

***Kitasatospora putterlickiae* F18-98, ein neu isolierter Bakterienstamm aus
der Rhizosphäre von *Putterlickia verrucosa*.**

**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur
Aminohydroxybenzoesäure-Biosynthese**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Theresa Boettcher

aus

Verl

Bonn, November 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. E. Leistner

2. Referent: Prof. Dr. G. M. König

Tag der Promotion:

Für Erik

Und für meine Eltern

„Nichts beflügelt die Wissenschaft so
wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur.“

A. Penzias, Amerikanischer Physiker (*1933)

Ein „Herzliches Dankeschön“...

... gilt es all denen zu sagen, die – auf unterschiedlichste Weise – zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben und mich dabei „beflügeln“ konnten.

Mit dieser Arbeit begann für mich eine Reise, nicht nur vom Institut der Pharmazeutischen Biologie in Bonn nach Seattle zum Department of Chemistry und wieder zurück, sondern auch eine, bei der es die Vielfältigkeit der Natur zu bestaunen und zu entdecken galt. Auf dem Weg mit seinen Höhen und Tiefen bin ich vielen begegnet, die sich von der Faszination der Wissenschaft anstecken ließen. Ihre Begeisterung ließ mich schneller über den einen oder anderen Stolperstein hinwegsehen. Andere standen „einfach nur“ unterstützend und hilfreich zur rechten Zeit zur Seite. Allen ein „Herzliches Dankeschön“:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. E. Leistner, danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema forschen zu können, für die sehr gute Betreuung, die ständig offene Tür und die stete Gesprächsbereitschaft. Ein besonderer Dank gilt dafür, dass ich experimentelle Freiräume nutzen durfte und eigene Ideen umsetzen konnte. Seine Unterstützung und seine Kontakte ermöglichten zudem die Forschungsaufenthalte in Seattle.

Frau Prof. Dr. G. König danke ich für die Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. H. G. Floss bedanke ich mich herzlich für eine sehr freundliche und unkomplizierte Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in Seattle und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Ebenso möchte ich für seine Anregungen und fachlichen Diskussionen sowie für die gute Kooperation im Rahmen dieser Arbeit danken.

Dr. Christel Drewke stand stets mit einem guten Rat zur Seite. Ein herzliches Dankeschön auch für ihre Bereitschaft, wissenschaftliche Fragestellungen zu diskutieren, die nicht zu „ihrem“ Forschungsthema gehörten sowie für ihre offene Art, Fragen aller Art zu klären.

Der Maytansin-Subgruppe mit Dr. Christian Pullen, Dr. Dorothee Clade, Dr. Kristina Meurer, Susanne Wings, Silke Engels und Ulrike Rick danke ich für die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima. Bei Dr. Dorothee Clade möchte ich mich für die erste Einführung in die Thematik bedanken. Dr. Christian Pullen danke ich herzlich für die fachlichen und darüber hinausgehenden Diskussionen, die Hilfe bei der Sammlung von Moosen in Oregon, USA sowie für eine Wanderung zum Mount Hood in Oregon. Ulrike Rick danke ich für ihr Engagement bei dieser Arbeit und die Unterstützung in vielen „kleinen“ Dingen, die zusammengenommen eine große Hilfe bedeuteten.

Susanne Wings, Mahalia Ahimsa-Müller, Stephanie Blättermann und Magdalena Oklejak danke ich für die Mithilfe an dieser Arbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten bzw. ihrem Praktikum.

Weiterhin gilt mein Dank:

Prof. Dr. Rolf Müller für viele hilfreiche Diskussionen zu dieser Arbeit und die Möglichkeit, die Protoplastierung von Streptomycceten in seinem Labor in der GBF Braunschweig lernen zu können. Dabei auch ein herzliches Dankeschön an seine Mitarbeiter für ihre Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. I. Groth, Frau T. Heinrich und Frau Dr. I. Sattler für die Gastfreundschaft bei meinem Besuch am HKI in Jena sowie für die Kooperationen im Rahmen dieser Arbeit.

Herrn Prof. M. Goodfellow und Carlos Rodriguez der Universität Newcastle, England für die Kooperation bzgl. der taxonomischen Bestimmung von Bakterien im Rahmen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. P. Sauer, Institut für Ökologie und Evolutionsbiologie, sowie seinen Mitarbeitern für die freundliche Einführung in die Technik des Sequenzierens und die Möglichkeit, das Sequenziergerät benutzen zu dürfen.

Frau Dornbusch und Frau Gassen für ihre freundliche Hilfe administrativer Probleme.

Dr. Andreas Genau, Dr. Christel Drewke und Dr. Erik Schütz für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und in den Kursen sowie für eine unkomplizierte Hilfsbereitschaft über „Arbeitsgruppengrenzen“ hinweg. Dies hat entscheidend zum Spaß an der Arbeit und zur Auflockerung des Laboralltags beigetragen.

Furthermore, this acknowledgement wouldn't be complete without saying thank you to all the people, who extended my knowledge about molecular biology and who also helped me feeling at home in Seattle:

First of all, I want to thank Dr. Tin-Wein Yu for his cooperation, the interest in my work and for teaching me more about molecular biology. In all our discussions he gave me an idea how one can look on results, even on negative ones, and how to connect those results together.

A big “thank you” goes to Dr. Linqun Bai for teaching me things I hadn’t known before, e.g. how to make good competent cells or how to carry out a “mini prep” quickly. His good humour and enthusiasm always provided a good atmosphere in the lab.

I want to say a special thank you to Dr. Stephanie Grond for her hospitality. She made me feel at home the very first day I went into the Floss lab. I acknowledge her constant interest in my work and her ideas concerning the OSMAC concept. Together with Dr. Steven Moss and Dr. Sonja Nordhoff we discovered the Pacific Northwest and hiked in the Cascades. I won’t forget all our discussions about our projects, combinatorial chemistry in general and politics during the coffee break.

There is also to mention Dr. Kenji Arakawa for his cooperation in the “AHBA project”; Dr. Taifo Mahmud, who welcomed me in the Floss group and tried to “keep a bench open” for me; Kay Kampsen, who send me so many different strains or plasmids, and the further former or current members of the Floss group: Dr. Chun-Gyu Kim, Prof. Yasu Kato, Dr. Matt McDonald, Dr. Simeon Bowers, Dr. Thomas Koch, Dr. Christian Hertweg and Brian Carroll. I owe all my thanks for their help and support.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, ohne deren Unterstützung meines Lebenswegs und ohne ihren Zuspruch diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen wäre. Zugleich gilt mein Dank meiner Oma für ihr fortwährendes Interesse an meiner Arbeit. Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Erik danken, der immer für mich da war.

Titelbild:

Kitasatospora putterlickiae F18-98,
12 h nach Kultivierung in ISP 2-Medium;
aufgenommen von Frau Dr. Groth, HKI Jena

Inhalt

Abkürzungen	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Struktur, Vorkommen und Wirkungen von Ansamycinen	1
1.2 Biosynthese der Maytansinoide.....	4
1.2.1 Biosynthese der mC ₇ N-Einheit.....	4
1.2.2 Biosynthese der Ansastruktur	8
1.3 Besonderheiten der Biosynthese von Maytansinoiden	9
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Nährmedien, Puffer, Lösungen	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Material für Chromatographie und Filtration sowie weiteres Verbrauchsmaterial	16
2.1.3 Enzyme, Größenstandards und Reagenziensätze.....	16
2.1.4 Oligonukleotide	17
2.1.5 Plasmide und Cosmide	19
2.1.6 Nährmedien	21
2.1.6.1 Nährmedien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	22
2.1.6.2 Medien zur Isolierung und Anzucht von Aktinomyceten	22
2.1.6.3 Nährmedien zur Protoplastentransformation von Streptomyceten.....	22
2.1.6.4 Medien zur Förderung der Produktion von Sekundärmetaboliten in Aktinomyceten.....	23
2.1.6.5 Medium zur Anzucht von <i>Penicillium avellaneum</i>	24
2.1.6.6 Medien zur Kultivierung von pflanzlichen Zellkulturen.....	25
2.1.7 Antibiotika	25
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	26
2.1.8.1 Puffer zur DNA-Isolierung	26
2.1.8.2 Puffer zur Transformation, Transfektion und Selektion von <i>E. coli</i>	26
2.1.8.3 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten.....	27
2.1.8.4 Puffer und Lösungen für Hybridisierungen nach Southern.....	27
2.1.8.5 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese	28
2.1.8.6 Puffer für die automatische Sequenzierung	28
2.1.8.7 Puffer zur Enzymreinigung.....	29
2.1.8.8 Puffer zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	29
2.2 Laboreinrichtung.....	30
2.2.1 Sterilisationsmethoden.....	30
2.2.2 Reinstwasseraufbereitung	30
2.2.3 Reinraumbedingungen/ Laminar Airflow	30
2.3 Bakterienstämme, Pilze, pflanzliche Zellkulturen.....	31
2.3.1 Bakterienstämme	31
2.3.2 Pilze	32
2.3.3 Pflanzliche Zellkulturen.....	32
2.4 Kulturbedingungen	32
2.4.1 Messung der Bakterienzellzahl von <i>E. coli</i> -Kulturen	32
2.4.2 Anzucht und Konservierung von <i>E. coli</i>	32
2.4.3 Anzucht und Konservierung von Aktinomyceten, insbesondere Streptomyceten	33
2.4.3.1 Anzucht in Fest- und Flüssigmedien.....	33

2.4.3.2 Anzucht von <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F98-18 zur Förderung der Produktion von Sekundärmetaboliten.....	33
2.4.3.3 Erstellen von Wachstumskinetiken für <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98	34
2.4.3.4 Herstellung von Sporensuspensionen (nach <i>Kieser et al., 2000</i>) und Erzeugung von Glycerindauerkulturen.....	35
2.4.4 Erhaltung pflanzlicher Zellsuspensionskulturen	35
2.5 Methoden der Molekularbiologie.....	36
2.5.1 Isolierung genomischer DNA	36
2.5.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Aktinomyceten (modifiziert nach <i>Altenbuchner und Cullum, 1984</i>).....	36
2.5.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Aktinomyceten im Kleinmaßstab (nach <i>Hopwood, 1985, Procedure 4, „Rapid Small Scale Isolation“</i>)	37
2.5.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenzellkulturen.....	37
2.5.2 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA.....	37
2.5.2.1 Extraktion von Plasmid- und Cosmid-DNA.....	38
2.5.2.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	39
2.5.3 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA	39
2.5.3.1 Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen	39
2.5.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	39
2.5.4 Native Agarose-Gelelektrophorese	40
2.5.5 Die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	41
2.5.5.1 Reaktionsbedingungen der PCR und Auswahl der DNA-Polymerase	41
2.5.5.2 Amplifikationsprotokoll für GC-reiche DNA	43
2.5.5.3 Amplifikationsprotokoll für 16S rDNA und die 16S-23S rDNA Spacerregion.....	43
2.5.5.4 Amplifikationsprotokoll für die Identifizierung von AHBA-Synthasegenen in <i>Putterlickia verrucosa</i> -Zellkulturen mit degenerierten Oligonukleotiden	44
2.5.6 Enzymatische Manipulationen an DNA.....	45
2.5.6.1 Restriktionsspaltung von DNA	45
2.5.6.2 Erstellen glatter DNA-Enden durch Auffüllen mit Klenow-Fragment	45
2.5.6.3 Dephosphorylierung von DNA	46
2.5.6.4 Addition von A'-Überhängen.....	46
2.5.6.5 Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase	47
2.5.7 Klonierung von PCR-Fragmenten in T-Überhangvektoren	47
2.5.7.1 Klonierung von 3'-adenylierten PCR-Fragmenten.....	47
2.5.7.2 Klonierung glattendiger PCR-Produkte	48
2.5.7.3 Erzeugung eines T-Überhangvektors	48
2.5.8 Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit DNA mittels Hitzeschock.....	49
2.5.8.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der Methode nach <i>Inoue et al. (1990)</i>	49
2.5.8.2 Rubidiumchlorid-Methode	50
2.5.8.3 Hitzeschock-Transformation und „Blau-Weiß“-Selektion.....	50
2.5.9 Elektroporation-vermittelte Transformation von <i>Escherichia coli</i>	51
2.5.9.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation.....	52
2.5.9.2 Elektroporation.....	52
2.5.10 Protoplastierung von Streptomyceten	53
2.5.11 Transformation von Streptomyceten.....	53
2.5.12 Herstellung und Analyse einer Cosmid-Bank	54
2.5.12.1 Vorbereitung genomischer DNA durch partielle Hydrolyse	55
2.5.12.2 Der Cosmid-Vektor pOJ446.....	55
2.5.12.3 Ligation	56
2.5.12.4 In-vitro-Verpackung rekombinanter Cosmide.....	56
2.5.12.5 Titerbestimmung der Cosmid-Bank	57
2.5.12.6 Amplifikation der Cosmid-Bank	58
2.5.12.7 Analyse der Cosmid-Bank	59
2.5.12.8 Cosmid-Kartierung.....	59
2.5.13 Hybridisierung von DNA und Transfertechniken	60
2.5.13.1 Herstellung markierter Sonden mittels PCR	60
2.5.13.2 DNA-Markierung unter Verwendung des Klenow-Fragmentes.....	60
2.5.13.3 Radioaktive Markierung von DNA mit Hilfe des Klenow-Fragmentes	61
2.5.13.4 „Southern Blot“ und Detektion mit DIG-markierten Sonden.....	61
2.5.13.5 Transfer nach Southern mit der Ammoniumacetat-Methode und anschließende radioaktive Detektion.....	64

2.5.13.6 Kolonie-Hybridisierung	65
2.5.14 DNA-Sequenzierung	66
2.5.14.1 Parameter für die Sequenzierreaktion	66
2.5.14.2 „Cycle Sequencing-Amplifikation“ für GC-reiche DNA-Matrizen	67
2.5.14.3 Reinigung der Sequenzierreaktion	67
2.5.14.4 Trennung im Sequenziergel	68
2.5.14.5 Computergestützte Auswertung der Sequenzierdaten	69
2.6 Methoden der Proteinbiochemie	70
2.6.1 Proteinquantifizierung nach Bradford	70
2.6.2 Auftrennung von Proteinen über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	70
2.6.3 Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	72
2.6.3.1 Anzucht, Induktion und Zellaufschluss zur Bestimmung der Proteinlöslichkeit	72
2.6.3.2 Herstellung von zellfreien Proteinrohextrakten zur Reinigung rekombinant exprimierter Proteine in <i>E. coli</i>	72
2.6.3.3 Coexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> und Herstellung zellfreier Rohextrakte für enzymatische Untersuchungen	73
2.6.3.4 Affinitätschromatographie von Poly-Histidin-Fusionsproteinen	74
2.6.4 Gewinnung rekombinanter Proteine aus <i>Streptomyces lividans</i>	75
2.6.4.1 Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte aus <i>Streptomyces lividans</i>	75
2.6.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten	75
2.6.5.1 Aktivitätstest der AHBA-Synthase	75
2.6.5.2 Bestimmung der Oxidoreduktase-Aktivität	76
2.7 Analytische Methoden	78
2.7.1 Massenspektrometrische Untersuchungen	78
2.7.2 Arbeiten zur Maytansinoidproduktion in Bakterien	79
2.7.2.1 Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Überständen von Bakterienkulturen	79
2.7.2.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung extrahierter Sekundärstoffe	79
2.7.2.3 Bioautographie mit <i>Penicillium avellaneum</i> zur Erfassung von Maytansin	80
2.7.2.4 Fütterung mit ¹⁴ C-markierter Aminohydroxybenzoesäure (AHBA)	80
2.7.2.5 Autoradiographie	81
3 ERGEBNISSE	83
3.1 Suche nach Maytansinbiosyntheseogenen in <i>Putterlickia verrucosa</i>	83
3.1.1 PCR mit degenerierten AHBA-Synthasegen-„Primern“	83
3.1.2 Hybridisierungsversuche nach Southern mit PCR-generierten und Plasmid-abgeleiteten heterologen Sonden	85
3.2 Taxonomische Bestimmung eines Isolates aus der Rhizosphäre einer Maytansin führenden Pflanze ..	86
3.2.1 16S rRNA-Taxonomie	86
3.2.2 Bestimmung der 16S-23S rRNA-Gen Spacerregion	88
3.3 Untersuchungen zum Sekundärstoffspektrum von <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98	90
3.3.1 Erstellen einer Wachstumskinetik von <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98	91
3.3.2 Einbau radioaktiv markierter AHBA in Sekundärstoffe von <i>K. putterlickiae</i>	92
3.3.3 Untersuchung des Stammes <i>K. putterlickiae</i> auf seine biologische Aktivität mittels Bioautographie ..	94
3.4 Molekularbiologische Untersuchungen am Stamm <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98	95
3.4.1 Die AHBA-Synthase aus <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98	95
3.4.1.1 Anlage einer Cosmid-Bank zur Sequenzierung des AHBA-Synthasegens	96
3.4.1.2 Identifizierung und Analyse von Cosmiden mit AHBA-Synthasegen	96
3.4.1.3 Klonierung und Sequenzierung des AHBA-Synthasegens	100
3.4.1.4 Überexpression der AHBA-Synthase aus <i>K. putterlickiae</i> F18-98 in <i>E. coli</i>	104
3.4.1.5 Aufreinigung und Funktionstestung der AHBA-Synthase aus <i>K. putterlickiae</i>	108
3.4.2 Identifizierung weiterer Gene der Maytansinoidbiosynthese in <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98 ..	110
3.4.2.1 Identifizierung weiterer Gene der AHBA-Biosynthese	110
3.4.3.2 Subklonierungen und partielle Sequenzierung des Cosmids pTbc2	113
3.4.2.3 Untersuchung des Cosmids pTbc2 auf weitere Gene der Maytansinbiosynthese	117

3.5 Untersuchung der Anfangsschritte der AHBA-Biosynthese.....	119
3.5.1 Biosynthetische Untersuchungen nach heterologer Expression in <i>E. coli</i>	120
3.5.1.1 Coexpression von Oxidoreduktase (RifL), Aminotransferase (RifK) und Phosphatase (RifM) aus <i>A. mediterranei</i> in <i>E. coli</i>	120
3.5.1.2 Aufreinigung und Funktionsanalyse der in <i>E. coli</i> coexprimierten Enzyme	122
3.5.2 Biosynthetische Untersuchungen nach Expression in <i>Streptomyces lividans</i>	125
3.5.2.1 Arbeiten zur heterologen Überexpression von Aminotransferase, Oxidoreduktase und Phosphatase (RifK-M) in <i>Streptomyces lividans</i>	125
3.5.2.2 Heterologe Expression von pHGF7604 in <i>Streptomyces lividans</i> TK24	128
3.5.2.3 Charakterisierung der exprimierten Proteine von pHGF7604 im zellfreien Rohextrakt aus <i>Streptomyces lividans</i> TK24.....	130
3.5.2.4 Heterologe Expression und anschließender Aktivitätstest der Deletionsmutanten von Oxidoreduktase (pHGF7607) und Phosphatase (pHGF7608) in <i>S. lividans</i> TK24	136
3.6 Untersuchungen an dem Moos <i>Claopodium crispifolium</i>, Thuidiaceae	137
3.6.1 Sammlung von <i>Claopodium crispifolium</i> in Oregon, USA.....	137
3.6.2 Isolierung und Analyse von assoziierten Aktinomyceten mit <i>C. crispifolium</i>	137
4 DISKUSSION	141
4.1 Höhere Pflanzen als Orte der Maytansinbiosynthese?.....	141
4.1.1 Untersuchungen zum biogenetischen Ursprung der Maytansine in Höheren Pflanzen.....	141
4.1.2 Ökologische Aspekte der Besiedlung von Höheren Pflanzen mit Mikroorganismen	145
4.2 <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98 – eine taxonomische Bestimmung	147
4.3 Die Familie der <i>Streptomycetaceae</i> als Sekundärstoffbildner	149
4.3.1 Physiologische und genetische Faktoren der Sekundärstoffproduktion	149
4.3.2 <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98 als möglicher Ansamycin-Produzent	153
4.4 Ein Gencluster aus <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98	155
4.4.1 Analyse der AHBA-Synthase aus <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98	155
4.4.2 Sequenzierung der Oxidoreduktase und Phosphatase	160
4.4.3 Weitere Gene der Maytansinbiosynthese – ein Vergleich der Gencluster	164
4.5 Biochemische Untersuchungen zur AHBA-Biosynthese	168
4.5.1 Die Anfangsschritte der AHBA-Biosynthese bis zur Bildung von 4-Amino-3,4-dideoxy-D-arabino-heptulose-7-phosphat (aDAHP).....	168
4.5.2 Zur Interaktion von Oxidoreduktase, Aminotransferase und Phosphatase	172
4.5.3 Heterologe Expression von pHGF7604 in <i>S. lividans</i> und Charakterisierung der exprimierten Proteine - eine enzymatische Betrachtung der ersten Reaktionsschritte der AHBA-Biosynthese.....	175
4.5.4 Abschließende Betrachtungen und Ausblick	180
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	183
6 LITERATURVERZEICHNIS	185
7 ANHANG	201

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro
6xHis	Hexahistidin
A	Adenin oder Ampere oder Alanin oder Absorption
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
Abb.	Abbildung
aDAHP	3,4-Didesoxy-4-amino-D- <i>arabino</i> -heptulusonsäure-7-phosphat
aDHQ	5-Desoxy-5-amino-3-dehydrochinasäure
aDHS	5-Desoxy-5-amino-3-dehydroshikimisäure
AHBA	3-Amino-5-hydroxybenzoesäure
Ala	Alanin
Amp ^r	Ampicillin-resistent
Ans	Präfix zur Bezeichnung der an der Ansatrieninbiosynthese beteiligten Enzyme
Apra ^r	Apramycin-resistent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
asm	Präfix zur Bezeichnung der Gene des Ansamitocin-Clusters
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin oder Cystein
cfu	Kolonie bildende Einheiten
Ci	Curie, 1 Ci = 3,7·10 ¹⁰ Bq (Bequerel)
Cm ^r	Chloramphenicol-resistent
cpm	registrierte radioaktive Zerfallsereignisse (counts per minute)
CSPD	3-(2'-Spiroadamantan)-4-methoxy-(3''-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetan
Da	Dalton
DAHP	3-Desoxy-D- <i>arabino</i> -heptulusonsäure-7-phosphat
dATP/ddATP	Desoxy-/Didesoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP/ddCTP	Desoxy-/Didesoxycytidintriphosphat
dGTP/ddGTP	Desoxy-/Didesoxyguanosintriphosphat
DHQ	3-Dehydrochinasäure
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dNTP/ddNTP	Desoxy-/Didesoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP/ddTTP	Desoxy-/Didesoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E4P	Erythrose-4-phosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
Fab	antigenbindendes Fragment

g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin oder Glycin
GC	Guanin/ Cytosin
ggf.	gegebenenfalls
Gly	Glycin
h	Stunde
H	Histidin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HMW	high molecular weight
His	Histidin
Kan ^r	Kanamycin-resistent
kb	Kilo-Basenpaar(e)
kD	Kilo-Dalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
konz.	konzentriert
KP _i	Kaliumphosphat-Puffer
λ	Bakteriophage Lambda oder Wellenlänge
l	Liter
lacI	lac-Repressor-Gen
lacPOZ'	β-Galactosidase-Gen (α-Fragment)
Leu	Leucin
LB	Luria-Bertani
LMW	low molecular weight
Lys	Lysin
m	Masse oder Meter oder milli-
m/V	Massenprozent
M	Methionin oder mol pro Liter
Mb	Mega-Basenpaar(e)
min	Minuten
mind.	mindestens
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
NAD/ NADH	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid, reduzierte Form
NADP	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NADPH	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, reduzierte Form
Nap	Präfix zur Bezeichnung der an der Naphthomycinbiosynthese beteiligten Enzyme
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat-Agarose
OD _x	Optische Dichte (Absorption) bei x nm
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
ori	Replikationsstart (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
Phe	Phenylalanin
PKS	Polyketidsynthase

PLP	Pyridoxalphosphat
PMP	Pyridoxaminphosphat
PMSF	Phenylmethylsulonylfluorid
PP _i	Pyrophosphat, anorganisch
RBS	ribosomale Bindungsstelle
rDNA	ribosomale DNA
rif	Präfix zur Bezeichnung der Gene des Rifamycin-Clusters
Rif	Präfix zur Bezeichnung der an der Rifamycinbiosynthese beteiligten Enzyme
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S	Serin oder Svedberg-Einheit
SAP	Alkalische Phosphatase aus Garnelen (Shrimp Alkaline Phosphatase)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
ssDNA	einzelsträngige DNA
ssp.	Subspezies
ΔT	Schmelztemperatur von Oligonukleotiden in °C
T	Thymidin oder Threonin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	N-Tris-[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tet ^r	Tetracyclin-resistent
Thio ^r	Thiostrepton-resistent
Thr	Threonin
u. a.	unter anderem
UDP	Uridin-5'-diphosphat
üN	über Nacht
V	Valin oder Volumen oder Volt
VT	Volumenteil
V/V	Volumenprozent

1 Einleitung

1.1 Struktur, Vorkommen und Wirkungen von Ansamycinen

Ansamycine sind makrozyklische Antibiotika mit einem aromatischen oder chinoiden Kern, der von einem aliphatischen Lactamring überbrückt wird. Daraus ergibt sich eine henkelartige Struktur, von der *Prelog und Oppolzer (1973)* die Namensgebung (lat. *ansa* für Henkel) ableiteten. Der aromatische oder chinoiden Kern wird durch eine so genannte mC_7N -Einheit (s. Abb. 1.1) charakterisiert, die entweder einem naphthalenoiden oder einem benzenoiden System angehört (*Rinehart et al., 1982a*). Differenzierungen der Ansamycine ergeben sich durch die unterschiedliche Länge und Substitution der aliphatischen Kette.

Rifamycin B, Naphthomycin C und Streptovaricin (s. Abb. 1.1) gehören zu den naphthalenoiden Ansamycinen mit einem antibakteriellen Wirkspektrum, insbesondere gegen

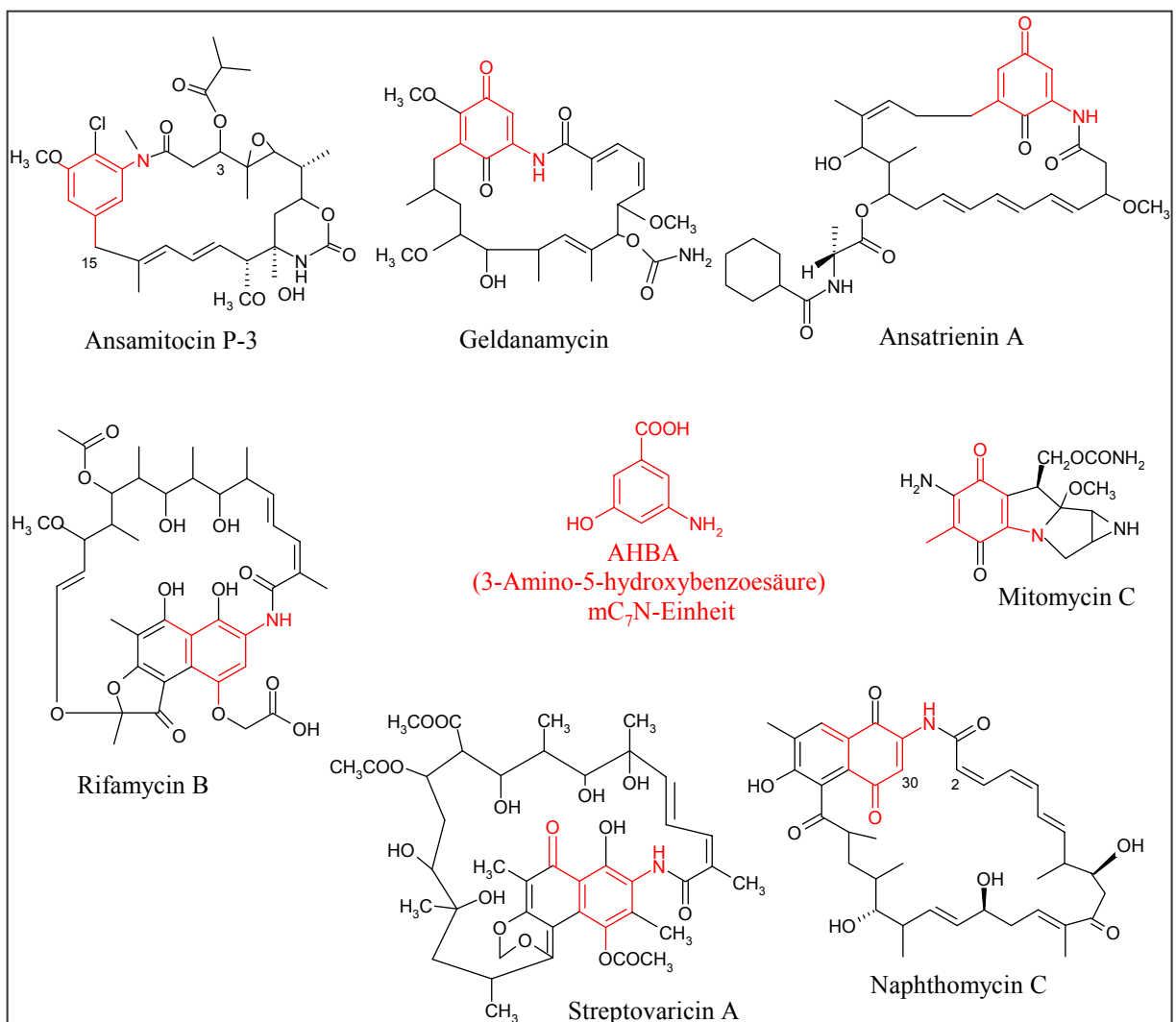


Abbildung 1.1 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure als Vorstufe der mC_7N -Einheit der Ansamycine und Mitomycine

gram-positive Bakterien. Rifamycine konnten 1959 erstmals durch *Sensi* aus *Amycolatopsis mediterranei* (früher *Nocardia*) als Substanzgemisch isoliert werden. Unter Kulturbedingungen, bei denen Barbiturat zugefügt wurde, konnte Rifamycin B als Einzelkomponente erhalten werden. Die natürlichen Rifamycine zeigen außerdem eine moderate Wirksamkeit gegen Mykobakterien. Partialsynthetische Modifikationen führten u. a. zu Rifampicin, das Eingang in die Tuberkulosetherapie gefunden hat.

Die benzenoiden Ansamycine wie Ansamitocin P-3, Geldanamycin und Ansatrienin A (s. Abb. 1.1) zeigen im Gegensatz zu den naphthalenoiden Verbindungen cytotoxische Aktivität gegen Eukaryoten.

Kupchan et al. (1972 a) isolierte mit Maytansin (Abb. 1.2) und seinen Derivaten erstmals die strukturell zu den Ansamycinen zugehörigen Maytansinoide aus *Maytenus serrata* (ehemals *M. ovatus*), einer äthiopischen Pflanze aus der Familie der *Celastraceae*. In weiteren Arten der *Celastraceen* wie z.B. *Maytenus buchananii* (*Kupchan et al., 1972 b, 1974, Larson et al., 1999*) und *Putterlickia verrucosa* (*Kupchan et al., 1977*) fanden sich höhere Maytansinoidkonzentrationen als in *Maytenus serrata* (*Kupchan et al., 1972 a*). Maytansinoide sind C₁₅N-Makrolaktame mit einer Hydroxycarbamat-Funktion und einem chlorierten Aromaten. Strukturvariationen zeichnen sich vor allem durch unterschiedliche Esterseitenketten an der 3-Hydroxylgruppe (s. Abb. 1.2) aus. Die Esterseitenkette an der 3-Hydroxylgruppe kann aber auch fehlen. Ebenso fehlt z. T. die N-Methylierung oder die Epoxid-Brücke. Colubrinol und Colubrinolacetat aus *Colubrina texensis* (Familie der *Rhamnaceae*) sind Beispiele für C-15-oxygenierte Verbindungen (*Wani et al., 1973*). Weitere C-15-oxygenierte Verbindungen finden sich in der Familie der *Euphorbiaceen*. Aus *Trewia nudiflora* (*Powell et al., 1982*) ließ sich neben dem trizyklischen Trewiasin auch das tetrazyklische Treflorin extrahieren.

Das Maytansinoid Trewiasin wurde außerdem aus den beiden Moosarten *Isothecium subdiversiforme* und *Thamnobryum sandei* isoliert (*Sakai et al., 1988*). Über das Vorkommen von Ansamitocin P3 (Maytansinisobutytrat, vgl. Abb. 1.2) in den Moosarten *Claopodium crispifolium* und *Anomodon attenuatus* wurde berichtet (*Suwanborirux et al., 1990*).

Maytansinoide Ansamitocine (s. Abb. 1.2) konnten auch aus einem Aktinomyceten, *Actinosynnema pretiosum* (früher *Nocardia*), gewonnen werden (*Higashide et al., 1977*). Ansamitocin P-0 und Ansamitocin P-1 sind identisch mit Maytansinoiden, die in Höheren Pflanzen gefunden wurden (s. Abb. 1.2). Eine Mutante von *Actinosynnema pretiosum* ssp.

auranticum (ATTC 31565) bildet als Hauptprodukte Ansamitocin P-3 und Ansamitocin P-4 (Tanida et al., 1981).

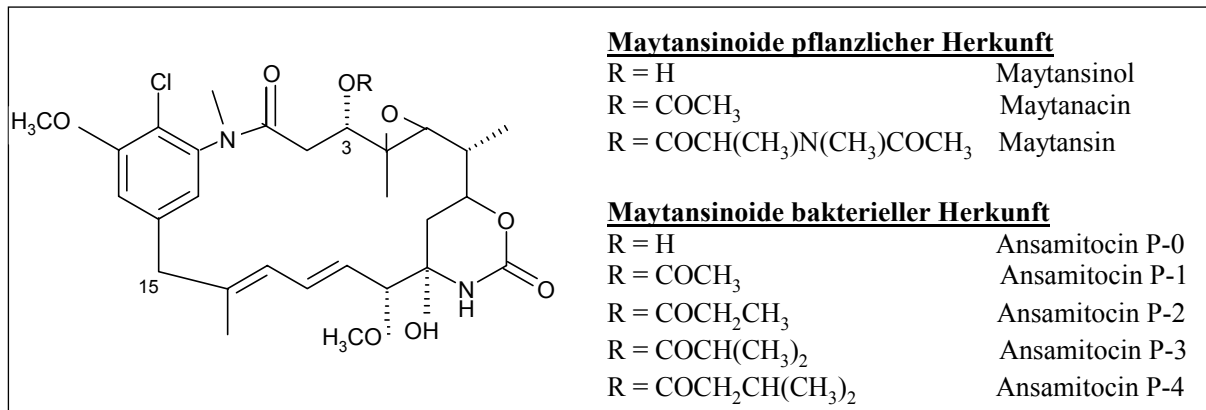


Abbildung 1.2 Maytansinoide pflanzlicher (aus *Putterlickia verrucosa*) und bakterieller (aus *Actinosynnema pretiosum*) Herkunft. Maytansinol und Ansamitocin P-0 sowie Maytanacin und Ansamitocin P-1 sind identische Verbindungen.

Das große Interesse und die intensive Suche nach Mikroorganismen und Höheren Pflanzen, aus denen Maytansinoide extrahiert werden können, gründet sich auf die starke antineoplastische, antileukämische und cytotoxische Aktivität der Verbindungen. Einen Überblick über die präklinischen Wirksamkeiten geben *Issell und Crooke (1978)*: Maytansin inhibiert verschiedenste murine Krebszelllinien (P388, L1210 und LY5178) sowie humane Karzinomzellen des Nasopharynx (KB Zellen) und humane Krebszelllinien der lymphatischen Leukämie *in vitro* in sehr niedrigen Dosen (10^{-3} bis 10^{-7} µg/ml). *In vivo* zeigen Ansamitocin P-3 (*Higashide et al., 1977*) und Maytansin (*Komoda und Kishi, 1980; Smith und Powell, 1984; Reider und Roland, 1984*) starke Antitumoraktivität gegen die lymphatische Leukämie P388 bei Mäusen. Gegenüber weiteren, auch soliden Tumorarten, wie B16-Melanom und Lewis-Lungenkarzinom haben Maytansinoide *in vivo* eine gute antineoplastische Aktivität. Daher wurde die therapeutische Verwendbarkeit in klinischen Studien der Phase I und Phase II bei verschiedensten soliden Tumoren oder auch bei akuter lymphatischer Leukämie getestet (*Komoda und Kishi, 1980*). Neben gastrointestinalen Nebenwirkungen wie starker Übelkeit mit Erbrechen und Diarrhö waren Neurotoxizität und selten auch Myelosuppressionen zu beobachten. Zudem wurde eine Fortführung der klinischen Studien wegen des insignifikanten Ansprechens von Patienten auf die Therapie nicht befürwortet (*Ravry et al, 1985; Thigpen et al., 1983*). Trotzdem wurde neben ausgedehnten Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen (u. a. *Kupchan et al., 1977*) versucht, die toxischen Nebenwirkungen der Maytansinoide über ein gezieltes Ansteuern des Wirkortes („Drug-Targeting“) zu reduzieren. *Ladino et al. (1997)* entwickelten Folat-Maytansinoide, die an Folat-Rezeptoren auf der Oberfläche von Krebszellen binden. Diesem Plan liegt die Erkenntnis zugrunde, dass sich Tumorzellen von

gesunden Zellen durch eine Überexpression von Folat-Rezeptoren unterscheiden. Eine weitere Möglichkeit des „Targeting“ bietet die Bildung von Immunokonjugaten. Schwierigkeiten, wie die moderate Cytotoxizität der bisher hierfür verwendeten Zytostatika oder die wenig effiziente Freisetzung der aktiven Substanz in der Zelle, sollen durch den Einsatz stark potenter Substanzen mit 100 bis 1000fach höherer Cytotoxizität wie die der Maytansine überwunden werden. Maytansinoide werden hierbei an Antikörper über Disulfidbrücken kovalent gebunden (*Chari et al., 1992*). Die eingesetzten Antikörper richten sich gegen bestimmte Glykoproteine, die auf der Oberfläche humaner Colonkarzinome vermehrt gebildet werden. Mit Hilfe der Maytansinoid-Immunokonjugate konnte in Mäusen eine vollständige Tumorremission erreicht werden (*Liu, et al., 1996*). Konjugate von Maytansinoiden mit Antikörpern, die weitere Tumorarten gezielt ansteuern, wurden synthetisiert (*Smith, 2001*). In einer weitergehenden Entwicklung könnten Konjugate mit humanisierten Antikörpern in klinischen Untersuchungen eingesetzt werden.

Der Wirkmechanismus der Maytansinoide beruht auf der Hemmung der Mitose. *Remillard et al. (1975)* zeigten dies für Maytansin anhand von Seeigeleiern, deren Zellteilung in der Metaphase gehemmt wurde. Maytansinoide binden an die Vinblastin-Bindungsstelle der β -Untereinheit der monomeren Tubuline (*Rai und Wolff, 1996*). Durch die Bindung von Maytansin an die monomeren Tubuline wird der Aufbau des Spindelapparates unterbunden. Es kommt zu einer Störung der Metaphase.

Wolpert-DeFillippes fand 1975 für Ansamitocin zusätzlich eine Hemmung der DNA-Neusynthese.

1.2 Biosynthese der Maytansinoide

1.2.1 Biosynthese der mC₇N-Einheit

Fütterungsexperimente haben gezeigt, dass 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) der spezifische Präkursor der mC₇N-Einheit in Ansamitocin P3 ist (*Hatano et al., 1982*). Aminohydroxybenzoesäure wurde auch in die Ansamycine Actamycin (*Kibby et al., 1980*), Mitomycin (*Anderson et al., 1980*), Geldanamycin (*Potgieter, 1983*) sowie Streptovaricin (*Staley und Rinehart, 1991*) eingebaut. Für Rifamycin erfolgte der Nachweis auf genetischer Ebene durch Supplementierung einer Mutante des Rifamycin-Produzenten *Amycolatopsis mediterranei* (*Ghisalba und Nüesch, 1981*).

Obwohl der aromatische Charakter der mC₇N-Einheit eine Beteiligung des Shikimatwegs als Aromatenbiosyntheseweg vermuten ließ, wurde markierte Shikimisäure, Chinasäure und

Dehydrochinasäure nicht in die mC₇N-Einheit eingebaut. Der Einbau weiterer markierter Vorstufen erfolgte aber in Shikimatweg analoger Weise (Karlson *et al.*, 1974; White und Martinelli, 1974; Haber *et al.*, 1977). Wie Casati *et al.* (1987) durch Einbauversuche an *Streptomyces collinus* zeigen konnten, beruhte diese Beobachtung nicht auf Permeabilitätshindernissen der Zellmembran, denn Shikimisäure wurde spezifisch zu einem weiteren Strukturelement des Ansatrienins (Abb. 1.1), einem Cyclohexancarbonsäure-Rest, umgesetzt. Offen blieb vor allem auch die Frage, wie der Stickstoff in die Ansaantibiotika über Aminohydroxybenzoessäure als Intermediate eingeführt wird.

Hornemann *et al.* (1980) formulierten eine mögliche Biosynthese, in der AHBA über 3,4-Didesoxy-4-amino-D-arabino-heptulosonsäure-7-phosphat (aDAHP) gebildet werden soll (s. Abb. 1.3).

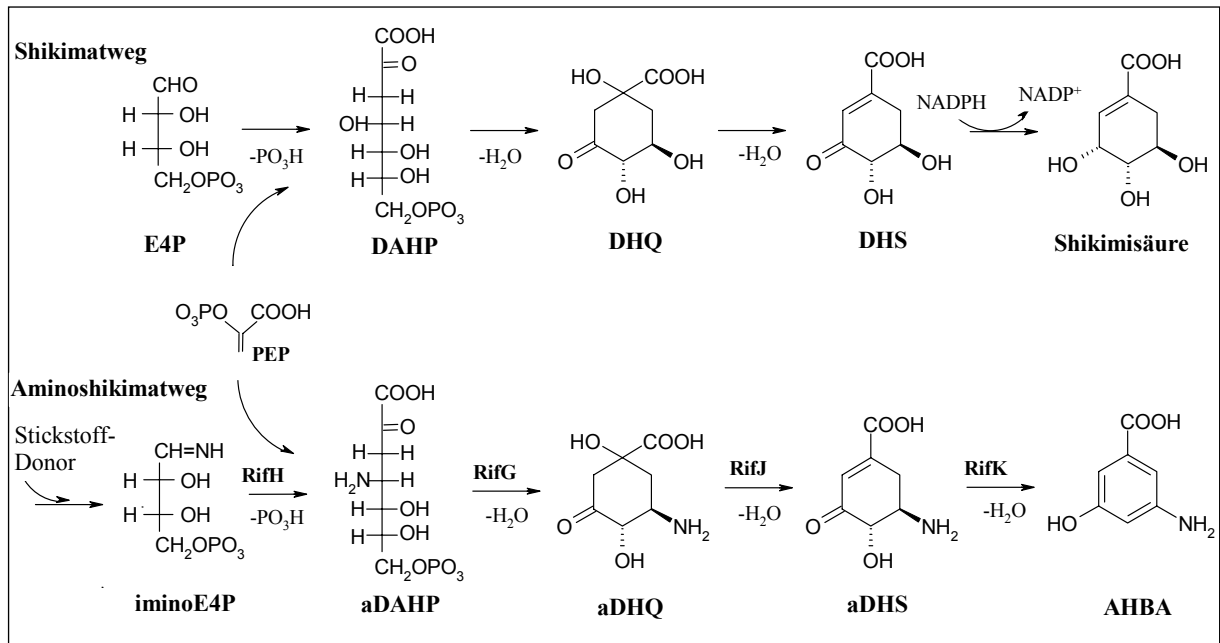


Abbildung 1.3 Vergleich des Shikimatwegs mit dem Aminoshikimatweg nach Hornemann *et al.* (1980) und Kim *et al.* (1992). E4P: Erythrose-4-phosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; DAHP: 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonsäure-7-phosphat; DHQ: 3-Dehydrochinasäure; DHS: 3-Dehydroshikimisäure; AHBA: 3-Amino-5-hydroxybenzoessäure; RifH: aDAHP-Synthase; RifG: aDHQ-Synthase; RifJ: aDHQ-Dehydratase; RifK: AHBA-Synthase.

In die mC₇N-Einheit von Rifamycin wurde nach Untersuchungen von Jiao *et al.* (1984) der Amidstickstoff aus Glutamin eingebaut. In Analogie zu Enzymen wie der Anthranilatsynthase oder der p-Aminobenzoatsynthase wurde daher für den Aminoshikimatweg zunächst eine Variante der DAHP-Synthase postuliert. Als bifunktionelle Glutamin-Amidohydrolase/DAHP-Synthase sollte das Enzym die Amidbindung von Glutamin spalten. Im aktiven Zentrum des Enzyms sollte der bei der Reaktion gebildete Ammoniak mit der Aldehydfunktion von Erythrose-4-phosphat eine Schiff'sche Base ausbilden. Es wurde angenommen, dass die

modifizierte DAHP-Synthase das entstandene Imin von Erythrose-4-phosphat mit Phosphoenolpyruvat (PEP) kondensiert (*Casati et al., 1987; Floss und Beale, 1989*).

Bei diesem Vorschlag blieb aber ungeklärt, warum für die Übertragung der Aminogruppe auf Erythrose-4-phosphat eine Amidohydrolase katalytisch wirken sollte, obwohl eine Transaminase erforderlich gewesen wäre. Auch die Arbeit von *Kim et al. (1992; 1996)* ließen Zweifel an dem Stickstoffeinführungsmodus zu: Die Autoren wiesen auf der Basis von Inkubationsversuchen in zellfreien Extrakten von *A. mediterranei* S699 nach, dass Dehydratisierungsschritte über 5-Desoxy-5-amino-3-dehydrochinasäure (aDHQ) und 5-Desoxy-5-amino-3-dehydroshikimisäure (aDHS) zu 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (s. Abb. 1.3) führen. Die Einbauraten der Vorstufen in Aminohydroxybenzoesäure lagen bei 45 % für aDAHP, 41 % für aDHQ und 95 % für aDHS. Dagegen ergab die Inkubation mit Erythrose-4-phosphat und PEP nur sehr geringe Ausbeuten (6 %) an AHBA. Der Zusatz von Glutamin zur Inkubation mit Erythrose-4-phosphat und PEP hatte überraschenderweise keine Auswirkung auf die Umsetzung zu AHBA (*Kim et al., 1996*).

Mit der AHBA-Synthase aus *A. mediterranei* wurde ein Enzym gereinigt und charakterisiert, das die Enolisierung und Dehydratisierung von aDHS zu AHBA katalysiert (*Kim et al., 1998*). Eine solche enzymatische Umsetzung ist im Shikimatweg nicht bekannt. Das für das Enzym kodierende Gen wurde mit Hilfe „Reverser Genetik“ kloniert und in *E. coli* überexprimiert (*Kim et al., 1998*). Studien zum Reaktionsmechanismus der Dehydrierung und Enolisierung von aDHS zu AHBA konnten durch kristallographische Analysen des rekombinanten Enzyms bestätigt werden (*Eads et al., 1999*). Interessanterweise führte die Mutation des AHBA-Synthasegens nicht zur Akkumulation von aDHS oder von Protocatechusäure, die chemisch durch Umwandlung aus aDHS entsteht (*Kim et al., 1998*). Dies ist u. a. ein Hinweis darauf, dass die AHBA-Biosynthese kompliziert ist und nicht unbedingt den Schritten der Shikimisäurebiosynthese folgt.

Eine Sonde des AHBA-Synthasegens verhalf zur Klonierung und Sequenzierung des Genclusters der Rifamycinbiosynthese aus *Amycolatopsis mediterranei* (*August et al., 1998*). In diesem Cluster konnten acht Gene detektiert werden, die für Enzyme der AHBA-Bildung kodieren. Die meisten dieser Gene liegen in einem einzigen Operon. Die heterologe Expression der acht Gene in *Streptomyces coelicolor* war für die AHBA-Produktion ausreichend (*Yu et al., 2001*). Zusätzliche Inaktivierungsexperimente der einzelnen Gene zeigten, dass neben dem Gen für die AHBA-Synthase Gene für eine Oxidoreduktase (*rifL*),

eine Phosphatase (rifM) und eine Kinase (rifN) für die AHBA-Bildung essentiell sind. Diese vier Gene besitzen keine entsprechenden Proteine im Shikimatweg.

Bei den Expressionsanalysen und Mutationsversuchen (Yu et al., 2001) blieb ungeklärt, bei welcher enzymatischen Umsetzung Stickstoff in den Aminoshikimatweg eingefügt wird. Die AHBA-Synthase aus *A. mediterranei* besitzt eine hohe Sequenzhomologie zu Aminotransferasen der Desoxyzucker-Biosynthese (Kim et al., 1998). Für die AHBA-Synthase wurde daher eine zweite Funktion als Transaminase postuliert (Yu et al., 2001).

