Exkonjuganten wurden mehrmals auf frische Platten überimpft, wobei die APR-Konzentration auf 50 µg / ml (Thiostrepton: 30 µg / ml) erhöht wurde und auf Phosphomycin nach der zweiten Sporulationsrunde verzichtet wurde. Nach erneuter Anzucht in Flüssigmedium wurde die Kultur mikroskopisch auf Kontaminationen mit *E. coli* überprüft.

Die genetische Analyse der Exkonjuganten erfolgte mit *Southern*-Hybridisierung (siehe 2.27), PCR und RT-PCR (siehe 2.17 und 2.18). Eine biochemische Charakterisierung der Mutanten und komplementierten Stämme erfolgte mit Hemmhofstests gegen *Bacillus subtilis* (siehe 2.31).

2.31 Bioassays zum Nachweis von Antibiotikaproduktion und Erstellung von Resistenzprofilen

Zur Untersuchung der Antibiotikaproduktion von *knock-out*-Mutanten und Stämmen, die aus Komplementationsversuchen stammten, wurden diese bis zur Sporulation auf TSB- oder SPMR-Platten kultiviert. Aus diesen Platten wurden Agarblöcke von ca. 1 cm

Durchmesser ausgestochen und auf TSB-Platten platziert, die vorher mit 300 µl einer 1 : 100 Verdünnung einer ÜNK von *B. subtilis* oder *E. coli* DH5α/pGM102 bespatelt wurden. Falls nötig wurden sterile Filterpapiere (Ø = 5 mm), die 50 µg eines Referenzantibiotikums (NEO, KAN, Paromamin) enthielten, ebenfalls auf den Platten platziert. Die Platten wurden für 2 bis 3 Stunden bei 4 °C inkubiert und anschließend über Nacht bei 30 °C bebrütet.

Für die Erstellung von Resistenzprofilen wurden ÜNK (TSB-Medium) der Streptomyceten 1 : 3 mit frischem Medium verdünnt und 500 µl davon auf TSB-Medium ausgespatelt. Sterile Filterpapierscheiben (Ø = 5 mm) wurden auf dem Agar platziert und mit je 50 µg der zur Verfügung stehenden Antibiotika beschickt. Die Platten wurden zuerst 3 – 4 h bei 8 °C inkubiert, um die Diffusion der Antibiotika in den Agar zu gewährleisten. Nach 24- bis 36-stündiger Bebrütung bei 28 °C wurden gebildete Hemmhöfe ausgemessen, um auf den Grad der Sensitivität des Stammes gegenüber dem Antibiotikum schließen zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion der Plasmide zur heterologen Expression: Generelle Vorgehensweise

Einige der Enzyme aus dem *neo*- und *kan*-Cluster, insbesondere die zur Synthese von 2-DOS („C, E, S/S1“-Enzyme), wurden bereits experimentell charakterisiert (vergl. 1.5 und dortige Referenzen). Über die Funktionen der restlichen Genprodukte steht die experimentelle Beweisführung noch aus. In dieser Arbeit sollte darum die postulierte Funktion einiger Proteine, die direkt am Aufbau des Zuckerrückgrates der AGAs beteiligt sein sollten, vor allem die Glycosyltransferasen („M/M1, M2, F“-Enzyme), untersucht werden. Keines der Gene war vorher bereits isoliert worden. Darum wurden zunächst die Leserahmen mithilfe der PCR-Technik aus den entsprechenden Cosmiden (vergl. ABOSHANAB, 2005 und PIEPERSBERG *et al.*, 2007) oder aus chromosomaler DNA der Produzenten mit spezifischen Primern amplifiziert (vergl. 2.17 und Tab. 2.4). Die Oligonukleotidprimer wurden so aus den Sequenzen der Cluster abgeleitet, dass am Translationsstartpunkt des amplifizierten Gens eine *NdeI*- und am 3'-Ende eine *BamHI*- oder *BglII*-Schnittstelle eingefügt wurde (Ausnahmen sind in dem entsprechenden Abschnitt angegeben). Bei einem zusätzlichen Primer wurde die hintere Schnittstelle so gewählt, dass das natürliche Stoppcodon zerstört wurde, um eine Codierungssequenz für einen C-terminalen 6x His-Tag (C-His-Proteine) anhängen zu können. Die Expressionsvektoren pET16b und pET16bP (vergl. Tab. 2.2) enthielten eine Sequenz für einen 10x His-Tag am N-Terminus der produzierten Proteine (N-His-Proteine). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den pUCPU21-Vektor ligiert (vergl. Tab. 2.3) und sequenziert (vergl. 2.19). Aus diesen Konstrukten wurden die DNA-Fragmente herausgeschnitten und nach Gelextraktion (siehe 2.11) in Expressionsvektoren ligiert (siehe Tab. 2.3). Die so erhaltenen Expressionsplasmide wurden in die unter 2.21 genannten Expressionsstämme transformiert. Zur Kontrolle wurden leere Expressionsvektoren analog transformiert. Die rekombinanten Stämme wurden wie unter 2.21

beschrieben kultiviert. Alle Abweichungen von diesem allgemeinen Schema, sowie das detaillierte Vorgehen sind in den einzelnen Abschnitten aufgeführt.

3.2 Die 2-DOS : *N*-Acetylglucosaminyltransferasen (*N*-Acetylparomaminsynthasen) NeoM & KanM1

Der erste Schritt zum Aufbau des Zuckerrückgrates in der NEO- und KAN-Biosynthese ist die Kupplung von 2-DOS mit einem *N*-Acetyl-D-Glucosamin-Rest zu dem Pseudodisaccharid Paromamin (vergl. 1.5.1 und Abb. 1.6). Diese Reaktion wird wahrscheinlich von den beiden homologen Genprodukten NeoM und KanM1 (58 % identische Aminosäuren bei einer Länge von 421 bzw. 414 Aminosäuren) katalysiert, da sie mögliche NDP-Bindedomänen und Sequenzähnlichkeiten zu Glycosyltransferasen anderer Bakterien (23 % identische Aminosäuren bei einer Überlappung von 289 Aminosäuren zu einer Glycosyltransferase von *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4) aufweisen.

3.2.1 Amplifikation und Klonierung der Gene *neoM* & *kanM1*

Das Gen *neoM* wurde mit den Primern „NeoM Start“, „NeoM Stopp Del“ oder „NeoM Stopp“ (vergl. Tab. 2.4) aus chromosomaler DNA von *S. fradiae*, wie unter 2.17 beschrieben, amplifiziert. Als Anlagerungstemperaturen wurden für beide Primerkombinationen 60 °C (Schritt 3, vergl. Tab. 2.6) und 69,6 °C (Schritt 6) verwendet. Ebenso wurde das Gen *kanM1* mit den Primern „KanM1 Start“, „KanM1 Stopp Del“ oder „KanM1 Stopp“ aus dem Cosmid SkaJ19 (Anlagerungstemperaturen 54 °C (Schritt 3) und 69,6 °C (Schritt 6) für beide Primerkombinationen, vergl. Tab. 2.6) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden wie unter 3.1 beschrieben weiter behandelt.

3.2.1.1 Überproduktion von NeoM

Die Produktion von NeoM in den Expressionsstämmen wurde, falls notwendig, durch Zugabe von IPTG (pET-Vektoren) bzw. L-Rhamnose (pJOE-Vektoren) induziert (vergl. Tab. 3.1). Die Gesamtzellextrakte bzw. zellfreien, löslichen Fraktionen und Sedimente

(siehe 2.22) wurden anschließend mit SDS-PAGE (vergl. 2.24) auf Überproduktion und Löslichkeit der Proteine untersucht. His-Tag-Fusionsproteine wurden zudem noch mit Western-Blot-Analyse (siehe 2.25) nachgewiesen.

NeoM konnte als C-His-Protein in mehreren *E. coli*-Stämmen, die mit dem Konstrukt pJOE/*neoM* transformiert worden waren, überproduziert werden (vergl. Tab. 3.1). Nachdem diese Stämme bis zu 5 h nach der Induktion mit 0,2 % L-Rhamnose bei 30 °C in LB-Medium kultiviert worden waren, war es möglich durch Western-Blot-Analyse eine schwache Proteinbande in der berechneten Größe von 46,1 kDa (C-His-NeoM) in den Gesamtzellextrakten, den löslichen Fraktionen und im Sediment nach Zellaufschluss nachzuweisen (vergl. Abb. 3.1). Dabei war das gebildete Fusionsprotein in *E. coli* BL21 (DE3)-pJOE/*neoM* und *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/*neoM* nur in der Sediment-Fraktion zu finden (siehe Abb. 3.1 Spur 6 + 12). In *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE/*neoM* und *E. coli* DH5 α -pJOE/*neoM* war dagegen auch eine geringe Menge C-His-NeoM in der löslichen Fraktion nachzuweisen (Abb. 3.1 Spur 14 + 17). Durch weitere Variation der Anzuchtbedingungen, wie Absenken der Temperatur, Verlängerung der Kultivierung nach Induktion, oder durch den Zusatz von Betain und Sorbitol zum Medium, änderte sich die Ausbeute an Protein allerdings nicht erkennbar. In den Expressionsexperimenten zur Darstellung von nativem NeoM konnte eine zusätzliche Proteinbande in der erwarteten Größe von 45,1 kDa trotz Variationen der Bedingungen (Anzuchtmedien, Temperatur, usw.) und Verwendung verschiedener Expressionssysteme (vergl. Tab. 3.1) nur im Sediment nach Zellaufschluss von *E. coli* BL21 (DE3)-pET11/*neoM* als *inclusion-bodies* nachgewiesen werden. Auch die Überproduktion von im PAA-Gel sichtbaren Mengen NeoM in Streptomyceten gelang nicht.

Die löslichen Fraktionen von C-His-NeoM aus *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE/*neoM* und *E. coli* DH5 α -pJOE/*neoM* wurden, wie unter 2.22 beschrieben, in Konzentratoren mit 30 kDa als Ausschlussgrenze auf die 8 – 10-fache Menge angereichert und dann in *in vitro*-Enzymtests (siehe 3.2.2) eingesetzt.

Tabelle -3.1- Zusammenfassung der Expressionsergebnisse für *neoM*.

Vektor	Stämme	Medien	Temp.	Induktorkonz.	Protein
pET11/ <i>neoM</i> (pET11aP)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Betain/Sorb.; MM	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,5 mM ; 1 mM (IPTG)	± ; Unl.
pET16/ <i>neoM</i> (pET16b)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Betain/Sorb.; MM	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,5 mM ; 1 mM (IPTG)	-
pJOE/ <i>neoM</i> (pJOE2775)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5 α	LB; LB- Betain/Sorb.	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) (L-Rhamnose)	± (W.B.); Lös.
pJOE02/ <i>neoM</i> (pJOE2702)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5 α	LB	30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) (L-Rhamnose)	-
pT7-7/ <i>neoM</i> (pT7-7)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3);	LB	30 °C; 37 °C	1 mM (IPTG)	-
pCJR29/ <i>neoM</i> (pCJR29)	<i>S. coelicolor</i>	TSB; SPMR	28 °C	konst.	-
p201PW/ <i>neoM</i> (pUWL201PW)	<i>S. lividans</i> TK23; <i>S. lividans</i> TK64; <i>S. lividans</i> 1326; <i>S. coelicolor</i>	TSB; M65; YEME 34 %; YEME 10,3 %; SPMR	28 °C	konst.	-
pLoriTbla/ <i>neoM</i> (pUWLoriTbla)	<i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	-
p6021/ <i>neoM</i> (pIJ6021)	<i>S. lividans</i> 1326	TSB	28 °C	10 μ g/ml (Thio)	-
p4123/ <i>neoM</i> (pIJ4123)	<i>S. lividans</i> 1326	TSB	28 °C	10 μ g/ml (Thio)	-
pHM8aM (pHM8a)	<i>S. lividans</i> TK23; <i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	-

Die rekombinanten Stämme wurden alle, wie unter 2.21 beschrieben, bei den hier aufgeführten Temperaturen in den angegebenen Medien mit den jeweiligen Induktorkonzentrationen behandelt. Induktorkonz. = Induktorkonzentration; Temp. = Temperatur; konst. = der verwendete Promotor war konstitutiv, die Zugabe eines Induktors war nicht nötig; + = Expression war nach Coomassie-Färbung des Gels sichtbar; - = keine Expression nach Coomassie-Färbung des Gels sichtbar; ± = minimale Expression war nach Coomassie-Färbung des Gels sichtbar; Unl. = Protein war nur in der unlöslichen Fraktion vorhanden; Lös. = Protein war in der löslichen Fraktion sichtbar; (W.B.) = Protein nur durch Western-Blot-Analyse nachweisbar; MM = Minimalmedium; Bet. = Betain; Sorb. = Sorbitol; Thio = Thiostrepton.

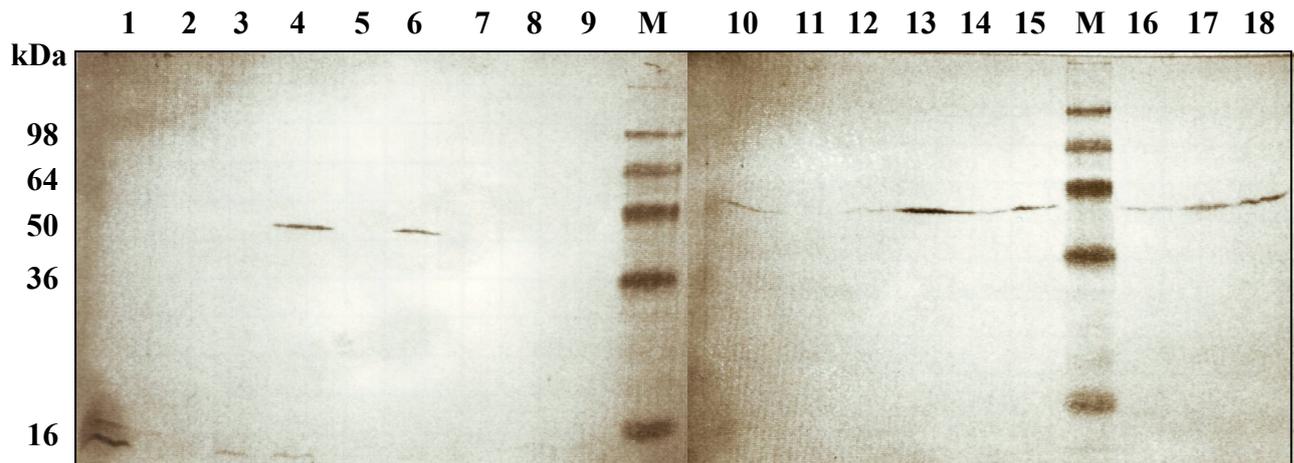


Abbildung -3.1- Western-Blot-Analyse auf Überproduktion von C-His-NeoM. Alle Stämme wurden in LB bei 30 °C kultiviert, mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose induziert und nach 5 h geerntet. Es wurden ca. 30 µg Gesamtprotein pro Spur auf ein 12 %iges Laemmli-Gel aufgetragen, nach SDS-PAGE auf Hybond P-Membran gebロットet und der immunologische Nachweis wie unter 2.25 beschrieben mit Anti-His-Tag-Antikörpern durchgeführt. Die Proteinextrakte jedes Stammes wurden immer in der Reihenfolge Gesamtzellextrakt, lösliche Fraktion und Sediment (jeweils 5 h nach Induktion) aufgetragen. Es wurden Extrakte von *E. coli* BL21 (DE3)-pJOE2775 (Kontrolle, Spur 1 – 3), *E. coli* BL21 (DE3)-pJOE/*neoM* (Spur 4 – 6), *E. coli* DH5α-pJOE2775 (Kontrolle, Spur 7 – 9), *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/*neoM* (Spur 10 – 12), *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE/*neoM* (Spur 13 – 15), *E. coli* DH5α-pJOE/*neoM* (Spur 16 – 18) verwendet. M = Proteinmarker; die Größen der Banden des Markers sind in kDa links angegeben.

3.2.1.2 Überproduktion von KanM1

Unter den gleichen Bedingungen wie bei der Überproduktion von NeoM gelang auch die Überproduktion von KanM1 (vergl. Tab. 3.2). Der Nachweis des C-His-KanM1-Fusionsproteins (berechnete Größe: 45,8 kDa) konnte ebenfalls mithilfe der Western-Blot-Analyse von den Gesamtzellextrakten, den löslichen Fraktionen und dem Sediment nach Zellaufschluss mehrerer *E. coli*-Stämme, die mit pJOE/*kanM1* transformiert und 5 h nach Induktion der Expression mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose bei 30 °C in LB-Medium geerntet worden waren (vergl. Tab 3.2 und Abb. 3.2), erbracht werden. So zeigte sich, dass KanM1 ebenfalls in *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE/*kanM1* und *E. coli* DH5α-pJOE/*kanM1* und zusätzlich in *E. coli* JR (DE3)-pJOE/*kanM1* und *E. coli* BL21 (DE3)-pJOE/*kanM1* löslich produziert wurde (siehe Abb. 3.2 Spur 5, 8, 11 + 14). Die Menge an gebildetem löslichem Protein war wesentlich höher als die von C-His-NeoM, wobei etwa 85 % des Proteins unlöslich im Sediment zu finden waren. Da oft der Anteil an löslichem Protein in Anzuchten bei niedrigen Temperaturen durch das verlangsamte Wachstum höher ist, wurden die Expressionen auch bei tieferen Temperaturen durchgeführt (vergl. Tab. 3.2). Durch das Absenken der Temperatur auf 25 °C konnte die Ausbeute an löslichem KanM1

nicht weiter gesteigert werden. Es wurde sogar eine Abnahme der absoluten Menge des gebildeten Proteins beobachtet.

Eine durch Coomassie-Färbung sichtbare Überproduktion von nativem KanM1 gelang weder in *E. coli* noch in den verwendeten Streptomyceten. Obwohl die Anzucht- und Expressionsbedingungen der Stämme ebenfalls stark variiert wurden (vergl. Tab. 3.2), konnte eine erwartete Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 44,8 kDa nicht nachgewiesen werden.

Die löslichen Fraktionen von C-His-KanM1 aus *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE/*kanM1* und *E. coli* DH5 α -pJOE/*kanM1* konnten, wie unter 2.22 beschrieben, in Konzentratoren mit 30 kDa als Ausschlussgrenze auf die 8 – 10-fache Menge angereichert werden.

Tabelle -3.2- Zusammenfassung der Expressionsergebnisse für *kanM1*.

Vektor	Stämme	Medien	Temp.	Induktorkonz.	Protein
pET11/ <i>kanM1</i> (pET11aP)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Betain/Sorb.	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,5 mM; 1 mM (IPTG)	-
pET16/ <i>kanM1</i> (pET16b)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Betain/Sorb.	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,5 mM; 1 mM (IPTG)	-
pJOE/ <i>kanM1</i> (pJOE2775)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5 α	LB; LB- Betain/Sorb.	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) (L-Rhamnose)	+ (W.B.); Lös.
pJOE02/ <i>kanM1</i> (pJOE2702)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5 α	LB	30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) (L-Rhamnose)	-
pT7-7/ <i>kanM1</i> (pT7-7)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3);	LB	30 °C; 37 °C	1 mM (IPTG)	-
pCJR29/ <i>kanM1</i> (pCJR29)	<i>S. coelicolor</i>	TSB; SPMR	28 °C	konst.	-
p201PW/ <i>kanM1</i> (pUWL201PW)	<i>S. lividans</i> TK23; <i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	-
pLoriTbla/ <i>kanM1</i> (pUWLoriTbla)	<i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	-
pHM8a/ <i>kanM1</i> (pHM8a)	<i>S. lividans</i> TK23; <i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	-

Die rekombinanten Stämme wurden alle, wie unter 2.21 beschrieben, bei den hier aufgeführten Temperaturen in den angegebenen Medien mit den jeweiligen Induktorkonzentrationen behandelt. Abkürzungen siehe Tab. 3.1.

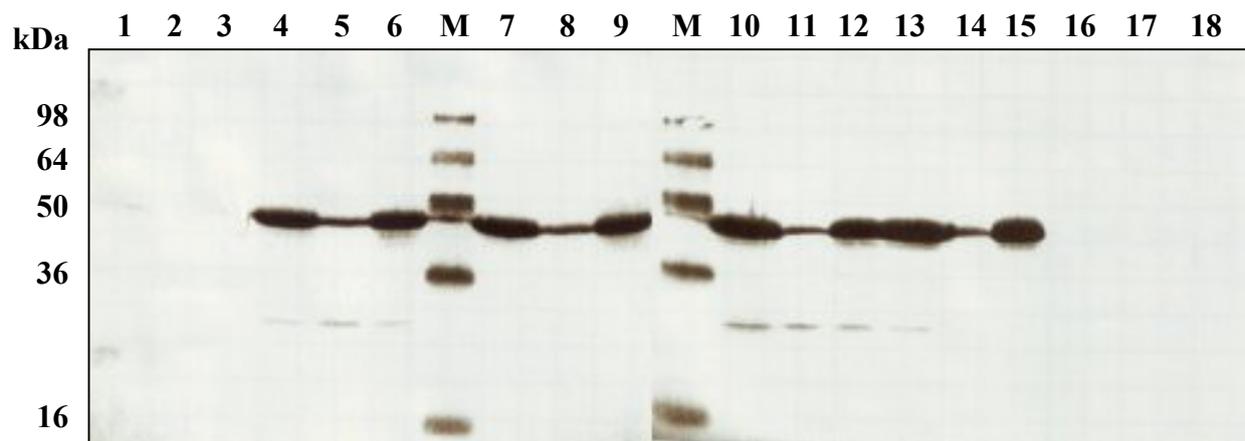


Abbildung -3.2- Western-Blot-Analyse auf Überproduktion von C-His-KanM1. Alle Stämme wurden in LB bei 30 °C kultiviert, mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose induziert und nach 5 h geerntet. Es wurden ca. 35 µg Gesamtprotein pro Spur auf ein 12 %iges Laemmli-Gel aufgetragen, nach SDS-PAGE auf Hybond P-Membran gebロットet und der immunologische Nachweis wie unter 2.25 beschrieben mit Anti-His-Tag-Antikörpern durchgeführt. Die Proteinextrakte jedes Stammes wurde in der Reihenfolge Gesamtzellextrakt, lösliche Fraktion und Sediment (jeweils 5 h nach Induktion) aufgetragen. Es wurden Extrakte von *E. coli* JR (DE3)-pJOE2775 (Spur 1 – 3), *E. coli* JR (DE3)-pJOE/kanM1 (Spur 4 – 6), *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE/kanM1 (Spur 7 – 9), *E. coli* BL21 (DE3)-pJOE/kanM1 (Spur 10 – 12), *E. coli* DH5α-pJOE/kanM1 (Spur 13 – 15), *E. coli* DH5α-pJOE2775 (Spur 16 – 18) verwendet. M = Proteinmarker; die Größen der Banden des Markers sind in kDa links angegeben.

3.2.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität von NeoM & KanM1

Die aus den Überproduktionen hervorgegangenen C-His-NeoM- bzw. C-His-KanM1-haltigen Proteinextrakte wurden in *in vitro* Enzymsätzen (vergl. 2.28.1) eingesetzt. Ausgehend von der postulierten Funktion (vergl. 1.3.1 und dortige Referenzen) sollten NeoM und KanM1 2-DOS mit einem NDP-aktiviertem Zucker zu Paromamin oder *N*-Acetylparomamin umsetzen. Da die exakte Substratspezifität nicht bekannt war, wurden zur Kontrolle UDP-D-Glucose (UDP-Glc), TDP-D-Glucose (TDP-Glc) und als vermutliches Substrat UDP-*N*-Acetyl-D-glucosamin (UDP-GlcNAc) neben 2-DOS als Substrate eingesetzt. UDP-D-glucosamin war kommerziell nicht verfügbar und konnte deshalb nicht verwendet werden. Unter Verwendung der angereicherten löslichen Fraktionen von C-His-NeoM (siehe 3.2.1.1) und C-His-KanM1 (siehe 3.2.1.2) konnte zunächst keine Bildung eines neuen Produktes mithilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) und Detektion mit Ninhydrin beobachtet werden.

Um auszuschließen, dass die fehlende Enzymaktivität auf eine durch den His-Tag verursachte Änderung der Proteinstruktur zurückzuführen war, sollten die nativen Proteine in die Tests eingesetzt werden. Eine Abspaltung des His-Tags war nicht möglich,

da keine entsprechende Erkennungssequenz im Vektor pJOE2775 codiert war. Daraufhin wurde die lösliche Fraktion eines Zellaufschlusses von *S. lividans* TK23-p201PW/*neoM*, der 56 h bei 28 °C in TSB angezogen worden war, eingesetzt. Das Protein NeoM war zwar nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Gels nicht sichtbar nachzuweisen, aber nach Inkubation bei 37 °C, Auftrennung mittels DC und Visualisierung mit Ninhydrin, konnte ein Umsatz von 2-DOS mit UDP-GlcNAc zu 2'-*N*-Acetylparomamin festgestellt werden, der mit dem gleich behandelten zellfreien Rohextrakt der Negativkontrolle (*S. lividans* TK23-pUWL201PW) nicht zu beobachten war (siehe Abb. 3.3). Der Umsatz war nicht vollständig. Ca. 10 % des eingesetzten 2-DOS wurden zu 2'-*N*-Acetylparomamin umgesetzt (Spur 1). TDP-Glc und UDP-Glc wurden von NeoM scheinbar nicht als Substrat akzeptiert, da keine anders wandernde Substanz in den entsprechenden Spuren dieser Tests nachzuweisen war (Spur 6 + 10) und auch 2-DOS offensichtlich nicht verbraucht worden war. Das Gleichgewicht der Reaktion lies sich trotz Variation der Testbedingungen, wie z.B. durch Einsatz von mehr 2-DOS oder weiterer Zugabe von (angereichertem) Rohextrakt, nicht weiter auf die Seite des Produktes verschieben. Durch einen späteren Vergleich des R_F -Wertes mit dem von authentischem 2'-*N*-Acetylparomamin (vergl. 2.28.3), konnte das Produkt identifiziert werden. Die authentische Substanz wurde durch regioselektive Acetylierung von Paromamin mit Acetyl-CoA unter Katalyse der spezifischen Acetyltransferase AAC(2') aus *S. kasugaensis* (HOTTA *et al.*, 1996) hergestellt (vergl. 2.28.3 und Abb. 4.11). Dieses Verfahren wurde von TRUMAN *et al.* (2006) für die erfolgreiche Darstellung von *N*-Acetylteicoplanin und von HOTTA *et al.* (1996, 2000) für die regioselektive Acetylierung verschiedener AGAs (unter anderem Arbekacin, RIB, NEO und KAN) angewendet.

Für weitergehende Analysen (NMR, Massenspektrometrie, etc.) reichte die gebildete Menge an 2'-*N*-Acetylparomamin nicht aus. Das gebildete Produkt diente im weiteren Verlauf der Arbeit als Substrat für die postulierten 2'-*N*-Acetylparomamin-Deacetylasen KanN und NeoD (siehe 3.3).

Als weitere mögliche Substrate für NeoM wurden Ribostamycin und Neamin unter den gleichen Bedingungen wie 2-DOS getestet. Bei beiden Substraten konnte mit keinem aktivierten Zucker ein Umsatz nachgewiesen werden.

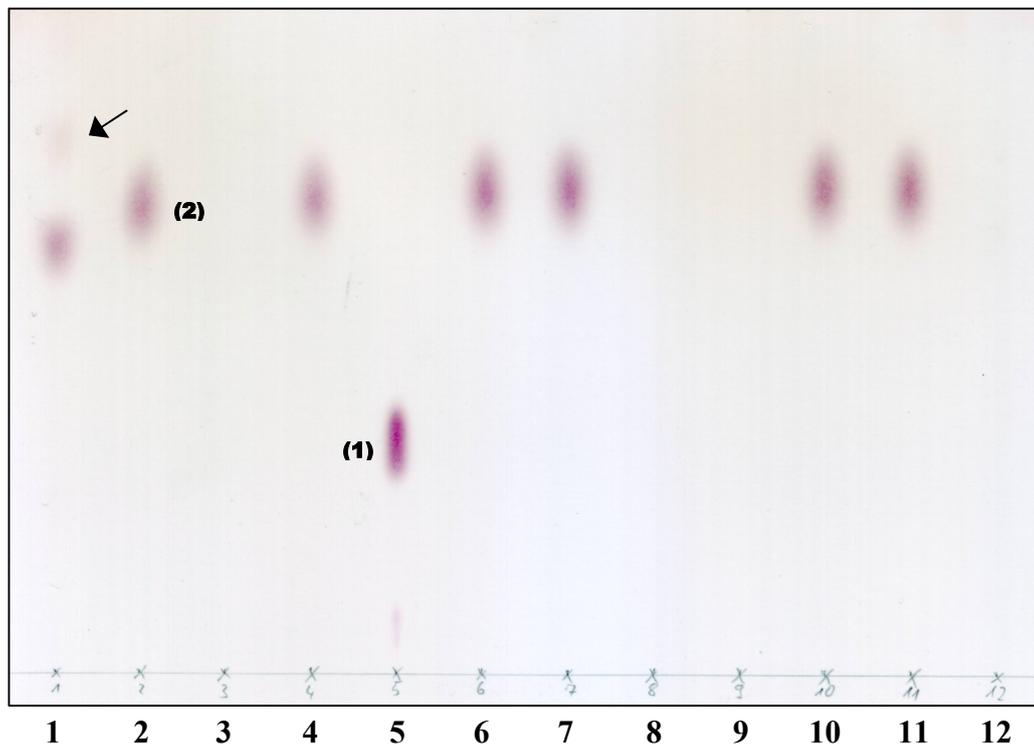


Abbildung -3.3- NeoM katalysiert die Synthese von 2'-N-Acetylparomamin. *S. lividans* TK23-pUWL201PW (Kontrolle) und *S. lividans* TK23-p201PW/*neoM* (NeoM) wurden wie unter 2.21.2 beschrieben 56 h angezogen, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und die löslichen Fraktionen für die Enzymtests (siehe 2.28.1) mit 2-DOS als Akzeptor verwendet. Spur 1: NeoM + UDP-GlcNAc; Spur 2: Kontrolle + UDP-GlcNAc; Spur 6: NeoM + TDP-Glc; Spur 7: Kontrolle + TDP-Glc; Spur 10: NeoM + UDP-Glc; Spur 11: Kontrolle + UDP-Glc; nach 4 stündiger Inkubation der Tests bei 37 °C. UDP-GlcNAc (Spur 3), 2-DOS (Spur 4), Paromamin ((**1**), Spur 5), TDP-Glc (Spur 8), lösliche Fraktion von *S. lividans* TK23-p201PW/*neoM* (Spur 9) und UDP-Glc (Spur 12) wurden als Standards benutzt. Der Pfeil kennzeichnet gebildetes 2'-N-Acetylparomamin, (**2**) kennzeichnet 2-DOS. Das Chromatogramm wurde mit Fließmittel II entwickelt und mit Ninhydrin-Lösung gefärbt (vergl. 2.29).

Ebenso wie NeoM wurde die enzymatische Aktivität von nativem KanM1 überprüft. Die Tests wurden wie unter 2.28.1 beschrieben durchgeführt. Mit der unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie für NeoM getesteten löslichen Fraktion des Zellaufschlusses von *S. lividans* TK23-p201PW/*kanM1*, der ebenfalls 56 h bei 28 °C in TSB angezogen worden war, konnte die Bildung von 2'-N-Acetylparomamin nicht beobachtet werden. Mit der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses von *S. lividans* TK64-p201PW/*kanM1*, der 48 h in TSB bei 28 °C kultiviert worden war, konnte dagegen ein Umsatz von 2-DOS mit UDP-GlcNAc zu 2'-N-Acetylparomamin beobachtet werden (siehe Abb. 3.4), obwohl keine im PAA-Gel nachweisbare heterologe Überproduktion des Proteins vorlag. Ein entsprechend behandelte Extrakt der Negativkontrolle (*S. lividans* TK64-pUWL201PW) zeigte keine vergleichbaren Aktivitäten. Abb. 3.4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildungsreaktion durch Zunahme von 2'-N-Acetylparomamin nach 1 h (Spur 5), 4 h (Spur 14) und 6 h (Spur 18) Inkubation der Tests bei 37 °C. Auch hier war der Umsatz nicht

vollständig. Durch die erneute Zugabe von KanM1-haltigem Proteinextrakt nach 6 h Inkubation konnte der Anteil von 2'-*N*-Acetylparomamin nicht weiter erhöht werden. Unter den gewählten Testbedingungen scheint UDP-GlcNAc, wie bei NeoM, das einzige akzeptierte Donorsubstrat für KanM1 zu sein. In den Tests mit TDP-Glc oder UDP-Glc war wiederum wie erwartet keine Bildung eines Produktes bzw. ein Umsatz von 2-DOS nachweisbar.

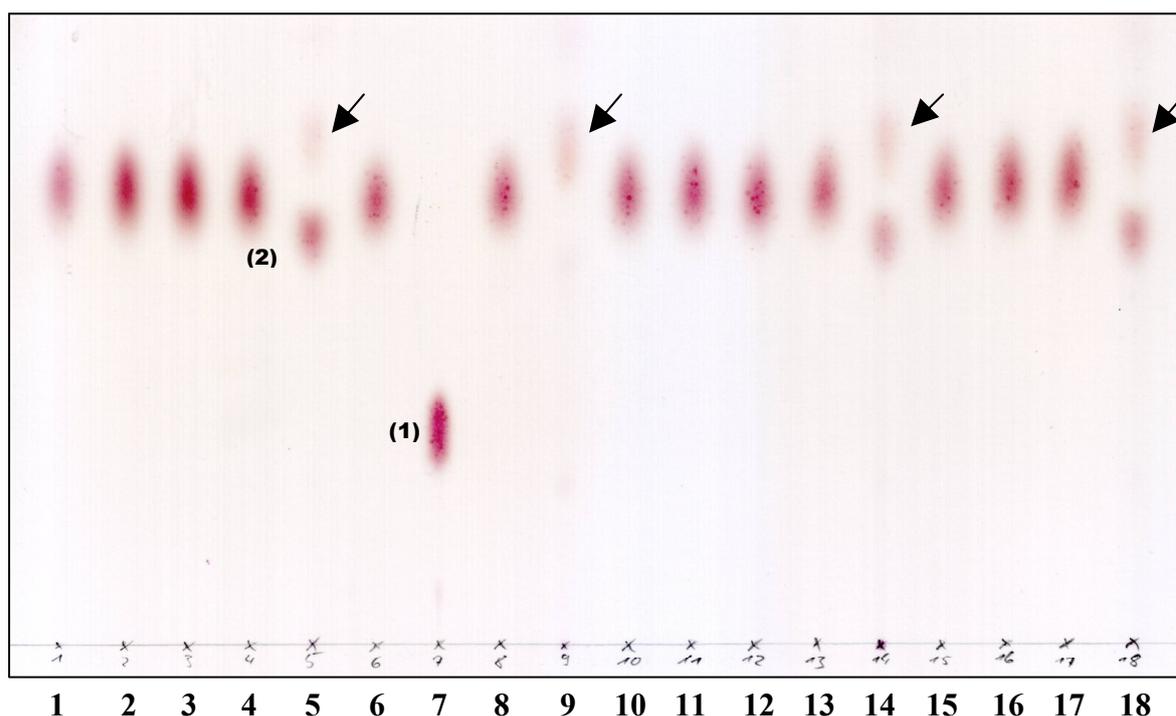


Abbildung -3.4- KanM1 katalysiert die Synthese von 2'-*N*-Acetylparomamin. *S. lividans* TK64-pUWL201PW (Kontrolle) und *S. lividans* TK64-p201PW/*kanM1* (KanM1) wurden wie unter 2.21.2 beschrieben 48 h angezogen, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und die löslichen Fraktionen für die Enzymtests (siehe 2.28.1) mit 2-DOS als Akzeptor verwendet. Die Tests wurden 1 h (Spur 1 – 6), 4 h (Spur 10 – 14) und 6 h (Spur 16 – 18) bei 37 °C inkubiert. Spur 1, 10, 16: KanM1 + UDP-Glc; Spur 2, 11: Kontrolle + UDP-Glc; Spur 3, 12, 17: KanM1 + TDP-Glc; Spur 4, 13: Kontrolle + TDP-Glc; Spur 5, 14, 18: KanM1 + UDP-GlcNAc; Spur 6, 15: Kontrolle + UDP-GlcNAc. Paromamin ((1), Spur 7), 2-DOS ((2), Spur 8) und 2'-*N*-Acetylparomamin (Spur 9, vergl. 2.28.3) wurden als Kontrollen benutzt. Pfeile kennzeichnen 2'-*N*-Acetylparomamin. Das Chromatogramm wurde mit Fliessmittel II entwickelt und mit Ninhydrin-Lösung gefärbt (vergl. 2.29).

3.3 Die Proteine NeoD und KanN

NeoD und KanN weisen eine signifikante Ähnlichkeit (29 % identische Aminosäuren bei einer Überlappung von 240 Aminosäuren zu einem LmbE-artigen Protein von *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl) zu der MitE/LmbE-Familie der Deacetylasen und zu

anderen Amidasen auf. In der postulierten Biosynthese von NEO und KAN katalysieren sie vermutlich die Deacetylierung des Pseudodisaccharides 2'-*N*-Acetylparomamin zu Paromamin (vergl. 1.3.1). Allerdings postulierten KUDO *et al.*, 2005a, dass es sich bei dem zu NeoD und KanN homologen BtrD (25 % identische Aminosäuren bei einer Überlappung von 270 Aminosäuren im Vergleich zu NeoD) aus der Butirosinbiosynthese um eine Nukleotidyltransferase handelt, obwohl eine Ähnlichkeit zu anderen Nukleotidyltransferasen gering bzw. nicht vorhanden ist. BtrD sollte demnach die Bildung des Substrates UDP-D-Glucosamin aus Glucosamin-1-phosphat katalysieren, das für die nachfolgende von BtrM katalysierte Glycosylierung von 2-DOS benötigt wird. In dieser Arbeit sollten NeoD und KanN daher auf beide postulierten Enzymaktivitäten hin untersucht werden.

3.3.1 Klonierung von *neoD* und *kanN*

Das Gen *neoD* wurde mit den Primern „Start neoD“, „Stopp neoD (pJOE)“ oder „neoD Stopp (pET)“ (Anlagerungstemperaturen: 54,7 °C, Schritt 3, und 67,5 °C, Schritt 6, vergl. Tab. 2.6, für beide Primerkombinationen) aus dem Cosmid SfrF04 amplifiziert. Ebenso wurde *kanN* mit den Primerkombinationen „KanN Start“ / „KanN Stopp (pJOE)“ (Anlagerungstemperatur: 55,6 °C, Schritt 3, bzw. 69,5 °C, Schritt 6, vergl. Tab. 2.6) und „KanN Start“ / „KanN Stopp (pET)“ (Anlagerungstemperatur: 53,5 °C, Schritt 3, bzw. 65,5 °C, Schritt 6, vergl. Tab. 2.6) aus dem Cosmid SkaJ19 amplifiziert. Die Expressionsplasmide wurden konstruiert, wie unter 3.1 beschrieben (siehe Tab. 2.3). Die Tabellen 3.3 und 3.4 zeigen zusammenfassend die Ergebnisse der Expressionsversuche für beide Gene.

3.3.1.1 Überproduktion von NeoD

Die heterologe Überproduktion von NeoD gelang bei Verwendung des pET11aP-Vektors (pET11/*neoD*) in den verwendeten *E. coli*-Stämmen (vergl. Tab. 3.3), die zusätzliche Proteinbande von berechneten 30,1 kDa (natives NeoD) waren zunächst nur in den unlöslichen Fraktionen der Zellaufschlüsse nachweisbar. Unter Standardbedingungen (37 °C, LB-Medium, 1 mM IPTG) war in den Gesamtzellextrakten von *E. coli*-

pET16b/*neoD* keine Expressionsbande nach Coomassie-Färbung des Gels sichtbar, die der erwarteten Größe von N-His-NeoD (32,6 kDa) entsprochen hätte.

Bei Abänderung der Kulturbedingungen der Expressionsansätze auf 30 °C bzw. 25 °C Anzuchttemperatur unter sonst gleichen Bedingungen konnte in den löslichen Fraktionen der Zellaufschlüsse von *E. coli* JM109 (DE3)-pET16b/*neoD* und *E. coli* BL21 (DE3)-pET16b/*neoD* nach Western-Blot-Analyse das N-His-NeoD-Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.5 (A) Spur 2 + 4). Ebenso wurde das C-His-NeoD von den in Tab. 3.3 genannten *E. coli*-pJOE/*neoD*-Stämmen nur bei 30 °C löslich produziert, während bei 37 °C keine nachweisbare Expression stattfand.

Tabelle -3.3- Zusammenfassung der Expressionsergebnisse für *neoD*.

Vektor	Stämme	Medien	Temp.	Induktorkonz.	Protein
pET11/ <i>neoD</i> (pET11aP)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Bet./Sorb.	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,5 mM; 1 mM (IPTG)	+; Unl.
pET16/ <i>neoD</i> (pET16b)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Bet./Sorb.	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,5 mM ; 1 mM (IPTG)	± (W.B.); Lös.
pJOE/ <i>neoD</i> (pJOE2775)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5α	LB; LB- Bet./Sorb.	30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) L-Rhamnose	± (W.B.); Lös.
pJOE02/ <i>neoD</i> (pJOE2702)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5α	LB	30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) L-Rhamnose	-
p201PW/ <i>neoD</i> (pUWL201PW)	<i>S. lividans</i> TK23; <i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	+; Lös.
pLoriTbla/ <i>neoD</i> (pUWLoriTbla)	<i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	-

Die rekombinanten Stämme wurden alle, wie unter 2.21 beschrieben, bei den hier aufgeführten Temperaturen in den angegebenen Medien mit den jeweiligen Induktorkonzentrationen behandelt. Abkürzungen siehe Tab. 3.1.