Inkubationsversuche mit zellfreien Extrakten von *A. mediterranei* ergaben weitere Hinweise, wie der Biosyntheseweg für die Anfangsschritte der AHBA-Bildung ablaufen könnte (Guo und Frost, 2000 a/ b). Wurde Kanosamin-6-phosphat (s. Abb. 1.4) in Gegenwart von Ribose-5-phosphat und PEP mit einem zellfreien Extrakt von *A. mediterranei* inkubiert, wurden aDAHP, DAHP und zu geringen Anteilen AHBA sowie Tyrosin und Phenylalanin gebildet. Diese Arbeit wurde angeregt durch Umezawa et al. (1968), die zeigten dass Inkubationen von UDP-[U-¹⁴C]-Glucose in zellfreiem Lysat von *Bacillus pumilus* mit NAD und Glutamin zur Bildung von [U-¹⁴C]-Kanosamin führte. Auch in einem zellfreien Extrakt von *A. mediterranei* konnte die Bildung von markiertem Kanosamin nachgewiesen werden, wenn mit deuterierter UDP-Glucose, NAD und Glutamin inkubiert wurde (Guo und Frost, 2002 b). Die AHBA-Biosynthese startet demnach vermutlich mit der Umsetzung von UDP-Glucose. Der neu postulierte Biosyntheseweg ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

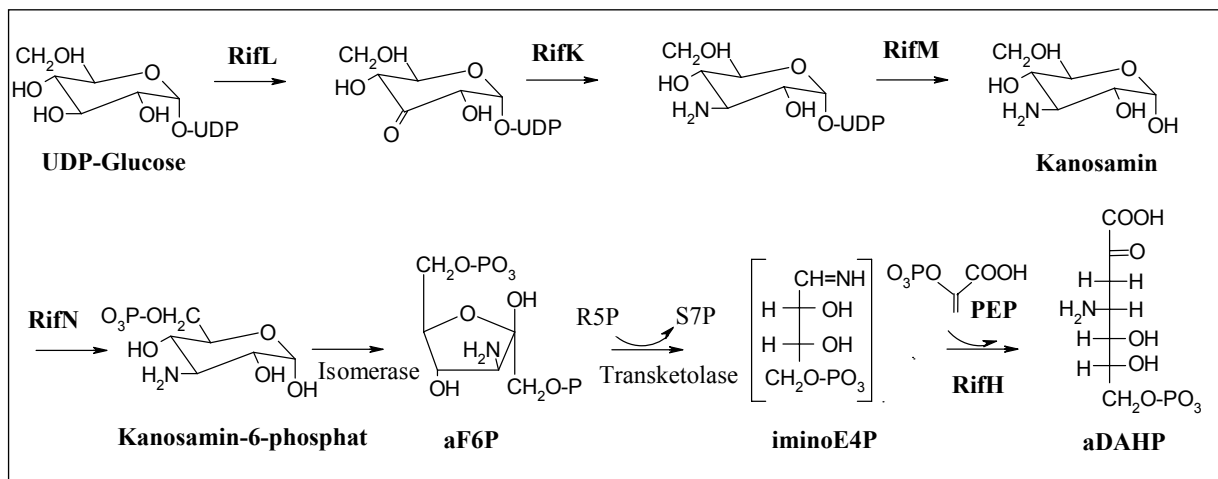


Abbildung 1.4 Neu postulierte Biosynthese für die Bildung von aDAHP (Arakawa et al., 2002). aF6P: 3-Amino-3-deoxyfructose-6-phosphat; iminoE4P: 1-Imino-1-deoxy-D-erythrose-4-phosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; Gene des Rifamycin-Clusters mit RifL: Oxidoreduktase; RifK: AHBA-Synthase; RifM: Phosphatase; RifN: Kinase; RifH: aDAHP-Synthase

Die für die AHBA-Bildung essentiellen Enzyme AHBA-Synthase, Oxidoreduktase, Phosphatase und Kinase wären direkt an den ersten Schritten der Biosynthese beteiligt. Es

wird davon ausgegangen, dass UDP-Glucose mit Hilfe der Oxidoreduktase zur entsprechenden 3-Keto-Verbindung oxidiert wird. Die AHBA-Synthase würde die Transaminierung der Ketofunktion katalysieren, bei der UDP-Kanosamin gebildet wird. Uridindiphosphat würde dann mit Hilfe der Phosphatase abgespalten. An der 6-Position würde im nächsten Schritt eine Phosphorylierung zu Kanosamin-6-phosphat erfolgen. Die rekombinante Kinase RifN aus *A. mediterranei* konnte bereits als ATP-abhängige Kanosamin-Kinase charakterisiert werden (Arakawa et al., 2002).

1.2.2 Biosynthese der Ansastruktur

In die Ansastruktur der Ansamitocine konnten drei Acetat-, drei Propionateinheiten sowie eine hydroxylierte C₂-Einheit eingebaut werden (Hatano, et al., 1985). Die vollständige Sequenzierung des Ansamitocin-Biosyntheseclusters von *Actinosynnema pretiosum* ssp. *auranticum* ATCC 31565 zusammen mit Geninaktivierungsversuchen sowie heterologen Überexpressionen einiger Proteine ergab ein erweitertes Bild zum Ablauf der Biosynthese (Yu et al., 2002). Die Polyketidbildung wird durch vier Typ-I-Polyketidsynthasen (AsmA-D) mit 7 kettenverlängernden Modulen katalysiert. Ghisalba und Nüesch (1981) postulierten, dass nach einer Aktivierung von AHBA zum AHBA-CoA-Ester dieses Molekül als Starter dient. Katalysiert wird diese Reaktion vermutlich durch ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) und eine Adenyltransferase, für die die Polyketidsynthase AsmA u. a. kodiert. Direkt im Anschluss an das letzte Modul der Polyketidsynthase AsmD findet sich ein Gen (asm9) mit Homologie zur Amidsynthase des Rifamycin-Clusters (August et al., 1998). Dieses Enzym steht somit an Stelle der sonst in Typ-I-Polyketidsynthasen (PKS) üblichen Thioesterase (Cane et al., 1998). Die Thioesterase beendet die Kettenverlängerung des Polyketids und löst das Molekül von der PKS ab. Eine entsprechende Funktion sowie die Lactamisierung und Zyklisierung zu Proansamitocin wird auch für die Amidsynthase des Ansamitocin-Produzenten postuliert (Yu et al., 2002).

In das Polyketidgerüst von Ansamitocin wird neben Acetat- und Propionateinheiten auch eine ungewöhnliche hydroxylierte C₂-Einheit eingebaut (s. Abb. 1.5). Fütterungsversuchen zufolge wird ein Substrat, das an ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebunden ist, eingeführt. Als Substrat dient vermutlich 2-Methoxymalonyl-ACP (Carroll et al., 2002). Wurde ein Subcluster von fünf Genen (asm13-17) aus *A. pretiosum* zusammen mit einer modifizierten PKS des Erythromycinclusters coexprimiert, resultierte dies in einem Einbau von 2-Methoxymalonyl-ACP in ein Polyketid (Kato et al., 2002). Das Subcluster der Gene asm13-17 kodiert damit für den Einbau der ungewöhnlichen hydroxylierten C₂-Einheit.

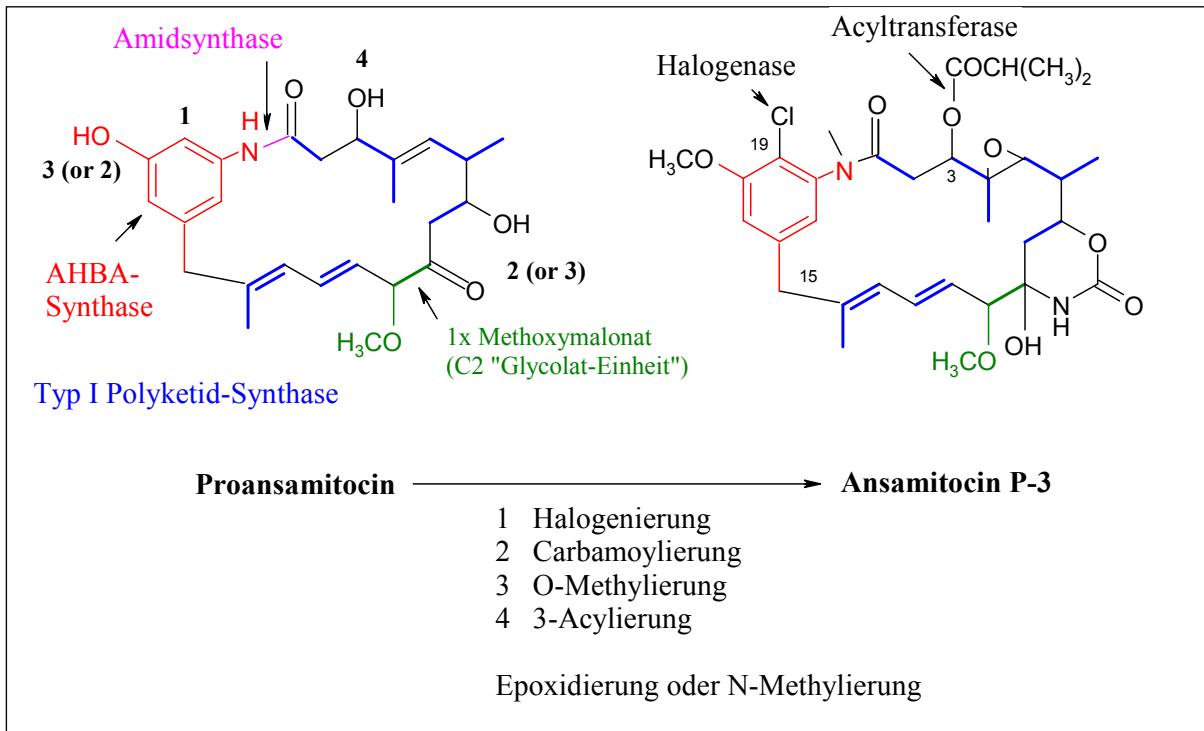


Abbildung 1.5 Postsynthetische Modifikationen von Proansamitocin zu Ansamitocin P3

Nach dem Aufbau des Polyketidgerüsts zu Proansamitocin (s. Abb. 1.5) erfolgen weitere Modifikationen zu Ansamitocin P3 (Yu *et al.*, 2002). Eine Halogenase chloriert den aromatischen Kern in Position 19. Eine Carbinolamid-Einheit aus Citrullin (Hatano *et al.*, 1985) wird dann durch eine Carbamoyltransferase eingeführt. An die O-Methylierung mit Hilfe einer O-Methyltransferase schließt sich die Acylierung der 3-Hydroxylgruppe an. Eine Acyltransferase kondensiert kurze aktivierte CoA-Ester wie z.B. Propionyl-CoA oder Isobutyryl-CoA an die 3-Hydroxylgruppe. Anders als erwartet ist die Acylierung nicht der letzte Schritt der Biosynthese, sondern findet vor der N-Methylierung und Epoxidierung statt. Die Acyltransferase nutzt N-Desmethyl-4,5-desepoxymaytansinol und nicht Maytansinol als Substrat (Moss *et al.*, 2002). Damit ist das auch in Pflanzen vorkommende Maytansinol keine Zwischenstufe zu Ansamitocin, sondern ein „Shuntprodukt“, das vielleicht durch Hydrolyse der acylierten Ansamitocine entstanden sein könnte.

1.3 Besonderheiten der Biosynthese von Maytansinoiden

Das Vorkommen strukturverwandter Verbindungen wie die der Maytansinoide in so verschiedenen Taxa wie Höheren Pflanzen, Moosen und Bakterien stellt eine Besonderheit dar. Mögliche Erklärungen sind neben konvergenten Biosynthesen das Vorliegen eines Horizontalen Gentransfers oder die Besiedlung einer Höheren Pflanze mit Mikroorganismen, die als Endo- oder Epiphyten die Sekundärstoffe bilden und an den Wirtsorganismus abgeben.

Für Maytansinoide ist es aufgrund der komplexen Strukturen unwahrscheinlich, dass die Biosynthese mehrfach „erfunden“ wurde (*Mothes, 1981*).

Bei einem Horizontalen Gentransfer werden, im Gegensatz zum Vertikalen Transfer, Gene zwischen zwei verwandtschaftlich weit auseinander liegenden Organismen übertragen. Einen Überblick zu möglichen Mechanismen geben *Bushmann (2001)* sowie *Amábile-Cuevas und Chicurel (1993)*. Letztere betonen die Notwendigkeit der unmittelbaren räumlichen Nähe zwischen den Spezies für ein solches Transferereignis. Ein Transferereignis ist ein wichtiger Faktor in der Evolution von Sekundärstoffen (*Vining, 1992*). Um einen Horizontalen Gentransfer zu erkennen, der im Laufe der Evolution stattgefunden hat, werden häufig die DNA-Sequenzen der betreffenden Gene miteinander verglichen. Die Nukleotidsequenz eines Gens, das bei einem Horizontalen Gentransfer übertragen wurde, unterscheidet sich unter Umständen im GC-Gehalt von den weiteren Genen des Organismus. Benachbarte Regionen des in einem Transferereignis übertragenen Gens können ggf. Sequenzen enthalten, welche eine Integration ins Genom ermöglichen (z.B. Bindestellen für Phagenintegrasen). Das Gen, das bei einem Horizontalen Gentransfer übertragen wurde, zeigt nur ein begrenztes phylogenetisches Auftreten (*Ochman et al., 2000*).

Bisher sind verschiedene Beispiele für einen Horizontalen Gentransfer bekannt. Neben einem Gentransfer zwischen zwei Bakterienspezies konnte ein Gentransfer von Pro- auf Eukaryoten (Bakterien auf Pilze; Bakterien auf Pflanzen) detektiert werden. Im Folgenden ist jeweils ein Beispiel aus der Literatur aufgeführt:

- Zwischen Streptomyceten im Boden ist häufig ein Gentransfer zu beobachten, bei dem z. T. die gesamten Gene, die für die Biosynthese eines Antibiotikums kodieren, übertragen werden (*Wellington et al., 1992 a; Egan et al., 2001*).
- Ein Gentransfer von Pro- auf Eukaryonten (Bakterien auf Pilze) wurde für ein Gen der β -Lactamantibiotikabiosynthese (Isopenicillin-N-Synthasegen) nachgewiesen (*Buades und Moya, 1996*). Ein Transferereignis von einem Bakterium auf eine Pflanze wird für eine Synthetase (CKS), die an der Bildung von Lipopolysacchariden beteiligt ist, angenommen (*Royo et al., 2000*).
- Der Gentransfer von Eukaryonten (Pflanzen) auf Bakterien ist Gegenstand experimenteller Untersuchungen, die insbesondere bei der Risikoabschätzung von transgenen Pflanzen eine Rolle spielen (*Nielsen et al., 1997; 1998*). Ein Gentransfer konnte hier bislang nicht bestätigt werden.

Ein Beispiel für das Vorkommen komplexer Verbindungen in Pflanzen und Mikroorganismen ist auch Taxol. Wani *et al.* gelang 1971 die Isolierung dieser Verbindung aus *Taxus brevifolia*. Mit spezifischen Antikörpern wurde intensiv nach Taxol produzierenden Endophyten verschiedener Eibenarten gesucht: Die endophytische Pilze, *Taxomyces andreanae* (Stierle *et al.*, 1993; Stierle *et al.*, 1995), *Pestalopsis microspora* (Strobel *et al.*, 1996), *Pestalotia heterocornis* (Noh *et al.*, 1999) und *Tubercularia sp.* (Wang *et al.*, 2000) produzieren in sehr geringer Menge Taxol. Caruso *et al.* (2000) isolierten neben endophytischen Pilzen auch Aktinomyceten, wobei 10 % der Pilze und 14 % der Aktinomyceten Taxolbildner sind.

Das Vorkommen von Taxol in sterilen Zellkulturen sowie biosynthetische Untersuchungen an *Taxus brevifolia* (Hezari *et al.*, 1997; Walker und Croteau, 2001) bestätigen, dass Taxol nicht allein von besiedelnden Mikroorganismen synthetisiert wird. Viel spricht hier dafür, dass die Taxolbiosynthese in *Taxus*-Pflanzen und Mikroorganismen abläuft. Solange die Gene der Taxolbiosynthese in Mikroorganismen aber nicht bekannt sind, kann ein Horizontaler Gentransfer auch nicht postuliert werden.

Anders scheint dies bei Ergot-Alkaloiden zu sein. Diese Indolalkaloide finden sich u. a. in den Pilzen der Gattung *Claviceps*, aber auch in Pflanzen der *Convolvulaceen-Familie* (Floss und Anderson, 1980). Fungizid-Versuche mit Folicur[®] und ProntoPlus[®] in der Arbeitsgruppe resultierten in der Eliminierung von Ergot-Alkaloiden bei behandelten *Ipomoea asarifolia* (*Convolvulaceae*). Eng mit Drüsenschuppen assoziierte Hyphen waren nach Fungizid-Behandlung nicht mehr nachweisbar (S. Kucht, persönliche Mitteilung) Die Ergebnisse lassen eine alleinige Beteiligung eines endophytischen Pilzes an der Ergotbiosynthese vermuten.

Eine Besiedlung von Maytansin führenden Pflanzen mit Mikroorganismen, die als Epi- oder Endophyten Maytansin bilden, erscheint möglich. Endophyten verursachen per Definition keine sichtbaren Erkrankungen ihres Wirtes (Petrini, 1991). Die Interaktion beider Organismen beruht vermutlich auf einem konstanten gegenseitigen Antagonismus, der im Gegensatz zu Pathogenen balanciert ist (Schulz *et al.*, 1999). Eine indifferente Beziehung zwischen beiden Organismen ist auch denkbar. Sie wird als Kommensalismus bezeichnet. Die wachsende Bedeutung von Endophyten charakterisieren Tan *et al.* (2000) und Sturz *et al.* (2000) im Überblick. Biotechnologische Anwendung finden auch so genannte Biokontrollagentien, die aus natürlich vorkommenden Wurzelbakterien bestehen, die antagonistische und Pflanzenwachstums fördernde Eigenschaften besitzen (Berg *et al.*, 2001 a/ b).

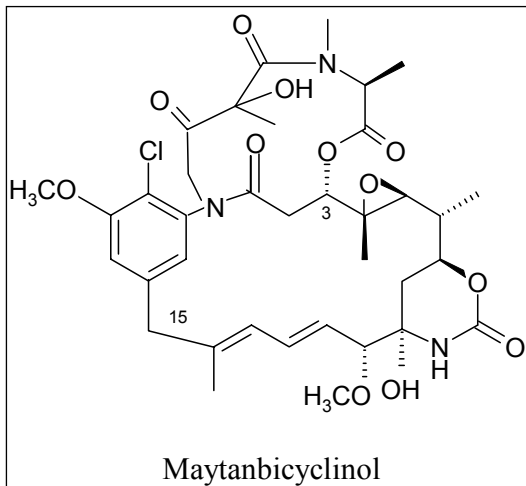


Abbildung 1.6 Tetrazyklisches Maytansin

Betrachtet man Maytansinoide aus Höheren Pflanzen, fällt die Variabilität der Acylseitenketten am C₃-Atom ins Auge. Einige Ester sind einzig in bestimmten Pflanzenfamilien zu finden. Beispiele sind die tetrazyklischen Ansamycine Treflorin aus *Trewia nudiflora* (*Euphorbiaceae*; Powell et al., 1982) und Maytanbicyclinol aus *Maytenus buchananii* (*Celastraceae*; Larson et al., 1999) (s. Abb. 1.6).

Die Acylseitenkette ist hier mit dem Stickstoff der mC₇N-Einheit verknüpft und bildet so eine weitere Ringstruktur aus. In Aktinomyceten wurden diese Verbindungen bisher nicht beschrieben. Es ist denkbar, dass ein besiedelnder Mikroorganismus für die Biosynthese eines Grundgerüsts zuständig ist und die Pflanze weitere Modifikationen wie die Acylierung an C₃ durchführt.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Der biogenetische Ursprung von Maytansinoiden in Höheren Pflanzen ist Gegenstand der Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Dazu sollten im Rahmen dieser Arbeit Zellkulturen von *Putterlickia verrucosa* mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Southern Hybridisierung auf Gene der Maytansinoidbiosynthese hin untersucht werden. Informationen zum GC-Gehalt, Codongebrauch und zur Genomstruktur (Vorkommen von Exons und Introns) bei *Putterlickia verrucosa* lagen bereits vor (Hoffmann, 1997). Dort war bereits ohne Erfolg nach einem AHBA-Synthasegen mit *Putterlickia*-spezifischen Oligonukleotiden gesucht worden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollten in dieser Arbeit neue degenerierte Oligonukleotide entwickelt werden, die von hochkonservierten Abschnitten der bakteriellen AHBA-Synthasegene unter Berücksichtigung des pflanzlichen Codongebrauchs abgeleitet werden.

Das erratische Vorkommen der Maytansinoide in Höheren Pflanzen (Pullen et al., 2003) führte zur Betrachtung der mikrobiellen Besiedlung Maytansin führender Pflanzen (Pullen, 2000; Meurer, 2002). Bei einem bakteriellen Isolat (F18-98) aus der Rhizosphäre von *Putterlickia verrucosa* war ein PCR-Fragment mit Homologien zu AHBA-Synthasegenen nachweisbar (Pullen, 2000). Ein Ziel meiner Arbeit war, durch Bestimmung der 16S –DNA-

Sequenz sowie der 16S-23S DNA-Spacerregion eine phylogenetische Einordnung des Stammes zu ermöglichen.

Chemisch-analytische Arbeiten sowie die Verwendung eines biologischen Testsystems sollten das Sekundärstoffspektrum des Bakterienstammes (F18-98) im Hinblick auf eine mögliche Maytansinoidproduktion erfassen. Ein möglicher Einbau einer radioaktiven Vorstufe (^{14}C -markierte AHBA) sollte untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der vollständigen Sequenzierung des vermuteten AHBA-Synthasegens des Bakterienisolates F18-98. Dazu sollte zunächst eine Cosmid-Bank des Stammes angelegt werden. Mit den Hybridisierungstechniken nach Southern sollte ein Cosmid-Klon detektiert werden, der das vollständige AHBA-Synthasegen enthält. Die Überexpression des AHBA-Synthasegens in *E. coli* und nachfolgender Aktivitätstest kann zeigen, inwieweit das entsprechende Genprodukt funktionsfähig ist.

Der Stamm sollte auf eventuell vorhandene weitere Gene der Maytansinbiosynthese untersucht werden. Hybridisierungen nach Southern konnten mit genomischer DNA des Bakterienstammes durchgeführt werden. Die Cosmid-Bank ermöglicht zudem das „Screening“ eines möglichen Genclusters, dessen Bestandteil das AHBA-Synthasegen ist. Durch weitere Identifizierung und Analyse des möglichen Genclusters könnten Informationen über das Potential des Stammes als Naturstoffbildner erhalten werden.

Ausgehend von der biosynthetischen Fragestellung, wie die ersten Schritte der AHBA-Bildung ablaufen, sollte versucht werden, den postulierten Biosyntheseweg mit Hilfe der Expression der Gene für eine Oxidoreduktase (*rifL*), Aminotransferase (*rifK*, analog AHBA-Synthase) und einer Phosphatase (*rifM*) und anschließendem Funktionstest nachzuweisen. Zur besseren Vergleichbarkeit mit vorherigen Biosyntheseuntersuchungen erschien hier die Verwendung der Gene des Rifamycin-Produzenten *Amycolatopsis mediterranei* vorteilhaft. Informationen zur Biosynthese der AHBA-Startereinheit sowie zum Schlüsselenzym AHBA-Synthase dienen dem allgemeinen Verständnis und können dazu beitragen, den biogenetischen Ursprung maytansinoider Naturstoffe in Pflanzen zu entschlüsseln.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Nährmedien, Puffer, Lösungen

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (= Sigma-Aldrich, 30926 Seelze), Merck-Eurolab (Darmstadt), Carl Roth GmbH (76185 Karlsruhe), Serva (69115 Heidelberg) und Sigma-Aldrich (82024 Taufkirchen) bezogen. In Tabelle 2.1 sind Chemikalien und Medienbestandteile zusammengestellt, die bei den vorliegenden Arbeiten verwendet wurden.

Tabelle 2.1 Bezugsquellen wichtiger Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid (Roti-Phorese)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
ADP-Glucose	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Alconox [®]	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Ansamitocin P-3	Prof. Floss, Seattle, WA 98195, USA
Apramycinsulfat	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
APS, Ammoniumperoxodisulfat	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
ATP (Adenosin-5'-triphosphat)	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
Blockierungsreagenz	Roche-Diagnostics, 68305 Mannheim
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Coomassie-Brilliant blue G250 [®]	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
CSPD-Star [®]	Roche-Diagnostics, 68305 Mannheim
Desoxynukleosidtriphosphate	Qbiogene, 68123 Heidelberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Entwickler-Konzentrat	Agfa-Gevaert, 51373 Leverkusen
Ethidiumbromid-Lösung, 1%	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
Fixierer-Konzentrat	Agfa-Gevaert, 51373 Leverkusen
GDP-Glucose	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Glutamin	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Glutaminsäure	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Glycin	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Hefe Extrakt (= Select [®] Yeast Extract)	Life Technologies (Gibco BRL), 76131 Karlsruhe
HPLC-Wasser (Lichrosolv [®])	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
Imidazol	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Kanamycin A, Monosulfat	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Kanosamin	Prof. Floss, Seattle, WA 98195, USA
Maytansin	Prof. Floss, Seattle, WA 98195, USA
Maytansinol	Prof. Floss, Seattle, WA 98105, USA
NAD (β -Nicotinamid-adenin-dinukleotid)	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
PEG (Polyethylenglycol) 1000	NBS Biologicals, Huntingdon, UK
PEG (Polyethylenglycol) 4000	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen

Substanz (Fortsetzung)	Bezugsquelle
Penicillin G (Benzylpenicillin), Kaliumsalz	Serva, 69115 Heidelberg
Phenol (Roti-Phenol®), pH 8	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
PLP (Pyridoxal-5'-phosphat)	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Rubidiumchlorid	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
Sorbit	Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe
TDP-Glucose	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
TES (N-[Tris-(hydroxymethyl) methyl]-2-aminoethansulfonsäure)	Fluka = Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Tetracyclinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Thiostrepton	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
Tris-Base (Tris-[hydroxymethyl] aminomethan)	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
Trypton (= Select® Pepton 140)	Life Technologies (Gibco BRL), 76131 Karlsruhe
TWEEN®20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
UDP-Glucose	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid)	Life Technologies (Gibco BRL), 76131 Karlsruhe

2.1.2 Material für Chromatographie und Filtration sowie weiteres Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2 Material für Chromatographie, Filtration, Membranen und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Bakerbond Octadecyl (C18), 3ml	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Filterpapier (Falten- und Rundfilter)	Schleicher und Schüll, 37586 Dassel
Indikatorpapier für pH Werte	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
Gel-Blotting Papier	Schleicher und Schüll, 37586 Dassel
Kieselgelplatten (Merck 60 F ²⁵⁴)	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
Agfa Curix HC 1.000G X-Ray Film	Agfa-Gevaert, 51373 Leverkusen
Biodyne Plus – Membran für Southern Blots	Pall Gelmann, 64380 Roßdorf
Membranfilter 0,2 µm	Schleicher und Schüll, 37586 Dassel

2.1.3 Enzyme, Größenstandards und Reagenziensätze

Die verwendeten Enzyme, Größenstandards zur DNA-Fragmentlängenbestimmung sowie zur Proteincharakterisierung und Reagenziensätze sind nachfolgend in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3 Enzyme, Größenstandards und Reagenziensätze

Bezeichnung	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas, 68789 St. Leon-Rot NEB-Biolabs, 65926 Frankfurt am Main
<i>Taq</i> -Polymerase	Qbiogene, 68123 Heidelberg
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, 1100 AB Amsterdam, NL
<i>Pwo</i> -Polymerase	Roche Diagnostics, 68298 Mannheim

Bezeichnung	Hersteller
T4-DNA-Ligase	NEB-Biolabs, 65926 Frankfurt am Main
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	NEB-Biolabs, 65926 Frankfurt am Main
SAP („Shrimp Alkaline Phosphatase“)	United States Biochemicals (USB), Bad Homburg
RNase A	Qiagen, 40724 Hilden
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.0 (ABI PRISM Ready Reaction Cycle Sequencing Kit)	Applied Biosystems, 64331 Weiterstadt
Gigapack [®] III Gold Packaging Extract	Stratagene, 1100 AB Amsterdam, NL
pGem [®] -T-Easy-Vektor-Kit	Promega, 68199 Mannheim
TOPO-TA-Cloning Kit [®] , Version K2	Invitrogen, 9704 CH Groningen, Niederlande
Qiaquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, 40724 Hilden
DNeasy Plant Maxi Kit	Qiagen, 40724 Hilden
Anti-Digoxigenin-AP	Roche-Diagnostics, 68298 Mannheim
DIG-High Prime Labeling Kit	Roche-Diagnostics, 68298 Mannheim
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche-Diagnostics, 68298 Mannheim
RadPrime DNA Labeling System	Life Technologies (Gibco BRL), 76131 Karlsruhe
GeneRuler Ladder Mix	MBI-Fermentas, 68789 St.Leon-Rot
Digoxigenin-markierter DNA-Größenstandard (λ -DNA, EcoR I/Hind III hydrolysiert)	Roche-Diagnostics, 68298 Mannheim
Low Molecular Weight Marker	Amersham-Pharmacia Biotech, 79111 Freiburg
Lysozym	Merck-Eurolab, 64295 Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	NEB-Biolabs, 65926 Frankfurt am Main

2.1.4 Oligonukleotide

In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide finden sich in Tabelle 2.4. Sie wurden von der Firma MWG Biotech, Eggenstein, bezogen.

Tabelle 2.4 Desoxyoligonukleotide („Primer“)

Für degenerierte Oligonukleotide gilt: W=A,T / Y=C,T / S=C,G / R=A,G / M=A,C / D=T,A,G / H=A,T,C / B=G,T;C / V=G,A,C; T[°C] = Schmelztemperatur

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5'→3')	T[°C]	bp	Funktion (Referenz)
Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung von AHBA-Synthasegenen				
AHBA1f	GCS GTS ACS AAC GGS ACS CAC G	69,6	22	Degenerierte Oligonukleotide, abgeleitet aus <i>A.pretiosum</i> , <i>S.collinus</i> und <i>A.mediterranei</i> (Hoffmann, 1997)
AHBA2r	CSG TCA TSA GCT TSC CGT TCT GG	66,0	23	
AHBAfwd	CAG AAC GGS AAG CTS ATG	56,0	18	Spezifische Oligonukleotide für das
AHBArev	CGT GSG TTC CGT TSG TSA CSG	65,7	21	
AHBA-Start	ATG AGT GCC CAA GGA CGT CCG GCC	80,0	24	AHBA-Synthasegen von <i>Kitasatospora</i>
AHBA1	CCC GCC GAC GGA CCG GAA	65,1	18	<i>putterlickiae</i> F18-98 (diese Arbeit)
AHBA2	AAG TAC TTC CAC CAG ACC	53,7	18	
AHBA-Exfw	AAA GGA TCC GCA TAT GAG TGC CCA AGG ACG	69,5	30	Oligonukleotide für das Expressionskonstrukt der AHBA-Synthase aus <i>K.putterlickiae</i> F18-98 (diese Arbeit)
AHBA-Exrev	GGG GAA TTC TCA TCA CAC CGC GGC CAG GGC	75,0	30	

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5'→3')	T[°C]	bp	Funktion (Referenz)
Oligonukleotide zur Sondenherstellung				
Kinafw	GCA CCC CGT ACC ACC TCG GCA TC	78,0	23	Oligonukleotide abgeleitet aus Sequenzen des Rif-Clusters (<i>August et al., 1998</i>); pFKN108 diente als DNA-Matrize, bei degenerierten Oligonukleotiden ist auch pDHc1 (<i>Hoffmann, 1997</i>) als Matrize möglich (<i>von Bamberg, 1999</i>)
Kinarv	GCA ACG ACG ACA GCC CGC CCA AC	78,0	23	
Oxidofw	GCG GTG GTC GGG CTC GGS TGG G	80,0	22	
Oxidorv	GGT TSG GGC TGA AGC CGA AGG TGC	80,0	24	
Phospfw	GAC ATT CCC GAT CGT CGA CCG GC	76,0	23	
Phosprv	GAC GGA CAG AGC GCG AGC AGG TC	78,0	23	
DAHPCon1f	CAG GGS GGS GAC TGC GCS GAG	76,0	21	
DAHPCon1r	GTG TTS CCG TGC ATS GGG TC	66,0	20	
ADHQ1F	GAG ATC TGC ATA TGC CCA CCA CCG CCA CCC GCG	110,0	33	
ADHQ1R	GCT GCA GCG CCC AGC GAT TCC GCT AGG ACC TC	108,0	32	
Oligonukleotide für Sequenzierungen mittels „Primer-Walking“				
Oxido1fw	GGA CGG GGG CCG GAC GA	64,8	17	Abgeleitete Oligonukleotide für die Sequenzierung des Oxidoreduktase- und Phosphatasegens in <i>K.putterlickiae F18-98</i> (diese Arbeit)
Oxido2rev	AGC TCG TCG AGC TGG CGC A	63,1	19	
Oxido3fw	AGC AAC AGC TCC CTC CGA	58,2	18	
Oxido4rev	GTC GAC GGG CTC GTG GGA	62,8	18	
Oxido6.1fw	AAG CCG GTC TGC CTC AGC	60,5	18	
Oxido7.1rev	CGG AGA GCG AGC CGA GCA	62,8	18	
Oxido7.2rev	CCC TCG GTG CCG CGC CAG	67,4	18	
Oxido8fw	CTG GAA CTG CTC GAC GTG C	61,0	19	
Oxido9fw	CTG CTG CCC GAA CCC GTC	62,8	18	
„Primer“ für die Amplifikation von 16S rDNA und der 16S-23S rRNA-Gen Spacerregion				
pA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	60,0	20	Allgemeine „Primer“ für bakterielle 16S rRNA-Gene (<i>Edwards et al., 1989</i>)
pH*	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	64,0	20	
781-796F	GAA CAG GAT TAG ATA CCC	51,4	18	„Primer“ zur Differenzierung zwischen <i>Kitasatospora</i> - und <i>Streptomyces</i> Spezies (<i>Zhang et al., 1997</i>)
revSKSPr	ACA GAT GCT CGC GTC CAC	58,2	18	
1463-1480F	CCG TCG AAG GTG GGA CCA	60,5	18	
revKSPr	TCC CTC AGG ACC CAA CAA	56,0	18	
33-48R 23S	AAG GGA TCC TGC CAA GGC ATC CAC C	67,9	25	„Primer“ für die 16S-23S rRNA-Gen Spacerregion (<i>Zhang et al., 1997</i>)
1525-1542F 16S	CCG GGA TCC GGT TGG ATC CAC CTC CTT	71,0	27	
Oligonukleotide zur Proteinexpression und zur Testung der Enzymfunktion				
StreptK-MExfw	GCC CAA GCT TAC ATA TGA ACG CGC GAA AG	68,1	29	
StreptK-MExrev2	GGG CTC GAG TCG AGC CGG CGA TCT TGT G	73,9	28	
Standard-Oligonukleotide zur Bestimmung der Basenfolge der DNA				
M13-fwd-20	GTA AAA CGA CGG CCA GT	52,0	17	Bindestellen der Oligonukleotide sind jeweils in den Angaben der Vektor-Hersteller aufgelistet.
M13rev	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	56,0	19	
SP6	CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG	66,0	24	
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	58,4	22	
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	53,2	20	

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5'→3')	T[°C]	bp	Funktion (Referenz)
Lit28M13rev(-61)	GTG TGG AAT TGT GAG CGG AT	57,3	20	
„Primer“ zur Suche von AHBA-Synthasegenen in kultivierten Zellen von <i>Putterlickia verrucosa</i>				
P1fAHBA	ACH AAY GGD ACW CAY GC	52,0	17	Degenerierte „Primer“,
P2fAHBA	CCW GCW TTY ACH TTY AT	46,3	17	abgeleitet aus konser-
P3fAHBA	ATM ATG CCW GTB CAY ATG GC	56,6	20	vierten Regionen bak-
P4rAHBA	WGC RTG WGC WGC RTC YTG	57,1	18	terieller AHBA-Syn-
P5fAHBA	CAR GAT GCW GCW CAY GC	55,2	17	thasegene, dem Codon-
P6rAHBA	TTH CCR TTY TGR AAW GAR AA	49,8	20	gebrauch (Hoffmann,
P7rAHBA	GCD GTC ATM AGY TTH CCR TT	55,6	20	1997) von <i>Putterlickia</i>
P8fAHBA	TCW TTY CAR AAY GGD AA	45,1	17	<i>verrucosa</i> -Pflanzen
P9rAHBA	ADY CRV WWR TTW GWH CC	47,5	17	angepasst (diese
P10rAHBA	WGA RAA YTC RTT MAD YC	45,1	17	Arbeit)

2.1.5 Plasmide und Cosmide

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Vektoren sowie die in dieser Arbeit erstellten rekombinanten Cosmide und Plasmide aufgelistet.

Tabelle 2.5 DNA-Vektoren

Bezeichnung	Größe	wichtige Eigenschaften	Referenz/Quelle
pBluescript [®] II KS(-)	2961 bp	Amp ^r , ColE1-origin, fl-origin, lacPOZ (α-Komplementation)	<i>Alting-Mees et al. (1992)</i> / Stratagene, Amsterdam, NL
pBlueT	2961 bp	3''-T-Überhangsvektor auf Basis von pBluescript [®] II KS(-)	Herstellung siehe 2.5.11.2
pCR [®] 2.1-TOPO	3908 bp	Amp ^r , Kan ^r , ColE1-origin, fl-origin, lacPOZ, 3''-T-Überhangsvektor	Invitrogen, Groningen, NL
pGem-T-Easy [®]	3015 bp	Amp ^r , ColE1-origin, fl-origin, lacPOZ (α-Komplementation), 3'-T-Überhangsvektor	<i>Summerton et al. (1983)</i> / Promega, 68199 Mannheim
pGem5Zf(+) [®]	3003 bp	Amp ^r , ColE1-origin, fl-origin, lacPOZ (α-Komplementation)	<i>Summerton et al. (1983)</i> / Promega, 68199 Mannheim
Litmus28	2823 bp	Amp ^r , M13-origin, ColE1-origin, lacPOZ (α-Komplementation)	<i>Evans et al. (1995)</i> / NEB, 65926 Frankfurt
pOJ446	10,4 kb	Cosmid-Vektor, 3 λ-cos-Stellen, Apra ^r , SCP2*-origin, oriT _{RK2} ,	<i>Bierman et al. (1992)</i> / Dr. B. E. Schoner (Eli Lilly, IN, USA)
pRSET B	2939 bp	Amp ^r , ColE1-origin, fl-origin, <i>E.coli</i> -Überexpressionsvektor, Expression eines N-terminalen Histidin-Fusionsproteins, T7-Promotor	<i>Studier and Moffatt (1986)</i> , <i>Schoepfer (1993)</i> / Invitrogen, Groningen, NL
pIJ4123	9200 bp	Thio ^r , Kan ^r , Streptomyceten-Überexpressionsvektor, Expression eines N-terminalen Histidin-Fusionsproteins, tipA-Promotor, pIJ101-origin	<i>Takano et al. (1995)</i> / Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pIJ6021	7800 bp	Thio ^r , Kan ^r , Streptomyceten-Überexpressionsvektor, tipA-Promotor, pIJ101-origin	<i>Takano et al. (1995)</i> / Prof. Floss (Seattle, WA, USA)

Tabelle 2.6 Cosmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz/ Herkunft
pTBc1 (6A5/2)	Cosmid mit 55 kb DNA von <i>K. putterlickiae</i> F18-98 in pOJ446, ähnlich zu pTBc2	diese Arbeit
pTBc2 (6A8/6)	54,6 kb DNA von <i>K. putterlickiae</i> F18-98 in pOJ446	diese Arbeit
pTBc3 (8A8/1)	Cosmid mit DNA von <i>K. putterlickiae</i> F18-98 in pOJ446; reorganisiert	diese Arbeit
pTBc4 (2B8/5)	DNA von <i>K. putterlickiae</i> F18-98 in pOJ446	diese Arbeit
pTBc5 (5B2/1)	ca. 8 kb DNA von <i>K. putterlickiae</i> F18-98 in pOJ446	diese Arbeit
pDBc1	Naphtomycin-Cluster, <i>Streptomyces collinus</i>	von Bamberg (1999)
pDBc7	Ansatrienin-Cluster, <i>Streptomyces collinus</i>	von Bamberg (1999)
pFKN108	Rifamycin-Cluster, <i>Amycolatopsis mediterranei</i>	August et al. (1998)

Tabelle 2.7 Rekombinante Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/ Referenz
pA1M5	TypI-PKS mit eryA KS-5 und AT-5 (Ketosynthase und Acyltransferase 5. Modul des eryAIII Gens), Amp ^r	Dr. L. Katz (Abbott Laboratories, IL, USA)
pHGF7579	mit 0,8 kb NdeI/ KpnI asm9-Fragment (Amidsynthase) aus <i>A. pretiosum</i> , Apra ^r	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
p4/27-21	Subklon von pDDc7 (Yu et al., 2002) mit 2,0 kb EcoRI/ HindIII-Fragment von asm21 aus <i>A. pretiosum</i> (Carbamoyltransferase) in pBluescript II KS(-)	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pRSET(Hal)H5	mit 1,31 kb NdeI/ KpnI-Fragment von asm12 aus <i>A. pretiosum</i> (Halogenase) in pRSET B	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pAtr-A7	Subklon von pDDc7 (Yu et al., 2002) mit EcoRI/ NdeI-Fragment von asm19 aus <i>A. pretiosum</i> (Acyltransferase)	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pHGF7577	6479 bp Fragment mit den Genen asm13-17 aus <i>A. pretiosum</i> in pNEB193	Prof. Floss (Seattle, WA, USA), Kato et al. (2002)
pHGF7719	RifK-(His ₆)-rifL in pRSET B	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pHGF7711	1516 bp NdeI/ XhoI-Fragment von rifK kloniert in modifizierten pRSET B-Vektor (Apra ^r)	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pHGF7720	2053 bp NdeI/ EcoRI-Fragment von (His ₆)-rifL-rifM in pRSET B	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pHGF7705	1947 bp NdeI/ EcoRI-Fragment mit den Genen rifL und rifM in pRSET B	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pRM030	1295 bp (His ₆)-rifL in pRSET B	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
EAHBA6	1507 bp BamHI/ XhoI-Fragment von (His ₆)-rifK kloniert in pRSET B, mit BamHI/ PvuII	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pRM064	773 bp BamHI/ EcoRI-Fragment mit (His ₆)-rifM in pRSET B	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)
pRM028	15,8 kb KpnI rif-Fragment aus <i>A. mediterranei</i> in pBluescript II SK(-)	Prof. Floss (Seattle, WA, USA)/ Yu et al. (2001)
pHGF7604	bifunktionaler Vektor (Shuttle-Vektor) mit ColE1-origin, Amp ^r (Selektion in <i>E. coli</i>); SCP2*-origin, Thio ^r (Selektion in <i>Streptomyces</i>), Gene rifK-N,J; G-I unter actII-orf4 Promotor	Dr. T.-W. Yu, (Seattle, WA, USA)/ Yu et al. (2001)

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/ Referenz
pHGF7607	Deletion des 624 bp XhoI Fragmentes aus rifL in pHGF7604	Dr. T.-W. Yu, (Seattle, WA, USA)/ <i>Yu et al. (2001)</i>
pHGF7608	Deletion des 224 bp ApaI Fragmentes aus rifM in pHGF7604	Dr. T.-W. Yu, (Seattle, WA, USA)/ <i>Yu et al. (2001)</i>
pHGF7609	Deletion des 832 bp NcoI/ PmlI Fragmentes aus rifN in pHGF7604	Dr. T.-W. Yu, (Seattle, WA, USA)/ <i>Yu et al. (2001)</i>

Tabelle 2.8 Eigene Plasmid-Konstrukte

Bezeichnung	Beschreibung
A18PCR ₄₀₀ TB25.4.4	400 bp AHBA-Synthasegen PCR-Produkt von <i>K. putterlickiae</i> F18-98 in pGem-T-Easy [®]
1 5Zf P/N 4.2	4,2 kb PstI/ NcoI-Fragment aus pTBc2 in pGem5Zf(+) [®]
1 5Zf P/S 2.2	2,2 kb PstI/ SacI-Fragment aus 1 5Zf P/N 4.2 in pGem5Zf(+) [®]
3 5Zf N/S 2.0	2,0 kb NcoI/ SacI-Fragment aus 1 5Zf P/N 4.2 in pGem5Zf(+) [®]
3 5Zf N/S _B 1.4	1,4 kb NcoI/ StuI-Fragment (mit Klenow glatt aufgefüllt), entstanden durch Religation von 3 5 Zf N/S 2.0, mit StuI und SacI hydrolysiert
4 5Zf S/ _B 0.6	0,6 kb SacI/ StuI (mit Klenow glatt aufgefüllt) in pGem5Zf(+) [®] , entstanden durch Religation von 3 5 Zf N/S 2.0, mit StuI und NcoI hydrolysiert
5 Zf P/X 0.9	0,9 kb PstI/ XmaI-Fragment aus 1 5Zf P/S 2.2 in pGem5Zf(+) [®]
5 Zf Sal 1.4	1,4 kb Sall-Fragment aus 1 5 Zf P/S 2.2 in pGem5Zf(+) [®]
4 5Zf P N/S 1.4	1,4 kb NcoI/ SacI-Fragment aus pTBc2 in pGem5Zf(+) [®]
5TopoAHBA	1167 bp F18-AHBA-Synthasegen PCR-Produkt in pCR [®] 2.1-TOPO
1pRSETB(AHBA)	1167 bp F18-AHBA-Synthasegen PCR-Produkt in pRSET B
Spacer5	300 bp PCR-Produkt der 16-23S rRNA-Gen Spacerregion von <i>Kitasatospora putterlickiae</i> F18-98 in pBluescript II KS(-)
4pTB rifL	1,3 kb NdeI/ HindIII-Fragment aus pHGF7719 ligiert mit 4,41 kb NdeI/HindIII-Fragment aus pHGF7711 (rifL in pRSET B, ohne Histidin-Fusionsprotein)
9 Lit28 H/X 0.7	0,7 kb PCR-Produkt (Beginn rifK) in Litmus28, mit HindIII und XhoI hydrolysiert
16 Lit28 9K-M	3,4 kb EcoRI/ BsrGI-Fragment aus pRM028 in 9 Lit28 H/X 0.7, mit EcoRI und BsiWI hydrolysiert

2.1.6 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien sind nachfolgend aufgeführt. Falls nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben jeweils auf 1 l Medium. Zur Herstellung wurde Reinstwasser (s. 2.2.2) verwendet. Bei Festmedien wurde vor dem Sterilisieren Agar (15 g/l) hinzugefügt. Nach dem Lösen der Einzelkomponenten wurden die Medien autoklaviert (s. 2.2.1). Antibiotika und andere hitzelabile Substanzen wurden nach dem Autoklavieren als sterile Lösungen zugefügt.

2.1.6.1 Nährmedien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

Tabelle 2.9 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung	Herstellung
LB-Medium (<i>Sambrook et al., 2001</i>)	Trypton 10,0 g Hefeextrakt 5,0 g NaCl 10,0 g	pH 7,5 mit NaOH einstellen
LB-Betain/ Sorbitol	wie LB-Medium, zusätzlich: Sorbitol 1M Betain 2,5 mM	

2.1.6.2 Medien zur Isolierung und Anzucht von Aktinomyceten

Tabelle 2.10 Nährmedien zur Isolierung und Kultivierung von Aktinomyceten

Medium	Zusammensetzung	Herstellung
ISP 2-Medium (<i>Shirling und Gottlieb, 1966</i>)	Malzextrakt 10,0 g Hefeextrakt 4,0 g Glucose 10,0 g	pH-Wert 7,3 mit NaOH einstellen, autoklavieren
YEME-Medium (<i>Hopwood et al., 1985</i>)	Saccharose 340,0 g Glucose 10,0 g Pepton 5,05 g Hefeextrakt 3,0 g Malzextrakt 3,0 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O (2,5 M) 2,0 ml	nach dem Autoklavieren Zugabe der sterilen Lösungen
TSB-Medium	Tryptic Soy Broth 30,0 g	
TSB-Medium mit Glycin	Tryptic Soy Broth 30,0 g Glycin 10,0 g	

2.1.6.3 Nährmedien zur Protoplastentransformation von Streptomyceten

Tabelle 2.11 Nährmedien zur Protoplastentransformation von Streptomyceten

Medium	Zusammensetzung	Herstellung
R2YE-Medium (<i>Thompson et al., 1980</i>)	Saccharose 103,0 g K ₂ SO ₄ 0,25 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O 10,12 g Glucose 10,0 g Casaminosäuren 0,1 g Bacto-Agar 22,0 g	mit Reinstwasser auf 800 ml auffüllen, autoklavieren
	KH ₂ PO ₄ (0,5%) 10 ml CaCl ₂ x 2 H ₂ O (3,68%) 80 ml L-Prolin (20%) 15 ml TES-Puffer (5,73%, pH 7,2) 100 ml Spurenelementlösung 2 ml NaOH (1N) 5 ml Hefeextrakt (10%) 50 ml	nach dem Autoklavieren Zugabe der sterilen Lösungen

Medium	Zusammensetzung	Herstellung
R5-Medium	Saccharose	103,0 g
	K ₂ SO ₄	0,25 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,12 g
	Glucose	10,0 g
	Casaminosäuren	0,1 g
	Spurenelementlösung	2 ml
	Hefeextrakt	5,0 g
	TES-Puffer	5,73 g
	Bacto-Agar	22,0 g
		KH ₂ PO ₄ (0,5%)
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O (5 M)	4,0 ml
	L-Prolin (20%)	15,0 ml
	NaOH (1N)	7,0 ml
Spurenelementlösung	ZnCl ₂	40 mg
	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200 mg
	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
	NaB ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	10 mg
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	10 mg

nach dem Autoklavieren
steril zugeben

2.1.6.4 Medien zur Förderung der Produktion von Sekundärmetaboliten in Aktinomyceten

Die Zusammensetzung der Medien für die Induktion der Sekundärstoffproduktion von Aktinomyceten wurde *Grond (1997)* entnommen.