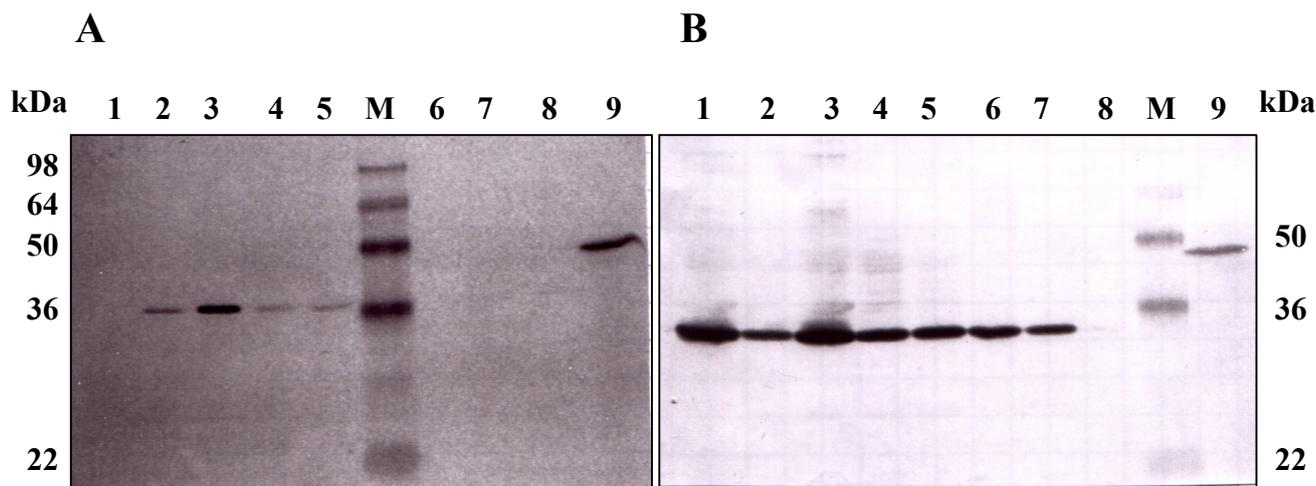


Abbildung -3.5- Western-Blot-Analysen der heterolog produzierten Proteine N-His-NeoD und C-His-KanN. (A) N-His-NeoD: Alle Stämme wurden bei 30 °C in LB kultiviert, mit 1 mM IPTG induziert und nach 2 h geerntet. Es wurden ca. 30 µg Gesamtprotein pro Spur auf ein 12 %iges Laemmli-Gel aufgetragen, nach SDS-PAGE auf Hybond P-Membran geblottet und der immunologische Nachweis wie unter 2.25 beschrieben mit Anti-His-Tag-Antikörpern durchgeführt. Die Spuren enthielten: (1) Gesamtzellextrakt von *E. coli* JM109(DE3)-pET16b (Kontrolle), (2) lösliche Fraktion von *E. coli* JM109 (DE3)-pET16b/*neoD*, (3) Sediment von *E. coli* JM109 (DE3)-pET16b/*neoD*, (4) lösliche Fraktion von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16b/*neoD*, (5) Sediment von *E. coli* BL21 (DE3)-pET16b/*neoD*, (6) Gesamtzellextrakt von *E. coli* Rosetta (DE3)-pET16b (Kontrolle), (7) lösliche Fraktion von *E. coli* Rosetta (DE3)-pET16b/*neoD*, (8) Sediment von *E. coli* Rosetta (DE3)-pET16b/*neoD*, (9) lösliche Fraktion von *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE2775/*forS* (Positivkontrolle = 46 kDa; MANDT, unveröffentlichte Ergebnisse). M = Proteinmarker; die Größen der Banden des Markers sind in kDa links angegeben.

(B) C-His-KanN: Alle Stämme wurden in LB bei 30 °C kultiviert, mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose induziert und nach 6 h geerntet. Es wurden ca. 35 µg Gesamtprotein pro Spur auf ein 12 %iges Laemmli-Gel aufgetragen, nach SDS-PAGE auf Hybond P-Membran geblottet und der immunologische Nachweis wie unter 2.25 beschrieben mit Anti-His-Tag-Antikörpern durchgeführt. Die Spuren enthielten: (1) Sediment von *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/*kanN*, (2) lösliche Fraktion von *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/*kanN*, (3) Sediment von *E. coli* BL21 (DE3)-pJOE/*kanN*, (4) lösliche Fraktion von *E. coli* BL21 (DE3)-pJOE/*kanN*, (5) lösliche Fraktion von *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE/*kanN*, (6) lösliche Fraktion von *E. coli* JR (DE3)-pJOE/*kanN*, (7) lösliche Fraktion von *E. coli* DH5α-pJOE/*kanN*, (8) Gesamtzellextrakt von *E. coli* DH5α-pJOE2775 (Kontrolle), (9) lösliche Fraktion von *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE2775/*forS* (Positivkontrolle = 46 kDa; MANDT, unveröffentlichte Ergebnisse). M = Proteinmarker; die Größen der Banden des Markers sind in kDa rechts angegeben.

3.3.1.2 Überproduktion von KanN

Alle Versuche, KanN und N-His-KanN genauso wie NeoD mithilfe der pET-Vektoren zu produzieren, ergaben trotz Austestung verschiedener Bedingungen (vergl. Tab. 3.4) keine nachweisbare Überproduktion des Proteins. Es war weder nach Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels noch mithilfe der Western-Blot-Analyse eine zusätzliche Proteinbande in der erwarteten Größen von 27 kDa (natives KanN) bzw. 29,5 kDa (N-His-KanN) zu finden. Nach Wechsel auf das L-Rhamnose-induzierbare pJOE2775-System konnte nach

Anzucht der verwendeten *E. coli*-Stämme (siehe Tab. 3.4) bei 37 °C in den Gesamtzellextrakten nach Zellaufschluss durch Coomassie-Färbung des Gels bereits eine schwache Expressionsbande in der berechneten Größe von 28 kDa nachgewiesen werden. Mit einer Western-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass sich auch eine geringe Menge des Fusionsproteins in der löslichen Fraktion befand. Ein Absenken der Temperatur auf 30 °C während der Kultivierung erhöhte sowohl die Gesamtmenge an produziertem C-His-KanN als auch den Anteil an löslichem C-His-KanN in allen verwendeten *E. coli*-Stämmen (siehe Abb. 3.5 (B) Spur 2 und 4 – 7).

Tabelle -3.4- Zusammenfassung der Expressionsergebnisse für *kanN*.

Vektor	Stämme	Medien	Temp.	Induktorkonz.	Protein
pET11/ <i>kanN</i> (pET11aP)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Bet./Sorb.	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,5 mM; 1 mM (IPTG)	-
pET16/ <i>kanN</i> (pET16b)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Bet./Sorb.	25 °C; 30 °C; 37 °C	0,5 mM; 1 mM (IPTG)	-
pJOE/ <i>kanN</i> (pJOE2775)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5 α	LB; LB- Bet./Sorb.	30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) L-Rhamnose	+ (W.B.); Lös.
pJOE02/ <i>kanN</i> (pJOE2702)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5 α	LB	30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) L-Rhamnose	-
p201PW/ <i>kanN</i> (pUWL201PW)	<i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	-

Die rekombinanten Stämme wurden alle, wie unter 2.21 beschrieben, bei den hier aufgeführten Temperaturen in den angegebenen Medien mit den jeweiligen Induktorkonzentrationen behandelt. Abkürzungen siehe Tab. 3.1.

3.3.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität von NeoD & KanN

Sowohl NeoD als auch KanN sind als potentielle Deacetylasen annotiert worden (vergl. PIEPERSBERG *et al.*, 2007). Aus den postulierten Biosynthesewegen (vergl. 1.3.1) ergab sich 2'-*N*-Acetylparomamin als mögliches Substrat. Dieses war allerdings kommerziell nicht verfügbar. Für die Ansätze zur Überprüfung der Deacetylaseaktivität der Enzyme wurde deshalb 2'-*N*-Acetylparomamin, welches mithilfe von NeoM oder KanM1 erzeugt werden konnte (siehe 3.2), benutzt. Die Enzymtests wurden, wie unter 2.28.2 beschrieben, durchgeführt und mithilfe der DC analysiert. Es kamen Gesamtzellextrakte und lösliche

Fractionen von folgenden Stämmen zum Einsatz: *E. coli* JM109 (DE3)-pET16b/*neoD*, *E. coli* BL21 (DE3)-pET11/*neoD*, *E. coli* BL21 (DE3)-pJOE/*neoD* und *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/*kanN*. Die Stämme waren, wie unter 3.3.1 beschrieben, kultiviert worden.

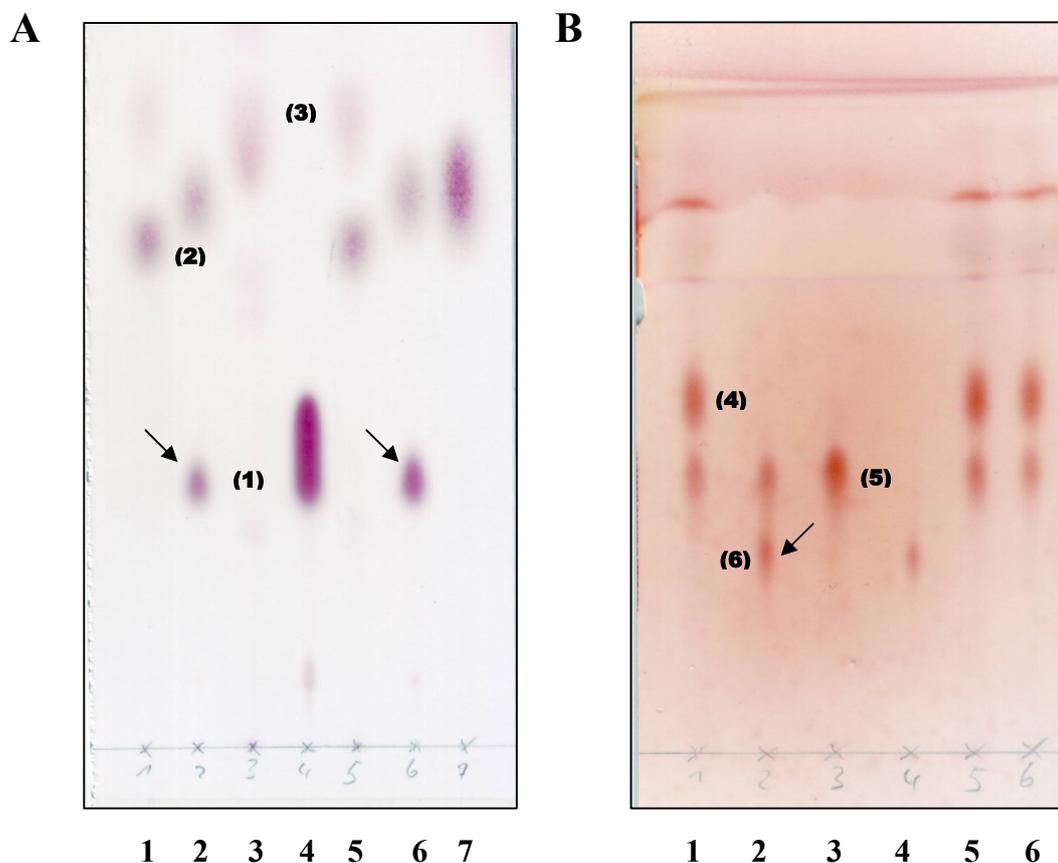


Abbildung -3.7- Die Deacetylaseaktivitäten von KanN und NeoD. Chromatogramm (A): NeoD- und KanN-katalysierte Deacetylierung von 2'-N-Acetylparomamin zu Paromamin. In die Reaktionsansätze wurden die löslichen Fraktionen von *E. coli* JM109 (DE3) eingesetzt, die folgende Plasmide enthielten: pET16b (Kontrolle, Spur 1), pET16b/*neoD* (Spur 2), pJOE2775 (Kontrolle, Spur 5) und pJOE2775/*kanN* (Spur 6). Die Stämme wurden bei 30 °C in LB-Medium kultiviert, mit 1 mM IPTG bzw. 0,2 % (w/v) L-Rhamnose induziert und nach 2 h bzw. 6 h geerntet. Die Tests wurden 6 h bei 37 °C inkubiert. Als Standards wurden 2'-N-Acetylparomamin ((3), Spur 3, vergl. 2.28.3), Paromamin ((1), Spur 4) und 2-DOS ((2), Spur 7) eingesetzt. Das Chromatogramm wurde mit Fließmittel II bei RT entwickelt und die AGAs mit Ninhydrin visualisiert (vergl. 2.29). Die Pfeile zeigen die Bildung von Paromamin. Chromatogramm (B): NeoD-katalysierte Deacetylierung von 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C, (4), zu 6'''-Hydroxy-NEO C, (6). In die Reaktionsansätze wurden die löslichen Fraktionen von *E. coli* JM109 (DE3) eingesetzt, die folgende Plasmide enthielten: pET16b (Kontrolle, Spur 1), pET16b/*neoD* (Spur 2), pJOE2775 (Kontrolle, Spur 5) und pJOE2775/*kanN* (Spur 6). Die Stämme wurden wie bei (A) beschrieben kultiviert. Die Tests wurden 12 h bei 37 °C inkubiert. Als Standards wurden RIB ((5), Spur 3) und NEO (Spur 4) eingesetzt. Das Chromatogramm wurde mit Fließmittel I bei RT entwickelt und die AGAs mit Ninhydrin visualisiert (vergl. 2.29). Der Pfeil kennzeichnet die Bildung von 6'''-Hydroxy-NEO C.

Es war eine deutliche Bildung von Paromamin, katalysiert durch NeoD oder KanN, zu beobachten (siehe Abb. 3.7 (A) Spuren 2 + 6). Das eingesetzte 2'-N-Acetylparomamin wurde vollständig zu Paromamin umgesetzt. Paromamin diente als Standard (Abb. 3.7 (A) Spur 4) und zeigte auf der DC einen identischen R_F -Wert wie das deacetylierte

Produkt, welches in den Enzymtests entstanden war. Die Extrakte aus den Kontrollstämmen katalysierten keine entsprechenden Reaktionen (Abb. 3.7 (A) Spur 1 + 5). Das in den Tests noch vorhandene 2-DOS schien die Reaktion nicht negativ zu beeinflussen. Natives NeoD, C- und N-His-NeoD waren alle gleichermaßen aktiv.

Da in der Biosynthese von NEO zwei Deacetylierungsschritte vorkommen (vergl. 1.3.1, 1.3.2 und Abb. 3.6), aber nur eine Deacetylase im *neo*-Cluster kodiert ist, könnte NeoD möglicherweise bifunktional sein. Um diesen Sachverhalt und eine mögliche Bifunktionalität von KanN zu klären, sollte auch die Deacetylierung von 2''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C untersucht werden. Dazu wurde 2''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C mit NeoF (siehe 3.4) hergestellt, in Enzymtests mit löslichen Fraktionen von *E. coli* JM109 (DE3)-pET16b/*neoD* (NeoD) und *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/*kanN* (KanN), wie unter 2.28.2 beschrieben, eingesetzt und die Tests mittels DC analysiert. In der Tat war die Bildung eines neuen Produktes nach Inkubation mit NeoD zu beobachten (siehe Abb. 3.7 (B) Spur 2), nicht aber bei Verwendung des Rohextraktes von *E. coli* JM109 (DE3)-pET16b (Negativkontrolle; Abb. 3.7 (B) Spur 1) oder den KanN-haltigen Zellextrakten (Abb. 3.7 (B) Spur 5 + 6). Da reines Hydroxy-NEO C (vergl. Abb. 3.6) als Vergleichssubstanz nicht erhältlich war, wurde NEO B (vergl. Abb. 1.9) als Standardsubstanz aufgetragen (Abb. 3.7 (B) Spur 4). Die R_F -Werte von NEO B und des gebildeten Produktes aus der NeoD katalysierten Reaktion waren in etwa identisch. Daraus wurde geschlossen, dass NeoD tatsächlich bifunktional ist, während das homologe KanN nur die Deacetylierung von 2'-*N*-Acetylparomamin zu Paromamin katalysiert (siehe 4.4).

Die heterolog überproduzierten Proteine wurden ebenfalls auf eine mögliche Nukleotidyltransferaseaktivität hin untersucht. Dazu wurde Glucosamin-1-phosphat mit verschiedenen dNTPs und den zellfreien Überständen von *E. coli* JM109 (DE3)-pET16b/*neoD* oder *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/*kanN* (beide wie unter 3.2.1 kultiviert), wie unter 2.28.2 beschrieben, bei 37 °C inkubiert. Die Enzymtests wurden mithilfe der HPLC spektralphotometrisch auf die Bildung von NDP-aktiviertem Glucosamin untersucht. Ein Unterschied zwischen den Extrakten, die lösliches N-His-NeoD oder C-His-KanN enthielten, und entsprechend behandelten Negativkontrollen war nicht feststellbar. Auch war eine für NDP-aktivierte Zucker charakteristische Doppelbande bei 205 – 210 nm und 260 – 270 nm (U. WEHMEIER, pers. Mitteilung) nicht nachweisbar. Ebenfalls war eine Deacetylaseaktivität der Enzyme bei Zugabe von UDP-GlcNAc wie bei KUDO *et al.*, 2005a, beschrieben nicht zu beobachten. In den HPLC-

Chromatogrammen war lediglich das unveränderte UDP-GlcNAc zu beobachten. Eine Auswertung der Fläche der Peaks ergab nach Kalibrierung des Systems, dass im Rahmen des Fehlers kein UDP-GlcNAc verbraucht wurde.

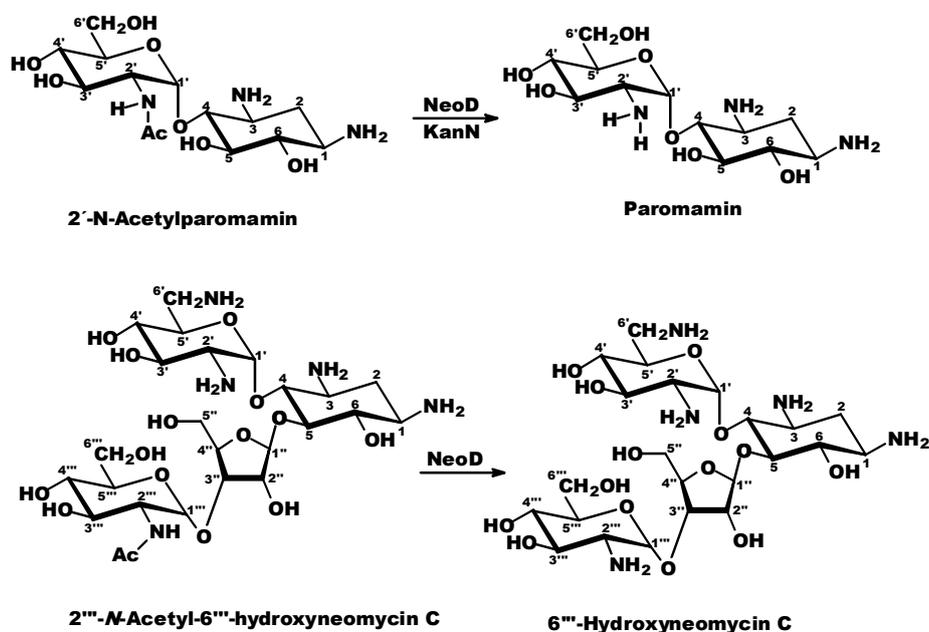


Abbildung -3.6- Postulierte und beobachtete Deacetylasereaktionen von NeoD und KanN.

3.4 Die Glycosyltransferase NeoF

Die Glycosyltransferase NeoF katalysiert in der NEO-Biosynthese vermutlich die Addition einer weiteren Zuckereinheit an das Pseudotrisaccharid RIB (vergl. Abb. 1.9). Welcher aktivierte Zucker das natürliche Donorsubstrat darstellt, war nicht bekannt. Als logisch erschien jedoch wiederum UDP-GlcNAc. Dieser Sachverhalt sollte geklärt werden

3.4.1 Überproduktion von NeoF

Der Leserahmen *neoF* wurde mithilfe der PCR-Technik aus dem Cosmid SfrF04 mit den spezifischen Primern „neoF Start“, „neoF Stopp (pJOE)“ oder „neoF Stopp (pET)“ (Anlagerungstemperaturen: 54,7 °C, Schritt 3, und 67,5 °C, Schritt 6, vergl. Tab. 2.6, für

beide Primerkombinationen) amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in pUCPU20 ligiert (vergl. Tab. 2.3), nach Sequenzierung (2.19) in Expressionsvektoren (vergl. Tab. 2.3) gebracht und diese in die unter 2.21 beschriebenen Expressionsstämme transformiert. Durch die Zugabe von IPTG (pET-Vektoren) bzw. L-Rhamnose (pJOE-Vektoren) zum Kulturmedium wurde die Produktion von NeoF in den Expressionsstämmen induziert. Die Überproduktion und die Löslichkeit des Proteins wurde durch Auftragung der Gesamtzellextrakte bzw. zellfreien Rohextrakte und Sedimente auf ein Polyacrylamidgel und anschließende SDS-PAGE untersucht. Gebildete C- oder N-His-Fusionsproteine wurden zusätzlich noch mit Western-Blot-Analysen nachgewiesen. Dabei wurden Proteinbanden in den Größen von 39,3 kDa (natives NeoF) bzw. 40,3 kDa (C-His-NeoF) bzw. 41,8 kDa (N-His-NeoF) erwartet. In allen Expressionsansätzen war keine NeoF-Überproduktion in den Gesamtzellextrakten, den löslichen Fraktionen oder im Sediment nach Zellaufschluss der *E. coli*-Stämme oder *S. lividans* TK64 feststellbar (vergl. Tab 3.5). Dagegen konnte in den löslichen Fraktionen und in den Sedimenten von Zellaufschlüssen von *S. lividans* TK23-p201PW/*neoF*, der 48 h bei 28 °C in TSB-Medium kultiviert worden war, das native NeoF bereits durch Coomassie-Färbung des PAA-Gels nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.5 und Abb. 3.8). Diese Proteinextrakte wurden für die folgenden Aktivitätstests (siehe 3.4.2) benutzt.

Tabelle -3.5- Zusammenfassung der Expressionsergebnisse für *neoF*.

Vektor	Stämme	Medien	Temp.	Induktorkonz.	Protein
pET11/ <i>neoF</i> (pET11aP)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB	30 °C; 37 °C	1 mM IPTG	-
pET16/ <i>neoF</i> (pET16b)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB	30 °C; 37 °C	1 mM IPTG	-
pT7-7/ <i>neoF</i> (pT7-7)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB	30 °C; 37 °C	1 mM IPTG	-
pJOE/ <i>neoF</i> (pJOE2775)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5 α	LB	30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) L-Rhamnose	-
p201PW/ <i>neoF</i> (pUWL201PW)	<i>S. lividans</i> TK23; <i>S. lividans</i> TK64	TSB; YEME 10,3 %	28 °C	konst.	+ ; Lös.

Die rekombinanten Stämme wurden alle, wie unter 2.21 beschrieben, bei den hier aufgeführten Temperaturen in den angegebenen Medien mit den jeweiligen Induktorkonzentrationen behandelt. Abkürzungen siehe Tab. 3.1.

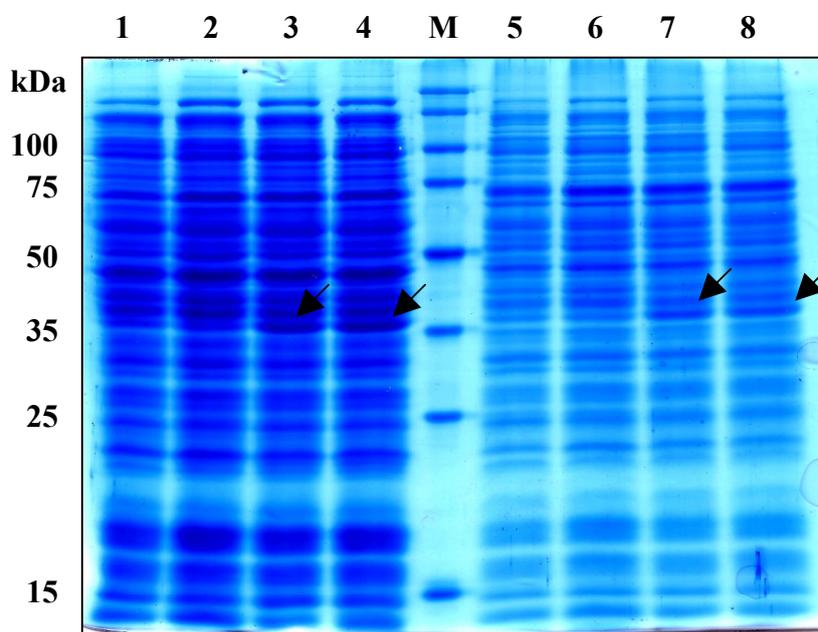


Abbildung -3.8- Heterologe Überproduktion von NeoF in *S. lividans* TK23. *S. lividans* TK23-p201PW/*neoF* und *S. lividans* TK23-pUWL201PW (Kontrolle) wurden bei 28 °C in TSB kultiviert und nach 48 h geerntet. SDS-PAGE Analyse der löslichen Fraktionen (Spur 1 – 4) und der Sedimente (Spur 5 – 8) der Kontrolle (Spur 1 + 2; 5 + 6) und von *S. lividans* TK23-p201PW/*neoF* (Spur 3 + 4; 7 + 8). Es wurden ca. 35 μ g Protein je Spur aufgetragen. Das Laemmli-Gel (10 %iges Trenngel) wurde mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die Pfeile markieren heterolog überproduziertes NeoF. M = Proteinmarker; die Größen der Banden des Markers sind in kDa links angegeben.

3.4.2 Nachweis der Glycosyltransferaseaktivität von NeoF

Um die Funktion von NeoF zu überprüfen, wurden NeoF-Proteinextrakte von *S. lividans* TK23-p201PW/*neoF* in *in vitro* Enzymansätzen, wie unter 2.28.1 beschrieben, eingesetzt. Als Akzeptorsubstrat diente RIB und 2-DOS als Kontrolle. Als Zuckerdonor wurde UDP-GlcNAc und wiederum TDP-Glc und UDP-Glc zur Kontrolle verwendet. Die lösliche Fraktion des Zellaufschlusses von *S. lividans* TK23-pUWL201PW diente als Enzymkontrolle. Beide Stämme waren 48 h lang in TSB bei 28 °C kultiviert worden. Die Tests wurden bis zu 6 h bei 37 °C inkubiert (vergl. 2.28.1). Für die Analyse wurden je 2 µl auf eine DC-Platte aufgetragen und nach Entwicklung des Chromatogramms in Fließmittel II (vergl. 2.29) mit Ninhydrin visualisiert (siehe Abb. 3.9).

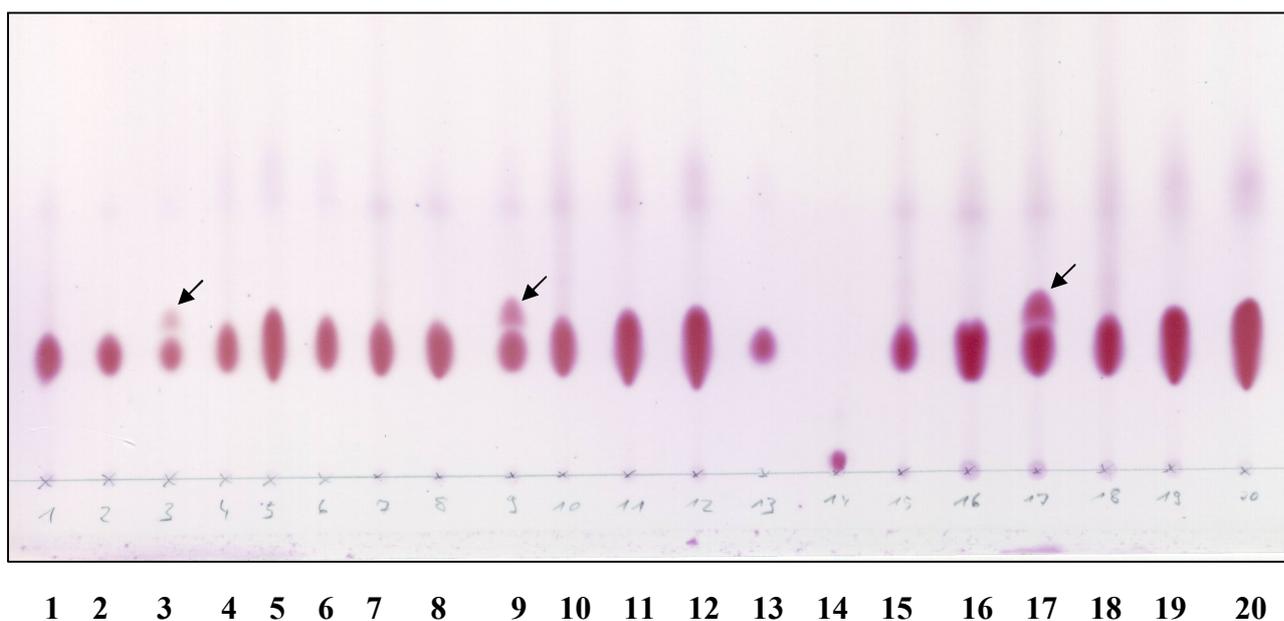


Abbildung -3.9- Bildung von 2''-N-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C durch die Glycosyltransferase NeoF. Das Chromatogramm zeigt die Abhängigkeit der Reaktion von verschiedenen aktivierten Donorzuckern zu verschiedenen Zeiten. In die Reaktion wurden lösliche Fraktionen einer 48 h TSB-Kultur von *S. lividans* TK23-p201PW/*neoF* (Spur 1 – 3; 7 – 9; 15 – 17) und *S. lividans* TK23-pUWL201PW (Kontrolle, Spur 4 – 6; 10 – 12; 18 – 20) eingesetzt. Die Tests wurden für 1 h (Spur 1 – 6), 2 h (Spur 7 – 12) und 6 h (Spur 15 – 20) bei 37 °C inkubiert. Als Donorzucker wurden UDP-Glc (Spur 1, 4, 7, 10, 15, 18), TDP-Glc (Spur 2, 5, 8, 11, 16, 19) und UDP-GlcNAc (Spur 3, 6, 9, 12, 17, 20) verwendet. Als Standards wurden RIB (Spur 13) und NEO B (Spur 14) eingesetzt. Das Chromatogramm wurde mit Fließmittel II bei RT entwickelt und die AGAs mit Ninhydrin visualisiert (vergl. 2.29). Pfeile zeigen gebildetes 2''-N-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C an.

Die Enzymtests zeigten eindeutig, dass NeoF nur die Reaktion von RIB mit UDP-GlcNAc zu 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C katalysierte. Im Verlauf von 6 h Inkubation war eine deutliche Zunahme des Produktes zu beobachten (siehe Pfeile, Spuren 3, 9 und 17 in Abb. 3.9). Ein vollständiger Umsatz der Substrate wurde trotz Variation der Testbedingungen (Inkubation bei 30 °C, geänderte Substratverhältnisse, verschiedene Puffer) nicht erreicht. Auch durch erneute Zugabe von NeoF-Extrakt nach 6 h Inkubation und erneute Inkubation bei 37 °C konnte das Reaktionsgleichgewicht nicht weiter auf die Seite des Produktes verschoben werden. In den Enzymtests konnte wie erwartet weder mit UDP-Glc noch TDP-Glc ein Umsatz beobachtet werden (siehe Abb. 3.9, Spuren 1, 7 und 13, bzw. 2, 8 und 14). Ebenso war in den Kontrollansätzen, die 2-DOS als Akzeptorsubstrat enthielten, keine Bildung eines Produktes zu beobachten.

Eine Isolierung des gebildeten 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C gelang in kleinen Mengen durch eine präparative DC und anschließende Elution mit verdünntem Ammoniakwasser. Für eine massenspektrometrische oder NMR-spektroskopische Untersuchung reichten diese Mengen allerdings nicht aus. Um festzustellen, ob es sich bei dem Produkt wirklich um ein AGA handelte, wurde die Substanz auf das Vorhandensein von zwei charakteristischen Aminogruppen am C-2'- und am C-3-Kohlenstoff (vergl. Abb. 1.2 und Abb. 1.9) hin getestet. Es ist möglich, mithilfe von Resistenzenzymen AGAs regioselektiv zu acetylieren, zu phosphorylieren oder zu nukleotidylieren (vergl. 1.5 und Abb. 1.11). Tatsächlich gelang es mit den heterolog überproduzierten *N*-Acetyltransferasen (vergl. 2.28.3) AAC(3) (aus *Klebsiella pneumoniae*) und AAC(2') (aus *S. kasugaensis*), das Produkt, wie unter 2.28.3 beschrieben, in Gegenwart von Acetyl-CoA zu acetylieren. In Abb. 3.10 sieht man am veränderten Laufverhalten, dass sowohl das nicht umgesetzte RIB (A + B Spur 1, Substanz **(5)**), als auch das durch NeoF gebildete 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C (A + B Spur 1, Substanz **(4)**) durch beide *N*-Acetyltransferasen acetyliert werden können (jeweils in der Spur 2; Pfeil zeigt acetyliertes 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C an). Das bedeutet, dass es sich bei dem aus der NeoF-Reaktion erhaltenen Produkt um ein AGA handeln muss, da die charakteristischen Aminogruppen sowohl bei RIB als auch bei dem Produkt nachzuweisen waren. Reines RIB (A: Spur 7; B: Spur 6, **(5)**) wurde ebenfalls mit beiden *N*-Acetyltransferasen unter gleichen Bedingungen umgesetzt (Abb. 3.10, A: Spur 6; B: Spur 7, **(6)**). Da 6'''-Hydroxy-NEO C als Standard nicht zur Verfügung stand, wurde das strukturell analoge NEO B (vergl. Abb. 1.9) acetyliert und der R_F -Wert mit dem des acetylierten 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C verglichen. NEO B konnte einzeln sowohl von AAC(3) als auch von

AAC(2') acetyliert werden. Eine weitere Acetylierung eines zuvor bereits alternativ acetylierten NEO B fand durch keines der beiden Enzyme statt.

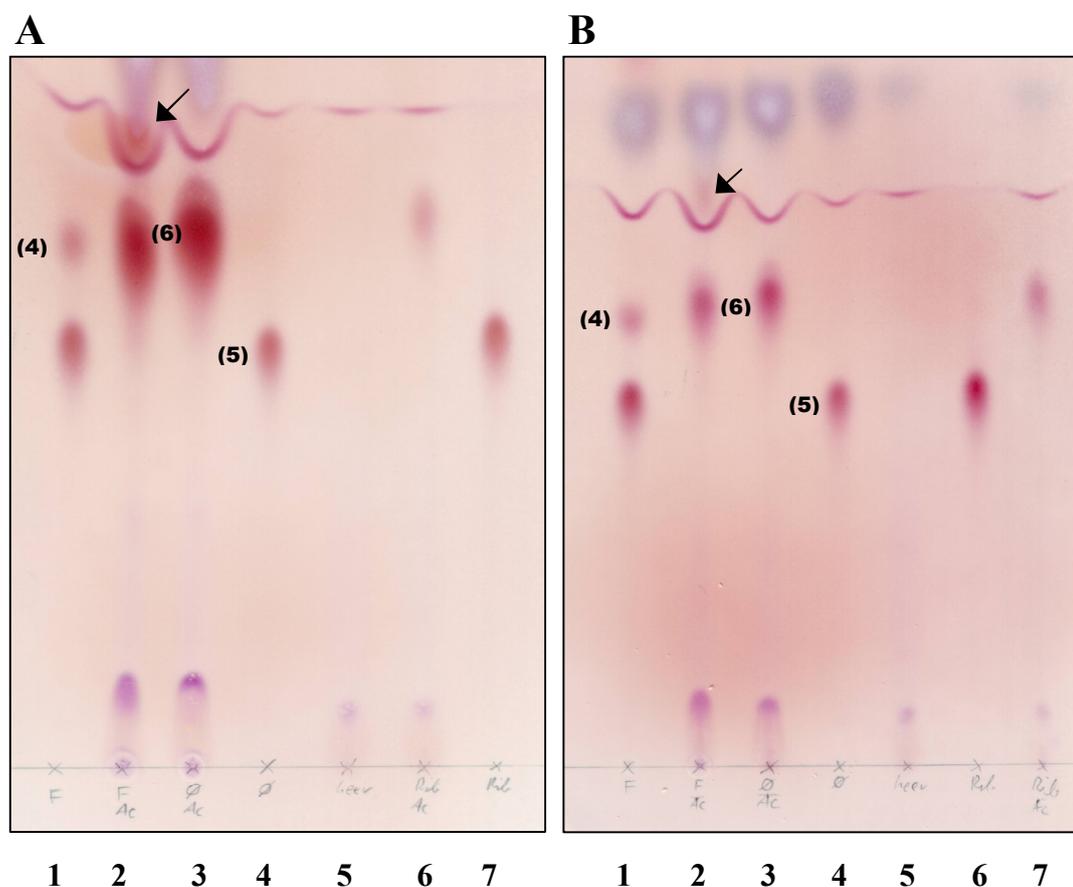


Abbildung -3.10- Acetylierung von 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C mit AAC(3) und AAC(2'). Die Acetylierungen wurden, wie unter 2.28.3 beschrieben, mit den NeoF-Tests (vergl. 2.28.1) und deren Kontrollen als Substrate durchgeführt. In Chromatogramm (A) wurden folgende Tests aufgetragen: (1) NeoF-Test; (2) NeoF-Test + AAC(3); (3) Negativkontrolle des NeoF-Tests + AAC(3); (4) Negativkontrolle des NeoF-Tests; (5) zellfreier Rohextrakt *E. coli* DH5 α /pOJ436; (6) RIB + AAC(3); (7) RIB (5). In Chromatogramm (B) wurden die analogen Tests mit AAC(2') aufgetragen. Die Reihenfolge 1 – 5 ist wie in (A), (6) RIB (5); (7) RIB + AAC(2'). Alle Tests wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Es wurden 2 μ l (NeoF-Tests) bzw. 4 μ l (Acetylierungstests) auf die DC aufgebracht. Beide Chromatogramme wurden mit Fließmittel I bei RT entwickelt und die AGAs mit Ninhydrin visualisiert (vergl. 2.29). Pfeile zeigen doppelt acetyliertes 6'''-Hydroxy-NEO C an. (4) = 2'''-N-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C; (6) = acetyliertes RIB.

3.5 Die Glycosyltransferase KanM2

Für die KAN-Biosynthese ist eine zweite, KanM1-verwandte Glycosyltransferase, KanM2 (388 Aminosäuren), charakteristisch. Ein homologes Protein wird in den ähnlichen Clustern für TOB (TobM2, 75 % Identität zu KanM2) und GEN (GenM2, 58 % Identität

zu KanM2) kodiert. Diese drei AGAs werden wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeiten wahrscheinlich auch durch vergleichbare Biosynthesewege synthetisiert. In allen drei Biosynthesen katalysieren die „M2“-Glycosyltransferasen vermutlich die Addition einer zweiten, neutralen Zuckereinheit an das Paromamin (vergl. 1.3.3).

3.5.1 Heterologe Überexpression von *kanM2*

Der offene Leserahmen *kanM2* wurde mit den Primern „KanM2 Start“, „KanM2 Stopp (JOE)“ oder „KanM2 Stopp (pET)“ aus dem Cosmid SkaJ19 (Anlagerungstemperaturen: 55 °C, Schritt 3, und 64,4 °C, Schritt 6, für beide Primerkombinationen, vergl. Tab. 2.4) amplifiziert. Die gereinigten PCR-Produkte wurden wie unter 3.1 und in Tab. 2.3 beschrieben in Expressionsvektoren ligiert. Alle Expressionskonstrukte wurden in die unter 2.21 beschriebenen Expressionsstämme transformiert. Trotz Variation der Expressionsbedingungen war ein Nachweis der erwarteten Proteine (43,3 kDa natives KanM2 bzw. 45,8 kDa N-His-KanM2) weder durch Coomassie-Färbung, noch durch Western-Blot-Analyse in einem der verwendeten Systeme möglich (vergl. Tab. 3.6).

Es wurde daher auch versucht, das zu KanM2 homologe TobM2-Protein unter identischen Bedingungen heterolog zu produzieren. Der ORF *tobM2* wurde dazu aus dem Cosmid SteK17 mit den Primern „tobM2 Start“, „tobM2 Stopp“ oder „tobM2 Frame“ (Anlagerungstemperaturen: 55 °C, Schritt 3, und 69 °C, Schritt 6, für beide Primerkombinationen, vergl. Tab. 2.6) amplifiziert. Nach Sequenzierung wurde *tobM2* in die in Tab. 2.3 genannten Expressionsvektoren ligiert. Mithilfe des Konstruktes p201PW/*tobM2*His sollte TobM2 zusätzlich als C-His-Protein in Streptomyceten überproduziert werden (vergl. Tab. 3.6).

In den Polyacrylamidgelen konnte in allen Überexpressionsansätzen mit *tobM2* weder in *E. coli* noch in *S. lividans* bei Verwendung der pET-Vektoren und pUWL201PW eine zusätzliche Proteinbande von berechneten 46,1 kDa (natives TobM2) bzw. 48,6 kDa (N-His-TobM2) beobachtet werden. Auch eine Western-Blot-Analyse zum Nachweis der His-Tag-Proteine der Gesamtzellextrakte aller *E. coli*-Stämme war negativ.

In den Gesamtzellextrakten von *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/*tobM2*, *E. coli* BL21 (DE3)-pJOE/*tobM2*, *E. coli* Rosetta (DE3)-pJOE/*tobM2* und *E. coli* DH5 α -pJOE/*tobM2* wurde bei Induktion mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose nach 3 h bei 37 °C eine zusätzliche Proteinbande von ca. 46 kDa (berechnete Größe von C-His-TobM2: 47,1 kDa) nach Coomassie-Färbung des PAA-Gels nachgewiesen, die in der Western-Blot-Analyse

allerdings kein Signal erzeugte. Auch die Reinigung des Fusionsproteins mithilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.22) gelang nicht. Eine deutliche Expressionsbande in der erwarteten Größe von C-His-TobM2 konnte auch bei der Analyse der Gesamtzellextrakte und zellfreien Rohextrakte von *S. lividans* TK64-p201PW/*tobM2*His, der bei 28 °C in TSB mehrere Tage kultiviert worden war, im PAA-Gel beobachtet werden. Diese konnte in der anschließenden Western-Blot-Analyse dieser Proteinextrakte ebenfalls nicht bestätigt werden; eine Reinigung durch Affinitätschromatographie (siehe 2.22) gelang ebenfalls nicht. Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf einen vorzeitigen Transkriptions- oder Translationsabbruch zurück zu führen war, wurden pJOE/*tobM2* und p201PW/*tobM2*His durch Restriktionsanalyse und erneute Sequenzierung von *tobM2* überprüft. Da das Gen keine Mutationen aufwies, die zu einer Verkürzung des Proteins hätten führen können (z.B. *nonsense-mutation*), blieb unklar warum der His-Tag nicht nachgewiesen werden konnte (siehe 4.2.3). Trotzdem wurden die Gesamtzellextrakte bzw. der zellfreie Rohextrakt von *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/*tobM2* und BL21 (DE3)-pJOE/*tobM2* bzw. *S. lividans* TK64-p201PWHis/*tobM2* auf ihre Glycosyltransferaseaktivität getestet (siehe 3.5.2).

Tabelle -3.6- Zusammenfassung der Expressionsergebnisse für *kanM2* und *tobM2*.

Vektor	Stämme	Medien	Temp.	Induktorkonz.	Protein
pET11/ <i>kanM2</i> pET11/ <i>tobM2</i> (pET11aP)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Bet./Sorb.; MM	30 °C; 37 °C	0,5 mM ; 1 mM (IPTG)	-
pET16bP/ <i>kanM2</i> (pET16bP) pET16/ <i>tobM2</i> (pET16b)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB; LB- Bet./Sorb.; MM	30 °C; 37 °C	0,5 mM ; 1 mM (IPTG)	-
p2702/ <i>kanM2</i> (pJOE2702) pJOE/ <i>tobM2</i> (pJOE2775)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5a	LB; LB- Bet./Sorb.; MM	30 °C; 37 °C	0,24 % (w/v) (L-Rhamnose)	-
pT/ <i>kanM2</i> (pT7-7)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB	30 °C; 37 °C	1 mM (IPTG)	-
pSUT7/ <i>kanM2</i> (pSUT7)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB	30 °C; 37 °C	1 mM (IPTG)	-
p201PW/ <i>kanM2</i> p201PW/ <i>tobM2</i> p201/ <i>tobM2</i> His (pUWL201PW)	<i>S. lividans</i> TK23 <i>S. lividans</i> 1326	TSB; YEME 10,3 %	28 °C	konst.	-
p6021/ <i>kanM2</i> (pIJ6021)	<i>S. lividans</i> 1326	TSB	28 °C	10 µg/ml (Thio)	-
p4123/ <i>kanM2</i> (pIJ4123)	<i>S. lividans</i> 1326	TSB	28 °C	10 µg/ml (Thio)	-
pLoriTbla/ <i>kanM2</i> (pUWLoriTbla)	<i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	-

Die rekombinanten Stämme wurden alle, wie unter 2.21 beschrieben, bei den hier aufgeführten Temperaturen in den angegebenen Medien mit den jeweiligen Induktorkonzentrationen behandelt. Abkürzungen siehe Tab. 3.1.

3.5.2 Nachweis der Glycosyltransferaseaktivität von KanM2 & TobM2

Trotz der nicht nachweisbaren Überproduktion von KanM2, wurde in Analogie zu NeoM und KanM1 (siehe 3.2.2) versucht, die postulierte Aktivität durch *in vitro* Enzymtests mit Rohextrakten der Überexpressionsansätze mit *E. coli* und Streptomyceten (siehe 3.5.1 und Tab. 3.6) nachzuweisen. Aus der Biosynthesehypothese (siehe 1.3.3 und Abb. 1.10) war nicht ersichtlich, welcher Zucker den natürlichen Donor darstellt. Deshalb wurden die Tests, wie unter 2.28.1 beschrieben, mit TDP-Glc, UDP-Glc und UDP-GlcNAc angesetzt. Aus der Hypothese war zu vermuten, dass Paromamin der eigentliche Akzeptor ist, aber

2-DOS, Neamin und 2'-*N*-Acetylparomamin wurden ebenfalls als mögliche Akzeptoren verwendet. Das 2'-*N*-Acetylparomamin wurde durch Reaktion von 2-DOS mit UDP-GlcNAc und NeoM hergestellt (siehe 3.2.2). Trotz verschiedener Variationen der Testbedingungen (Temperatur, Substratverhältnisse, andere Puffer), war die Bildung eines neuen Produktes in keinem der Ansätze zu beobachten. Die Tests wurden mithilfe der DC analysiert (vergl. 2.29).

Als weiterer Versuch, die postulierte Aktivität von KanM2 / TobM2 aufzuzeigen, wurde versucht die Rückreaktion, welche bei verschiedenen Glycosyltransferasen bereits beschrieben worden war (siehe 1.4), durch die Inkubation von KAN und TOB mit KanM2- bzw. TobM2-haltigen Proteinextrakten und dNDPs (dADP, dCDP, dGDP, dTDP, siehe 2.28.1) und die Bildung von NDP-aktiviertem Kanosamin (3-Amino-D-glucose) nachzuweisen. Unter den gewählten Bedingungen (siehe 2.28.1) konnte nach Trennung der Tests mithilfe der DC auch mit verschiedenen Fliessmitteln und Detektionsreagenzien (vergl. 2.29) keine Bildung eines neuen Produktes beobachtet werden.

3.6 Die Glycosyltransferase HygF

Das Protein HygF ist eine putative 2-DOS : Glycosyltransferase. Die Ähnlichkeit zu den 2-DOS : GlcNAc-Transferasen NeoM und KanM1 (siehe 3.2) ist gering (< 15 % identische Aminosäuren). Aus der Biosynthesehypothese (vergl. 1.2.3) wurde geschlossen, dass sie vermutlich einen anderen aktivierten Zucker (UDP-Gal) als Substrat erkennt.

3.6.1 Heterologe Überproduktion von HygF

Der ORF *hygF* wurde aus dem Cosmid 2720-2G17 mit den Primern „hygF Start“, „hygF Stopp“ oder „hygF Stopp Del“ (Anlagerungstemperaturen: 54 °C, Schritt 3, und 63 °C, Schritt 6; mit Stopp, bzw. 67,9 °C, Schritt 6; ohne Stopp, vergl. Tab. 2.6) amplifiziert. Abweichend vom allgemeinen Klonierungsschema (siehe 3.1) wurde das PCR-Produkt *hygF* mit Stopp nach Klenow-Behandlung (vergl. 2.15) in einen dephosphorylierten (vergl. 2.15), mit *Sma*I geschnittenen pUCPU21-Vektor ligiert. Die Sequenzierung zeigte, dass die *Bam*HI-Erkennungsstelle im Primer mit 2 Basenaustauschen offensichtlich defekt

war. Aufgrund des Vorhandenseins der *Bam*HI-Schnittstelle im Polylinker des Vektors, konnte das Fragment trotzdem in Expressionsvektoren ligiert werden. Die so erhaltenen Konstrukte wurden in die unter 2.21 beschriebenen Expressionsstämme transformiert und HygF heterolog überproduziert (vergl. Tab. 3.7).

Tabelle -3.7- Zusammenfassung der Expressionsergebnisse für *hygF*.

Vektor	Stämme	Medien	Temp.	Induktorkonz.	Protein
pT7-7/ <i>hygF</i> (pT7-7)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB	37 °C	1 mM (IPTG)	-
pET11/ <i>hygF</i> (pET11aP)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB	30 °C; 37 °C	1 mM (IPTG)	-
pET16/ <i>hygF</i> (pET16b)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	LB	30 °C; 37 °C	1 mM (IPTG)	+; Lös.
pJOE/ <i>hygF</i> (pJOE2775)	<i>E. coli</i> JM109 (DE3); <i>E. coli</i> JR (DE3); <i>E. coli</i> BL21 (DE3); <i>E. coli</i> Rosetta (DE3); <i>E. coli</i> DH5 α	LB	30 °C; 37 °C	0,2 % (w/v) L-Rhamnose	+; Lös.
p201PW/ <i>hygF</i> (pUWL201PW)	<i>S. lividans</i> TK23; <i>S. lividans</i> TK64;	TSB; M65;	28 °C	konst.	-
pLoriTbla/ <i>hygF</i> (pUWLoriTbla)	<i>S. lividans</i> TK64	TSB	28 °C	konst.	-

Die rekombinanten Stämme wurden alle, wie unter 2.21 beschrieben, bei den hier aufgeführten Temperaturen in den angegebenen Medien mit den jeweiligen Induktorkonzentrationen behandelt. Abkürzungen siehe Tab. 3.1.

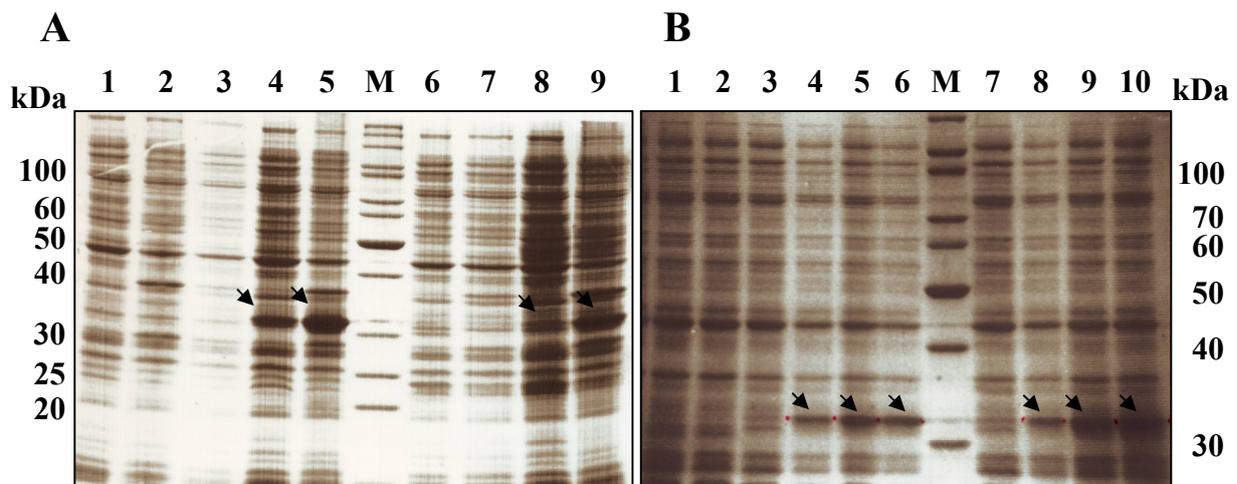


Abbildung -3.11- Heterologe Überproduktion der Glycosyltransferase HygF. Die Spuren enthalten Lysate von (A) *E. coli*: JM109 (DE3)-pJOE2775 (Kontrolle) lösliche Fraktion (1) & Sediment (2); JM109 (DE3)-pJOE/hygF Gesamtzellextrakt vor Induktion (3), lösliche Fraktion (4) & Sediment (5); BL21 (DE3)-pJOE2775 (Kontrolle) lösliche Fraktion (6) & Sediment (7); BL21 (DE3)-pJOE/hygF lösliche Fraktion (8) & Sediment (9). Die Stämme wurden mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose induziert und 6 h bei 30 °C in LB kultiviert. Es wurde ca. 35 – 40 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Die Konzentration des Trenngels (Laemmli) betrug 13 %. M = Proteinmarker; die Größen der Banden des Markers sind in kDa links angegeben. Die Pfeile zeigen die Banden überproduzierter Proteine an. (B) *E. coli*: JM109 (DE3)-pET16b (Kontrolle) Gesamtzellextrakt 2 h (1) & 4 h nach Induktion (2); JM109 (DE3)-pET16/hygF Gesamtzellextrakt vor (3), 1 h (4), 2 h (5) & 4 h nach Induktion (6); JR (DE3)-pET16/hygF Gesamtzellextrakt vor (7), 1 h (8), 2 h (9) & 4 h nach Induktion (10). Die Expression wurde mit 1mM IPTG induziert. Die Stämme wurden bei 30 °C in LB kultiviert. Die Gesamtproteinmenge betrug ca. 35 µg pro Spur. Bei dem Trenngel handelte es sich um ein 10%iges Laemmli-Gel. M = Proteinmarker; die Größen der Banden des Markers sind in kDa rechts angegeben. Die Pfeile zeigen die Banden überproduzierter Proteine an.

Es konnte jeweils eine zusätzliche Proteinbande im Vergleich zu den Kontrollstämmen in der gesuchten Größe von 31,8 kDa bzw. 33,3 kDa (C- bzw. N-His-HygF) in den löslichen Fraktionen der Zellaufschlüsse von *E. coli* JM109 (DE3)-pJOE/hygF (Abb. 3.11 (A) Spur 4) und BL21 (DE3)-pJOE/hygF (Abb. 3.11 (A) Spur 8), und ferner in den Gesamtzellextrakten von JM109 (DE3)-pET16/hygF (Abb. 3.11 (B) Spur 5) und JR (DE3)-pET16/hygF (Abb. 3.11 (B) Spur 9) nachgewiesen werden. Eine Überproduktion von nativem HygF (30,8 kDa) war weder in den Extrakten der rekombinanten *E. coli*- noch in denen der Streptomycesen-Stämme trotz verschiedener Expressionsbedingungen (siehe Tab. 3.7) zu beobachten. Da in N-His-HygF aber eine Erkennungsstelle für die Protease Faktor X_a zur Abspaltung des His-Tags vorhanden war (vergl. Tab. 2.2), sollte, wenn nötig, natives HygF auf diesem Wege generiert werden.

3.6.2 Erste Versuche zur Glycosyltransferaseaktivität von HygF

Die erhaltenen Proteinextrakte (siehe 3.6.1) wurden, wie unter 2.28.1 beschrieben, auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht. Da NDP-aktivierte D-Galactose kommerziell nicht erhältlich ist, wurden die vorhandenen NDP-Zucker UDP-Glc, TDP-Glc und UDP-GlcNAc als Donorsubstrate in die Reaktion eingesetzt. 2-DOS diente als Akzeptor. Ein Umsatz konnte nicht beobachtet werden. Auch der Einsatz von Rohextrakten von *S. lividans* TK23 und TK64, die die Plasmide p201PW/*hygF* oder pLoriTbla/*hygF* enthielten und mehrere Tage bei 28 °C in TSB-Medium oder M65-Medium kultiviert wurden, führte zu keinem nachweisbarem Umsatz. N-His-HygF zeigte nach Aufreinigung und Abspaltung des His-Tags ebenfalls keine Aktivität. Mangels des eigentlichen Donorsubstrates wurden diese Versuche nicht weiter geführt. Einige Rückschlüsse auf die postulierte Aktivität von HygF ließen sich dennoch ziehen (siehe 4.3).

3.7 Generierung und Charakterisierung von *knock-out*-Mutanten von *S. fradiae* und *S. kanamyceticus*

Die Charakterisierung mehrerer Biosyntheseschritte zur Produktion von NEO und KAN (Bildung und Deacetylierung von Paromamin, vergl. Abb. 1.8, Bildung von 6-O-Glucosylparomamin, vergl. Abb. 1.10) sollte in den Wildtypen *S. fradiae* und *S. kanamyceticus* durch gezielte Mutagenese der Gene *neoM*, *neoD* und *kanM2* untersucht werden. Diese Inaktivierung sollte durch Insertion einer Resistenzkassette mittels homologer Rekombination in die jeweiligen Leserahmen erreicht werden. Dazu wurden entsprechende Plasmide auf der Grundlage des Vektors pMAC-P (vergl. Tab. 2.2) konstruiert, die sich in den Stämmen nicht autonom replizieren konnten.

Vor der Konstruktion der Mutageneseplasmide wurden von *S. fradiae* DSM 40063 und *S. kanamyceticus* DSM 40500 Resistenzprofile gegen jeweils 50 mg Antibiotikum mittels Plattendiffusionsmethode (vergl. 2.31) ermittelt, um einen passenden Selektionsmarker für die Mutagenese auszuwählen. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle -3.8- Antibiotikaresistenzprofile von *S. fradiae* und *S. kanamyceticus*.

<i>S. fradiae</i> DSM 40063		<i>S. kanamyceticus</i> DSM 40500	
Resistent	Sensitiv	Resistent	Sensitiv
Ampicillin	Amikacin	Ampicillin	Amikacin
NEO	APR	KAN	APR
Phosphomycin	BTR	Phosphomycin	BTR
RIB	Chloramphenicol	RIB	Chloramphenicol
	Erythromycin	Rifampicin	Erythromycin
	GEN		GEN
	HYG B		HYG B
	KAN		Lincomycin
	Lincomycin		LIV A
	LIV A		NEO
	PAR		PAR
	Rifampicin		SPC
	SPC		STR
	STR		Tetracyclin
	Tetracyclin		Thiostrepton
	Thiostrepton		TOB
	TOB		

Die Resistenzprofile wurden wie unter 2.31 beschrieben angelegt.

APR wurde in beiden Fällen als Resistenzmarker für die Mutagenese ausgewählt, da es bei beiden Stämmen einen deutlichen Hemmhof verursachte und die APR-Resistenz einen erprobten Selektionsmarker für Streptomyceten darstellte. Die Resistenz wird in *E. coli* und *S. lividans* durch die Acetyltransferase AAC(3)IV aus *Klebsiella pneumoniae* vermittelt (BRÄU *et al.*, 1984). Das entsprechende Gen *aacC4* war bereits im Konstrukt pUC19/ΩC4 (vergl. Tab. 2.2; BLONDELET-ROUAULT *et al.*, 1997) vorhanden.

3.7.1 Konstruktion der Mutageneseplasmide

In den Sequenzen der Gene *neoM*, *neoD* und *kanM2* wurde nach passenden Schnittstellen für die Insertion der Resistenzkassette gesucht. Die Insertionsstelle sollte nach Möglichkeit in der Mitte des Gens liegen, so dass die DNA-Abschnitte oberhalb und unterhalb mindestens 250 Bp lang waren, um die Rekombination mit homologen Sequenzen im Chromosom so spezifisch wie möglich zumachen.

3.7.1.1 Das Plasmid pMACP/*neoMP*⁺ zur Inaktivierung von *neoM*

Zuerst wurde das Plasmid pPU21/*neoM*⁺, welches das Gen *neoM* mit Stopp enthielt (vergl. Tab. 2.3), präparativ mit *Bsa*I hydrolysiert (vergl. Abb. 3.12), wobei die Schnittstelle im Leserahmen +1 zum Startcodon von *neoM* lag. Da *neoM* in einem Operon liegt (vergl. Abb. 1.3) und die Verschiebung seines Leserahmens die Transkription nachfolgender Gene beeinflussen könnte (polare Effekte), wurde das *aacC4*-Fragment so gewählt, dass sowohl vom *neoM*-Startcodon, als auch vom *aacC4*-Startcodon aus ein vollständiger Leserahmen bis zum *neoM*-Stoppcodon entstand. Aus dem Plasmid pUC19/ Ω C4 wurde die *aacC4P*⁺-Kassette (*aacC4* mit nativem Promotor) mit den Primern „*aacC4* Start +Prom“ und „*aacC4* Stopp“ bei einer Anlagerungstemperatur von 50 °C amplifiziert. Aus der veröffentlichten *aacC4*- Sequenz (BRÄU *et al.*, 1984; BLONDELET-ROUAULT *et al.*, 1997) war die genaue Lage des nativen Promotors des *aacC4*-Gens war nicht ersichtlich, deshalb wurde der Startprimer 60 Bp oberhalb des Startcodons gelegt. Der Stoppprimer war so konstruiert, dass das natürliche Stoppcodon des *aacC4*-Gens zerstört wurde. Beide Primer enthielten die Erkennungssequenz für *Sma*I (vergl. Tab. 2.4). Das 900 Bp große PCR-Produkt *aacC4P*⁺ wurde mit *Sma*I hydrolysiert und die Fusion mit dem Plasmid pPU21/*neoM*⁺ ergab das Konstrukt pUCPU/*neoMP*⁺, wobei die Länge der flankierenden *neoM*-Genfragmente auf beiden Seiten der Kassette rund 600 Bp betrug, was für eine homologe Rekombination erfahrungsgemäß ausreicht. Die gewünschte Orientierung der Kassette in Leserichtung von *neoM* wurde mit einer *Nde*I / *Xho*I-Restriktionsanalyse überprüft. Bei korrekter Orientierung musste ein 1,3 kBp DNA-Fragment aus dieser Hydrolyse entstehen. Das erhaltene Konstrukt (2,2 kBp) wurde dann *Nde*I / *Bam*HI in einen entsprechend geschnittenen pMAC-P ligiert, was zum Mutageneseplasmid pMACP/*neoMP*⁺ führte (vergl. Abb. 3.12).

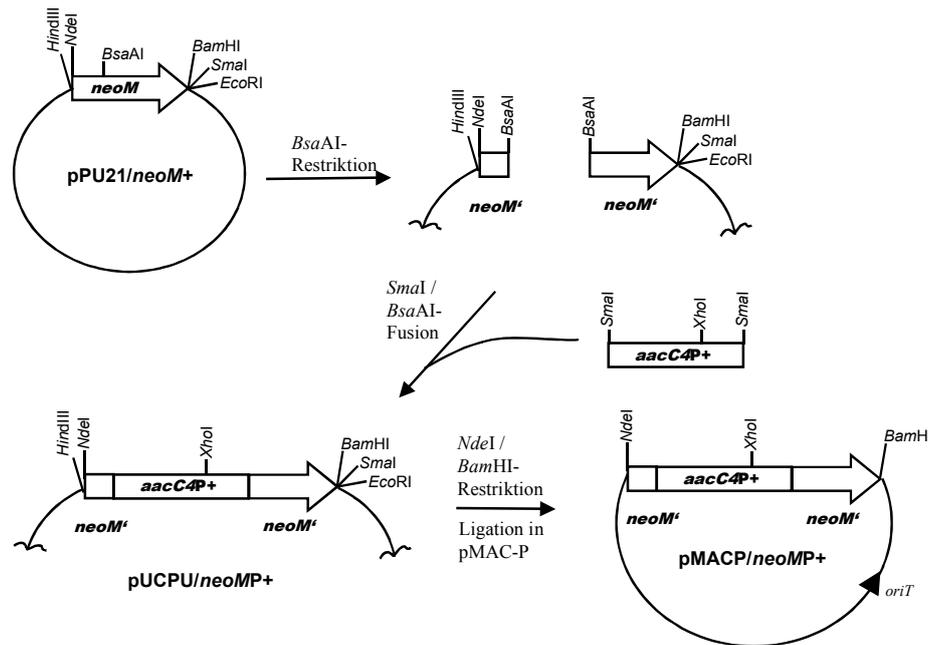


Abbildung -3.12- Konstruktion des Mutageneseplasmids pMACP/neoMP+ zur Erzeugung einer neoM-knock-out-Mutante. Wichtige Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind eingezeichnet (nicht maßstabsgetreu). Genfragmente sind durch ein Apostroph gekennzeichnet. Die genauen Größen der Fragmente sind in Tab. 2.3 angegeben. Die Orientierung der aacC4P+-Kassette wurde durch NdeI / XhoI-Restriktionsanalyse überprüft.

3.7.1.2 Das Plasmid pMACP/neoD Ω zur Inaktivierung von neoD

Für die Konstruktion des neoD-Mutageneseplasmides wurde das Plasmid pPU21/neoD+ (vergl. Tab. 2.3) mit *HincII* hydrolysiert, wobei ein 200 Bp-Fragment aus dem Gen deletiert wurde (siehe Abb. 3.13). Diese Deletion bewirkte eine Leserahmenverschiebung. Da aber aufgrund der Lage von *neoD* im Biosynthesecenter am Ende eines Operons (vergl. Abb. 1.3) keine polaren Effekte auf die Transkription nachfolgender Gene zu erwarten waren, wurde diese Leserahmenverschiebung nicht korrigiert. Die flankierenden DNA-Bereiche der Schnittstellen betragen 470 Bp am 3'- bzw. 250 Bp am 5'-Ende des Gens. Das Plasmid wurde mit dem *SmaI*-Fragment der Ω -Kassette (1,8 kBp) des Plasmids pUC19/ Ω C4 fusioniert, was zum Plasmid pUCPU/neoD Ω führte (siehe Abb. 3.13). In der verwendeten Ω -Kassette ist das *aacC4*-Gen unter der Kontrolle seines nativen Promotors und wird an beiden Enden von kurzen repetitiven Sequenzen (Ω -Sequenzen, PRENTKI & KRISCH, 1984) eingerahmt, die in allen Leserahmen Transkriptions- und Translationsstopps enthalten. Um die Orientierung der Ω -Kassette zum Translationsstartpunkt von *neoD* zu bestimmen, wurde das erhaltene Plasmid mit den Enzymen *NdeI*/*XhoI* restringiert, wobei ein 1,5 kBp-Fragment die bevorzugte

Orientierung in Leserichtung von *neoD* bedeutete. Das Mutageneseplasmid pMACP/*neoD*Ω entstand durch Fusion des *NdeI*/*SmaI*- geschnittenen *neoD*Ω-Fragmentes mit dem *NdeI* / *EcoRV*-behandelten Vektor pMAC-P (siehe Abb. 3.13).

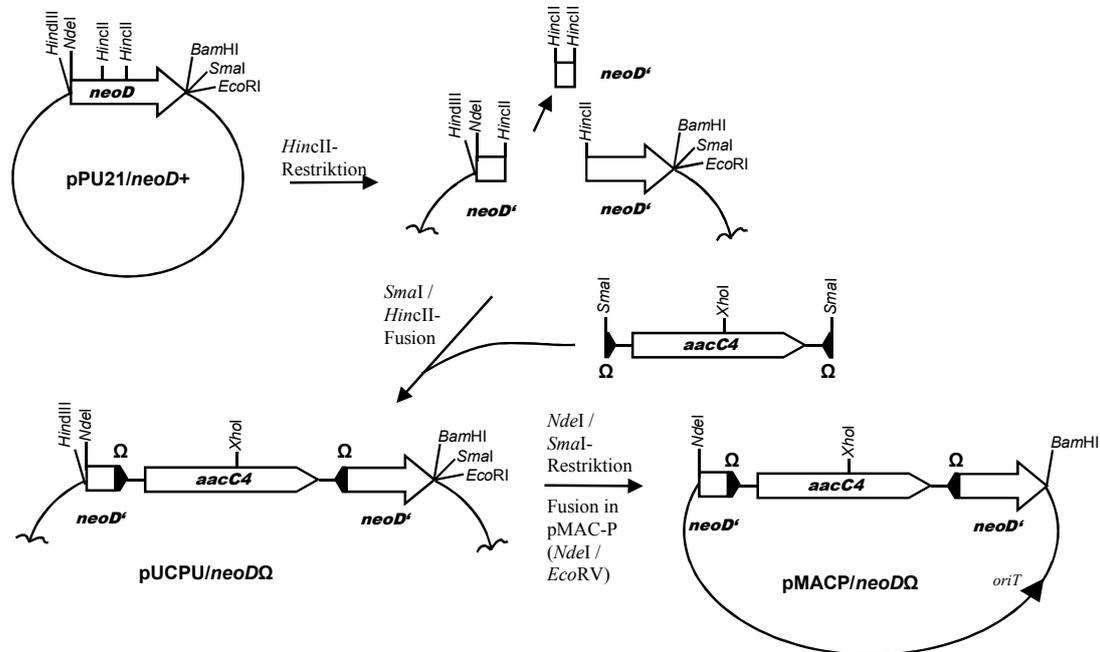


Abbildung -3.13- Konstruktion des Mutageneseplasmids pMACP/*neoD*Ω zur Erzeugung einer *neoD*-knock-out-Mutante. Wichtige Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind eingezeichnet (nicht maßstabsgetreu). Genfragmente sind durch ein Apostroph, Omegasequenzen durch ein Ω gekennzeichnet. Die genauen Größen der Fragmente sind in Tab. 2.3 angegeben. Die Orientierung der *aacC4*Ω-Kassette wurde durch eine *NdeI* / *XhoI*-Restriktionsanalyse überprüft.

3.7.1.3 Das Plasmid pMACP/*kanM2*P+ zur Inaktivierung von *kanM2*

Das Mutageneseplasmid pMACP/*kanM2*P+ wurde zur Ausschaltung des *kanM2*-Gens konstruiert (vergl. Abb. 3.14). Durch eine präparative *BsaAI*-Hydrolyse des Plasmids pPU21/*kanM2*+, der *kanM2* mit Stopp enthielt (siehe Tab. 2.3), waren die homologen Bereiche oberhalb und unterhalb der Schnittstelle mit 650 Bp am 3'- bzw. 550 Bp am 5'-Ende von *kanM2* ausreichend für eine homologe Rekombination. Jedoch war der Leserahmen des Gens unterhalb der *BsaAI*-Schnittstelle nach Fusion mit der Resistenzkassette um +1 verschoben, was polare Effekte auf nachfolgende Gene im Operon (vergl. Abb. 1.4) zur Folge gehabt hätte. Deshalb wurde die *SmaI*-hydrolysierte *aacC4*P+-Kassette verwendet, die auch schon für die Konstruktion von pMACP/*neoMP*+ benutzt worden war (siehe 3.7.1.1). Diese glich die unerwünschte

Leserahmenverschiebung aus. Das entstandene Konstrukt pUCPU/*kanM2P+* wurde durch eine *NdeI*/*XhoI*-Restriktionsanalyse auf die Orientierung der Kassette zum Startcodon von *kanM2* hin überprüft. Ein 1,3 kbp-Fragment deutete auf die gewünschte Orientierung in Leserichtung von *kanM2* hin. Das 2,1 kbp *kanM2P+*-Fragment wurde *NdeI*/*SmaI* aus pUCPU21 herausgeschnitten und in einen *NdeI*/*EcoRV*-geschnittenen Vektor pMAC-P fusioniert.

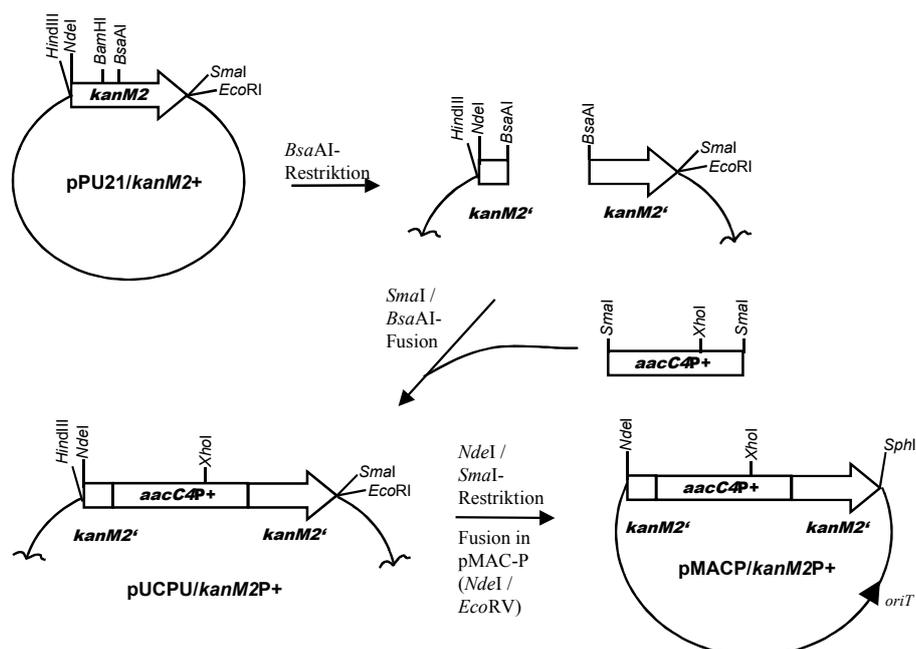


Abbildung -3.14- Konstruktion des Mutageneseplasmids pMACP/*kanM2P+* zur Erzeugung einer *kanM2*-knock-out-Mutante. Wichtige Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind eingezeichnet. Genfragmente sind durch ein Apostroph gekennzeichnet. Die genauen Größen der Fragmente sind in Tab. 2.3 angegeben. Die Orientierung der *aacC4P+*-Kassette wurde durch eine *NdeI*/*XhoI*-Restriktionsanalyse überprüft.

3.7.2 Intergenerische Konjugation

Mehrere Versuche, Plasmid-DNA auf dem Wege der Transformation von Protoplasten (vergl. 2.20) in die Produzentenstämme *S. fradiae* und *S. kanamyceticus* zu bekommen, führten nicht zu dem gewünschten Rekombinationsereignis. Zwar glichen die Zellen von

S. fradiae nach Behandlung mit Lysozym unter verschiedenen Bedingungen (Anzuchtmedien, Temperatur, Dauer der Lysozymbehandlung) bei mikroskopischer Betrachtung Protoplasten, aber sämtliche Versuche methylierte und nicht-methylierte replikative Plasmid-DNA (pUWL201PW) in diese zu transformieren, ergaben keine thioestreptonresistenten Transformanten. *S. kanamyceticus* ließ sich weder mit Lysozym, noch mit Mutanolysin oder Lysing-Enzymen von *Trichoderma* sp. protoplastieren. Die unter 3.7.1 konstruierten Mutageneseplasmide enthielten den *oriT* des konjugierbaren Vektors RP4, so dass sie, in Verbindung mit den entsprechenden *tra*- und *mob*-Genen, durch Konjugation in andere Bakterien übertragbar waren (vergl. GROHMANN *et al.*, 2003; Abb. 3.15). Als Donor wurden die *E. coli*-Stämme ET+ und ETZ (siehe Tab. 2.1 und dortige Referenzen) ausgewählt, da diese bereits je ein Plasmid enthalten, welches für die fehlenden Tra- und Mob-Funktionen codiert. Dazu sind beide Stämme nicht in der Lage, die Adenin- bzw. Cytosinreste in bestimmten Sequenzen ihrer DNA zu methylieren (Mutation der Dam- bzw. Dcm-Methylase und weiterer spezifischer Enzyme, vergl. MACNEIL *et al.*, 1992; MARINUS, 1996), weshalb eine eventuell in den Produzenten vorhandene Restriktionsbarriere umgangen wurde.

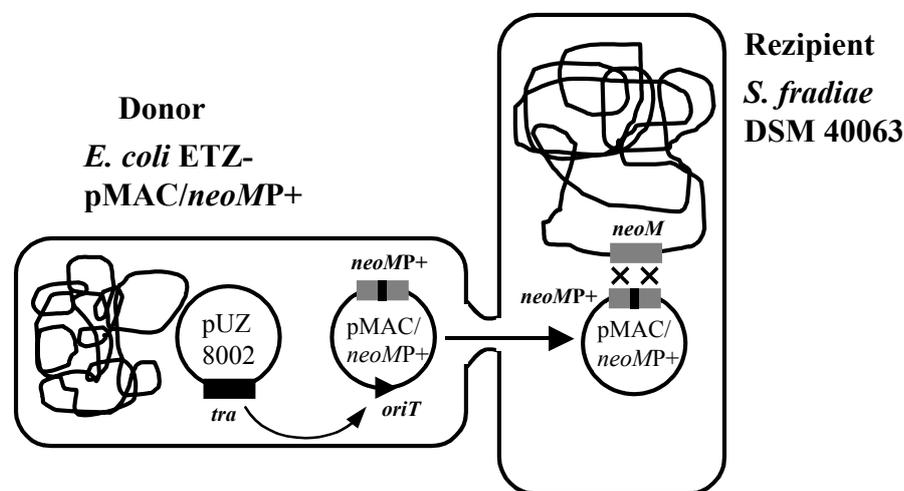


Abbildung -3.15- Schematische Darstellung des intergenerischen DNA-Transfers zwischen *E. coli* und *Streptomyces*. Die Konjugation ist für das Beispiel des Mutageneseplasmids pMAC/neoMP+ gezeigt. Die Apramycinkassette ist durch einen schwarzen Balken innerhalb des Gens *neoM* (grau) gekennzeichnet. *tra* = Transfergene; *oriT* = Transferursprung

Da viele Protokolle zur intergenerischen Konjugation zwischen *E. coli* und verschiedenen Stämmen von Streptomyceten in der Literatur beschrieben sind (z.B. MAZODIER *et al.*, 1989; SMOKVINA *et al.*, 1990; WOHLLEBEN & MUTH, 1993), wurden die Bedingungen zunächst mit einem replizierfähigen, konjugierbaren Plasmid (pOJ436, vergl. Tab. 2.2) für

S. fradiae optimiert. In Anlehnung an die veröffentlichten Protokolle wurden sowohl Sporen als auch Substratmycel von *S. fradiae* als Rezipient in die intergenerische Konjugation mit *E. coli* ET+ und *E. coli* ETZ als Donoren eingesetzt. Ebenfalls wurde die Konjugation mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten (von 3 h bis über Nacht) bei verschiedenen Temperaturen (37 °C, 28 °C und RT) auf verschiedenen Medien (TSB, M65, SPMR, AS1, SMA, ISP4) durchgeführt. Es wurden jedoch keine APR-resistenten Exkonjuganten unter den Bedingungen erhalten. Entsprechend dem Protokoll von BIERMAN *et al.*, 1992, wurde das Mycel des Rezipienten durch leichtes sonifizieren (30 % der max. Leistung; 3 Zyklen a 10 Pulse mit 10 s Pause) zerkleinert in die Konjugationsansätze eingesetzt. So konnten, je nach Medium, bis zu 20 APR-resistente Exkonjuganten pro Ansatz erhalten werden. Da sich pOJ436 über eine ϕ C31-Stelle in das Chromosom des Rezipienten integriert, konnte das Plasmid nicht reisoliert werden. Um sicherzustellen, dass die APR-Resistenz auf den erfolgreichen Transfer des Plasmides und nicht auf eine Mutation zurückzuführen war, wurde der Vektor pUWLoriTapra, der keine ϕ C31-Stelle besitzt (vergl. Tab. 2.2), unter den gleichen Bedingungen in die Konjugation eingesetzt. Die Anzahl der erhaltenen Exkonjuganten war mit bis zu 30 pro Ansatz sogar noch etwas höher. Das Plasmid konnte durch alkalische Lyse der APR-resistenten Exkonjuganten (vergl. 2.10) und Agarosegelelektrophorese zunächst nicht nachgewiesen werden. Die Plasmidpräparation wurde daraufhin in *E. coli* DH5 α transformiert. Aus den erhaltenen Transformanten konnte der ursprünglichen Vektor pUWLoriTapra re-isoliert werden. Allerdings wies der Vektor bei einzelnen Isolaten Deletionen auf.

Da die Ausbeute an Exkonjuganten immer noch zu gering war, wurden die Bedingungen weiter optimiert. Als effizienteste Methode stellte sich schließlich der Einsatz von frisch gekeimten Sporen als Rezipient in die Konjugation mit *E. coli* ETZ-pUWLoriTapra als Donor heraus (für Details siehe 2.30). Hierbei konnten hunderte von Exkonjuganten von *S. fradiae* pro Ansatz isoliert werden. Unter diesen Bedingungen wurden die Mutagenese-Plasmide pMACP/*neoMP*+ und pMACP/*neoD* Ω in *S. fradiae* konjugiert und die erhaltenen Exkonjuganten wie unter 3.7.3 beschrieben charakterisiert.

Die keimenden Sporen von *S. kanamyceticus* sollten wie die Sporen von *S. fradiae* als Rezipient in eine intergenerische Konjugation mit *E. coli* ETZ-pUWLoriTapra als Donor eingesetzt werden. Allerdings stellte sich heraus, dass der analog durchgeführte Hitze-Schock zur Einleitung der Keimung (10 Minuten bei 50 °C, vergl. 2.30) die Sporen abtötete. Die Absenkung der Temperatur auf 37 °C erhöhte zwar die Anzahl an lebensfähigen Sporen, die anschließende Inkubation der keimenden Sporen und die

Durchführung der Konjugation bei 37 °C lieferte jedoch keine Exkonjuganten. Daraufhin wurde die Temperatur für beide Schritte auf 30 °C gesenkt, die Keimungsphase der Sporen um 1 h und die Dauer der Konjugation um 2 h verlängert (siehe 2.30). Unter diesen Bedingungen gelang es bis zu 30 Exkonjuganten pro Ansatz zu erhalten, die pUWLoriTapra enthielten. Die Ausbeute an Exkonjuganten konnte durch weitere Versuche nicht weiter gesteigert werden, so dass beschlossen wurde, das Mutagenese-Plasmid pMACP/*kanM2P*⁺ unter diesen Bedingungen in *S. kanamyceticus* zu konjugieren. Tatsächlich gelang es so, vier mögliche Δ *kanM2*-Mutanten zu erhalten (siehe 3.7.3.3).

3.7.3 Charakterisierung der Exkonjuganten

Die aus den Konjugationsexperimenten (siehe 3.7.2) hervorgegangenen und, wie unter 2.30 beschrieben, gereinigten Exkonjuganten wurden durch mehrere Verfahren phänotypisch und genotypisch charakterisiert. Prinzipiell konnten die Mutageneseplasmide (siehe 3.7.1) auf drei Arten homolog mit dem Chromosom des Rezipienten rekombinieren: Erstens auf die gewünschte Art mit einem doppelten homologen Rekombinationsereignis (siehe Abb. 3.15), wobei keine Reste des Plasmids mehr vorhanden sein sollten. Zweitens mit einem singulären Rekombinationsereignis (sog. *single-cross-over*) über die homologen Sequenzen des Gens entweder oberhalb oder unterhalb der Resistenzkassette. Das Ergebnis wäre die Integration des kompletten Plasmids in das Chromosom unter Beibehaltung einer intakten Kopie des Gens. Drittens könnte das Plasmid illegitim an beliebigen Stellen mit dem Chromosom rekombinieren. Der zur Konstruktion der Mutageneseplasmide verwendete Vektor pMAC-P enthielt einen Selektionsmarker gegen Hygromycin B (vergl. Tab. 2.2). Konnte dieser Marker als ein erster phänotypischer Test nachgewiesen werden, lag entweder ein *single-cross-over* oder ein illegitimes Rekombinationsereignis der Mutagenese-Konstrukte vor. HYG B-resistente Kolonien wurden deshalb nicht weiter verwendet. Zusätzlich wurde die Produktion von Antibiotika mit Bioassays (siehe 2.31) überprüft und es sollten die eventuell angehäuften Zwischenstufen isoliert werden. Die genetische Charakterisierung der Exkonjuganten erfolgte in drei Schritten: (1) per PCR zur schnellen Überprüfung der Struktur des ausgeschalteten Gens, (2) *Southern*-Hybridisierung mit für das Gen und die

Resistenzkassette spezifischen Sonden und (3) RT-PCR von zwei anderen Genen im Cluster.

3.7.3.1 Charakterisierung der möglichen $\Delta neoM$ -Mutanten

Die chromosomale DNA von den insgesamt 14 erhaltenen Hygromycin B-sensitiven möglichen $\Delta neoM$ -Mutanten (*S. fradiae* $\Delta MP+1$; $\Delta MP+3\alpha$ bis $\Delta MP+3\delta$; $\Delta MP+4\alpha$ bis $\Delta MP+4\eta$; $\Delta MP+6\gamma$ & $\Delta MP+6\zeta$) von *S. fradiae* wurde, wie unter 2.11 beschrieben, isoliert und als Matrize in einer analytischen PCR mit den Primern „neoM Start oMM“ und „neoM Stopp oMM“ mit der Anlagerungstemperatur 66 °C eingesetzt (vergl. 2.17). Einige der PCR-Produkte hatten die für eine erfolgreiche Integration der *aacC4*-Kassette erwartete Größe von 2,2 kBp und enthielten einen *XhoI*-Schnitt, der das PCR-Produkt in die berechneten 1,3 und 0,9 kBp-Fragmente spaltete (vergl. Abb. 3.16). Bei anderen Exkonjuganten war nur eine 1,2 kBp große Bande zu sehen, wobei es sich offensichtlich um das intakte *neoM* handelte.