Tabelle 2.12 Medien zur Produktion von Sekundärmetaboliten in Aktinomyceten

Medium	Zusammensetzung	Herstellung
M2-Glycerin-Medium	Glycerin	20,0 g
	Malzextrakt	10,0 g
	Hefeextrakt	4,0 g
	CaCO ₃	20,0 mg
SM-Medium	Sojamehl, entfettet	20,0 g
	Mannitol	20,0 g
M2-Medium	Malzextrakt	10,0 g
	Glucose	4,0 g
	Hefeextrakt	4,0 g
M2Ca-Medium	wie M2, zusätzlich	
	CaCO ₃	20,0 mg
Hafermedium	Hafermehl	20,0 g
	Spurenelemente 11	2,5 ml/l
Kleiemedium	Kleie	20,0 g
	Spurenelemente 11	2,5 ml/l
Lebermedium	Glucose	10,0 g
	Caseinpepton	4,0 g
	Fleischextrakt	4,0 g
	Hefeextrakt	0,5 g
	Leberextrakt	0,5 g
	NaCl	2,5 g

Medium	Zusammensetzung	Herstellung	
NL 1153	Glycerin Arginin NaCl K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ x 7 H ₂ O Spurenelemente 11	12,5 g 1,0 g 1,0 g 1,0 g 0,5 g 5 ml/l	pH-Wert 7,3 einstellen
NL 1345	Glycerin Arginin L-Tyrosin K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ x 7 H ₂ O NaCl Spurenelemente 11	12,5 g 1,0 g 0,5 g 1,0 g 0,5 g 0,5 g 5 ml/l	
NL 1358	Glycerin Caseinpepton K ₂ HPO ₄ NaCl MgSO ₄ x 7 H ₂ O Spurenelemente 11	30,0 g 2,0 g 1,0 g 1,0 g 0,5 g 5 ml/l	
NL 1187	Stärke (NH ₄) ₂ SO ₄ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ x 7 H ₂ O NaCl CaCO ₃ Spurenelemente 11	10,0 g 2,0 g 1,0 g 1,0 g 1,0 g 2,0 g 5 ml/l	
NL 136	Glucose Sojapepton CaCO ₃ CoCl ₂	20,0 g 10,0 g 2,0 g 1,0 mg	pH-Wert 7,2 einstellen
Spurenelemente 11	CaCl ₂ x 2 H ₂ O Fe(III)-citrat MnSO ₄ ZnCl ₂ CuSO ₄ x H ₂ O Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O CoCl ₂ Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	3,0 g 1,0 g 0,2 g 0,1 g 0,025 g 0,02 g 0,004 g 0,01 g	

2.1.6.5 Medium zur Anzucht von *Penicillium avellaneum*

Tabelle 2.13 Anzuchtmedium von *Penicillium avellaneum*

Medium	Zusammensetzung	Herstellung	
Biotest-Medium für <i>Penicillium avellaneum</i> (Hanka et al., 1974)	Na ₂ PO ₄ x H ₂ O KH ₂ PO ₄ Hefeextrakt Glucose	3,5 g 0,5 g 5,0 g 10,0 g	pH-Wert 7,1 einstellen

2.1.6.6 Medien zur Kultivierung von pflanzlichen Zellkulturen

Tabelle 2.14 Medien zur Kultivierung von pflanzlichen Zellkulturen

Medium	Zusammensetzung	Herstellung
BDS-Medium (<i>Dunstan und Short, 1977</i> ; modifiziert nach <i>Gamborg et al., 1968</i>)	Saccharose	30,0 g
	KNO ₃	2,53 g
	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	172,0 mg
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	150,0 mg
	(NH ₄) ₂ SO ₄	134,0 mg
	(NH ₄)H ₂ PO ₄	230,0 mg
	NH ₄ NO ₃	320,0 mg
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	247,0 mg
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,85 mg
	Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	37,25 mg
	KI	0,75 mg
	MnSO ₄ x 4 H ₂ O	13,2 mg
	H ₃ BO ₃	3,0 mg
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 mg
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25 mg
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,039 mg
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025 mg
	Nicotinsäure	1,0 mg
	Thiamindichlorid	10,0 mg
	Pyridoxalhydrochlorid	1,0 mg
myo-Inosit	100,0 mg	
Kinetin	1,0 mg	
3,6-Dichlor-2- methoxybenzoesäure	1,0 mg	
		pH-Wert 5,5 einstellen, autoklavieren, als Festmedium außer- dem Zugabe von 4,0 g Phytigel™ vor dem Sterilisieren

2.1.7 Antibiotika

Zur Selektion rekombinanter Stämme mit Hilfe der Antibiotikaresistenz wurden den Medien die in Tabelle 2.15 aufgeführten Antibiotika zugesetzt. Dazu wurden Stammlösungen der Antibiotika mit den angegebenen Konzentrationen angefertigt und bei -20 °C gelagert. Die Lösungen wurden durch einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm, s. 2.1.2) sterilfiltriert.

Tabelle 2.15 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration Medium [µg/ml]	Konzentration Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel
Penicillin G	100	100	H ₂ O, reinst
Apramycin	100	100	H ₂ O, reinst
Kanamycin	60	60	H ₂ O, reinst
Tetracyclin	10	10	Ethanol
Chloramphenicol	17-34	34	Ethanol
Thiostrepton	20-50	50	DMSO

2.1.8 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in Reinstwasser (s. 2.2.2) angesetzt.

2.1.8.1 Puffer zur DNA-Isolierung

Tabelle 2.16 Puffer zur DNA-Isolierung

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
Puffer P1	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
Puffer P2	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (m/V)
Puffer P3	Kaliumacetat	2,55 M
STE-Puffer	Tris-HCl	25 mM
	EDTA, pH8	25 mM
	Saccharose	300 mM
	Lysozym	10 mg/ml
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
Kirby-Mix	Roti [®] -Phenol (pH 8)	24 VT
	Chloroform	24 VT
	Isoamylalkohol	2 VT
TEGLR	Tris-HCl	25 mM, pH 8
	EDTA	10 mM, pH 8
	Glucose	50 mM
	Lysozym	1 mg/ ml
	RNase A	5 µg/ ml

2.1.8.2 Puffer zur Transformation, Transfektion und Selektion von *E. coli*

Tabelle 2.17 Puffer zur Transformation, Transfektion und Selektion von *E. coli*

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
TB-Puffer	HEPES oder PIPES	10 mM
	CaCl ₂	15 mM
	KCl	250 mM
	MnCl ₂	55 mM
TFB1-Puffer	Kaliumacetat	30 mM
	CaCl ₂	10 mM
	MnCl ₂	50 mM
	RbCl	100 mM
	Glycerol	15 %
TFB2-Puffer	MOPS oder PIPES	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerol	15 %
Glycerol-Lösung (10%)	Glycerol	10,0 g
	H ₂ O	ad 100,0 g

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
GYT-Puffer	Glycerol	10 %
	Hefeextrakt	0,125 %
	Trypton	0,25 %
IPTG-Lösung (7%)	Isopropyl- β -D-thiogalactosid H ₂ O	7,0 g ad 100,0 g
X-Gal-Lösung (2%)	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β - D-galactosid Dimethylformamid	2,0 g ad 100,0 g
SM-Puffer	NaCl	5,8 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
	Tris-HCl (pH 7,5)	50,0 ml
	Gelatine-Lösung 2%ig (m/V)	5,0 ml
	H ₂ O	ad 1000,0 ml

2.1.8.3 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten

Tabelle 2.18 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
P-Puffer (<i>Okanishi et al., 1974;</i> <i>Hopwood und Wright,</i> <i>1978</i>)	Saccharose	103,0 g
	K ₂ SO ₄	0,25 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,02 g
	Spurenelementlösung (siehe Tabelle 2.11)	2,0 ml
	H ₂ O	ad 800 ml
	KH ₂ PO ₄ (0,5%) CaCl ₂ x 2 H ₂ O (3,68 %) TES-Puffer (5,73 %, pH 7,2)	10,0 ml 100,0 ml 100,0 ml
Lysozym-Lösung	Lysozym in P-Puffer	1 mg/ ml q.s.
Transformationspuffer	PEG 1000	25 %
	P-Puffer	q.s.

2.1.8.4 Puffer und Lösungen für Hybridisierungen nach Southern

Tabelle 2.19 Puffer und Lösungen für Hybridisierungen nach Southern

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
Depurinierungslösung	HCl	250 mM
Blockierungsreagenz- Stocklösung	Blockierungsreagenz	10 % (m/V) in Detektionspuffer 1 unter Erwärmen lösen
Denaturierungslösung	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
Neutralisierungslösung	Tris-HCl	0,5 M
	NaCl	3,0 M
SSC-Puffer (20fach konzentriert)	NaCl	3,0 M
	Natriumcitrat	0,3 M
Detektionspuffer 1	Maleinsäure	0,1 M
	NaCl	0,15 M

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Herstellung	
Detektionspuffer 2	Blockierungsreagenz- Stocklösung	10 ml	
	Detektionspuffer 1	ad 100,0 ml	
Detektionspuffer 3	Tris-HCl	0,1 M	pH 9,5; autoklavieren
	NaCl	0,1 M	
Prähybridisierungslösung	SSC-Puffer	5fach	
	Formamid	50 %	
	Blockierungsreagenz	2 %	
	N-Laurylsarcosin	0,1 %	
	SDS	0,02 %	
Hybridisierungslösung	SSC-Puffer	5fach	DIG-markierte Sonde zur Prähybridisierungslösung zugeben
	Formamid	50 %	
	Blockierungsreagenz	2 %	
	N-Laurylsarcosin	0,1 %	
	SDS	0,02 %	
2x Waschpuffer	SDS	0,1 %	
	SSC-Puffer	2fach	
0,5x Waschpuffer	SDS	0,1 %	
	SSC-Puffer	0,5fach	
0,1x Waschpuffer	SDS	0,1 %	
	SSC-Puffer	0,1fach	
Tween-Waschlösung	Tween 20	0,3 %	
	Detektionspuffer 1	q.s.	

2.1.8.5 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese

Tabelle 2.20 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Herstellung	
TAE-Puffer (50fach konzentriert)	Tris	2,0 M	pH 8,3
	Essigsäure	1,0 M	
	EDTA	0,05 M	
TBE-Puffer (10fach konzentriert)	Tris	0,9 M	
	Borsäure	0,9 M	
	EDTA (auf pH 8 einstellen)	0,02M	
DNA-Auftragspuffer (6fach konzentriert)	Bromphenolblau	0,25 %	
	Xylencyanol FF	0,25 %	
	Glycerol	30 % (m/V)	

2.1.8.6 Puffer für die automatische Sequenzierung

Tabelle 2.21 Puffer für die automatische Sequenzierung

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Herstellung	
Probenauftragspuffer	Formamid	5 VT	
	EDTA (25 mM, pH 8)	1 VT	
APS-Lösung 10 %	APS	1,0 g	bei -20 °C lagern
	H ₂ O	ad 10 ml	
Elektrophoresepuffer	10 x TBE-Puffer (s. 2.1.8.5)	130 ml	frisch herstellen
	H ₂ O	1170 ml	

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
Acrylamid-Gellösung (4,5 %)	Harnstoff	12,0 g	für ein Gel von 36 cm Länge ausreichend, frisch ansetzen
	Acrylamid-Lösung 30 %ig	5,0 ml	
	TBE-Puffer 10fach (s. 2.1.8.5)	4,0 ml	
	HPLC-Wasser	15,3 ml	

2.1.8.7 Puffer zur Enzymreinigung

Tabelle 2.22 Puffer zur Enzymreinigung

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
Aufschlusspuffer 1	Tris-HCl	0,1 M	pH 7,5; autoklavieren
	EDTA	1,0 mM	
	NaCl	0,1 M	
	Glycerol	5,0 % (V/V)	
	Triton X100	0,1 %	
	DTT	1,0 mM	
Lysepuffer A	Tris-HCl	50 mM	pH 7,5
	Glycerol	15 % (V/V)	
Lysepuffer B	NaH ₂ PO ₄	50 mM	pH 8,0
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	20 mM	
	Lysozym	1 mg/ ml	
Lysepuffer C	K ₂ HPO ₄	50 mM	pH 7,5 mit 50 mM KH ₂ PO ₄ einstellen
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	1 mM	
	PLP (Pyridoxalphosphat)	1 mM	
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM	pH 8,0; autoklavieren
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	250 mM	

2.1.8.8 Puffer zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung von Proteingelen

Tabelle 2.23 Puffer zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung		Herstellung
denaturierender Proben- puffer (5fach konzentriert)	Glycerol	10 ml	pH 6,8
	β-Mercaptoethanol	5 ml	
	SDS-Lösung (10 %)	30 ml	
	Bromphenolblau	0,01% (m/V)	
	Tris-HCl	1,9 M	
	SDS	13,5% (m/V)	
	H ₂ O	ad 100,0 ml	
APS-Lösung 20 %	Ammoniumperoxodisulfat	2,0 g	bei -20 °C lagern
	H ₂ O	ad 10 ml	
Sammelgelpuffer	SDS	0,4 %	pH 6,8
	Tris-HCl	0,5 M	
Trenngelpuffer	SDS	0,4 %	pH 8,8
	Tris-HCl	1,5 M	

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung		Herstellung
Elektrophoresepuffer (5fach konzentriert)	Glycin	0,96 M	pH 8,5
	Tris-HCl	0,125 M	
	SDS	0,5% (m/V)	
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliantblau G250 [®]	1 g/l	
	Eisessig (100 %)	75 ml/l	
	Methanol	200 ml/l	
Coomassie- Entfärbelösung	Eisessig (100 %)	75 ml/l	
	Methanol	200 ml/l	
Sammelgel-Lösung 4 %	Sammelgelpuffer	2,5 ml	Puffer, Acrylamid u. H ₂ O mischen und entgasen, APS und TEMED zufü- gen, sofort in Gießvor- richtung geben, 30 min polymerisieren lassen
	Acrylamid-Lösung 40%	1,0 ml	
	Wasser	6,4 ml	
	APS (20 %)	75 µl	
	TEMED	15 µl	
Trenngel-Lösung 13,5 %	Trenngelpuffer	10 ml	s. Sammelgel-Lösung; zusätzlich mit Isobutanol überschichten, üN poly- merisieren lassen
	Acrylamid-Lösung 40%	13,4 ml	
	Wasser	16,4 ml	
	APS (20 %)	200 µl	
	TEMED	25 µl	

2.2 Laboreinrichtung

2.2.1 Sterilisationsmethoden

Medien, Lösungen, Puffer sowie Gebrauchsmaterialien und Geräte wurden für mindestens 20 min bei 121 °C und 1 atü in einem Autoklav der Firma Webeco, Bad Schwartau, autoklaviert. Temperaturempfindliche Lösungen oder Puffer wurden durch einen Membranfilter (0,2 µm Porenweite, Schleicher und Schüll, Dassel) filtriert.

2.2.2 Reinstwasseraufbereitung

Für alle Arbeiten wurde Reinstwasser eingesetzt. Die Aufbereitung erfolgte mit einer „Milli-Q Reagent Water-Anlage“ der Firma Millipore, Eschborn. Für molekularbiologische Anwendungen wurde Reinstwasser autoklaviert. Autoklaviertes HPLC-Wasser (Lichrosolv[®]) wurde eingesetzt, wenn schwebstofffreie Lösungen gebraucht wurden.

2.2.3 Reinraumbedingungen/ Laminar Airflow

Tätigkeiten, die unter sterilen Bedingungen (Reinraumbedingungen) ausgeführt werden mussten, wurden unter einer Werkbank mit turbulenzarmer Verdrängungsströmung (Laminar Airflow) durchgeführt.

Für Arbeiten mit Bakterien und Pilzen wurde das Gerät BSB 4A der Firma Gelaire Flow Laboratories (Meckenheim) eingesetzt. Eine Werkbank des Typs CF436B (CeacConcordia Elektrizitäts-AG, Dortmund) wurde für Arbeiten an pflanzlichen Zellkulturen verwendet. Die Geräte benötigten 10 min Vorlaufzeit.

2.3 Bakterienstämme, Pilze, pflanzliche Zellkulturen

2.3.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden verschiedenste *E. coli*- und Aktinomyceten-Stämme und für Klonierungs- bzw. Expressionsexperimente verwendet (siehe Tabelle 2.24).

Tabelle 2.24 Bakterienstämme

<i>E. coli</i>	Genotyp	Hersteller/ Referenz
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZ ΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>] ^c	Bullock et al. (1987)/ Stratagene, La Jolla, CA 92037, USA
XL1 Blue MRF'	<i>d(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZ ΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>] ^c	Jerpseth et al. (1992)/ Stratagene, La Jolla, CA 9203,7 USA
XL1 Blue MRF'Kan	<i>d(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZ ΔM15 Tn10 (Kan^r)</i>] ^c	Jerpseth et al. (1993)/ Stratagene, La Jolla, CA 92037, USA
DH5α	Φ80 <i>dlacZΔM15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻,m_K⁺) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Woodcock et al. (1989)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻,m_B⁻) dcm gal λ(DE3)</i>	Studier et al. (1990)
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻,m_B⁻) dcm gal λ(DE3)</i> pLysS(Cm ^r)	Studier et al. (1990)
Aktinomyceten-Stämme		Referenz/ Herkunft
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	Wirtsstamm zur heterologen Expression	Hopwood et al. (1985)
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	Wirtsstamm zur heterologen Expression	
<i>Kitasatospora putterlickiae</i> F98-18	Isolat aus der Rhizosphäre einer <i>Putterlickia verrucosa</i> -Pflanze (<i>Celastraceae</i>)	Groth et al. (2003)
<i>Actinosynnema pretiosum</i> ssp. <i>auranticum</i> ATCC31565		Higashide et al. (1977)
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699		Prof. G. Lancini (Lepetit Research Laboratory, Geranzano, I)
<i>Streptomyces collinus</i> Tü1892		Weber et al. (1981)

2.3.2 Pilze

Tabelle 2.25 Pilzstamm als Indikatorstamm für Bioautographie-Versuche

Pilzstamm	Eigenschaft	Herkunft/ Referenz
<i>Penicillium avellaneum</i> UC4376	Ansamitocin und Maytansin sensitiv	Hanka (1974)/ Upjohn, Michigan, USA

2.3.3 Pflanzliche Zellkulturen

Die in Tabelle 2.26 aufgeführten Pflanzenzellkulturen wurden am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn erzeugt.

Tabelle 2.26 Pflanzliche Zellkulturen

Pflanze	Eigenschaft	Herkunft/ Referenz
<i>Putterlickia verrucosa</i> (E.Mey. ex. Sond.) Szyszyl.	<i>Celastraceae</i>	Botanischer Garten Pretoria [Dr. Luck (1991)]
<i>Putterlickia verrucosa</i> (E.Mey. ex. Sond.) Szyszyl. [FG I]	<i>Celastraceae</i> , Feuchtwachshauspflanze FGI, Maytansin führend	Pullen (2000), Meurer (2002)

2.4 Kulturbedingungen

2.4.1 Messung der Bakterienzellzahl von *E. coli*-Kulturen

Um das Wachstum von *E. coli*- Kulturen zu verfolgen, wurde die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspensionen mit Hilfe eines Spektralphotometers (Uvikon[®] 810, Kontron Biotek, München) gemessen. Die Trübung der Suspension, als scheinbare Absorption bei 600 nm, wurde gegen das entsprechende Anzuchtmedium bestimmt. Näherungsweise entspricht dabei eine OD₆₀₀ von 1,0 einer Zellzahl von 8×10^8 Zellen (Gassen, 1991).

2.4.2 Anzucht und Konservierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (s. 2.1.6) für 12-16 h (üN) bei 37 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator (HT Schüttler, Infors, Bottmingen, CH). Als Inokulum diente entweder eine Einzelkolonie oder eine Flüssigkultur, die aus einer Einzelkolonie hergestellt wurde. Eine Bakteriensuspension wurde auf LB-Festmedium mit einer Platinimpföse im Verdünnungsausstrich („13-Strichverfahren“, Schlegel, 1992) vereinzelt.

Wenn der Bakterienstamm ein Antibiotikaresistenzgen zur Wachstumsselektion enthielt, wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (s. 2.1.7).

Zur Konservierung eines Stammes wurden 1 ml einer üN-Kultur mit 0,6 ml sterilem Glycerol in einem Kryo-Röhrchen der Firma Nalgene gemischt. Damit die Bakterien Glycerol aufnehmen und sich keine Kristallisationskeime bilden, wurden die Zellen zuerst für ca. 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei – 80 °C eingefroren.

Für die Anzucht aus einer Dauerkultur wurde mit einer Impföse ein Tropfen der aufgetauten Kultur auf LB-Festmedium ausgestrichen und üN im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.4.3 Anzucht und Konservierung von Aktinomyceten, insbesondere Streptomyceten

2.4.3.1 Anzucht in Fest- und Flüssigmedien

Streptomyces lividans-Stämme und anderen Aktinomyceten wurden in YEME-Medium oder TSB-mit-Glycin-Medium (s. 2.1.6.2) angezogen. Saccharose und Glycin im Medium führten zur Ausbildung schwächerer Zellwände. Die Zellwand konnte bei der DNA-Präparation (s. 2.5.1.1 und 2.5.1.2) leichter aufgebrochen werden. 50 ml Medium in einem 500 ml-Erlenmeyer-Schikanekolben wurden mit einer Einzelkolonie bzw. 0,1 ml einer Sporensuspension (s. 2.4.3.4) angeimpft. Die Anzucht erfolgte bei 28 °C im Rundschtüttler (200 rpm, HT-Schtüttler, Braun, Melsungen). Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (8000x g, 10min) geerntet und bei – 20 °C für spätere Bearbeitungen eingefroren.

Die Kultivierung auf ISP 2-Festmedium (s. 2.1.6.2) wurde in der Regel für 3–5 Tage bei 28 °C im Brutschrank durchgeführt. Ein Teil des Luftmycels wurde mit einer Impföse im „13-Strichverfahren“ (*Schlegel, 1992*) auf eine neue Platte übertragen. Rekombinante Stämme wurden durch die Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums (s. 2.1.7) selektiert.

2.4.3.2 Anzucht von *Kitasatospora putterlickiae* F98-18 zur Förderung der Produktion von Sekundärmetaboliten

Um ein gleichmäßiges Wachstum des Stammes zu ermöglichen, wurde zunächst eine Vorkultur etabliert, aus der dann die Hauptkultur angeimpft wurde. Für die Vorkultur wurden 100 ml SM-Medium (s. 2.1.6.4) in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 1 cm² einer gut gewachsenen ISP 2-Agarplatte des Bakterienstammes beimpft. Der Stamm wurde 72 h bei 28 °C und 180 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Hauptkultur von 100 ml Nährlösung in

einem 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 1 ml der Vorkultur inokuliert. Die Inkubation fand unter den Bedingungen der Vorkultur statt. Nach 96 h wurde die Kultivierung beendet.

2.4.3.3 Erstellen von Wachstumskinetiken für *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

Das Wachstumsverhalten des Stammes *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 wurde in verschiedenen Nährlösungen (s. 2.1.6.4) unter konstanten Bedingungen bestimmt. Aus dem Wachstumsverlauf ergab sich, wann biosynthetische Vorstufen bei Fütterungsexperimenten (s. 2.7.2.4) appliziert wurden.

In dieser Arbeit wurde das Wachstum von Bakterienkulturen über die Trockenmasse bestimmt, da Aktinomyzeten häufig in Flüssigkulturen aggregieren, so dass Extinktionsmessungen ungeeignet sind. Alle Inkubationen wurden zweifach angesetzt, um auftretende Pipettier- und Messfehler besser korrigieren zu können.

- 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße wurden mit geöffneter Verschlussklappe bei 100 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Mit einer Analysen-Feinwaage wurde ihr Leergewicht bestimmt.
- Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die Bakterienhauptkultur wie in 2.4.3.2 beschrieben aus einer Vorkultur beimpft. Die Wachstumskurve wurde dann über 40 h erstellt.
- Probenentnahmen von je 1 ml Kulturlösung ab Zeitpunkt $t = 0$ erfolgten alle 4 h. Alle Proben wurden unter Verwendung abgeschnittener Pipettenspitzen entnommen und in die Eppendorf-Gefäße überführt. Die Proben wurden sofort bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.
- Nach Beendigung der Probenentnahme wurden alle Proben aufgetaut und 30 min bei $20000\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde mit 1 ml Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert.
- Der wässrige Überstand wurde dekantiert. Die Eppendorf-Gefäße wurden mit geöffneten Deckeln bei 100 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.
- Alle Proben wurden gewogen. Die Massendifferenz von dem Gewicht nach der Probenentnahme und dem Leerwert wurde ermittelt. Dadurch wurde das Nettogewicht bestimmt. Für jeden Entnahmezeitpunkt wurde der Mittelwert aus den zwei bestimmten Werten errechnet. Die mittlere Gewichts-differenz wurde gegen die Zeit aufgetragen.

2.4.3.4 Herstellung von Sporensuspensionen (nach Kieser et al., 2000) und Erzeugung von Glycerindauerkulturen

Zur Konservierung der Stämme wurden Sporensuspensionen oder Glycerindauerkulturen angelegt.

Viele Aktinomyceten, insbesondere Streptomyceten, produzieren Sporen, die im Luftmycel als Ketten vorliegen. Um eine Sporensuspension zu etablieren, wurden 1 ml einer Flüssigkultur oder 10-20 µl Sporensuspension auf eine ISP 2-Agarplatte ausplattiert. Die Anzucht erfolgte über 3-6 Tage bei 28 °C bis zur Sporulation.

- Zu einer Platte wurden 9 ml einer sterilen Tween-80-Lösung (0,1%, m/ V) zugegeben und die Sporen mit Hilfe einer Impföse abgekratzt und abgeschwemmt.
- Die Suspension wurde für 1 min kräftig gemischt und durch sterile Watte gefiltert, um Mycelreste abzutrennen.
- Nach dem Zentrifugieren (1000x g, 10 min) und dem sofortigem Abdekantieren des Überstandes wurde der Rückstand in dem zurückgebliebenen Tropfen Flüssigkeit dispergiert. Die Sporen wurden mit 10 ml autoklavierter Glycerol-Lösung (20 % m/ V in Wasser) gewaschen.
- Nach dem erneuten Zentrifugieren (1000x g, 10 min) wurden die pelletierten Sporen in 1 ml Glycerol-Lösung (20 % m/ V in Wasser, autoklaviert) resuspendiert. Die Sporensuspension wurde bei – 20 °C gelagert.

Da die Sporen gegenüber osmotischen Veränderungen unempfindlich sind, konnten Verdünnungen der Sporensuspension direkt in autoklaviertem Reinstwasser vorgenommen werden. Diese ließen sich dann auf Festmedien verteilen. Flüssigmedien wurden mit 0,1 ml Sporensuspension angeimpft (s. 2.4.3.1).

Für die Herstellung von Glycerindauerkulturen wurden die Bakterien in 80 ml Flüssigkultur 1-2 Tage angezogen. Die Zellen wurden sedimentiert (4300x g, 10 min, 4 °C). Die Zellmasse wurde in 15 ml Glycerol-Lösung (Glycerol 15 % m/ V in Wasser) gewaschen, pelletiert und in 10 ml Glycerol-Lösung (15 % m/ V in Wasser) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 1 ml-Aliquots aufgeteilt und bei – 80 °C gelagert. Zur Reaktivierung wurden 50 ml Flüssigmedium mit 0,5 ml Dauerkultur angeimpft.

2.4.4 Erhaltung pflanzlicher Zellsuspensionskulturen

Die in dieser Arbeit untersuchten pflanzlichen Zellkulturen waren bereits im Arbeitskreis etabliert (Pullen, 2000; Meurer, 2002). Zur Erhaltung der pflanzlichen Kalluskulturen wurden

einige Kalluszellen in frisches Festmedium (s. 2.1.6.6) überführt. Inkubiert wurde bei 25 °C unter Kunstlicht (400 Lux).

Für den Erhalt pflanzlicher Suspensionskulturen wurde der Inhalt eines Kultur-Erlenmeyerkolbens alle 8 Tage auf drei mit je 50 ml frischem Flüssigmedium (s. 2.1.6.6) beschickten 300 ml-Erlenmeyerkolben verteilt. Die Anzucht wurde unter gleichen Bedingungen bei 120 rpm geschüttelt (G 10 Schüttler, New Brunswick, New Brunswick, NJ). Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

2.5 Methoden der Molekularbiologie

2.5.1 Isolierung genomischer DNA

2.5.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Aktinomyceten (modifiziert nach *Altenbuchner und Cullum, 1984*)

Die Anzucht der Bakterienkultur wurde nach 2.4.3.1 durchgeführt. Die Zellen einer 20 ml Kultur wurden dann sedimentiert (6000x g, 5 min).

- Die Zellmasse wurde in 5 ml STE-Puffer (s. 2.1.8.1) resuspendiert und 30-45 min bei 37 °C inkubiert. Lysozym baute dabei die Zellwand des Mycels ab und es entstanden Protoplasten.
- Nach dem Zusatz von 2 ml SDS-Lösung (5 %, m/ V) wurde der Ansatz gemischt und 10 min bei 60 °C inkubiert.
- Zur Entfernung von Proteinen und anderen Zellbestandteilen schloss sich die Zugabe von 2 ml Phenol/ Chloroform (pH 8) an. Der Ansatz wurde gemischt, 5 min auf Eis gehalten und zentrifugiert (20000x g, 15 min).
- Nach Überführen des klaren Überstandes in ein neues Röhrchen wurde die DNA durch Zugabe von 0,1 VT Natriumacetat-Lösung (3M, pH 4,8) und 1 VT Isopropanol gefällt. Bei einem trübem Überstand musste die Aufreinigung durch Phenol/ Chloroform wiederholt werden.
- Die ausgefallene DNA wurde mit einer Pipettenspitze aufgespult und in 70 % igem Ethanol (eiskalt) gewaschen.
- Nach vorsichtigem Trocknen im Vakuum bei Raumtemperatur (Speed Vac[®] Plus SC110A, Savant, CA, USA) wurde die DNA in 0,5 – 1,0 ml TE-Puffer (2.1.8.1) oder Wasser gelöst. Die DNA wurde bei –20 °C gelagert.

2.5.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Aktinomycceten im Kleinmaßstab (nach Hopwood, 1985, Procedure 4, „Rapid Small Scale Isolation“)

Bei der folgenden Methode verlaufen die Arbeitsschritte wie unter 2.5.1.1 beschrieben, wobei mit geringeren Mengen gearbeitet wurde. Als Ausgangsmaterial dienten 50 mg Mycel.

- Zu 50 mg Mycel wurde 500 µl STE-Puffer (2.1.8.1) zugegeben. Zur Protoplastenbildung wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.
- Nach dem Zusatz von 250 µl SDS-Lösung (2 %, m/ V) wurde der Ansatz 1 min geschüttelt. 250 µl Phenol/ Chloroform wurden zugefügt. Der Ansatz wurde 30 s gemischt. Zur Proteinabtrennung wurde zentrifugiert (20000x g, 2min). Die Phenolextraktion wurde wiederholt, bis keine Zwischenphase zwischen der oberen wässrigen Phase und der unteren organischen Phase mehr sichtbar war.

Aus der oberen wässrigen Phase wurde die DNA analog 2.5.1.1 ausgefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer (2.1.8.1) aufgenommen.

2.5.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenzellkulturen

Zur Isolierung genomischer DNA aus pflanzlichem Material hat die Firma Qiagen (Hilden) Reagenziensätze für eine vereinfachte Präparation entwickelt. In dieser Arbeit wurde das „DNeasy Plant Maxi Kit“ verwendet. Dieses Verfahren wurde nach Herstellerangaben und –protokoll (s. Anhang) durchgeführt.

Zunächst wurde das pflanzliche Ausgangsmaterial im Mörser fein zerrieben. Nach der Zellyse wurden Proteine und Polysaccharide präzipitiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren abgetrennt. Es folgte die Bindung der DNA an Membranen aus Silicagel. DNA adsorbiert in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze an Silicagel, indem Wasser von den hydratisierten Molekülen entfernt wird. Waschschrirte mit 80 %igem Ethanol entfernten Salze. Genomische DNA wurde mit einem kleinem Volumen Puffer niedriger Ionenstärke oder mit Wasser eluiert.

2.5.2 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA

Die alkalische Lyse nach *Birnboim und Doly (1979)* führt zum Zellaufschluss und setzt DNA frei. Das Verfahren liegt allen nachfolgend beschriebenen DNA-Isolierungen zugrunde. Bei der anschließenden Neutralisation werden denaturierte Proteine sowie chromosomale DNA präzipitiert und abgetrennt. Die gelöste Plasmid-DNA kann dann mit Isopropanol oder mit

eiskaltem Ethanol gefällt werden. Angaben zu verwendeten Puffern und Lösungen finden sich in Tabelle 2.16.

2.5.2.1 Extraktion von Plasmid- und Cosmid-DNA

- 2 ml einer *E. coli*-üN Kultur wurden in einem 2 ml-Eppendorf-Gefäß sedimentiert (4000x g, 5 min). Die Zellen wurden in 300 µl Puffer P1 resuspendiert.
- Zur alkalischen Lyse wurden 300 µl Puffer P2 hinzugefügt und das Gefäß bis zur Klärung des Lysates mehrfach invertiert.
- Nach 3 min erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 300 µl P3. Zur Abtrennung der ausgefallenen Bestandteile wurde zentrifugiert (12000x g, 5 min) und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.
- Der Ansatz wurde mit 0,7 VT Kirby-Mix (2.1.8.1) oder alternativ mit 0,7 VT Chloroform extrahiert. Chloroform wurde verwendet, wenn ein höherer Reinigungsgrad der DNA, insbesondere für Sequenzierreaktionen, erzielt werden sollte. Es wurde gemischt und zentrifugiert (12000x g, 5 min). Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Gefäß transferiert.
- Zu dem Überstand wurden 0,7 VT eiskalter Ethanol zugefügt. Die Plasmid- bzw. Cosmid-DNA wurde durch Zentrifugieren bei 20000x g für 15 min gefällt (alternativ wurde die DNA mit 0,7 VT Isopropanol gefällt, wobei dann im folgenden Waschschrift mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen wurde).
- Die DNA wurde mit 70 %igem Ethanol von Salzresten befreit. Nach vorsichtigem Trocknen im Vakuum (Speed Vac[®] Plus SC110A, Savant, CA, USA) wurde die DNA in 30 µl TE-Puffer (s. 2.1.8.1) oder Wasser gelöst.

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid- bzw. Cosmid-DNA aus *E. coli* wurde ausgehend von einer 50 ml üN-Kultur mit größeren Puffervolumen (je 5 ml) gearbeitet.

Sollte Plasmid-DNA aus Streptomyceten gewonnen werden, wurden diese in 50 ml Kulturen nach 2.4.3.1 angezogen. Nach dem Sedimentieren der Zellen analog dem der *E. coli*-Kulturen wurden 300 µl Zellmasse in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für einen erleichterten Zellaufschluss wurde bei Streptomyceten das Mycel zusätzlich mit Lysozym behandelt. Dazu wurde das Mycel in 300 µl TEGLR-Lösung (s. 2.1.8.1) statt in Puffer P1 resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die weitere Extraktion erfolgte wie bei *E. coli*.

2.5.2.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (s. 2.5.4) von DNA-Restriktionsansätzen wurde das Agarosestück des gewünschten DNA-Fragmentes aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben (s. Anhang). Eluierte DNA wurde nach dem unter 2.5.1.3 beschriebenen Prinzip an Silicagel-Säulchen gebunden. Agarose und Proteinreste wurden in mehreren Waschschritten von der Matrix gewaschen. Dann wurde die DNA mit HPLC-Wasser (Lichrosolv[®]) eluiert.

2.5.3 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA

2.5.3.1 Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen

Sowohl eine Konzentrierung als auch eine Reinigung von DNA wird durch eine Alkoholfällung erreicht. Die Präzipitation der DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte mit Ethanol.

- Eine wässrige DNA-Lösung wurde mit 0,1 VT Natriumacetat-Lösung (3M, pH 5,2) versetzt (zur Fällung sind einwertige Kationen erforderlich) und mit 2 VT Ethanol vermischt.
- Nach dem Invertieren wurde die DNA durch Zentrifugieren (20000x g, 30 min) sedimentiert.
- Um Salze zu entfernen, wurden die Nukleinsäuren mit 70%igem Ethanol (eiskalt) gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert.
- Der Überstand wurde verworfen und Lösungsmittelreste im Vakuum (Speed Vac[®] Plus SC110A, Savant, CA, USA) entfernt.
- Die DNA wurde je nach Bedarf in Wasser oder in TE-Puffer (s. 2.1.8.1) aufgenommen.

2.5.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung von DNA mit hohem Reinheitsgrad erfolgte photometrisch nach geeigneter Verdünnung in Reinstwasser mit einem Uvikon[®]810-Photometer (Kontron, München) bei 260 nm. Ein A_{260} -Wert von 1,0 einer dsDNA-haltigen Lösung entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dsDNA (*Sambrook et al., 2001*).

Die Konzentration einer dsDNA-haltigen Lösung berechnet sich somit wie folgt:

$$[c] = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 [\mu\text{g}/\text{ml}]$$

Reste von RNA oder Phenol (Absorptionsmaxima bei 260 bzw. 280 nm) stören die Bestimmung. Die Nukleinsäurelösung wurde daher auch bei 280 nm vermessen. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} lässt die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Der Wert sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.5.4 Native Agarose-Gelelektrophorese

Im elektrischen Feld können DNA-Moleküle nach ihrer Größe in einer Agarose-Gelmatrix aufgetrennt werden (*Sambrook et al., 2001*). Abhängig von der verwendeten Agarose-Konzentration (meist zwischen 0,6-2 %) lassen sich DNA-Fragmente von 20 kb (bei niedrigeren Gelmatrix-Konzentrationen) bis 0,1 kb (bei höheren Gelmatrix-Konzentrationen) für analytische oder präparative Zwecke trennen.

Agarose wurde in der gewünschten Konzentration in TAE-Puffer (s. 2.1.8.5) suspendiert, in einer Mikrowelle aufgeköcht und gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wurde eine 1%ige Ethidiumbromid-Lösung (5 µl auf 100 ml Agarose-Lösung) zugegeben. Die Agarose-Lösung wurde in einem Gelschlitten mit Taschenformer ausgegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in einer Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer (2.1.8.5) überschichtet und mit den DNA-Lösungen beladen. Die DNA-Lösungen wurden zuvor mit 0,2 VT DNA-Auftragspuffer (6fach konzentriert, s. 2.1.8.5) versetzt. Ein gleichzeitig aufgetragener DNA-Größenstandard diente zur Abschätzung der Molekülgröße der DNA. Die Trennung wurde mit Anlegen einer Spannung (60-120 V) gestartet.

Alternativ konnte statt TAE-Puffer auch TBE-Puffer (2.1.8.5) für die Agarose-Gelmatrix und entsprechend als Elektrophoresepuffer eingesetzt werden. TBE-Puffer wurde insbesondere für die Auftrennung von DNA mit anschließendem DNA-Transfer nach Southern (s. 2.5.13) sowie für die Cosmid-Kartierung (s. 2.5.12.8) angewandt.

Die Elektrophorese wurde beendet, wenn eine ausreichende Trennung der DNA-Moleküle erreicht war. Die Farbstoffe aus dem DNA-Auftragspuffer (2.1.8.5) dienten als Indikator. Bromphenolblau wandert etwa mit der Geschwindigkeit von 300 bp-Fragmenten, Xylencyanol mit der von 4000 bp-Fragmenten. Mit Hilfe eines Transilluminators (Schroma 43, Vetter, Wiesloch) wurde die DNA im UV-Durchlicht sichtbar gemacht (Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, Fluoreszenz bei 302 nm). Zur Dokumentation wurde das Gel mit einer MP4-Kamera (Polaroid, Filmtyp 667) mit Rotfilter fotografiert.

2.5.5 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Saiki et al. (1988) beschrieben eine Methode, die eine schnelle und gezielte Amplifikation von DNA-Fragmenten ermöglicht. Dazu müssen allerdings Teilsequenzen oder flankierende DNA-Abschnitte der zu vermehrenden DNA bekannt sein. Aus diesen Bereichen werden zwei Oligonukleotide abgeleitet, von denen die Amplifikation des DNA-Fragmentes ausgeht. Je nach Wahl der eingesetzten Oligonukleotide können auch neue Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen an den Enden des vermehrten DNA-Fragmentes generiert werden. Das Prinzip der DNA-Amplifizierung besteht aus einer zyklischen Wiederholung dreier temperaturabhängiger Reaktionsschritte.

1. Denaturierung Durch Erhitzen wird die doppelsträngige DNA denaturiert; es entsteht Einzelstrang-DNA.
2. „Annealing“ Die Oligonukleotide lagern sich spezifisch an komplementäre Basenfolgen der (+)- und (-)-Stränge der DNA-Matrize.
3. „Extension“ Thermostabile DNA-Polymerasen füllen, ausgehend von den angelagerten Oligonukleotiden, die Einzelstränge in 5'→3'-Richtung zu Doppelsträngen auf. An die 3'-Enden der Oligonukleotide werden komplementäre Desoxynukleotide angeheftet.

Die Wiederholung der Reaktionsschritte führt zu einer exponentiellen Vermehrung des von den Oligonukleotiden eingeschlossenen DNA-Abschnitts. Allerdings ist mit zunehmender Zyklenzahl davon auszugehen, dass die Effektivität der Reaktion nachlässt.

2.5.5.1 Reaktionsbedingungen der PCR und Auswahl der DNA-Polymerase

Qualität und Quantität der erhaltenen Produkte werden von der verwendeten DNA-Polymerase, den Konzentrationen der einzelnen Reaktionskomponenten und den gewählten Amplifizierungsbedingungen entscheidend beeinflusst.

Abhängig von der Zielsetzung der PCR wurden unterschiedliche DNA-Polymerasen verwendet. Die *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* besitzt eine hohe Prozessivität (Maß für die Anzahl eingebauter Nukleotide, bevor sich das Enzym von der Matrize ablöst) und ergibt daher hohe Produktkonzentrationen. Nachteilig wirkt sich allerdings die hohe Fehlerrate (8×10^{-6} versus $1,3 \times 10^{-6}$ der *Pfu*-Polymerase, *Cline et al., 1996*) aus. Aufgrund der terminalen Desoxynukleotidtransferase-Aktivität (*Costa et al., 1994*) der *Taq*-Polymerase, die einen 3'-Desoxyadenosin-Überhang erzeugt, lässt sich das PCR-Produkt in T-Überhang-

Vektoren klonieren (s. 2.5.7.1). Dieses Enzym wurde standardmäßig für PCR-Amplifikationen eingesetzt.

Wurden Expressionsplasmide erstellt, wurde mit der *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* oder mit der *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* gearbeitet. Beide Enzyme zeichnen sich durch eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität aus, die falsch eingebaute Nukleotide am 3'-Ende entfernt („proofreading activity“, *Lundberg et al., 1991*). Die Prozessivität dieser Enzyme ist vermindert und muss in der Extensionszeit berücksichtigt werden. Die glattendigen PCR-Produkte ließen sich nach 2.5.7.2 in Plasmidvektoren klonieren.

Als DNA-Matrize wurden 10 ng/ µl genomische DNA oder 10 pg/ µl Plasmid- oder Cosmid-DNA verwendet. Es wurde immer der mit der jeweiligen DNA-Polymerase gelieferte Reaktionspuffer eingesetzt. In 10facher Konzentration waren hier die notwendigen Puffersalze und 15 mM Magnesiumchlorid enthalten. Zudem wurde im Reaktionsansatz ggf. weiteres Magnesiumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 3 mM zugefügt, um die Aktivität der DNA-Polymerase zu steigern.

Bei PCR-Reaktionen mit „proofreading activity“-Polymerase wurden dNTPs im Überschuss zugegeben, damit es durch die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität nicht zum Abbau der Oligonukleotide kam.

Für einen Standard-PCR-Ansatz wurden die einzelnen Komponenten (ohne Polymerase) in ein 0,2 ml-Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Nach der ersten Denaturierung der DNA (5 min 97 °C) wurde die Polymerase hinzugefügt, um eine frühzeitige Hitzeinaktivierung des Enzyms zu vermeiden („hot start“).

Standard-PCR-Ansatz:

DNA-Matrize	50 pg-50 ng/50 µl (s. o.)
(+)-Primer, 50µM	0,5 µl
(-)-Primer, 50 µM	0,5 µl
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 25 mM	1 µl
Reaktionspuffer, 10fach konzentriert	5 µl
MgCl ₂ , 25 mM	bis 3 µl
DMSO (nur bei GC-reicher DNA-Matrize)	5 µl
DNA-Polymerase	1-2,5 U
H ₂ O	ad 50 µl

Die Länge des zu vermehrenden PCR-Produktes und die Schmelztemperatur der Oligonukleotide bestimmen die Wahl der Amplifizierungsbedingungen. Die

Schmelztemperatur der Oligonukleotide lässt sich nach der Wallace-Regel (*Sambrook et al., 2001*) ermitteln:

$$[(\text{Anzahl von A+T}) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G+C}) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}]$$

Die „Annealing“-Temperatur wurde so gewählt, dass sie mindestens 5 °C unter der Schmelztemperatur des niedriger schmelzenden Oligonukleotids lag. Optimale Temperaturen lagen zwischen 50-65 °C.

Die Extensionszeit hängt von der verwendeten DNA-Polymerase sowie der erwarteten Größe des Amplifikates ab. Bei *Taq*-Polymerasen geht man von einer Amplifikationsrate von 1 kb/min aus. *Pfu*- und *Pwo*-Polymerase benötigen mindestens 2 min für ein Stück derselben Länge. Die Extension wurde bei GC-reicher DNA bei 74 °C durchgeführt, in allen anderen Fällen bei 72 °C. Die *Taq*-Polymerase adenyliert das PCR-Produkt am 3'-Ende im letzten 10minütigen Extensionsschritt.

2.5.5.2 Amplifikationsprotokoll für GC-reiche DNA

Amplifizierungsprogramm:

1. Schritt		
Denaturierung	97 °C	5 min
„Annealing“	50-65 °C	1,5 min
2. Schritt		
Extension	74 °C	x min (0,5-2,5 min)
Denaturierung	95 °C	0,5 min
„Annealing“	50-65 °C	0,5-1,5 min
(29 Zyklen)		
3. Schritt		
Extension	74 °C	10 min
Kühlung	4 °C	bis zur Probenentnahme

2.5.5.3 Amplifikationsprotokoll für 16S rDNA und die 16S-23S rDNA Spacerregion

Die Amplifizierung der 16S rDNA ist für die Verwendung der Oligonukleotide pA/ pH* optimiert (*Dr. F.A. Rainey, DSMZ, Braunschweig*). Auch bei GC-reichen DNA-Matrizen wurde kein DMSO zugefügt. Es wurde mit *Taq*-Polymerase gearbeitet.

1. Schritt		
Denaturierung	98 °C	3 min

2. Schritt

„Annealing“	52 °C	1 min
Extension	72 °C	2 min
Denaturierung (28 Zyklen)	93 °C	1 min

3. Schritt

„Annealing“	52 °C	1 min
Extension	72 °C	10 min
Kühlung	4 °C	bis zur Probenentnahme

Für die Amplifizierung der 16S-23S rRNA „Genspacer“ wurde ein Oligonukleotid so synthetisiert, dass die konservierte Sequenz am Ende des 16S rRNA-Gens Zielstruktur war. Das zweite Oligonukleotid ist spezifisch für einen konservierten Bereich des beginnenden 23S rRNA-Gens. Die PCR-Bedingungen wurden wie bei *Zhang et al. (1997)* sowie *Wang et al. (1996 a, b)* beschrieben, gewählt.

Protokoll für die 16S-23S rDNA Spacerregion:

Denaturierung	95 °C	40 s
„Annealing“	52 °C	30 s
Extension (25 Zyklen)	72 °C	20 s
Kühlung	4 °C	bis zur Probenentnahme

2.5.5.4 Amplifikationsprotokoll für die Identifizierung von AHBA-Synthasegenen in *Putterlickia verrucosa*-Zellkulturen mit degenerierten Oligonukleotiden

Amplifizierungsprogramm:

1. Schritt

Denaturierung	97 °C	5 min
„Annealing“	38-50 °C	1,5 min

2. Schritt

Extension	72 °C	0,5 min
Denaturierung	95 °C	0,5 min
„Annealing“ (29 Zyklen)	38-50 °C	1,0 min

3. Schritt

Extension	72 °C	10 min
Kühlung	4 °C	bis zur Probenentnahme

2.5.6 Enzymatische Manipulationen an DNA

2.5.6.1 Restriktionsspaltung von DNA

Zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen genutzt. Bei Inkubationsvolumina von 10-20 μ l wurde bis zu 5 μ g DNA mit 1-10 U Enzym (abhängig vom Enzym) geschnitten. Der Ansatz enthielt außerdem 0,1 VT der vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer (10fach konzentriert) und ggf. 0,1 VT BSA (10mg/ ml). Mit Reinstwasser wurde auf das Reaktionsvolumen aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei der für das Enzym angegebenen Temperatur (meist 37 °C) für 1-3 h bei Plasmiden, für 4 h bei Cosmiden und für 8-12 h bei genomischer DNA.

Zur Hydrolyse größerer DNA-Konzentrationen (20-80 μ g) wurden die Reaktionsvolumina proportional erhöht.

Sollten zwei Enzyme in einer Inkubation eingesetzt werden, wurde die Hydrolyse in einem für beide Enzyme geeigneten Puffer (Angabe des Herstellers) durchgeführt. War die Aktivität eines der Enzyme in diesem Puffer zu niedrig, wurde die Reaktion sequentiell durchgeführt. Dabei wurde zunächst mit einem Enzym hydrolysiert, dann die DNA nach 2.5.3.1 gefällt und gereinigt und schließlich mit dem zweiten Enzym gespalten. Analog wurde verfahren, wenn die Temperaturoptima der verwendeten Enzyme zu weit auseinander lagen.