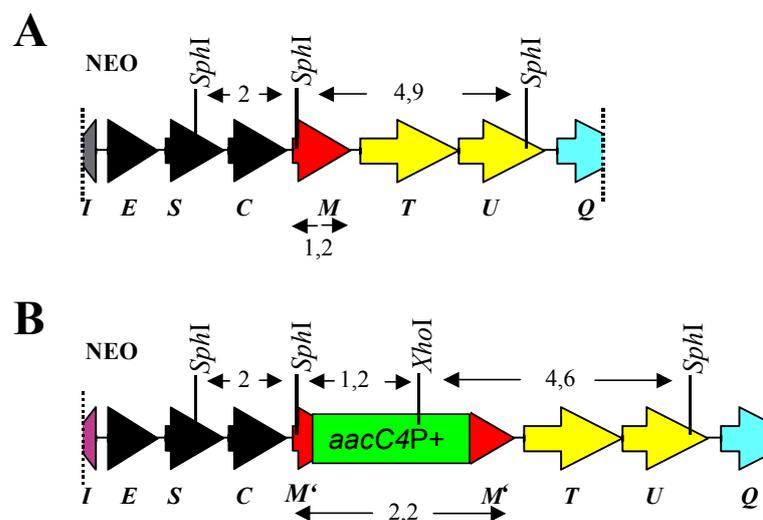


Abbildung -3.16- Ausschnitte aus dem NEO-Cluster. Die bei der PCR und *Southern*-Hybridisierung zur Charakterisierung der $\Delta neoM$ -Mutanten relevanten *SphI*- und *XhoI*-Schnitte und die erwarteten Fragmentgrößen (in kBp) des Wildtyps (A) und der Mutanten (B) sind als Pfeile oberhalb der Gene eingezeichnet. Die Pfeile unterhalb des Gennamens kennzeichnen die Größe des Gens in kBp.

Für die folgende *Southern*-Blot-Analyse wurde die chromosomale DNA der verbleibenden 9 Mutanten und des Wildtyps mit *SphI* und *SphI/XhoI* verdaut und die Fragmente in einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt. Der Blot, die Hybridisierung und die Detektion erfolgten wie unter 2.27 beschrieben. Es wurde sowohl eine spezifische

Sonde für *neoM* als auch für *aacC4* verwendet. Beide Sonden wurden wie unter 2.26 beschrieben mithilfe der PCR und den Primern „neoM Start oMM“ und „neoM Stopp oMM“ (65 °C Anlagerungstemperatur) bzw. „aac4-F“ und „aac4-R“ (60 °C Anlagerungstemperatur) hergestellt und mit DIG markiert. Abb. 3.17 zeigt exemplarisch das Ergebnis der *Southern*-Hybridisierung der *SphI*-hydrolysierten chromosomalen DNA mit der *aacC4*-Sonde. Die Größe der zu erwartenden Hybridisierungsbanden bei den $\Delta neoM$ -Mutanten konnten einfach aus der Sequenz des Clusters berechnet werden (siehe Abb. 3.16), während die DNA des Wildtyps nicht mit der *aacC4*-Sonde hybridisieren konnte. Wie erwartet konnte bei einigen Mutanten ($\Delta MP+3\gamma$, $\Delta MP+3\eta$ und $\Delta MP+4\gamma$) eine 5,8 kBp große Bande (siehe Abb. 3.17 Spur 3, 4 + 7) mit der *aacC4*-Sonde hybridisiert werden. Bei anderen möglichen Mutanten hybridisierten etwas kleinere Banden ($\Delta MP+4\zeta$) oder es wurde mehr als eine Bande detektiert (z.B. bei $\Delta MP+1$ und $\Delta MP+3\beta$, siehe Abb. 3.17 Spur 1 + 2). Da es sich bei diesen Banden entweder um unspezifische Signale oder um ein abweichendes Rekombinationsereignis des Mutageneseplasmids pMACP/*neoMP+* handelte, wurden diese Exkonjuganten nicht weiter charakterisiert.

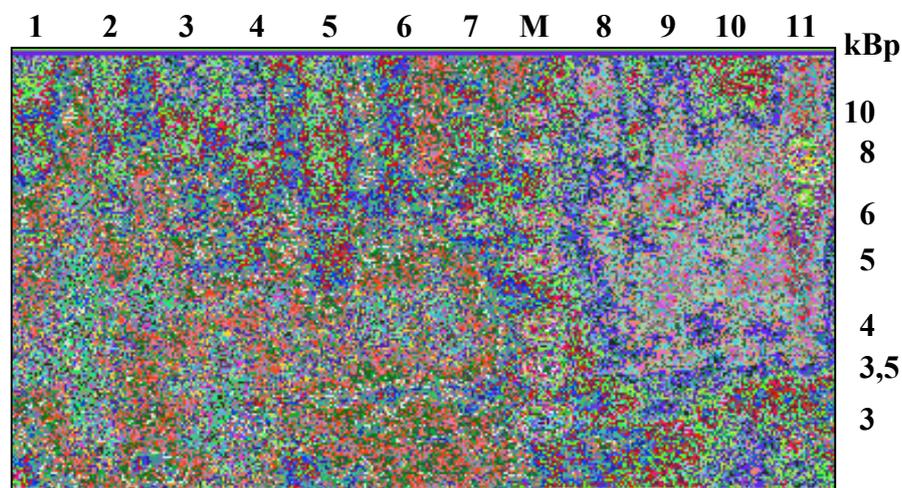


Abbildung -3.17- Southern-Hybridisierung der potentiellen $\Delta neoM$ -Mutanten. Die Spuren auf der Membran enthalten DNA von *S. fradiae*: (1) $\Delta MP+1$, (2) $\Delta MP+3\beta$, (3) $\Delta MP+3\gamma$, (4) $\Delta MP+3\eta$, (5) $\Delta MP+4\alpha$, (6) $\Delta MP+4\beta$, (7) $\Delta MP+4\gamma$, (8) $\Delta MP+4\delta$, (9) $\Delta MP+4\zeta$, (10) Wildtyp. Als Kontrolle wurde *SphI*-hydrolysiertes pMACP/*neoMP+* (11) verwendet. Die chromosomale DNA wurde mit *SphI* verdaut, wie unter 2.27 beschrieben geblottet und mit der spezifischen DIG-markierten *aacC4*-Sonde hybridisiert. Die Banden wurden durch Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. M = DNA-Marker; die Fragmentlängen relevanter Banden des Markers sind in kBp rechts angegeben, der Marker ist unter 2.14 vollständig beschrieben.

Die durch *Southern*-Hybridisierung positiv getesteten Mutanten *S. fradiae* Δ MP+3 γ , Δ MP+3 η und Δ MP+4 γ sollten biochemisch auf Produktion von NEO durch Plattendiffusionstests überprüft (vergl. 2.31) werden. Für diese Tests mussten die Mutanten ohne Antibiotika kultiviert werden, da diese die Ergebnisse verfälscht hätten. Um zu testen, wie stabil die Insertion der Resistenzkassette im Chromosom war, wurde eine Kultur von *S. fradiae* Δ MP+3 γ parallel in TSB-Medium mit und ohne APR angezogen, aus diesen erneut mehrfach überimpft und dann eine geeignete Verdünnung von beiden Kulturen auf TSB-Medium ausgespatelt, welches 50 μ g/ml APR enthielt. Nach Inkubation bei 28 °C für 20 h wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt. Da die Koloniezahl übereinstimmend war, wurde die Insertion der Resistenzkassette, trotz fehlenden Selektionsdrucks, als stabil angenommen. Die Mutanten wurden auf TSB-Medium bis zur beginnenden Sporulation kultiviert und die Tests wie unter 2.31 beschrieben mit *B. subtilis* und *E. coli* DH5 α -pGM102 durchgeführt. Wie erwartet bildete sich um die Mutanten bei beiden Indikatorstämmen kein Hemmhof (siehe Abb. 3.24 (3)), während sich um den Wildtyp ein Hemmhof bei bildete (Abb. 3.24 (5)).

Um zu überprüfen, ob die fehlende Bildung von NEO auf die gezielte Unterbrechung des Biosyntheseweges oder auf die Inaktivierung des kompletten Clusters zurückzuführen war, wurde die Aktivität des Biosyntheseclusters in den Mutanten Δ MP+3 γ , Δ MP+3 η und Δ MP+4 γ durch RT-PCR (vergl. 2.18) nachgewiesen. Dazu wurden die Stämme in AGA-Produktionsmedium angezogen, die komplette RNA aus ihnen isoliert (2.12) und mittels RT-PCR (2.18) auf die mRNA von *neoQ* (liegt stromabwärts von *neoM*, vergl. Abb. 3.16) und *neoE* (liegt vor *neoM*, vergl. Abb. 2.16) hin untersucht. Der optimale Zeitpunkt für die Ernte der Kulturen wurde durch Untersuchung der NEO-Produktion des Wildtyps abgeschätzt. Das Maximum der Produktion von *S. fradiae* war nach 48 h bei 28 °C erreicht. Es wurde angenommen, dass dieses Maximum mit der maximalen Genexpression korreliert. In Abb. 3.18 erkennt man, dass sowohl *neoQ* (Spur 1 – 4) als auch *neoE* (Spur 5 – 8) transkribiert werden. Die Transkriptionsrate beider Gene entspricht in allen Mutanten dem Niveau der Transkription des Wildtyps (Abb. 3.18 Spur 4 + 8).

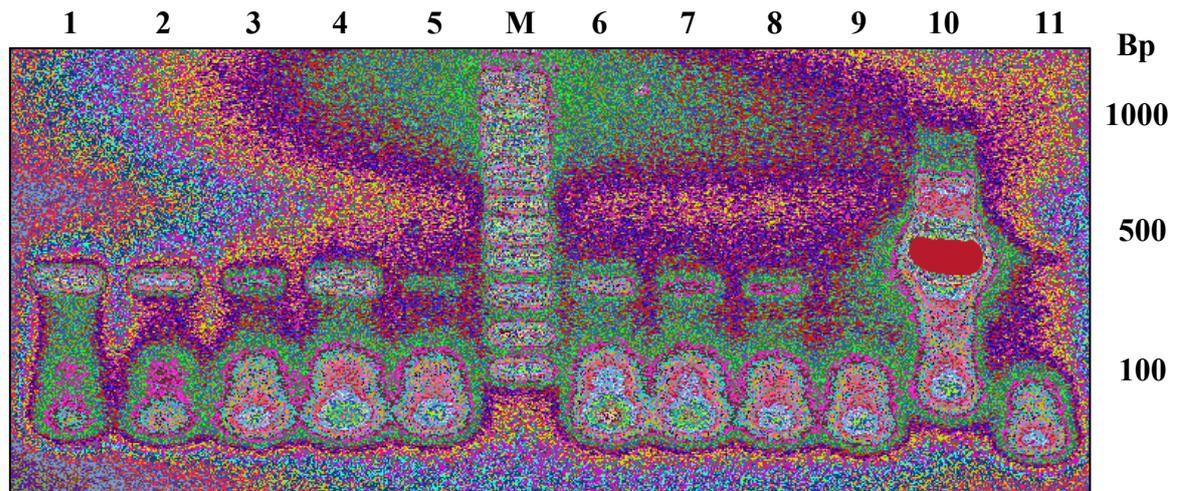


Abbildung -3.18- RT-PCR-Analyse der $\Delta neoM$ -Mutanten. Gesamt-RNA von *S. fradiae* $\Delta MP3\gamma$ (Spuren 1 + 5), $\Delta MP3\eta$ (Spuren 2 + 6), $\Delta MP4\gamma$ (Spuren 3 + 7) und Wildtyp (Spuren 4 + 8) wurde mit spezifischen Primern für *neoQ* (Spur 1 – 4) und *neoE* (Spur 5 – 8) untersucht. Als Kontrollen wurde ein Ansatz ohne RNA (Spur 9), ein Ansatz mit 16S-rRNA-Primern (Spur 10) und ein Ansatz ohne RT-Schritt mit der Gesamt-RNA des Wildtyps (Spur 11) aufgetragen. Die Stämme wurden 48 h bei 28 °C in AGA-Produktionsmedium angezogen. M = DNA-Marker; die Fragmentlängen einiger Banden des Markers sind in Bp rechts angegeben, der Marker ist unter 2.14 vollständig beschrieben.

Als letzter phänotypischer Test wurde versucht, das Zwischenprodukt 2-DOS, welches sich bei den Mutanten anhäufen sollte, aus dem Agar zu isolieren. Dazu wurden die Mutanten $\Delta MP+3\gamma$, $\Delta MP+3\eta$ und $\Delta MP+4\gamma$ und der Wildtyp von *S. fradiae* auf TSB-Medium ohne Selektionsmarker bis zur beginnenden Sporulation angezogen und die NEO-Produktion des Wildtyps durch die Plattendiffusionsmethode (2.31) überprüft. Der grob zerkleinerte Agar wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit mehreren Portionen bidest. H₂O extrahiert. Die Fraktionen wurden anschließend bis zur Trockne im Vakuum eingengt und der Rückstand in 500 µl bidest. H₂O und 500 µl Ameisensäure gelöst. Die Proben wurden über eine SPE-Säule (Strata X-C der Firma Phenomenex) gereinigt und konzentriert. Die Analyse mittels DC ergab trotz verschiedener Trennbedingungen kein eindeutiges Ergebnis, da in den Isolaten Substanzen vorhanden waren, die ebenfalls mit Ninhydrin reagierten. Die durch diese Substanzen entstandene hohen Hintergrundfärbung der DC machte eine Identifizierung einer einzelnen Substanz unmöglich. In analog durchgeführten Kontrollisolationen zur Überprüfung der Methode wurden Agarplatten nur mit definierten Mengen an Paromamin beschickt und anschließend mithilfe der DC analysiert. Es zeigte sich, dass Paromamin erst ab einer Ausgangskonzentration von 15 µg/ml deutlich von dem Hintergrund unterscheidbar war. Vermutlich war die Konzentration des von den $\Delta neoM$ -Mutanten gebildeten 2-DOS zu gering.

3.7.3.2 Charakterisierung der möglichen $\Delta neoD$ -Mutanten

Aus der Konjugation von *S. fradiae* mit *E. coli* ET+-pMAC/*neoD* Ω gingen insgesamt 25 Exkonjuganten (*S. fradiae* $\Delta D\Omega 1-1$ bis $\Delta D\Omega 1-5$; $\Delta D\Omega 2-1$ bis $\Delta D\Omega 2-5$; $\Delta D\Omega 3-1$; $\Delta D\Omega 4-1$ bis $\Delta D\Omega 4-3$; $\Delta D\Omega 5-1$ & $\Delta D\Omega 5-2$; $\Delta D\Omega 6-1$ bis $\Delta D\Omega 6-9$) hervor, von denen nur 17 gegen Hygromycin B sensitiv waren. Von diesen wurde, wie unter 2.11 beschrieben, die chromosomale DNA isoliert und mittels PCR (2.17) und dem spezifischen Primerpaar „neoD Start oMM“ / „neoD Stopp oMM“ bei der Anlagerungstemperatur 67 °C analysiert. Es zeigte sich, dass 6 Mutanten in der PCR-Analyse kein Produkt ergaben, während 4 nur eine Bande von 800 Bp erzeugten, was der Größe des intakten *neoD* entsprach (vergl. Abb 3.19 A). Bei 7 Mutanten entstand eine schwache 800 Bp und eine starke 2,5 kBp große Bande. Die große Bande hatte die gesuchte Größe und zerfiel zudem noch durch eine *XhoI*-Hydrolyse in die gewünschten 1,5 und 1,0 kBp großen Fragmente (siehe Abb. 3.19 B). Da es sich bei diesen Exkonjuganten offensichtlich um Mutanten handelte, die durch ein einfaches Rekombinationsereignis entstanden waren (siehe 3.7.3), wurden sie erneut mehrfach auf SMA-Platten zur Sporulation gebracht und in TSB-Medium wieder angezogen. Wie mehrfach berichtet worden war (Referenzen siehe KIESER *et al.*, 2000), kann bei Streptomyceten leicht nachträglich ein doppeltes Rekombinationsereignis aus einem *single-cross-over*-Ereignis entstehen und durch mehrfache Sporulation und Keimung der Sporen begünstigt werden. Tatsächlich zeigte sich, dass nach drei Sporulationsrunden in drei der Mutanten das PCR-Muster eines zweifachen Rekombinationsereignisses mit nur einer 2,5 kBp großen Bande aufwies. Diese wurden einer *Southern*-Blot-Analyse unterzogen.

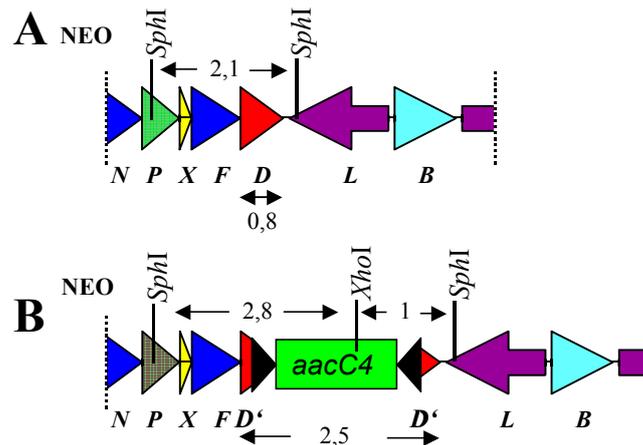


Abbildung -3.19- Ausschnitt aus dem NEO-Cluster. Die bei der *Southern*-Hybridisierung zur Charakterisierung der $\Delta neoD$ -Mutanten relevanten *SphI*- und *XhoI*-Schnitte und die erwarteten Fragmentgrößen (in kBp) des Wildtyps (A) und der Mutante (B) sind als Pfeile oberhalb der Gene eingezeichnet. Die Pfeile unterhalb des Gennamens kennzeichnen die Größe des Gens in kBp. Omegafragmente sind durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet.

Zur Erzeugung einer spezifischen Sonde für *neoD*, wurde das Gen mit den Primern „neoD Start oMM“ und „neoD Stopp oMM“ bei einer Anlagerungstemperatur von 67 °C aus dem Cosmid SfrF04 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt (vergl. 2.14) und wie unter 2.26 beschrieben radioaktiv markiert. In Abb. 3.19 sind die erwarteten Restriktionsmuster für den Wildtyp und die Mutante zu erkennen: So sollte bei beiden Hydrolysen nur eine 2,1 kBp große Bande der chromosomalen DNA des Wildtyps mit der *neoD*-Sonde hybridisieren können. Die Mutanten dagegen sollten eine um 1,8 kBp größere Bande (3,8 kBp, siehe Abb. 3.19 B) erzeugen, die sich zusätzlich noch durch *XhoI* in eine 1,8 kBp und eine 1,0 kBp große Bande spalten lässt. Die durchgeführte *Southern*-Blot-Analyse der *SphI*- und *SphI*/*XhoI*-gespaltenen chromosomalen DNA (siehe Abb. 3.20) zeigte, dass genau die erwarteten Banden mit der Sonde hybridisierten. Alle drei möglichen Mutanten erzeugten das erwartete Hybridisierungsmuster (siehe Abb. 3.20) mit Banden in den Größen von 3,8 kBp (*SphI*, Spur 4 - 6) bzw. 2,8 und 1 kBp (*SphI*/*XhoI*, Spur 1 - 3). Der Wildtyp erzeugte jeweils nur die erwartete 2,1 kBp große Bande (Spur 7 + 8).

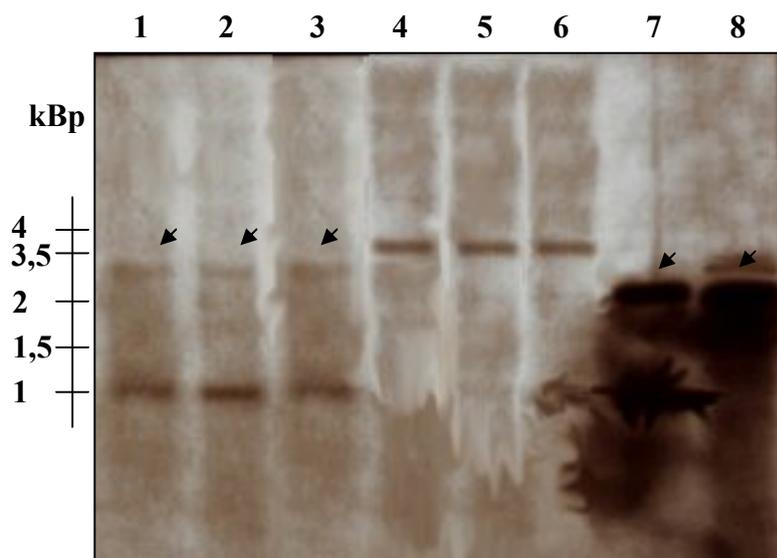


Abbildung -3.20- Southern-Hybridisierung der $\Delta neoD$ -Mutanten.

Die Spuren enthalten chromosomale DNA von *S. fradiae* $\Delta D\Omega 1-2$ (Spur 1 + 4), $\Delta D\Omega 6-2$ (Spur 2 + 5), $\Delta D\Omega 6-6$ (Spur 3 + 6) und Wildtyp (Spur 7 + 8). Die DNA wurde mit *SphI*/*XhoI* (Spur 1 – 3 + 7) bzw. *SphI* (Spur 4 – 6 + 8) hydrolysiert, wie unter 2.27 beschrieben geblottet, mit einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde für *neoD* hybridisiert und durch Belichtung eines Röntgenfilms visualisiert. Pfeilspitzen markieren schlecht zu sehende Banden. Die Fragmentlängen des DNA-Standards wurden durch Ausmessen der Membran bestimmt und sind in kBp links angegeben.

Die Mutanten wurden anschließend einer RT-PCR-Analyse unterzogen. Dazu wurden sie in AGA-Produktionsmedium bei 28 °C für 48 h kultiviert und die Gesamt-RNA aus ihnen, wie unter 2.12 beschrieben, isoliert. Als Markergene für die Aktivität des Clusters wurden *neoA* (liegt stromabwärts von *neoD*, vergl. Abb. 1.3) und *neoT* (liegt vor *neoD*, siehe Abb. 1.3) ausgewählt. Die RT-PCR wurde wie unter 2.18 beschrieben mit den Primerpaaren „neoA RT for“ / „neoA RT rev“ und „neoT RT Start“ / „neoT RT Stopp“ durchgeführt. Abb. 3.21 zeigt, dass sowohl *neoA* (Spur 1 – 4) als auch *neoT* (Spur 5 – 8) in den Mutanten genau so stark transkribiert wurde wie im Wildtyp.

Darüber hinaus wurden die Mutanten biochemisch mit Bioassays (2.31) auf die Bildung von NEO untersucht. Dies geschah in Analogie zu den $\Delta neoM$ -Mutanten (siehe 3.7.3.1). Auch hier war die Bildung eines Hemmhofes, wie erwartet, nicht zu beobachten (siehe Abb. 3.24 (4)). Die Isolierung des erwarteten Zwischenproduktes 2'-*N*-Acetylparomamin aus den Agarplatten wurde wie unter 3.7.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Analyse mithilfe der DC war allerdings auch nicht aussagekräftig.

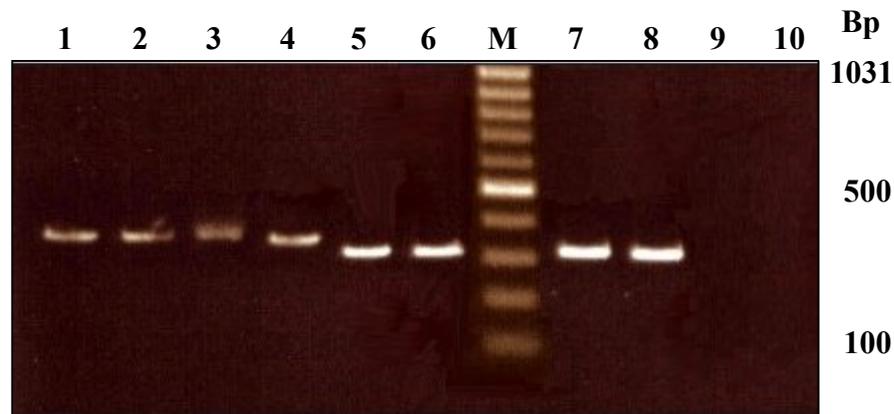


Abbildung -3.21- RT-PCR-Analyse der $\Delta neoD$ -Mutanten. Gesamt-RNA von *S. fradiae* $\Delta D\Omega 1-2$ (Spur 1 + 5), $\Delta D\Omega 6-2$ (Spur 2 + 6), $\Delta D\Omega 6-6$ (Spur 3 + 7) und Wildtyp (Spur 4 + 8) wurde mit den spezifischen Primern für *neoA* (Spur 1 – 4) und *neoT* (Spur 5 – 8) untersucht. Als Kontrollen wurden ein Ansatz ohne RNA (Spur 9) und ein Ansatz ohne RT-Schritt mit Wildtyp-RNA (Spur 10) mit aufgetragen. Die Stämme wurden 48 h bei 28 °C in AGA-Produktionsmedium angezogen. M = DNA-Marker; die Fragmentlängen einiger Banden des Markers sind in Bp rechts angegeben, der Marker ist unter 2.14 vollständig beschrieben.

3.7.3.3 Charakterisierung der möglichen $\Delta kanM2$ -Mutanten

Aus den Konjugationsexperimenten zwischen *E. coli* und *S. kanamyceticus* (siehe 3.7.2) wurden insgesamt vier Exkonjuganten (*S. kanamyceticus* $\Delta kanM2-1$ bis $\Delta kanM2-4$) erhalten, von denen zwei ($\Delta kanM2-2$ und $\Delta kanM2-3$) sensitiv gegenüber HYG B waren (= zweifaches Rekombinationsereignis, vergl. 3.7.3). Die beiden anderen wurden in Analogie zu den $\Delta neoD$ -Mutanten (siehe 3.7.3.2) erneut mehrfach auf SPMR-Medium zur Sporulation gebracht, um ein doppeltes Rekombinationsereignis herbeiführen zu können. Eine Exkonjugante ($\Delta kanM2-1$) stellte dabei das Wachstum ein und wurde nicht weiter verwendet. Die andere war nach zwei Sporulationsrunden gegen HYG B sensitiv. Die PCR-Analyse mit den Primern „kanM2 for oMM“ und „kanM2 rev oMM“ (62 °C Anlagerungstemperatur) der chromosomalen DNA der drei Exkonjuganten zeigte, dass es sich nur bei $\Delta kanM2-2$ um eine Mutante handelte, da eine Bande von 2,1 kBp entstand, die sich durch eine *XhoI*-Restriktionsanalyse wie vorausgesagt in zwei Fragmente der Größen 1,3 und 0,7 kBp spalten ließ (vergl. Abb. 3.22). Bei den anderen beiden Exkonjuganten war nur eine Bande bei 1,1 kBp zu beobachten, was der normalen Größe von *kanM2* entsprach (siehe Abb. 3.22 A). Diese beiden Exkonjuganten schienen durch ein illegitimes Rekombinationsereignis entstanden zu sein.

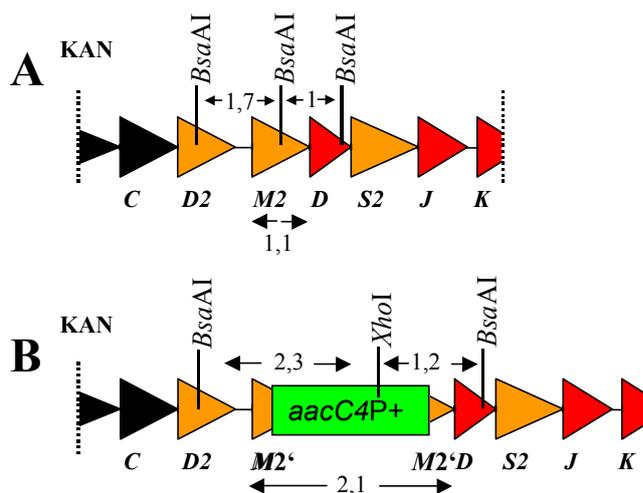


Abbildung -3.22- Ausschnitt aus dem KAN-Cluster. Die bei der *Southern*-Hybridisierung zur Charakterisierung der $\Delta kanM2$ -Mutante relevante *Bsa*AI- und *Xho*I-Schnitte und die erwarteten Fragmentgrößen (in kBp) des Wildtyps (A) und der Mutante (B) sind als Pfeile oberhalb der Gene eingezeichnet. Der interne *Bsa*AI-Schnitt ist durch die Konstruktion des Mutageneseplasmids in der Mutante nicht mehr vorhanden (vergl. 3.7.1 und Abb. 3.14). Die Pfeile unterhalb des Gennamens kennzeichnen die Größe des Gens in kBp.

Die *Southern*-Hybridisierung mit der spezifischen DIG-markierten *aacC4*-Sonde (wie unter 3.7.3.1 beschrieben hergestellt) zeigte nach *Bsa*AI- und *Bsa*AI / *Xho*I-Hydrolyse der chromosomalen DNA der Mutante $\Delta kanM2-2$ das berechnete Bandenmuster (vergl. Abb. 3.22) von 3,5 kBp (*Bsa*AI-Hydrolyse, siehe Abb. 3.23 Spur 1) bzw. 2,3 und 1,2 kBp (*Bsa*AI / *Xho*I-Hydrolyse, siehe Abb. 3.23 Spur 2). Die chromosomale DNA des Wildtyps hybridisierte wie erwartet nicht mit der *aacC4*-Sonde (Abb. 3.23 Spur 3). Bei der ebenfalls durchgeführten *Southern*-Hybridisierung mit einer spezifischen DIG-markierten Sonde für *kanM2* (hergestellt mit PCR; Primer: „*kanM2* for oMM“ & „*kanM2* rev oMM“, 62 °C Anlagerungstemperatur) zeigte die Wildtyp-DNA das erwartete Hybridisierungsmuster (vergl. Abb. 3.22) von einer 1,7 kBp und 1,0 kBp Bande sowohl nach *Bsa*AI- als auch nach *Bsa*AI / *Xho*I-Hydrolyse (ohne Abb.). In der mit *Bsa*AI / *Xho*I-hydrolysierten chromosomalen DNA der Mutante $\Delta kanM2-2$ hybridisierte die Sonde ebenfalls mit 2 Banden (2,3 kBp und 1,2 kBp, vergl. Abb. 3.22 B), während nach *Bsa*AI-Hydrolyse der DNA, wie erwartet, nur eine 3,5 kBp große Bande nachzuweisen war (ohne Abb.).

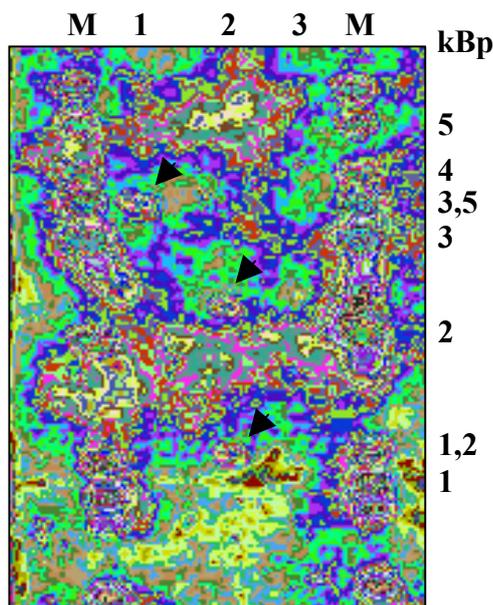


Abbildung -3.23- Southern-Hybridisierung der $\Delta kanM2$ -Mutante.

Die chromosomale DNA von *S. kanamyceticus* $\Delta kanM2$ wurde gespalten mit: *Bsa*AI (Spur 1) und *Bsa*AI / *Xho*I (Spur 2). Spur 3 enthält *Bsa*AI-hydrolysierte chromosomale DNA vom Wildtyp. Die DNA wurde wie unter 2.27 beschrieben gebロットet und mit der spezifischen DIG-markierten *aacC4*-Sonde hybridisiert. Die Banden wurden durch Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht und sind durch Pfeile markiert. M = DNA-Marker; die Fragmentlängen einiger Banden des Markers sind in kBp rechts angegeben, der Marker ist unter 2.14 vollständig beschrieben.

Zur weiteren Charakterisierung der Mutante wurde ein Bioassay zur Überprüfung der KAN-Produktion unter Verwendung von *B. subtilis* und *E. coli* DH5 α -pGM102 als Indikatorstämme durchgeführt (siehe 2.31). Dazu musste vorher die Stabilität der Insertion *aacC4*-Kassette im Chromosom getestet werden, um auf eine Selektion auf APR bei der Anzucht der Mutante $\Delta kanM2$ -2 verzichten zu können. Dieser Test wurde analog zu den Tests mit den *S. fradiae*-Mutanten (siehe 3.7.3.1) durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass nach mehreren Anzuchten ohne Selektionsdruck die Menge an APR-resistenten Kolonien gegenüber den Anzuchten mit APR gleich blieb. Die Insertion des Selektionsmarkers wurde deshalb als stabil angenommen und die Bioassays ohne APR durchgeführt. Die Analyse des Bioassays zeigte, dass das Wachstum von *B. subtilis* um die Mutante $\Delta kanM2$ -2 herum gehemmt wurde (siehe 3.24, 1). Der Hemmhof war deutlich schwächer ausgeprägt als derjenige, der um die Kolonien des Wildtyps von *S. kanamyceticus* herum sichtbar war (siehe 3.24, 2). Offensichtlich wurde eine weniger wirksame Substanz oder eine geringere Menge KAN von der Mutante angehäuft. Aus

dem Biosynthesepostulat (siehe 1.3.1) sollte eine *kanM2-knock-out*-Mutante Paromamin oder 2'-*N*-Acetylparomamin als Zwischenstufe anhäufen. Paromamin ist wesentlich schwächer antibiotisch wirksam als KAN (HOTTA *et al.*, 2000), während 2'-*N*-Acetylparomamin keine antibiotische Aktivität mehr besitzt (HOTTA *et al.*, 1996). Die Analyse der Bioassays deckte sich so möglicherweise mit der tatsächlichen Wirksamkeit des postulierten Zwischenproduktes Paromamin. Da *E. coli* DH5 α durch das Plasmid pGM102 (vergl. Tab. 2.2) sowohl gegen Paromamin als auch KAN resistent wurde, konnte in diesem Test kein Hemmhof um die Mutante oder den Wildtyp beobachtet werden.

Eine erfolgreiche Isolierung des eventuell gebildeten Paromamins aus dem Agar (vergl. 3.7.3.1) konnte mithilfe der DC aufgrund der vielen aus dem Medium stammenden, ebenfalls mit Ninhydrin reagierenden Stoffe nicht eindeutig nachgewiesen werden. Der Versuch, diese Stoffe durch Anzucht der Stämme in Minimalmedium zu eliminieren, misslang ebenfalls, da sowohl bei *S. kanamyceticus* als auch bei Δ *kanM2-2* unter den getesteten Bedingungen (28 °C; 10 g/l D-Glucose; bis 72 h) keine KAN- bzw. Paromaminproduktion nachweisbar war.

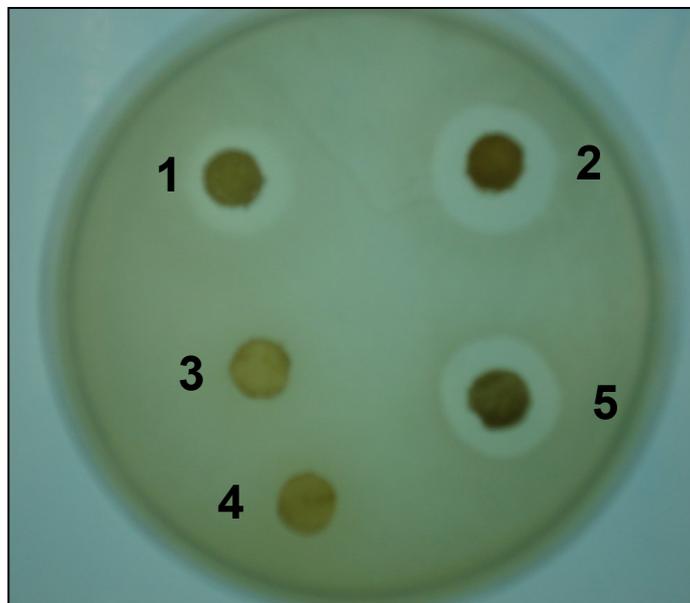


Abbildung -3.24- Hemmhoftests zur Bestimmung der Antibiotikaproduktion. Der Bioassay wurde mit *Bacillus subtilis* auf TSB-Medium wie unter 2.31 beschrieben durchgeführt. (1) *S. kanamyceticus* Δ *kanM2*; (2) *S. kanamyceticus* Wildtyp; (3) *S. fradiae* Δ MP3 γ ; (4) *S. fradiae* Δ D Ω 6-6; (5) *S. fradiae* Wildtyp

3.7.4 Komplementation der *knock-out*-Mutanten

Die isolierten Mutantenstämme ($\Delta neoM$, $\Delta neoD$ und $\Delta kanM2$) sollten durch Einbringen des intakten Gens (*neoM*, *neoD* und *kanM2*) auf einem Plasmid in trans komplementiert werden und die Bildung von NEO bzw. KAN durch Bioassays (2.31) bestätigt werden. Die $\Delta neoM$ -Mutanten sollten ebenfalls durch *kanM1* komplementiert werden, um die funktionelle Homologie der beiden Genprodukte nachzuweisen. Ebenfalls sollte versucht werden, die $\Delta neoD$ -Mutanten von *kanN* in trans zu komplementieren. Die Mutante $\Delta kanM2-2$ sollte auch durch *tobM2* komplementiert werden.

Als einziges konjugierbares Expressionsplasmid stand pUWLoriTbla und seine Derivate, pUWLoriTapra und pUWLoriTaph, zur Verfügung (vergl. Tab. 2.2 und BLAESING *et al.*, 2005). Wie unter 2.21 beschrieben, enthalten sie den konstitutiven Promotor P_{ermE^*} (BIBB *et al.*, 1985). Um zu testen, ob dieser Promotor in *S. fradiae* und *S. kanamyceticus* zur heterologen Genexpression benutzt werden kann, wurde ein Reportersystem auf Basis der Apramycinresistenzkassette *aacC4* folgendermaßen konstruiert: Das *aacC4*-Gen wurde aus dem Plasmid pUC19/ $\Omega C4$ mit den Primern „*aacC4* Start -Prom“ und „*aacC4* StoppBam“ (Anlagerungstemperaturen 53 °C, Schritt 3, und 56 °C, Schritt 6, vergl. Tab 2.6) amplifiziert. Die Primer waren so gewählt, dass eine *NdeI*-Schnittstelle am Translationsstartcodon entstand und so der natürliche Promotor nicht mehr vorhanden war. Durch den Stopprimer wurde eine *BamHI*-Schnittstelle unmittelbar nach dem natürlichen Translationsstoppcodon des Gens generiert. Das Gen wurde in pUCPU21 ligiert (pUCPU/*aaC4*), sequenziert und nach einer präparativen *EcoRI* / *HindIII*-Hydrolyse in pUWLoriTbla ligiert. Die intergenerische Konjugation der DNA in *S. fradiae* und *S. kanamyceticus* erfolgte wie unter 2.30 beschrieben mit *E. coli* ETZ als Donor. Die Exkonjuganten wurden zunächst auf Thiostrepton selektiert und durch mehrmaliges Umplattieren auf Thiostrepton / Phosphomycinplatten (TSB) gereinigt. Aus mehreren Exkonjuganten konnte das intakte Plasmid pLoriTbla/*aacC4* zur Kontrolle reisoliert werden. Die Selektion auf das *aacC4*-Gen erfolgte dann auf TSB-APR-Medium (Konzentrationen bis 100 $\mu\text{g/ml}$ APR). Die Stämme, die das *aacC4*-Gen unter der Kontrolle des Promotors P_{ermE^*} enthielten, tolerierten die höchste APR-Konzentration, während Kontrollstämme, die nur den Vektor pUWLoriTbla enthielten, bereits bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ APR das Wachstum einstellten.

Die beiden Komplementationsplasmide pLoriTbla/*neoM* und pLoriTbla/*neoD* wurden durch Ligation der *EcoRI* / *HindIII* geschnittenen DNA-Fragmente *neoM* bzw. *neoD* aus

pUCPU/*neoM*⁺ bzw. pUCPU/*neoD*⁺ in einen entsprechend geschnittenen pUWLoriTbla erzeugt (vergl. Tab 2.3). Die Konjugation dieser Plasmide in Sporen von *S. fradiae* Δ MP+3 γ , Δ MP+3 η und Δ MP+4 γ bzw. Δ D Ω 1-2, Δ D Ω 6-2 und Δ D Ω 6-6 erfolgte wie unter 2.30 beschrieben. Die Selektion der Exkonjuganten erfolgte auf APR / Thiostrepton-Platten, was eine Gegenselektion gegen *E. coli* mit Phosphomycin unnötig machte, da weder pUWLoriTbla noch pUZ8002 eine APR-Resistenz enthielten. Aus je 3 Exkonjuganten wurden die Plasmide isoliert und nach Rücktransformation in *E. coli* DH5 α durch Restriktion genauer analysiert. Einige der Plasmide wiesen zum Teil Deletionen auf. Die entsprechenden Exkonjuganten wurden nicht weiter verwendet. Da bereits getestet wurde, ob die Insertion der Apramycinkassette auch bei fehlendem Selektionsdruck stabil war (siehe 3.7.3), wurden die zu komplementierten Mutanten nur auf TSB-Thiostrepton-Platten für die Bioassays bis zur beginnenden Sporulation bei 28 °C angezogen. Die Bioassays wurden mit *E. coli* DH5 α anstelle von *B. subtilis* und ansonsten wie unter 2.31 beschrieben durchgeführt. *E. coli* DH5 α besitzt als Gram-negatives Bakterium eine natürliche Insensitivität gegen Thiostrepton, aufgrund der schlechten Aufnahme der Substanz in die Zelle (STROHL & FLOSS, 1995). Zur Kontrolle wurden die gleichen Tests auch gegen NEO-resistente *E. coli* DH5 α -pGM102 (vergl. Tab. 2.2; MUTH *et al.* 1988) durchgeführt, um ausschließen zu können, dass andere antibiotisch wirksame Substanzen durch Aktivierung kryptischer Gencluster gebildet wurden.

Es gelang jedoch nicht, die Produktion von NEO bei einer der komplementierten Mutanten nachzuweisen, da keine sichtbare Hemmhofbildung zu beobachten war. Zur Kontrolle wurden die komplementierten Mutanten einer RT-PCR-Analyse unterzogen, um sowohl die Transkripte einiger Markergene des Clusters als auch die der in trans komplementierenden Gene auf dem Komplementierungsplasmid nachzuweisen. Das Ergebnis zeigte, dass die Komplementation auf genetischer Ebene funktionierte, da die gesuchten Transkripte eindeutig nachweisbar waren (siehe Abb. 3.25 Spur 1 – 3). Exemplarisch zeigt Abb. 3.25 das Ergebnis der RT-PCR-Analyse für die Komplementation der Δ *neoM*-Mutante *S. fradiae* Δ MP3 γ mit dem Plasmid pLoriTbla/*neoM*. Der Stamm war analog von *S. fradiae* Δ MP3 γ (vergl. 3.7.3.1) 48 h bei 28 °C in AGA-Produktionsmedium kultiviert und die Gesamt-RNA, wie unter 2.12 beschrieben, aus ihm präpariert worden. Die RT-PCR wurde wie unter 2.18 beschrieben mit den spezifischen Primern für *neoQ*, *neoE* und *neoM* (vergl. Tab. 2.4) durchgeführt. Die Transkriptionsrate aller drei Gene in der komplementierten Mutante entspricht der des

Wildtyps *S. fradiae*. Warum trotzdem keine NEO-Produktion bei der komplementierten Mutante nachzuweisen war, blieb unklar (siehe 4.5).

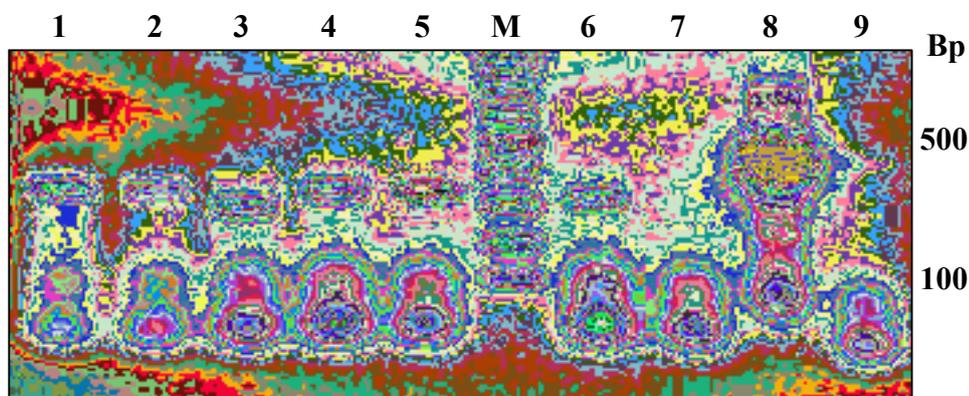


Abbildung -3.25- RT-PCR-Analyse von *S. fradiae* Δ MP3 γ -pLoriTbla/neoM-3 und Wildtyp. Die Gesamt-RNA der komplementierten Mutante (Spur 1 – 3) und des Wildtyps (Spur 4 – 6) wurde mit spezifischen Primern für *neoQ* (Spur 1 + 4), *neoM* (Spur 2 + 5) und *neoE* (Spur 3 + 6) untersucht. Als Kontrollen wurde ein Ansatz ohne RNA (Spur 7), ein Ansatz mit 16S-rRNA-Primern (Spur 8) und ein Ansatz ohne RT-Schritt mit Gesamt-RNA des Wildtyps (Spur 9) aufgetragen. Die Stämme wurden 48 h bei 28 °C in AGA-Produktionsmedium angezogen. M = DNA-Marker; die Größen einiger Banden des Markers sind in Bp rechts angegeben, der Marker ist unter 2.14 vollständig beschrieben.

3.8 Erste Versuche zur biokombinatorischen Darstellung neuer AGAs

Mit der Möglichkeit neue Glycosyltransferasefunktionen in die Produzentenstämme *S. fradiae* und *S. kanamyceticus* bringen zu können, sollte versucht werden neue AGAs durch Biokombinatorik zu generieren. Ein mögliches Pseudopentasaccharid könnte, wie in Abb. 3.26 dargestellt, von *S. fradiae* als Nebenprodukt produziert werden. Dazu wurden die Plasmide pLoriTapra/*kanM2* und pLoriTbla/*kanM2* via intergenerischer Konjugation (siehe 2.30) in *S. fradiae* eingebracht. Nach Isolierung mehrerer APR-resistenter bzw. thiostreptonresistenter Exkonjuganten wurden die Plasmide nach alkalischer Lyse des Streptomyceten (vergl. 2.10) und Transformation in *E. coli* DH5 α auf ihre Integrität durch Restriktionsanalysen überprüft. Je 6 Exkonjuganten, die einen intakten pLoriTapra/*kanM2* bzw. pLoriTbla/*kanM2* enthielten, wurden in AGA-Produktionsmedium, auf TSB-Medium und M65-Medium kultiviert. In allen Anzuchten enthielten die Medien nur Thiostrepton als Selektionsmarker (vergl. Tab. 2.2). Durch Vergleich mit dem Wildtyp war es möglich den Beginn der Antibiotikaproduktion mithilfe der Plattendiffusionsmethode (vergl. 2.31) abzuschätzen. Dies war nach maximal 60 h bei allen Medien der Fall. Der Nachweis eines neuen AGAs wurde durch

Hemmhoftests gegen *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -pGM102 und *E. coli* DH5 α -pOJ436 durchgeführt (vergl. 2.31). Allerdings war die Produktion eines neuen Antibiotikums auf diese Weise bei keiner der Anzuchten feststellbar. Alle Stämme erzeugten wie der Wildtyp einen Hemmhof bei *E. coli* DH5 α und keine bei *E. coli* DH5 α -pGM102 und *E. coli* DH5 α -pOJ436.

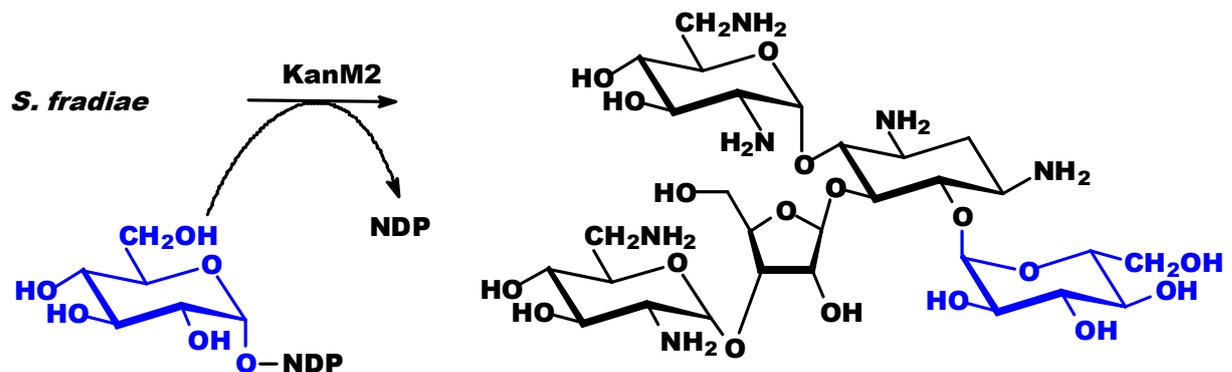


Abbildung -3.26- Ein mögliches neues AGA durch die Einbringung der GT KanM2 in *S. fradiae*. Die zusätzliche D-Glucoseeinheit ist blau dargestellt. NDP = Nucleosiddiphosphat

Das Plasmid pLoriTbla/hygF wurde, wie unter 2.30 beschrieben, in *S. kanamyceticus* per intergenerischer Konjugation mit *E. coli* ETZ als Donor gebracht, um in der 5-Position mit Galactose substituiertes KAN zu erhalten (siehe Abb. 3.27). Die wenigen erhaltenen Exkonjuganten wurden auf Integrität des konjugierten Plasmides getestet. Nach Rücktransformation in *E. coli* DH5 α und Restriktionsanalyse konnte kein Plasmid ohne Deletionen erhalten werden. Diejenigen Exkonjuganten, in denen *hygF* intakt war, wurden dennoch auf ihre Antibiotikaproduktion getestet. Dazu wurden sie auf SPMR-Medium mit Thiostrepton bis zur beginnenden Sporulation bei 28 °C kultiviert und ein Bioassay, wie unter 2.31 beschrieben, gegen *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH5 α -pGM102 und *E. coli* DH5 α -pOJ436 durchgeführt. Die Produktion einer antibiotisch wirksamen Substanz konnte allerdings bei keiner Exkonjugante beobachtet werden, während der Wildtyp einen typischen Hemmhof auf dem Zellrasen von *E. coli* DH5 α erzeugte. Wie erwartet führten die Plasmide in *E. coli* DH5 α -pGM102 und *E. coli* DH5 α -pOJ436 zu einer Resistenz gegenüber KAN.

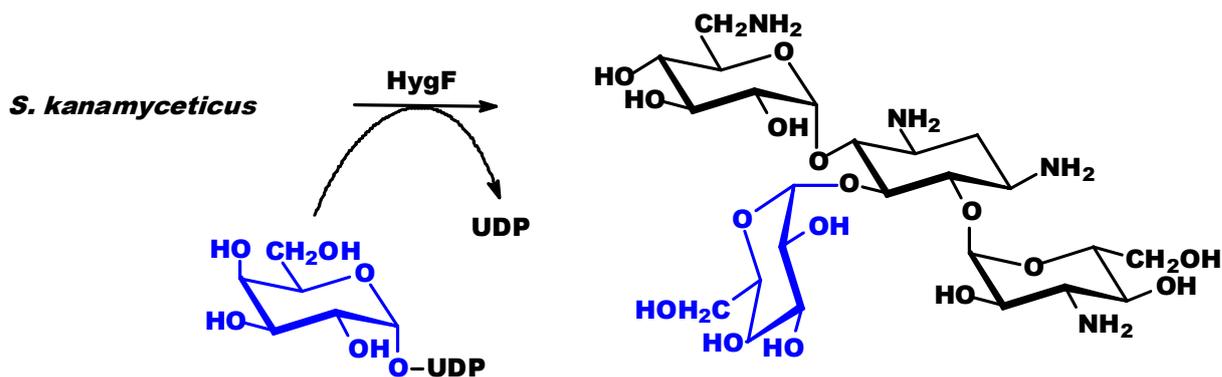


Abbildung -3.27- Ein mögliches neues AGA durch die Einbringung der GT HygF in *S. kanamyceticus*. Die zusätzliche Galactoseeinheit ist blau dargestellt. UDP = Uridindiphosphat

Als ein weiteres biokombinatorisches Experiment sollte die Galactosyltransferase *hygF* in eine $\Delta neoM$ -Mutanten gebracht werden. Dazu wurde wie bei der in trans-Komplementation der *knock-out*- Mutanten (vergl. 3.7.4) das Plasmid pLoriTbla/*hygF* in *S. fradiae* $\Delta MP+3\gamma$, $\Delta MP+3\eta$ und $\Delta MP+4\gamma$ mithilfe der intergenerischen Konjugation gebracht (vergl. 2.30) und die genetische Komplementation durch RT-PCR nachgewiesen. Auch hier war die Bildung eines neuen Produktes durch Hemmhofstests nicht nachweisbar.

4 Diskussion

Glycosyltransferasen haben eine entscheidende Funktion beim spezifischen Aufbau von AGAs. Daher sind in der vorliegenden Arbeit die potenziellen Glycosyltransferasen NeoM, KanM1, KanM2, NeoF und HygF, sowie die Proteine NeoD und KanN durch Enzymtests und *knock-out*-Mutanten näher untersucht worden. Darüber hinaus wurden erste Versuche unternommen, durch Kombination bestimmter Glycosyltransferasefunktionen neue AGAs herzustellen.

4.1 Allgemeine Probleme

Die therapeutisch wichtigste und daher interessanteste Gruppe der AGAs sind diejenigen, die um ein zentrales Pseudodisaccharid, Paromamin, herum aufgebaut sind (vergl. 1.2). Auch die übrigen einleitenden Biosyntheseschritte der Vorläufersubstanz 2-DOS sind in den entsprechenden Produzenten konserviert (vergl. PIEPERSBERG *et al.*, 2007) und durch biochemische Charakterisierung der beteiligten Enzyme aufgeklärt worden: In der BTR-Biosynthese von *B. circulans* (HUANG *et al.*, 2002), NEO-Biosynthese von *S. fradiae* (KUDO *et al.*, 2005) und der KAN-Biosynthese von *S. kanamyceticus* (ABOSHANAB, 2005) sind diese Schritte identisch: Ausgehend von dem ubiquitären Metaboliten Glucose-6-phosphat wird 2-DOS durch eine Zyklisierungsreaktion, Oxidation und zweimalige Transaminierung unter Beteiligung der C, E und S/S1-Enzyme synthetisiert (vergl. Abb. 1.8, 1.3 und dortige Referenzen). Einige weitere Reaktionen der verschiedenen Biosynthesen sind ebenfalls untersucht worden. So sind beispielsweise die Enzyme NeoQ und NeoB für die Transaminierung von Paromamin und 6"-Hydroxy-NEO C verantwortlich (vergl. Abb. 1.9; HUANG *et al.*, 2007). Ebenso ist die Synthese, Anheftung und Modifizierung des 2-Hydroxy- γ -aminobuttersäurerestes in der Butirosinbiosynthese untersucht und die beteiligten Enzyme charakterisiert worden (LI *et al.*, 2005).

Zu Beginn dieser Arbeit war, mit Ausnahme von BtrL und BtrA, die in der BTR-Biosynthese für die 5-Ribosylierung von Neamin (vergl. Abb. 1.9; KUDO *et al.*, 2007)

verantwortlich sind, nichts über die am Aufbau der AGAs beteiligten Glycosyltransferaseschritte an experimentellen Daten verfügbar. Diese Tatsache erstaunt, weil die beteiligten Enzyme an den primären Biosyntheseschritten wichtiger Intermediate beteiligt sind, während die bisher experimentell charakterisierten Enzyme diese zentralen Intermediate nur modifizieren. Andeutungen und Hinweise auf ihre Funktion und die Zuordnung der Gene in sequenzierten Clustern konnten schon sehr früh (z.B. BAUD *et al.*, 1977; HUANG *et al.*, 2005) gemacht werden. Diese Diskrepanz hat vermutlich verschiedene Ursachen. Streptomycetengene weisen in der Regel einen relativ hohen GC-Gehalt auf (bis >70 %; ENQUIST & BRADLEY, 1971; Bentley *et al.*, 2002; IKEDA *et al.*, 2003; OHNISHI *et al.*, 2008), dadurch müssen bei der heterologen Überexpression dieser Gene in *E. coli* andere, in diesem Wirtstamm selten benutzte Codons bei der Translation verwendet werden, was generell zu schlechten oder gar keinen Ausbeuten an rekombinantem Protein führen kann. Die geringere und verzögerte Translationsrate könnte darüber hinaus für die inkorrekte Faltung des entstehenden Proteins verantwortlich sein, genauso wie das Vorhandensein unterschiedlicher Chaperone oder deren Konzentrationen. Beispielsweise berichteten MADAN *et al.*, 2008, dass sie nur bei Co-Expression der Chaperone GroES und GroEL aus *E. coli* (FENTON & HORWICH, 2003; LIN & RYE, 2006) ein rekombinantes Protein in *E. coli* nachweisen konnten.

Neben diesen generellen Schwierigkeiten scheint die heterologe Expression von Glycosyltransferasen besonderen Schwierigkeiten zu unterliegen. Andere Gruppen berichteten ebenfalls, dass die erfolgreiche Expression von Glycosyltransferasegenen schwieriger war, als z.B. die von anderen Genen mit vergleichbarem GC-Gehalt (HONG *et al.*, 2006; MITTLER *et al.*, 2007). Auch ist berichtet worden, dass Glycosyltransferasen sich an hydrophobe Partikel in den Zellen anlagern und nur unlöslich als *inclusion-bodies* vorlagen (TUMBALE *et al.*, 2008). In der Tat ließen sich auch die in dieser Arbeit charakterisierten Glycosyltransferasen nur bedingt in *E. coli*-Stämmen nach Optimierung der Anzuchtbedingungen und oftmals nur als His-Tag-Fusionsproteine löslich produzieren. Selbst bei Verwendung von *S. lividans* als Wirtstamm gelang die Überproduktion nur in Ausnahmefällen (NeoF) in Mengen, die auf PAA-Gelen sichtbar gemacht werden konnten, während sonst die Glycosyltransferasen nur anhand ihrer Aktivitäten in Gesamtzellextrakten oder den daraus resultierenden löslichen Fraktionen nachgewiesen werden konnten.

4.2 Die Glycosyltransferasen der GT4-Familie

Glycosyltransferasen werden, basierend auf ihrer Aminosäuresequenz, in Familien gruppiert (vergl. 1.4; www.cazy.org; CAMPPELL *et al.*, 1998; COUTINHO *et al.*, 2003). Alle Mitglieder einer CAZy-Familie sollten die gleiche dreidimensionale Faltung (für Details vergl. 1.4) aufweisen, aber trotzdem unterschiedliche Substrate und aktivierte Zucker umsetzen können (COUTINHO *et al.*, 2003; BRETON *et al.*, 2006). Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit sind NeoM, KanM1, KanM2 und NeoF in die CAZy-Familie GT4 eingruppiert worden, sollten somit GT-B-Faltung aufweisen und den Zuckertransfer unter Beibehaltung der Stereochemie am anomeren Kohlenstoff katalysieren. In der Datenbank der GT4-Familie sind heute bereits über 7500 Glycosyltransferasen verzeichnet, womit sie die zweitgrößte Glycosyltransferase-Familie darstellt.

4.2.1 Die Glycosyltransferasen NeoM & KanM1

Paromamin, bestehend aus dem 1,3-Diaminocyclitol 2-DOS und dem Aminozucker D-Glucosamin, wird durch eine in allen Produzenten der 2-DOS-AGA-Gruppe (vergl. 1.2) konservierte Glycosyltransferase (M/M1-Enzyme) aus den Vorläufern zusammengesetzt. Die Proteine NeoM und KanM1 wurden in dieser Arbeit nach Klonierung und Optimierung der Expressionsbedingungen heterolog als C-His-Fusionsproteine löslich in verschiedenen *E. coli*-Stämmen überproduziert (vergl. 3.2.1.1 und 3.2.1.2). Die mit den entsprechenden Extrakten durchgeführten Enzymtests (siehe 3.2.2) zeigten jedoch, dass die Enzyme offensichtlich inaktiv waren, da unter keinen der gewählten Bedingungen die Bildung eines neuen Produktes nachzuweisen war. Trotz des Einsatzes verschiedener Anzuchtbedingungen ließen sich mit keinem der gewählten *E. coli*-Expressionssysteme die nativen Proteine NeoM oder KanM1 in löslicher Form nachweisen (vergl. Tab 3.1 und Tab. 3.2). Auch mit Stämmen von *S. lividans* konnten keine nachweisbaren Mengen der Proteine NeoM und KanM1 produziert werden. Jedoch katalysierten die in die Enzymtests eingesetzten Rohextrakte verschiedener *S. lividans*-Expressionstämmen dennoch die Bildung eines neuen Produktes (siehe Abb. 3.3 und Abb. 3.4). So konnte gezeigt werden, dass NeoM und KanM1 eine identische Reaktion katalysieren: Aus 2-DOS und UDP-GlcNAc bildete sich ein neues Produkt, welches durch den Vergleich der R_F -Werte mit strukturbekannter Substanz als 2'-N-Acetylparomamin identifiziert wurde (siehe Abb. 3.3

und Abb. 3.4). Darüber hinaus akzeptierten beide Enzyme scheinbar nur UDP-GlcNAc, aber weder TDP-Glc noch UDP-Glc als Substrate, da weder die Bildung eines neuen Produktes noch die Abnahme des eingesetzten 2-DOS mit diesen Donoren nachweisbar waren. Dass der durch NeoM und KanM1 übertragene Zuckerrest *N*-Acetylglucosamin und nicht Glucose war, deckt sich mit den Ergebnissen von KOJIMA *et al.* (1975). Sie zeigten, dass idiotrophe Mutanten von *S. fradiae* und *S. kanamyceticus* radioaktiv markiertes Glucosamin bevorzugt in den Glucosamin-Ring von Paromamin einbauen und Glucosamin somit ein direkter Vorläufer von Paromamin ist, während entsprechend markierte Glucose in beide Ringe gleich gut inkorporiert wird, also im Stoffwechsel der Zellen zuerst in Glucosamin umgebaut wird. Da im Zuckermetabolismus zunächst UDP-GlcNAc aus UDP-Glucosamin und AcetylCoA gebildet wird (vergl. MICHAL, 1999), konnte in den Versuchen von KOJIMA *et al.* (1975) nicht zwischen UDP-Glucosamin und UDP-GlcNAc als Substrat unterschieden werden. Es gab keine weiteren Hinweise darauf, ob UDP-GlcNAc oder UDP-Glucosamin als Co-Substrat von NeoM oder KanM1 umgesetzt werden. Da aber in den Versuchen dieser Arbeit der Zuckerrest von UDP-GlcNAc von beiden Enzymen auf 2-DOS übertragen wurde, musste es zwangsläufig einen nachfolgenden Biosyntheseschritt geben, die Hydrolyse des *N*-Acetylrests, weil Paromamin als Intermediat nachgewiesen worden war (CLARIDGE *et al.*, 1974; FANG *et al.*, 1984). Die Hydrolasen, die diese Deacetylierung katalysieren, konnten im Laufe dieser Arbeit ebenfalls identifiziert werden (siehe 4.4).

Der Umsatz von 2-DOS zu 2'-*N*-Acetylparomamin war sowohl in der NeoM- wie auch der KanM1-Katalyse nicht quantitativ (vergl. 3.2.2). Es scheint sich dabei um eine Gleichgewichtsreaktion zu handeln, wobei das Gleichgewicht auf der Seite der Edukte liegt. Auf diese Weise regulieren die AGA-Produzenten möglicherweise den Abzug des UDP-GlcNAcs aus dem Primärstoffwechsel. Die Menge des verbrauchten UDP-GlcNAcs würde somit sowohl von der Aktivität der Glycosyltransferase als auch von der des nachfolgenden Enzyms (der Deacetylase) über den Abbau des 2'-*N*-Acetylparomamins kontrolliert werden. Ein einfacher Ansatz zur Überprüfung, ob tatsächlich ein Gleichgewicht in der NeoM-Reaktion vorliegt, wäre die zeitgleiche Inkubation der Glycosyltransferaseansätze mit den Deacetylase NeoD/KanN (vergl. 4.4). Dabei käme es direkt zur Deacetylierung von 2'-*N*-Acetylparomamin und so zu keiner Ausbildung eines Gleichgewichtes. Dabei würde mehr 2-DOS verbraucht, als in einem entsprechenden Kontrollansatz ohne NeoD/KanN. Gegen die Gleichgewichtshypothese spricht allerdings die Tatsache, dass die Erhöhung der 2-DOS- oder UDP-GlcNAc-Konzentration in den in

dieser Arbeit durchgeführten Tests nicht zu einer höheren Bildung des Produktes führte (vergl. 3.2.2). Außerdem sollten gereinigte Enzyme für die Enzymtests verwendet werden, weil UDP-GlcNAc ein ubiquitäres Molekül des Primärstoffwechsels darstellt, weshalb es wahrscheinlich ist, dass auch weitere Enzyme in den verwendeten Rohextrakten UDP-GlcNAc umsetzen.

YOKOYAMA *et al.* (2008) konnten ebenfalls die durch NeoM katalysierte Bildung von 2'-*N*-Acetylparomamin durch Umsatz von 2-DOS mit UDP-GlcNAc feststellen. Sie testeten neben UDP-Glc auch UDP-Glucosamin. Beide aktivierte Zucker wurden nicht als Substrat erkannt. Ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit ist die Tatsache, dass kein vollständiger Umsatz des eingesetzten 2-DOS zu 2'-*N*-Acetylparomamin beobachtet werden konnte (YOKOYAMA *et al.*, 2008). Die in ihren *in vitro*-Enzymtests eingesetzten Verhältnisse von Zuckerakzeptor zu -donor stimmten mit den Testbedingungen dieser Arbeit überein, lediglich wurde von YOKOYAMA *et al.* (2008) ein anderer Puffer und eine etwas geringere Mg²⁺-Ionenkonzentration verwendet (vergl. 2.28.1).

HUANG *et al.* (2005) vermuteten, dass NeoM in der NEO-Biosynthese auch den Glycosyltransferaseschritt von RIB zu Hydroxy-NEO C katalysieren könnte (vergl. Abb. 1.9), obwohl dies unwahrscheinlich ist, da eine weitere mögliche Glycosyltransferase in allen Clustern der NEO-Familie vorkommt (F-Enzyme, siehe 4.2.2). Auch wurde RIB als Endprodukt einer Mutante von *S. fradiae* identifiziert (BAUD *et al.*, 1977), was einen weiteren Hinweis auf eine zusätzliche Glycosyltransferase darstellt. Wäre NeoM tatsächlich bifunktional, könnte die Bildung von RIB durch diese Mutante nicht erklärt werden. Trotz dieser Hinweise wurden in dieser Arbeit Enzymtests mit NeoM und RIB als Akzeptor durchgeführt. Es konnte, wie erwartet, kein Umsatz nachgewiesen werden.

Trotz der hohen Anzahl der Glycosyltransferasen, die in die Familie GT4 eingruppiert worden sind, sind nur vier Glycosyltransferasen dieser Familie in ihrer 3D-Struktur charakterisiert worden: WaaG von *E. coli* transferiert einen Glucoserest von UDP-Glc auf L-Glycero-D-mannoheptose und stellt ein wichtiges Enzym in der Lipopolysaccharidsynthese dar (YETON *et al.*, 2000; MARTINEZ-FLEITEZ *et al.*, 2006). PimA von verschiedenen Mycobakterien überträgt einen Mannosylrest auf ein Inositolphosphat während der Synthese von Lipoglycanen (GUERIN *et al.*, 2007) und AviGT4 von *S. viridochromogenes* katalysiert die Übertragung eines aktivierten Eurenanzuckers auf L-Lyxose in der Avilamycinbiosynthese (HOFMANN *et al.*, 2005; MARTINEZ-FLEITEZ *et al.*, 2006). Die vierte strukturell charakterisierte und zu NeoM und

KanM1 ähnlichste Glycosyltransferase (18 % bzw. 19 % identische Aminosäuren) ist MshA aus der Mycothiolbiosynthese (siehe Abb. 4.1) von *Corynebacterium glutamicum* (VETTING *et al.*, 2008). Mycothiol wird in allen Actinobakterien zur Aufrechterhaltung des zellulären Redoxpotenzials gebildet (NEWTON *et al.*, 1996). MshA-Homologe wurden deshalb auch in *Mycobacterium tuberculosis*, *S. coelicolor* und *Nocardia farcina* gefunden und biochemisch charakterisiert (VETTING *et al.*, 2008). MshA überträgt (wie NeoM und KanM1) einen GlcNAc-Rest von UDP-GlcNAc auf einen Cyclitolakzeptor (NEWTON *et al.*, 2006). Vergleicht man die ersten Schritte der Mycothiolbiosynthese (siehe Abb. 4.1) und der Paromaminsynthese (siehe Abb. 1.8), so sieht man, dass sowohl die Glycosyltransferase-, wie auch die nachfolgende Deacetylasereaktion mit ähnlichen Substraten verläuft. Der Proteinsequenzvergleich von MshA, NeoM und KanM1 zeichnet sich trotzdem nur durch eine geringe Anzahl an identischen Aminosäuren aus (vergl. Abb. 4.2). Dennoch lassen sich auch bei NeoM und KanM1 konservierte charakteristische Aminosäurereste finden. Abb. 4.2 zeigt einen Ausschnitt aus dem Proteinvergleich. Die in dieser Abb. rot markierten Aminosäurereste sind bei MshA für die Bindung und Ausrichtung des UDP-Restes verantwortlich (VETTING *et al.*, 2008). Die grün markierten Reste wechselwirken spezifisch mit dem GlcNAc-Rest. Darüber hinaus stellten VETTING *et al.* (2008) weitere spezifische Wechselwirkungen der Peptidatome des Proteins mit UDP-GlcNAc fest. Diese Wechselwirkungen sind aus der Primärsequenz für NeoM und KanM1 nicht nachzuweisen, da sie nur bedingt (über sterische Einflüsse) von den Seitenketten abhängig sind. Des Weiteren sind die Aminosäurereste, die die Bindetasche in MshA für den Zuckerakzeptor bilden, ebenfalls in NeoM und KanM1 ähnlich (in Abb. 4.2 unterstrichen).

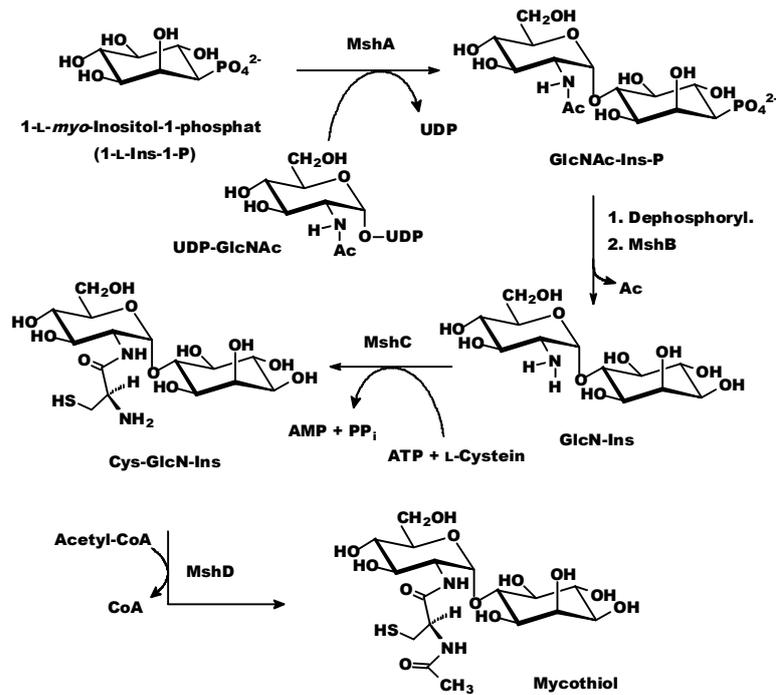


Abbildung -4.1- Biosynthese von Mycothiol. GlcNAc-Ins-P = 1-O-(2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-D-myo-inositol-3-phosphat; GlcN-Ins = 1-O-(2-Amino-1-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-D-myo-inositol; Cys-GlcN-Ins = 1-O-[2-[[*(2R)*-2-Amino-3-mercapto-1-oxopropyl]amino]-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl]-D-myo-inositol; Dephosphoryl. = Dephosphorylierung durch unbekannte Phosphatase.

NeoM	--MRDTPPFHHDVYTA ^R AEFDVAGGCMQVQILRDSRELDADRGVEQIVMTVGFPLPFR	58
KanM1	MRVLRDTEFYHHDVYDSW ^R AEFDVAGGCMQVQILRMSRALAEELCVRQOVLTVGFPLPFR	60
MshA	--NRVAMISMHTSPDQQ ^R GTGDS-GGMNYIILSTATEI ^A KQGLEVDITRATRPSQGET	56
	:*::: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NeoM	VDREGLRVRYTRAEDPRLRSEL ^T GLYGLNQAMLAAYLTACAPLRRRTWRPDLVYHADGOL	118
KanM1	RDSENLVYRITRAFLPRLRSRIT ^T GLYGLNQAMLAALTECYKLRRRMPADLTOVHLDGOL	120
MshA	VRVAENLRVINIAAGPYEGLSKEELP ^T QLAAFTGCMESPTTRREKVIYDILHSHVWLSQGV	116
	:* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NeoM	WALLAGPLVSRDVGAPYCL ^T LHCSKLDASTPEPMSRFRDLQHRLVAAAERTALRRARRVSTL	178
KanM1	WALLAGPVAAEDVGVPTVY ^T VHCSREAVYCPMSTVDRIQHPLVYAVERNALRRAGITTL	180
MshA	GMWLR----DDMRIPLIHTA ^H ELAAVKNSTYRDSPTPESEARRICEQQQLVDNADVLAVN	171
	** : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NeoM	TSRTADTVARLDPLDRALV ^D VDLDPDSVG-DVRFV ^R AEAEETVRSLEGP-AGREVVGWVG	235
KanM1	TEPTATYLAABEGAAQRV ^I DDVVDAYD ^D DRRAEAP-AEVE ^R LKKRFLPQEGGPIVIGVG	239
MshA	TQHEMQDLHHHEDAD ^P DRISVYVSPGADVELYSPGNDRATERSRREL ^G IP-LHTKVIYAV ^R VG	230
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NeoM	^R VYARE ^K GRD ^R EY-AMAE ^R MDAGSGAPGAYFAVYG-DGP--CRE ^R MEAAVEAAGLAD ^R EYF	291
KanM1	^R YARE ^K GRHAYQAVARE ^L ADAGR---DFT ^L IVVG-DGP--QRAD ^M EAAVEAAGLAD ^R RFV	293
MshA	^F LCFT ^K GPQV ^L IKAVAA ^L FD ^R DF ^R N ^L LV ^I ICGG ^S SG ^N AT ^P DTY ^R HMAE ^E EGV ^E K ^R IR	290
	*: ** : : *:* * : * : * : *	
NeoM	TGFLPHDAVESVMTALD ^V LVMP ^S AHE ^L EGSAL ^R AMVCGTPVACTAVGGLRDTVGSVTPS	351
KanM1	TGFLPHDEI ^F AVMTALD ^V LVMP ^S VH ^E ELGSA ^L AVL ^R AMAGTPVAA ^T AVGGLCDTVGKVTPS	353
MshA	LDPRPSELDVAVYRAAD ^I VAVP ^S FH ^S SPGLVAM ^L AGASGTPV ^L AAVVG ^L PIAVAE ^R GTG	350
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NeoM	LLYFRGDVAALTRAAGDAV ^T DAER ^H RTYA ^A AVP ^D ILGRY ^G ADTV ^E R-AL ^E HY ^R IAV ^G RA	410
KanM1	LLAAPGOVATLARTV ^K RV ^D DD ^P APV ^L AL ^R LAGREN ^L AD ^E FGV ^H HAAGL ^A HY ^R EV ^L GKE	413
MshA	LLVDGHS ^P HAMADALA ^T LLDD ^D ET ^R EM ^S DAVE ^H ART ^F SW ^L ATA ^A Q ^L SS ^L Y ^D AD ^A EN ^N	410
	** : * : * : * : *	

Abbildung -4.2- Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich zwischen NeoM, KanM1 und MshA. Charakteristische AS sind farbig markiert. Rot = spezifische Wechselwirkungen mit UDP-Rest; grün = spezifische Wechselwirkungen mit GlcNAc-Rest; Unterstrichen = AS, die die Cyclitolbindetasche bilden; * = identische AS; : = konservativer Aminosäureaustausch. Verwendet wurde die Proteinsequenz von MshA aus *Corynebacterium glutamicum* (Accession-Nummer: 3C48_B).

Das Programm LOOPP (vergl. <http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>) bietet die Möglichkeit, dreidimensionale Faltungen von Proteinen zu erstellen. Dabei werden die mögliche Raumstruktur kurzer Sequenzabschnitte mit der wirklichen Anordnung ähnlicher Sequenzen in bekannten, kristallographisch untersuchten Proteinen verglichen. So kann gezeigt werden, dass die simulierte Struktur von NeoM mit der tatsächlichen Struktur von MshA, trotz einer Ähnlichkeit von weniger als 20 % identischer Aminosäuren, in etwa übereinstimmt (siehe Abb. 4.3 A). Ebenfalls ist aus der prinzipiellen Überlagerung der Positionen und Orientierungen der α -Helices und β -Faltblätter die GT-B-Faltung von NeoM ersichtlich (vergl. Abb. 4.3 A), da MshA GT-B-Faltung besitzt (VETTING *et al.*, 2008). Vergleicht man dagegen die Struktur von NeoM mit der von SpsA, einer Glycosyltransferase von *B. subtilis*, die kristallographisch untersucht, in die Familie GT2 eingruppiert worden ist und GT-A-Faltung aufweist (CHARNOCK & DAVIES, 1999), so stellt man keine Übereinstimmung in der Anordnung der α -Helices und β -Faltblätter fest (Abb. 4.3 B). Die gleichen Tatsachen lassen sich mit der simulierten Struktur von KanM1 feststellen.

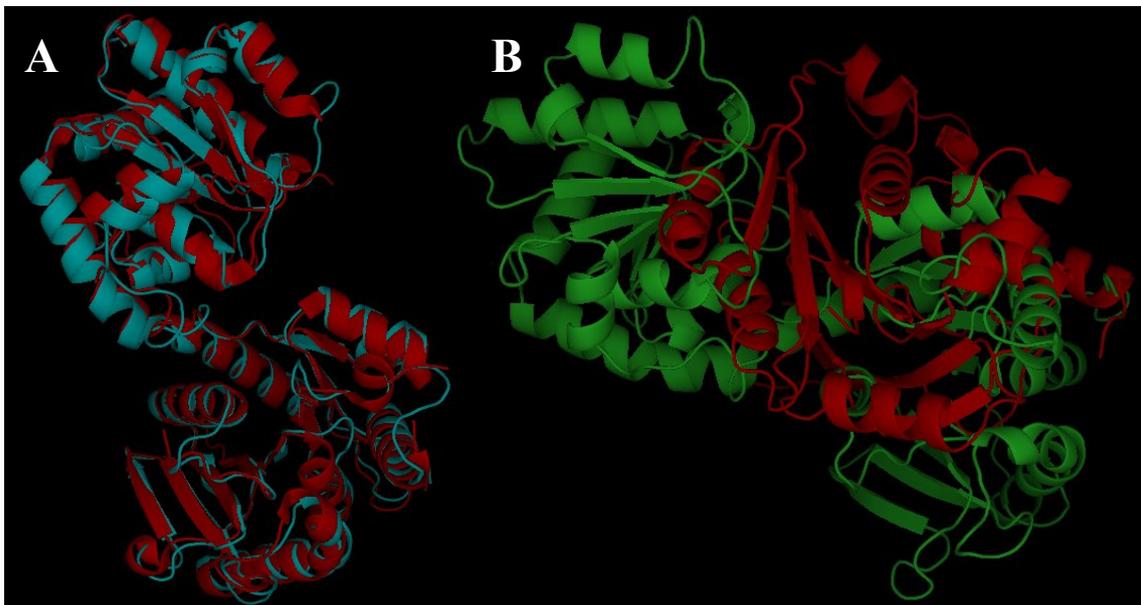


Abbildung -4.3- Die dreidimensionalen Strukturen von NeoM, MshA und SpsA. (A) Überlagerung der Kristallstruktur von MshA (rot, pdb-Nummer 3C48) mit der simulierten Struktur von NeoM (blau). (B) Überlagerung der Kristallstruktur von SpsA (rot, pdb-Nummer 1QG8) mit der simulierten Struktur von NeoM (grün). Die Struktur von NeoM wurde mit Hilfe des Programms Loopp simuliert. Die Vergleiche wurden mit Hilfe des Programms PyMol erstellt.

Untereinander sind die Glycosyltransferasen der AGA-Biosynthesen wesentlich ähnlicher. Betrachtet man z.B. die identischen Aminosäuren (siehe Abb. 4.4), so fällt die hohe

Ähnlichkeit der 2-DOS-M/M1-Enzyme untereinander auf (53 % - 91 % identische Aminosäurereste). BtrM weist, wie viele Gene aus dem *btr*-Cluster, eine geringere Ähnlichkeit zu seinen Homologen auf (~ 30 % Identität). Da dieses Protein aus *B. circulans* stammt, einem Bakterium, das nur entfernt mit Actinomyceten verwandt ist, könnte die geringe Identität der Primärstruktur auf der Anpassung an eine völlig andere Codonverwendung in den Genen beruhen. Trotzdem gehört BtrM in die Gruppe der M/M1-Enzyme (vergl. 1.2.1). ForM, FraM und IstM weisen ebenfalls nur geringe Ähnlichkeit zu den anderen M/M1-Enzymen auf (30 % - 39 %). In den Biosynthesen von Fortimicin und Istamicin ist *scyllo*-Inosamin bzw. 2-Desoxy-*scyllo*-inosamin das Cyclitol, welches als Akzeptor in der Glycosyltransferasereaktion benutzt wird (vergl. PIEPERSBERG *et al.*, 2007). Die Proteine KanM2, TobM2 und GenM2 bilden eine weitere Gruppe (58 % - 75 % Identität), die sich klar von den M/M1-Enzymen abtrennen lässt (~ 30 % identische Aminosäuren). Genauso sind die möglichen Ribosyltransferasen (A-Enzyme in Abb. 4.4) untereinander sehr ähnlich (77 % identische Aminosäuren), während die Anzahl der identischen Aminosäurereste im Vergleich zu den anderen Glycosyltransferasen bei >20 % liegt. Genauso verhält es sich bei den F-Enzymen der NEO-Familie (repräsentiert durch NeoF in Abb. 4.4) und HygF, die ebenfalls nur geringe Ähnlichkeiten zu den anderen AGA-Glycosyltransferasen aufweisen.

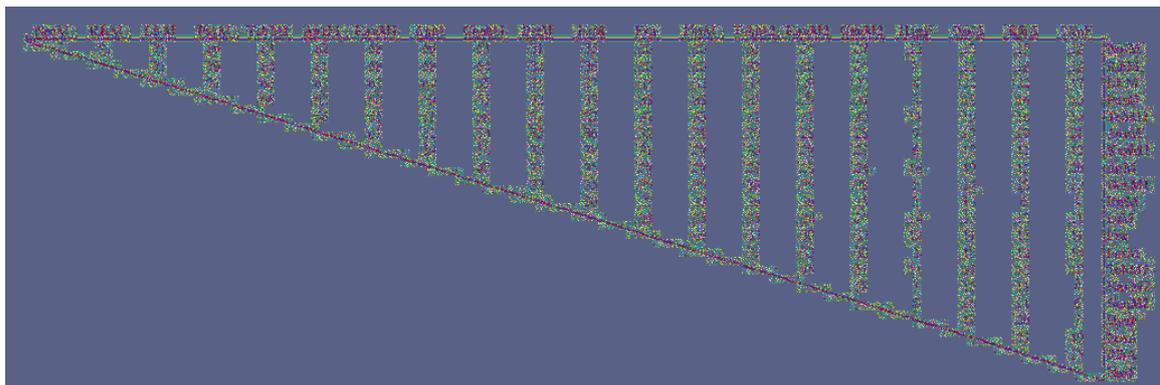


Abbildung -4.4- Ähnlichkeiten von verschiedenen AGA-Glycosyltransferasen. Die Zahlen geben die Anzahl (in %) der identischen Aminosäurereste an. Die Accession-Nummern der zugehörigen Cluster sind in Tab. 1.1 angegeben.