2.5.6.2 Erstellen glatter DNA-Enden durch Auffüllen mit Klenow-Fragment

Die große Untereinheit der *E. coli*-DNA-Polymerase I wird als Klenow-Fragment bezeichnet. Im Gegensatz zum Holoenzym fehlt jedoch die 5'→3' Exonuklease-Aktivität. Die 3'→5' Exonuklease- und die Polymerase-Aktivität bleiben erhalten (*Klenow und Henningsen, 1970*). In Gegenwart von Desoxynukleotiden ist die Exonuklease-Aktivität in Bezug auf doppelsträngige DNA durch die Polymerase-Aktivität inhibiert.

Das Klenow-Fragment wurde eingesetzt, um Einzelstränge von 5' nach 3' aufzufüllen. Durch die 3'→5' Exonuklease-Aktivität eignete sich das Enzym auch zur Entfernung von 3'-Überhängen. Somit konnten nach Restriktionen, bei denen ein Überhang entstanden war, glatte DNA-Enden erzeugt werden.

Reaktionsansatz:

DNA-Lösung

0,1 VT Klenow-Reaktionspuffer, 10fach konzentriert

dNTP-Mix (Endkonzentration 0,05 mM)

5 U Klenow-Fragment

Der Ansatz wurde 20 min bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von EDTA (10 mM Endkonzentration) und Erhitzen (75 °C, 20 min) wurde die Reaktion abgestoppt. Zur Reinigung wurde der Reaktionsansatz über ein Agarosegel aufgetrennt (s. 2.5.4) und die DNA aus dem Gel extrahiert (s. 2.5.2.2).

2.5.6.3 Dephosphorylierung von DNA

Bei linearisierten Vektoren mit komplementären Enden wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen entfernt, um eine intramolekulare Ligation (Religation) zu verhindern. Vektor-DNA wurde dazu mit alkalischer Phosphatase aus Garnelen („Shrimp Alkaline Phosphatase“, SAP) behandelt. Vektor-DNA-Lösung wurde mit 1 U SAP und 0,1 VT SAP-Reaktionspuffer (10fach konzentriert) versetzt und 3 h bei 37 °C dephosphoryliert. Das Enzym wurde dann durch Hitze (20 min, 65 °C) inaktiviert und die DNA durch eine Alkoholfällung (s. 2.5.3.1) gereinigt.

2.5.6.4 Addition von A'-Überhängen

Aufgrund der terminalen Desoxynukleotidtransferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase (*Costa et al., 1994*) lässt sich ein 3'-Desoxyadenosin(dA)-Überhang an einem glattendigen DNA-Fragment mit Hilfe der *Taq*-Polymerase erzeugen. Die Methode wurde verwendet, um glattendige PCR-Produkte der *Pfu*- bzw. *Pwo*-DNA-Polymerase in T-Überhang-Vektoren zu klonieren (s. 2.5.7). Das im Agarosegel gereinigte und anschließend extrahierte Produkt (s. 2.5.2.2) wurde direkt für die Reaktion eingesetzt.

Reaktionsansatz:

30 µl DNA-Lösung
0,5 µl dATP, 25 mM
4 µl 10x Reaktionspuffer der *Taq*-Polymerase
1 U *Taq*-DNA-Polymerase
3,5 µl H₂O

Der Ansatz wurde 10 min bei 72 °C inkubiert und auf Eis gekühlt. Es folgte die Klonierung in einen T-Überhang-Vektor mit Hilfe des „TOPO TA Cloning[®] Kits“ (s. 2.5.7.2).

2.5.6.5 Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase

T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung eines Phosphodiesters zwischen gegenüberliegenden 5'-Phosphat und 3'-Hydroxylenden. Diese Reaktion findet unter ATP-Verbrauch statt. Um Religationen möglichst auszuschließen, wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu inserierender DNA (Insert) von 1:3 gewählt. Die benötigte Menge an Insert wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{ng Insert} = [(\text{ng Vektor} \times \text{Größe des Inserts in kb}) / (\text{Größe des Vektors in kb})] \times 3$$

Wurden für die Ligation Vektoren mit glatten Enden oder mit komplementären kohäsiven Enden eingesetzt, musste die Vektor-DNA vor der Ligation dephosphoryliert werden (s. 2.5.6.3).

Reaktionsansatz für die Ligation kohäsiver Enden:

80 ng Vektor-DNA
zu inserierende DNA (Konzentration s. o.)
0,1 VT 10x Reaktionspuffer
ATP (1 mM Endkonzentration)
PEG 4000 (5 % Endkonzentration)
2 U T4-DNA-Ligase
Reinstwasser ad 20 µl

Die Ligation glatter Enden erfordert höhere T4-Ligase-Konzentrationen. Abweichend wurde daher mit 4 U T4-DNA-Ligase und mit einer Polyethylenglycol-Endkonzentration von 10 % gearbeitet. Die Ligation konnte entweder 16 h bei 16 °C oder 3 h bei 22 °C inkubiert werden. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Reinigung zur Transformation (s. 2.5.8, 2.5.9 und 2.5.11) eingesetzt.

2.5.7 Klonierung von PCR-Fragmenten in T-Überhangvektoren

2.5.7.1 Klonierung von 3'-adenylierten PCR-Fragmenten

Die Polymerasekettenreaktion mit *Taq*-Polymerase (s. 2.5.5) führt zur Bildung von 3'-Desoxyadenosin-(dA)-Einzelstrang-Überhängen am PCR-Produkt. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um das PCR-Produkt in einen T-Überhangvektor zu ligieren. Als Vektoren mit Einzel-3'-Thymidin-(T)-Überhang standen der Vektor pGem[®]-T-Easy (Tab. 2.3) und der pBlueT-Vektor (2.5.7.3) zur Verfügung.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch getrennt (s. 2.5.4) und aus dem Agarosegel extrahiert (2.5.2.2), um dann in Ligationen verwendet zu werden.

Für die Ligation in den Vektor pGem[®]-T-Easy wurde der kommerziell erhältliche Reagensatz „pGem[®]-T-Easy Vektor System“ (s. Tab.2.3) eingesetzt. Es wurde nach Angaben des Herstellers folgender Ansatz pipettiert:

2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl	
pGem [®] -T-Easy Vektor (50 ng)	1 µl	
PCR-Produkt	x µl	(mit einem molaren Verhältnis von 1:1 bzw. 1:3 von Vektor zu Insert)
T4 DNA Ligase (3 Weiss Units/ µl)	1 µl	
Reinstwasser	ad	10 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Kompetente Zellen (s. 2.5.8.1) wurden mit den rekombinanten Plasmiden transformiert (s. 2.5.8.3). Aus den erhaltenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. 2.5.2.1) und durch Restriktionsspaltung mit EcoRI (s. 2.5.6.1) kontrolliert. Der Vektor besitzt zwei EcoRI-Schnittstellen, die die Klonierungsstelle flankieren.

Die Ligation des 3'-adenylierten PCR-Produktes in den pBlueT-Vektor (2.5.7.3) wurde nach 2.5.6.5 durchgeführt. Nach der Transformation kompetenter Zellen mit den rekombinanten Plasmiden wurden die erhaltenen Kolonien wie beschrieben analysiert (s. 2.5.8.3).

2.5.7.2 Klonierung glattendiger PCR-Produkte

Glattendige PCR-Produkte der *Pfu*-DNA-Polymerase bzw. *Pwo*-DNA-Polymerase wurden zunächst nach 2.5.6.4 am 3'-Ende adenyliert. Die adenylierten Produkte wurden mit Hilfe des „TOPO TA Cloning[®] Kits“ (Invitrogen, Leek, NL) in den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor ligiert. Der Vektor besitzt einen Thymidin-Überhang. Zusätzlich ist die Topoisomerase I aus dem *Vaccina*-Virus kovalent an den linearisierten Vektor gebunden und ermöglicht die schnelle Ligation mit 3'-adenylierter DNA (*Shuman, 1994*).

4,5 µl aus einem Ansatz nach 2.5.6.4 wurden mit 0,5 µl TOPO[®]-Vektor vermischt, 5 min bei 22 °C inkubiert und dann gekühlt. Es schloss sich eine Transformation von *E. coli* (2.5.8) an.

2.5.7.3 Erzeugung eines T-Überhangvektors

Durch Hydrolyse des pBluescript[®] II KS(-)-Vektors und Einfügen von 3'-Thymidin-(T)-Überhängen an die Enden des linearisierten Vektors konnte ein Vektor erstellt werden, der sich für die Klonierung 3'-adenylierter Produkte (s. 2.5.7.1) eignet.

- 10 µg des pBluescript[®] II KS(-)-Vektors wurden mit 20 U EcoRV, 0,1 VT Reaktionspuffer (10fach konzentriert) sowie 10 µg BSA in einem 100 µl-Ansatz 12-16 h (üN) bei 37 °C inkubiert.
- Der linearisierte Vektor wurde durch Zugabe von 10 µl NaCl (2M) und 250 µl Ethanol über 10 min bei – 20 °C gefällt. Die Nukleinsäure wurde zentrifugiert (20000x g, 20 min), im Vakuum getrocknet und in 90 µl Wasser resuspendiert.
- Zur Kontrolle der Hydrolyse wurden 5 µl DNA-Lösung im Agarosegel aufgetrennt (s. 2.5.4). Als Vergleich diente ungeschnittene Vektor-DNA.
- Zur Addition der T'-Überhänge wurden 85 µl DNA-Lösung mit 2 µl dTT (100 µM), 0,1 VT 10x Taq-Reaktionspuffer und 6 U Taq-DNA-Polymerase in einem Endvolumen von 100 µl gemischt. Es wurde 2 h bei 70 °C inkubiert.
- Der Ansatz wurde mit 1 VT Kirby-Mix (s. 2.1.8.1) ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (15000x g, 5 min). Aus der oberen Phase wurde die DNA durch Zugabe von 0,1 VT Natriumchlorid-Lösung (2M) und 2,5 VT Ethanol präzipitiert (20000x g, 20 min).
- Die DNA wurde getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer (2.1.8.1) resuspendiert.

2.5.8 Transformation von *Escherichia coli* mit DNA mittels Hitzeschock

Die Transformation bezeichnet die Übertragung von freier, gelöster DNA in eine Empfängerzelle. Es wurden zwei Verfahren angewendet, um *E. coli*-Zellen chemisch transformationskompetent zu machen.

2.5.8.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der Methode nach Inoue et al. (1990)

Die folgende Methode wurde standardmäßig zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet, da im Vergleich zu Calciumchloridmethoden eine hohe Transformationseffizienz von ca. 10⁸ Klonen/ µg DNA erzielt wurde.

Alle Zentrifugationen erfolgten 10 min bei 4000x g und 4 °C. Die verwendeten Lösungen und Gefäße wurden vorgekühlt. TB-Puffer wurde frisch zubereitet (s. 2.1.8.2) und vor Gebrauch 10 min auf Eis gehalten.

- 50 ml LB-Medium, ggf. zur Selektion mit entsprechendem Antibiotikazusatz, wurden mit 500 µl einer üN-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 24 °C und 180 rpm (HT Schüttler, Infors, Bottmingen, CH) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–0,7 angezogen.
- Die Bakteriensuspension wurde anschließend mindestens 10 min auf Eis gelagert und dann durch Zentrifugieren pelletiert. Nach dem Abdekantieren des Mediums wurde das

Zellsediment vorsichtig in 40 ml TB-Puffer aufgenommen, erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

- Die Zellen wurden vorsichtig in 10 ml TB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,76 ml DMSO wurden sie in 200 µl Portionen bei – 80 °C aufbewahrt.
- Sollte die Transformation direkt im Anschluss durchgeführt werden, konnten die Zellen sofort eingesetzt werden, ohne sie bei – 80 °C einzufrieren. Andernfalls wurde ein Aliquot der Zellsuspension aufgetaut. Die Hitzeschock-Transformation wurde sofort nach 2.5.8.3 durchgeführt.

2.5.8.2 Rubidiumchlorid-Methode

Bei der hier beschriebenen Methode handelt es sich um ein modifiziertes Protokoll nach *Hanahan (1985)*. Zentrifugiert wurde stets 5 min bei 4500x g und 4 °C. Lösungen und Reaktionsgefäße wurden auf Eis gekühlt.

- 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ wurden im Verhältnis 1:100 mit einer üN-Kultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes inokuliert (entspricht einer Zugabe von 2,5 ml üN-Kultur). Die Zellen wurden in einem 1 l-Kolben bis zur OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 bei 37 °C und 180 rpm (HT Schüttler, Infors, Bottmingen, CH) kultiviert.
- Nach dem Sedimentieren der Zellen wurde das Zellsediment in eiskaltem TFB1-Puffer (0,4 VT des ursprünglichen Kulturvolumens) resuspendiert und 5 min auf Eis gehalten.
- Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer aufgenommen und auf Eis 15–60 min inkubiert. Aliquots von 200 µl wurden in Isopropanol (– 80 °C) schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

2.5.8.3 Hitzeschock-Transformation und „Blau-Weiß“-Selektion

Für die Transformation wurden 200 µl frische oder auf Eis aufgetaute kompetente Zellen (Herstellung nach 2.5.8.1 oder 2.5.8.2) mit 0,1-1µg Plasmid-DNA, 1µg Cosmid-DNA oder 2 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt und 20 min auf Eis inkubiert.

- Es folgte eine Hitzeschockbehandlung bei 42 °C. Hier wurde der Ansatz exakt 90 s im Wasserbad inkubiert und sofort 2 min auf Eis gekühlt. Abweichend davon wurden die Ansätze mit den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS (s. Tabelle 2.24) genau 30 s bei 42 °C gehalten.

- Zur Regeneration wurden 900 µl steriles LB-Medium zugefügt und die transformierten Zellen 1 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Hierbei erfolgte die Expression der vektorvermittelten Antibiotikaresistenz, die der Selektion transformierter Zellen dient.
- Nach dem Sedimentieren der Zellen (1700x g, 5 min) wurde der Überstand bis auf ca. 100-200 µl verworfen. Die Zellen wurden im restlichen Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz und ggf. IPTG- und X-Gal-Lösung zur Blau-Weiß-Selektion (s. u.) ausplattiert. Die Platten wurden üN bei 37 °C bebrütet.
- Alternativ wurden vor dem Zentrifugieren 200 µl des Ansatzes entnommen und direkt auf entsprechende LB-Agarplatten ausgestrichen, um eine zu hohe Koloniedichte zu vermeiden. Dies war insbesondere der Fall, wenn eine hohe Transformationseffizienz erwartet wurde (z.B. bei der Transformation von Leerplasmiden).

Die Verwendung von Klonierungsvektoren, die das lacZ-Gen enthielten, ließ eine „Blau-Weiß“-Selektion der entstandenen Transformanten (Klone) zu. Das lacZ-Gen ermöglicht die α -Komplementation der β -Galactosidase, so dass transformierte Zellen nach Induktion mit IPTG zugesetztes 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) spalten. Dadurch nehmen die Zellen die blaue Farbe des Abbauproduktes an. Erfolgreiches Inserieren von Fragmenten in den jeweiligen Klonierungsvektor unterbricht die kodierende Sequenz des lacZ-Gens. Rekombinante Klone konnten anhand ihrer weißen Farbe identifiziert werden. Kolonien mit β -Galactosidase-Aktivität wachsen, verglichen mit Zellen ohne diese Aktivität, langsamer. Daher ist es möglich, dass nach üN Inkubation bei 37 °C blaue Kolonien etwas kleiner als weiße erscheinen.

- Für die „Blau-Weiß“-Selektion wurden LB-Agarplatten mit 40 µl X-Gal-Lösung (s. 2.1.8.2) und 10 µl IPTG-Lösung (s. 2.1.8.2) bestrichen. Die Transformationsansätze wurden wie oben beschrieben ausgestrichen und bebrütet.

Mit Hilfe dieser Methode kann zwar prinzipiell auf eine positive Insertion getestet werden, doch eine Aussage über die Identität der Fragmente kann nicht getroffen werden. Daher wurde die Plasmid-DNA aus positiven Klonen isoliert (s. 2.5.2.1) und die Identität der Insertion mittels Restriktionsspaltung (s. 2.5.6.1), PCR (2.5.5) oder Southern Hybridisierung (2.5.13) kontrolliert. Eine genaue Aussage lieferte auch die Sequenzierung (s. 2.5.14).

2.5.9 Elektroporation-vermittelte Transformation von *Escherichia coli*

Die Fähigkeit zur Aufnahme von DNA ist bei der Elektroporation-vermittelten Transformation sehr hoch (Transformationsrate von $10^9 - 10^{10}$ Zellen/ µg DNA). Plasmide

mit einer Größe von mehr als 30 kb (vor allem Cosmide) wurden durch die effiziente Elektroporationsmethode in die Zellen eingebracht. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Potentialdifferenz der Zellmembran für einige Millisekunden aufgehoben. Dabei entstehen kurzfristig Poren in der Membran, die eine DNA-Aufnahme ermöglichen.

2.5.9.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation

- 1 l LB-Medium wurden mit einer μ N-Kultur des jeweiligen Stammes im Verhältnis 1:1000 inokuliert und die Zellen bei 37 °C und 200 rpm (HT Schüttler, Infors, Bottmingen, CH) bis zu einer OD_{600} von 0,7 angezogen.
- Die Zellen wurden geerntet (7000x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und 500 ml eiskalte Glycerol-Lösung (s. 2.1.8.2) zur Zellmasse zugefügt. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert.
- Die Bakteriensuspension wurde erneut zentrifugiert (7000x g, 5 min, 4 °C). Das Zellsediment wurde weitere zweimal mit Glycerol-Lösung (2.1.8.2) gewaschen und pelletiert.
- Nach Zufügen von 2 ml GYT-Puffer (2.1.8.2) wurden Aliquots von 50 μ l abgefüllt und bei – 80 °C gelagert.

2.5.9.2 Elektroporation

Die Elektroporation wurde mit Hilfe der MicroPulserTM-Elektroporations-Apparatur (Bio-Rad Laboratories, Cell) unter Verwendung von Elektroporationsküvetten (Gene Pulser Cuvettes, 0,2 cm) durchgeführt.

- 50 μ l der elektrokompenten Zellen (s. 2.5.9.1) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-2 μ l DNA-Lösung (zur Verringerung der Leitfähigkeit in Reinstwasser gelöst) gemischt. Der Ansatz wurde 1 min auf Eis inkubiert.
- Die Suspension wurde dann in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde nach den Angaben des Herstellers im Elektroporator platziert und ein Puls (Programm Ec2, Spannung 2,5 kV) ausgelöst.
- In die Küvette wurde umgehend 1 ml LB-Medium gegeben. Die Zeit zwischen dem elektrischen Puls und dem Transfer der Zellen in entsprechendes Medium ist entscheidend für die Regeneration der Zellen (*Dower et al., 1988*). Eine Verlängerung dieser Spanne führt zum drastischen Abfall der Transformationseffizienz.
- Die Zellsuspension wurde 1h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert (1700x g, 5 min). Der Überstand wurde bis auf ca. 200 μ l dekantiert.

- Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit Zusätzen der entsprechenden Antibiotika und ggf. IPTG und X-Gal (s. a. 2.5.8.2) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden im Brutschrank (37 °C) bebrütet.

2.5.10 Protoplastierung von Streptomycceten

Die Protoplastierung von Streptomycceten diente in dieser Arbeit der Transformation von *Streptomycces lividans* mit Plasmid-DNA (s. 2.5.11). Die Technik der hier beschriebenen Methode basiert auf der Arbeit von *Okanishi et al. (1974.)* Durch die Arbeiten von *Bibb et al. (1978)* und *Thompson et al. (1982)* wurde die Methode weiter optimiert. Für *Streptomycces lividans* lassen sich optimale Transformationsraten erzielen, wenn die Protoplasten aus Mycel erzeugt werden, das bis zur späten exponentiellen Phase (36-40 h) gewachsen ist (*Kieser et al., 2000*).

- Zu 25 ml YEME-Medium (s. 2.1.6.2) wurden 0,1 ml Sporensuspension (s. 2.4.3.4) des zu protoplastierenden Stammes gegeben und für 36-40 h bei 30 °C und 150 rpm angezogen. Die Kultur wurde dann auf Kontaminationen mikroskopisch untersucht und anschließend zentrifugiert (1000x g, 10 min). Der Überstand wurde verworfen.
- Das Sediment wurde in 15 ml Saccharose-Lösung (10,3 % m/ V in Wasser) resuspendiert und erneut zentrifugiert (1000x g, 10 min). Dieser Schritt wurde wiederholt.
- Zum Mycel wurden 4 ml Lysozym-Lösung (s. 2.1.8.3) zugefügt. Es wurde 15-60 min bei 30 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurde im Abstand von 15 min die Bildung von Protoplasten unter dem Phasenkontrastmikroskop verfolgt.
- Nach deutlicher Protoplastierung wurde die Suspension dreimal in einer 5 ml-Pipette aufgezogen und 15 min inkubiert (30 °C). Nach Zugabe von 5 ml P-Puffer (s. 2.1.8.3) wurde erneut mit der Pipette durchmischt und nochmals 15 min bei 30 °C inkubiert. Dadurch sollte eine Trennung der Protoplasten vom Mycel erreicht werden.
- Zur Abtrennung von Mycelresten wurde der Ansatz durch sterile Watte filtriert. Die Protoplasten wurden pelletiert (1000x g, 7 min). Nach dem Dekantieren des Überstandes folgte die vorsichtige Suspendierung der Protoplasten in 1 ml P-Puffer (s. 2.1.8.3).
- Die Protoplasten konnten in einem Eisbad bei –80 °C eingefroren und bei –80 °C gelagert werden oder direkt für die Transformation nach 2.5.11 eingesetzt werden.

2.5.11 Transformation von Streptomycceten

Plasmid-DNA lässt sich nach der Methode von *Bibb et al., 1978* und *Thompson et al., 1982* mittels Polyethylenglykol in Streptomycceten-Protoplasten einbringen.

Zunächst wurden die nach 2.5.10 erstellten Protoplasten nach einer 1:10 Verdünnung in P-Puffer (s. 2.1.8.3) in einer Thoma-Zählkammer gezählt. Die Zahl der Protoplasten pro ml berechnet sich bei einer Kammertiefe von 0,02 mm wie folgt:

Protoplasten pro ml = Anzahl der Protoplasten im kleinsten Quadrat $\times 2 \times 10^7$

- Aliquots von 4×10^9 Protoplasten wurden sedimentiert (700x g, 7 min) und nach dem Dekantieren des Puffers im zurückbleibenden Tropfen (ca. 50 μ l) vorsichtig resuspendiert.
- Zu der Suspension wurde 1-10 μ g DNA in einem Volumen von maximal 20 μ l zugegeben und unmittelbar 0,5 ml Transformationspuffer (s. 2.1.8.3) zugefügt. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt.
- 3 min nach Zugabe des Transformationspuffers wurde der Ansatz mit 5 ml P-Puffer (2.1.8.3) versetzt und zentrifugiert (700x g, 7 min).
- Nach Abgießen des Überstandes wurden die transformierten Protoplasten in 1 ml P-Puffer verdünnt und resuspendiert. Unterschiedlichen Verdünnungen der Protoplasten wurden auf R2YE bzw. R5-Agarplatten (s. 2.1.6.3) ausgestrichen. Zur Regeneration erfolgte eine Bebrütung für 14-20 h bei 28 °C. Anschließend wurden die Platten zur Selektion der rekombinanten Bakterien mit 2 ml Antibiotika-haltiger wässriger Lösung überschichtet. Dabei sollte eine Endkonzentration von 200 μ g Thiostrepton oder von 4000 μ g Kanamycin pro Platte erreicht werden.
- Nach 3-5 Tagen weiterer Bebrütung bei 28 °C wurden Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt und auf ISP 2-Agarplatten (2.1.6.2) mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen.

Die Überprüfung der Insertion erfolgte durch Restriktionsanalysen (2.5.6.1) der gewonnenen Plasmid-DNA (nach 2.5.2.1) oder per PCR (s. 2.5.5).

2.5.12 Herstellung und Analyse einer Cosmid-Bank

Rekombinante DNA-Bibliotheken werden u. a. dazu verwendet, so genannte „single-copy“ Gene aus einem komplexen Genom zu isolieren. Bei der Herstellung einer Cosmid-Bibliothek wird die gesamte genomische DNA in Fragmente von 35-50 kb aufgespalten, die dann in Cosmid-Vektoren kloniert werden.

Cosmid-Vektoren sind Hybride von Plasmidvektoren und λ -Phagen. Sie besitzen den Replikationsursprung für *E. coli* und ein Antibiotikaresistenzgen wie Plasmide sowie *cos*-Regionen aus λ -Phagen-DNA. Cosmide vereinigen die Vorteile der Plasmid-Klonierung bzgl.

einfacher technischer Handhabung mit Vorteilen der Phagen-Vektoren (Einbau langer DNA-Stücke).

2.5.12.1 Vorbereitung genomischer DNA durch partielle Hydrolyse

Genomische DNA von *K. putterlickiae* F18-98 (isoliert nach 2.5.1.1) wurde partiell hydrolysiert, um Fragmentgrößen von 35-50 kb zu erhalten. Das Restriktionsenzym Sau3AI mit der Nukleotiderkennungssequenz GATC schneidet genomische DNA in hoher Frequenz und wurde daher in vier verschiedenen Ansätzen für 5, 15, 30 und 45 s bei 37 °C mit DNA inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 20 min.

Ansatz für die partielle Hydrolyse:

- 40 µl genomische DNA (Konzentration 1 µg/ µl)
- 10 µl Sau3AI-Reaktionspuffer (10fach konzentriert)
- 4 U Sau3AI
- Wasser ad 100 µl

Zur Kontrolle der Restriktion wurden 10 µl jedes Ansatzes sowie nicht hydrolysierte DNA im Agarosegel (0,5%iges Gel, 50V) nach 2.5.4 aufgetrennt. Diejenigen Ansätze, bei denen die DNA-Fragmentgrößen zwischen 30-50 kb lagen, wurden für die Cosmid-Klonierung ausgewählt. Die DNA dieser Ansätze wurde dann ohne weitere Aufreinigung dephosphoryliert (s. 2.5.6.3). Abweichend wurde 1µl Phosphatase eingesetzt und 2h bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde durch Hitze inaktiviert. Die dephosphorylierten DNA wurde direkt für die Ligation (s. 2.5.12.3) eingesetzt.

2.5.12.2 Der Cosmid-Vektor pOJ446

Durch Restriktionsspaltung mit HpaI kann der Cosmid-Vektor pOJ446 (*Bierman et al., 1992*) so gespalten werden, dass zwei *cos*-Stellen des Vektors räumlich voneinander getrennt vorlagen. Über diese *cos*-Sequenzen aus λ-Phagen erfolgt später die Zirkularisierung der Cosmide bei der Verpackung in Phagenköpfe (s. a. *Rao et al., 1987*).

In einem ersten Restriktionsansatz wurden 20 µg Vektor-DNA (präpariert nach 2.5.2.1) mit 5 U HpaI für 4 h bei 37°C behandelt (s. 2.5.6.1). Für eine vollständige Hydrolyse wurde der gesamte Ansatz erneut mit 10 U HpaI für weitere 3h bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde nach 2.5.6.3 dephosphoryliert und die Phosphatase in der Hitze inaktiviert. Die DNA wurde durch eine Phenol/ Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Isopropanol ausgefällt (s. 2.5.3.1) und in 160µl TE-Puffer (s. 2.1.8.1) gelöst.

Der linearisierte Vektor wurde zusätzlich mit BamHI hydrolysiert. In die so entstandenen Vektorarme konnte später die mit Sau3AI geschnittene genomische DNA ligiert werden, da es sich bei Sau3AI und BamHI um kompatible Schnittstellen handelt. Die gesamte Vektor-DNA (160µl) wurde mit 400 U BamHI versetzt und nach 2.5.6.1 4 h bei 37 °C hydrolysiert. Es folgte eine Aufreinigung mit Phenol/ Chloroform. Aus der wässrigen Phase (ca. 200µl) wurden 3 µl entnommen und auf das Vorkommen von zwei unterschiedlich großen Vektor-DNA-Fragmenten (2 und 8 kb) gelelektrophoretisch (s. 2.5.4) hin untersucht (s. a. 3.4.1.1).

2.5.12.3 Ligation

Die mit Sau3AI partial hydrolysierte genomische DNA wurde mit den dazu kompatiblen BamHI-Enden des pOJ446 Vektors verknüpft. Zur Reinigung der restringierten genomischen DNA und der Vektor-DNA wurden diese in einem für die Ligation passenden Verhältnis kopräzipitiert.

Mit Sau3AI partiell hydrolysierte, dephosphorylierte genomische DNA (s. 2.5.12.1) wurde mit der wässrigen Endphase (nach Phenol/ Chloroform-Extraktion s. 2.5.12.2) des restringierten Cosmid-Vektors im Verhältnis 2,8:1 gemischt und mit Isopropanol gefällt (2.5.3.1). Die kopräzipitierte DNA (chromosomale DNA mit Vektor-DNA) wurde in 18 µl Wasser aufgenommen. Der Ansatz wurde 4 h bei 4 °C gehalten.

Ligationsansatz:

- 16 µl „Kombinations-DNA“
- 2 µl T4-DNA-Ligasepuffer (10fach konzentriert)
- 2 µl T4-DNA-Ligase (NEB)

Der Ligation erfolgte 16h bei 16°C.

2.5.12.4 In-vitro-Verpackung rekombinanter Cosmide

Für die Transfektion wird ligierte DNA in vitro in infektiöse Phagenköpfe verpackt. Dabei macht man sich die Eigenschaften lytischer Phagen zunutze. Im lytischen Zyklus von λ-Phagen liegen hunderte von DNA-Kopien als fortlaufend lange Kette, so genannte Concatemere, vor. Jede Kopie ist dabei mit der nächsten über *cos*-Stellen verknüpft. λ-Verpackungsenzyme zerlegen diese Concatemere, indem sie zwei *cos*-Stellen im Abstand von ca. 45 kb erkennen und diese Einheit schneiden. Die Phagenpartikel enthalten somit linearisierte, mit einzelsträngigen komplementären DNA-Abschnitten, den *cos*-Sequenzen, endende Moleküle.

Zur Verpackung der Cosmide wurde der Verpackungsextrakt („Gigapack[®] III Gold Packaging Extract“) der Firma Stratagene (Amsterdam, NL) verwendet. Neben λ -Verpackungsproteinen sind in diesem auch Vorstufen von λ -Phagenköpfen enthalten. Die genaue Zusammensetzung des „Gigapack[®] III Gold Packaging Extracts“ wird vom Hersteller nicht angegeben.

Der Verpackungsextrakt wurde über Handwärme angetaut. Möglichst ohne Luftblasen zu erzeugen wurden dann 4 μ l des Ligationsansatzes (s. 2.5.12.3) hinzugegeben und mit der Pipettenspitze vorsichtig durchmischt. Der Ansatz wurde genau 2 h bei RT inkubiert (längere Inkubationszeiten senken die Verpackungseffizienz drastisch).

Nach Zugabe von 500 μ l SM-Puffer (s. 2.1.8.2) und 20 μ l Chloroform wurde erneut gemischt und kurz zentrifugiert (6000x g, 2 min). Bis zur Weiterverarbeitung konnte der Überstand bei 4°C als verpackte Cosmid-Bank gelagert werden.

2.5.12.5 Titerbestimmung der Cosmid-Bank

Zur Konzentrationsbestimmung der Cosmid-Bank wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRF⁺ Kan mit definierten Mengen der verpackten Cosmide (s. 2.5.12.4) infiziert. Der Titer der Cosmid-Bank (in „colony forming units“, cfu) gibt an, wieviele rekombinante Bakterienkolonien pro μ l verpackter Cosmid-Bank erzeugt werden können.

- Mit einer Einzelkolonie von *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ Kan wurden 50 ml LB-Medium (mit 10 mM MgSO₄, 0,2% (m/V) Maltose und 60 μ g/ml Kan) angeimpft und üN bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt.
- Die Kultur wurde zentrifugiert (500x g, 10 min, 4 °C) und das Medium dekantiert. Die Zellen wurden in 5 ml steriler MgSO₄-Lösung (10 mM) aufgenommen und anschließend mit 10 mM MgSO₄-Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt.
- Die verpackte Cosmid-Bank (s. 2.5.12.4) wurde mit SM-Puffer je 1:10 und 1:50 verdünnt. Je 25 μ l dieser Verdünnungen wurden mit je 25 μ l der hergestellten *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ Kan-Zellsuspension (OD₆₀₀ von 0,5) vermischt und 30 min bei RT inkubiert.
- Nach Hinzufügen von 200 μ l LB-Medium wurde zur Expression der Cosmid-Vektor-kodierten Apramycin-Resistenz 1h bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln im Wasserbad inkubiert.
- Die infizierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit je 100 μ g/ml Apramycin ausplattiert und üN bei 37 °C im Brutschrank angezogen.

Durch Auszählen der Kolonien konnte der Titer, angegeben als cfu-Wert, errechnet werden. 25 μ l der 1:10 Verdünnung ergaben im Durchschnitt 65,5 Klone. Der Titer lag also bei 26 Kolonien pro μ l der unverdünnten verpackten Cosmid-Bank.

2.5.12.6 Amplifikation der Cosmid-Bank

Die in Phagenköpfe verpackten linearen Cosmide werden nach Infektion von *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ Kan in der Zelle über die *cos*-Sequenzen zirkularisiert und wie ein Plasmid repliziert. Aus den Cosmid-Klonen kann die Cosmid-DNA isoliert werden.

Ist die Größe des gesamten bakteriellen Genoms bekannt, kann berechnet werden, wie viele Klone erzeugt werden müssen, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % ein einzelnes Gen in der Genbank zu detektieren. Die Berechnung (*Knippers, 1997*) erfolgt nach der Formel:

$$\text{Anzahl der Cosmid-Klone } N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

P = Wahrscheinlichkeit, mit der ein DNA-Fragment in der Bibliothek vorkommt

f = Verhältnis der durchschnittlichen Größe der eingebauten DNA zur Größe des Gesamtgenoms

Für Aktinomyceten wird eine Genomgröße von ca. 8 Mb angenommen. Mit einer Wahrscheinlichkeit von P = 0,999 und f = 50 kb/ 8000 kb = 0,00625 ergibt sich für N eine Anzahl von 1101,8 Cosmid-Klonen. Um ein Gen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in der erstellten Cosmid-Bank zu finden, sollten 3000 Cosmid-Kolonien amplifiziert werden.

- Die verpackte Cosmid-Bank (s. 2.5.12.4) wurde mit SM-Puffer 1:10 verdünnt. Je 40 µl dieser Verdünnung ergaben einen Ansatz mit ca. 100 cfu (s. 2.5.12.5). 30 Ansätze (mit je 100 cfu) wurden jeweils mit 40 µl einer Zellsuspension von *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ Kan (nach 2.5.12.5 hergestellt) gemischt. Die Ansätze wurden 30 min bei RT inkubiert.
- Nach Zugabe von je 4 VT LB-Medium wurden die Ansätze 1 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Die einzelnen Kulturen wurden dann auf Apramycin-haltige LB-Agarplatten ausplattiert und üN bei 37°C im Brutschrank angezogen.
- Die einzelnen Cosmid-Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in Mikrotiterplatten überführt, deren Bohrungen jeweils 150µl LB-Apramycin-Medium enthielten. Die Kolonien wurden bei 37 °C üN in den Mikrotiterplatten inokuliert.
- Von den Mikrotiterplatten wurden die Kulturen mit einem sterilen Metallstempel auf je zwei Sätze LB-Apramycin-Agarplatten übertragen (48 Kolonien pro Stempelvorgang auf eine Platte). Dabei enthielt der eine Satz LB-Apramycin-Agarplatten eine Nylonmembran (Biodyne Plus, s. Tab. 2.2), auf die die Bakterienkolonie transferiert wurde. Die Agarplatten wurden erneut üN bei 37 °C kultiviert. Der Satz Agarplatten ohne

Nylonmembran wurde bis zur Analyse der Cosmid-Klone bei 4 °C gelagert (Replikplatten).

- Zur Konservierung der Cosmid-Bank wurden die einzelnen Koloniesuspensionen in den Mikrotiterplatten mit sterilem Glycerol in einer Endkonzentration von 18 % (v/v) versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.5.12.7 Analyse der Cosmid-Bank

Für die Analyse („Screening“) der Cosmid-Bank nach spezifischen DNA-Sequenzen wurde die Methode der Kolonie-Hybridisierung verwendet. Die Bakterienkolonien auf den Nylonmembranen (s. 2.5.12.6) wurden nach 2.5.13.6 behandelt. Die Hybridisierung erfolgte mit genspezifischen, heterologen radioaktiven Sonden. Bakterienklone, deren „Kolonie-Blot“ ein Hybridisierungssignal lieferte, wurden zur Präparation der Cosmid-DNA kultiviert (s. 2.5.2.1). Dazu wurde auf die Replikplatten zurückgegriffen. Die Cosmid-DNA wurde anschließend kartiert (s. 2.5.12.8).

2.5.12.8 Cosmid-Kartierung

Bei der Restriktionskartierung kann unter Zuhilfenahme mehrerer Restriktionsendonukleasen (2.5.6.1) die Reihenfolge der durch Hydrolyse entstehenden DNA-Fragmente auf einem Cosmid rechnerisch bestimmt werden.

Dazu wurde die DNA mit zwei verschiedenen Enzymen in separaten Reaktionsansätzen vollständig hydrolysiert. Zusätzlich erfolgte eine Restriktionsspaltung der DNA mit beiden Enzymen gemeinsam. Die hydrolysierte DNA wurde im Agarosegel (s. 2.5.4, mit 0,5 % Agarose, TBE-Puffer) nach Größen getrennt. Die erhaltenen Bandenmuster wurden miteinander verglichen und die Länge der Fragmente bestimmt. Größere DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel extrahiert („Hybaid Recovery DNA Purification Kit II“, Hybaid, Teddington, UK; DNA-Extraktion von 200 bp – 300 kb-Länge; Prinzip s. 2.5.2.2). Diese Fragmente wurden dann jeweils mit weiteren Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Diese Untersuchungen dienten dazu, die Anordnung der DNA-Fragmente auf einem Cosmid rechnerisch zu ermitteln.

2.5.13 Hybridisierung von DNA und Transfertechniken

Bei Hybridisierungsanalysen lagern sich DNA-Einzelstränge mit definierter Sequenz (als markierte Sonde) unter Bildung von Wasserstoffbrücken an komplementäre immobilisierte DNA-Moleküle. Die Stabilität nimmt mit zunehmender Anzahl an Wasserstoffbrücken zu.

2.5.13.1 Herstellung markierter Sonden mittels PCR

Lion und Haas (1990) beschrieben die Synthese von DNA-Sonden mit Hilfe der PCR. Die *Taq*-Polymerase integriert anstelle von Desoxythymidin (aus dTTP) Digoxigenin-markiertes Desoxyuridin (aus DIG-dUTP) in das gebildete PCR-Fragment.

Unter Verwendung des Markierungsreagentiensatzes („PCR DIG Probe Synthesis Kit“, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die Reaktion wie in 2.5.5 beschrieben durchgeführt. Für das PCR-Reaktionsgemisch wurden die vom Hersteller gelieferten Reagenzien verwendet. Die Desoxynukleosidtriphosphate wurden gegen den „PCR DIG Mix“, der neben den üblichen dNTPs zusätzlich DIG-dUTP (DIG-dUTP:dTTP=1:3) enthält, ausgetauscht. Für die Markierung von GC-reicher DNA oder von DNA-Matrizen von 1-3 kb Länge wurde ein Verhältnis von 1:6 DIG-dUTP:dTTP durch Mischen mit der dNTP-Stocklösung gewählt.

PCR-Markierungsansatz:

- DNA-Matrize (Endkonzentration s. 2.5.5.2)
- 0,5 µl je Primer (50 pmol/ µl)
- 5 µl PCR-Puffer mit MgCl₂, 10fach konzentriert
- 2,5 µl DMSO (bei GC-reicher DNA)
- 5 µl „PCR DIG mix“, je nach DNA-Matrize 1:3 bzw. 1:6 DIG-dUTP:dTTP
- 0,75 µl „Enzyme mix“
- HPLC-Wasser ad 50 µl

Zur qualitativen Beurteilung der Markierungseffizienz wurde anschließend ein Aliquot der Reaktion zusammen mit einem nicht markierten Reaktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch nach 2.5.4 aufgetrennt. Durch den Einbau von markiertem Digoxigenin ist das markierte PCR-Produkt ein signifikant größer als der unmarkierte Vergleich. Nach der gelelektrophoretischen Aufreinigung (s. 2.5.4 und 2.5.2.2) konnte das DIG-markierte PCR-Produkt als Sonde eingesetzt werden.

2.5.13.2 DNA-Markierung unter Verwendung des Klenow-Fragmentes

Das Klenow-Fragment kopiert DNA-Moleküle in Gegenwart von Hexanukleotiden und Digoxigenin-markiertem Desoxyuridintriphosphat (DIG-dUTP). Die Hexanukleotide lagern sich an denaturierte einzelsträngige DNA. Sie dienen als Starter für eine

Kondensationsreaktion mit Hilfe des Klenow-Fragmentes. Durch die verschiedenen Sequenzen der Hexanukleotide entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge. In die entstehenden Doppelstränge wird statistisch an jeder 25. Position ein Digoxigenin-Molekül eingebaut.

Das „DIG High Prime Labeling Kit“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) wurde für die Reaktion eingesetzt. In dem Reagenziensatz sind neben Klenow-Fragment, dNTPs, DIG-dUTP, Reaktionspuffer (5fach konzentriert) auch Hexanukleotide enthalten.

- Im kochenden Wasserbad wurden 16 µl DNA-Lösung (1-3 µg DNA in Wasser gelöst) für 10 min denaturiert und sofort auf Eis gekühlt.
- 4 µl „DIG-High Prime“-Lösung wurden zugegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C üN inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8) gestoppt.

Die modifizierte DNA konnte direkt als Sonde eingesetzt werden.

2.5.13.3 Radioaktive Markierung von DNA mit Hilfe des Klenow-Fragmentes

Zur radioaktiven Markierung von DNA mit 32-Phosphor (^{32}P) wurde das „RadPrime DNA Labeling System“ der Firma Gibco, Life Technologies verwendet. Oligonukleotide (Octamere) unterschiedlicher Basenabfolge lagern sich an denaturierte DNA-Matrizen an und werden mit Hilfe des Klenow Fragmentes erweitert. In Gegenwart von $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ entsteht dabei eine radioaktive Sonde, die für Southern Hybridisierungen verwendet werden kann (s. 2.5.13.5).

- 25 ng der zu markierenden DNA (gelöst in 22 µl Reinstwasser), 1 ng/ µl des Molekulargewichtsstandards für die Agarose-Gelelektrophorese sowie 5 µl „2.5X Random Primer Solution“ wurden gemischt und bei 95-100 °C 10 min denaturiert. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis gekühlt.
- Es folgte die Zugabe von jeweils 4 µl dATP, dGTP und dTTP sowie von 5 µl des Reaktionspuffers (10fach konzentriert). 2 µl Klenow Fragment wurden hinzupipettiert.
- Zum Schluss wurden 2 µl $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ (10 mCi/ ml) zugefügt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die radioaktiv markierte DNA konnte ohne Aufreinigung als Sonde eingesetzt werden.

2.5.13.4 „Southern Blot“ und Detektion mit DIG-markierten Sonden

Bei der von *Southern* (1975) beschriebenen Methode werden DNA-Fragmente gelelektrophoretisch getrennt (s. 2.5.4) und auf eine Nylonmembran transferiert. Die DNA

wird auf der Nylonmembran immobilisiert und kann unter geeigneten Bedingungen mit DNA-Sonden hybridisieren.

In den Abschnitten 2.1.8.4 und 2.1.8.5 sind die im Folgenden benannten Puffer und Lösungen beschrieben. Bei der nicht-radioaktiven Detektion wurde mit dem Digoxigenin-System der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) laut Herstelleranweisung gearbeitet. Weitergehende Informationen gibt das Handbuch „DIG Application Manual for Filter Hybridisation“ von Roche Diagnostics (s. Anhang).

Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA

Die gelelektrophoretische Trennung der durch Hydrolyse (s. 2.5.6.1) fragmentierten DNA erfolgte nach 2.5.4. Zur Trennung großer DNA-Fragmente erwiesen sich niedrige Arbeitsspannungen (ca. 40 mV) als vorteilhaft. TBE-Puffer (2.1.8.5) wurde als alternatives Gelpuffersystem unterstützend eingesetzt, um eine optimale Trennung der DNA zu gewährleisten. Um eine spätere Detektion zu vereinfachen, wurde ein Digoxigenin-markierter DNA-Größenstandard (Tab. 2.3) mit aufgetrennt.

Southern Transfer und Fixierung der DNA

- Zur Depurinierung wurde das Agarosegel in HCl (0,25 M) 5 min geschüttelt und anschließend mit Wasser gewaschen.
- Bei der nachfolgenden alkalischen Denaturierung bricht die DNA an den depurinierten Stellen. Die entstehenden Fragmente werden besser auf die Membran transferiert. Dazu wurde das Gel 2 x 15 min in Denaturierungslösung inkubiert.
- Nach zweimaligem Abspülen des Gels mit Wasser wurde das Gel 2 x 15 min in Neutralisierungslösung geschwenkt (Neutralisation).
- Der DNA-Transfer erfolgte mit Hilfe von Kapillarkräften. Ein mit SSC-Puffer (20fach konzentriert) getränkter Filterpapierstreifen (Whatman 3MM) überbrückte eine Glasplatte und wurde an beiden Enden in ein Pufferreservoir mit SSC-Puffer (20fach) getaucht. Auf die Glasplatte mit getränktem Filterpapier wurde das Gel mit der Oberseite nach unten gelegt und am oberen rechten Rand markiert. Darauf wurden eine Nylonmembran (Biodyne Plus, s. 2.1.2), ebenfalls entsprechend markiert, und zwei weitere Filterpapiere in Gelgröße luftblasenfrei aufgebracht. Auf diese wurden trockene Papiertücher platziert und zusätzlich mit einem Gewicht (1 kg) beschwert. Die Kapillarkraft zieht Puffer aus dem Reservoir durch Gel und Membran in die Papiertücher. Die DNA wird aus dem Gel im Strom mitgenommen und an der positiv geladenen Nylonmembran immobilisiert. Der Transfer wurde üN durchgeführt (8-12 h).

- Die Membran wurde zur Entfernung von Gelresten, Ethidiumbromid und Salzen 5 min in SSC-Puffer (5fach konzentriert) gewaschen. Die Membran wurde zur Fixierung der DNA mit UV-Licht (366 nm) 5 min bestrahlt.

Hybridisierung

Eine zunächst durchgeführte Vorhybridisierung bereitet die Membran auf die eigentliche Hybridisierung vor, indem unspezifische Bindestellen der Membran blockiert werden. Dies minimiert „Hintergrundsignale“ bei der Detektion. Bei der Anlagerung der DNA-Sonde an komplementäre DNA konnte die Stabilität der entstandenen Doppelstränge durch die gewählten Stringenzbedingungen wie Temperatur, Salzkonzentration der Hybridisierungslösung und des Waschpuffers beeinflusst werden. Die geeignete Stringenz wurde jeweils experimentell ermittelt. In dieser Arbeit wurden die Temperatur und die Salzkonzentration des Waschpuffers variiert.

- Zur Vorhybridisierung wurde die Membran in 20 ml Prähybridisierungslösung 2 h bei 42 °C in einem Hybridisierungsrohr (HybridtubeTM, Life Technologies, Eggenstein) äquilibriert.
- Die Sonde (hergestellt nach 2.5.13.1 bzw. 2.5.13.2) wurde 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Sonde wurde der Hybridisierungslösung hinzugefügt. Diese Sondenlösung war bei – 20 °C bis zu mind. 1 Jahr lagerungsfähig und konnte wiederholt verwendet werden. Bei wiederholter Verwendung wurde die Lösung 10 min bei 68 °C im Wasserbad erhitzt, auf Eis abgekühlt und nach Abgießen der Prähybridisierungslösung als Hybridisierungslösung verwendet.
- Die Hybridisierung fand μ N bei 42 °C statt.
- Die Membran wurde 2 x 5 min in 2x-Waschpuffer gewaschen. Üblicherweise folgte ein Waschschriff von 2 x 15 min mit 0,1x-Waschpuffer. Abhängig von den gewählten Stringenzbedingungen konnte auch 1x- oder 0,5x-Waschpuffer eingesetzt werden. Bei höheren Stringenzen wurde der Waschschriff bei 50-68 °C durchgeführt.

Detektion

Die Detektion der miteinander hybridisierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines gekoppelten Immuno-Chemilumineszenz-Assays. Digoxigenin-markiertes dUTP der Sonde wird als Hapten von einem Antikörper (Anti-Digoxigenin F_{ab}-Fragment, Roche Diagnostics) erkannt. Das an den Digoxigenin-spezifischen Antikörper gekoppelte Enzym Alkalische Phosphatase ermöglicht eine Chemilumineszenz-Reaktion mit dem Substrat CSPD® (Roche Diagnostics). Das Substrat wird dephosphoryliert und unter Lichtemission umgelagert. Die Lichtsignale sind als Schwärzungen von Röntgenfilmen nachweisbar.