Aus der Gruppierung der Glycosyltransferasen aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit lassen sich auch Rückschlüsse auf ihre möglichen Funktionen ziehen. So lassen sie sich eindeutig in Gruppen einteilen, aus denen auch ihre verschiedenen möglichen Funktionen

hervorgehen (siehe Abb. 4.5). Da in dieser Arbeit bewiesen wurde, dass es sich bei NeoM und KanM1 um 2-DOS : 4-*N*-Acetylglucosaminyltransferasen handelt, ist es wahrscheinlich, dass auch die in Abb. 4.5 orange hinterlegten Enzyme diese Aktivität aufweisen.

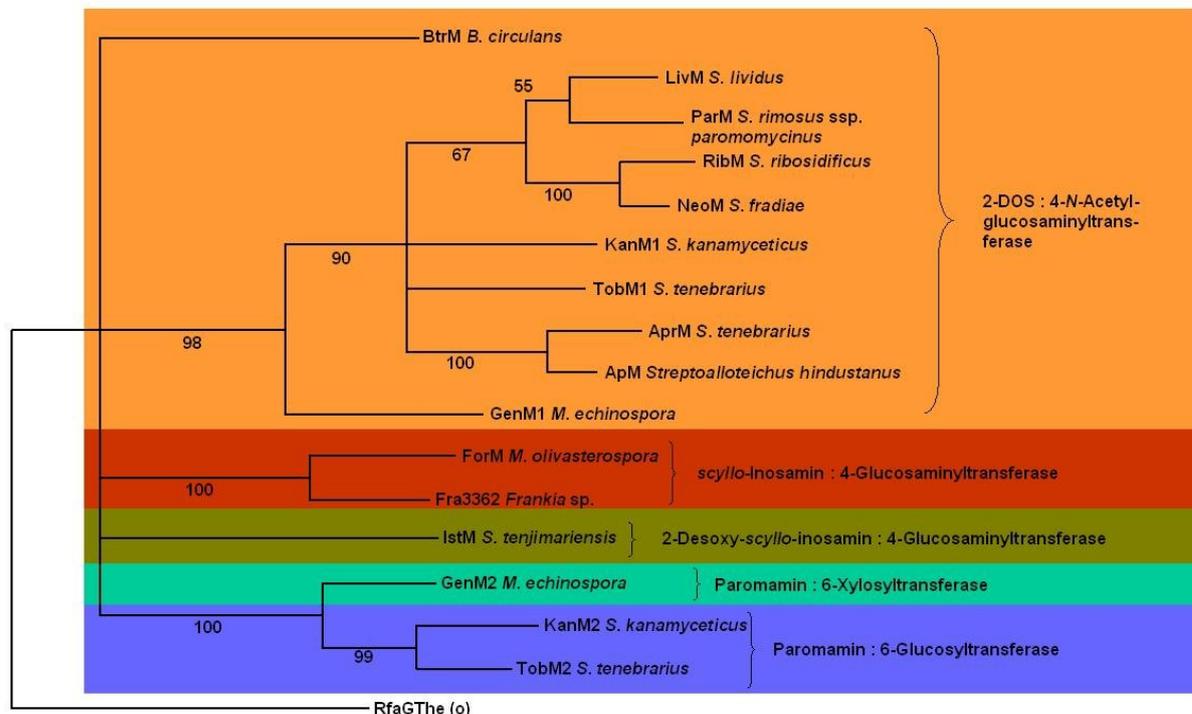


Abbildung -4.5- Stammbaum verschiedener AGA-Glycosyltransferasen. Das Phylogramm wurde durch 500faches Bootstrapping mit dem Programm PAUP 3.1 erzeugt. Als Outgroup diente die Glycosyltransferase RfaG von *Thermoanaerobacter tengcongensis* MBT4 (Accession-Nummer: AAG44711.7). Die vermuteten Glycosyltransferaseaktivitäten sind farblich hinterlegt.

4.2.2 Die Glycosyltransferase NeoF

Neben NeoM (siehe 4.2.1) ist eine weitere Glycosyltransferase für den Aufbau von NEO erforderlich (vergl. Abb. 1.9). Unter 4.2.1 wurde bereits diskutiert, warum NeoM nicht, wie von HUANG *et al.* (2005) postuliert, in der NEO-Biosynthese auch den Glycosyltransferaseschritt von RIB zu Hydroxy-NEO C katalysieren kann. Die in 4.2.1 gemachten Überlegungen werden zusätzlich durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigt: Das in nativer Form produzierte Protein NeoF (vergl. Tab. 3.5) übertrug den *N*-Acetylglucosaminrest von UDP-GlcNAc auf RIB (vergl. Abb. 3.9). Unter den gewählten Bedingungen (vergl. 2.28.1) war jedoch keine Aktivität von NeoM zu beobachten und es wurde durch NeoF auch kein UDP-Glc oder TDP-Glc mit RIB

umgesetzt. Offensichtlich stellen also weder RIB für NeoM noch UDP-Glc und TDP-Glc für NeoF Substrate dar, was mit der postulierten Biosynthese übereinstimmt (vergl. 1.3.2). Die Bildung von 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO-C (vergl. Abb. 1.9) gleicht der Bildung von 2'-*N*-Acetylparomamin durch NeoM bzw. KanM1 (vergl. 4.2.1 und Abb. 1.8). Es war deshalb wahrscheinlich, dass auch das durch NeoF gebildete 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO-C in einem nachfolgenden Schritt zu 6'''-Hydroxy-NEO-C deacetyliert wird. Tatsächlich katalysierte NeoD auch diese Reaktion (siehe Abb. 3.7), so dass UDP-GlcNAc tatsächlich das natürliche Substrat von NeoF darstellt.

Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch YOKOYAMA *et al.*, 2008, und FAN *et al.*, 2008. Beide Gruppen wiesen ebenfalls UDP-GlcNAc und RIB als Substrate für NeoF nach. Interessanterweise beobachteten beide Gruppen einen vollständigen Umsatz von RIB zu 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO-C. Dies könnte an der Tatsache liegen, dass sie gereinigtes NeoF benutzten, während in dieser Arbeit zellfreie Rohextrakte verwendet wurden. Rohextrakte enthalten eine Vielzahl von Enzymen, für die UDP-GlcNAc als wichtiges Intermediat des Primärstoffwechsels ein Substrat darstellt. So wurde UDP-GlcNAc in den Testansätzen möglicherweise zu einem erheblichen Anteil durch konkurrierende Reaktionen verbraucht, so dass es für einen Umsatz mit NeoF nicht mehr zur Verfügung stand.

NeoF ist, wie NeoM und KanM1 auch, ein Mitglied der CAZy-Familie GT4. Die zu NeoF ähnlichsten Glycosyltransferasen, Cmaq_1456 von *Cladovirga maquilensis* (10 % Identität), WaaG von *E. coli* (7 % Identität) und RfaG von *Magnetospirillum magneticum* (16 % Identität), sind, außer WaaG, biochemisch noch nicht analysiert worden. Die 3D-Struktur von WaaG wurde durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (MARTINEZ-FLEITEZ *et al.*, 2006). Auch hier konnten hoch konservierte Aminosäurereste in der Bindestelle des NDP-Zuckers (rot in Abb. 4.6; GEREMIA *et al.*, 1996) identifiziert werden. Diese Reste sind in NeoF und seinen Homologen konserviert (siehe Abb. 4.6).

Abbildung -4.6- Ausschnitt des Aminosäuresequenzvergleiches zwischen den F-Enzymen der AGA-Biosynthesen und ähnlichen Glycosyltransferasen der GT4-Familie. Reste, die für die Bindung des NDP-Zuckers verantwortlich sind, sind rot dargestellt. Cmaq_1456 = Glycosyltransferase von *Cladviriga maquilingsis* (ABW02281); WaaG = Glycosyltransferase von *E. coli* (AAC69667); RfaG = Glycosyltransferase von *Magnetospirillum magneticum* (YP_422890). Die Accession-Nummern der AGA-Cluster sind in Tab. 1.1 angegeben. * = identische Aminosäurereste; : = konservativer Aminosäureaustausch.

Der Vergleich der simulierten dreidimensionalen Struktur von NeoF (vergl. 4.2.1) mit der tatsächlichen Struktur von WaaG (siehe Abb. 4.7) zeigte, dass die beiden Strukturen insbesondere im Bereich der C-Termini gut übereinstimmen, während in Teilen der übrigen Proteinkette nur geringe Übereinstimmungen zu finden waren. Diese Tatsache ging auch bereits aus dem Primärstrukturvergleich hervor (Abb. 4.6). Da WaaG aus dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* isoliert wurde und eine andere Funktion besitzt, ist es mit NeoF nicht nahe genug verwandt, um eine größere Aminosäuresequenzähnlichkeit zu haben. Auch zu MshA (siehe 4.2.1), welches aus den näher verwandten Mycobakterien stammt, weist NeoF keine stärkere Sequenzähnlichkeit auf (11 % identische Aminosäuren). Für diese geringen Sequenzähnlichkeiten ergibt sich dennoch eine erstaunlich gute Übereinstimmung im 3D-Strukturvergleich in Abb. 4.7. So kann mit Recht geschlossen werden, dass die in der Abb. 4.6 postulierten konservierten Aminosäurereste tatsächlich die essentiellen Beiträge zur NDP-Zuckerbindestelle liefern.

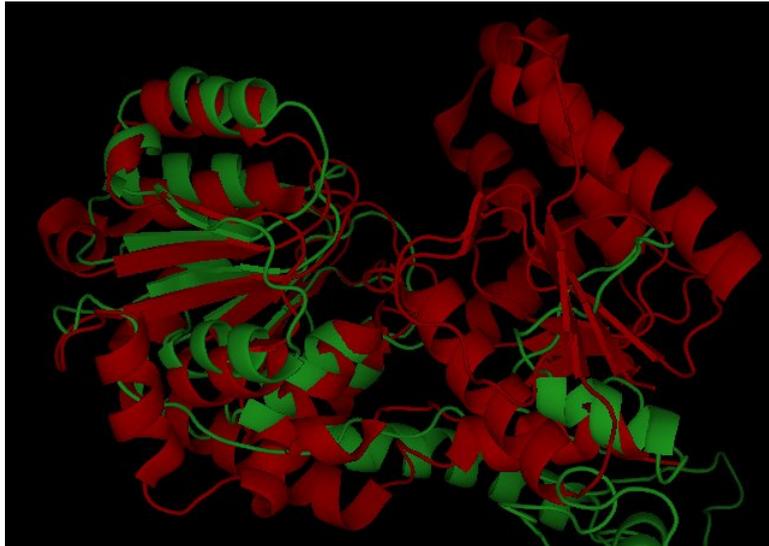


Abbildung -4.7- Die dreidimensionale Struktur von NeoF und WaaG. Gezeigt ist die Überlagerung der Kristallstruktur von WaaG (rot, pdb-Nummer 2IV7) mit der simulierten Struktur von NeoF (grün). Die Struktur von NeoF wurde mit Hilfe des Programms Loopp simuliert. Die Vergleiche wurden mit Hilfe des Programms PyMol erstellt.

4.2.3 Die Glycosyltransferase KanM2

Die postulierte Biosynthese von KAN (vergl. 1.3.1 und 1.3.3) bedingt neben der Glycosylierung von 2-DOS durch KanM1 (siehe Abb. 1.8) eine weitere Glycosyltransferasereaktion (siehe Abb. 1.10), um die für die KAN-Familie typische 4,6-pseudotrisaccharidische Struktur (vergl. 1.2) aufzubauen. KanM2 ist der einzige dafür infrage kommende Kandidat. Dafür spricht auch die Tatsache, dass für alle analog verlaufenden Biosynthesen 2-DOS-haltiger AGAs (TOB und GEN) nahe verwandte M2-Enzyme in den jeweiligen Biosyntheseclustern codiert werden (siehe 1.2.2). Diese zweite Glycosylierung wurde vermutlich in der frühen Evolution dieser Biosynthesewege aus den deutlich verwandten M1-Enzymen entwickelt (vergl. Abb. 4.4).

Allerdings konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Enzymansätzen (vergl. 3.5.2) die postulierte Aktivität von KanM2 und TobM2 mit keinem der verwendeten aktivierten Zucker oder Akzeptoren nachgewiesen werden. Als mögliche Ursachen dafür kommen neben der Inaktivität der Enzyme (1) eine falsche Zuordnung der Enzymfunktion der M2-Enzyme oder (2) die Verwendung eines falschen Akzeptor- bzw. (3) Donorsubstrates in Frage.

Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass in den in dieser Arbeit durchgeführten Enzymtests kein Umsatz aufgrund einer inkorrekten Zuordnung der Enzymfunktionen zu

beobachten war. Die M2-Enzyme sind eindeutig näher miteinander verwandt (vergl. Abb. 4.5) und grenzen sich gegenüber den M/M1-Enzymen ab (siehe Abb. 4.4). Zwar ist die Ähnlichkeit zu anderen, charakterisierten Glycosyltransferasen geringer, trotzdem weisen die M2-Enzyme ebenso wie die M1-Enzyme eindeutige Signatursequenzen für Glycosyltransferasedomänen in ihrer Primärstruktur auf. So zeigt die Simulation der dreidimensionalen Struktur von KanM2 auch eindeutig die erwartete hohe Ähnlichkeit zu der 3D-Struktur der Glycosyltransferase MshA und ist somit eindeutig eine Glycosyltransferase mit GT-B-Faltung (siehe Abb. 4.8).

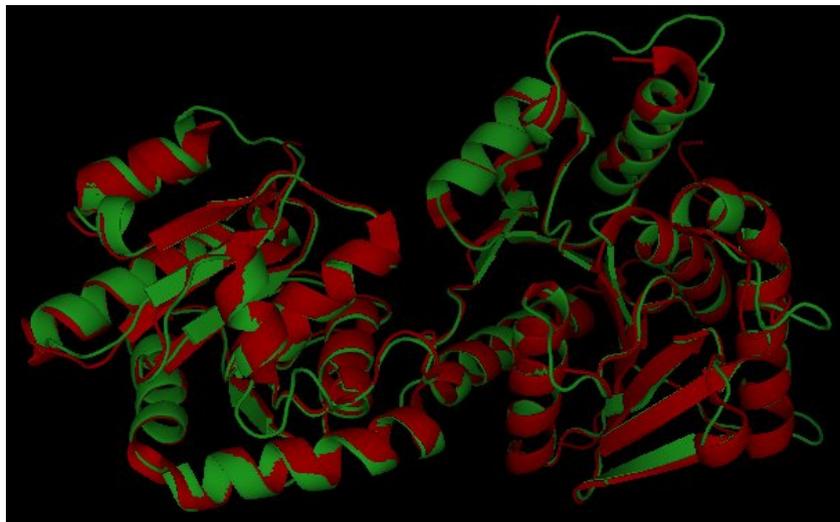


Abbildung -4.8- Die dreidimensionale Struktur von KanM2 und MshA. Gezeigt ist die Überlagerung der Kristallstruktur von MshA (rot, pdb-Nummer 3C48) mit der simulierten Struktur von KanM2 (grün; vergl. auch MshA/NeoM, Abb. 4.3). Die Struktur von KanM2 wurde mit Hilfe des Programms Loopp simuliert. Die Vergleiche wurden mit Hilfe des Programms PyMol erstellt.

Die für die M2-Reaktion in Frage kommenden Akzeptorsubstrate 2-DOS, Paromamin und 2'-N-Acetylparomamin zeigten weder mit KanM2 noch mit TobM2 einen Umsatz. Die Wahrscheinlichkeit, dass 2-DOS der natürliche Akzeptor ist, ist eher gering, weil es bedeuten würde, dass KanM1 und KanM2 um das gleiche Substrat konkurrieren müssten. Des Weiteren spricht gegen 2-DOS als Substrat für KanM2, dass das hypothetische 6-Glucosyl-2-DOS nicht isoliert werden konnte, während das Produkt der KanM1-Reaktion (und KanN-Reaktion, siehe 4.4) Paromamin im Kulturmedium von *S. kanamyceticus* nachgewiesen wurde (CLAES *et al.*, 1973). Ob Paromamin oder 2'-N-Acetylparomamin das natürliche Substrat darstellt, lässt sich nicht klären. Für Paromamin als Substrat spricht, dass die Deacetylase KanN 2'-N-Acetylparomamin als Substrat erkennt und, unter

der Voraussetzung einer strikt sequenziellen Reaktionsfolge, das Substrat für KanM2 herstellt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Deacetylierung der 2'-Position nicht auch nach dem 6-Glucosyltransfer auf 2'-*N*-Acetylparomamin stattfinden kann.

Das tatsächliche Donorsubstrat der zweiten Glycosyltransferasereaktion der KAN-Biosynthese ist bisher unbekannt. Aus dem analog verlaufenden GEN-Biosyntheseweg gibt es jedoch aufgrund der chemischen Strukturen einiger identifizierter Intermediate den Hinweis, dass ein neutraler Zucker (in diesem Fall D-Xylose) und nicht, wie bei den M/M1-katalysierten Reaktionen (vergl. 4.2.1), *N*-Acetyl-D-glucosamin als Donorsubstrat übertragen wird (vergl. PIEPERSBERG *et al.*, 2007). D-Xylose ist bisher im Stoffwechsel nur in UDP-aktivierter Form gefunden worden (SEIFERT, 2004) und die nahe Verwandtschaft der M1/M2-Enzyme spricht ohnehin dafür, dass ein UDP-aktivierter Zucker das Donorsubstrat darstellt. Auch konnte eine *kanD2-knock-out*-Mutante von *S. kanamyceticus* isoliert werden. KanD2 katalysiert vermutlich den auf die KanM2-Reaktion folgenden Biosyntheseschritt (vergl. 1.3.3 und Abb. 1.10). Diese Mutante häufte 6-*O*-Glucosylparomamin an (U. WEHMEIER, pers. Mitteilung), was ebenfalls ein deutlicher Hinweis für die Übertragung des neutralen Zuckers D-Glucose durch KanM2 ist. UDP-Glc ist die im Metabolismus der Bakterien ubiquitär vorkommende Form nukleotidaktivierter Glucose (MICHAL, 1999). Fütterungsexperimente mit radioaktiv markierter Glucose zeigten, dass UDP-Glucose der wahrscheinliche Vorläufer von Kanosamin in *B. aminoglucoisidicus* ist (UMEZAWA *et al.*, 1967b & 1968; GUO & FROST, 2002). Demnach stellt eindeutig UDP-Glc das favorisierte Substrat für KanM2 dar. Deshalb muss in Zukunft versucht werden, die Reaktionsbedingungen und die Enzymaktivität in den KanM2-Tests zu optimieren. Außerdem muss möglichst mit gereinigtem Enzym gearbeitet werden.

4.3 Die Glycosyltransferase der GT2-Familie: HygF

Die postulierte Galactosyltransferase HygF (vergl. 1.2.3) lies sich als einzige der in dieser Arbeit behandelten Glycosyltransferasen direkt in *E. coli* löslich im mit Coomassie gefärbtem PAA-Gel sichtbaren Mengen als C- und N-His-Fusionsprotein überproduzieren (siehe Abb. 3.11). Die Enzymtests (vergl. 2.28.1 und 3.6.2), die mit diesen

Proteinextrakten durchgeführt wurden, zeigten jedoch keine nachweisbare Bildung eines neuen Produktes. Um ausschließen zu können, dass die fehlende Aktivität auf die His-Tags zurückzuführen war, sollten die Tests auch mit nativem HygF wiederholt werden. Da eine Überproduktion von nativem HygF weder in *E. coli* noch in den verwendeten Streptomyccetenstämmen nachweisbar war (vergl. Tab. 3.7), blieb als weitere Möglichkeit die Abspaltung des His-Tags von N-His-HygF (vergl. Tab. 2.2), was allerdings zum unspezifischen Abbau des Proteins führte. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass beachtliche Mengen des N-His-Fusionsproteins z.B. mit *E. coli* JM109 (DE3)-pET16/hygF überproduziert werden konnten (vergl. Abb. 3.11), während mit *E. coli* JM109 (DE3)-pET11/hygF unter den gleichen Anzuchtbedingungen (verwendetes Medium, Temperatur, Induktorkonzentration, vergl. Tab. 3.7) kein natives Protein gebildet wurde. Als Ursache für dieses Phänomen könnte zum Einen das generelle Problem GC-reicher Gene und die damit verbundene für *E. coli* fremde Codon-Usage in Frage kommen. Zwischen dem T7-Promotor des pET16b-Vektors und dem Translationsstartcodon von *hygF* ist die Codierungssequenz für einen 10x His-Tag und weitere Aminosäuren eingefügt (siehe Tab. 2.2). Diese Sequenz ist AT-reich und enthält die gängigen *E. coli*-Codons für Aminosäuren, so dass bei der Translation erst ein kurzes Oligopeptid mit normaler Codon-Verwendung gebildet wird. Es kann sich so ein fester Komplex von Oligopeptid, Ribosom und mRNA bilden bevor die GC-reicheren Codons des heterologen Gens translatiert werden sollen. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Komplex zerfällt, wenn sich die Translationrate durch den Einbau einer seltenen tRNA verlangsamt, ist gering. Im pET11aP-Vektor dagegen folgen unmittelbar auf den T7-Promotor die GC-reichen Codons des heterologen Gens. Verlangsamt sich die Translation direkt bei den ersten Triplets, so könnte der Translationskomplex wieder zerfallen und eine Überproduktion wäre so nicht beobachtbar.

Als weitere Ursache für die fehlende Bildung von nativem HygF könnte man vermuten, dass dieses Protein für die Wirtsstämme toxisch wirkt, da es z.B. als potenzielle Galactosyltransferase der Zelle ein wichtiges Primärstoffwechselprodukt (UDP-Gal) entziehen könnte. C- und N-His-HygF könnten entweder reduzierte oder gar keine Aktivität aufweisen und sich deshalb problemlos von *E. coli* überproduzieren lassen.

Nach der hypothetischen Biosynthese (vergl. 1.2.3 und PIEPERSBERG *et al.*, 2007) können zwei aktivierte Zucker als mögliche Substrate von HygF auf 2-DOS übertragen werden: Entweder direkt aktivierte Galactose (vermutlich als UDP-Gal) oder zuerst aktivierte Glucose, die dann zu Galactose epimerisiert wird. Da der postulierte aktivierte Zucker

UDP-Gal kommerziell nicht erhältlich war, wurden die Tests mit UDP-Glc, TDP-Glc und UDP-GlcNAc durchgeführt (vergl. 3.6.2). Mit keinem dieser Substrate ließ sich mit 2-DOS ein Umsatz beobachten. Das stützt die Hypothese, dass eine spätere Epimerisierung der C-4'-Position des aus 2-DOS und aktivierter Glucose gebildeten Pseudodisaccharides nicht stattfindet, sondern wie zu erwarten direkt aktivierte Galactose umgesetzt wird.

Weitere Hinweise auf die mögliche Aktivität von HygF lassen sich aus der Aminosäuresequenz ableiten. HygF ist als einzige der AGA-Glycosyltransferasen in die GT2-Familie eingruppiert worden (vergl. www.cazy.org) und sollte somit eine andere Faltung (GT-A, vergl. 1.4) aufweisen. HygF weist entfernte Ähnlichkeit (22 % identische Aminosäuren) zu dem GT2-Enzym SpsA von *B. subtilis* auf, welches als UDP-abhängige Glycosyltransferase beschrieben und in seiner Kristallstruktur aufgeklärt wurde (CHARNOCK & DAVIES, 1999). Ebenfalls findet sich eine Ähnlichkeit (26 % identische Aminosäuren) zu der humanen Galactosyltransferase ppGalNAcT-2, welche GalNAc von UDP-GalNAc auf Serin- oder Threoninreste von Proteinen überträgt (FRITZ *et al.*, 2006). Einige für die Bindung von UDP-aktivierter Galactose charakteristische Aminosäurereste können auch in der Sequenz von HygF gefunden werden (siehe Abb. 4.9). So koordinieren die rot eingezeichneten Reste sowohl bei SpsA als auch bei PpGalNAcT-2 (und dessen Isoenzymen) spezifisch den UDP-Rest (teilweise über Mg^{2+} -Ionen), während die grünen Reste Teile einer mit Wasser gefüllten, hydrophilen Tasche darstellen, in die sich der Galactosylrest einlagert.

Die simulierte Struktur von HygF stimmt gut mit der Kristallstruktur von SpsA überein (siehe Abb. 4.10). Man erkennt deutlich die im Vergleich zu den simulierten GT-B-Glycosyltransferasen NeoM, KanM2 und NeoF (siehe Abb. 4.3, Abb. 4.7 und Abb. 4.8) kompaktere Struktur der GT-A-Faltung (vergl. 1.4). Die Simulationen sind in guter Übereinstimmung mit der Theorie.

```

SpsA      ---MPKVSVMTSYNKS-DYVAKSISSILSQT--FSDFELEMDDNSNEE-----TL 46
PpGalNAcT-2  WRVDLPATSVVITFHNEARSALLRTVVSVLKKSPPHLIKEIILVDDYSNDPEDGALLGKI 120
HygF      PERRTAVAVTVVITRTRPALLARALASAQTQSPPGGFEHLVVADDCCDTH-----AL 55
          : :*          : :: *   : :          : : **   :          :

SpsA      NVIRPFLNDNRVREY-ORDISGVKER-----TEKTRYAA 79
PpGalNAcT-2  EKVRVLRNDRLEGLMRSRVGADAAQAKVLTFLDSHCECNEHWLEPLLERVAEDRTRVVS 180
HygF      LRGRELPQNVRWLLA-GRGPGEVSGP-----GRSSR 85
          * : :: *   : *          *

SpsA      LINQAIEMAEGEYITATDDN-----TYMPDRLLKRVRELDTHPEKAVIYS--- 125
PpGalNAcT-2  PIIDVINMDNFQYVGASADLKGGFQWNLVFKWDYMTPEQRRSRQGNFVAPIKTEMIAGGL 240
HygF      LRNMAVRISSEPWIAFLDDDN-----EWE PDHLT SLLECARRTGHRVHS--- 130
          : : : : : * :          : : :

SpsA      -ASKTYHLNEN-----RDIVKETVRPAAQVTWN 152
PpGalNAcT-2  FVMDKFEFELGKYDMMMDVWGGENLEISFRVWQCGGSELIIPCSRVGHVFRKQHEYTFF 300
HygF      -QLRMFHFDGT-----PYLEQLDFWTAD 152
          : : :          *

```

Abbildung -4.9- Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich zwischen HygF und bekannten Galactosyltransferasen. Charakteristische Aminosäurereste sind farbig markiert. Rot = spezifische Wechselwirkungen mit UDP-Rest; Grün = Teile einer hydrophilen Tasche. Accession-Nummern: PpGalNAcT-2 = 2FFV_B; SpsA = NP391670; HygF siehe Tab. 1.1. * = identische Aminosäurereste; : = konservativer Aminosäureaustausch.

HygF besitzt außerdem eine signifikante Ähnlichkeit (48 % identische Aminosäuren) zu den putativen Glycosyltransferasen der Spectinomycinproduzenten *S. netropsis* (SpcF) bzw. *S. spectabilis* (SpcG). Beide Enzyme sind allerdings noch nicht biochemisch charakterisiert worden. Ihre postulierte Funktion weist die gleiche Regioselektivität wie HygF auf (vergl. 1.2.3). Sie übertragen den Zuckerrest von dTDP-Actinospectose (dTDP-3-Keto-4,6-dideoxyglucose) auf die C-5-Position des Cyclitols Actinamin unter Bildung von Spectinomycin (vergl. STUMPP *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2008).



Abbildung -4.10- Die dreidimensionale Struktur von HygF und SpsA. Gezeigt ist die Überlagerung der Kristallstruktur von SpsA (rot, pdb-Nummer 1QG8) mit der simulierten Struktur von HygF (grün). Die Struktur von HygF wurde mit Hilfe des Programms Loopp simuliert. Die Vergleiche wurden mit Hilfe des Programms PyMol erstellt.

4.4 Die Proteine NeoD/KanN

NeoD und KanN sind als mögliche Deacetylasen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu anderen Deacetylasen klassifiziert worden (ABOSHANAB, 2005; PIEPERSBERG *et al.*, 2007). Überraschenderweise publizierten KUDO *et al.* (2005a) den Befund, dass das zu NeoD und KanN homologe Protein BtrD eine neue Klasse von Nukleotidyltransferasen sei, welche keinerlei Ähnlichkeit zu bereits bekannten Nukleotidyltransferasen hatte. BtrD sollte die Bildung von UDP-Glucosamin aus Glucosamin-1-phosphat katalysieren. Sie stützten ihre Schlussfolgerung auf die Tatsache, dass sie die Bildung von UDP-Glucosamin in *in vitro*-Ansätzen mit BtrD-haltigen Rohextrakten von *E. coli* beobachten konnten. Eine von ihnen erzeugte $\Delta btrD$ -Mutante von *B. circulans* produzierte erst bei Zugabe von Paromamin wieder Butirosin, was allerdings nicht im Widerspruch zu der postulierten Deacetylaseaktivität von BtrD steht. Des Weiteren versuchten KUDO *et al.* (2005a) die postulierte Deacetylaseaktivität von BtrD durch die Inkubation von UDP-GlcNAc mit BtrD zu widerlegen, wobei sie keinen Umsatz feststellen konnten.

Unter den von KUDO *et al.* (2005a) gewählten Reaktionsbedingungen (vergl. auch 2.28.2) konnte die Bildung von NDP-aktivierter Glucose unter der Katalyse durch NeoD oder

KanN aus Glucose-1-phosphat und ATP, CTP, GTP, UTP, dATP, dCTP, dGTP oder dTTP nicht nachgewiesen werden (siehe 3.3.2). Die von KUDO *et al.*, 2005a, beschriebene Deacetylierung von UDP-GlcNAc konnte ebenfalls nicht mit NeoD oder KanN beobachtet werden. Eine Deacetylierung von UDP-GlcNAc wäre auch widersinnig, da das Hydrolyseprodukt UDP-Glucosamin das Edukt der Biosynthese von UDP-GlcNAc darstellt (vergl. MICHAL, 1999). Wahrscheinlich ist, dass NeoD und KanN, wie in Abb. 1.8 gezeigt, nur das Pseudodisaccharid 2'-N-Acetylparomamin deacetylieren können, damit die unnötige Hydrolyse von UDP-GlcNAc vermieden wird. Andere Deacetylasen, wie z.B. das LmbE-ähnliche Protein MshB von *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 wirken tatsächlich nur auf GlcNAc enthaltende Verbindungen, aber nicht auf UDP-GlcNAc selber (NEWTON *et al.*, 2000). Die Möglichkeit, die von PIEPERSBERG *et al.* (2007) postulierte Deacetylaseaktivität von KanN und NeoD zu testen, scheiterte zunächst an der Verfügbarkeit eines geeigneten Substrates (2'-N-Acetylparomamin, vergl. Abb. 1.8). Dieses konnte sowohl mit der heterolog produzierten Acetyltransferase AAC(2') aus *S. kasugaensis* (vergl. 2.28.3, Abb. 4.11 und HOTTA *et al.*, 1996) und mit den Glycosyltransferasen NeoM und KanM1 (vergl. Abb. 1.8) hergestellt werden. Die Inkubation des 2'-N-Acetylparomamins sowohl mit NeoD als auch mit KanN setzte Paromamin frei, welches eindeutig durch Vergleich mit einem authentischen Paromaminstandard identifiziert werden konnte (vergl. Abb. 3.7).

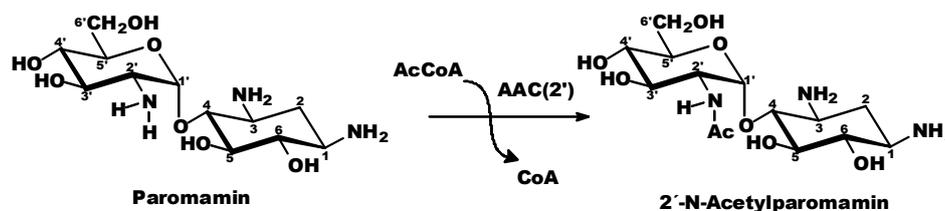


Abbildung -4.11- Darstellung von 2'-N-Acetylparomamin durch AAC(2') aus *S. kasugaensis*.

NeoD und KanN weisen zudem eine gewisse Ähnlichkeit zu den biosynthetischen Proteinen PIG-L des Menschen (Glycosylphosphatidylinositolbiosynthese; WATANABE *et al.*, 1999), MshB von *Mycobacterium tuberculosis* (Mycothiobiosynthese; vergl. Abb. 4.1; NEWTON *et al.*, 2000a) und Orf2* von *Actinoplanes teichomyceticus* (Teicoplaninbiosynthese; LI *et al.*, 2004; TRUMAN *et al.*, 2006) auf, welche alle als N-Acetylglucosaminyl-Deacetylasen klassifiziert wurden. Alle Enzyme besitzen eine konservierte COG2120 Domäne, die ebenfalls bei NeoD und KanN (und ihren Homologen aus anderen 2-DOS-AGA-Biosynthesen) gefunden werden kann (siehe Abb.

4.12). Diese Domäne hat das Sequenzmotiv (A/P)HXDD in der Nähe des N-Terminus und die Sequenz HXDH, welche relativ zentral im Protein liegt. Kristallographische Untersuchungen bei MshB zeigen, dass die Motive für die Bindung des Substrates bzw. Metallionen verantwortlich sind (MAYNES *et al.*, 2003). Darüber hinaus findet man auch in NeoD und KanN Aminosäurereste, die für die Bindung des Glucosaminy substrates verantwortlich sein könnten (Arg68 und Asp95 bei MshB; MCCARTHY *et al.*, 2004). Alle genannten Deacetylasen werden in sehr unterschiedlichen Biosynthesen benutzt. Gemeinsam ist, dass in allen diesen Wegen UDP-GlcNAc als Zuckerdonor von Glycosyltransferasen genutzt und auf ein Aglycon übertragen wird. Die *N*-Acetylgruppe wird jeweils nach dem Transfer hydrolysiert. Dieselbe Reaktionsfolge tritt auch bei der Lipid A-Biosynthese auf. Die daran beteiligte Deacetylase LpxC weist ebenfalls nur eine sehr geringe Ähnlichkeit mit den anderen Deacetylasen auf (JACKMAN *et al.*, 1999). TRUMAN *et al.* (2007) konnten zeigen, dass es sich bei BtrD ebenfalls um eine *N*-Acetylparomamin-Deacetylase und damit auch um das zu NeoD und KanN homologe Protein handelt.

Aus der Tatsache, dass bei der Bildung von NEO eine weitere Glucosamingruppe umgesetzt wird (der Transfer der letzten Zuckereinheit an RIB), ergab sich die Konsequenz, dass falls wie zu erwarten wiederum UDP-GlcNAc das Substrat darstellt, ein weiterer Deacetylateschritt notwendig ist. In den Clustern der NEO-Familie gibt es aber nur ein Gen, *neoD*, und keines für eine weitere homologe Deacetylase. Daraus folgte, dass NeoD beide Reaktionen katalysieren könnte. Tatsächlich konnte aus 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C mit Hilfe von NeoD 6'''-Hydroxy-NEO C freigesetzt werden. Der *N*-Acetylrest in 2'-*N*-Acetylparomamin bzw. 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C scheint für die Erkennung der Substanzen als Substrat für NeoD verantwortlich zu sein, da 2'-*N*-Acetylparomamin und 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C ansonsten strukturell sehr unterschiedlich sind (vergl. Abb. 1.8 und Abb. 1.9). Dies lässt auf eine beträchtliche Substratflexibilität von NeoD schließen. Interessanterweise war KanN jedoch nicht in der Lage 2'''-*N*-Acetyl-6'''-hydroxy-NEO C zu deacetylieren, was bedeutet, dass sich NeoD in der Evolution sehr spezifisch an zwei verschiedene Substrate angepasst hat.

Aus Proteinvergleichen (siehe Abb. 4.12) lässt sich ableiten, dass sich die Deacetylasen der KAN-Familie (TobD und KanN, 77 % Identität) von denen der NEO-Familie (NeoD, LivD, RibD, ParD und BtrD) unterscheiden (nur 25 % – 32 % identische Aminosäuren), während die D-Enzyme der NEO-Familie untereinander eine Identität (außer BtrD) von 58 % – 77 % aufweisen. So weichen beispielsweise die Sequenzen von TobD und KanN

direkt auf das charakteristische Sequenzmotiv (A/P)HXDD am N-Terminus folgend stark von denen der D-Enzyme der NEO-Familie ab (vergl. Abb. 4.12). Diese Sequenzunterschiede könnten die mögliche Ursache für die unterschiedlichen Spezifitäten, wie die Bifunktionalität der D-Enzyme der NEO-Familie bzw. Monofunktionalität von KanN/TobD sein. Aus dem Vergleich der simulierten 3D-Strukturen von NeoD und KanN (siehe Abb. 4.13) kann ebenfalls geschlossen werden, dass bei NeoD eine strukturelle Anpassung im Laufe seiner Evolution stattgefunden hat. Beide Strukturen sind nahezu identisch. Allerdings weist KanN zwei zusätzliche β -Faltblätter nahe seines N-Terminus auf, die bei NeoD fehlen (vergl. Abb. 4.13). Möglicherweise erschweren oder blockieren diese zusätzlichen Strukturen die Bindung großer Substrate, wie 2^{'''}-*N*-Acetyl-6^{'''}-hydroxy-NEO C, an die charakteristische, ebenfalls in der Nähe des N-Terminus lokalisierte Substratbindedomäne, während sich ein kleineres Substrat, wie 2'-*N*-Acetylparomamin, problemlos an die COG2120-Domäne anlagern kann.

IstD	-----MPTRVLLLS PHPDDIA WSLG---CTVSRMRAAGSAS	33
ForD	-----MSTAQSLDHPVPGALRLRP AKVLLVSPHPDDIA WSLG---GTVARVAAAG-AA	50
KanN	-----MRVLLV SPHPDDIA LSFGGWVAAHARGLAAKGWR	34
TobD	-----MRLTLL APHPDDIA LSVGGWLAGVGPRLRASGWR	34
NeoD	----MGEPTWEAAEDPDRTLRERLR RRTLLVSPHPDDV AYSCGG----LLAAVGRPAH	51
RibD	MDGTMGDPTWEVKEE PGRALSARLREGRTLLVSPHPDDV AYSCGG----LLAAVGRPAH	55
LivD	----MPD-----LITELREH RTLLIAPHDDV AYSCGG----ALAACAGAAR	39
ParD	----MTG-----LIEELRDH TTLWISPHDDV AYSCGG----VLAACAGSAP	39
AprN	----MPEN-----LALAGN LLLSPHDDI AYSCGG----LVASGLGAAE	37
Orf2*	-----MPHDPG ATRLLAISPHLDD AVLSFGAG----LAQAAQDGAN	37
MshB	-----MSETPRL LFVHAHPDDE SLNGATIAHYTSRGAQVHV	38
BtrD	-----MNQDKRA FMFISPHFDDV ILSCAS----TLMELMNQHT	35
Pig-L	AWGFLWVWDS SERMKSREQGRLGAESRTLLVIAHPDDE AMFFAP----TVLGLARLRH	70
	: * **	
IstD	LRDAVRRVRPSFVLAPLAAG-- GHVDM TAVRRAAR---EPLPGTDVVWYEDLPYAAEEV	165
ForD	LTPVLRRAARPDLLLVP LAVR-- GHVDM LAARSAAEYVAAAEAPDCALLYEDLPYAAAGVD	185
KanN	LIAAALAG-ADLVVAPLAVG-- GHVDM RIVRTAVR---QSLGATPCLWYEDLPYALESP	165
TobD	VVARAVAG-SAVVVAPLAVG-- GHVDM RLARDAVA---EALGEIPCLWYEDLPYALDDA	166
NeoD	VAEAI RDAGADTVLAPAAVG-- GHVDM LLVHGAVR--GAVGPGGPLTLFYEDLPYAGQRD	188
RibD	VADAVRASGADTVLAPAAVG-- GHI DM LLVHGAVR--GAVAGGGALALFYEDLPYAGQHE	192
LivD	IAAAVRDLRPGVLVAPAAVG-- GHVDM RLVHDAVR--ESAR-DGVRRLYYEDLPYAAHQE	175
ParD	VAEAVAE LRPSLV LAPAAVG-- GHVDM RLVHEAVR--RSAG-DGVRRLYYEDLPYAAHHP	175
AprN	VTAAVRSASPDLVAPAAVG-- DHI DM LIVHEAAR--RLDA--EYRTLYYEDIPYSAHHD	171
Orf2*	IRSII DEFDP TLVVTCAAIG--EHPDM EATRDAAL--FATHEKNVPVRLWEDLPYAVFKS	195
MshB	LVAI IRELRPHVVV TYDPNGGYGHPDM VHTHTVTAAVAAAGVSGTADHPGDPWTPV KF	180
BtrD	IETYLQ SCDLARKYTW VFP PAISKHVDH RL LLTKAGLR ---LMSQGY PVLFYSEFPY WQ QHN	196
Pig-L	LLQHI EVNGINLV VTFDAGVSGHSDH I ALYAAV RALHSE GKLPKGC SV LTLQSVNV VL R -	180
	: * *	

Abbildung -4.12- Ausschnitt des Aminosäuresequenzvergleiches zwischen NeoD, KanN, ihren Homologen aus anderen AGA-Biosyntheseclustern und bekannten Deacetylasen. Die Ausschnitte zeigen die charakteristischen Sequenzmotive (rot) der COG2120-Domäne (unterstrichen), welche vermutlich für die Bindung von Substrat und Co-Faktor verantwortlich sind. Die Accession-Nummern der AGA-Cluster sind in Tab. 1.1 angegeben; Orf2* = AJ632270; MshB = NP215686; Pig-L = BAA74775. * = identische Aminosäurereste; : = konservativer Aminosäureaustausch.