- Die Membran wurde für 1 min in Tween-Waschlösung äquilibriert und mindestens 30 min mit Detektionspuffer 2 behandelt.
- Nach Erneuern des Detektionspuffers 2 wurde zu diesem Anti-Digoxigenin-AP (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10000 gegeben und genau 30 min inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit Tween-Waschlösung je 15 min wurden Reste des Antikörpers entfernt.
- Nach einminütigem Äquilibrieren der Membran in Detektionspuffer 3 wurde die Membran in eine Folientasche gelegt. Mit 2 Tropfen CSPD[®]-Lösung (Roche Diagnostics) wurde die Membran benetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert, um die enzymatische Dephosphorylierung und die anschließende Lichtreaktion zu starten.
- Unter Lichtausschluss wurde die Membran auf einen Röntgenfilm gelegt. Der Film wurde für 4-6 h belichtet und schließlich entwickelt. Falls die Belichtung des Films zu schwach ausgeprägt war, konnte ein weiterer Film 12 h mit der Membran exponiert werden.

Entfernen der Sonde von der Membran

Durch Behandlung mit Alkalisalzen und Detergenzien löst sich die Sonde von der an der Membran fixierten DNA. Die Membran konnte dann für weitere Hybridisierungsversuche verwendet werden. Da aber, abhängig von der Qualität der Membran, eine Schädigung der Membran nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde in dieser Arbeit die Membran nur einmal wiederverwendet.

- Die Membran wurde 1 min in Wasser gespült und dann 20 min in einer Lösung von NaOH (0,2 M) und SDS (0,1 %) bei 37 °C gewaschen. Bei starker Bindung der Sonde wurde die Inkubationszeit bis zu 2 x 30 min erhöht.
- Die Membran wurde in SSC-Lösung (2fach konzentriert) geschwenkt.

Die Membran konnte dann in einer weiteren Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

2.5.13.5 Transfer nach Southern mit der Ammoniumacetat-Methode und anschließende radioaktive Detektion

Bei dieser Methode wird ebenfalls der von *Southern (1975)* beschriebene Transfer von DNA auf eine Nylonmembran mit anschließender Immobilisierung durchgeführt. Bei der Detektion wurde mit radioaktiv markierten Sonden (s. 2.5.13.3) gearbeitet. Verwendete Lösungen und Puffer finden sich in Abschnitt 2.1.8.4.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA wurde wie in 2.5.13.4 durchgeführt.

Southern Transfer und Fixierung der DNA

- Depurinierung und Denaturierung erfolgten wie in 2.5.13.4.
- Zur Neutralisation wurde das Agarosegel in einer Lösung von Ammoniumacetat (1 M) und NaOH (20 mM) für 2 x 30 min inkubiert.
- Für den DNA-Transfer wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf eine Glasplatte platziert, die Nylonmembran, 2 Lagen Whatman-Filterpapier sowie Papiertücher (Dicke von 2 cm) aufgelegt und mit einem Gewicht (1 kg) 2 h beschwert.
- Die Immobilisierung der DNA an der Nylonmembran erfolgte bei 260 nm für 2 min.
- Mit 2x SSC-Puffer wurde die Membran 5 min bei 68 °C gewaschen.

Hybridisierung

- Die Membran wurde 2 h mit Prähybridisierungslösung (ohne Formamid) bei 68 °C vorhybridisiert.
- Die nach 2.5.13.3 erstellte Sonde wurde 10 min bei 100 °C denaturiert und zur Prähybridisierungslösung gegeben. Hybridisiert wurde 4h bei 68 °C.
- Die Membran wurde mit 2x-Waschpuffer (bei gewünschter niedriger Stringenz) oder mit 0,1x-Waschpuffer (bei gewünschter höherer Stringenz) bei 68 °C 15 min gewaschen.
- Mit Hilfe des Geiger-Müller-Zählrohres wurde die Membran auf vorhandene Radioaktivität abgetastet und ggf. der Waschschrift wiederholt.

Detektion

- Die Membran wurde in Folie verpackt und im Dunkeln auf einen Röntgenfilm in einer Kassette aufgelegt. Der Film wurde bei – 80 °C für mehrere Tage (meist 1 Woche) belichtet. Der Film wurde unter Lichtausschluss entwickelt.
- An den Stellen, an denen die radioaktive Sonde mit komplementären Sequenzen hybridisierte, war auf dem Film eine Schwärzung zu erkennen.

2.5.13.6 Kolonie-Hybridisierung

Bakterienkolonien können direkt auf eine Nylonmembran übertragen werden (s. a. 2.5.12.6). Eine Alkali-Behandlung führt zur Zelllyse und immobilisiert gleichzeitig die denaturierte DNA auf der Membran.

Zwei Lagen Gel-Blotting Papier wurden mit Denaturierungslösung (s. 2.1.8.4) getränkt. Die Nylonmembran wurde für 15 min auf diesen platziert. Anschließend wurde die Membran auf zwei Lagen Filterpapier, getränkt mit Neutralisierungslösung (s. 2.1.8.4), überführt. Nach 15 min wurde die Nylonmembran für weitere 10 min auf Filterpapiere aufgelegt, die mit SSC-

Lösung (2fach konzentriert, s. 2.1.8.4) eingeweicht wurden. Eine Hitzebehandlung (80 °C, mind. 30 min) fixierte die DNA auf der Membran.

Die anschließende Hybridisierung und Detektion ist in Abschnitt 2.5.13.5 beschrieben.

2.5.14 DNA-Sequenzierung

Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Sequenzierungsmethode arbeitet nach dem Prinzip des von *Sanger et al. (1977)* entwickelten Kettenabbruch-Verfahrens.

Es wurde mit einem „ABI PRISM™ 377 Gelsystem“ der Firma Applied Biosystems/ Perkin-Elmer (Weiterstadt) gearbeitet. Das Gerät detektiert vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, die, jeweils spezifisch für je ein Nukleotid, nach Anregung durch Laserlicht Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. Die zu sequenzierende DNA (Matrize) wird bei diesem Verfahren einer PCR-ähnlichen Reaktion unterzogen, in der die Strangsynthese nur von einem Oligonukleotid („Sequenzierprimer“) ausgeht. Werden neben Desoxynukleotiden (dNTPs) auch 3'-farbstoffmarkierte Didesoxynukleotide („dye terminators“, ddNTPs) eingesetzt, kommt es bei der Synthese der DNA zu einem Kettenabbruch. Dabei markieren die ddNTPs, korrespondierend zur entsprechenden Base, dieses Fragment mit Farbstoff. Die unterschiedlich langen DNA-Abbruchfragmente werden in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Identifizierung der endständigen Didesoxynukleotide erlaubt die Festlegung der DNA-Basenfolge (*Smith et al., 1986*).

2.5.14.1 Parameter für die Sequenzierreaktion

Für die Erzeugung der Abbruchfragmente wurde das „ABI PRISM™ Ready Reaction Cycle Sequencing Kit/ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.0“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt. Neben dNTPs und farbstoffmarkierten ddNTPs enthält dieses Terminationsgemisch AmpliTaq® DNA Polymerase, die rasch Nukleotide einbaut und keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Durch die Thermostabilität bleibt nach wiederholtem Erhitzen auf hohe Temperaturen (94 – 96 °C) die Aktivität der Polymerase erhalten.

Für eine Sequenzierreaktion wurde doppelsträngige Plasmid- oder Cosmid-DNA oder ein aus Agarosegelen extrahiertes (s. 2.5.2.2) PCR-Produkte eingesetzt. Als „Sequenzierprimer“ dienten Oligonukleotide, die als Standard-Oligonukleotide komplementär zu entsprechenden Sequenzen von Klonierungsvektoren waren oder die als sequenzspezifische Primer für das „Primer Walking“ erstellt worden waren (s. 2.1.4). Die einzelnen Komponenten eines Reaktionsansatzes wurden auf Eis pipettiert.

Reaktionsansatz für die Sequenzierung:

Terminationsgemisch („Big Dye“)	2,0 µl
DNA-Matrize:	
dsDNA	1 µg
oder PCR-Produkt	200 ng
Sequenzierprimer, 5 pmol/ µl	3 µl
H ₂ O	ad 10,0 µl

Die Sequenzierreaktion wurde in einen PCR-Thermoblock (Biometra T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen) gestellt. Mit Ausnahme von GC-reichen DNA-Matrizen, die nach 2.5.14.2 behandelt wurden, wurden für alle weiteren Sequenzierungen standardmäßig folgende Temperaturzyklen durchlaufen:

Denaturierung	96 °C	10 s
„Annealing“	50 °C	5 s
Extension	60 °C	1 min
[40 Zyklen]		

Anschließend folgte eine Reinigung nach 2.5.14.3.

2.5.14.2 „Cycle Sequencing-Amplifikation“ für GC-reiche DNA-Matrizen

Bei Anwendung des Standardsequenzierprogramms (2.5.14.1) für GC-reiche DNA-Matrizen konnten nur sehr schlechte Daten erzielt werden. Aus diesem Grund wurde das Amplifikationsprotokoll in dieser Arbeit für alle GC-reichen DNA-Matrizen angepasst. Es ergaben sich folgende Temperaturzyklen:

Denaturierung	98 °C	30 s
„Annealing“	50 °C	15 s
Extension	60 °C	4 min
[40 Zyklen]		

Die Proben durchliefen das Temperaturprogramm im PCR-Thermoblock (Biometra T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen). Anschließend erfolgte die Reinigung nach 2.5.14.3.

2.5.14.3 Reinigung der Sequenzierreaktion

Um die Abbruchfragmente im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufzutrennen, mussten diese durch Präzipitation von den restlichen „Sequenzierprimern“ und nicht verbrauchten Fluoreszenzfarbstoff markierten ddNTPs abgetrennt werden.

- Dazu wurden zum Reaktionsgemisch 40 µl HPLC-Wasser, 5 µl Natriumacetat-Lösung (3M, pH 4,6) und 125 µl Ethanol (100 %) zugegeben. Die Lösung wurde komplett in ein

1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Abbruchfragmente ließen sich durch Zentrifugieren (20000x g, 15 min) präzipitieren.

- Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und zum Präzipitat 300 µl 70 % iger Ethanol (frisch hergestellt) zugefügt, um die DNA von Salzen zu befreien.
- Es folgte eine erneute Zentrifugation (20000x g, 5 min). Die Waschlösung wurde vorsichtig entfernt und die DNA-Abbruchfragmente im Vakuum getrocknet (Speed Vac® Plus SC110A, Savant, CA, USA).

Bis zur Trennung im Polyacrylamidgel konnte die getrocknete DNA mehrere Tage bei – 20 °C aufbewahrt werden.

2.5.14.4 Trennung im Sequenziergel

Die gereinigten Proben wurden in einem denaturierenden 4,5 % igen Harnstoff-Polyacrylamidgel mit Hilfe des „ABI PRISM™ 377 Gelsystem“ der Firma Applied Biosystems/ Perkin-Elmer (Weiterstadt) elektrophoretisch getrennt. Herstellungsprotokolle für die verwendeten Puffer und Lösungen finden sich unter 2.1.8.6.

- Zunächst wurden die Glasplatten (Länge 36 cm) mit warmem Leitungswasser und anschließend mit Alconox®-Lösung gereinigt, um „Hintergrundfluoreszenz“ bei der Detektion mit Laserlicht zu minimieren und das Gel möglichst gleichmäßig gießen zu können. Es wurde intensiv mit Leitungswasser abgespült und zum Schluss mit Reinstwasser nachgespült.
- Nach Trocknen der Glasplatten wurden zwischen diese Abstandshalter („Spacer“) gelegt und die Glasplatten in den Halterahmen eingespannt.
- Die frisch zubereitete Acrylamid-Gellösung (4,5 %) wurde durch einen 0,2 µm-Filter der Firma Schleicher und Schüll (Dassel) filtriert und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast.
- Durch die Zugabe von 10 µl TEMED und 233 µl APS-Lösung (10 %ig) zur Gellösung begann die Polymerisation. Der Ansatz wurde durchmischt und sofort luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen.
- Ein Gelkamm wurde so eingesetzt, dass bei der Polymerisation eine glatte Gelfront entstand. Das Gel polymerisierte ca. 1 h in horizontaler Lage.
- Nach der Polymerisation des Gels wurden die Glasplatten erneut außen vorsichtig gesäubert und Gelreste am Halterahmen entfernt. An der glatten Gelfront konnte nun ein Gelkamm mit 36 Zähnen eingesetzt werden, die die Probenaufnahmetaschen bildeten.

- Das Gel wurde vertikal in das Sequenziergerät eingebaut und die zugehörigen Elektrodenkammern mit Elektrophoresepuffer (s. 2.1.8.6) gefüllt. Bei einem Vorlauf wurde zunächst die Qualität der gereinigten Glasplatten und des Polyacrylamidgels beurteilt. Anschließend wurde das Gel auf eine Temperatur von 48 °C erwärmt.
- Zur Probenvorbereitung wurde die DNA in 2 µl Probenauftragspuffer gelöst, 3 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt.
- Für den Sequenzierlauf wurden die Probenaschen mit Elektrophoresepuffer ausgespült. Je 1 µl der Sequenzierproben wurde in zwei Chargen aufgetragen. Zur besseren Trennung im Gel wurden zuerst alle ungeradzahligen Proben geladen. Es wurde für 5 min Spannung angelegt. Dann wurde die zweite Charge mit den geradzahligen Probennummern nachgetragen.
- Der Sequenzierlauf wurde 5 Stunden bei 2900 V und 48 °C, mit ständiger computergesteuerter Fluoreszenzdetektion und Datensammlung, durchgeführt. Die gesammelten Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms („Sequence Analysis 3.0“, Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet und standen zur Weiterverarbeitung zur Verfügung.

2.5.14.5 Computergestützte Auswertung der Sequenzierdaten

Mit den verschiedenen Pogrammodulen der Software **Lasergene** (DNASTAR, London, UK) wurden die Sequenzdaten untersucht. Das Programm „SeqMan“ bearbeitet Sequenzrohdaten. Für die Eingabe von DNA und die Übersetzung in Aminosäuredaten wird „EditSeq“ verwendet. Restriktionskartierungen und graphische Darstellungen der DNA erfolgen mit Hilfe von „MapDraw“. Das Programm „MegAlign“ dient dem Protein- oder Nukleotidvergleich. Die Charakterisierung von Proteinen wird mit „Protean“ ermöglicht.

FramePlot 2.1 ist ein frei verfügbares Internet-Programm für die Analyse von bakterieller GC-reicher DNA. Bei GC-reicher DNA findet sich in der ersten und dritten Position eines Codons mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Guanin- oder Cytosinbase. Das Programm wird zur Bestimmung des Codongebrauchs benutzt, entsprechende offene Leseraster werden berechnet und graphisch dargestellt (*Bibb et al., 1984*).

Das Softwareprogramm **Blast search** (National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA) sucht Homologien zwischen DNA- und Proteinsequenzen. Die zu analysierenden Sequenzen können hier mit bereits im Internet veröffentlichten Daten verglichen werden, z.B. mit dem Ziel, Auskunft über putative Funktionen fraglicher Gene zu erhalten.

Wichtige Adressen im Internet mit Informationen zu DNA, Proteinen und Aktinomyceten (Actinomycetes *Streptomyces* Internet Resource Center, ASIRC) sind:

NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Clustalw 1.6	http://www.tokyo-center.genome.ad.jp/SIT/CLUSTAL.html
FramePlot 2.1	http://nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl
PROSITE	http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html
ASIRC	http://molbiol.cbs.vmn.edu/asirc/

2.6 Methoden der Proteinbiochemie

2.6.1 Proteinquantifizierung nach Bradford

Zur Quantifizierung von Proteinen wurde die Methode nach *Bradford (1976)* angewendet. Bei der Reaktion zwischen dem Bradford-Reagenz und Proteinen entsteht zeitabhängig ein Farbkomplex, der nach kurzer Zeit wieder zerfällt. Darum sollte für alle Proben und Vergleichslösungen exakt dieselbe Inkubationszeit eingehalten werden. Die Komplexbildung, an der vor allem die Aminosäure Arginin, aber auch Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin beteiligt sind, führt zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm. Für gleiche Mengen verschiedener Proteine ist aufgrund unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzungen eine unterschiedliche Absorption zu erwarten. Der Test besitzt somit nur vergleichenden Charakter.

- 100 µl der Probelösung wurden in Einmalküvetten mit 900 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach 10 min wurden die Proben bei 595 nm in einem Spektralphotometer (Uvikon 810, Kontron Biotek) gegen Wasser gemessen.
- Die Konzentrationen wurden anhand einer Kalibriergeraden von 1-20 µg BSA/ ml (unter gleichen Bedingungen vermessen) errechnet.

2.6.2 Auftrennung von Proteinen über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Trennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese verwendet. Die Proben werden zunächst zur Denaturierung u. a. mit SDS aufgekocht. Dabei bilden sich durch Anlagerung von SDS-Molekülen an die Proteinoberfläche Polyanionen. Ihre Trennung in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen beruht auf Unterschieden im Migrationsverhalten durch

eine dreidimensionale Gelmatrix. Die Trennung wird nur durch die Proteingröße bestimmt (Laemmli, 1970).

Die SDS-PAGE erfolgte in 13,5 % igen Polyacrylamidgelen (Gelgröße 18 x 16 cm) mit Hilfe einer Vertikalelektrophorese-Apparatur (Maxigel, Biometra, Göttingen) und einem Spannungsgeber der Firma Consort (Typ E 734, Turnhout, Belgien). Angaben zu genannten Puffern und Lösungen finden sich in Tabelle 2.23.

Zur Probenaufbereitung wurden die Proteine mit 0,2 VT denaturierendem Probenpuffer (5fach konzentriert) in einem kochenden Wasserbad 10 min erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Der Molekulargewichtsstandard („Low Molecular Weight Marker“, Amersham-Pharmacia Biotech) wurde nach Vorschrift in 100 µl 5fach Probenpuffer gelöst und gleichermaßen behandelt. Er enthält Phosphorylase B (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovalbumin (42,7 kDa), Carboanhydrase (31 kDa), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (21,5 kDa) und Lysozym (14,4 kDa).

Für die Elektrophorese wurde die Trenngel-Lösung entsprechend 2.1.8.8 angefertigt und sofort zwischen zwei durch Spacer getrennte Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit wassergesättigtem Isobutanol konnte die Matrix über Nacht polymerisieren. Die Sammelgel-Lösung (Herstellung s. 2.1.8.8) wurde nach Entfernen des Isobutanols aufgebracht und der Probenaschenformer eingesetzt. Nach ca. 30 min war die Polymerisation des Sammelgels beendet. Die Glasplatten mit fixiertem Gel wurden in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Der Elektrophoresepuffer (2.1.8.8) wurde in die Elektrodenkammern gefüllt und der Taschenkamm für die Proben entfernt. Die ausgespülten Taschen wurden mit Proben beladen, wobei maximal 50 µl Probenvolumen in große Taschen oder 20 µl in kleine Taschen gefüllt wurden. Die Konzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 15-25 mA. Zur Trennung im Trenngel wurde die Stromstärke auf 50-60 mA erhöht. Es konnte eine Wasserkühlung angeschlossen werden. Sobald der im denaturierenden Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau den unteren Trenngelrand erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten abgelöst. Das Sammelgel wurde verworfen. Das Trenngel wurde zur Detektion der Proteine für mindestens 1 h in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Das Gel wurde dann über Nacht in Entfärberlösung (2.1.8.8) geschwenkt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen und die Gelmatrix zu entfärben.

2.6.3 Proteinexpression in *Escherichia coli*

2.6.3.1 Anzucht, Induktion und Zellaufschluss zur Bestimmung der Proteinlöslichkeit

Zur Untersuchung der Expression und zur Bestimmung der Löslichkeit rekombinanter Proteine wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS mit dem jeweiligen T7-Expressionskonstrukt auf Basis des pRSET B-Vektors in einer üN Kultur kultiviert.

- 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz wurde mit der üN-Vorkultur im Verhältnis 1:100 beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und 200 rpm in einem HAT Infors-Schüttler (Infors, Bottmingen, CH) angezogen.
- Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert. Anschließend wurde 4 h weiter bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.
- Direkt vor der Induktion und danach in einstündigen Intervallen wurden Proben von je 3 ml entnommen, um die Induktion zu verfolgen. Nach Sedimentieren der Zellen (8000x g, 5 min, 4 °C) wurden diese in 500 µl Aufschlußpuffer1 (s. 2.1.8.7) auf Eis resuspendiert.
- Mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, Danbury, CT, USA, Mikrospitze, Output: Stufe 2-3) wurden die Zellen in drei Intervallen von je 15 s mit jeweils 15 s Pause beschallt. Während des Aufschlusses wurden die Proben auf Eis gehalten, um ein Erhitzen und Schäumen der Suspension zu vermeiden.
- Die Hälfte des entstandenen Rohextraktes wurde zentrifugiert (20000x g, 10 min, 4 °C). Die Zellfragmente konnten so abgetrennt werden. Im Überstand findet sich die lösliche zellfreie Fraktion. Sowohl der Proteinrohextrakt als auch der zellfreie Extrakt wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.6.2).

2.6.3.2 Herstellung von zellfreien Proteinrohextrakten zur Reinigung rekombinant exprimierter Proteine in *E. coli*

Wenn Proteine in *E. coli* heterolog exprimiert werden, können sie u. a. zu einem hohen intrazellulären, kolloidosmotischen Druck in der Zelle führen. Für die Zelle sind die Proteine toxisch. Die Fremdproteine werden dann in Membranen eingeschlossen. Um die Bildung dieser Einschlusskörper („inclusion bodies“) zu verhindern, wurde der rekombinante Expressionsstamm in LB-Betain/ Sorbitol-Medium (s. 2.1.6.1) mit modifiziertem Protokoll induziert. Die Zugabe des nicht metabolisierbaren Zuckeralkohols Sorbitol zusammen mit Betain übt einen hohen osmotischen Stress auf die Zellen aus, der die Löslichkeit der Proteine erhöhen soll (*Blackwell and Horgan, 1991*).

Das Plasmid pLysS im Stamm BL21(DE3)pLysS exprimiert geringe Mengen T7-Lysozym, einen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase. Im uninduzierten Zustand kann so die Transkription vom T7-Promotor verhindert werden. Der Stamm BL21(DE3)pLysS wurde daher bevorzugt eingesetzt.

- 100 ml LB-Betain/ Sorbitol-Medium (mit Antibiotikazusätzen) wurden im Verhältnis 1:100 mit einer rekombinanten *E. coli*-Vorkultur inokuliert und 8 h bei 28 °C im Rundschtüttler (180 rpm) inkubiert.
- Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG (0,1 mM Endkonzentration). Die Anzucht wurde für 24 h fortgesetzt.
- Die Zellen wurden geerntet (9000x g, 4 °C, 10 min) und bei -20 °C eingefroren.
- Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurden diese in 1 ml Lysepuffer B (s. 2.1.8.7) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert.
- Der Aufschluss erfolgte wie in 2.6.3.1 beschrieben. Der Rohextrakt wurde zentrifugiert (15000x g, 15 min, 4 °C). Der Überstand, der zellfreie Rohextrakt, wurde bis zur Verwendung in enzymatischen Aktivitätsbestimmungen oder bis zur säulenchromatographischen Reinigung (s. 2.6.3.4) auf Eis gehalten.

2.6.3.3 Coexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* und Herstellung zellfreier Rohextrakte für enzymatische Untersuchungen

Für Coexpressionen mehrerer Proteine wurden der *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS mit zwei Plasmiden von unterschiedlicher Antibiotikaresistenz nach 2.5.8.3 transformiert. Alternativ wurde mit einem Plasmid, kodierend für die Expression zweier Proteine, transformiert. Die Kultivierung und Induktion erfolgten wie in 2.6.3.2 beschrieben. Sollten größere Proteinmengen erhalten werden, wurde 1 l LB-Betain/ Sorbitol-Medium (s. 2.1.6.1) in Fernbachkolben entsprechend inokuliert.

Um den Anteil löslicher, aktiver Proteine zu erhöhen, wurde zudem variierend nach der Inokulation bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1-0,4 kultiviert und dann mit IPTG (0,1 mM Endkonzentration) induziert. Die Zellen wurden für weitere 24-40 h kultiviert. Die Zellsuspension wurde bei 8000x g und 4 °C 10 min zentrifugiert (1 l Ansätze bei 4000x g, 4 °C, 20 min in der Cryofuge 5000S von Heraeus) und das Zellpellet bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen der Zellmasse auf Eis wurde pro 100 ml Kultur 1 ml Lysepuffer C (s. 2.1.8.7) zugefügt. Die Zellsuspension wurde bis zu 10mal für je 30 s mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, Danbury, CT, USA, Output: Stufe 2-3, Mikrospitze, für größere Ansätze 1,5 cm

Telleraufsatz) behandelt. Zwischen den einzelnen Beschallungen wurden 30 s Pause eingehalten. Die Proben wurden stets auf Eis gehalten.

Nach dem Zentrifugieren (15000x g, 15 min, 4 °C) konnte der zellfreie Proteinrohextrakt bis zur weiteren Reinigung (s. 2.6.3.4) auf Eis gelagert werden.

2.6.3.4 Affinitätschromatographie von Poly-Histidin-Fusionsproteinen

Wurden Proteine mit einem Fusionsanteil von 6 Histidinresten („His₆-tag“) exprimiert, war eine Reinigung dieser Proteine über eine Affinitätschromatographie an einem Nickelchelat (Nickel-Nitriloacetat-Agarose, „Ni-NTA“, Qiagen, Hilden) möglich. Ni²⁺-Ionen sind über vier Koordinationsstellen chelatisiert. Die Histidinreste binden an die zwei weiteren Ligand-Bindungsstellen. Die Elution erfolgt mit imidazolhaltigem Puffer, da Imidazol kompetitiv die komplexierten Proteine aus ihrer Bindung verdrängt.

Die Reinigung wurde nach der Anleitung des Handbuchs „The QIAexpressionist“ (Qiagen, s. Anhang) unter nativen Bedingungen durchgeführt. Die Herstellung des zellfreien Proteinrohextraktes folgte 2.6.3.2 bzw. 2.6.3.3. Zu 4 ml klarem Lysat wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose gegeben und 1 h bei 4 °C leicht geschüttelt. Das Gemisch wurde in eine leere Säulenkartusche überführt und zweimal mit 4 ml Lysepuffer B ohne Lysozymzusatz (s. 2.1.8.7) gewaschen. Das gebundene Protein wurde dann in vier Fraktionen mit je 0,5 ml Elutionspuffer (2.1.8.7) eluiert. Nach allen Wasch- und Elutionsschritten wurden Proben für die Analyse mittels SDS-PAGE (s. 2.6.2) abgenommen.

Bei der Aufreinigung von coexprimierten Proteinen wurde insbesondere die Oxidoreduktase RifL als Poly-Histidin-Fusionsprotein nur schwach an die Affinitätsmatrix gebunden. Anhand der SDS-PAGE war erkennbar, dass das Enzym bereits frühzeitig bei den Waschschritten eluiert wurde. Daher wurde bei den Waschschritten nur mit Imidazolkonzentrationen von 5–10 mM (laut Protokoll 20 mM üblich) gearbeitet.

Neben der Affinitätschromatographie mit Nickelchelat kann auch Co²⁺ in analoger Weise an eine Sepharose-Matrix gebunden sein (BD TALONTM Resin, BD Bioscience Clontech). Diese Matrix soll Poly-Histidin-Fusionsproteine mit erhöhter Selektivität im Vergleich zu Nickel-Affinitätssäulen binden. Mit diesem System wurden coexprimierte Proteine analog des Handbuchs („TALONTM Metal Affinity Resins User Manual“, BD Bioscience Clontech) gereinigt (s. Anhang).

Nach der Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (2.6.1) wurde ggf. das Eluat über Centriplus[®]-Röhrchen (Typ YM10 bzw. YM30, Amicon, Witten) durch Zentrifugieren (maximal 3000x g) eingengt. Dabei wurde mit Ausschlussgrößen von 10 bzw. 30 kDa

gearbeitet. Proteine oberhalb dieser Grenze wurden konzentriert, kleinere konnten die Membran passieren.

2.6.4 Gewinnung rekombinanter Proteine aus *Streptomyces lividans*

2.6.4.1 Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte aus *Streptomyces lividans*

Die Zellanzucht von *S. lividans* TK24-Transformanten mit den zu untersuchenden Plasmiden erfolgte wie unter 2.4.3.1 beschrieben. Als Anzuchtmedium dienten 60 ml modifiziertes R5-Medium (s. 2.1.6.3, ohne Saccharose) mit Zusatz von 5 µg/ml Thiostrepton. Nach einwöchiger Kultivierung bei 28 °C und 200 rpm wurden die Zellen sedimentiert (8000x g, 4 °C, 10 min). Das Zellsediment wurde sofort mit kaltem K₂HPO₄-Puffer (0,1 M; pH 7,5) gewaschen und erneut pelletiert. Pro Gramm Feuchtgewicht wurden die Zellen in 1,5 ml K₂HPO₄-Puffer (0,1 M; pH 7,5) unter Zusatz von 1 mM PMSF resuspendiert. Der Zellaufschluss mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, Danbury, CT, USA, Mikrospitze, Output: Stufe 2-3) wurde in drei Intervallen zu je 20 s Beschallung und 30 s Pause durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis gehalten. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren (15000x g, 4 °C, 20 min) abgetrennt. Das zellfreie Lysat wurde über PD-10 Säulen (gefüllt mit Sephadex G-25, Amersham Pharmacia, Freiburg) von niedermolekularen Bestandteilen gereinigt. Zuvor wurden die PD-10 Säulen mit je 25 ml K₂HPO₄-Puffer (0,1 M; pH 7,5) äquilibriert. Das Lysat wurde auf die Säule gegeben und zuerst mit 3,5 ml K₂HPO₄-Puffer (0,1 M; pH 7,5) eluiert. Das Eluat wurde ein zweites Mal auf die Säule aufgebracht und mit 3,0 ml K₂HPO₄-Puffer (0,1 M; pH 7,5) eluiert. Die Proteinkonzentration des erhaltenen zellfreien Rohextraktes wurde nach Bradford (2.6.1) bestimmt. Der zellfreie Extrakt wurde bis zur Bestimmung der Enzymaktivität (s. 2.6.5.2) auf Eis gelagert. Unter geringem Aktivitätsverlust konnte der zellfreie Extrakt bei -20 °C für eine Woche eingefroren werden.

2.6.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.6.5.1 Aktivitätstest der AHBA-Synthase

Zur Untersuchung der Funktionalität der AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* F18-98 wurde das Gen in den Expressionsvektor pRSET B ligiert. Die AHBA-Synthase wurde als Poly-Histidin-Fusionsprotein in *E. coli* BL21(DE3)pLysS exprimiert (Anzucht und Induktion wie unter 2.6.3.2). Nach der Ernte von 0,5 ml Zellsuspension wurde das Zellpellet in Lysepuffer A (s. 2.1.8.7) resuspendiert. Die Beschallung mit Ultraschall erfolgte in drei Intervallen von je

10 s und 30 s Pause. Die Proben wurden dabei stets auf Eis gehalten. Zellreste wurden anschließend abzentrifugiert (4000x g, 10 min, 4 °C). Die Aktivitätsbestimmung wurde im zellfreien Rohextrakt durchgeführt.

Eine unbekannte Menge des Substrates der AHBA-Synthase, 5-Desoxy-5-amino-3-dehydroshikimat (aDHS), wurde in 1 ml Wasser gelöst und zum zellfreien Proteinextrakt pipettiert. Die Umsetzung erfolgte μ N bei 30 °C. Die Reaktion wurde dann mit 0,5 ml Ethylacetat und 1 %igem Eisessig abgestoppt. Nach kurzer Zentrifugation (20000x g, 2 min) wurde die obere Ethylacetat-haltige Phase abgenommen und im Vakuum (Speed Vac[®] Plus SC110A, Savant, CA, USA) getrocknet. Nach Wiederaufnahme in 0,1 ml Methanol wurde die Probe massenspektrometrisch (s. 2.7.1) untersucht.

Als Positivkontrolle wurde die AHBA-Synthase aus *Amycolatopsis mediterranei* als Poly-Histidin-Fusionsprotein überexprimiert. Dazu wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit dem Expressionskonstrukt EAHBA6 (s. Tab. 2.7) kultiviert und induziert (nach 2.6.3.2). Für eine Negativkontrolle wurde *E. coli* BL21(DE3)pLys mit dem leeren Expressionsvektor pRSET B transformiert. Der Stamm wurde entsprechend kultiviert und induziert (s. 2.6.3.2). Positiv- und Negativkontrolle wurden analog der rekombinanten AHBA-Synthase aus *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 behandelt. Für die Auftrennung mittels SDS-PAGE (2.6.2) wurden während der einzelnen Aufschlussschritte Aliquots von jeweils 10 μ l abgenommen.

2.6.5.2 Bestimmung der Oxidoreduktase-Aktivität

Die enzymatische Untersuchung der Oxidoreduktase rifL aus *A. mediterranei* beruht auf der Umsetzung von NAD⁺. Die Zunahme des durch Reduktion entstandenen NADH + H⁺ wurde photometrisch bei $\lambda = 340$ nm (Uvikon[®]810-Photometer, Kontron, München) über einen Zeitraum von 20 min bei 37 °C ermittelt. Als Probe diente der zellfreie Proteinextrakt von *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) (s. Tab. 2.7 mit rifK-M, J, G-I). Zur Kontrolle wurde der analog bearbeitete zellfreie Extrakt aus *S. lividans* TK24 verwendet. Als weitere Kontrollen wurde auch mit dem zellfreien Extrakt von *S. lividans* TK24/ (pHGF7607) (Oxidoreduktase-, rifL-Mutante von pHGF7604; s. Tab. 2.7) und von *S. lividans*/ (pHGF7608) (Phosphatase-, rifM-Mutante von pHGF7604; s. Tab. 2.7) gearbeitet. Wenn nicht anderes angegeben wurde eine Proteinkonzentration von 40 μ g/ μ l gewählt. Als Substrat wurde UDP-Glucose in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

Reaktionsansatz:

UDP-Glucose, 50 mM	x μ l
NAD, 50 mM	40 μ l
PLP, 5 mM	2 μ l
MgCl ₂ , 1M	10 μ l
Zellfreier Extrakt	40 μ g/ μ l Protein (Endkonzentration)
K ₂ HPO ₄ -Puffer, 0,1 M; pH 7,5	ad 1000 μ l

Die Assaybestandteile wurden bis auf das Substrat (UDP-Glucose) in eine Mess- und eine Referenzküvette pipettiert. Zum Volumenausgleich wurde ein dem Substratvolumen entsprechende Menge K₂HPO₄-Puffer in die Referenzküvette gegeben. Nach gutem Durchmischen der Lösungen wurden die Küvetten im Zweistrahl-Photometer platziert. Es wurden dann 5 min ohne Substrat gemessen, um eventuelle Aktivitätsartefakte durch den Rohextrakt auszuschließen. In die Messküvette wurde dann das Substrat zugeben, erneut gemischt und exakt nach 1 min die Messung gestartet.

Zur Charakterisierung der Oxidoreduktase-Aktivität wurden verschiedene Parameter im Enzymtest variiert.

Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Enzymaktivität

Es wurden Enzymkonzentrationen von 10-150 μ g/ 1000 μ l Inkubationsansatz vermessen.

Bestimmung des pH-Optimums

Das pH-Optimum wurde mit Hilfe von K₂HPO₄-Puffer (0,1 M) in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,0 in jeweils 0,5er Schritten bestimmt. Dieser Puffer wurde an Stelle des sonst üblichen Puffers bei pH 7,5 eingesetzt. Im Bereich unterhalb von pH 6,0 war es aufgrund des isoelektrischen Punktes von RifL (bei pH 6,168) und der daraus resultierenden Unlöslichkeit des Proteins nicht möglich, die Bestimmung durchzuführen.

Bestimmung des K_M-Wertes

Die UDP-Glucose-Konzentrationen wurden von 2 mM bis 16 mM (Endkonzentration) variiert. Die Messungen wurden stets mindestens zweimal wiederholt. Der pH-Wert des Puffers richtete sich nach dem zuvor ermittelten Optimum.

Einfluss verschiedener Stickstoffdonatoren auf die Enzymaktivität

Vorherige Untersuchungen lassen auf eine Interaktion der Oxidoreduktase (RifL) und der Aminotransferase (RifK) schließen. Demnach könnte sich die Transaminierung direkt der Oxidation folgen (s. Einleitung dieser Arbeit). Insofern war eine Beeinflussung durch verschiedene Stickstoffdonatoren denkbar. Die Enzymaktivität wurde nach der Zugabe von

Glutamin, Glutaminsäure, Asparagin, Asparaginsäure oder NH_4Cl (je 2 mM Endkonzentration) zum Inkubationsansatz bestimmt.

Untersuchungen zur Abhängigkeit von PLP sowie zur Nutzung des Cosubstrates NADP wurden durch jeweiliges Auslassen bzw. Zufügen der Substanzen durchgeführt.

2.7 Analytische Methoden

2.7.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

In der Massenspektroskopie werden Moleküle in der Gasphase in positive oder negative Ionen überführt (Ionisation). Diese sind oft instabil und zerfallen in geladene und ungeladene Bruchstücke (Fragmentierung). Die geladenen Fragmente werden im elektrischen Feld nach ihrer Masse getrennt (Massen-Fokussierung).

Molekülionenspektren wurden bei dieser Arbeit mit Hilfe der Elektrospray-Ionisierung (ESI-MS) erzeugt. Eine Übersicht zur Methode der Elektrospray-Ionisierung als schonendes Ionisierungsverfahren gibt *Cole (1997)*. Im Gegensatz zu klassischen Ionisierungsverfahren (z.B. EI-MS, Elektronenstoß-Ionisation) findet bei der schonenden Ionisierung ein Protonentransfer ($[\text{M} + \text{H}]^+ / [\text{M}-\text{H}]^-$) oder eine Ionenanlagerung statt. Die Ionisierung wird dabei stark durch die Substanzeigenschaften beeinflusst. So ist entscheidend, ob die Substanzen ausreichende Protonen- oder Kationenaaffinitäten besitzen. In dieser Arbeit wurde mit einem Massenspektrometer von Bruker Esquire LC00066/ Ion Trap (Bruker Daltronics) gearbeitet. Ionisation, Ionentrennung und –detektion erfolgen diskontinuierlich hintereinander in der gleichen Kammer („ion trap“). Die verdampfte Substanz wird zunächst durch einen kurzzeitigen Elektronenstrahl (1 ms) ionisiert. Die Ionen werden dann durch eine Veränderung eines Hochfrequenzfeldes fokussiert und registriert. Die Reaktionsabfolge beginnt mit einer neuen Probe erneut.

Für den massenspektrometrischen Nachweis der AHBA-Bildung nach enzymatischer Umsetzung von aDHS wurde die methanolische Lösung aus 2.6.5.1 in einen Direkteinlass des Gerätes eingespritzt. Zuvor wurde mit Methanol gespült, um „Hintergrundsignale“ zu verringern. Die Messungen wurden im Positiv-Modus durchgeführt. Es wurde die Adduktionsbildung, die Anlagerung von Protonen an Molekülionen ($\text{M}-\text{H}^+$), verfolgt. Für 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure war eine Massenzahl von m/z von 154 ($\text{M}-\text{H}^+$) zu erwarten.

2.7.2 Arbeiten zur Maytansinoidproduktion in Bakterien

2.7.2.1 Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Überständen von Bakterienkulturen

Nach Beendigung der Bakterianzucht (s. 2.4.3.2) wurde die jeweilige Kultur mit 3 x 1 VT Ethylacetat (frisch destilliert) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und in Methanol (1 ml/ 100 ml Kulturanzucht) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde nach dem Zentrifugieren der Zellen (6000x g, 10 min) mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3,5-4 eingestellt. Dann wurde erneut mit 3 x 1 VT Ethylacetat ausgeschüttelt, dieser eingedampft und die Rückstände in Methanol aufgenommen.

Alternativ wurde die gesamte Kulturanzucht vor der Extraktion mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3,5-4 eingestellt. Danach wurde mit 3 x 1 VT Ethylacetat (frisch destilliert) extrahiert.

2.7.2.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung extrahierter Sekundärstoffe

Maytansinoide konnten nach *Snedden et al. (1980)* mittels Dünnschichtchromatographie getrennt werden. Zur Trennung der nach 2.7.2.1 extrahierten Sekundärstoffe wurden DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm der Firma Merck verwendet. 5-20 µl des methanolischen Extraktes (aus der Ethylacetatphase) bzw. 200 µl des wässrigen Extraktes (nach erstem Ausschütteln mit Ethylacetat ohne vorheriges Ansäuern) wurden aufgetragen.

Als mobile Phase zur Auftrennung eines Ethylacetatextraktes diente ein Gemisch aus Chloroform und Methanol (95/5). Als weitere Fließmittel wurden Isopropanol:Methanol (30/70), Butanol:Eisessig:Wasser (60/20/20), Toluol:Isopropanol:NH₃ 25% (30/60/10) sowie Toluol:Aceton:Ameisensäure (60/39/1), insbesondere für die Auftrennung der wässrigen Phase, getestet. Dabei zeigte sich, dass das Gemisch aus Toluol:Aceton:Ameisensäure (60/39/1) für die Trennung der extrahierten Sekundärstoffe aus *Kitasatospora putterlickiae*, im Hinblick auf die Autoradiographie, besonders geeignet war.

Die Detektion erfolgte mit UV-Licht (254 nm, 360 nm) sowie durch Besprühen der Platte mit Anisaldehyd (1 ml in 85 % Methanol, 10 % Eisessig, 5 % H₂SO₄) oder Ehrlichs Reagenz (nach Merck). Die Platte wurde nach dem Ansprühen auf ca. 100 °C erhitzt. Als Standard wurden Maytansin und Ansamitocin P3 und ggf. [Carboxyl-¹⁴C₁]-AHBA gleichzeitig chromatographiert.

2.7.2.3 Bioautographie mit *Penicillium avellaneum* zur Erfassung von Maytansin

Der Pilz *Penicillium avellaneum* UC 4376 wird durch Ansamitocin in seinem Wachstum gehemmt (Hanka et al., 1974). Damit eignet sich der Stamm für die Bioautographie, einer Kombination aus dünnenschichtchromatographischer Auftrennung und biologischem Testsystem, u. a. für Maytansinoide.

- Nach der Dünnschicht-Trennung der extrahierten Sekundärstoffe (s. 2.7.2.2) wurden fluoreszenzlöschende Banden unter UV-Licht (254 nm) markiert. Die Platte wurde unter dem Laminar Airflow in eine Testschale gelegt. Die Ränder der DC-Platte wurden mit Klebeband umklebt, so dass sich ein Steg bildete.
- Wurde eine mit *P. avellaneum* beimpfte Agarplatte (s. 2.1.6.5) mehrere Tage bei 28 °C inkubiert, bildete sich ein charakteristischer orangeroter Sporenrasen. Auf diesen Sporenrasen wurden 2 ml Tween 80-Lösung (0,05 % m/V) aufgebracht. Mit einem Drigalski-Spatel wurden die Sporen suspendiert und mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen.
- 100 ml Biotest-Medium (s. 2.1.6.5) wurden kurz aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 40 °C mit 200 µl Sporensuspension versetzt. Durch vorsichtiges Mischen wurden die Sporen homogen verteilt und das Medium auf die DC-Platte gegossen. Auf eine gleichmäßige Schichtdicke wurde geachtet.
- Die Platte wurde mehrere Tage bei 28 °C bebrütet und auf eine Wachstumshemmung hin untersucht.

2.7.2.4 Fütterung mit ¹⁴C-markierter Aminohydroxybenzoesäure (AHBA)

3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) wurde bei Fütterungsexperimenten spezifisch in die mC₇N-Einheit von Actamycin (Kibby et al., 1980), Mitomycin (Anderson et al., 1980), Ansamitocin (Hatano et al., 1982) sowie Streptovaricin C (Staley und Rinehart, 1991) eingebaut. Durch die Zugabe von AHBA als radioaktiv markierter Vorstufe zu Kulturanzuchten von *Kitasatospora putterlickiae* konnte ein Einbau in gebildete Sekundärmetabolite untersucht werden.

Die im Hause vorhandene [Carboxyl-¹⁴C₁]-AHBA besitzt eine spezifische Aktivität von 52 mCi/ mol. Bei vollständiger Dotierung weist 1 Mol [Carboxyl-¹⁴C₁]-AHBA eine spezifische Aktivität von 68 mCi auf. Es wurde eine 10 ml-Stammlösung mit einer unbekannte Menge [Carboxyl-¹⁴C₁]-AHBA hergestellt und ihre Aktivität im Szintillationszähler (Wallac 1409,

Wallac Turku, SF) ermittelt (1 μCi entspricht 2 220 000 dpm). Anhand dessen konnte das für die Fütterung zu entnehmende Volumen der Stammlösung berechnet werden.

Für Fütterungsexperimente wurden 4 μCi [Carboxyl- $^{14}\text{C}_1$]-AHBA zu 100 ml Kulturanzucht von *Kitasatospora putterlickiae* gegeben.

Die Anzucht der Vorkultur und das Beimpfen der Hauptkultur von *K. putterlickiae* erfolgten wie unter 2.4.3.2 beschrieben. Die radioaktive Vorstufe wurde 4 h nach dem Beimpfen der Hauptkultur zugefügt. Der Zufütterungszeitpunkt ergab sich aus der Wachstumskinetik nach 2.4.3.3. Danach trat der Stamm nach 4 h in die exponentielle Wachstumsphase ein. Nach 96 h wurde die Anzucht beendet und die Kultur nach 2.7.2.1 aufgearbeitet. Ein radioaktiver Einbau wurde nach 2.7.2.5 untersucht.

2.7.2.5 Autoradiographie

Um einen Einbau von [Carboxyl- $^{14}\text{C}_1$]-AHBA in Sekundärstoffe von *K. putterlickiae* zu untersuchen, wurden die radioaktiven Extrakte dünnschichtchromatographisch getrennt (s. 2.7.2.2). Die DC-Platte wurde nach dem Abdampfen der Lösungsmittel auf einen Autoradiographie-Film (Biomax MS-Film, NEN) unter Lichtausschluss aufgelegt. Dabei wurde der Film nach den Angaben des Herstellers zwischen eine Verstärkerfolie („intensifying screen“) gelegt, auf den die DC-Platte platziert wurde. Der Film wurde in einer Kassette bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ mehrere Tage belichtet und anschließend entwickelt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der biogenetische Ursprung der Maytansinoide in Höheren Pflanzen untersucht.

3.1 Suche nach Maytansinbiosyntheseegenen in *Putterlickia verrucosa*

Wenn bei einem Horizontalen Gentransfer die Gene der Maytansinbiosynthese von Bakterien auf Höhere Pflanzen übertragen wurden, müsste es möglich sein, die Gene der Maytansinbiosynthese in den Pflanzen zu detektieren.

In einer früheren Arbeit (*Hoffmann, 1997*) war bereits ohne Erfolg nach einem AHBA-Synthasegen in *Putterlickia verrucosa* gesucht worden. Dazu wurden degenerierte Oligonukleotide dem Codongebrauch der Pflanzen angepasst und in PCR-Reaktionen mit pflanzlicher DNA eingesetzt. In neueren Studien wurde die Kristallstruktur der rekombinanten AHBA-Synthase aus *A. mediterranei* analysiert. Diese Analysen ergaben weitere Hinweise zu konservierten Bereichen, die für die Funktionalität des Enzyms entscheidend sind (*Eads et al., 1999*).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollten in dieser Arbeit neue degenerierte Oligonukleotide aus hochkonservierten Bereichen der AHBA-Synthase abgeleitet werden. Der pflanzliche Codongebrauch sollte entsprechend berücksichtigt werden.

Außerdem wurde die pflanzliche DNA mit heterologen bakteriellen Sonden der AHBA-Synthase und der Amidsynthase von *A. pretiosum* nach Southern hybridisiert.

Am Institut für Pharmazeutische Biologie Bonn waren zwei verschiedene Zellkulturen von *Putterlickia verrucosa* etabliert (s. 2.3.3). Eine Zellkultur entstand aus der Maytansin führenden Feuchtgewächshauspflanze FGI. Die zweite Kultur wurde aus einem Individuum der Art *Putterlickia verrucosa*, in der Maytansin nicht nachweisbar war, erzeugt. Aus beiden Zellkulturen wurde die genomische DNA nach 2.5.1.3 isoliert und jeweils in den Untersuchungen eingesetzt.

3.1.1 PCR mit degenerierten AHBA-Synthasegen-, „Primern“

Im katalytischen Zentrum der AHBA-Synthase aus *A. mediterranei* ist die Aminosäure Lys188 über eine kovalente Bindung mit dem Cofaktor Pyridoxalphosphat (PLP) verbunden. Die Aminosäure Asp159 bildet mit dem Cofaktor PLP eine Ionenpaar-Bindung. Weitere Aminosäuren (Gly62, Thr63, Leu66, Phe88, Ala161, His162, Ser183, Asn234 und Arg236)

stabilisieren die PLP-Bindung u. a. durch van der Waals'sche Wechselwirkungen (*Eads et al. 1999*). Alle Aminosäuren, die im katalytischen Zentrum an der Bindung des Cofaktors beteiligt sind, sind hoch konserviert. Aus diesen konservierten Bereichen wurden degenerierte Oligonukleotide abgeleitet. Die Oligonukleotide wurden dem Codongebrauch von *Putterlickia verrucosa* angepasst (*Hoffmann, 1997*). Dabei wurden die jeweiligen Aminosäuren der bakteriellen AHBA-Synthasen beibehalten. Nur die dritte Codonposition wurde verändert. Die Oligonukleotide wurden auf den geringeren GC-Gehalt von *Putterlickia verrucosa* eingestellt (s. 2.1.4). Die Lage der Oligonukleotide, bezogen auf das AHBA-Synthasegen von *A. mediterranei*, ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die erwarteten Fragmentgrößen bei PCR-Reaktionen gelten für Bereiche, in denen nur Exons vorkommen. Die PCR-Produkte der pflanzlichen DNA können durch mögliche Introns länger sein.

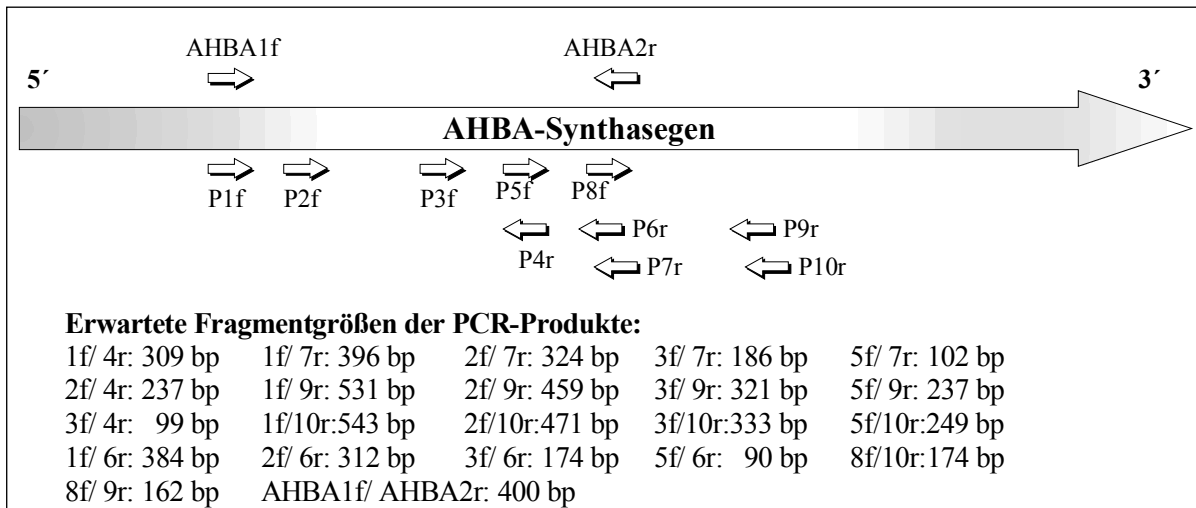


Abbildung 3.1 *Putterlickia*-spezifische degenerierte AHBA-Synthase-„Primer“ relativ zum AHBA-Synthasegen von *A. mediterranei*. Von allen möglichen Oligonukleotid-Kombinationen sind die erwarteten Größen der PCR-Fragmente – ausgehend von dem AHBA-Synthasegen von *A. mediterranei* - angegeben.

PCR-Reaktionen (s. 2.5.5) wurden mit genomischer DNA aus *Putterlickia verrucosa*-Zellkulturen (s. o.) jeweils mit und ohne DMSO-Zusatz für alle Oligonukleotid-Kombinationen durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte nach 2.5.5.4. Die „Annealing“-Temperatur wurde in Abhängigkeit des jeweiligen „Primerpaares“ ausgewählt (40, 43, 46 und 50 °C). Die PCR-Reaktionen wurden bei jeweils zwei Grad niedrigerer „Annealing“-Temperatur wiederholt. Geringere „Annealing“-Temperaturen führen zu einem Verlust an Selektivität der Reaktion. Um möglichst alle PCR-Amplifikate zu erhalten, wurde dieser Qualitätsverlust hingenommen.

Die PCR-Reaktion wurde außerdem mit den degenerierten Oligonukleotiden AHBA1f und AHBA2r (s. 2.1.4) nach 2.5.5.2 durchgeführt. Diese Oligonukleotide wurden von weiteren bakteriellen AHBA-Synthasegenen (inklusive des AHBA-Synthasegens von *A. mediterranei*)

abgeleitet. Diese Untersuchung sollte horizontal transferierte Gene erfassen, die von Bakterien auf *Putterlickia verrucosa* übertragen wurden und die sich im Laufe der Evolution noch nicht dem Codongebrauch von *Putterlickia verrucosa* angeglichen hatten.

Alle PCR-Ansätze wurden gelelektrophoretisch getrennt (s. 2.5.4). Die Amplifikate wurden mit einem Längenstandard verglichen und ihre Größe bestimmt. Alle Fragmente wurden aus dem Agarosegel extrahiert (s. 2.5.2.2) und in den T-Überhangvektor pBlueT kloniert (s. 2.5.7.1 und 2.5.8.3). Die entstandenen Plasmide wurden nach 2.5.14 sequenziert.

Die PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden P1fAHBA und P7rAHBA ergab bei einer „Annealing“-Temperatur von 44 °C ein Fragment von 600 bp. Die Amplifikation mit P3fAHBA und P4rAHBA bei 48 °C lieferte ein 200 bp-Fragment, das sich wiederholt nicht klonieren ließ. Die PCR-Reaktion mit den Bakterien-spezifischen Oligonukleotiden AHBA1f und AHBA2r ergab ein Produkt von 700 bp.

Die DNA-Sequenzen der Plasmide wurde mit dem Softwareprogramm „Blast search“ (s. 2.5.14.5) in alle sechs Leseraster übersetzt (mit Hilfe der Funktion „Blastx“) und auf Homologien mit bakteriellen AHBA-Synthasegenen in einer Datenbankrecherche untersucht. Es konnte keine Homologie der *Putterlickia*-PCR-Fragmente zu bakteriellen AHBA-Synthasegenen festgestellt werden. Die verwendeten Oligonukleotide wurden in den Sequenzen wiedergefunden.

3.1.2 Hybridisierungsversuche nach Southern mit PCR-generierten und Plasmid-abgeleiteten heterologen Sonden

Die chromosomale DNA von *Putterlickia verrucosa* wurde mit Hilfe von Southern Hybridisierungen (s. 2.5.13) auf ein mögliches Vorkommen des AHBA-Synthasegens und eines Amidsynthasegens untersucht. Dazu wurde die genomische DNA aus *Putterlickia verrucosa*-Zellkulturen nach 2.5.1.3 isoliert und jeweils mit den Enzymen EcoRI, BamHI und HindIII üN hydrolysiert (s. 2.5.6.1). Als Kontrolle wurde genomische DNA aus *A. pretiosum* (2.3.1) mit der Endonuklease KpnI hydrolysiert.

Die hydrolysierte DNA wurde nach Southern (s. 2.5.13) mit den DNA-Sonden für die AHBA-Synthase und die Amidsynthase bei unterschiedlich stringenten Bedingungen hybridisiert. Die AHBA-Synthasegen-Sonde wurde in einer PCR-Reaktion (s. 2.5.13.1) mit den Oligonukleotiden AHBA1f/ AHBA2r (2.1.4) aus Cosmid-DNA von *A. pretiosum* (pDDc6, s. Clade, 2001) erstellt. Für die Amidsynthasegen-(asm9)-Sonde wurde das Plasmid pHGF7579 (s. Tab. 2.7) mit KpnI und NdeI hydrolysiert. Das entstandene 0,8 kb asm9-Fragment wurde

mit Hilfe des Klenow-Fragments mit Digoxigenin markiert (s. 2.5.13.2). Selbst unter Bedingungen geringster Stringenz (Vorhybridisierung und Hybridisierung bei 42 °C; Waschschrift mit 2x-Waschpuffer bei RT, vgl. 2.5.13.4) konnte mit keiner der oben genannten, heterologen DNA-Sonden ein Hybridisierungssignal bei *Putterlickia verrucosa* detektiert werden.

Dies deutete daraufhin, dass in *Putterlickia verrucosa* keine Gene der Anfangsschritte der Maytansinbiosynthese vorhanden sind. Daher ist ein Horizontaler Gentransfer unwahrscheinlich. Da ein Gentransfer auch anhand früherer Untersuchungen wenig wahrscheinlich war (*Pullen et al., 2003*), rückte die Betrachtung der mikrobiellen Besiedlung Maytansin führender Pflanzen in den Fokus der Untersuchungen.

3.2 Taxonomische Bestimmung eines Isolates aus der Rhizosphäre einer Maytansin führenden Pflanze

Maytansinoide zeigen ein erratisches Vorkommen in Höheren Pflanzen: In individuellen Pflanzen einer Art konnten Maytansinoide gefunden werden, in anderen Individuen jedoch nicht (*Pullen et al., 2003*). Daher wurde die mikrobielle Besiedlung Maytansin führender Pflanzen in vorherigen Arbeiten (*Pullen, 2000; Meurer, 2002*) intensiv untersucht. Hierbei war das bakterielle Isolat F18-



Abbildung 3.2 F18-98 auf ISP2-Medium

98 aus der Rhizosphäre von *Putterlickia verrucosa* isoliert worden. Mit der DNA aus diesem Stamm konnte ein PCR-Produkt mit Homologien zu bekannten AHBA-Synthasegenen gefunden werden (*Pullen, 2000*). Das Isolat F18-98 (s. Abb. 3.2) sollte in dieser Arbeit mit Hilfe der 16S-rDNA und 16S-23S rDNA-Sequenzierung taxonomisch eingeordnet werden.

3.2.1 16S rRNA-Taxonomie

Die 16S rRNAs sind in Bakterien hoch konserviert. Die ribosomale RNA bildet ausgedehnte intramolekulare Doppelhelix-Bereiche aus, die sich zu definierten dreidimensionalen Strukturen falten. Die ähnliche Form bei vielen Organismen ist in ihrer prinzipiell gleichen Funktion begründet. In der Primärstruktur konnten hoch konservierte als auch variable Regionen innerhalb der Sequenz der 16S rRNA-Gene charakterisiert werden (*Woese, 1987*). Ausgehend von den hoch konservierten Sequenzbereichen wurden von *Edwards et al. (1989)*

universelle Oligonukleotide pA und pH* für die PCR entwickelt. Mit dieser Methode werden phylogenetisch unterschiedliche Bakterien erfasst. Die Sequenzierung der gesamten 16S rDNA von ca. 1500 bp dient der genaueren taxonomischen Bestimmung. Die Sequenz kann in Gendatenbanken mit bereits bekannten 16S rRNA Genen verglichen werden.

Von genomischer DNA des bakteriellen Isolates F18-98 (s. 2.5.1.1) wurde mit den Oligonukleotiden pA und pH* (s. 2.1.4) die 16S rDNA nach 2.5.5.3 amplifiziert. Das PCR-Produkt von 1500 bp Länge wurde elektrophoretisch getrennt (2.5.6) und aus dem Gel extrahiert (s. 2.5.2.2). Das Fragment wurde in den Vektor pGem-T-Easy® nach 2.5.7.1 ligiert, und *E. coli* XL1 blue-Zellen wurden mit dem Plasmid transformiert (s. 2.5.8.3). Aus den entstandenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. 2.5.2.1) und diese durch eine Restriktionsspaltung (s. 2.5.6.1) mit EcoRI analysiert. Bei einer Insertion des 1500 bp-PCR-Produktes wurden drei EcoRI-Fragmente im Gelbild erwartet. Ein 3,0 kb-Fragment wurde dem Vektor zugeordnet. Die anderen beiden Fragmente von ca. 650 bp und 850 bp entstammten der Insertion. Diese beiden EcoRI-Fragmente wurden in einen mit EcoRI hydrolysierten und dephosphorylierten pBluescript® II KS(-)-Vektor subkloniert (Ligation nach 2.5.6.5, Transformation nach 2.5.8.3). Die Plasmid-DNA der Subklone wurde mit den Standard-Oligonukleotiden des Vektors vollständig sequenziert (s. 2.5.14). Die Auswertung der Einzelsequenzen ergab eine vollständige Sequenz von 1554 bp für die 16S rDNA von F18-98 (s. Anhang). Die Klonierungsstrategie für die Sequenzierung der 16S rDNA ist in Abbildung 3.3 verdeutlicht.

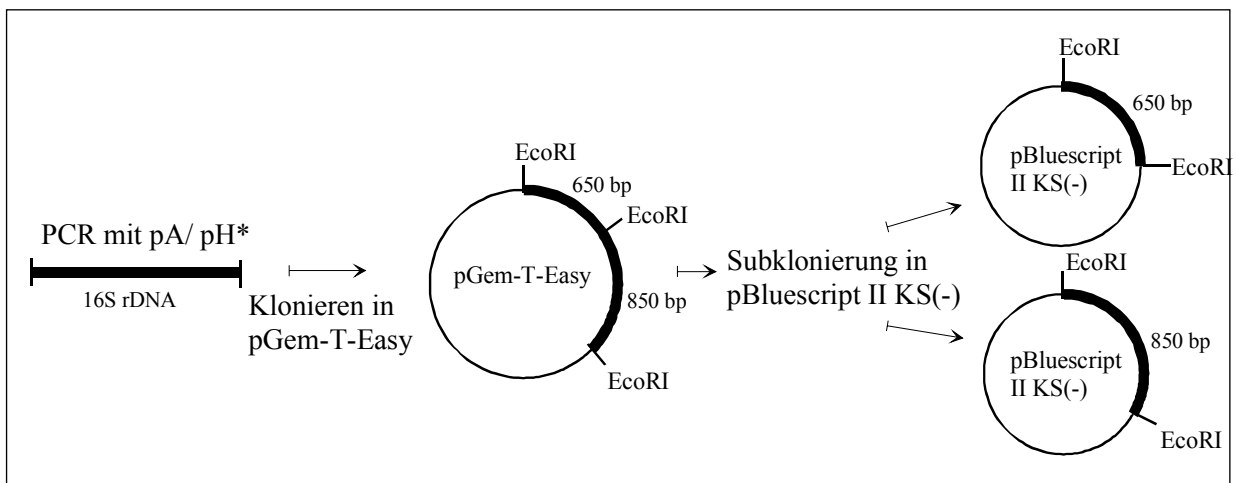


Abbildung 3.3 Klonierungsstrategie für die 16S rDNA Sequenzierung von F18-98

Zur taxonomischen Einordnung von F18-98 wurde eine Homologiesuche auf Nukleotidebene mit dem Computerprogramm „Blast“ (Funktion „BlastN“, s. 2.5.14.5) durchgeführt. Die 16S rDNA von F18-98 zeigte zu 98 % Übereinstimmung mit der 16S rDNA von *Kitasatospora*

azaticus (Stamm IFO13803). 97 % der Nukleotide von F18-98 waren identisch mit *Kitasatospora kifunensis*.

Ein phylogenetischer Stammbaum wurde mit dem Computerprogramm „PHYDIT“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Goodfellow, Universität Newcastle, UK, erstellt (s. Anhang).

3.2.2 Bestimmung der 16S-23S rRNA-Gen Spacerregion

Bakterielle rRNA-Gene besitzen eine sehr ähnliche Struktur. Jedes Gen enthält hintereinander liegende Abschnitte für die 16S rRNA, die 23S rRNA und die 5S rRNA mit kurzen Trennstrecken („Spacern“) dazwischen. Der „Spacerbereich“ zwischen 16S rRNA-Genabschnitt und dem 23S rRNA-Genabschnitt kann für weitere taxonomische Charakterisierungen verwendet werden. Aufgrund von Unterschieden in der Nukleotidsequenz der 16S-23S rDNA „Spacerregion“ lassen sich die nah verwandten Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* klar voneinander unterscheiden. Neun charakteristische Nukleotide der 16S-23S rDNA „Spacerregion“ sind einzig in der Gattung *Kitasatospora* zu finden (Zhang *et al.*, 1997).

Da das Isolat F18-98 nach der 16S rDNA-Sequenzierung hohe Homologien zu *Kitasatospora* Spezies aufwies, wurden Untersuchungen zur 16S-23S rDNA „Spacerregion“ durchgeführt.

Die genomische DNA von F18-98 (isoliert nach 2.5.1.1) und von *Streptomyces collinus* (als Kontrolle für eine Art der Gattung *Streptomyces*) wurde mit den Oligonukleotiden 781-796F und revSKSPr (s. 2.1.4) nach 2.5.5.3 (Protokoll für die 16S rDNA-PCR) amplifiziert. Das Oligonukleotid 781-796F zielt auf die 16S rDNA (Nukleotide 781-796; *E. coli*-Zählung). Das reverse Oligonukleotid revSKSPr wurde vom Ende des 16S-23S rRNA „Spacers“ abgeleitet. Eine PCR-Amplifikation führte bei dieser positiven Kontrolle bei beiden Organismen zu einem Fragment von ca. 1 kb. Eine spezifische PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 1463-1480F und revKSPr nach dem Protokoll für die 16S-23S „Spacerregion“ (s. 2.5.5.3) sollte nur bei Arten der Gattung *Kitasatospora* zu einem Produkt von ca. 250-300 bp führen (vgl. Zhang *et al.*, 1997). Nach der gelelektrophoretischen Trennung (2.5.4) der PCR-Reaktionen wurde bei *S. collinus* kein Amplifikat in der spezifischen Reaktion detektiert. Der Stamm F18-98 zeigte das *Kitasatospora*-spezifische Produkt von ca. 250 bp.

Zur Sequenzierung der 16S-23S rDNA „Spacerregion“ wurde chromosomale DNA des Stammes F18-98 als DNA-Matrize für eine PCR-Amplifikation nach 2.5.5.3 eingesetzt. Die dazu verwendeten Oligonukleotide 33-48R 23S und 1525-1542F 16S (s. 2.1.4) enthielten am 5'-Ende jeweils eine BamHI (GGATTC) -Restriktionsschnittstelle (vgl. Zhang *et al.*, 1997).

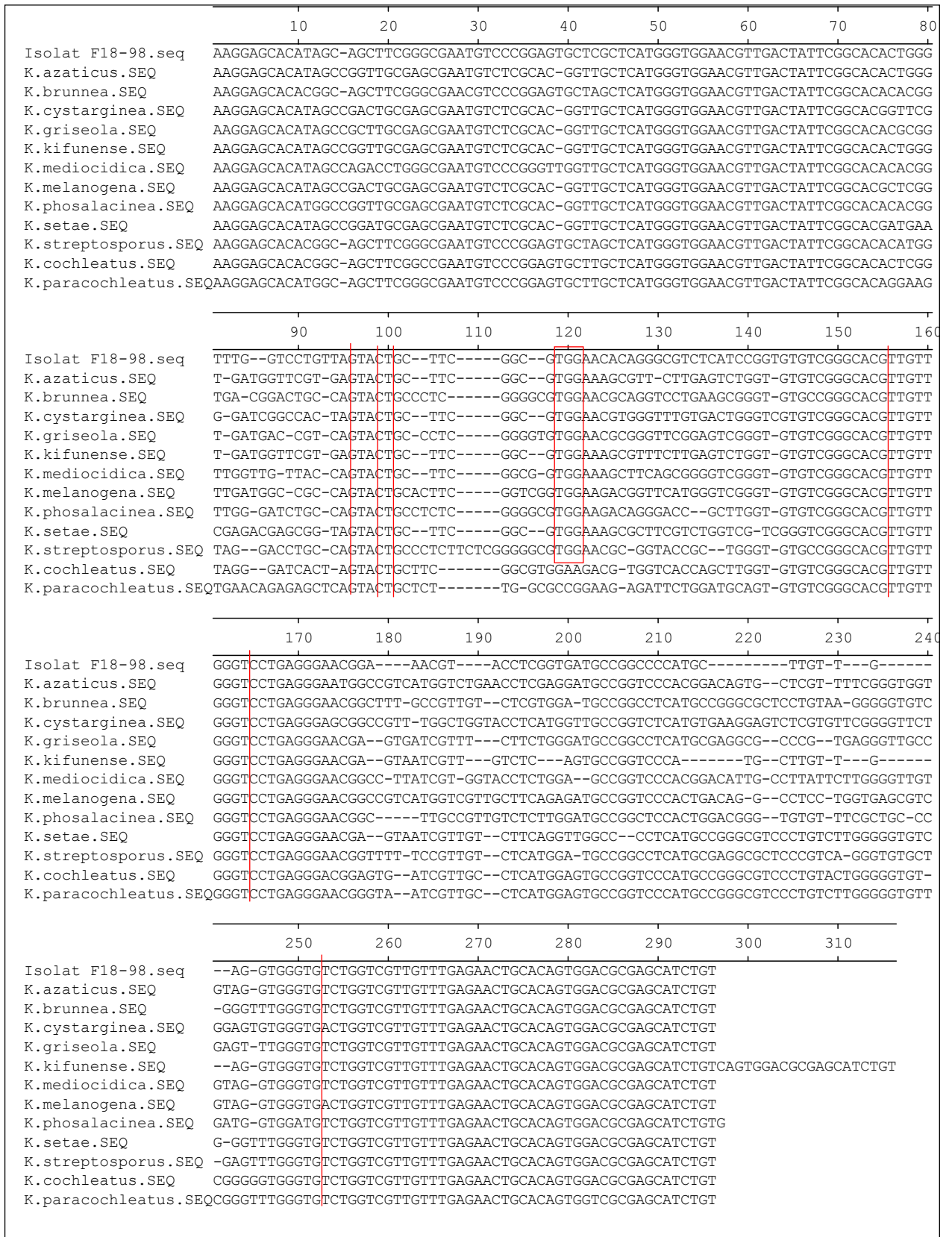


Abbildung 3.4 Sequenzvergleiche der 16S-23S rDNA „Spacerregion“ für *Kitatospora* Arten und dem Isolat F18-98 nach Zhang et al. (1997). Die für *Kitatospora* Arten spezifischen Nukleotide wurden markiert.

Nach der gelelektrophoretischen Aufreinigung (s. 2.5.4 und 2.5.2.2) wurde das PCR-Produkt von ca. 300 bp mit BamHI restringiert (s.2.5.6.1) und in den mit BamHI hydrolysierten,

dephosphorylierten Vektor pBluescript[®] II KS(-) kloniert (s. 2.5.6.5 und 2.5.8.3). Aus den generierten Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. 2.5.2.1) und mit der Endonuklease BamHI hydrolysiert. Es wurde auf eine Insertion von 300 bp geprüft. Das positive Konstrukt Spacer5 (s. Tab. 2.8) wurde vollständig sequenziert (s. 2.5.14). Mit dem Computerprogramm „MegAlign“ (Clustal-Methode, Lasergene, DNASTAR, s. 2.5.14.5) wurde die Sequenz der 16S-23S rDNA „Spacerregion“ des Isolates F18-98 mit den 16S-23S rDNA-„Spacern“ der bekannten *Kitasatospora* Arten verglichen. Die neun für *Kitasatospora* Arten charakteristischen Nukleotide waren in der Sequenz des bakteriellen Isolates F18-98 vorhanden (s. Abb. 3.4). Damit konnte das Isolat F18-98 anhand der Sequenzdaten taxonomisch in die Gattung *Kitasatospora* eingeordnet werden.

Weitergehende chemotaxonomische Charakterisierungen des Bakterienstammes wurden von Frau Dr. Groth am Hans-Knöll-Institut in Jena durchgeführt. Ihren Ergebnissen zufolge handelt es sich bei dem Organismus um eine neue Art der Gattung *Kitasatospora*. Die Art wurde als *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 bezeichnet und charakterisiert (Groth *et al.*, 2003).

3.3 Untersuchungen zum Sekundärstoffspektrum von *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

Das Sekundärstoffspektrum des Bakterienstammes *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 sollte im Hinblick auf eine mögliche Maytansinoidproduktion untersucht werden. Neben chemisch-analytischen Arbeiten sollte auch ein biologisches Testsystem verwendet werden, um antibiotisch aktive Substanzen zu erfassen.

Da bereits viele Bakterien der *Streptomycetaceae* bezüglich ihrer Antibiotikabildung untersucht wurden, konnte auf dieses Wissen zurückgegriffen werden, um möglichst geeignete Anzuchtbedingungen für *K. putterlickiae* F18-98 zu finden:

- Bei den *Streptomycetaceae* ist eine zeitliche Kopplung der Sekundärstoffproduktion mit der morphologischen Differenzierung zu beobachten (Chater und Bibb, 1997). Das vegetative Substratmycel dieser Bakterien differenziert sich zum Luftmycel, wenn die Milieubedingungen schlechter werden. Aus dem Luftmycel können dann Sporen gebildet werden. Bei submersen Kultivierungen beginnt die Produktion von antibiotisch aktiven

Substanzen, sobald die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht (*Kieser et al., 2000*).

- Viele Bakterienstämme der *Streptomycetaceae*, wie z.B. *Streptomyces coelicolor*, bilden nicht nur einen Sekundärstoff, sondern mehrere pharmakologisch aktive Naturstoffe. Um die Stämme auch unter Laborbedingungen zur Produktion ihres gesamten Naturstoffspektrums zu aktivieren, wurde in der Arbeitsgruppe von Zeek (Universität Göttingen) das so genannte „OSMAC“-Konzept („one strain - many compounds“) entwickelt. Bei diesem Konzept wird ein Bakterienstamm unter den verschiedensten Bedingungen kultiviert und jeweils das Sekundärstoffspektrum analysiert. Es werden u. a. die Zusammensetzungen der Medien oder auch die Sauerstoffpartialdrücke in Fermenterkultivierungen variiert (*S. Grond*, persönliche Mitteilung).

Unter diesen Aspekten wurde auch der Stamm *Kitasatospora putterlickiae* in verschiedenen Medien kultiviert, um ein möglichst breites Sekundärstoffspektrum zu erhalten. Zusätzlich wurde eine Wachstumskinetik des Stammes für eine submerse Kultivierung erstellt, um zu prüfen, wann *K. putterlickiae* die stationäre Phase erreicht.

3.3.1 Erstellen einer Wachstumskinetik von *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

Wachstumskinetiken von *K. putterlickiae* wurden für die Medien erstellt, die bei einem Fütterungsversuch mit radioaktiv markierter AHBA verwendet werden sollten (s. 2.1.6.4 und 3.3.2). Entsprechend erfolgten die Kultivierungen unter den Bedingungen, die später bei den Untersuchungen zur Sekundärstoffproduktion von *K. putterlickiae* gewählt wurden (2.4.3.2).

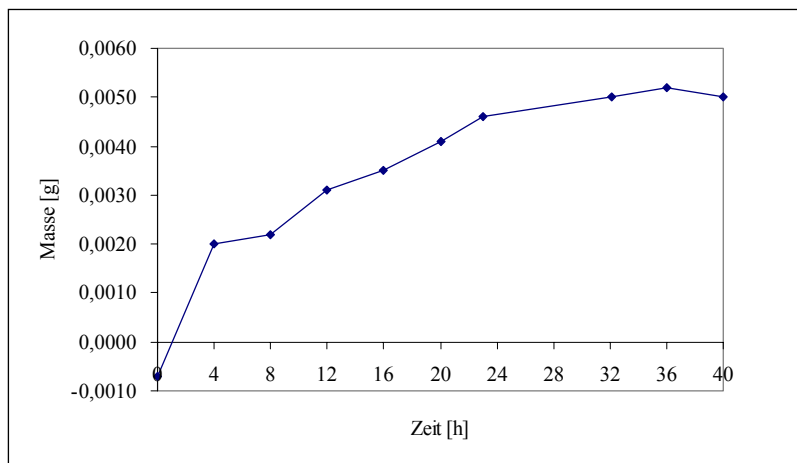


Abbildung 3.5 Wachstumsverhalten von *K. putterlickiae* F18-98 in NL136-Medium (28°C und 200 rpm im Rundschtüttler).

Die Wachstumskurve wurde nach 2.4.3.3 ermittelt. Alle 4 h wurden Proben mit einem Volumen von 1 ml entnommen und nach 2.4.3.3 weiter bearbeitet. Die Wachstumskurven des Stammes in den verschiedenen Medien wurden über 40 h erstellt, um den Beginn der stationären Wachstumsphase zu erfassen.

Unabhängig vom verwendeten Medium lag die exponentielle Wachstumsphase für *K. putterlickiae* zwischen 4 h und 24 h. Dann trat der Stamm in die stationäre Wachstumsphase

ein. Als Beispiel ist das Wachstumsverhalten von *K. putterlickiae* im Medium NL136 (s. 2.1.6.4) in Abbildung 3.5 dargestellt.

3.3.2 Einbau radioaktiv markierter AHBA in Sekundärstoffe von *K. putterlickiae*

Mit dem aus *K. putterlickiae* amplifizierten PCR-Produkt mit Homologien zu AHBA-Synthasen lag bereits ein Hinweis auf ein Gen vor, das für ein Schlüsselenzym von Ansamycinbiosynthesen kodiert. Der Einbau der radioaktiven Vorstufe [Carboxyl- $^{14}\text{C}_1$]-AHBA in Sekundärstoffe von *K. putterlickiae* wurde untersucht, um spezifisch die Naturstoffe zu finden, die eine mC_7N -Einheit besitzen (s. 1.1).

In Anlehnung an das „OSMAC“-Konzept (*S. Grond*, persönliche Mitteilung) wurden die Fütterungsversuche in jeweils verschiedenen Medien (s. 2.1.6.4), wie unter 2.7.2.4 beschrieben, durchgeführt. [Carboxyl- $^{14}\text{C}_1$]-AHBA wurde 4 h nach dem Beginn der Kultivierung des Stammes dem jeweiligen Medium zugefügt (s. 2.7.2.4). Nach diesem Zeitraum trat der *K. putterlickiae* in die exponentielle Wachstumsphase ein (s. 3.3.1). Die Gene des Sekundärstoffwechsels werden meist in der spätexponentiellen Phase exprimiert (*Kieser et al.*, 2000). Längere Inkubationszeiten erschienen daher sinnvoll. Die Kulturen wurden 96 h inkubiert. Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte nach 2.7.2.1. Anschließend wurden die extrahierten Sekundärstoffe dünnschichtchromatographisch getrennt (s. 2.7.2.2). Es wurden sowohl die wässrigen Extrakte als auch die Extrakte der Ethylacetatphase untersucht. Um die radioaktiv markierten Produkte zu detektieren, wurde die entwickelte DC-Platte auf einen Autoradiographie-Film aufgelegt (s. 2.7.2.5). Der Film wurde mehrere Tage belichtet und anschließend entwickelt (2.7.2.5).

Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung wurden verschiedene Fließmittelsysteme entwickelt und untersucht (s. 2.7.2.2). Ein Gemisch aus Toluol, Aceton und Ameisensäure (60/ 39/ 1) trennte die radioaktiv markierten Sekundärstoffe besonders gut. Aus diesem Grund wurde diese mobile Phase standardmäßig eingesetzt. Die Extrakte aus der Ethylacetatphase wurden außerdem mit einem Gemisch aus Chloroform:Methanol (95/ 5) dünnschichtchromatographisch getrennt. Als Vergleich wurde [Carboxyl- $^{14}\text{C}_1$]-AHBA gleichzeitig chromatographiert. Maytansin oder Ansamitocin P3 sind aufgrund ihrer Lipophilie in der Ethylacetatphase zu erwarten. Daher wurden diese Substanzen als Vergleiche nur bei der Trennung der Extrakte der Ethylacetatphase eingesetzt.

In den Extrakten aus *K. putterlickiae* war kein radioaktiv markierter Sekundärstoff nachweisbar, der die gleichen Trenneigenschaften wie Maytansin oder Ansamitocin P3 aufwies.

In der Abbildung 3.6 ist ein Ausschnitt eines Autoradiogramms für eine dünnenschichtchromatographische Trennung der wässrigen Extrakte (nach Ethylacetat-Extraktion der Kulturanzuchten ohne vorheriges Ansäuern, vgl. 2.7.2.1 und 2.7.2.2) dargestellt. Als Fließmittel diente das Gemisch aus Toluol:Aceton:Ameisensäure (60/ 39/ 1). Nur in einigen Medien wurde die radioaktiv markierte Vorstufe umgesetzt. Bei Kultivierungen mit den Medien M2, M2Ca, M2-Glycerin, NL1358 und mit dem Hafermedium entstand jeweils ein radioaktives Produkt, das sich von der zugefügten Vorstufe [Carboxyl- $^{14}\text{C}_1$]-AHBA unterschied. Der Rf-Wert des radioaktiven Produktes lag jeweils bei 0,24.

In allen Medien, bei denen eine Produktbildung stattfand, war Malzextrakt enthalten. Ausnahmen waren das Hafermedium und das Medium NL1358, bei denen nur in einem geringen Maße ein radioaktiv markierter Sekundärstoff gebildet wurde. Eine besonders starke Produktbildung schien im M2-Glycerin-Medium vorzuliegen, wie durch die Größe und Stärke der Schwärzung im Autoradiogramm erkennbar war (beim Auftrag gleicher Konzentrationen der einzelnen Extrakte). Das Medium M2-Glycerin enthält anstelle von Glucose Glycerin.

Es unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung nur in dieser Komponente vom M2Ca-Medium. *K. putterlickiae* könnte einer Katabolitrepression unterliegen, bei der Substanzen des Primärstoffwechsels die Produktion von Sekundärmetaboliten unterbinden (s. 4.3.1).

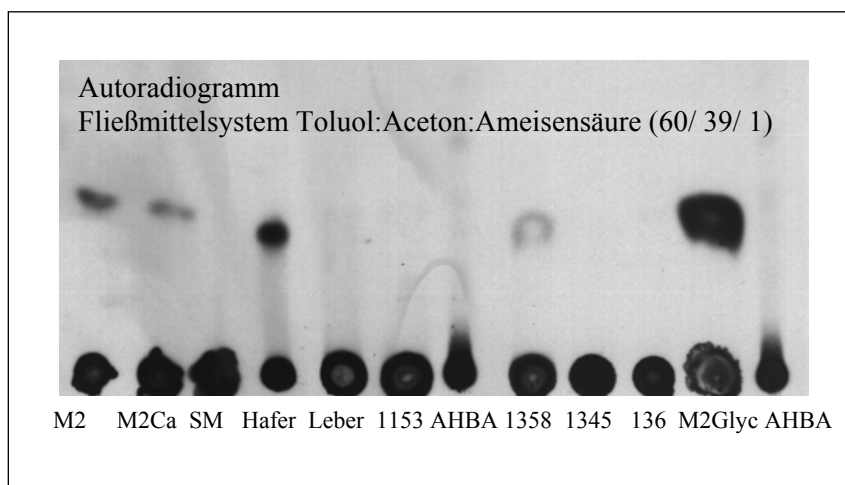


Abbildung 3.6 Autoradiogramm der wässrigen Phase. Aufarbeitungen unterschiedlicher Kultivierungen von *K. putterlickiae* mit ^{14}C -AHBA.

Da das Medium M2-Glycerin für die Sekundärstoffproduktion besonders geeignet erschien, wurde es für alle weiteren Kultivierungen verwendet.

Wurden die Extrakte der Ethylacetatphase nach vorherigem Ansäuern der Kultur (s. 2.7.2.1) dünnschichtchromatographisch getrennt und autoradiographiert (s. 2.7.2.2 und 2.7.2.5), konnten mehrere radioaktiv markierte Produkte, die sich von [Carboxyl- ^{14}C]-AHBA unterschieden, detektiert werden. Mit dem Fließmittelsystem Toluol: Aceton: Ameisensäure (60/ 39/ 1) ergaben sich für diese Produkte Rf-Werte von 0,31; 0,43; 0,49 und 0,61 (s. Abb. 3.7). Die Sekundärstoffe wurden in unterschiedlichen Mengen produziert. Die prominenteste Bande lag bei einem Rf-Wert von 0,31.

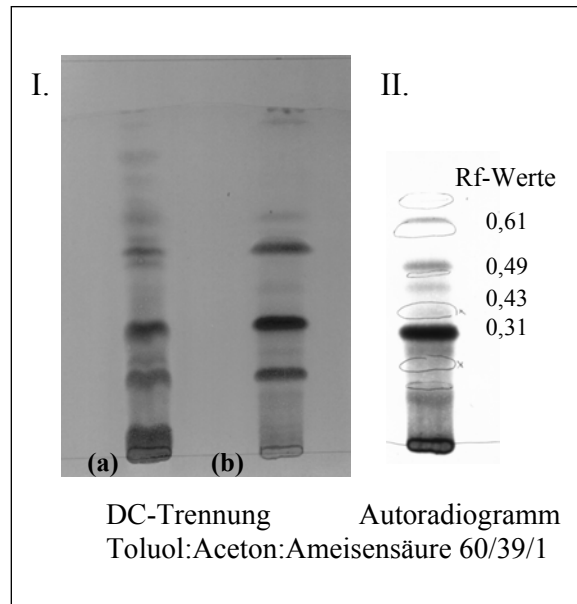


Abbildung 3.7 DC (I.) u. Autoradiogramm (II.) der Ethylacetatphase. Aufarbeitung von Kultivierungen mit M2-Glycerin-Medium (mit (b) u. ohne Zugabe (a) von ^{14}C -AHBA). Die DC-Platte wurde mit Ehrlichs Reagenz besprüht.

Zur Strukturaufklärung der radioaktiv markierten Metaboliten wurde der Stamm *K. putterlickiae* an das Hans-Knöll-Institut in Jena gegeben. Bisher wurde die Bildung von Aminohydroxybenzalkohol nachgewiesen (*I. Sattler*, persönliche Mitteilung). Geringe Produktionsraten und die Umstellung der Kultivierung auf den Fermentermaßstab führten zu Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Arbeiten zur Strukturaufklärung sind noch nicht abgeschlossen.

3.3.3 Untersuchung des Stammes *K. putterlickiae* auf seine biologische Aktivität mittels Bioautographie

Maytansin und Ansamitocin P3 hemmen das Wachstum von *Penicillium avellaneum* UC 4376 (*Hanka et al.*, 1974). Die Bioautographie mit dem Pilzstamm (s. 2.7.2.3) wurde angewandt, um antibiotisch wirksame Sekundärstoffe zu finden.

Der Stamm *K. putterlickiae* wurde unter den gleichen Bedingungen kultiviert, die bei den Fütterungsversuchen mit radioaktiv markierter AHBA verwendet wurden (s. 2.4.3.2). Die Kultivierung erfolgte jedoch nur im M2-Glycerin-Medium (s. 2.1.6.4). Aus den Kulturüberständen wurden die Sekundärmetabolite mit Ethylacetat extrahiert (s. 2.7.2.1). Nach der dünnschichtchromatographischen Trennung (s. 2.7.2.2) wurde die Bioautographie

durchgeführt. Bei einer Bioautographie mit Extrakten aus der Ethylacetatphase wurden bei einer Kultivierung zwei Hemmzonen für Sekundärstoffe von *K. putterlickiae* sichtbar (s. Abb. 3.8). Als Fließmittelsystem wurde das Gemisch aus Chloroform und Methanol (95/ 5)

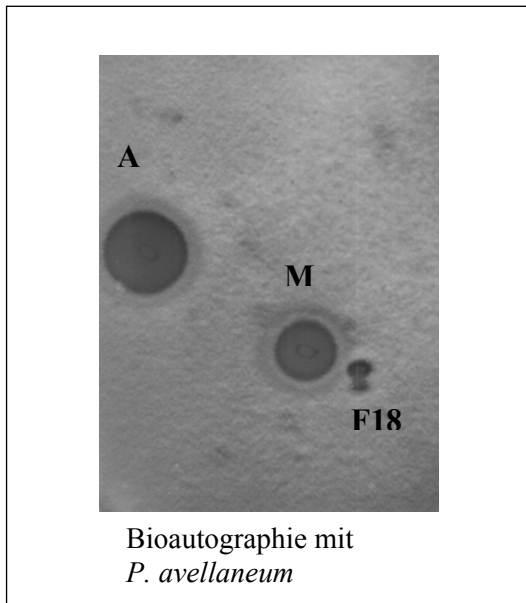


Abbildung 3.8 Bioautographie von Extrakten der Ethylacetatphase. Anzuchten von *K. putterlickiae* in M2-Glycerin. DC mit CHCl₃: Methanol (95/5). Hemmzonen für Ansamitocin P3 (A), Maytansin (M) u. einen Extrakt von *K. putterlickiae* F18-98 (F18).

verwendet. Die Hemmzonen sind im Vergleich zu Hemmzonen der Referenzen Maytansin (M) und Ansamitocin (A) sehr gering. Nicht für jeden Extrakt der Ethylacetatphase konnte die antibiotische Aktivität gezeigt werden, obwohl gleiche Bedingungen für die Anzucht und die Aufarbeitung der Kulturen gewählt wurden. Spätere Untersuchungen bestätigten, dass nur ältere Kulturen von *K. putterlickiae*, die zum Inokulieren der Vorkulturen eingesetzt wurden, Sekundärstoffe mit antibiotischer Aktivität produzieren. Das gebildete Sekundärstoffspektrum in *K. putterlickiae* scheint somit auch stark von der jeweiligen Wachstumsphase abhängig zu sein.

Mit einer älteren Kultur von *K. putterlickiae* wurde erneut ein Fütterungsversuch für [Carboxyl-¹⁴C₁]-AHBA durchgeführt. Bei der anschließenden Bioautographie konnte gezeigt werden, dass ein gebildeter radioaktiv markierter Sekundärstoff auch antibiotische Aktivität gegenüber *Penicillium avellaneum* aufwies (S. Wings, persönliche Mitteilung).

3.4 Molekularbiologische Untersuchungen am Stamm *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

3.4.1 Die AHBA-Synthase aus *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

In der DNA des Stammes *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 war ein PCR-Fragment mit Homologien zu bakteriellen AHBA-Synthasegenen nachweisbar (Pullen, 2000). In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob es sich bei der putativen AHBA-Synthase um ein funktionsfähiges Enzym handelt. Die AHBA-Synthase katalysiert im letzten Schritt des Aminoshikimatweges die Dehydratisierung und Enolisierung von Aminodehydroshikimisäure (aDHS) zu AHBA (Kim et al., 1998). Alle bisher bekannten AHBA-Synthasegene enthalten

ein charakteristisches Sequenzmotiv (s. 4.4.1), das auch die Aminotransferasen des Sekundärstoffwechsels („secondary metabolic aminotransferases“, SMAT; *Piepersberg, 1994*) besitzen. Zu dieser Proteinfamilie gehören PMP-abhängige Dehydratasen und PLP-abhängige Aminotransferasen. Die Enzyme sind oft an der Bildung von Desoxyzuckern oder von Aminocyclitolen in Antibiotikabiosynthesen beteiligt (*Liu et al., 1994; Ahlert et al., 1997*). Unterschiede zwischen AHBA-Synthasen und den Proteinen der SMAT-Familie lassen sich bisher nur in Aktivitätsmessungen belegen.

In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollte die AHBA-Synthase aus *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 vollständig sequenziert und anschließend überexprimiert werden, um die katalytische Aktivität zu testen.

3.4.1.1 Anlage einer Cosmid-Bank zur Sequenzierung des AHBA-Synthasegens

Die Cosmid-Bank ist eine rekombinante Genbibliothek, bei der DNA-Fragmente von 35-50 kb in Cosmid-Vektoren (Plasmide mit *cos*-Regionen aus λ -Phagen) inseriert werden. Die ligierte DNA wird in vitro in infektiöse Phagenköpfe verpackt. Dabei entstehen zunächst so genannte Concatemere, fortlaufend lange DNA-Ketten. Über die *cos*-Stellen sind Vektoranteile (mit inserierter genomischer DNA) miteinander verknüpft. Eine Terminase des λ -Phagen schneidet die Concatemere im Abstand von ca. 45 kb an den *cos*-Regionen. *E. coli*-Zellen werden analog einer Phagen-Transduktion infiziert. Nach der Infektion zirkularisiert die zuvor lineare Cosmid-DNA über die *cos*-Regionen. Die rekombinante Cosmid-DNA kann dann wie ein Plasmid repliziert werden, ohne dass Phagenfunktionen exprimiert werden.

Die Cosmid-Bank wurde nach 2.5.12 angelegt. Es wurden 3000 Cosmid-Klone aus dem Genom von *K. putterlickiae* amplifiziert. Die Abbildung 3.9 zeigt zusammenfassend die einzelnen Herstellungsschritte.

3.4.1.2 Identifizierung und Analyse von Cosmiden mit AHBA-Synthasegen

Zur Analyse der Cosmid-Bank (s. 2.5.12.7) wurde eine Kolonie-Hybridisierung durchgeführt, um nach Cosmiden mit einem AHBA-Synthasegen zu suchen. Dazu wurde eine homologe Sonde für die AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* erstellt:

Aus genomischer DNA von *K. putterlickiae* wurde das 400 bp-AHBA-Synthasegen-Fragment in einer PCR-Reaktion (s. 2.5.5.2) mit den Oligonukleotiden AHBA1f/ AHBA2r amplifiziert und in den Vektor pGem-T-Easy[®] kloniert (s. 2.5.7.1 und 2.5.8.3). Das generierte rekombinante Plasmid A18PCR₄₀₀TB25.4.4 (s. Tab. 2.8) wurde vollständig sequenziert (s.2.5.14). Sequenzvergleiche mit dem Softwareprogramm „Blast“ (2.5.14.5) bestätigten, dass

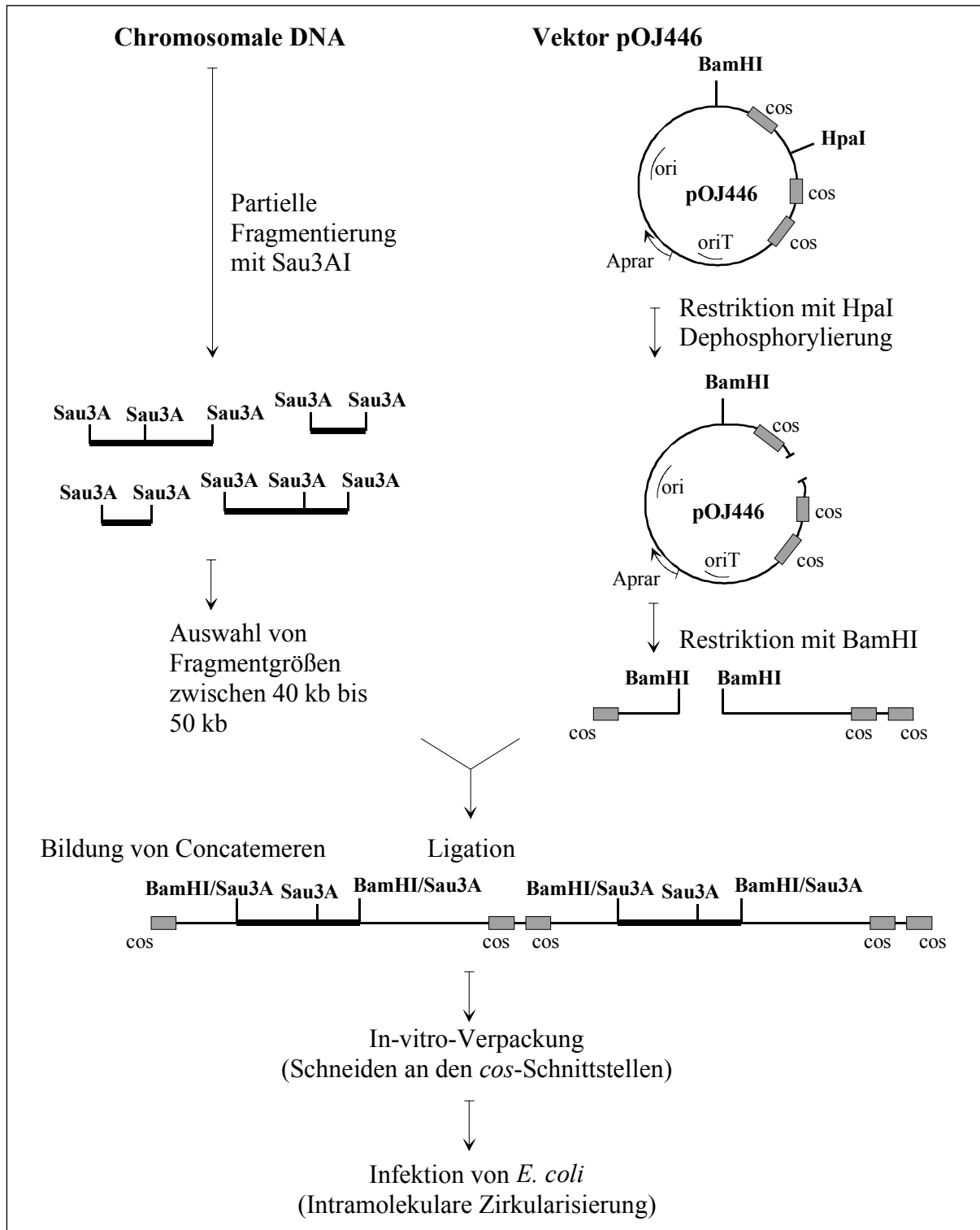


Abbildung 3.9 Prinzip der Cosmid-Klonierung mit dem Cosmid-Vektor pOJ446

das Amplifikat Homologien zu AHBA-Synthasegenen aufweist.

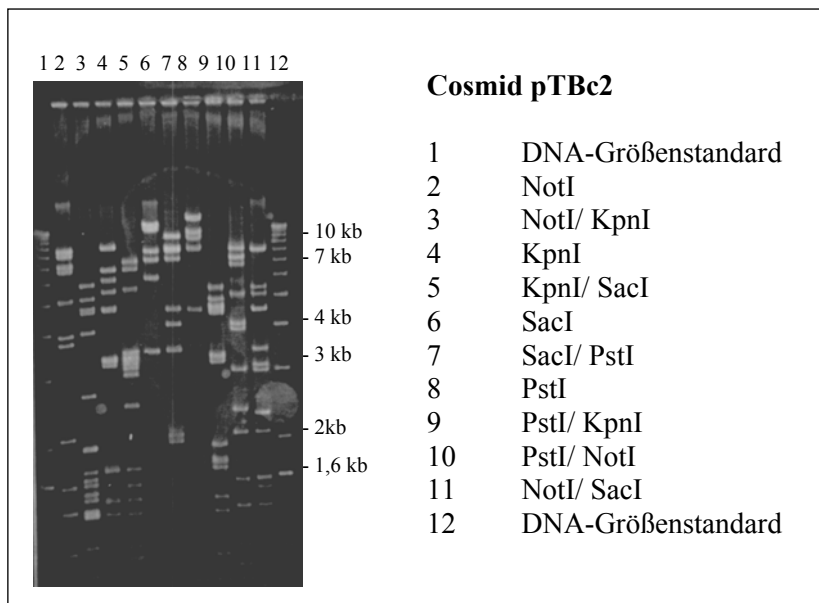
Das Plasmid A18PCR₄₀₀TB25.4.4 wurde zur Herstellung einer homologen Sonde für die AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* verwendet. In einer PCR-Reaktion (s. 2.5.5.2) mit dem Plasmid A18PCR₄₀₀TB25.4.4 als DNA-Matrize und den Oligonukleotiden AHBA1f/ AHBA2r wurde das 400 bp-Fragment amplifiziert. Das Fragment wurde nach gelelektrophoretischer Trennung (2.5.4) aus dem Agarosegel isoliert (2.5.2.2). Dann wurde es direkt durch das

Klenow-Fragment mit 32-Phosphor (s. 2.5.13.3) radioaktiv markiert. Mit dieser homologen Sonde wurden die Cosmid-Klone nach 2.5.12.7 hybridisiert.