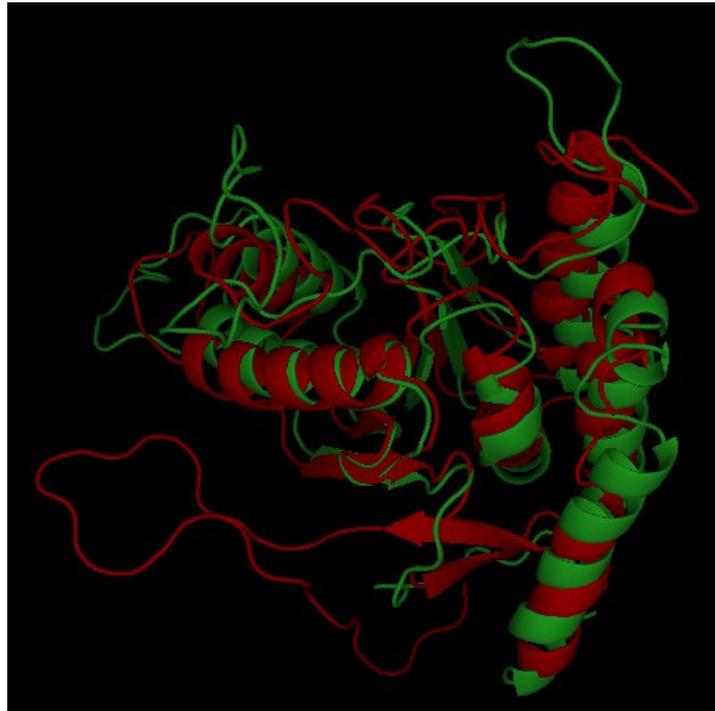


Abbildung -4.13- Die dreidimensionale Struktur von NeoD und KanN. Gezeigt ist die Überlagerung der simulierten Strukturen von KanN (rot) und NeoD (grün). Die Strukturen wurden mit Hilfe des Programms Loopp simuliert. Die Vergleiche wurden mit Hilfe des Programms PyMol erstellt.

4.5 *knock-out*-Mutanten

Neben der biochemischen Charakterisierung der einzelnen Enzyme durch *in vitro*-Enzymtests, gelang es auch *knock-out*-Mutanten von *S. fradiae* bzw. *S. kanamyceticus* in den Genen *neoM* und *neoD* bzw. *kanM2* herzustellen, diese genotypisch und biochemisch zu charakterisieren und damit die Funktion der Genprodukte zusätzlich nachzuweisen (vergl. 3.7). Die Generierung dieser Mutanten stellte sich zunächst als nicht möglich heraus, da trotz des Einsatzes mehrerer unterschiedlicher Verfahren zur Protoplastierung und anschließender Transformation von *S. fradiae* und *S. kanamyceticus*, keine Plasmid-DNA auf diesem Wege übertragen werden konnte. Als alternative Möglichkeit der DNA-Übertragung wurde die intergenerische Konjugation zwischen *E. coli* und *Streptomyces* sp. verwendet. In den hierzu dokumentierten Protokollen (z.B. MAZODIER *et al.*, 1989; SMOKVINA *et al.*, 1990; WOHLLEBEN & MUTH, 1993), wird darauf hingewiesen, dass die Bedingungen für die Konjugation von Stamm zu Stamm meist sehr

unterschiedlich sind und diese deshalb praktisch für jeden Stamm neu optimiert werden müssen. Unter den in den etablierten Protokollen (FLETT *et al.*, 1997; KIESER *et al.*, 2000; BIERMAN *et al.*, 1992) gewählten Bedingungen (siehe 3.7.2) gelang die DNA-Übertragung zunächst nicht. Die Tatsache, dass mit frisch zerkleinertem Mycel einige Exkonjuganten erhalten werden konnten, führte zu der Vermutung, dass die Struktur der Zellwand der Rezipienten die DNA-Übertragung negativ beeinflussen könnte. Deshalb wurden frisch keimende Sporen als Rezipienten benutzt. Die so erzielte wesentlich höhere Anzahl der erhaltenen Exkonjuganten scheint diese Annahme zu bestätigen. Die Steigerung der Temperatur auf 37 °C während der Konjugation wirkte sich ebenfalls günstig aus. Dieser Effekt ist vermutlich auf das bessere Wachstum der *E. coli*-Donorstämme zurückzuführen. Da allerdings *S. kanamyceticus* nicht in der Lage war, sich bei 37 °C zu vermehren, mussten die Konjugationsexperimente mit diesem Stamm bei 30 °C durchgeführt werden. Dies verringerte vermutlich die Ausbeute an Exkonjuganten wiederum sehr stark. Die Gewinnung APR-resistenter und HYG-B-sensitiver Exkonjuganten wies darauf hin, dass die unter 2.30 beschriebene Methode zur Entstehung von Mutanten durch zweifache Rekombinationsereignisse (vergl. Abb. 4.14) führte.

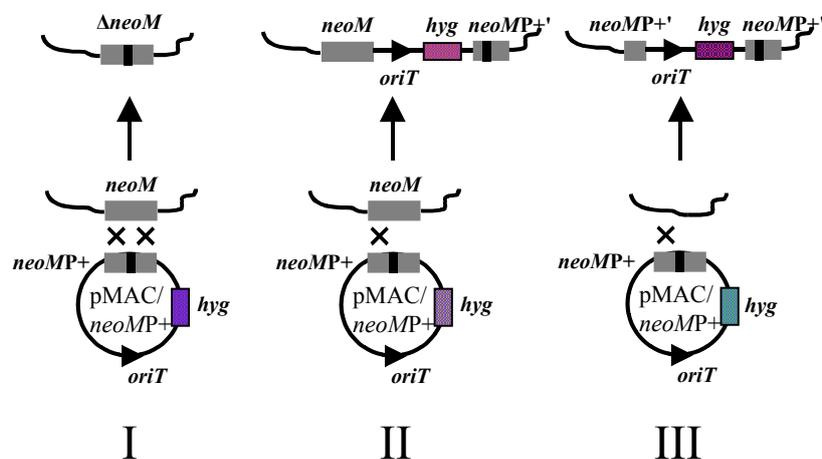


Abbildung -4.14- Rekombinationsmöglichkeiten des Mutageneseplasmids pMAC/neoMP+ mit dem Chromosom von *S. fradiae*. Dargestellt sind homologe, zweifache Rekombination (I), homologe, einfache Rekombination (II) und illegitime Rekombination (III). Die Apramycinkassette ist durch einen schwarzen Balken innerhalb des Gens *neoM* (grau) gekennzeichnet. *oriT* = Transferursprung, *hyg* = HYG-B-Resistenzgen.

Mit den durchgeführten *Southern*-Hybridisierungen (vergl. 3.7.3) konnte gezeigt werden, dass der Rekombinationsort bei einigen Mutanten genau den Erwartungen entsprach, also keine polaren Effekte auf nachfolgende Gene zu erwarten waren. Mit Hilfe der RT-PCR

konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die Cluster bzw. die untersuchten Markergene trotz Insertierung der Resistenzkassetten transkribiert wurden und deshalb die Biosynthesen nur gezielt unterbrochen sein sollten (vergl. 3.7.3).

Da die *S. fradiae* $\Delta neoM$ - bzw. $\Delta neoD$ -Mutanten keinerlei antibiotisch wirksame Substanzen gegenüber dem Testorganismus *B. subtilis* bildeten (siehe Abb. 3.24), war zunächst nicht klar ob der Biosyntheseweg überhaupt noch aktiv war und Produkte lieferte. Da aber der Wildtyp unter diesen Bedingungen NEO produzierte (siehe Abb. 3.24) und die Transkriptionsrate (RT-PCR) einiger Markergene im Cluster derjenigen des Wildtyps entsprach (vergl. Abb. 3.18 und Abb. 3.21), könnten die folgenden Produkte angehäuft werden (vergl. 1.3): 2-DOS in der $\Delta neoM$ -Mutante und 2'-*N*-Acetylparomamin in der $\Delta neoD$ -Mutante. Beide Substanzen weisen jedoch keine antibiotische Aktivität auf (HOTTA *et al.*, 2000), so dass ein biologischer Nachweis unmöglich war.

Um die *S. kanamyceticus* $\Delta kanM2$ -Mutante bildete sich dagegen ein deutlicher Hemmhof auf dem Teststamm *B. subtilis* (siehe Abb. 3.24). Dies könnte bedeuten, dass in einigen Mutanten das rekombinant unterbrochene Gen *kanM2* durch weitere Rekombinationen (homolog oder illegitim) wiederhergestellt wurde und die Mutanten wieder KAN produzierten. Da das Gen *kanM2* durch die Insertion der APR-Resistenzkassette (*aacC4*) nur unterbrochen war (vergl. 3.7.1.3), wäre eine weitere Möglichkeit, dass das von der Mutante gebildete KanM2-AACC4-Fusionsprotein noch genügend katalytische Aktivität aufwies, um KAN zu produzieren. Als dritte Alternative könnte die Mutante Paromamin anhäufen (vergl. Abb. 1.10). Paromamin besitzt eine geringere antibiotische Aktivität als Kanamycin (HOTTA *et al.*, 2000).

Die *trans*-Komplementationen der $\Delta neoM$ -, $\Delta neoD$ - und $\Delta kanM2$ -Mutanten konnte auf genetischer Ebene mittels RT-PCR erfolgreich nachgewiesen werden (vergl. 3.7.4). Die nachgewiesenen Transkripte einzelner Markergene des Clusters beweisen, dass das jeweilige Biosynthesecluster sowohl in den Mutanten als auch in den komplementierten Mutanten wie im Wildtyp aktiv exprimiert wird. Da die Produktion von NEO bzw. KAN dennoch nicht beobachtet werden konnte, könnten als Ursachen folgende Möglichkeiten bestehen: (1) Durch die stabile Insertion des *aacC4*-Gens mit seinem natürlichen Promotor in das Chromosom wird vermutlich konstitutiv AAC(3)IV produziert. Diese *N*-Acetyltransferase von *Klebsiella pneumoniae* (BRÄU *et al.*, 1984) ist das einzige Isoenzym der AAC(3)-Enzymfamilie, welches APR modifizieren kann (SHAW *et al.*, 1993). Allerdings werden auch beinahe alle anderen 2-DOS-AGAs von AAC(3)IV modifiziert (HOTTA *et al.*, 2000), so dass die Mutanten zwar NEO bzw. KAN produzieren könnten,

dieses aber durch 3-Acetylierung (vergl. 1.5 und Abb. 1.11) inaktiviert und als solches ausgeschieden wird, so dass keine Bildung eines Hemmhofes beobachtet werden konnte. (2) Die Gene zur Komplementation wurden konstitutiv exprimiert (P_{ermE^*} ; BIBB *et al.*, 1985), dadurch waren im Verhältnis viel mehr Transkripte dieser Gene vorhanden als von Genen im Cluster. Die RT-PCR-Analysen der Wildtypen von *S. fradiae* bzw. *S. kanamyceticus* zeigen, dass die natürliche Menge an Transkripten eher gering ist. Es könnte daher sein, dass ein so zu stark angehäuftes, regulatorisch wirksames Transkript oder Protein einen oder mehrere Biosyntheseschritte unterdrückte, so dass kein NEO bzw. KAN produziert wurde.

Der Nachweis eines von den Mutanten angehäuften Zwischenproduktes ließ sich mit der gewählten Methode nicht eindeutig verifizieren. Zum einen konnte nur eine begrenzte Medienzusammensetzung zur Anzucht der Stämme benutzt werden, da insbesondere *S. kanamyceticus* zur Produktion von KAN oder auch nur zur Sporulation auf wenigen Medien fähig war. Der Beginn der Sporulation wurde als Hinweis auf die beginnende Produktion der Sekundärmetaboliten gedeutet. Es ist bekannt, dass Sporulation und Sekundärmetabolismus in vielen Streptomyceten über die gleichen Kaskaden global reguliert werden (HORINOUCI & BEPPU, 1992; ONAKA *et al.*, 1998; CHATER & CHANDRA, 2008). So konnte mit den Wildtypen der Produzenten dieser Zusammenhang bestätigt werden.

Trotz des fehlenden direkten Nachweises der Zwischenstufen und der *in trans* Komplementation, bestätigen die Eigenschaften der Mutanten die Beteiligung der Gene an den Biosynthesen von NEO und KAN. (1) Die $\Delta neoM$ - und $\Delta neoD$ -Mutanten produzierten kein NEO mehr und häuften eine Substanz im Agar an, die keine antibiotische Aktivität besaß. 2-DOS und 2'-*N*-Acetylparomamin besitzen nachweislich keinerlei antibiotische Wirksamkeit. (2) Die $\Delta kanM2$ -Mutante produzierte offensichtlich kein KAN mehr, sondern häufte Paromamin an, welches deutlich geringere antibiotische Wirksamkeit als KAN besitzt.

4.6 Biokombinatorische Darstellung neuer AGAs

Neben der Überprüfung ihrer Funktion in der NEO- und KAN-Biosynthese sollten die charakterisierten Glycosyltransferasefunktionen in ersten Versuchen daraufhin geprüft werden, ob sich mit ihrer Hilfe durch Biokombinatorik neue AGAs herstellen ließen. Mit

den 2-DOS : 4-*N*-Acetylglucosaminyltransferasen (M/M1-Enzyme; Paromaminsynthesen) war wegen ihrer hohen Spezifität für ein monomeres Aminocyclitol als Akzeptorsubstrat keine weitere Glucosaminylierung an anderen Substratpositionen bzw. Oligosaccharidsubstraten zu erwarten. Daher kamen als Kandidaten für mögliche heterologe Glycosylierungen nur die sehr wahrscheinlich neutrale Zucker übertragenden Glycosyltransferasen vom M2- (wahrscheinlich 6-*O*-Glucosyl- bzw. 6-*O*-Xylosyltransferasen) oder F-Typ (HygF, wahrscheinliche Galactosyltransferase) in Frage.

Ein Test auf heterologe Glycosylierung lässt sich sinnvollerweise nur *in vivo* durchführen. Deswegen mussten die entsprechenden Gene aktiv in die entsprechenden heterologen Wirts- bzw. Produktionsstämme eingebracht werden (vergl. 3.8).

Als Substrate bzw. Produkte kamen in Frage: (1) Da die C-6-Position von Paromamin in der NEO-Biosynthese nicht modifiziert wird und in der KAN-Biosynthese mit Glucose durch KanM2 verknüpft wird, könnte *S. fradiae* durch Zusatz der 6-*O*-Glucosyltransferase KanM2 ein neues Pseudopentasaccharid bilden (vergl. Abb. 3.26). Zumindest sollte sich 6-*O*-Glucosylparomamin (vergl. Abb. 1.10 und Abb. 4.15 IV) im Kulturmedium nachweisen lassen, da bis zum Paromamin die Biosynthesen identisch verlaufen (vergl. 1.3.1) und KanM2 Paromamin als Substrat akzeptieren sollte (vergl. 1.3.3) und deshalb entweder in Konkurrenz zu der 6'-Aminierungs- bzw. 5-Ribosyltransferasereaktion der NEO-Synthese (vergl. 1.3.2) treten oder ein zusätzlich glucosyliertes RIB oder NEO liefern würde (siehe Abb. 4.15).

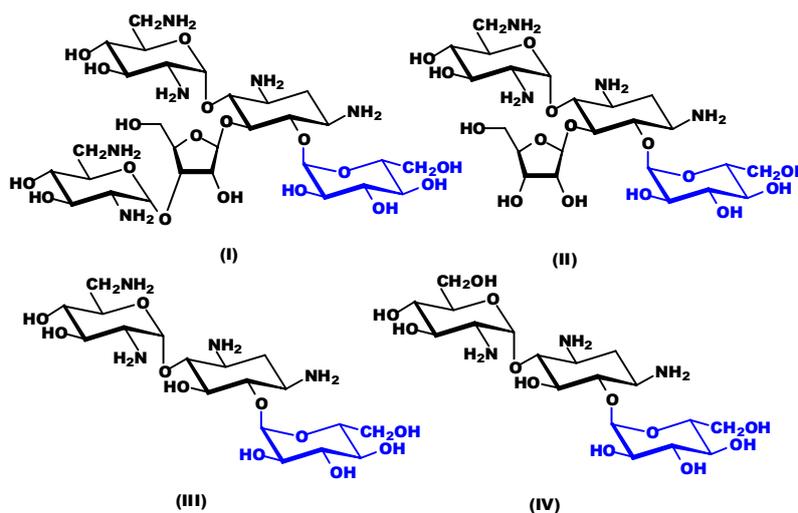


Abbildung -4.15- Mögliche neue Fermentationsprodukte von *S. fradiae* durch die zusätzliche Aktivität von KanM2. (I) = 6-*O*-Glucosyl-NEO C; (II) = 6-*O*-Glucosyl-RIB; (III) = 6-*O*-Glucosylneamin; (IV) = 6-*O*-Glucosylparomamin. Die durch KanM2 hinzugefügte Glucosylgruppe ist blau dargestellt.

Ebenso sollte (2) HygF aufgrund seiner postulierten 1,5-Regioselektivität in der Lage sein, KAN oder Vorstufen zu glycosylieren (vergl. Abb. 3.27), da die 5-Position von 2-DOS während der Biosynthese ebenfalls nicht modifiziert wird (vergl. 1.3). Auf diese Weise könnten unter anderem ein neues Pseudotetrasaccharid (siehe Abb. 3.27 und Abb. 4.14 (I)), 5-Galactosylparomamin (Abb. 4.16 (II)), 5-Galactosyl-2-DOS (Abb. 4.16 (III)) oder 5-Galactosyl-6-Kanosamin-2-DOS (Abb. 4.16 (IV)) von *S. kanamyceticus* gebildet werden.

Eine dritte Möglichkeit zur Darstellung neuer AGAs könnte die Einführung der HygF-Funktion in die $\Delta neoM$ -Mutanten von *S. fradiae* sein, wobei 5-Galactosyl-2-DOS (Abb. 4.16 (III)) als Zwischenstufe entstehen sollte. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Substanz in den nachfolgenden Biosyntheseschritten umgesetzt wird ist zwar gering, da die 5-Position für den Ribosyltransfer blockiert ist, aber evtl. ist NeoF oder eines der anderen modifizierenden Enzyme in der Lage, 5-Galactosyl-2-DOS umzusetzen. Das Endprodukt könnte ein völlig anders modifiziertes Pseudodisaccharid sein.

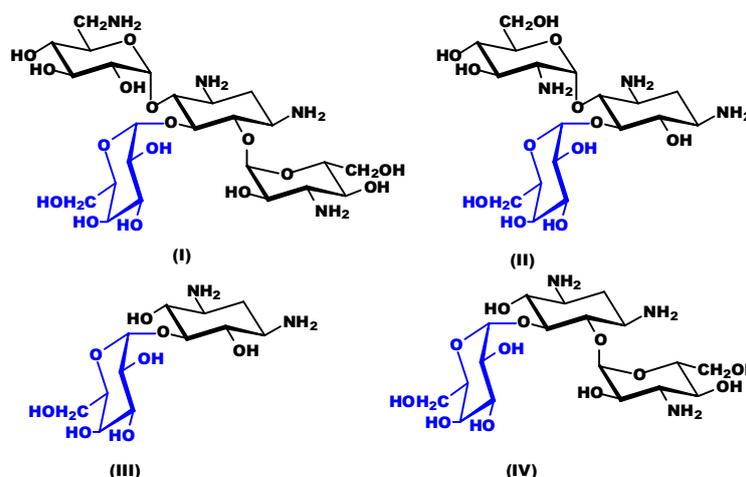


Abbildung -4.16- Mögliche neue Fermentationsprodukte von *S. kanamyceticus* durch die zusätzliche Aktivität von HygF. (I) = 5-O-Galactosyl-KAN A; (II) = 5-O-Galactosylparomamin; (III) = 5-O-Galactosyl-2-DOS; (IV) = 5-O-Galactosyl-6-O-Kanosamyl-2-DOS. Die durch HygF hinzugefügte Galactosylgruppe ist blau dargestellt.

In den durchgeführten Experimenten (vergl. 3.8) konnte jedoch kein neues AGA nachgewiesen werden. Es gelang, die Gene *kanM2* in *S. fradiae*, *hygF* in *S. fradiae* $\Delta MP+3\gamma$, $\Delta MP+3\eta$ und $\Delta MP+4\gamma$ und *hygF* in *S. kanamyceticus* zu bringen und auch ihre Transkripte mittels RT-PCR nachzuweisen. Doch der Stamm *S. fradiae*-pLoriTbla/*kanM2* erzeugte nach wie vor NEO (Hemmhof bei *B. subtilis*, kein Hemmhof bei *E. coli* DH5 α -

pGM102 oder *E. coli* DH5 α -pOJ436). Es könnte allerdings sein, dass biokombinatorisch modifizierte AGAs neben NEO gebildet wurden, aber entweder generell unwirksam waren oder ebenso wie NEO durch die Phosphotransferase bzw. Acetyltransferase inaktiviert wurden. Eine genaue Analyse der gebildeten Produkte könnte darüber Klarheit verschaffen.

In den Genclustern der AGAs sind auch Gene für Exporter vorhanden (vergl. PIEPERSBERG *et al.*, 2007). Diese Exporter sind sehr wahrscheinlich hochspezifisch für ihre Zielmoleküle. Sie könnten möglicherweise nicht mehr in der Lage sein, die neu gebildeten AGAs aus der Zelle zu schleusen, so dass die neuen AGAs deshalb nicht im Medium nachzuweisen waren.

Der Stamm *S. kanamyceticus*-pLoriTbla/hygF produzierte interessanterweise kein KAN mehr. Eine mögliche Ursache dafür könnte der zusätzliche Stress der Zellen durch die Anwesenheit von Thiostrepton und das dadurch verzögerte Wachstum sein. Da eine Verlängerung der Anzucht keinen nachweisbaren Effekt hatte und der Stamm auch normal sporulierte, kann das Fehlen der Antibiotikaproduktion offensichtlich nur auf die Anwesenheit des exprimierten HygF-Enzyms zurückzuführen sein.

Auch bei den Δ neoM-Mutanten von *S. fradiae*, die die HygF-Funktion erhalten hatten, war die Bildung einer antibiotischen Substanz nicht zu beobachten. Da in der Literatur nichts über das wahrscheinliche Zwischenprodukt 5-Galactosyl-2-DOS bekannt war, kann auch keine Aussage über seine antibiotische Wirksamkeit getroffen werden. Die einzige genügend empfindliche Nachweismöglichkeit für die AGAs bestand aus Bioassays, weshalb in diesem Fall keinerlei Schlüsse gezogen werden können. In weiteren Versuchen dieser Art muss daher in der Zukunft das Produktspektrum der rekombinanten Produzenten nach Extraktion von Fermentationsbrühen chemisch-analytisch untersucht werden.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die eingebrachten Plasmide in den Produzenten *S. fradiae* und *S. kanamyceticus* oftmals Deletionen aufwiesen. Rekombinationen sind in Streptomycceten relativ häufig (KIESER *et al.*, 2000; HOPWOOD, 2006). Ein zukünftiger Versuch, Glycosyltransferasefunktionen in die Produzenten zu bringen, sollte deshalb mit Hilfe von Vektoren erfolgen, die sich in das Chromosom integrieren können, und so erfahrungsgemäß größere Stabilität besitzen. Des Weiteren wäre ein induzierbares System, evtl. auf Basis eines natürlichen Promotors aus einem der AGA-Biosynthesecluster, von Vorteil, da die Produktion des zusätzlichen Proteins auf diesem

Weg mit dem Einsetzen des Sekundärmetabolismus gestartet werden kann, was mögliche, schädliche Effekte des Proteins auf das Wachstum des Stammes minimiert.

4.7 Ausblick

Das immer häufigere Auftreten von pathogenen Bakterienstämmen, die gegen viele Antibiotika und auch gegen AGAs resistent sind (vergl. 1.5), erfordert entweder die Isolierung immer neuer AGA-Klassen oder Modifikationen an den existierenden AGAs, um bestehende Resistenzmechanismen umgehen zu können (vergl. MINGEOT-LECLERCQ & TULKENS, 1999). Da in den letzten Jahrzehnten keine neuen Antibiotika trotz Ausweitung intensiver *screening*-Programme isoliert werden konnten, wird in verschiedenen Entwicklungsprogrammen versucht, die bestehenden Antibiotika gezielt zu verbessern. Ein erster Schritt war die chemische Modifizierung von AGAs (RISTUCCIA & CUNHA, 1985). Die durch Anheftung von 2-Hydroxy- γ -aminobuttersäure erhaltenen KAN- und GEN-Derivate (z.B. Amikacin, Arbekacin, Isepamicin, vergl. Abb. 4.17) erwiesen sich dabei gegen eine Vielzahl AGA-resistenter Bakterien als besonders wirksam (KONDO & HOTTA, 1999). Die gezielte chemische Modifizierung einzelner Gruppen ist allerdings sehr schwierig und Totalsynthesen sind zu aufwendig und ineffizient. Der nächste Schritt zielt deshalb auf die Möglichkeit, existierende Biosynthesewege biotechnisch zu modifizieren oder ergänzen zu können, so dass neue AGAs direkt von Bakterien produziert werden könnten. Dabei steht nicht nur die Umgehung vorhandener Resistenzen im Vordergrund, sondern vor allem die Verringerung der teilweise erheblichen Nebenwirkungen der AGAs (vergl. 1.5; MINGEOT-LECLERCQ *et al.*, 1999 a + b; KOTRA *et al.*, 2000). Die Voraussetzung dafür ist ein detailliertes Verständnis der an der Biosynthese beteiligten Gene und Enzyme, sowie deren Regulation.

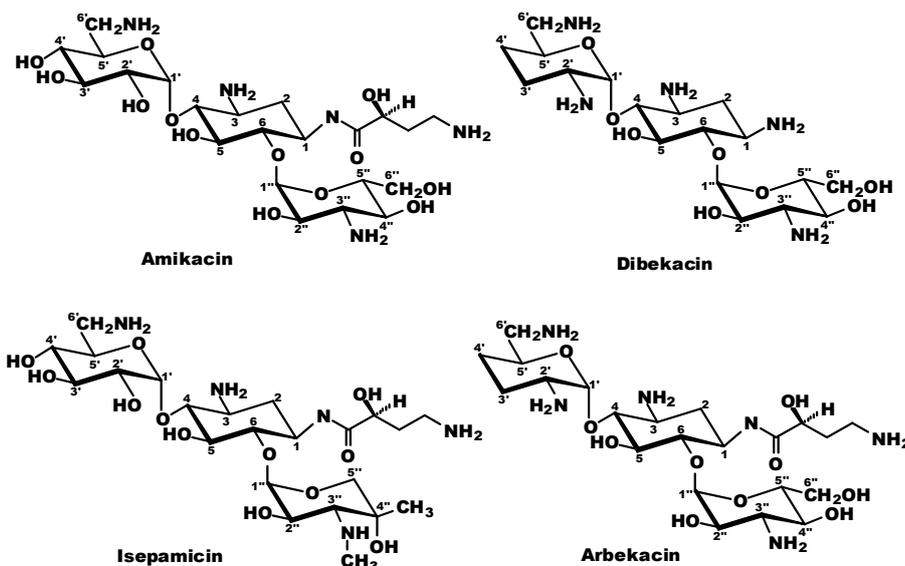


Abbildung -4.17- Klinisch relevante halbsynthetische AGAs.

Neben der weiteren Aufklärung der Biosynthesen zweier Modell-AGAs (NEO und KAN), können die in dieser Arbeit charakterisierten Enzymfunktionen für die gezielte Modifizierung von AGAs zu interessanten neuen Verbindungen benutzt werden. Betrachtet man z.B. die Veränderung der Wechselwirkungen zwischen dem Ring III von KAN A und GEN C1a mit der bakteriellen A-Stelle (siehe Abb. 4.18 A + B), so sieht man, dass der Austausch von Glucose gegen Xylose zu Kontakten mit anderen Ribonukleotiden führt. Dieser Zuckeraustausch könnte durch Einführung der GenM2-Funktion (Xylosyltransferase) in eine $\Delta kanM2$ -Mutante bewirkt werden. Auch das Vorhandensein des Neosamin-Ringes (Ring IV in Abb. 4.18 C) führt zu anderen Wechselwirkungen mit Ribonukleotiden. Vergleicht man die Wechselwirkungen von NEO (Abb. 4.18 C) mit der von RIB (Abb. 4.18 D), so erkennt man, dass diese in der Neosamin-Untereinheit (Ringe I + II) beinahe identisch sind, während durch das Fehlen der Neosamin-Einheit auch die Wechselwirkungen des Riboserings beeinflusst werden.

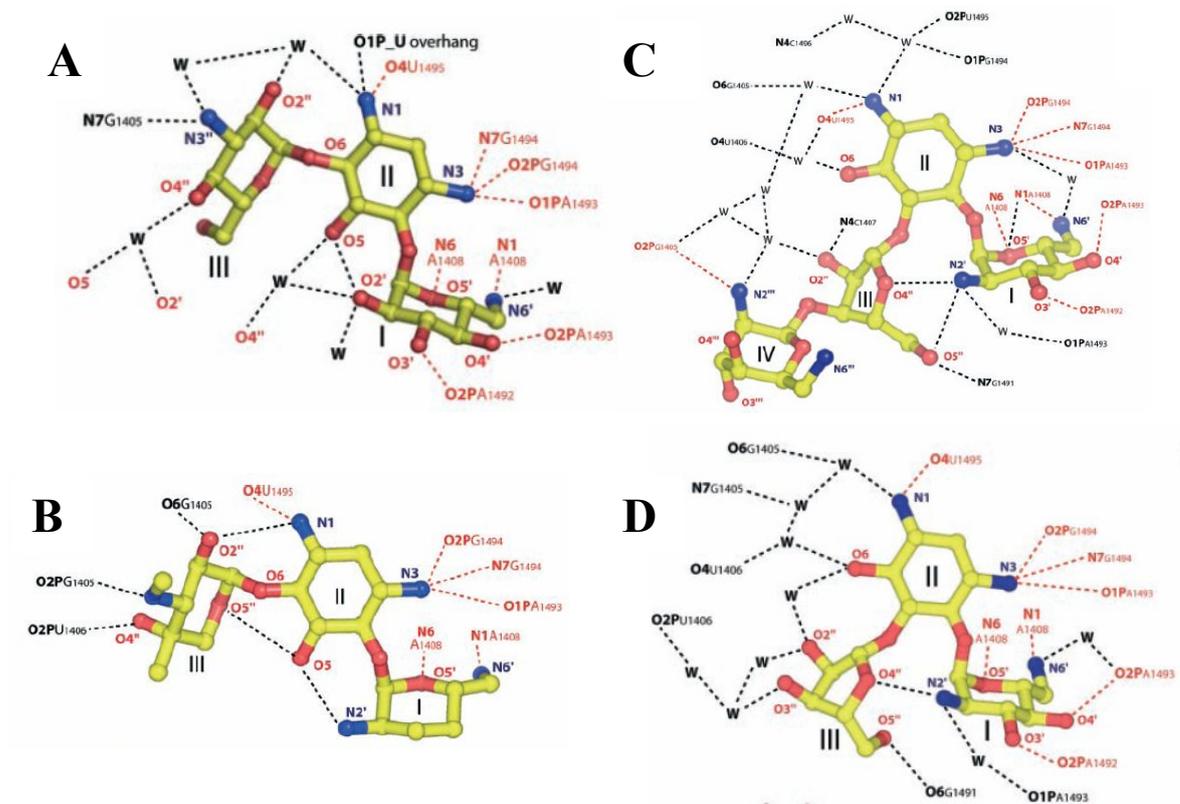


Abbildung -4.18- Wechselwirkungen verschiedener AGAs mit der ribosomalen A-Stelle. (A) = KAN A; (B) = GEN C1A; (C) = NEO B; (D) = RIB. W = Wasser. Die Ribonucleotide sind in der *E. coli*-Nummerierung angegeben. Daten entnommen aus FRANÇOIS *et al.* (2005).

Des Weiteren ist in einigen Biosynthesen von 2-DOS-AGAs die Tendenz zu beobachten die 3'-OH- oder 4'-OH-Gruppe zu modifizieren bzw. zu entfernen. Diese Hydroxylgruppen wechselwirken mit den Ribonucleotiden A1492 und A1493 (vergl. 1.2.4, Abb. 1.7 und Abb. 4.18). Auch die C-6'-Gruppen unterliegen in einigen Biosynthesen Modifikationen (vor allem C- und N-Methylierung). Mit Hilfe der beteiligten Enzyme sollte es möglich sein, gezielt diese Gruppen auch in anderen 2-DOS-AGAs modifizieren zu können. Abb. 4.19 zeigt exemplarisch, welche Gruppen eines AGAs der KAN-Familie durch Biokombinatorik oder Mutagenese modifiziert werden können.

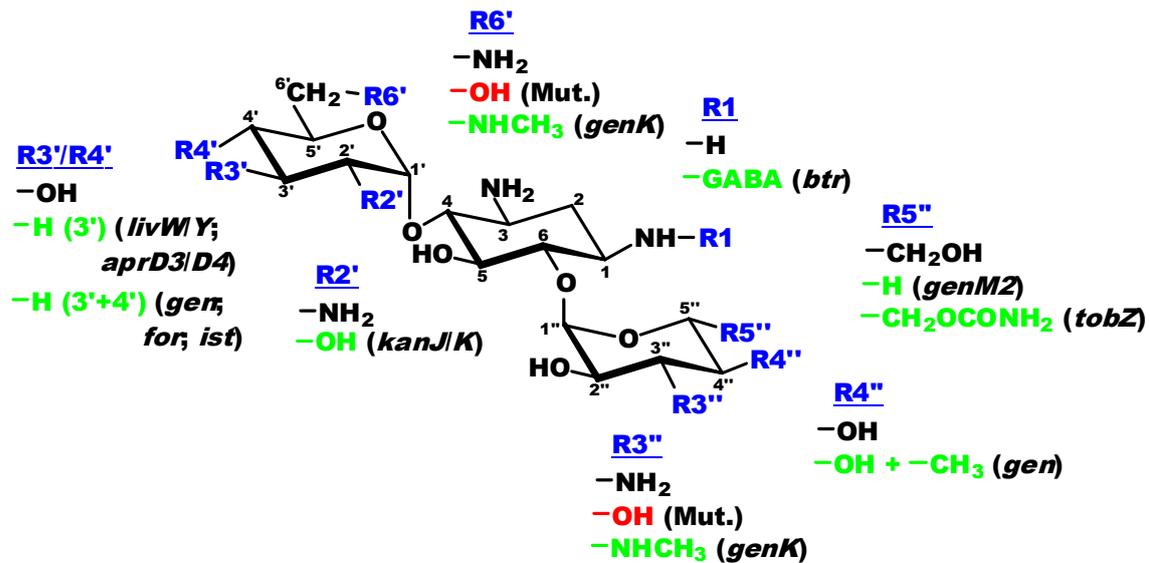


Abbildung -4.19- Mögliche Modifizierungen in der KAN-Familie durch Biokombinatorik oder Mutagenese. Die schwarz dargestellten Reste stellen das natürliche Substitutionsmuster dar. Reste, die durch Zusatz von bestimmten Genfunktionen eingefügt werden können sind grün dargestellt. Gezielte Mutagenese einzelner Gene (= Mut.) führt zu den rot dargestellten Resten. Die modifizierenden Gene sind angegeben. *btr*, *for*, *gen*, *ist* = für die Modifizierung sind mehrere Gene aus den *btr*-, *for*-, *gen*- oder *ist*-Clustern notwendig; GABA = γ -Aminobuttersäure.

Ein seit langem bekanntes Beispiel für den Erfolg einer solchen Modifikation, ist die Entfernung der 3'-OH-Gruppe. Ein unter klinisch relevanten Bakterien weit verbreiteter Resistenzmechanismus phosphoryliert diese Position (durch die *O*-Phosphotransferasen APH(3'), vergl. 1.5, Abb. 1.11 und MINGEOT-LECLERCQ *et al.*, 1999a) und machte den therapeutischen Einsatz vieler AGAs nutzlos. Als wirksame Alternative wurden dann AGAs verwendet, denen natürlicherweise die 3'-OH-Gruppe fehlt (z.B. bei TOB und LIV B, vergl. Abb. 1.2 und Abb. 1.5), oder chemisch entfernt wurde (z.B. Dibekacin, vergl. Abb. 4.17). Als Beispiel für eine gezielte, biokombinatorische Modifikation wurde gezeigt, dass Mutanten von *S. kanamyceticus*, welche nicht mehr in der Lage waren, die 6'- bzw. 3''-Position zu aminieren ($\Delta kanQ$ bzw. $\Delta kanD2$, vergl. Abb. 1.10) und so bereits neuartige KANs produzierten, durch die Einführung der Genfunktionen *livW/Y* aus *S. lividus* zusätzlich in der Lage waren, auch die 3'-OH-Gruppe der gebildeten KANs zu entfernen (U. WEHMEIER, pers. Mitteilung).

AGAs eignen sich aus einem weiteren Grund sehr gut für biokombinatorische Experimente. Neben der guten Wirksamkeit gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien (vergl. 1.2.4, 1.5) bestehen ihre Biosynthesen aus einzelnen, mehr oder weniger voneinander unabhängigen Katalyseschritten. Dieser schrittweise Aufbau erlaubt relativ einfach die Addition oder Deletion einzelner Schritte. Andere klinisch verwendete

Antibiotika (z.B. Makrolide) werden dagegen über ganze Enzymkomplexe (PKS-Module) synthetisiert und modifiziert. Bei diesen ist ein biokombinatorischer Eingriff wesentlich schwieriger durchzuführen, da die gesamte Proteinstruktur des Multienzymkomplexes berücksichtigt werden muss.

5 Literaturverzeichnis

Aboshanab, K.M.A.. **2005**. Genetic studies on the biosynthesis of the major aminoglycoside antibiotics: Isolation, analysis and comparison of the biosynthetic gene clusters for 12 aminoglycoside antibiotics. *Dissertation Bergische Universität Wuppertal*

Ahlborn, C.. **2002**. Molekularbiologische Untersuchungen an potentiell Zucker-modifizierenden Genen in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Diplomarbeit Bergische Universität Wuppertal*

Apichaisataienchote, B., J. Altenbuchner, H. Buchenauer. **2005**. Isolation and identification of *Streptomyces fradiae* SU-1 from Thailand and protoplast transformation with the chitinase B gene from *Nocardiosis prasina* OPC-131. *Curr. Microbiol.* 51 : 116 – 121

Autissier, D., P. Barthelemy, M. Mazieres, M. Peyre, L. Penasse. **1981**. 6"-Deamino-6"-hydroxy derivatives, as intermediates in the biosynthesis of neomycin and paromomycin. *J. Antibiot.* 34 : 536 – 543

Babcock, M.J., K.E. Kendrick. **1988**. Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 170 : 2802 – 2808

Baltz, R.H., P. Matsushima. **1981**. Protoplast fusion in *Streptomyces*: Conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* 127 : 137 – 146

Ban, N., B. Freeborn, P. Nissen, P. Penczek, R.A. Grassucci, R. Sweet, J. Frank, P.B. Moore, T.A. Steitz. **1998**. A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell* 93 : 1105 – 1115

Ban, N., B., P. Nissen, J. Hansen, M. Capel, P.B. Moore, T.A. Steitz. **1999**. Placement of protein and RNA structures into a 5 Å resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* 400 : 841 – 847

Ban, N., B., P. Nissen, J. Hansen, P.B. Moore, T.A. Steitz. **2000**. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289 : 905 – 920

Basso, L.A., J.S. Blanchard. **1998**. Resistance to antitubercular drugs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 456 : 115 – 144

Baud, H., A. Betencourt, M. Peyre, L. Penasse. **1977**. Ribostamycin, as an intermediate in the biosynthesis of neomycin. *J. Antibiot.* 30 : 720 – 723

Bennet, P.M., J. Grinsted, M.H. Richmond. **1977**. Transposition of TnA does not generate deletions. *Mol. Gen. Genet.* 154 : 205 – 211

-
- Bentley, S.D., K.F. Chater, A.-M. Cerdeño-Tárraga, G.L. Challis, N.R. Thomson, K.D. James, D.E. Harris, M.A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C.W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.-H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.-A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill, D.A. Hopwood. **2002**. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 714 : 141 – 147
- Bernacchi, S., S. Freisz, C. Maechling, B. Spiess, R. Marquet, P. Dumas, E. Ennifar. **2007**. Aminoglycoside binding to the HIV-1 RNA dimerization initiation site: thermodynamics and effect on the kissing-loop to duplex conversion. *Nucleic Acids Res.* 35 : 7128 – 7139
- Bertram, R., M. Schlicht, K. Mahr, H. Nothhaft, M.H. Saier Jr, F. Titgemeyer. **2004**. In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 186 : 1362 – 1373
- Beyer, S., G. Mayer, W. Piepersberg. **1998**. The StrQ protein encoded in the gene cluster for 5'-hydroxystreptomycin of *Streptomyces glaucescens* GLA.0 is a α -D-glucose-1-phosphate cytidyltransferase (CDP-D-glucose synthase). *Eur. J. Biochem.* 258 :1059 – 1067
- Bibb, M.J., G.R. Janssen, J.M. Ward. **1985**. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* 38 : 215 – 226
- Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E.T. Seno, R.N. Rao, B.E. Schoner. **1992**. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* sp.. *Gene* 116 : 43 – 49
- Birch, A., A. Häusler, A. Hütter. **1990**. Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp.. *J. Bacteriol.* 172 : 4138 – 4142
- Birnboim, H.C., J. Doly. **1979**. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 : 1513 – 1523
- Blaesing, F., A. Mühlenweg, S. Vierling, G. Ziegelin, S. Pelzer, E. Lanka. **2005**. Introduction of DNA into Actinomycetes by bacterial conjugation from *E. coli* - An evaluation of various transfer systems. *J. Biotechnol.* 120 : 146 – 161
- Blanchard, S., J.S. Thorson. **2006**. Enzymatic tools for engineering natural product glycosylation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 : 263 – 271
- Blattner, F.R., G. Plunkett III, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, Y. Shao. **1997**. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277 : 1453 – 1462
-

-
- Blondelet-Rouault, M.-H., J. Weiser, A. Lebrihi, P. Branny, J.-L. Pernodet. **1997**. Antibiotic resistance gene cassettes derived from the Ω interposon for use in *E. coli* and *Streptomyces*. *Gene* 190 : 315 – 317
- Botto, R., B. Coxon. **1983**. Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy of neomycin B and related aminoglycosides. *J. Am. Chem. Soc.* 105 : 1021 – 1028
- Bourne, Y., B. Henrissat. **2001**. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 11 : 593 – 600
- Bradford, M.M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248 – 254
- Bräu, B., U. Pilz, W. Piepersberg. **1984**. Genes for gentamicin-(3)-*N*-acetyl-transferases III and IV: I Nucleotide sequences of the AAC(3)-IV gene and possible involvement of an IS140 element in its expression. *Mol. Gen. Genet.* 193 : 179 – 187
- Breton, C., L. Snajdrova, C. Jeanneau, J. Koca, A. Imberty. **2006**. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16 : 29R – 37R
- Brodersen, D.E., W.M. Clemons, A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan. **2000**. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 103 : 1143 – 1154
- Brodersen, D.E., W.M. Clemons, A.P. Carter, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan. **2002**. Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S RNA. *J. Mol. Biol.* 316 : 725 – 768
- Brodersen, D.E., W.M. Clemons, A.P. Carter, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan. **2003**. Phasing the 30S ribosomal subunit structure. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59 : 2044 – 2050
- Brown, C.M., K.K. McCaughan, W.P. Tate. **1993**. Two regions of the Escherichia coli 16S ribosomal RNA are important for decoding stop signals in polypeptide chain termination. *Nucleic Acids Res.* 21 : 2109 – 2115
- Brummett, R., K. Fox. **1989**. Aminoglycoside-induced hearing loss in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 : 797 – 800
- Campbell, J.A., G.J. Davies, V.V. Bulone, B. Henrissat. **1998**. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 329 : 719
- Cate, J.H., M.M. Yusupov, G.Z. Yusupov, T.N. Earnest, H.F. Noller. **1999**. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* 285 : 2095 – 2104
- Carter, A.P., W.M. Clemons, D.E. Brodersen, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan. **2000**. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407 : 340 – 348
-

-
- Charnock, S.J., G.J. Davies. **1999**. Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry* 38 : 6380 – 6385
- Chater, K.F., M.J. Merrick. **1979**. Streptomyces. In: *Developmental Biology of Prokaryotes*. Ed.: J.H. Parish. 93 – 114, Blackwell Scientific Publications
- Chater, K.F.; D.A. Hopwood. **1993**. Streptomyces. In: *Bacillus subtilis and other Gram-positive Bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Ed.: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, R. Losick. 83 – 99 ASM Press, Washington, D.C.
- Chen, S., D. von Bamberg, V. Hale, M. Breuer, B. Hardt, R. Müller, H.G. Floss, K.A. Reynolds, E. Leistner. **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
- Cech, T.R.. **2000**. Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science* 289 : 878 – 879
- Claes, P.J., H. Vanderhaeghe, F. Compennolle. **1973**. Isolation and identification of minor components of commercial kanamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4 : 560 – 563
- Claridge, C.A., J.A. Bush, M.D. Defuria, K.E. Price. **1974**. Fermentation and mutational studies with a butirosin-producing strain of *Bacillus circulans*. *Dev. Ind. Microbiol. Ser.* 15 : 101 – 113
- Clemons, W.M., J.L. May, B.T. Wimberly, J.P. McCutcheon, M.S. Capel, V. Ramakrishnan. **1999**. Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* 400 : 833 – 840
- Coffey, G.L., L.E. Anderson, M.W. Fisher, M.M. Galbraith, A.B. Hillegas, D.L. Kohberger, P.E. Thompson, J. Weston, K. Ehrlich. **1959**. Biological studies of paromomycin. *Antibiot. Chemother. (Washington D.C.)* 9 : 730 – 738
- Coutinho, P.M., E. Deleury, G.J. Davies, B. Henrissat. **2003**. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 328 : 307 – 317
- Cron, M.J., O.B. Fardig, D.L. Johnson, F.M. Palermi, H. Schmitz, I.R. Hopper. **1958**. The chemistry of kanamycin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 76 : 27 – 30
- Davies, J., G.D. Wright. **1997**. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 5 : 234 – 240
- DeLey, J.. **1978**. Modern molecular methods in bacterial taxonomy: evaluation, applications, prospects. Proc. 4th Int. Conf.. *Plant Path. Bacteriol.* 347 – 357
- De Stasio, E.A., D. Moazed, H.F. Noller. **1989**. Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic--RNA interactions. *EMBO J.* 8 : 1213 – 1216
-

-
- Dion, H.W., P.W. Woo, N.E. Willmer, D.L. Kern, J. Onaga, S.A. Fusari. **1972**. Butirosin, a new aminoglycosidic antibiotic complex: isolation and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2 : 84 – 88
- Doi, O., M. Miyamoto, N. Tanaka, H. Umezawa. **1968**. Inactivation and phosphorylation of kanamycin by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 16 : 1282 – 1284
- Doi, Y., K. Yokoyama, K. Yamane, J. Wachino, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa. **2004**. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 : 491 – 496
- Doumith, M., P. Weingarten, U.F. Wehmeier, K. Salah-Bey, B. Benhamou, C. Capdevila, J.M. Michel, W. Piepersberg, M.C. Raynal. **2000**. Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* 264 : 477 – 485
- Dubendorff, J.W., F.W. Studier. **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
- Dutcher, J.D., N. Hosansky, M.N. Donin, O. Wintersteiner. **1951**. Neomycins B and C, and some of their degradation products. *J. Am. Chem Soc.* 73 : 1384 – 1385
- Egan, S.M., R.F. Schleif. **1993**. A regulatory cascade in the induction of *rhaBAD*. *J. Mol. Biol.* 234 : 87 – 98
- Elson-Schwab, L., Y. Tor. **2007**. Targeting HIV-1 RNA with aminoglycoside antibiotics and their derivatives. In: *Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery – Second Edition*. Ed.: D.P. Arya. 267 – 287, John Wiley & Sons, Inc.
- Enquist, L.W., S.G. Bradley. **1971**. Characterization of deoxyribonucleic acid from *Streptomyces venezuelae* species. *Dev. Ind. Microbiol.* 12 : 225 – 236
- Ensign, J.C.. **1978**. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Ann. Rev. Microbiol.* 32 : 185 – 219
- Erlich, H.A., N. Arnheim. **1992**. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genet.* 26 : 479 – 506
- Fan, Q., F. Huang, P.F. Leadlay, J.B. Spencer. **2008**. The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: genetic and biochemical evidence for the roles of two glycosyltransferases and a deacetylase. *Org. Biomol. Chem.* 6 : 3306 – 3314
- Fang, J.R., C.J. Pearce, K.L. Rinehart. **1984**. Neomycin biosynthesis: the involvement of neamine and paromamine as intermediates. *J. Antibiot.* 37 : 77 – 79
- Faust, B., D. Hoffmeister, G. Weitnauer, L. Westrich, S. Haag, P. Schneider, H. Decker, E. Künzel, J. Rohr, A. Bechthold. **2000**. Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tü2717. *Microbiology* 146 : 147 – 154
-

- Fenton, W.A., A.L. Horwich. **2003**. Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide. *Q. Rev. Biophys.* 36 : 229 – 256
- Fischer, C., F. Lipata, J. Rohr. **2003**. The complete gene cluster of the antitumor agent gilvocarcin V and its implication for the biosynthesis of the gilvocarcins. *J. Am. Chem. Soc.* 125 : 7818 – 7819
- Flatt, P.M., T. Mahmud. **2007**. Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 24 : 358 – 392
- Fleischmann, R.D., D. Alland, J.A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W. R. Jacobs Jr., J. C. Venter, C. M. Fraser. **2002**. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* 184 : 5479 – 5490
- Flett, F., V. Mersinias, C.P. Smith. **1997**. High efficient intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 155 : 223 – 229
- Fong, D.H., A.M. Berghuis. **2002**. Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry. *EMBO J.* 21 : 2323 – 2331
- Fourmy, D., M.I. Recht, S.C. Blanchard, J.D. Puglisi. **1996**. Structure of the A-site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* 274 : 1367 – 1371
- François, B., R.J. Russel, J.B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vincens, E. Westhof. **2005**. Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides : Role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res.* 33 : 5677 – 5690
- Frank, J., R.K. Agrawal. **2000**. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406 : 318 – 322
- Fritz, T.A., J. Raman, L.A. Tabak. **2006**. Dynamic association between the catalytic and lectin domains of human UDP-GalNAc : polypeptide alpha-N-galactosaminyltransferase-2. *J. Biol. Chem.* 281 : 8613 – 8619
- Gachon, G.M., M. Langlois-Meurinne, P. Saindrenan. **2005**. Plant secondary metabolism glycosyltransferases : the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* 10 : 542 – 549
- Galimand, M., S. Sabtcheva, P. Courvalin, T. Lambert. **2005**. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 : 2949 – 2953
- Geremia, R.A., E.A. Petroni, L. Ielpi, B. Herissat. **1996**. Towards a classification of glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities: prokaryotic alpha-mannosyltransferases. *Biochem. J.* 318 : 133 – 138
-

Giordano, T.J., U. Deuchle, H. Bujard, W.T. McAllister. **1989**. Regulation of coliphage T3 and T7 RNA polymerases by the *lac* repressor-operator system. *Gene* 84 : 209 – 219

Golovacheva, R.S., L.G. Loginova, T.A. Salikhov, A.A. Kolesnikov, G.N. Zaitseva. **1975**. A new thermophilic species, *Bacillus thermocatenuatus*. *Microbiology* 44 : 230 – 233

Gonzalez-Zorn, B., T. Teshager, M. Casas, M.C. Porrero, M.A. Moreno, P. Courvalin, L. Dominguez. **2005a**. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 11 : 954 – 956

Gonzalez-Zorn, B., A. Catalan, J.A. Escudero, L. Dominguez, T. Teshager, M.C. Porrero, M.A. Moreno. **2005b**. Genetic basis for dissemination of *armA*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56 : 583 – 585

Gregory, S.T., J.F. Carr, A.E. Dahlberg. **2005**. A mutation in the decoding center of *Thermus thermophilus* 16S rRNA suggests a novel mechanism of streptomycin resistance. *J. Bacteriol.* 187 : 2200 – 2202

Grohmann, E., G. Muth, M. Espinosa. **2003**. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 : 277 – 301

Guerin, M.E., J. Kordulakova, F. Schaeffer, Z. Svetlikova, A. Buschiazzo, D. Giganti, B. Gicquel, K. Mikusova, M. Jackson, P.M. Alzari. **2007**. Molecular recognition and interfacial catalysis by the essential phosphatidylinositol mannosyltransferase PimA from *Mycobacteria*. *J. Biol. Chem.* 282 : 20705 – 20714

Hanahan, D.. **1983**. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 : 557 – 580

Haskell, T.H., J.C. French, Q.R. Bartz . **1959**. Paromomycin I, paromamine, a glycoside of D-glucosamine. *J. Am. Chem. Soc.* 81 : 3480 – 3482

Hodgson, D.A.. **1982**. Glucose repression of carbon source uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* 128 : 2417 – 2430

Hofmann, C., R. Boll, B. Heitmann, G. Hauser, C. Dürr, A. Frerich, G. Weitnaer, S.J. Glaser, A. Bechthold. **2005**. Identification of genes encoding enzymes responsible for the biosynthesis of L-lyxose and the attachment of the eurenate during avilamycin biosynthesis. *Chem. Biol.* 12 : 1137 – 1143

Holmgren, A.. **1986**. Thioredoxin and glutaredoxin systems: an overview. In: *Thioredoxin and Glutaredoxin Systems: Structure and Functions*. Ed.: A. Holmgren. 1 – 9, Raven Press, New York.

Hong, J.S., S.J. Park, N. Parajuli, S.R. Park, H.S. Koh, W.S. Jung, C.Y. Choi, Y.J. Yoon. **2006**. Functional analysis of desVIII homologues involved in glycosylation of macrolide antibiotics by interspecies complementation. *Gene* 386 : 123 – 130

-
- Hotta, K., C.-B. Zhu, T. Ogata, A. Sundana, J. Ishikawa, S. Mizuno. **1996**. Enzymatic 2'-N-acetylation of Arbekacin and antibiotic activity of its product. *J. Antibiot.* 49 : 458 – 464
- Hotta, K., A. Sunada, Y. Ikeda, S. Kondo. **2000**. Double stage activity in aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiot.* 53 : 1168 – 1174
- Hu, Y.N., S. Walker. **2002**. Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem. Biol.* 9 : 1287 – 1296
- Huang, F., Y. Li, J. Yu, J.B. Spencer. **2002**. Biosynthesis of aminoglycoside antibiotics: cloning, expression and characterisation of an aminotransferase involved in the pathway to 2-deoxystreptamine. *Chem. Commun.* 2860 – 2861
- Huang, F., S.F. Haydock, T. Mironenko, D. Spiteller, Y. Li, J.B. Spencer. **2005**. The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: characterisation of an aminotransferase involved in the formation of 2-deoxystreptamine. *Org. Biomol. Chem.* 3 : 1410 – 1418
- Huang, F., D. Spiteller, N.A. Koorbanally, Y. Li, N.M. Llewellyn, J.B. Spencer. **2007**. Elaboration of neosamine rings in the biosynthesis of Neomycin and Butirosin. *Chem. Bio. Chem.* 8 : 283 – 288
- Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, S. Mura. **2003**. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 21 : 526 – 531
- Ikeda, H., E.T. Seno, C.J. Brunton, K.F. Chater. **1984**. Genetic mapping, cloning, and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196 : 501 – 507
- Jackman, J.E., C.R.H. Raetz, C.A. Fierke. **1999**. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase of *Escherichia coli* is a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* 38 : 1902 – 1911
- Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B.J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A.C. McHardy, F. Meyer, B. Möckel, W. Pfefferle, A. Pühler, D.A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahm, V.F. Wendisch, I. Wiegräbe, A. Tauch. **2003**. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 104 : 5 – 25
- Kaul, M., C.M. Barbieri, J.E. Kerrigan, D.S. Pilch. **2003**. Coupling of drug protonation to the specific binding of aminoglycosides to the A site of 16 S rRNA: elucidation of the number of drug amino groups involved and their identities. *J. Mol. Biol.* 326 : 1373 – 1387
- Kelley, L.A., R.M. MacCallum, M.J.E. Sternberg. **2000**. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* 299 : 501 – 522
-

Kharel, M.K., D.B. Basnet, H.C. Lee, K. Liou, Y.H. Moon, J.J. Kim, J.S. Woo, J.K. Shong. **2004a**. Molecular cloning and characterization of a 2-deoxystreptamine biosynthetic gene cluster in gentamicin-producing *Micromonospora echinospora* ATCC15835. *Mol. Cells* 18 : 71 – 78

Kharel, M.K., D.B. Basnet, H.C. Lee, K. Liou, J.S. Woo, B.G. Kim, J.K. Shong. **2004b**. Isolation and characterization of the tobramycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces tenebrarius*. *FEMS Microbiol. Lett.* 230 : 185 – 190

Kharel, M.K., B. Subba, D.B. Basnet, J.S. Woo, H.C. Lee, K. Liou, J.K. Shong. **2004c**. A gene cluster for biosynthesis of kanamycin from *Streptomyces kanamyceticus*: comparison with gentamicin biosynthetic gene cluster. *Arch. Biochem. Biophys.* 429 : 204 – 214

Khidekel, N., S. Arndt, N. Lamarre-Vincent, A. Lippert, K.G. Poulin-Kerstien, B. Ramakrishnan, P.K. Qasba, C.L. Hsieh-Wilson. **2003**. A Chemoenzymatic approach toward the rapid and sensitive detection of O-GlcNAc posttranslational modifications. *J. Am. Chem. Soc.* 125 : 16162 – 16163

Kieser, T., M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater, D.A. Hopwood. **2000**. Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, John Innes Centre, Norwich, UK

Kim, K.-R., T.-J. Kim, J.-W. Suh. **2008**. The gene cluster for Spectinomycin biosynthesis and the aminoglycoside-resistance function of *spcM* in *Streptomyces spectabilis*. *Curr. Microbiol.* 57 : 371 – 374

Kojima, M., S. Inouye, T. Nida. **1975**. Bioconversion of ribostamycin (SF-733). III. Formation, structure and synthesis of 3-N-carboxymethyl ribostamycin. *J. Antibiot.* 28 : 48 – 55

Kondo, S., K. Hotta. **1999**. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications. *J. Infect. Chemother.* 5 : 1 – 9

Kotra, L.P., J. Haddad, S. Mobashery. **2000**. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 : 3249 – 3256

Kudo, F., H. Tamegai, T. Fujiwara, U. Tagami, K. Hirayama, K. Kakinuma. **1999**. Molecular cloning of the gene for the key carbocycle-forming enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminocyclitol antibiotics and its comparison with dehydroquinase synthase. *J. Antibiot.* 52 : 559 – 571

Kudo, F., Y. Yamamoto, K. Yokoyama, T. Eguchi, K. Kakinuma. **2005**. Bioynthesis of 2-Deoxystreptamine by three crucial enzymes in *Streptomyces fradiae* NBRC 12773. *J. Antibiot.* 58 : 766 – 774

Kudo, F., K. Kwabe, H. Kuriki, T. Eguchi, K. Kakinuma. **2005a**. A new family of glucose-1-phosphate/glucosamine-1-phosphate nucleotidyltransferase in the biosynthetic pathways for antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* 127 : 1711 – 1718

-
- Kudo, F., T. Fujii, S. Kinoshita, T. Eguchi. **2007**. Unique O-ribosylation in the biosynthesis of butirosin. *Bioorg. Med. Chem.* 15 : 4360 – 4368
- Laemmli, U.K.. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680 – 685
- Leblond, P., P. Demuyter, J.M. Simonet, B. Decaris. **1990**. Genetic instability and hypervariability in *Streptomyces ambofaciens*: towards an understanding of a mechanism of genome plasticity. *Mol. Microbiol.* 4 : 707 – 714
- Lehle, L., W. Tanner. **1973**. The function of *myo*-inositol in the biosynthesis of raffinose. *Eur. J. Biochem.* 38 : 103 – 110
- Li, T.-L., F. Huang, S.F. Haydock, T. Mironenko, P.F. Leadlay, J.B. Spencer. **2004**. Biosynthetic gene cluster of the glycopeptide antibiotic teicoplanin: characterization of two glycosyltransferases and the key acyltransferase. *Chem. Biol.* 11 : 107 – 119
- Li, Y., N.M. Llewellyn, R. Giri, F. Huang, J.B. Spencer. **2005**. Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein-mediated pathway. *Chem. Biol.* 12 : 665 – 675
- Lin, Z., H.S. Rye. **2006**. GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41 : 211 – 239
- Liu, H.W., J.S. Thorson. **1994**. Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 48 : 223 – 256
- Liu, J., A. Mushegian. **2003**. Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci.* 12 : 1418 – 1431
- Lutzhetskyy, A., A. Bechthold. **2005**. It works: combinatorial biosynthesis for generating novel glycosylated compounds. *Mol. Microbiol.* 58 : 3 – 5
- MacNeil, D.J., K.M. Gewain, C.L. Ruby, G. Dezeny, P.H. Gibbons, T. MacNeil. **1992**. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111 : 61 – 68
- Madan, D., Z. Lin, H.S. Rye. **2008**. Triggering protein folding within the GroEL-GroES complex. *J. Biol. Chem.* Elektronische Vorabpublikation.
- Mann, R.L., R.M. Gale, R.F. van Abeele. **1953**. Hygromycin. II. Isolation and Properties. *Antibiot. Chemother.* 3 : 1279 – 1282
- Marinus, M.G.. **1996**. Methylation of DNA. In: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology – Second Edition*. Ed.: F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger. 728 – 791 ASM Press, Washington, D.C.
- Martinez-Fleites, C., M. Proctor, S. Roberts, D.N. Bolam, H.J. Gilbert, G.J. Davies. **2006**. Insights into the synthesis of lipopolysaccharide and antibiotics through the structures of two retaining glycosyltransferases from family GT4. *Chem. Biol.* 13 : 1143 – 1152
-

- Matsushima, P., R.H. Baltz. **1985**. Efficient plasmid transformation of *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae* protoplasts. *J. Bacteriol.* 163 : 180 – 185
- Mayfield, C.I., S.T. Williams, S.M. Ruddick, H.L. Hatfield. **1972**. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV Observation on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol. Biochem.* 4 : 79 – 91
- Maynes, J.T., C. Garen, M.M. Cherney, G.L. Newton, D. Arad, Y. Av-Gay, R.C. Fahey, M.N. James. **2003**. The crystal structure of 1-D-myo-inositol 2-acetamido-2-deoxy-alpha-D-glucopyranoside deacetylase (MshB) from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a zinc hydrolase with a lactate dehydrogenase fold. *J. Biol. Chem.* 278 : 47166 – 47170
- Mazodier, P., R. Petter, C. Thompson. **1989**. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* 171 : 3583 – 3585
- McCarthy, A.A., N.A. Peterson, R. Knijff, E.N. Baker. **2004**. Crystal structure of MshB from *Mycobacterium tuberculosis*, a deacetylase involved in mycothiol biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 335 : 1131 – 1141
- McEnroe, A.S., H.W. Taber. **1984**. Correlation between cytochrome aa3 concentrations and streptomycin accumulation in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26 : 507
- Mehling, A., U.F. Wehmeier, W. Piepersberg. **1995a**. Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: Towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. *Microbiology* 141 : 2139 – 2147
- Mehling, A., U.F. Wehmeier, W. Piepersberg. **1995b**. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* 128 : 119 – 126
- Meister, A.. **1992**. Biosynthesis and functions of glutathione, an essential biofactor. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. Spec. Issue* 1 : 1 – 6
- Michal, G.. **1999**. Biochemical Pathways – Biochemie Atlas. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Miller, J.H.. **1972**. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 433
- Minami, A., K. Kakinuma, T. Educhi. **2005**. Aglycon switch approach toward unnatural glycosides from natural glycoside with glycosyltransferase VinC. *Tetrahedron Lett.* 46 : 6187 – 6190
- Mingeot-Leclercq, M.-P., Y. Glupczynski, P.M. Tulkens. **1999a**. Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 : 727 – 737
- Mingeot-Leclercq, M.-P., P.M. Tulkens. **1999b**. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 : 1003 – 1012
-

-
- Mittler, M., A. Bechthold, G.E. Schulz. **2007**. Structure and action of the C-C bond-forming glycosyltransferase UrdGT2 involved in the biosynthesis of the antibiotic urdamycin. *J. Mol. Biol.* 372 : 67 – 76
- Mizoguchi, H., S. Nakagawa, S. Ando, M. Hayashi, K. Ochiai, H. Yokoi, N. Tateishi, A. Senoh, M. Ikeda, A. Ozaki. **2001**. Novel polynucleotides. European Patent EP 1108790
- Moazed, D., H.F. Noller. **1987**. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 327 : 389 – 394
- Mori, T., Y. Kyotani, I. Watanabe, T. Oda. **1972**. Chemical conversion of Lividomycin A into Lividomycin B. *J. Antibiot.* 25 : 149 – 150
- Motamedi, H., A. Shafiee, S.-J. Cai. **1995**. Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces* spp.. *Gene* 160 : 25 – 31
- Murakami, T., T.G. Holt, C.J. Thompson. **1989**. Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 171 : 1459 – 1466
- Murase, M., S. Ito, T. Fukatsu, H. Umezawa. **1970**. Studies on kanamycin related compounds produced during fermentation by mutants of *Streptomyces kanamyceticus*. Isolation and properties. *Progr. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 2 : 1098 – 1110
- Muth, G., W. Wohlleben, A. Pühler. **1988**. The minimal replicon of *Streptomyces ghanaensis* plasmid pSG5 identified by subcloning an Tn5 mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* 211 : 424 – 429
- Miyadoh, S. **1990**. A history of systematics and a concept of species in streptomycetes. *Actinomycetol.* 4 : 41 – 48
- Newton, G.L., K. Arnold, M.S. Price, C. Sherrill, S.B. Delcardyre, Y. Aharonowitz, G. Cohen, J. Davies, R.C. Fahey, C. Davis. **1996**. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *J. Bacteriol.* 178 : 1990 – 1995
- Newton, G.L., Y. Av-Gay, R.C. Fahey. **2000**. A novel mycothiol-dependent detoxification pathway in mycobacteria involving mycothiol S-conjugate amidase. *Biochemistry* 39 : 10739 – 10746
- Newton, G.L., Y. Av-Gay, R.C. Fahey. **2000a**. N-Acetyl-1-D-myo-inosityl-2-amino-2-deoxy-alpha-D-glucopyranoside deacetylase (MshB) is a key enzyme in mycothiol biosynthesis. *J. Bacteriol.* 182 : 6958 - 6963
- Newton, G.L., P. Ta, K.P. Bzymek, R.C. Fahey. **2006**. Biochemistry of the initial steps of mycothiol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 281 : 33910 – 33920
- Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P.B. Moore, T.A. Steitz. **2000**. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289 : 920 – 930
- Novotna, J., Z. Hostalek. **1985**. Phosphorylation of hexoses in *Streptomyces aureofaciens*: evidence that the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system is not operative. *FEMS Microbiol. Lett.* 28 : 347 – 350
-

-
- Ogasawara, Y., K. Katayama, A. Minami, M. Otsuka, T. Eguchi, K. Kakinuma. **2004**. Cloning, sequencing, and functional analysis of the biosynthetic gene cluster of macrolactam antibiotic vicenistatin in *Streptomyces halstedii*. *Chem. Biol.* 11 : 79 – 86
- Ohnishi, Y., J. Ishikawa, H. Hara, H. Suzuki, M. Ikenoya, H. Ikeda, A. Yamashita, M. Hattori, S. Horinouchi. **2008**. The Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 190 : 4050 – 4060
- Ogle, J.M., D.E. Brodersen, W.M. Clemmens Jr., M.J. Tarry, A.P. Carter, V. Ramakrishnan. **2001**. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* 292 : 897 – 902
- Ogle, J.M., F.V. Murphy, M.J. Tarry, V. Ramakrishnan. **2002**. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* 111 : 721 – 732
- Omura, S.. **1992**. Thom Award Lecture. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Ind. Microbiol.* 10 : 135 – 156
- Ouzzine, M., S. Gulberti, N. Levoine, P. Netter, J. Magdalou, S. Fournel-Gigleux. **2002**. The donor substrate specificity of the human beta 1,3-glucuronosyltransferase I toward UDP- glucuronic acid is determined by two crucial histidine and arginine residues. *J. Biol. Chem.* 277 : 25439 – 25445
- Paget, M.S.B., L. Chamberlin, A. Atrih, S.J. Foster, M.J. Buttner. **1999**. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 181 : 204 – 211
- Palcic, M.M.. **1999**. Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 : 616 – 624
- Pape, T., W. Wintermeyer, M.V. Rodnina. **2000**. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nature Struct. Biol.* 7 : 104 – 107
- Pearce, C.J., J.E. Barnett, C. Anthony, M. Akhtar, S.D. Gero. **1976**. The role of the pseudo-disaccharide neamine as an intermediate in the biosynthesis of neomycin. *Biochem. J.* 159 : 601 – 606
- Peterbauer, T., L.B. Lahuta, A. Blöchl, J. Mucha, D.A. Jones, C.L. Hedley, R.J. Gòrecki, A. Richter. **2001**. Analysis of the raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition. *Plant Physiol.* 127 : 1764 – 1774
- Peterbauer, T., A. Richter. **1998**. Galactosylnonitol and stachyose synthesis in seeds of Adzuki bean. *Plant Physiol.* 117 : 165 – 172
- Pfister, P., M. Risch, D.E. Brodersen, E.C. Bottger. **2003**. Role of 16S rRNA Helix 44 in Ribosomal Resistance to Hygromycin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 : 1496 – 1502
-

-
- Piepersberg, W.. **1992**. Metabolism and cell individualization. In: *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*. Eds.: D. Chadwick, J. Whelan, K. Widdows. 294 – 299, John Wiley & Sons, Inc.
- Piepersberg, W.. **1993**. Streptomycetes and Corynebacteria. In: *Biotechnology – Second Edition, Vol. 1*. Ed.: H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler. 433 – 468, VCH Weinheim
- Piepersberg, W.. **1995**. Streptomycin and related aminoglycosides. *Biotechnology* 28 : 531 – 570
- Piepersberg, W.. **1997**. Molecular biology, biochemistry, and fermentation of aminoglycoside antibiotics. In: *Biotechnology of Industrial Antibiotics – Second Edition*. Ed.: W.R. Strohl. 81 – 163, Marcel Dekker, Inc.
- Piepersberg, W.. **2002**. Endogenous Antimicrobial Molecules: An Ecological Perspective. In: *Molecular Medical Microbiology, Vol. 1*. Ed.: M. Sussman. 561 – 584, Academic Press
- Piepersberg, W., K.M. Aboshanab, H. Schmidt-Beißner, U.F. Wehmeier. **2007**. The biochemistry and genetics of aminoglycoside producers. In: *Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery – Second Edition*. Ed.: D.P. Arya. 15 – 118, John Wiley & Sons, Inc.
- Piepersberg, W., J. Distler. **1997**. Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In: *Biotechnology – Second, Revised Edition*. Ed.: H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler. 7 : 399 – 488
- Pittenger, R.C., R.N. Wolfe, M.M. Hoehn, P.N. Marks, W.A. Daily, J.M. McGuire. **1953**. Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiot. Chemother.* 3 : 1268 – 1278
- Pöhling, S.. **1997**. Dissertation Bergische Universität Wuppertal
- Prins, J.M., G.J. Weverling, K. de Blok, R.J. van Ketel, P. Speelman. **1998**. Validation and nephrotoxicity of a simplified once-daily aminoglycoside dosing schedule and guidelines for monitoring therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 2494 – 2499
- Poole, K.. **2005**. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56 : 20 – 51
- Popovic, B., X. Tang, D.Y. Chirgadze, F. Huang, T.L. Blundell, J.B. Spencer. **2006**. Crystal structures of the PLP- and PMP-bound forms of BtrR, a dual functional aminotransferase involved in butirosin biosynthesis. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 65 : 220 – 230
- Postma, P.W., J. Lengeler, G.R. Jacobson. **1993**. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57 : 543 – 594
- Postma, P.W., J. Lengeler, G.R. Jacobson. **1996**. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems. In: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular*
-

Biology – Second Edition. Ed.: F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger. 1149 – 1174 ASM Press, Washington, D.C.

Prentki, P., H. Krisch. **1984**. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29 : 303 – 313

Qasba, P.K., B. Ramakrishnan, E. Boeggeman. **2006**. Mutant glycosyltransferases assist in the development of a targeted drug delivery system and contrast agents of MRI. *Am. Assoc. Pharm. Soc. J.* 8 : 190 – 195

Qasba, P.K., E. Boeggeman, B. Ramakrishnan. **2008**. Site-specific linking of biomolecules via glycan residues using glycosyltransferases. *Biotechnol. Prog.* 24 : 520 – 526

Ramakrishnan, B., E. Boeggeman, P.K. Qasba. **2005**. Mutation of Arg 228 to lysine enhances the glucosyltransferase activity of bovine β -1,4-galactosyltransferase. *Biochemistry* 44 : 3202 – 3210

Rao S., M. Rossmann. **1973**. Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.* 76 : 241 – 56

Rao, R.N., J.R. Turner. **1996**. Activator gene for macrolide biosynthesis. U.S. Patent Nr.: 5,514,544 für Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, U.S.A.

Rather, P.N.. **1998**. Origins of the aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates* 1 : 285 – 291

Recht, M.I., S. Douthwaite, J. Puglisi. **1999**. Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J.* 18 : 3133 – 3138

Reed, K.C., D.A. Mann. **1985**. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acid Res.* 13 : 7207 – 7221

Rinehart Jr., K.L., J.M. Malik, R.S. Nystrom, R. Strohsan, S.T. Truitt, M. Taniguch, J.P. Rolls, W.J. Haak, B.A. Ruff. **1974**. Carbon-13 as a biosynthetic tool. IV. Biosynthetic incorporation of glucosamine-1-¹³C and glucose-6-¹³C into neomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 96 : 2263 – 2265

Ristuccia, A.M., B.A. Cunha. **1985**. An overview of amikacin. *Ther. Drug Mon.* 7 : 12 – 25

Rosenberg, E.Y., D. Ma, H. Nikaido. **2000**. AcrD of Escherichia coli is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* 182 : 1754 – 1756

Rowe, C.J., J. Cortés, S. Gaisser, J. Staunton, P.F. Leadley. **1998**. Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes. *Gene* 216 : 215 – 223

Sabater, B., J. Sebastian, C. Asensio. **1972**. Identification and properties of an inducible mannikinas from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochem. Biophys. Acta* 284 : 406 – 413

-
- Saier Jr, M.H., M.J. Fagan, C. Hoischen, J. Reizer. **1993**. Transport Mechanisms. In: *Bacillus subtilis and other Gram-positive Bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Ed.: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, R. Losick. 133 – 156 ASM Press, Washington, D.C.
- Sambrook, J., D.W. Russel. **2001**. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Dritte Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
- Sanger, F., S. Nicklen, A.R. Coulsen. **1977**. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 : 5463 – 5467
- Schatz, A., E. Bugie, S.A. Waksman. **1944**. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 55 : 66 – 69
- Schlünzen, F., R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi. **2001**. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413 : 814 – 821
- Schroeder, R., C. Waldsich, H. Wank. **2000**. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J.* 19 : 1 – 9
- Schultz, J., A.D. Elbein. **1974**. Biosynthesis of mannosyl- and glucosyl-phosphoryl-polyprenols in *Mycobacterium smegmatis*. Evidence for oligosaccharide-phosphoryl-polyprenols. *Arch. Biochem. Biophys.* 160 : 311 – 322
- Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare, G.H. Miller. **1993**. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57 : 138 – 163
- Shier, W.T., K.L. Rinehart Jr., D. Gottlieb. **1969**. Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63 : 198 – 204
- Shier, W.T., P.C. Schaefer, D. Gottlieb, K.L. Rinehart Jr.. **1974**. Use of mutants in the study of aminocyclitol antibiotic biosynthesis and the preparation of the hybridmycin C complex. *Biochemistry* 13 : 5073 – 5078
- Shomura, T., N. Ezaki, T. Tsuruoka, T. Niwa, E. Akita. **1970**. Studies on antibiotic SF-733, a new antibiotic. I. Taxonomy, isolation and characterization. *J. Antibiot.* 23 : 155 – 161
- Simon, R., U. Prierer, A. Pühler. **1983**. A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1 : 784 – 791
- Sinnott, M.L.. **1990**. Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* 90 : 1171 – 1202
- Skeggs, P.A., D.J. Holmes, E. Cundliffe. **1987**. Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* 133 : 915 – 923
-

- Smokvina, T., P. Mazodier, F. Boccard, C.J. Thompson, M. Guerineau. **1990**. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* 94 : 53 – 59
- Southern, E.M.. **1975**. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503 – 517
- Strohl, W.R., H.G. Floss. **1995**. Thiopeptides. In: *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production*. Ed.: L.C. Vining, C. Stuard. 223 – 238, Butterworth-Heinemann
- Studier, F.W., B.A. Moffat. **1986**. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189 : 113 – 130
- Stumpp, T., B. Wilms, J. Altenbuchner. **2000**. Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *Biospektrum* 6 : 33 – 36
- Stumpp, T., D. Jennen, D. Lyutzkanova, L. Starodubtseva, J. Altenbuchner. **2002**. Cloning of the Spectinomycin biosynthesis genes. In: *Microbial Secondary Metabolites: Biosynthesis, Genetics and Regulation*. Ed.: F. Fierro, J.F. Martin. 27 – 41 Research Signpost, Kerala, Indien.
- Subba, B., M.K. Kharel, H.C. Lee, K. Liou, B.G. Kim, J.K. Shong. **2005**. The ribostamycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces ribosidificus*: comparison with butirosin biosynthesis. *Mol. Cells* 20 : 90 – 96
- Tabor, S., C.C. Richardson. **1985**. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 : 1074 – 1078
- Takano, E., J. White, C.J. Thompson, M.J. Bibb. **1995**. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp.. *Gene* 166 : 133 – 137
- Takeuchi, T., T. Hikiji, K. Nitta, S. Yamasaki, S. Abe, H. Takayama, H. Umezawa. **1957**. Biological studies on kanamycin. *J. Antibiot.* 10 : 107 – 114
- Tamegai, H., E. Nango, M. Kuwahara, M. Yamamoto, Y. Ota, H. Kuriki, T. Eguchi, K. Kakinuma. **2002**. Identification of L-glutamine: 2-deoxy-scylo-inosose aminotransferase required for the biosynthesis of butirosin in *Bacillus circulans*. *J. Antibiot.* 55 : 707 – 714
- Thorson, J.S., T.J. Hosted Jr., J.Q. Jiang, J.B. Biggins, J. Ahlert. **2001**. Nature's carbohydrate chemists: the enzymatic glycosylation of bioactive bacterial metabolites. *Curr. Org. Chem.* 5 : 139 – 167
- Titgemeyer, F., J. Walkenhorst, J. Reizer, M.H. Stuver, X. Cui, M.H. Saier. **1995**. Identification and characterisation of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology* 141 : 51 – 58

-
- Tok, J.B., L.J. Dunn, R.C. Des Jean. **2001**. Binding of dimeric aminoglycosides to the HIV-1 rev responsive element (RRE) RNA construct. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 : 1127 – 1131
- Truman, A.W., F. Huang, N.M. Llewellyn, J.B. Spencer. **2007**. Characterization of the enzyme BtrD from *Bacillus circulans* and revision of its functional assignment in the biosynthesis of Butirosin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 : 1462 – 1464
- Truman, A.W., L. Robinson, J.B. Spencer. **2006**. Identification of a deacetylase involved in the maturation of teicoplanin. *Chem. Bio. Chem.* 7 : 1670 – 1675
- Tumbale, P., H. Jamaluddin, N. Thiyagarajan, K. Brew, K.R. Acharya. **2008**. Structural basis of UDP-galactose binding by alpha-1,3-galactosyltransferase (alpha3GT): role of negative charge on aspartic acid 316 in structure and activity. *Biochemistry* 47 : 8711 – 8718
- Umezawa, H., M. Ueda, K. Maeda, K. Yagiashita, S. Kondo, Y. Okami, R. Utahara, Y. Osato, K. Nitta, T. Takeuchi. **1957**. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J. Antibiot.* 10 : 181 – 188
- Umezawa, H., M. Okanishi, S. Kondo, K. Hamana, R. Utahara, K. Maeda, S. Mitsuhashi. **1967**. Phosphorylative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R factor. *Science* 157 : 1559 – 1561
- Umezawa, S., S. Shibahara, S. Omoto, T. Takeuchi, H. Umezawa. **1968**. Studies on the biosynthesis of 3-amino-3-deoxy-D-glucose. *J. Antibiot.* 21 : 485 – 491
- Unligil, U.M., J.M. Rini. **2000**. Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 10 : 510 – 517
- Vasiljevic, B., E. Cundliffe. **1990**. Cloning of grm, a gentamicin resistant gene from *Micromonospora purpurea*. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 14A : 122
- Vetting, M.W., P.A. Frantom, J.S. Blanchard. **2008**. Structural and enzymatic analysis of MshA from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 283 : 15834 – 15844
- Volff, J., C. Eichenseer, P. Viell, W. Piendl, J. Altenbuchner. **1996**. Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Microbiol.* 21 : 1037 – 1047
- Wakisaka, Y., E. Masaki, Y. Nishimoto. **1982**. Formation of crystalline delta-endotoxin or poly-beta-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 : 1473 – 1480
- Waksman, S.A.. **1965**. A quarter-century of the antibiotic era. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5 : 9 – 19
- Waksman, S.A., H.A. Lechevalier, D.A. Harris. **1949**. Neomycin-production and antibiotic properties. *J. Clin. Invest.* 28 : 934 – 939
-

-
- Waksman, S.A., H.A. Lechevalier. **1962**. The Actinomycetes. Vol. I – III ; Williams & Wilkins Co., Baltimore
- Walker, R.J., G.G. Duggin. **1988**. Drug nephrotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28 : 331 – 345
- Wang, F., X. Xiao, A. Saito, H. Schrepf. **2002a**. *Streptomyces olivaceoviridis* possesses a phosphotransferase system that mediates specific, phosphoenolpyruvate-dependent uptake of N-acetylglucosamine. *Mol. Genet. Genomics* 268 : 344 – 351
- Wang, L., R.L. White, L.C. Vining. **2002**. Biosynthesis of the dideoxysugar component of jadomycin B: genes in the *jad* cluster of *Streptomyces venezuelae* ISP5230 for L-digitoxose assembly and transfer to the angucycline aglycone. *Microbiology* 148 : 1091 – 1103
- Watanabe, R., K. Ohishi, Y. Maeda, N. Nakamura, T. Kinoshita. **1999**. Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem. J.* 339 : 185 – 192
- Wehmeier, U.F., W. Piepersberg. **2004**. Biotechnology and molecular biology of the alpha-glucosidase inhibitor Acarbose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 : 613 – 625
- Weinstein, M.J., G.M. Luedemann, E.M. Oden, G.H. Wagman, J.P. Rosselet, J.A. Marquez, C.T. Coniglio, W. Charney, H.L. Herzog, J. Black. **1963**. Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*. *J. Med. Chem.* 122 : 463 – 464
- Wellington, E.M.H., N. Cresswell, P.R. Herron. **1992**. Gene transfer between streptomycetes in soil. *Gene* 115 : 193 – 198
- Whithers, S.G., W.W. Wakarchuk, N.C.J. Strynadka. **2002**. One step closer to a sweet conclusion. *Chem. Biol.* 9 : 1270 – 1273
- Wirmer, J., E. Westhof. **2006**. Molecular contacts between antibiotics and the 30S ribosomal particle. *Meth. Enzymol.* 415 : 180 – 202
- Wohlleben, W., G. Muth. **1993**. Streptomyces plasmid vectors. In: *Plasmids – A Practical Approach. 2nd Edition*. Ed.: K.G. Hardy. 147 – 175 IRL Press, Oxford
- Woo, P.W.K., H.W. Dion, Q.R. Bartz. **1971**. Butirosins A and B, aminoglycoside antibiotics. I. Structural units. II. Mass spectrometric study. III. Structures. *Tetrahedron Letters* 12 : 2617 – 2628
- Yamane, K., Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa. **2004**. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 : 2069 – 2074
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, J. Messing. **1985**. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 : 103 – 119
-

- Yeton, J.A., E. Vinogradov, M.B. Perry, C. Whitfield. **2000**. Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by *waaG* destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. *J. Bacteriol.* 182 : 5620 – 5623
- Yokoyama, K., Y. Yamamoto, F. Kudo, T. Eguchi. **2008**. Involvement of two distinct *N*-acetylglucosaminyltransferases and a dual-function deacetylase in Neomycin biosynthesis. *Chem. Bio. Chem.* 9 : 865 – 869
- Young, M.L., M. Bains, A. Bell, R.E. Hancock. **1992**. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 : 2566 – 2568
- Zembower, T.R., G.A. Noskin, M.J. Postelnick, C. Nguyen, L.R. Peterson. **1998**. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 10 : 95 – 105
- Zhang, C., B.R. Griffith, Q. Fu, C. Albermann, X. Fu, I.-K. Lee, L. Li, J. S. Thorson. **2006**. Exploiting the reversibility of natural product glycosyltransferase-catalyzed reactions. *Science* 313 : 1291 – 1294

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt zu haben.

Christian Mandt; Wuppertal, im Oktober 2008