Fünf Cosmid-Klone (pTBc1 bis pTBc5; Tab. 2.6) hybridisierten unter stringenten Bedingungen (Prä- und Hybridisierung bei 68 °C; 0,1x-Waschpuffer bei 68 °C; s. 2.5.13.5) mit der homologen AHBA-Synthase-Sonde. Zur ersten Überprüfung der fünf Cosmide wurde die DNA der Klone mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert (2.5.6.1) und die Längen der entstandenen Fragmente im Agarosegel bestimmt (2.5.4):

- Das Cosmid pTBc5 wies bei dieser Analyse nur eine Insertion von ca. 8 kb auf. Deshalb wurde das Cosmid in weiteren Untersuchungen nicht mehr verwendet.
- Bei der Kartierungsanalyse (s. 2.5.12.8) des Cosmids pTBc3 konnten Unstimmigkeiten im Vergleich mit den anderen Cosmiden nicht geklärt werden. Da bei der Klonierung größerer DNA-Fragmente eine Rearrangierung der DNA durchaus auftreten kann, wurde davon ausgegangen, dass bei der Herstellung des Cosmids pTBc3 die DNA rearrangiert wurde. Das Cosmid pTBc3 wurde nicht mehr näher untersucht.
- In die Cosmide pTBc1 und pTBc2 wurde genomische DNA von ca. 55 kb bzw. 54,6 kb Länge inseriert. Die Restriktionsanalysen der beiden Cosmide ergaben ein sehr ähnliches Bild. Die Cosmid-DNA der beiden Cosmide ist bis auf einen 1,2 kb-Bereich identisch und deckt somit fast den gleichen Bereich genomischer DNA ab.

Um eine Subklonierung für die nachfolgende Sequenzierung des AHBA-Synthasegens zu ermöglichen, wurde für das Cosmid pTBc2 eine Restriktionskarte erstellt (s. 2.5.12.8). Die



Cosmid-DNA wurde dazu mit den Enzymen SacI, PstI, KpnI und NotI in separaten Restriktionsansätzen hydrolysiert. In weiteren Ansätzen wurde die DNA dann in Doppelrestriktionen mit den jeweiligen Enzymkombinationen gespalten. Die restringierte DNA wurde im Agarosegel getrennt (s. 2.5.12.7). Die Längen der erhaltenen

Abbildung 3.10 Charakteristische Kartierungsanalyse für das Cosmid pTBc2. Hydrolyse der Cosmid-DNA mit den Enzymen NotI, KpnI, SacI und PstI in Einzel- und Doppelrestriktionen.

DNA-Fragmente wurden bestimmt und miteinander verglichen. Konnten Fragmente gleicher Größe detektiert werden, war zunächst davon auszugehen, dass es sich um denselben DNA-Abschnitt handelte. In Abbildung 3.10 ist eine typische gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten nach Hydrolyse des Cosmids pTBc2 dargestellt.

Für die Einzelrestriktionen von pTBc2 mit den Endonukleasen PstI und SacI sind die Ergebnisse in Tabelle 3.1 zusammengestellt. Im Anschluss an die Agarose-Gelelektrophorese wurden die Restriktionsfragmente in Southern Hybridisierungen (s. 2.5.13.3) mit der homologen AHBA-Synthasegen-Sonde hybridisiert. Die DNA-Fragmente, die ein Hybridisierungssignal mit dieser Sonde gaben, sind in Tabelle 3.1 fett markiert.

Zusätzlich wurde die Cosmid-DNA von pTBc2 mit der selten schneidenden Endonuklease NcoI hydrolysiert. Da der Cosmid-Vektor pOJ446 Schnittstellen für XbaI und SpeI enthält, wurden in Doppelrestriktionen NcoI mit XbaI bzw. NcoI mit SpeI kombiniert. Die Enzyme XbaI und SpeI flankieren die BamHI-Klonierungsstelle (Vektorkarte s. Anhang), in die die chromosomale DNA von *K. putterlickiae* inseriert wurde. Wird mit XbaI bzw. SpeI hydrolysiert, werden Vektoranteile von der inserierten DNA abgetrennt. Die DNA-Fragmente, die bei diesen Hydrolysen erhalten wurden, sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Die Fragmente aus den Doppelrestriktionen wurden nach der Agarose-Gelelektrophorese aus dem Gel extrahiert (s. 2.5.12.7). Jedes einzelne Fragment (z.B. 7 kb; 11,5 kb; 16 kb; 21 kb aus der Restriktion mit NcoI/ XbaI und 19,5 kb; 13 kb aus der Restriktion mit NcoI/ SpeI von pTBc2; vgl. Tabelle 3.1) wurde mit den Endonukleasen PstI und SacI hydrolysiert und im Agarosegel erneut analysiert.

Cosmid pTBc2				
NcoI	NcoI/ XbaI	NcoI/ SpeI	PstI	SacI
32,5 *	21 *	19,5 *	17,8	13,5 *
16	16	16	12,2 *	12,6 *
7	11,5	13	11,2	9,2
	7	7	8,7	8
			3,9 *	6,2
				3,4

Tabelle 3.1 Zusammenfassung der durch Restriktionsspaltungen erhaltenen Ergebnisse für das Cosmid pTBc2. Angabe der Fragmentlängen in [kb]. Für die Enzyme PstI und SacI sind nur die Einzelrestriktionen dargestellt. Die mit Stern gekennzeichneten Fragmente enthalten Anteile des Cosmid-Vektors pOJ446. Fett markierte Fragmente kennzeichnen DNA-Abschnitte, die mit der AHBA-Synthasegen-Sonde ein Hybridisierungssignal ergaben.

Die Schnittstellen der Endonukleasen auf dem Cosmid pTBc2 und somit die Anordnung der einzelnen DNA-Fragmente ließen sich für PstI, SacI und NcoI aus den erhaltenen Daten rechnerisch ermitteln. Durch weitere Restriktionsanalysen (mit Enzymkombinationen, die vorher nicht gewählt wurden) konnte die Kartierung überprüft werden. In Abbildung 3.11 sind die Restriktionskarten für das Cosmid pTBc2 dargestellt. Die Lage der AHBA-Synthase

ist eingezeichnet. Eine weitere detaillierte Cosmid-Karte findet sich im Anhang. Dort sind auch die Schnittstellen für die Endonuklease NotI aufgeführt, soweit sie sich sicher aus den bisherigen Daten ermitteln ließen. Da das Enzym in einigen DNA-Abschnitten sehr oft schneidet, war nicht in allen Bereichen eine genaue Zuordnung möglich. Aus diesem Grund wurden nicht alle vorhandenen Schnittstellen eingezeichnet. Dies gilt ebenso für die Endonuklease KpnI. Auf eine Restriktionskarte für dieses Enzym wurde daher verzichtet.

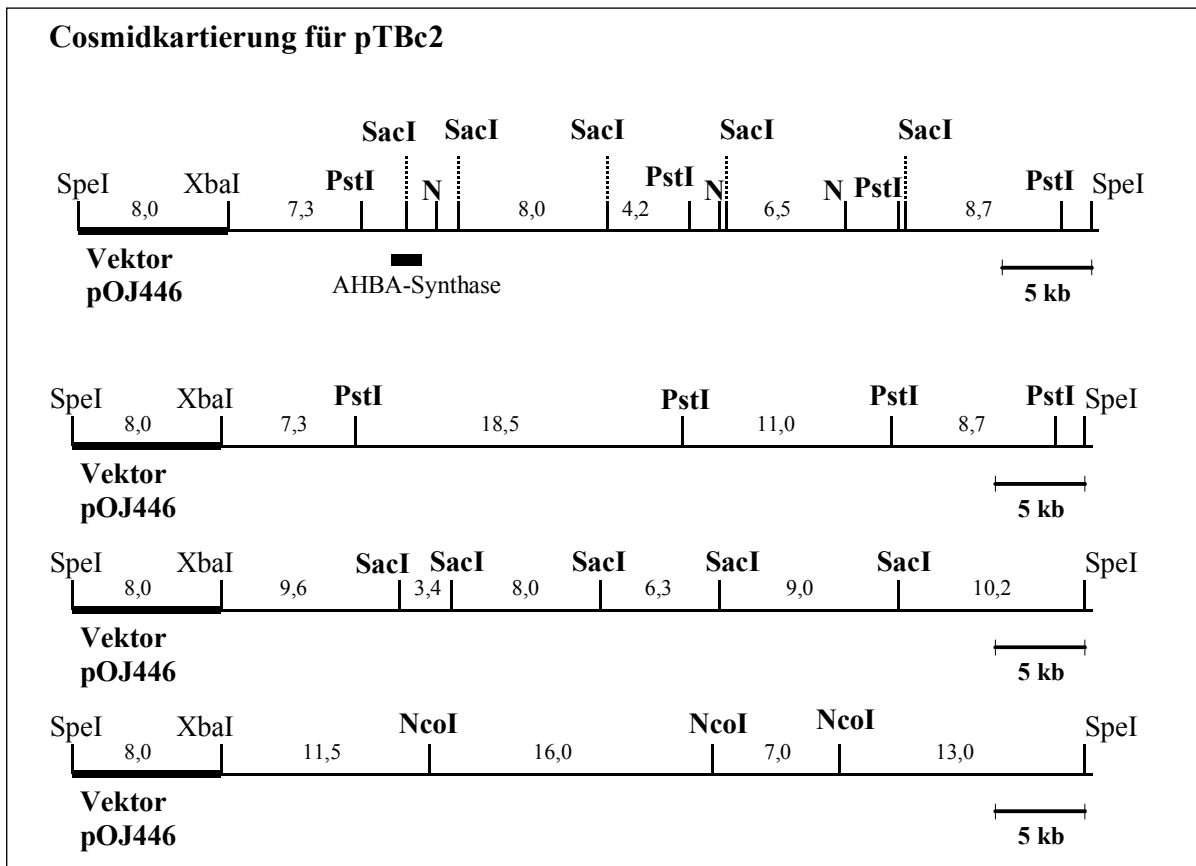


Abbildung 3.11 Linearisierte Restriktionskarten des Cosmids pTBc2, basierend auf PstI-, SacI- und NcoI (N)-Restriktionsschnittstellen. In der obersten Darstellung sind die Schnittstellen für alle drei Enzyme gemeinsam eingefügt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in den drei weiteren Darstellungen jeweils nur die Restriktionsschnittstellen eines Enzyms eingezeichnet. Der reine Cosmid-Vektor pOJ446 enthält mehrere PstI- und SacI-Schnittstellen, aber keine NcoI-Schnittstelle. Die Lage der AHBA-Synthase wurde anhand von Southern Hybridisierungsanalysen ermittelt.

3.4.1.3 Klonierung und Sequenzierung des AHBA-Synthasegens

Anhand der Restriktionskartierungen und den Hybridisierungen mit der AHBA-Synthasegen-Sonde (s. 3.4.1.2) war es möglich, zur Sequenzierung des AHBA-Synthasegens eine Subklonierungsstrategie zu entwickeln. Das komplette Gen befindet sich auf einem 4,2 kb großen PstI/ NcoI-Fragment.

Die Cosmid-DNA von pTBc2 wurde mit den Endonukleasen PstI und NcoI in einer Doppelrestriktion hydrolysiert (s. 2.5.6.1) und anschließend im Agarosegel getrennt (s. 2.5.4).

Das 4,2 kb-Fragment wurde aus dem Gel isoliert (s. 2.5.2.2) und in den mit PstI/ NcoI-linearisierten Vektor pGem5Zf(+) (s. Tab. 2.5) kloniert (s. 2.5.6.5 und 2.5.8.3). Das generierte Plasmid 1 5Zf P/N 4.2 konnte dann für weitere Subklonierungen verwendet werden.

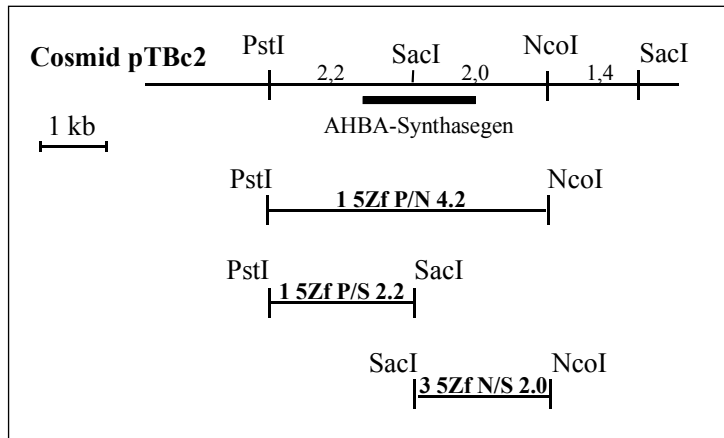


Abbildung 3.12 Subklonierung des 4,2 kb PstI/NcoI-Fragmentes des Cosmids pTBc2, auf dem das AHBA-Synthasegen von *K. putterlickiae* nach Hybridisierungsversuchen nach Southern lokalisiert wurde.

Bei den weiteren Subklonierungen des 4,2 kb PstI/ NcoI-Fragmentes aus 1 5Zf P/N 4.2 entstanden die Plasmide 1 5Zf P/S 2.2 und 3 5ZF N/S 2.0 (s. Abb. 3.12 und Tab. 2.8). Aus dem Plasmid 1 5Zf P/S 2.2 wurden im Rahmen der Diplomarbeit von *Wings* (2001) die weiteren Subklone 5 Zf P/X 0.9 und 5 Zf Sal 1.4 generiert (s. dort).

Für die Subklonierung des Plasmids 3 5Zf N/S 2.0 war es notwendig, eine Restriktionskarte des Plasmids anzufertigen. Die Vorgehensweise ist schematisch in Abbildung 3.13 dargestellt. Um eine Kartierung zu erleichtern, wurde eine Endonuklease, hier XmnI, gewählt, für die die Restriktionsschnittstellen bereits bekannt waren. Die bekannte Endonuklease wurde in Doppelrestriktionen mit neuen Enzymen kombiniert:

- Die Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym XmnI hydrolysiert (s. 2.5.6.1). XmnI schneidet den Vektor pGem5Zf(+). Aus der Teilsequenzierung des Plasmids 3 5Zf N/S 2.0 war bereits bekannt, dass sich die XmnI-Schnittstelle nahe der SacI-Restriktionsschnittstelle befand (s. Abb. 3.13).
- In einer Doppelrestriktion wurde die Plasmid-DNA von 3 5Zf N/S 2.0 mit XmnI und XmaI hydrolysiert. Neben einem 2,1 kb XmnI-Fragment wurden dabei drei weitere Fragmente erhalten (1,2 kb; 0,2 kb; 1,5 kb). Die möglichen Anordnungen dieser Fragmente auf dem Plasmid sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Eine Entscheidung für eine der Möglichkeiten konnte zunächst allerdings nicht getroffen werden.
- In einer Doppelrestriktion der Plasmid-DNA mit XmnI und StuI wurden neben dem 2,1 kb XmnI-Abschnitt zwei Fragmente (0,4 kb; 2,5 kb) isoliert. Da das Enzym StuI nicht innerhalb des Klonierungsvektors pGem5Zf(+) schneidet, war in diesem Fall eine eindeutige Zuordnung der DNA-Fragmente möglich.

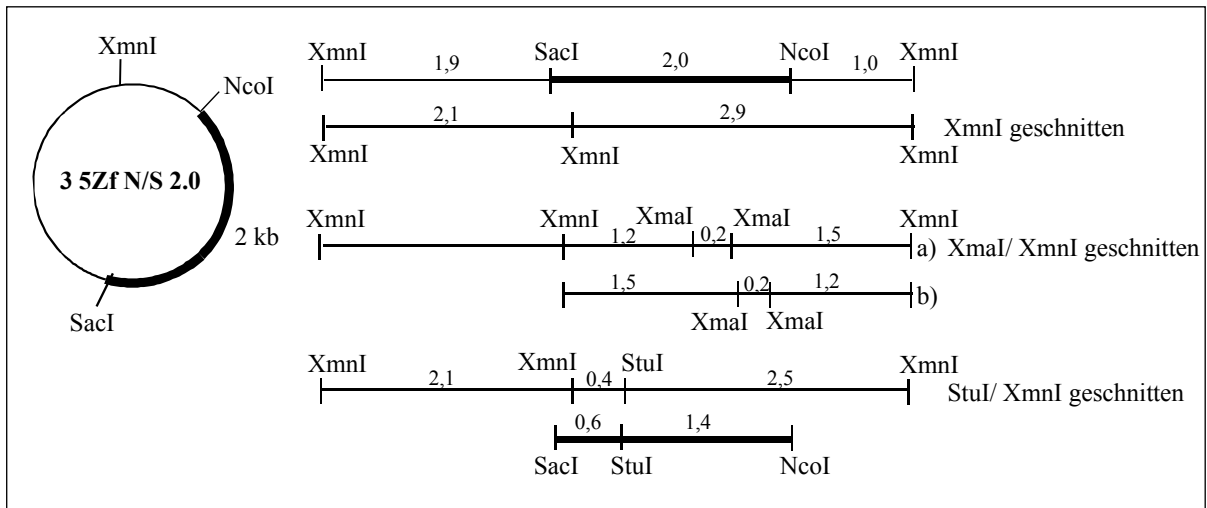


Abbildung 3.13 Restriktionskartierung für das Plasmid 3 5Zf N/S 2.0. Schematische Darstellung der Vorgehensweise. Für die Doppelrestriktion mit XmnI/ XmaI ergeben sich die möglichen Anordnungen a) oder b). Für das Enzym StuI ist nur die aufgezeigte Anordnung möglich. Fett markierte Anteile charakterisieren die inserierte DNA, dünn markierte Anteile bezeichnen Vektor-DNA.

Für die Subklonierungen der 0,6 kb SacI/ StuI- und 1,4 kb StuI/ NcoI-Fragmente aus dem Plasmid 3 5Zf N/S 2.0 wurde die Technik der Religation angewandt.

Für die Klonierung des 0,6 kb SacI/ StuI-Fragmentes wurde dazu das Plasmid 3 5Zf N/S 2.0 mit den Endonukleasen StuI und NcoI hydrolysiert (s. 2.5.6.1). Der Ansatz wurde gelelektrophoretisch getrennt (2.5.4). Dabei wurde ein 1,4 kb- und ein 3,6 kb-Fragment erhalten. Das 3,6 kb-Fragment wurde aus dem Gel isoliert (s. 2.5.2.1). Dieser DNA-Abschnitt enthielt noch die vollständige Vektor-DNA. Für eine Religierung dieses Fragmentes wurden an den Schnittstellen mit Hilfe des Klenow-Fragmentes (s. 2.5.6.2) glatte Enden erzeugt. Die DNA wurde zur Reinigung präzipitiert (s. 2.5.3.1) und anschließend in einem Ligationsansatz religiert (s. 2.5.6.5). Dabei wurde keine weitere Vektor-DNA zu dem Ligationsansatz zugegeben.

Entsprechend wurde die Klonierung des 1,4 kb StuI/ NcoI-Fragmentes durchgeführt. Das Plasmid 3 5Zf N/S 2.0 wurde mit den Enzymen SacI und StuI geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.5.6.1 und 2.5.4). Im Gel konnte ein 0,6 kb- und ein 4,4 kb-Fragment identifiziert werden. Das 4,4 kb-Fragment (mit vollständigen Vektoranteilen) wurde aus dem Gel isoliert (s. 2.5.2.2) und in einer Reaktion mit dem Klenow-Fragment (s.2.5.6.2) eingesetzt, um an den Schnittstellen glatte Enden zu generieren. Nach dem Fällen der DNA (s. 2.5.3.1) wurde das DNA-Fragment in einer Ligationsreaktion (s. 2.5.6.5) religiert.

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit den Plasmiden transformiert (s. 2.5.8.3). Um auf eine positive Insertion zu prüfen, konnte bei den durch Religation erzeugten Klonen nicht mehr

mit den zuvor verwendeten Restriktionsenzymen gearbeitet werden, da bei der Erzeugung glatter Enden durch das Klenow-Fragment die jeweiligen Schnittstellen zerstört wurden. Aus diesem Grund wurde auf Restriktionsenzyme zurückgegriffen, die sich in der Klonierungsregion des Vektors pGem5Zf befinden und die Insertion flankieren. Es wurden die Subklone 4 5Zf S/B 0.6 und 3 5Zf N/S_B 1.4 (s. Tab. 2.8) erhalten.

Alle erhaltenen Plasmide wurden mit den Standard-Oligonukleotiden des Vektors pGem5Zf sequenziert (s. 2.5.14.2). Aus den bereits bekannten Sequenzdaten wurden die Oligonukleotide AHBA_{fwd}, AHBA_{rev}, AHBA-Start, AHBA1 und AHBA2 (s. 2.1.4) abgeleitet. Mit diesen Oligonukleotiden als „Sequenzierprimern“ wurden weitere Sequenzierungen durchgeführt (2.5.14.2). Weite Bereiche wurden doppelsträngig sequenziert.

Das Standardsequenzierprogramm (2.5.14.1) erwies sich für die Sequenzierung GC-reicher DNA-Matrizen von *K. putterlickiae* als ungeeignet. In dieser Arbeit wurde daher ein modifiziertes Amplifikationsprotokoll für die Sequenzierung GC-reicher DNA entwickelt (s. 2.5.14.2). Da bei der Basenpaarung zwischen den Basen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden (anstelle von zwei Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin), hängt der Schmelzpunkt der DNA vom jeweiligen GC-Gehalt ab. Höhere GC-Gehalte einer DNA erfordern höhere Denaturierungstemperaturen. Bei dem modifizierten Sequenzierprogramm wurde daher u. a. eine höhere Denaturierungstemperatur gewählt (s. 2.5.14.2).

Die Rohdaten aller Sequenzierreaktionen wurden mit dem Computerprogramm „SeqMan“ (s. 2.5.14.5) bearbeitet. Die DNA-Sequenz von 1375 bp wurde mit dem Programm „FramePlot“ (2.5.14.5) auf mögliche offene Leseraster mit dem typischen Codongebrauch der Actinomyceten untersucht. Mit dem Softwareprogramm „Blast“ (Funktion „Blastx“, 2.5.14.5) wurde die Sequenz in alle sechs Aminosäuresequenzen übersetzt und Homologievergleiche mit veröffentlichten Sequenzen im Internet durchgeführt. Die Übersetzung eines 1167 bp großen DNA-Abschnittes liefert ein Protein von 388 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 41,95 kDa. Zusätzlich wurden 76 bp stromaufwärts des Start-Codons und 132 bp stromabwärts nach dem Stop-Codon sequenziert. In Abbildung 3.14 ist die Nukleotidsequenz sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz des putativen AHBA-Synthasegens aus *K. putterlickiae* dargestellt. Die DNA-Sequenz der AHBA-Synthase von *K. putterlickiae* wurde in der Gendatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, USA) unter der Zugangsnummer AF452095 eingetragen.

ausgegangen, dass ein geringer Fusionsanteil die Ausbildung eines katalytisch aktiven Proteins am wenigsten behindert. Mit dem Expressionsvektor pRSET B (s. Anhang) werden Proteine als 6xHistidin-Fusionsproteine unter der Kontrolle eines T7 RNA-Polymerase-abhängigen T7-Promotors exprimiert. Das putative AHBA-Synthasegen aus *K. putterlickiae* wurde daher in den Vektor pRSET B kloniert.

Damit die AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* im passenden Leserahmen in die Klonierungsregion des Expressionsvektors pRSET B ligiert werden konnte, wurden zuvor in einer PCR-Reaktion neue Erkennungssequenzen für entsprechende Restriktionsenzyme am 5'- und am 3'-Ende des Gens erzeugt. Am 5'-Ende des Oligonukleotids AHBA-Exfw (s. 2.1.4) wurde die Schnittstelle für BamHI (GGATCC) eingefügt. Das Oligonukleotid AHBA-Exrev (s. 2.1.4) wurde mit einer Erkennungssequenz für die Endonuklease EcoRI (GAATTC) am 5'-Ende synthetisiert. Zusätzlich wurden in die Oligonukleotid-Sequenz von AHBA-Exfw Nukleotide eingefügt, die zusammen mit dem Start-Codon (ATG) des AHBA-Synthasegens eine Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease NdeI ergaben (CATATG). Durch eine Restriktion mit NdeI ist es möglich, den Poly-Histidin-Fusionsanteil zu entfernen. Nach der Religation des Plasmidkonstruktes kann dann ein natives Protein exprimiert werden.

Die Vorgehensweise bis zur Klonierung des AHBA-Synthasegens in den pRSET B-Vektor ist in Abbildung 3.15 gezeigt. In der PCR-Reaktion (s. 2.5.5.2) wurde mit den Oligonukleotiden AHBA-Exfw und AHBA-Exrev das komplette AHBA-Synthasegen amplifiziert. Das Plasmid 15Zf P/N 4.2 diente als DNA-Matrize. Für die PCR-Reaktion wurde die *Pwo*-Polymerase verwendet, um falsch eingebaute Nukleotide am 3'-Ende zu entfernen (s. a. 2.5.5.1). Bei der Proteinexpression ist es entscheidend, fehlerhafte Amplifikationen zu vermeiden. Die Bildung von Punktmutationen oder ein vorzeitiges Ende der Proteinsynthese können zum völligen oder teilweisen Verlust der Aktivität führen.

Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch getrennt (s. 2.5.4) und aus dem Gel isoliert (s. 2.5.2.2). Es wurde ein PCR-Amplifikat mit glatten Enden erhalten. Um das PCR-Produkt in einen Klonierungsvektor ligieren zu können, wurde mit Hilfe der *Taq*-Polymerase jeweils ein 3'-Desoxyadenosin-Überhang an die Enden des glattendigen Produktes angefügt (s. 2.5.6.4). Das PCR-Produkt wurde dann in den Vektor pCR2.1-TOPO (s. Tab. 2.5) kloniert (2.5.7.2). Um zu überprüfen, ob während der PCR-Reaktion die neu generierten Schnittstellen im passenden Leserahmen eingefügt wurden, wurden die positive Klone sequenziert (s. 2.5.14). Durch die Exonuklease-Aktivität der *Pwo*-Polymerase können eingesetzte Oligonukleotide degradiert werden. Dies kann zum Verlust der Restriktionsschnittstellen führen.

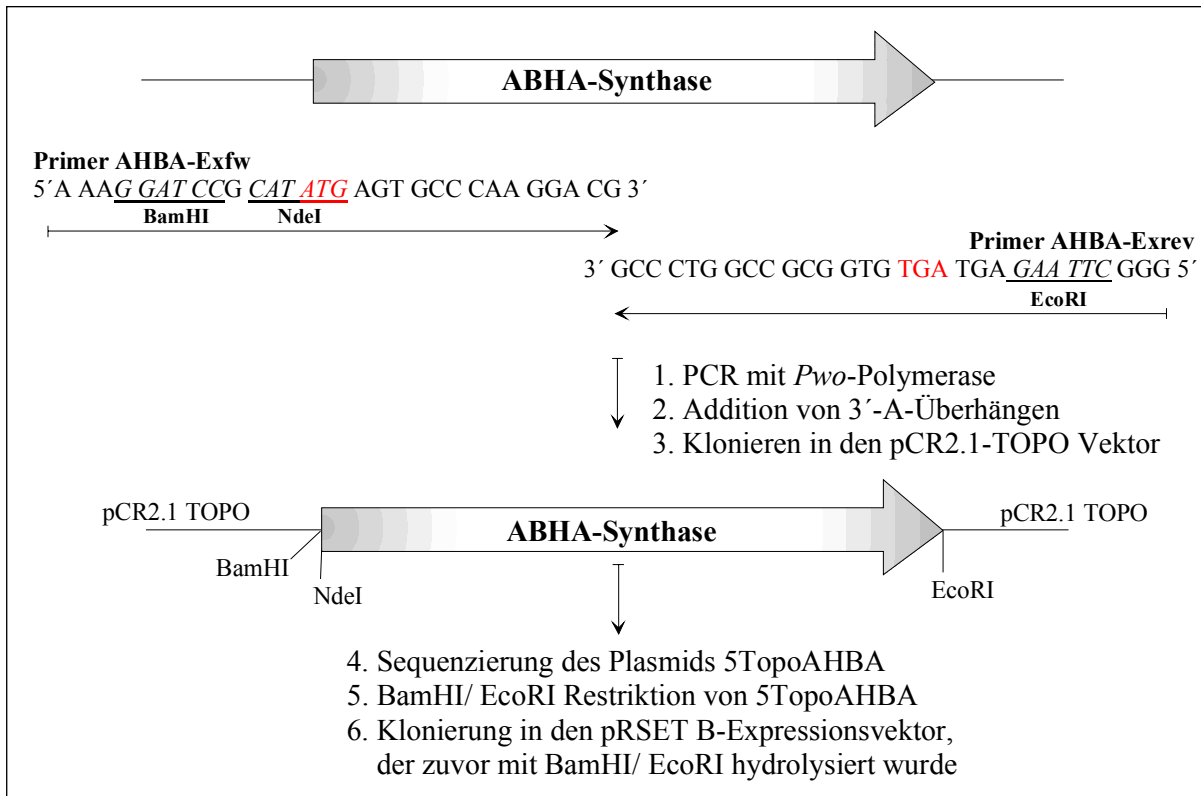


Abbildung 3.15 Überexpression der AHBA-Synthase von *K. putterlickiae*. Gezeigt sind die Schritte bis zur Klonierung des AHBA-Synthasegens in den Expressionsvektor pRSET B. Die Restriktionsschnittstellen in den Oligonukleotid-Sequenzen sind kursiv dargestellt. Start- und Stop-Codon wurden rot markiert.

Das PCR-Amplifikat des AHBA-Synthasegens wurde in das Plasmid 5TopoAHBA (s. Tab. 2.8) korrekt inseriert. Dieses Plasmid wurde mit den Endonukleasen BamHI und EcoRI in einer Doppelrestriktion hydrolysiert (s. 2.5.6.1). Der Ansatz wurde im Agarosegel getrennt (s.2.5.4) und das 1179 bp BamHI/ EcoRI-Fragment aus dem Gel isoliert (2.5.2.2). Der Expressionsvektor pRSET B wurde mit den Endonukleasen BamHI und EcoRI linearisiert (s. 2.5.6.1) und durch Präzipitieren von den Reaktionskomponenten gereinigt (s. 2.5.3.1). Die linearisierte Vektor-DNA wurde mit dem 1179 bp BamHI/ EcoRI-Fragment kondensiert (s. 2.5.6.5). In Abbildung 3.16 ist ein Ausschnitt des Vektors pRSET B mit dem inserierten AHBA-Synthasegen aus *K. putterlickiae* dargestellt.

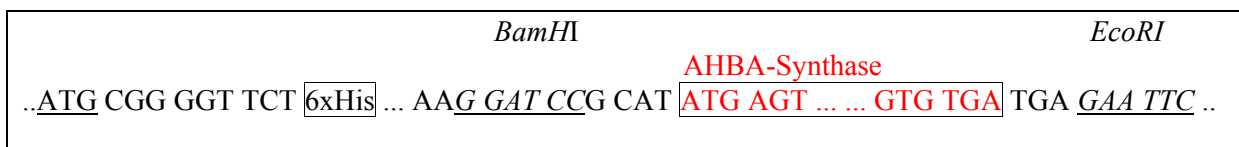


Abbildung 3.16 Ausschnitt aus der Klonierungsregion des rekombinanten Plasmids 1pRSETB(AHBA) mit dem inserierten AHBA-Synthasegen aus *K. putterlickiae*.

Kompetente Zellen des *E. coli*-Expressionsstammes BL21(DE3)pLysS wurden mit dem Plasmid 1pRSETB(AHBA) transformiert (nach 2.5.8.3, abweichend ohne „Blau-Weiß-Selektion“). Als Deletionsmutante fehlen dem Stamm BL21(DE3)pLysS einige Proteasegene.

Er eignet sich daher besonders für die Expression von Proteinen. Der Expressionsstamm enthält zudem den lysogenen Bakteriophagen DE3 (λ -Derivat), der ein Gen trägt, das für die T7 RNA-Polymerase kodiert. Die T7 RNA-Polymerase ist wesentlich aktiver als diejenige RNA-Polymerase, die in nativen *E. coli*-Stämmen gebildet wird. Daher werden mit dem T7-Expressionssystem sehr hohe Expressionsraten erzielt. Der T7-Promotor befindet sich auf dem Expressionsvektor pRSET B. Das AHBA-Synthasegen wird T7 RNA-Polymerase abhängig transkribiert. Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS enthält weiterhin das Plasmid pLysS. Das Plasmid pLysS kodiert für T7-Lysozym. T7-Lysozym verhindert die vorzeitige Transkription des Zielgens, indem es die T7 RNA-Polymerase inhibiert. Rekombinante Fremdproteine können damit die Wirtszellen nicht in ihrem Wachstum behindern.

Die „Blau-Weiß-Selektion“ (s. 2.5.8.3) kann für die *E. coli*-Expressionsstämme BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS nicht durchgeführt werden, da eine Zugabe von IPTG auch die Proteinexpression induziert. Dies ist unter Umständen kritisch, da rekombinante Proteine toxisch auf die Zellen wirken könnten und die Bildung von Plasmid-tragenden Kolonien nach der Transformation vollständig verhindern könnten.

Um die Expression und die Löslichkeit der rekombinanten AHBA-Synthase zu untersuchen, wurde der mit 1pRSETB(AHBA) transformierte Stamm von *E. coli* BL21(DE3)pLysS nach 2.6.3.1 mit IPTG induziert und kultiviert. Die Proben, die direkt vor der Induktion mit IPTG und in den stündlichen Intervallen nach der Induktion entnommen wurden, wurden nach 2.6.3.1 mit Ultraschall behandelt. Die zellfreien Extrakte mit den löslichen Proteinfractionen

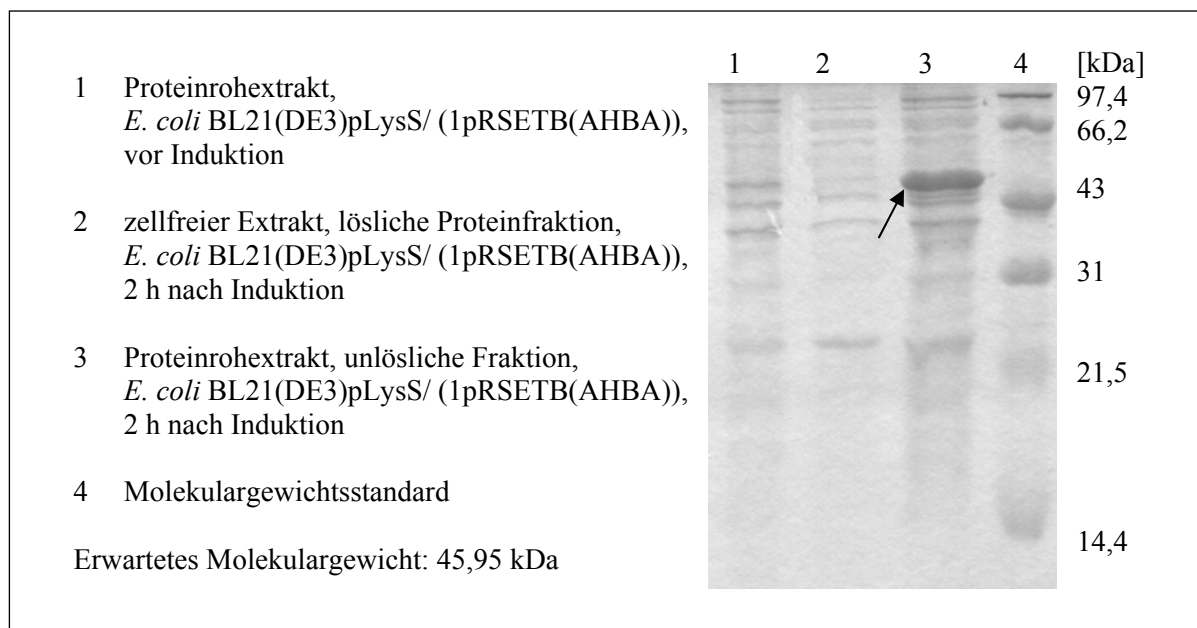


Abbildung 3.17 Überexpression der rekombinanten AHBA-Synthase aus *K. pouterlickiae* als 6xHistidin-Fusionsprotein (s. Pfeil). 13,5 % iges SDS-Polyacrylamidgel.

als auch die Proteinrohextrakte mit unlöslichen Proteinen wurden im SDS-Polyacrylamidgel (s. 2.6.2) getrennt. In Abbildung 3.17 werden die Proben, die unmittelbar vor der Induktion entnommen wurden, mit den Proben nach einer 2 h-Induktion verglichen.

Die Expression des 6xHistidin-AHBA-Synthase-Fusionsproteins ergab ein ca. 46 kDa großes Protein, das nur im Proteinrohextrakt detektiert werden konnte. Im zellfreien Extrakt war die jeweilige Bande für die AHBA-Synthase nicht nachweisbar (s. Abb. 3.17). Das rekombinante Protein war unter den verwendeten Anzuchtbedingungen komplett unlöslich. Die rekombinante AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* schien für *E. coli*-Zellen toxisch zu sein. Daher könnte das Protein in Membranen eingeschlossen worden sein.

3.4.1.5 Aufreinigung und Funktionstestung der AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae*

Um die katalytische Aktivität der rekombinant exprimierten AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* zu untersuchen, musste das Protein in löslicher Form gebildet werden. Die Anzucht- und Induktionsbedingungen sollten optimiert werden, um ein lösliches Fusionsprotein zu erhalten. Das lösliches 6xHistidin-Fusionsprotein sollte dann über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

Der transformierte *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ (1pRSETB(AHBA))-Stamm wurde unter modifizierten Bedingungen in LB-Betain/ Sorbitol-Medium (s. 2.6.3.2) angezogen und mit geringeren IPTG-Konzentrationen (Endkonzentration von 0,1 mM, vorher 0,5 mM IPTG) induziert. Analog wurde als Kontrolle der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS mit dem nicht rekombinanten Ausgangsvektor pRSET B transformiert (s. 2.5.8.3, ohne „Blau-Weiß-Selektion“) und unter gleichen Bedingungen induziert (2.6.3.2). Die zellfreien Extrakte aus beiden Kultivierungen wurden nach 2.6.3.2 gewonnen. Für die SDS-PAGE wurden Anteile abgenommen. Die rekombinante 6xHistidin-AHBA-Synthase wurde über die Ni²⁺-Affinitätschromatographie angereichert (s. 2.6.3.4). Die Kontrolle wurde entsprechend behandelt. Anschließend wurden die Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt (2.6.2, s. Abb. 3.18).

Im SDS-Polyacrylamidgel konnten im zellfreien Extrakt deutliche Proteinbanden für das AHBA-Synthase-Fusionsprotein detektiert werden (s. a. Abb. 3.18). Die modifizierten Anzucht- und Induktionsbedingungen (s.2.6.3.2) waren für die Bildung von löslichem Fusionsprotein geeignet. Durch die Ni²⁺-Affinitätschromatographie wurde ein einzelnes Protein von ca. 46 kDa aufgereinigt. Dies entsprach der Größe der dominanten Proteine des zellfreien Extraktes. Die erwartete Größe für das 6xHistidin-AHBA-Synthase-Fusionsprotein betrug 45,95 kDa. Im zellfreien Extrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS, der zur Kontrolle nur

mit dem Ausgangsvektor pRSET B transformiert wurde, wurde die Bande nicht detektiert (s. Abb. 3.18). Wie erwartet traten auch keine Proteinbanden nach der Affinitätschromatographie auf.

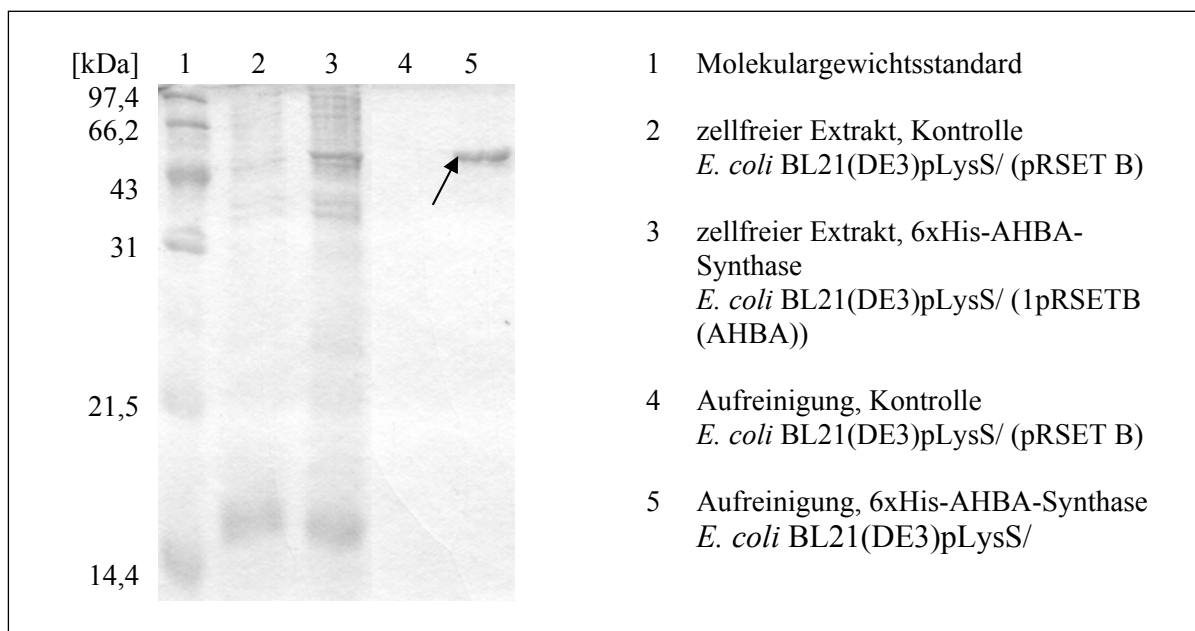


Abbildung 3.18 Aufreinigung des rekombinanten 6xHistidin-AHBA-Synthase Fusionsproteins aus *K. putterlickiae* über Ni^{2+} -Affinitätschromatographie (s. Pfeil). 13,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Anzucht und Induktion des Expressionsstammes [mit pRSET B zur Kontrolle oder mit Plasmid 1pRSETB(AHBA)] nach modifiziertem Protokoll und Gewinnung des zellfreien Extraktes mit der löslichen Proteinfraction nach 2.6.3.2.

Die Aktivität der AHBA-Synthase wurde direkt im zellfreien Extrakt bestimmt. Aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS / (1pRSETB(AHBA)) wurde der zellfreie Extrakt nach dem oben genannten Verfahren gewonnen (s. 2.6.3.2). Für eine Positivkontrolle wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit dem Plasmid EAHBA6 transformiert (s. 2.5.8.3, ohne „Blau-Weiß-Selektion“). Das Plasmid EAHBA6 (s. Tab. 2.7) kodiert für die AHBA-Synthase aus *Amycolatopsis mediterranei*, die als Poly-Histidin-Fusionsprotein nach IPTG-Induktion exprimiert wird. Der mit dem nicht rekombinanten Ausgangsvektor pRSET B transformierte Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS diente als Negativkontrolle. Anzucht, Induktion und Zellaufschluss für die Positiv- und die Negativkontrolle erfolgten jeweils unter den gleichen Bedingungen (s. 2.6.3.2). Mit den drei zellfreien Extrakten wurde der Aktivitätstest nach 2.6.5.1 durchgeführt. Katalysiert durch die AHBA-Synthase sollte 5-Desoxy-5-amino-3-dehydroshikimisäure (aDHS) zu AHBA umgesetzt werden. Die Bildung von AHBA wurde massenspektrometrisch detektiert (s. 2.7.1). Für den zellfreien Extrakt aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS / (1pRSETB(AHBA)) konnte eine deutlich erkennbare Neubildung von AHBA gezeigt werden (Massenspektrogramm s. Anhang). Die Kontrollinkubation mit zellfreiem Extrakt aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ (pRSET B) führte nicht zur Bildung von

AHBA. Damit kodiert das AHBA-Synthasegen aus *K. putterlickiae* für ein funktionsfähiges Protein, das die Bildung von AHBA katalysiert. Die AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* kann eindeutig von Proteinen der SMAT-Familie unterschieden werden (s. 3.1.4).

3.4.2 Identifizierung weiterer Gene der Maytansinoidbiosynthese in *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

Die Klonierung einer Vielzahl von Genen, die für die Biosynthese von Antibiotika in Aktinomyceten verantwortlich sind, führte zu einem umfassenden Bild der Organisationsstruktur dieser Gene in Aktinomyceten. Gene für die Biosynthese von Sekundärstoffen liegen mit Genen, die für Resistenzmechanismen kodieren, regulatorischen Genen sowie Genen für den Transport der Sekundärmetabolite in großen Genclustern zusammen (Hopwood *et al.*, 1988; Martin und Liras, 1989; Chater, 1992).

Um den Stamm *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 bzgl. seines Sekundärstoffpotentials (s. 3.3) weiter zu charakterisieren, bot sich eine weiterführende molekularbiologische Betrachtungsweise an. Mit der AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* wurde ein Gen sequenziert und überexprimiert (3.4.1), das im Sekundärstoffwechsel spezifisch die Bildung von AHBA katalysiert. Falls auch in *K. putterlickiae* Gene für Sekundärstoffe geclustert vorliegen, sind möglicherweise in räumlicher Nähe zum AHBA-Synthasegen weitere Gene entsprechender Funktion lokalisiert. Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Cosmid-Bank ermöglicht dabei die Identifizierung und Analyse eines möglichen Genclusters.

Der Stamm *K. putterlickiae* sollte auf eventuell vorhandene, weitere Gene der Maytansinoidbiosynthese untersucht werden. Dazu wurden Hybridisierungen nach Southern von genomischer DNA und von Cosmid-DNA mit heterologen Sonden durchgeführt. Weitere Teile des Cosmids pTBc2 wurden sequenziert.

3.4.2.1 Identifizierung weiterer Gene der AHBA-Biosynthese

Zunächst wurde die Cosmid-DNA von *K. putterlickiae* auf weitere Gene der AHBA-Biosynthese untersucht. Die Gene der AHBA-Biosynthese waren für die Ansamycin-Produzenten *Amycolatopsis mediterranei* (August *et al.*, 1998), *Actinosynnema pretiosum* (Hoffmann, 1997) und z. T. für *Streptomyces collinus* (von Bamberg, 1999) bekannt (s. a. 1.2.1). Damit konnten heterologe Sonden für Southern Hybridisierungen erstellt werden, um Gene für die Biosynthese der mC₇N-Einheit in *K. putterlickiae* zu finden.

Die Herstellung der DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe der PCR (s. 2.5.13.1). In früheren Arbeiten wurden bereits Oligonukleotide zur Herstellung von Sonden für die Gene der

AHBA-Biosynthese entwickelt (Hoffmann, 1997; von Bamberg, 1999). Diese Oligonukleotide (s. 2.1.4) wurden im Rahmen dieser Arbeit in PCR-Reaktionen (s. 2.5.13.1) eingesetzt, um Digoxigenin-markierte Produkte zu amplifizieren. Als DNA-Matrize diente das Cosmid pFKN108 (s. Tab. 2.7) mit Genen des Rifamycin-Clusters. Heterologe Sonden für die Oxidoreduktase, die Phosphatase, die Kinase, aDAH-P-Synthase sowie die aDHQ-Synthase (vgl. Abb. 1.3 und 1.4) konnten in dieser Arbeit eingesetzt werden.

Sequenzierungen der Plasmide 1 5Zf P/N 4.2; 1 5Zf P/S 2.2 und 3 5Zf N/S 2.0 (s. 3.4.1.3) gaben bereits Hinweise darauf, dass sich eine Oxidoreduktase und eine Kinase in der Nähe der AHBA-Synthase befinden könnten. Dies sollte anhand von Southern Hybridisierungen auf Cosmid-DNA belegt werden. Da eine Restriktionskartierung der Cosmid-DNA bereits erstellt wurde (s. 3.4.1.2), war es gleichzeitig möglich, die Lage dieser Gene auf dem Cosmid zu bestimmen.

Für den „Southern Blot“ wurde das Cosmid pTBc2 (s. 2.1.5) mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (s. 2.5.6.1). Es wurden stets Doppelrestriktionen durchgeführt. Die entstehenden Fragmentgrößen des Cosmids pTBc2 sind für die verwendeten Restriktionen mit PstI/ XbaI; PstI/ NcoI; PstI/ SacI und SacI/ NcoI in Tabelle 3.2 angegeben.

Cosmid pTBc2			
PstI/ XbaI	PstI/ NcoI	PstI/ SacI	SacI/ NcoI
17,8	13,6	11,2 *	13,6 *
11,2	12,2 *	9,2	13,4 *
8,7	8,7	8,7	8
7,3	7,1	8	6,5
4,9 *	4,2	4,2	5,6
3,9 *	3,9 *	3,9 *	2,7
0,77 *	2,7	3,4	2
	1,4	2,2	1,4
	0,77 *	2	0,78 *
		0,78 *	0,6
		0,77 *	

Tabelle 3.2 Zusammenfassung der durch Restriktionsspaltungen erhaltenen Ergebnisse für das Cosmid pTBc2. Die Angabe der Fragmentlängen erfolgt in [kb]. Die mit Sternen gekennzeichneten Fragmente enthalten Anteile des Cosmid-Vektors pOJ446. Die Fragmente von 0,77 kb und 0,78 kb, die bei fast allen Hydrolysen erhalten werden, sind DNA-Abschnitte, die ausschließlich Vektor-DNA enthalten.

Zusätzlich wurde das Cosmid pDBc1 (Naphptomycin-Cluster, *S. collinus*; von Bamberg, 1999) mit der Endonuklease BamHI gespalten. Das Cosmid diente als Positivkontrolle für die Southern Hybridisierungsversuche. Teilweise wurde auch genomische DNA von *A. pretiosum* mit PstI hydrolysiert, um diese als Positivkontrolle einzusetzen.

Die Southern Hybridisierungen (s. 2.5.13.4) erfolgte unter stringenten Bedingungen (Vorhybridisierung und Hybridisierung bei 42 °C; Waschschr. mit 0,1x-Waschpuffer bei

RT). Dabei wurden in unterschiedlichen Ansätzen die oben aufgeführten Sonden eingesetzt. Abbildung 3.19 zeigt die Ergebnisse der Southern Hybridisierungen von Cosmid-DNA des Stammes *K. putterlickiae* mit der heterologen Oxidoreduktasegen- und der heterologen Phosphatasegen-Sonde aus *A. mediterranei*. Ein zur Oxidoreduktase homologes DNA-Fragment findet sich auf einem 2,0 kb *SacI*/*NcoI*-DNA-Abschnitt. Mit der Phosphatase-Sonde hybridisierte ein 1,4 kb *SacI*/*NcoI*-DNA-Fragment. Die genaue Lage dieser beiden Fragmente auf der Cosmid-DNA ist zusammenfassend in Abbildung 3.20 dargestellt.

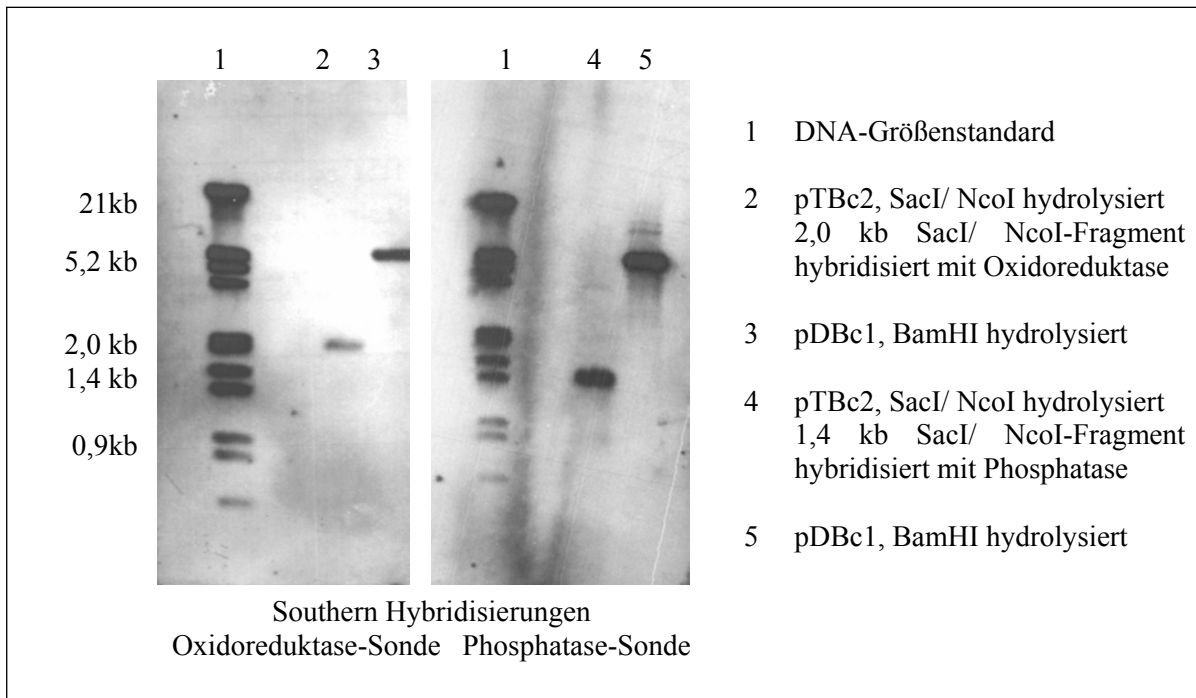


Abbildung 3.19 Southern Hybridisierungen mit *SacI*/*NcoI* hydrolysierter Cosmid-DNA von pTBc2 (*K. putterlickiae*). Es wurde eine Oxidoreduktasegen- und einer Phosphatasegen-Sonde aus *A. mediterranei* verwendet.

Wurde mit der aDAHP-Synthase-Sonde eine Southern Hybridisierung nach den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt, konnten für die Fragmente 8,7 kb-*PstI*/*XbaI*; 8,7 kb-*PstI*/*SacI* und 8,7 kb-*PstI*/*NcoI* (vgl. Tab. 3.2) positive Hybridisierungssignale detektiert werden. Die Zuordnung zu DNA-Abschnitten des Cosmids pTBc2 erfolgt in Abbildung 3.20. Bei Verwendung der aDHQ-Synthase-Sonde hybridisierten ein 7,3 kb-*PstI*/*XbaI*-Fragment sowie ein 11,2 kb-*PstI*/*SacI*- und ein 12,2 kb-*PstI*/*NcoI*-DNA-Fragment.

Die Hybridisierungsversuche mit der DNA-Sonde für die Kinase wurden von S. Wings (*Wings, 2001*) durchgeführt. Dabei zeigten sich u. a. Hybridisierungssignale bei einem 2,2 kb *PstI*/*SacI*-Fragment und einem 4,4 kb *PstI*/*NcoI*-Fragment von entsprechend restringierter DNA des Cosmids pTBc2 (*Wings, 2001*).

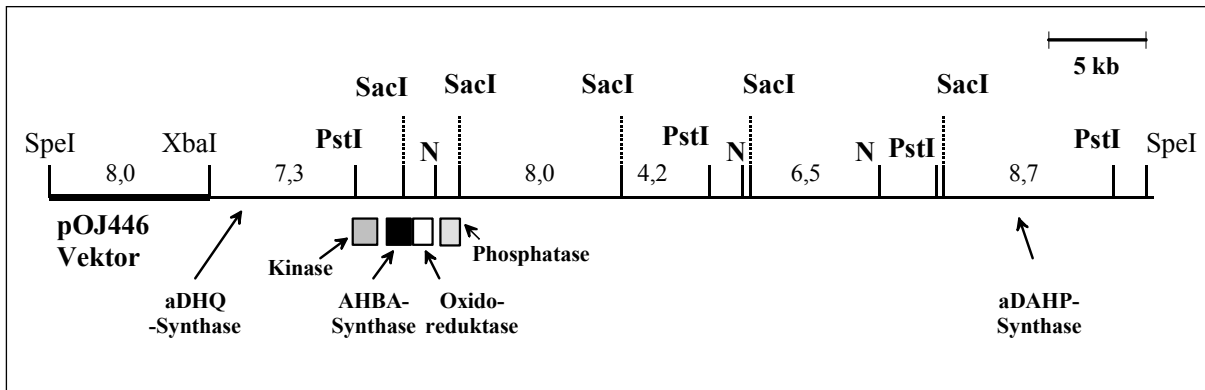


Abbildung 3.20 Auswertung der Southern Hybridisierungen bezogen auf das Cosmid pTBc2. Das aDHQ-Synthasegen liegt auf dem 7,3 kb XbaI/ PstI-Fragment, das aDAHP-Synthasegen befindet sich auf dem 8,7 kb SacI/ PstI-Fragment. Eine genaue Lage der Gene ist bisher nicht bekannt.

3.4.3.2 Subklonierungen und partielle Sequenzierung des Cosmids pTBc2

Die Gene für die AHBA-Synthase, die Oxidoreduktase und Phosphatase liegen in einer konservierten Reihenfolge in den bisher untersuchten AHBA-Biosynthese-Clustern der unterschiedlichen Ansamycin-Produzenten vor (vgl. 4.5.2). Aus diesem Grund schien es interessant zu untersuchen, inwieweit diese Beobachtungen auch auf den Stamm *K. putterlickiae* zutreffen. Daher sollten die Gene für die Oxidoreduktase und Phosphatase in dieser Arbeit sequenziert werden.

Die Ergebnisse der Southern Hybridisierungen gaben neue Hinweise zur genauen Lage der detektierten Gene auf dem Cosmid pTBc2 (s. 3.4.3.1). Das Oxidoreduktasegen war auf einem

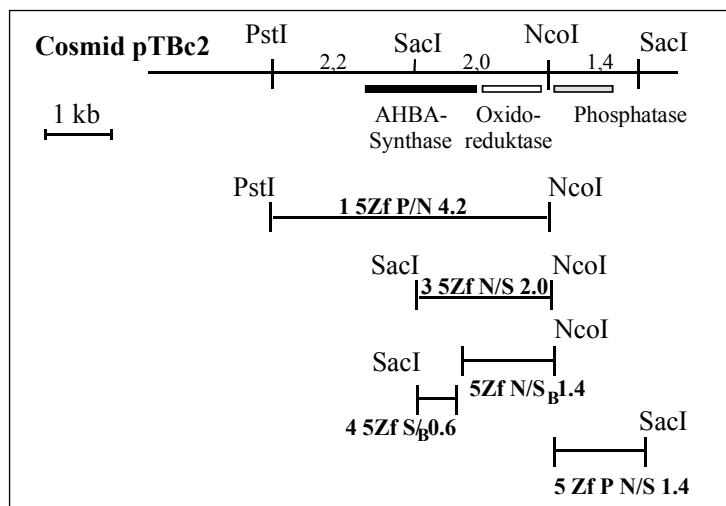


Abbildung 3.21 Übersicht über die Subklone, die zur Sequenzierung des Oxidoreduktase- und des Phosphatasegens verwendet wurden (vgl. 3.4.1.4).

2,0 kb SacI/ NcoI-Fragment des Cosmids pTBc2 nachweisbar (s. Abb. 3.21). Damit liegt das Gen für die Oxidoreduktase unmittelbar benachbart zum AHBA-Synthasegen. Ein 1,4 kb SacI/ NcoI-DNA-Abschnitt des Cosmids pTBc2 zeigte bei Southern Hybridisierungen Homologien zum Phosphatasegen aus *A. mediterranei* (s. 3.4.2.1 und Abb. 3.21).

Für die Sequenzierung der Oxidoreduktase wurde auf die in dieser Arbeit erstellten Subklone 1 5Zf P/N 4.2; 3 5Zf N/S 2.0; 3 5Zf N/S_B 1.4 und 4 5Zf S_B 0.6 (s. Tab. 2.8 und Abb. 3.21)

zurückgegriffen. Um die Basenfolge der DNA für das Oxidoreduktasegen zu bestimmen, wurden außerdem sequenzspezifische Oligonukleotide für das „Primer-Walking“-Verfahren entwickelt. Das „Primer-Walking“-Verfahren ist eine Methode, um ausgehend von bekannten Sequenzbereichen neue Sequenzen über Oligonukleotide zu erhalten, die in unbekannte Bereiche „hineinlesen“. Die dazu verwendeten Oligonukleotide wurden aus bereits sequenzierten Bereichen des Gens abgeleitet, die ca. 50 – 60 bp vor dem Ende der bis dahin bekannten Sequenz lagen. Die entwickelten Oligonukleotide sind unter 2.1.4 aufgeführt. Die Sequenzierungen wurden nach 2.5.14 durchgeführt und die Rohdaten mit dem Computerprogramm „SeqMan“ (s. 2.5.14.5) bearbeitet.

Für die Sequenzierung des Phosphatasegens wurde der 1,4 kb SacI/ NcoI-DNA-Abschnitt des Cosmids pTBc2 subkloniert (s. Abb. 3.21). Die DNA des Cosmids pTBc2 wurde mit den Endonukleasen SacI und NcoI hydrolysiert (s. 2.5.6.1) und im Agarosegel getrennt (s. 2.5.4). Das 1,4 kb SacI/ NcoI-DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel isoliert (s. 2.5.2.2) und in den zuvor mit SacI und NcoI restringierten Vektor pGem5Zf inseriert (s. 2.5.6.5). Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit dem Plasmid transformiert (nach 2.5.8.3). Das erhaltene Plasmid 5 Zf P N/S 1.4 (s. Abb. 3.21) wurde dann mit Standard-Oligonukleotiden des Vektors pGem5Zf sequenziert. Zusätzlich wurden weitere Oligonukleotide synthetisiert, um ebenfalls das „Primer-Walking“-Verfahren anzuwenden (s. 2.1.4). Die Rohdaten der Sequenzierreaktionen wurden mit dem Programm „SeqMan“ (s. 2.5.14.5) ausgewertet und mit den Daten der Oxidoreduktasegen-Sequenzierungen und den AHBA-Synthasegen-Sequenzierungen (s. 3.4.1.3) zusammengeführt.

Die bearbeiteten Sequenzen wurden dann mit Hilfe weiterer Computerprogramme ausgewertet (s. 2.5.14.5). Offene Leseraster (ORFs) dieses Abschnittes des Clusters aus *K. putterlickiae* wurden mit dem Programm „FramePlot 2.1“ ermittelt, da es bei GC-reicher DNA im Gegensatz zu DNA mit niedrigem GC-Gehalt z. T. äußerst schwierig sein kann, den für ein Gen kodierenden Bereich zu ermitteln. Häufig sind auch ribosomale Bindestellen schwer zu erkennen (Strohl, 1992). Das Programm „FramePlot 2.1“ basiert auf der Grundlage des typischen Codongebrauchs von Streptomycceten mit dem hohen GC-Gehalt ihrer DNA (Bibb et al., 1984). Da für alle 20 Aminosäuren Codons kodieren, die auf G oder C enden, befindet sich bei Streptomycceten in der dritten Position eines Codons zu 92 % eine Guanin- oder Cytosinbase. Dagegen gibt es viele Aminosäuren, die in dem für sie kodierenden Codon an zweiter Position ein A oder T enthalten. Bei Streptomycceten ist damit der GC-Gehalt für

die Position 2 eines Codons am geringsten (51 %). Für die erste Position eines Codons ist ein mittlerer GC-Gehalt (70 %) bei Streptomycceten charakteristisch. Diese asymmetrische Verteilung wird im Programm „FramePlot 2.1“ genutzt, um offene Leseraster zu detektieren. Im Programm „FramePlot 2.1“ ist der GC-Gehalt für jedes Leseraster graphisch aufgetragen. Das Leseraster, in dem sich an der dritten Position eines Codons zu sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine Guanin- oder Cytosinbase befindet, charakterisiert ein offenes Leseraster. Mögliche ATG- oder GTG- Start-Codons werden durch das Symbol „>“ gekennzeichnet, das Stop-Codon durch eine senkrechte Linie.

Die einzelnen offenen Leseraster wurden auf Aminosäureebene mit dem Programm „Blast“ (Funktion „BlastP“, NCBI) auf Sequenzhomologien untersucht.

Insgesamt konnte ein zusammenhängender DNA-Abschnitt von 3337 bp aus *K. putterlickiae* sequenziert werden (inklusive des AHBA-Synthasegens), in dem drei offene Leseraster detektiert wurden. Die „FramePlot“-Analyse dieses DNA-Bereichs ist im Anhang dargestellt. Unmittelbar stromabwärts des AHBA-Synthasegens findet sich das Gen, welches für die Oxidoreduktase kodiert. Für das Oxidoreduktasegen war es schwierig, einen Startpunkt des offenen Leserasters zu bestimmen. In einem Abstand von 9 Nukleotiden befinden sich zwei GTG-Start-Codons im gleichen Leseraster (s. Abb. 3.22). Werden die Proteinsequenzen von bereits bekannten Oxidoreduktasegenen mit den beiden möglichen Proteinsequenzen der Oxidoreduktase aus *K. putterlickiae* auf Grundlage der Clustal-Berechnungsmethode (Programm „MegAlign“, DNASTAR, s. 2.5.14.5) miteinander verglichen, erscheint es wahrscheinlicher, dass das ORF erst mit dem zweiten GTG-Codon beginnt (s. Abb. 3.22, Codon eingerahmt). Anders als bei *E. coli* Genen kodiert bei Streptomycceten das Start-Codon GTG zu 36 % für den Start eines Genes (bei *E. coli* zu 3 %; *Kieser et al.*, 2000). Die Sequenzdaten finden sich im Anhang dieser Arbeit.

GGC	CGC	GGT	GTG	<u>AAC</u>	GCG	CGG	GTG	<u>AGC</u>	ACC...
			V	N	A	R	V	S	T ...

Abbildung 3.22 Ausschnitt aus dem Sequenzbereich für die AHBA-Synthase (3'-Ende) und der Oxidoreduktase (5'-Ende) von *K. putterlickiae*. Die Stop-Codons für das AHBA-Synthasegen sind unterstrichen. Mögliche Start-Codons (GTG) für die Oxidoreduktase sind rot markiert. Aufgrund von Sequenzvergleichen auf Aminosäureebene erscheint es wahrscheinlicher, dass das zweite Start-Codon (hier Kasten) für den Beginn des Oxidoreduktasegens kodiert.

717 bp des dritten ORFs kodieren für ein Gen mit Homologien zur Phosphatase. Dieses Gen liegt 166 bp stromabwärts des Oxidoreduktasegens. Die Sequenz ist im Anhang aufgeführt.

Weitere Sequenzierungen der Subklone von 1 5Zf P/S 2.2 wurden von *Wings (2001)* durchgeführt. Neben der beinahe vollständigen Sequenzierung des Kinasegens konnte stromaufwärts der AHBA-Synthase ein offenes Leseraster detektiert werden, das für eine aDHQ-Dehydratase kodiert (*Wings, 2001*). Zusammen mit diesen Sequenzen ist damit die Basenfolge für einen zusammenhängenden DNA-Abschnitt von ca. 4,9 kb des Stammes *K. putterlickiae* bekannt.

Alle Gene der AHBA-Biosynthese, die nach heterologer Expression in *S. coelicolor* ausreichen, um AHBA zu bilden (*Yu et al., 2001*), wurden damit in *K. putterlickiae* detektiert.

Um schnell Informationen über weitere Sequenzabschnitte zu erhalten, wurde zusätzlich das so genannte „shotgun sequencing“ durchgeführt. Bei dieser Methode wurde die DNA des Cosmids pTBc2 mit dem Enzym Sau3AI hydrolysiert (2.5.6.1) und alle möglichen Fragmente in einen BamHI restringierten pBluescript II KS(-)-Vektor kloniert (2.5.8.3), ohne dass die genaue Lage der Fragmente zueinander bekannt war. Die Plasmid-DNA aller generierten Klone wurde sequenziert.

Bei der Sequenzierung des Plasmids 4 5Zf P N/S 1.4 wurden auch Bereiche ansequenziert, die stromabwärts des Phosphatasegens lagen. Ca. 400 bp wurden mit Hilfe des Programms „Blastx“ (s. 2.5.14.5) auf Homologien zu bereits bekannten Genen analysiert. Dabei zeigte sich auf der Aminosäureebene eine Homologie zu den ersten Aminosäuren von AsmA aus *A. pretiosum*. Das Protein AsmA besteht u. a. aus einer „Ketten-Initiations-Domäne“ mit Acyl-Carrier-Protein (ACP) und einer Adenyltransferase, die zur Aktivierung der mC₇N-Starter-Einheit dienen. Die Charakteristika aller bisher ermittelten Sequenzdaten von *K. putterlickiae* sind in einer Übersicht in Tabelle 3.3 wiedergegeben.

Protein	Länge (AS)	Sequenzhomologie	Funktion
KitK (Kinase)	327 (partiell)	RifN <i>A. mediterranei</i> (55 %)	Kinase
aDHQH	146	RifJ <i>A. mediterranei</i> (74 %)	Aminodehydrochinat-dehydratase
KitA (AHBA-Synthase)	388	GdnA <i>S. hygroscopicus</i> (73,6 %)	AHBA-Synthase
KitO (Oxidoreduktase)	368	ShnO <i>S. hygroscopicus</i> (58 %)	Oxidoreduktase
KitP (Phosphatase)	238	ShnP <i>S. hygroscopicus</i> (65 %)	Phosphatase
AACPL	39 (partiell)	AsmA <i>A. pretiosum</i> (61 %)	PKS-CoA-Ligase
PKS	58 (partiell)	PimS2, <i>S. natalensis</i> (48 %)	Polyketidsynthese
PKS	56 (partiell)	Rif-PKS, Modul 9/ 10 (71 %)	Polyketidsynthese

Tabelle 3.3 Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind zusammenfassend dargestellt (inkl. der Arbeiten von *Wings, 2001*). Die Sequenzhomologien auf Aminosäureebene (in Prozent identische Aminosäuren, bezogen auf überlappende Bereiche) und die möglichen Funktionen sind aufgeführt.

3.4.2.3 Untersuchung des Cosmids pTBc2 auf weitere Gene der Maytansinbiosynthese

Die Sequenzierungen von DNA aus *K. putterlickiae* (s. 3.4.2.2) ergaben bereits Hinweise auf Gene, die sich mit den Genen der AHBA-Biosynthese in einem Cluster befinden könnten. In Southern Hybridisierungen (s. 2.5.13) mit genomischer DNA und mit Cosmid-DNA von *K. putterlickiae* sollte nach Homologien zu weiteren Genen der Maytansinbiosynthese gesucht werden. Im Folgenden wird auf die jeweils verwendeten Sonden eingegangen, die bis auf die Sonde für eine Polyketidsynthase alle von DNA aus *A. pretiosum* stammten.

Typ-I-Polyketidsynthase

Eine Typ-I-Polyketidsynthase (PKS) zeichnet sich für die Biosynthese der Ansastruktur in Rifamycin (*August et al., 1998*) und in Ansamitocin (*Yu et al., 2002*) verantwortlich. Eine solche TypI-PKS baut ebenfalls das Polyketidgerüst von Erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea* auf (*Donadio et al., 1991*). Zur Herstellung der Sonde für eine Typ-I-Polyketidsynthase (PKS) wurde das Plasmid pA1M5 (s. Tab. 2.7) mit SacII hydrolysiert. Dabei wurde eine Insertion von 2,4 kb isoliert, die kodierende Abschnitte für eine Ketosynthase (KS-5) und eine Acyltransferase (AT-5) des 5. Moduls des eryAIII-Gens (ORF3 von eryA) enthielt (*Donadio et al., 1991*). Das 2,4 kb SacII-Fragment wurde mit Digoxigenin markiert (s. 2.5.13.2) und als Sonde eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen (Vor- und Hybridisierung bei 42 °C; Waschschrte mit 0,1x-Waschpuffer bei RT) wurden Hybridisierungssignale für die PstI/ XbaI-Fragmente (17,8 kb und 11,2 kb), für die PstI/ SacI-Fragmente (9,2 kb, 8 kb und 4,2 kb) sowie für die PstI/ NcoI-Fragmente (13,6 kb; 7,1 kb und 2,7 kb) des Cosmids pTBc2 sichtbar (vgl. Tabelle 3.2). Anhand der Restriktionskartierung des Plasmids pTBc2 lassen sich diese DNA-Fragmente den Abschnitte des Cosmids zuordnen, auf denen die PKS lokalisiert ist. Ein zusammenhängender DNA-Abschnitt von ca. 23,4 kb besitzt Homologien zu Typ-I-Polyketidsynthasen. Wie auch die Sequenzierung einer PKS-CoA-Ligase (s. 3.4.2.2) bestätigt, beginnt dieser Bereich direkt stromabwärts des Phosphatasegens und reicht bis zu dem Abschnitt der mit der aDAH-P-Synthase hybridisiert (8,7 kb PstI-Fragment, vgl. Abb. 3.20).

3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase

Bei der Kettenverlängerung wird in die Polyketidstruktur von Ansamitocin neben Acetat- und Propionateinheiten auch eine hydroxylierte C₂-Einheit eingebaut (s. 1.2.2). Ein Subcluster von fünf Genen kodiert für die Bildung von 2-Methoxymalonyl-ACP (*Kato et al., 2002*). Das Gen asm13 kodiert für eine 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und scheint spezifisch für die

Biosynthese hydroxylierter C₂-Einheiten verantwortlich zu sein (*Carroll et al., 2002*). Diese auch als „Glycolat“-Einheiten bezeichneten Vorstufen finden sich nur noch in wenigen weiteren Polyketiden, so z.B. in Geldanamycin (*Haber et al., 1977*), FK506 (*Byrne et al., 1993*) und Soraphen (*Hill et al., 1998*). Als asm13-Sonde diente ein 0,45 kb EcoRI/ PvuII-Fragment des Plasmid pHGF7577 (s. Tab. 2.7). Dieses Fragment wurde sowohl mit Digoxigenin als auch radioaktiv markiert (s. 2.5.13.2 und 2.5.13.3) und dann als Sonde verwendet. Die radioaktiv markierte Sonde wurde nur bei genomischer DNA von *K. putterlickiae* verwendet. Weder die Cosmid-DNA noch die genomische DNA hybridisierten unter unterschiedlichen Bedingungen mit der heterologen Sonde.

Amidsynthase

Die gebildete Polyketidkette wird bei der Maytansinoidbiosynthese mit Hilfe einer Amidsynthase mit der Aminogruppe der mC₇N-Einheit verknüpft, so dass eine Makrolactamstruktur ausgebildet wird. Für eine Amidsynthase-Sonde wurde ein 0,8 kb NdeI/ KpnI-Fragment des Plasmids pHGF7579 (s. Tab. 2.7) verwendet, das einen kodierenden Bereich für das Amidsynthasegen (asm9) aus *A. pretiosum* enthält. Dieses Fragment wurde einmal durch das Klenow-Fragment radioaktiv markiert (s. 2.5.13.3) und als Sonde für Hybridisierungen mit genomischer DNA eingesetzt. Zum anderen erfolgte eine Markierung mit Digoxigenin (s. 2.5.13.2). Die Digoxigenin-markierte Sonde wurde sowohl mit genomischer DNA als auch mit Cosmid-DNA hybridisiert. Trotz unterschiedlich gewählter Stringenzbedingungen konnte keine Hybridisierung festgestellt werden. Einzig bei den Southern Hybridisierungen mit Cosmid-DNA zeigten sich selbst bei höheren Stringenzen dort Hybridisierungssignale, wo der Cosmid-Vektor pOJ446 im Gel getrennt war.

Halogenase und Carbamoyltransferase

Heterologe Sonden wurden für Gene erstellt, die bei der Ansamitocinbiosynthese an postsynthetischen Modifikationen beteiligt sind (s. 1.2.2). Radioaktiv- und Digoxigenin-markierte Sonden wurden für das Halogenasegen (asm12) und das Carbamoyltransferasegen (asm21) synthetisiert (s. 2.5.13.2 und 2.5.13.3). Für die Halogenasegen-Sonde wurde ein Fragment von 1,3 kb mit NdeI und KpnI aus dem Plasmid pRSET(Hal)H5 (s. Tab. 2.7) geschnitten. Ein 2,0 kb großer DNA-Abschnitt des Carbamoyltransferasegens wurde durch Hydrolyse von p4/27-21 (s. Tab. 2.7) mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII erhalten. Hybridisierungsexperimente mit genomischer DNA und mit Cosmid-DNA waren negativ.

Acyltransferase

Die Acyltransferase (Asm19) katalysiert einen der späteren Schritte der Maytansinoidbiosynthese. Das Plasmid pAtr-A7 (s. Tab. 2.7) wurde mit EcoRI und NdeI restringiert, um ein asm19-Fragment zu erhalten, das durch das Klenow-Fragment radioaktiv markiert wurde (s. 2.5.13.3). Die radioaktive Sonde wurde in Hybridisierungsversuchen mit genomischer DNA von *K. putterlickiae* eingesetzt (s. 2.5.13.5). Unter höher stringenten Bedingungen (Vor- und Hybridisierung bei 68 °C, Waschschrift mit 0,1x-Waschpuffer bei 68 °C) hybridisierten ein ca. 11 kb großes SacI-Fragment, ein 11 kb KpnI-Fragment sowie ein 9 kbPstI-Fragment von *K. putterlickiae*.

Zusammenfassend betrachtet wurden Homologien zu weiteren Genen der Maytansinoidbiosynthese nur für ein Typ-I-Polyketidsynthasegen und für ein Acyltransferasegen (asm19) gefunden. Dieses Ergebnis deutete daraufhin, dass weitere essentielle Gene für eine Maytansinoidbiosynthese fehlen oder aber nicht in unmittelbarer Nähe der AHBA-Synthase liegen. Es ist jedoch auch möglich, dass entsprechende Gene deshalb nicht in *K. putterlickiae* detektiert wurden, weil die Sequenzhomologien der Gene zueinander zu gering sind. Sind einige Gene nur sehr wenig konserviert (für das Amidsynthasegen diskutiert, *T.-W. Yu*, persönliche Mitteilung), lassen sie sich schlechter in PCR und Southern Hybridisierungen mit genomischer DNA nachweisen.

3.5 Untersuchung der Anfangsschritte der AHBA-Biosynthese

In molekularbiologischen und biochemischen Versuchen sollten im Rahmen dieser Arbeit die ersten Schritte der neu postulierten AHBA-Biosynthese untersucht werden (s. 1.2.1). In einem Rohextrakt von *K. putterlickiae* war keine Enzymaktivität messbar. Da alle bisherigen Studien zur AHBA-Biosynthese mit den Enzymen von *A. mediterranei* durchgeführt wurden, wurden daraufhin in dieser Arbeit ebenfalls die Gene rifK (AHBA-Synthase), rifL (Oxidoreduktase) und rifM (Phosphatase) des Rifamycin-Bildners *A. mediterranei* für die biosynthetischen Untersuchungen verwendet. Damit sollte es möglich sein, die Ergebnisse direkt mit vorherigen Biosyntheseuntersuchungen zu vergleichen.

Erste Versuche zur Enzymaktivität der Oxidoreduktase wurden bereits von K. Arakawa (persönliche Mitteilung) durchgeführt. Dabei wurde die Oxidoreduktase RifL aus *A. mediterranei* zusammen mit der AHBA-Synthase RifK aus *A. mediterranei* in *E. coli* coexprimiert. Die Coexpression ergab Hinweise auf eine Interaktion der beiden Proteine (s. a.

3.5.1.2). Nach der Aufreinigung der in *E. coli* coexprimierten Enzyme wurde in einem enzymatischen Test die Aktivität der Oxidoreduktase bestimmt. Die gemessene Aktivität war allerdings nur sehr gering und nicht immer reproduzierbar messbar. Aus diesem Grund sollten die Coexpression der AHBA-Synthase und der Oxidoreduktase sowie die anschließende Proteinaufreinigung optimiert werden. In einem optimierten System sollte dann die katalysierte Reaktion genauer charakterisiert werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Phosphatase RifM (vgl. Abb. 1.4) an einer Interaktion mit den beiden anderen Enzymen beteiligt ist.

3.5.1 Biosynthetische Untersuchungen nach heterologer Expression in *E. coli*

3.5.1.1 Coexpression von Oxidoreduktase (RifL), Aminotransferase (RifK) und Phosphatase (RifM) aus *A. mediterranei* in *E. coli*

Für die Coexpression der Oxidoreduktase RifL, der AHBA-Synthase RifK und der Phosphatase RifM wurden die in Tabelle 3.4 aufgeführten Plasmide eingesetzt. Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Plasmide findet sich in Tab. 2.8.

Plasmidbezeichnung	Eigenschaft	Überexpression von ...	Tabelle 3.4
pRM030	Amp ^r	His-RifL	Plasmide, die zur Coexpression verwendet wurden. Einige Plasmide kodieren für Poly-Histidin-Fusionsproteine. Die Plasmide pHGF7705, pHGF7720 und pHGF7719 kodieren jeweils für die Expression von zwei Proteinen, die z. T. als Poly-Histidin-Fusionsproteine exprimiert werden.
EAHBA6	Amp ^r	His-RifK	
pRM064	Amp ^r	His-RifM	
4pTBrifL	Apra ^r	RifL	
pHGF7711	Apra ^r	RifK	
pHGF7705	Amp ^r	RifL und RifM	
pHGF7720	Amp ^r	His-RifL und RifM	
pHGF7719	Amp ^r	RifK und His-RifL	

Das Plasmid 4pTBrifL wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Dazu wurde das Plasmid pHGF7719 mit den Endonukleasen NdeI und HindIII gespalten (s. 2.5.6.1) und ein 1,3 kb NdeI/ HindIII-Fragment, das das rifL-Gen ohne Poly-Histidin-Anteil enthielt (s. Abb. 3.23), wurde isoliert (s. 2.5.4 und 2.5.2.2). Um das isolierte rifL-Gen in einen Expressionsvektor mit einem Apramycinresistenzgen zu ligieren, wurde das Plasmid pHGF7711 (s. Abb. 3.23) mit NdeI und HindIII hydrolysiert (s. 2.5.6.1). Das Plasmid pHGF7711 besteht aus dem rifK-Gen, das in einen modifizierten Expressionsvektor pRSET B ligiert wurde (s. Tab. 2.8). Bei der Hydrolyse von pHGF7711 wurde das Gen rifK aus dem Plasmid geschnitten (vgl. Abb. 3.23). In der nachfolgenden Gelelektrophorese (2.5.4) wurden die DNA-Fragmente getrennt und der Vektoranteil von pHGF7711 (4,41 kb NdeI/ HindIII-Fragment) aus dem Gel isoliert (s. 3.5.2.2). Das 4,41 kb NdeI/ HindIII-Fragment (Vektoranteil von pHGF7711) wurde dann mit dem 1,3 kb NdeI/ HindIII-Fragment aus pHGF7719 (rifL-Gen) ligiert (s. 2.5.6.5).

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit dem neu generierten Plasmid transformiert (s. 2.5.8.3). Das neu erzeugte Plasmid 4pTBrifL entspricht dem Plasmid pHGF7711, in dem anstelle des Gens *rifK* das Gen *rifL* ligiert wurde.

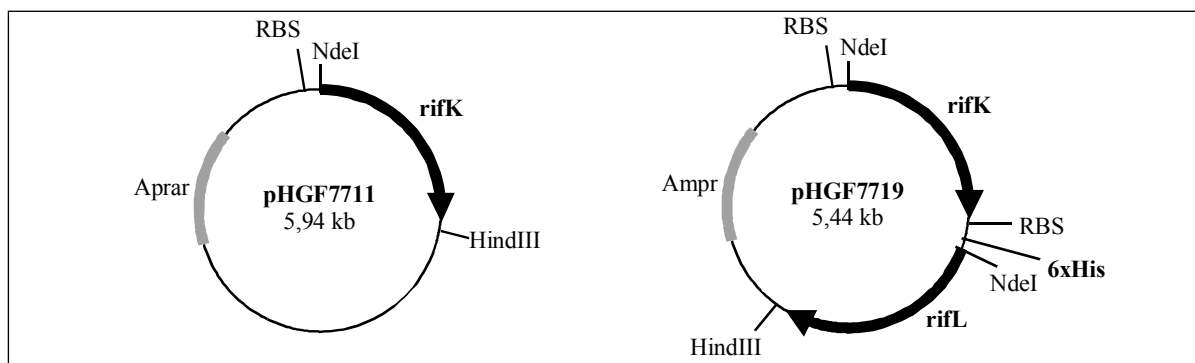


Abbildung 3.23 Plasmidkarten der Plasmide pHGF7711 und pHGF7719.

Für die Coexpression wurden die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS (vgl. 3.4.1.4) mit den in Tabelle 3.4 aufgeführten Plasmiden nach 2.5.8.3 transformiert. Dabei wurde ein Stamm meist mit zwei Plasmiden gleichzeitig transformiert, um später zwei Gene gemeinsam exprimieren zu können. In Tabelle 3.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidkombinationen aufgeführt. Nur das Plasmid pHGF7719 wurde allein in einer Transformation eingesetzt, da es für die Expression von zwei Genen (*rifK* und *rifL* als Poly-Histidin-Fusionsprotein) kodiert.

Die Plasmide, mit denen die *E. coli*-Zellen gleichzeitig transformiert wurden, mussten unterschiedliche Antibiotikaresistenzgene besitzen. Die Klone, die zwei Plasmide enthielten, wurden durch die Zugabe verschiedener Antibiotika selektiert.

Verwendete Plasmidkombinationen	Coexpression von ...	Bemerkung
pHGF7719	RifK und His-RifL	Beide Gene sind auf einem Plasmid lokalisiert.
pHGF7711 und pRM030	RifK und His-RifL	Gene sind auf zwei Plasmiden lokalisiert.
EAHBA6 und 4pTBrifL	His-RifK und RifL	
pHGF7711 und pHGF7705	RifK, RifL und RifM	
pHGF7711 und pHGF7720	RifK, His-RifL und RifM	

Tabelle 3.5 Für die in dieser Arbeit durchgeführten Coexpressionen wurden die *E. coli* Stämme BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS wurden mit den in dieser Tabelle aufgeführten Plasmiden bzw. Plasmidkombinationen transformiert.

Einzelne Klone wurden nach 2.6.3.3 angezogen und mit IPTG induziert. Dabei erfolgte die Induktion nach dem modifizierten Protokoll für schwerlösliche oder toxische Proteine in LB-Betain/ Sorbitol-Medium, um den Anteil an löslichem Protein zu erhöhen. Nach der Anzucht der *E. coli*-Kulturen wurde die Zellsuspension geerntet und der zellfreie Rohextrakt nach 2.6.3.3 hergestellt. Abhängig von der Wahl der cotransformierten Plasmide (s. Tab. 3.5)

wurde entweder die rekombinante AHBA-Synthase oder die rekombinante Oxidoreduktase als Poly-Histidin-Fusionsprotein exprimiert. Das jeweils coexprimierte Enzym wurde ohne Fusionsanteil gebildet.

3.5.1.2 Aufreinigung und Funktionsanalyse der in *E. coli* coexprimierten Enzyme

Die coexprimierten Enzyme wurden gereinigt, um anschließend in einem enzymatischen Test die Aktivität der Oxidoreduktase zu untersuchen. Dazu wurden die nach 2.6.3.3 gewonnenen zellfreien Rohextrakte mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie gemäß 2.6.3.4 gereinigt. Poly-Histidin-Fusionsproteine binden an die Nickelmatrix, indem sich ein Protein-Nickel-Chelatkomplex bildet. Nicht bindende Proteine wurden abweichend von 2.6.3.4 mit Lysepuffer C (s. 2.1.8.7) von der Matrix gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit imidazolhaltigem Puffer (s. 2.6.3.4). Der Proteingehalt des Eluates wurde nach Bradford bestimmt (2.6.1). War die Proteinkonzentration sehr gering, wurde das Eluat eingengt (s. 2.6.3.4). Durch SDS-PAGE (s. 2.6.2) wurden die einzelnen Reinigungsschritte dokumentiert.

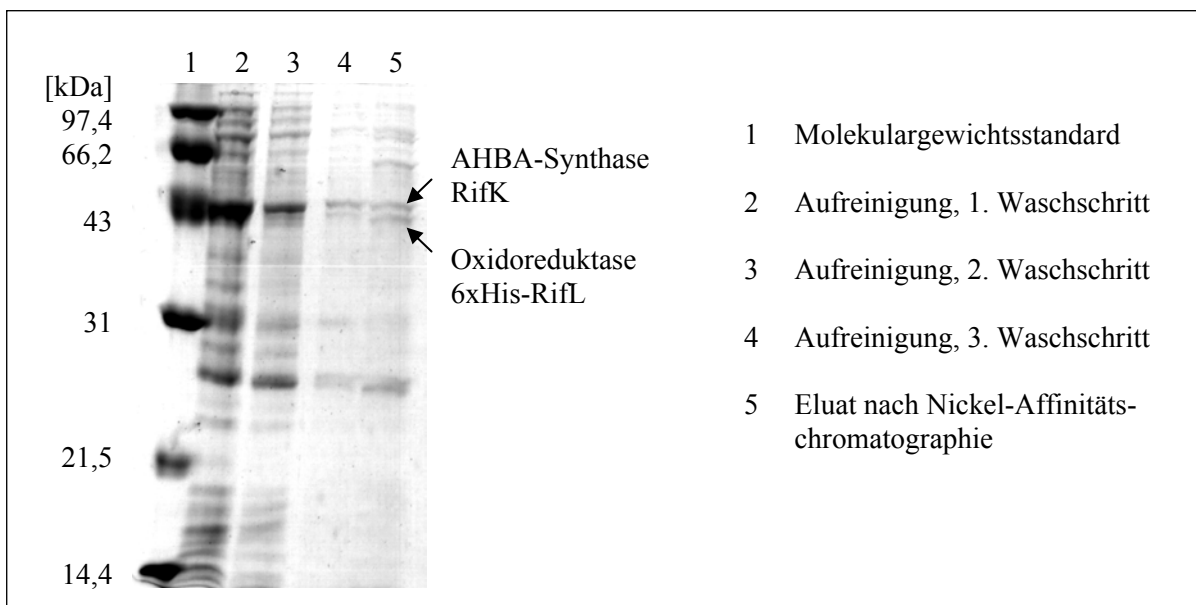


Abbildung 3.24 SDS-PAGE verschiedener Aufreinigungsschritte der Nickel-Affinitätschromatographie für den zellfreien Rohextrakt aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ (pHGF7711 und pRM030). Die erwartete Proteingröße der 6xHistidin-Oxidoreduktase RifL beträgt 41,9 kDa. Die berechnete Proteingröße der AHBA-Synthase RifK liegt bei 42,1 kDa.

Wurde ein zellfreier Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ pHGF7719 oder von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ (pHGF7711 und pRM030) mit der Nickel-Affinitätschromatographie aufgearbeitet, befand sich im Eluat neben dem RifL-Fusionsprotein auch die rekombinante AHBA-Synthase RifK (s. Abb. 3.24), obwohl das Protein RifK nicht als Poly-Histidin-Fusionsprotein exprimiert wurde. Da die AHBA-Synthase bei den vorherigen Waschschriften

nicht vollständig entfernt wurde, musste das Protein an die rekombinante Oxidoreduktase RifL gebunden haben. Dies deutet auf eine Interaktion der Oxidoreduktase mit der AHBA-Synthase hin (die Proteininteraktion der beiden Enzyme wurde bereits von *K. Arakawa* beschrieben, persönliche Mitteilung). Interessant war außerdem, dass die rekombinante Oxidoreduktase RifL in *E. coli* bis dahin nicht als lösliches Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Die Coexpression der AHBA-Synthase mit der Oxidoreduktase erhöhte die Proteinlöslichkeit.

In den zellfreien Extrakten wurde die AHBA-Synthase häufig in höheren Konzentrationen synthetisiert. Anscheinend wurden umgekehrt sehr geringe lösliche Proteinmengen der Poly-Histidin-Oxidoreduktase RifL gebildet, so dass nicht jedes Molekül AHBA-Synthase an die Oxidoreduktase binden konnte. Über die Art des gebildeten Enzymkomplexes ist allerdings noch nichts bekannt. Auffällig ist jedoch, dass sich auch in den Waschschritten bereits Proteinbanden finden, die der AHBA-Synthase entsprechen (s. Abb. 3.24).

Wurde umgekehrt die AHBA-Synthase als Poly-Histidin-Fusionsprotein mit der nativen Oxidoreduktase coexprimiert (*E. coli* BL21(DE3)pLysS/ (EAHBA6 und 4pTBrifL)) und der zellfreie Extrakt gereinigt, konnte im SDS-Polyacrylamidgel (s. 2.6.2) eine starke Proteinbande für die 6xHistidin-AHBA-Synthase detektiert werden. Diese Bande war in der Eluatfraktion die prominenteste Bande. Die Oxidoreduktase wurde dagegen nur sehr schwach exprimiert. Die Interaktion zwischen der Oxidoreduktase und der AHBA-Synthase wurde demnach eher durch die Expression der Oxidoreduktase als Poly-Histidin-Fusionsprotein begünstigt.

Im zellfreien Extrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ (pHGF7720 und pHGF7711) (s. Tab. 3.5) wurde neben der rekombinanten AHBA-Synthase und der 6xHistidin-Oxidoreduktase auch die rekombinante Phosphatase RifM exprimiert. Die erwartete Größe für die rekombinante Phosphatase betrug 24,8 kDa. Prominente Proteinbanden entsprechender Größe konnten in der SDS-PAGE gefunden werden. Große Teile des Proteins wurden jedoch durch die Waschschriffe der Nickel-Affinitätschromatographie entfernt. Im Eluat zeigte sich nur eine sehr schwache Proteinbande, die der Phosphatase rifM entsprach.

Nach der Reinigung der überexprimierten Proteine wurde in einem enzymatischen Test die Aktivität der Oxidoreduktase untersucht. Die Bedingungen sind unter 2.6.5.2 beschrieben. Als Proben wurden die jeweiligen Eluatfraktionen aus der Nickel-Affinitätschromatographie verwendet. In den Inkubationen wurden verschiedene Proteinkonzentrationen (10-100 µg/ ml

Endkonzentration) getestet. Da der zellfreie Extrakt aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ (pHGF7711 und pHGF7705) (s. Tab. 3.5) nicht über die Nickel-Affinitätschromatographie zu reinigen war, wurde in diesen Inkubationen der zellfreie Rohextrakt direkt verwendet.

Obwohl in der SDS-PAGE die Expression der rekombinanten Oxidoreduktase RifL nachgewiesen werden konnte, blieb die Oxidoreduktase-Aktivität überaus niedrig und war oft nicht reproduzierbar. Dies war unabhängig davon, ob die Oxidoreduktase als Poly-Histidin-Fusionsprotein oder als natives Protein exprimiert wurde. Die zusätzliche Expression der Phosphatase RifM brachte keine Aktivitätsverbesserung. Aktivitätstestungen mit zellfreien Rohextrakten waren ebenfalls nicht reproduzierbar. Die Änderungen der Anzuchtbedingungen (Induktion mit geringeren IPTG-Konzentrationen, Induktionsdauer oder niedrigere Kultivierungstemperaturen) erzielten keine Aktivitätssteigerung.

Zudem wurde versucht, die Aktivität durch Modifikationen bei der Herstellung des zellfreien Proteinextraktes zu verbessern:

- In gram-negativen Bakterien finden sich im periplasmatischen Raum hydrolytische Enzyme, wie z.B. Hydrolasen, Phosphatasen und Proteasen. Diese Kompartimentierung wird bei der Herstellung eines zellfreien Rohextraktes zerstört. Die überexprimierten Proteine sind dann vor einem Angriff hydrolytischer Enzyme nicht mehr geschützt. Durch das Zufügen von Proteasehemmern können proteolytische Enzyme inhibiert werden. Allerdings werden nicht alle Klassen proteolytischer Enzyme mit einem Proteasehemmer gleich gut gehemmt. Der Proteasehemmer PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) inhibiert Serinesterasen, Thioproteasen sowie einige Carboxypeptidasen (*Scopes, 1994*). PMSF wurde in einer Endkonzentration von 1 mM dem Lysepuffer C (s. 2.1.8.7 und 2.6.3.3) zugegeben.
- Proteine können durch den Zusatz von Glycerol stabilisiert werden. Die Glycerolzugabe zu wässrigen Proteinlösungen bewirkt, dass die Proteine bevorzugt Wasser binden. Die dabei gebildete Proteinstruktur bleibt mit einer größeren Häufigkeit erhalten als in einer wässrigen Proteinlösung ohne Glycerol (*Gekko und Timasheff, 1981*). Glycerol wurde in einer Endkonzentration von 20 % (m/ V) dem Lysepuffer C (s. 2.1.8.7) zugefügt.
- Die Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein wird in der Zelle durch ein reduzierendes Milieu und durch das Vorkommen weiterer Sulfhydrylgruppen vor der Oxidierung geschützt. Diese Umgebung wird bei der Herstellung eines zellfreien Rohextraktes zerstört und die Bildung von Disulfiden wird begünstigt. Um die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern, wurden dem Lysepuffer C (s. 2.1.8.7 und 2.6.3.3) 1 mM DTT (Dithiothreitol) zugefügt. Dieses Reagenz wird selbst zu einer intramolekularen Disulfidverbindung

oxidiert ohne mit den Sulfhydrylgruppen der Proteine zu interagieren. Konzentrationen bis zu 1 mM DTT (Endkonzentration) waren mit der Nickel-Affinitätschromatographie kompatibel. Höhere Konzentrationen führen zu Beeinträchtigungen der Affinitätschromatographie.

Die verschiedenen Zusätze zum Lysepuffer C führten nicht zu einer reproduzierbar messbaren Aktivität der Oxidoreduktase. Zusätzlich wurde versucht, die Aktivität der Oxidoreduktase zu steigern, indem mögliche Cofaktoren wie NAD, NADP und NADH in jeweils verschiedenen Ansätzen dem Lysepuffer C (s. 2.1.8.7) in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt wurden. Dies resultierte jedoch nicht in einer verbesserten Aktivität des Enzyms.

Aktivitätstests wurden außerdem mit Proteinextrakten durchgeführt, die mit Hilfe des „BD TALON™ Resins“ (s. 2.6.3.4) gereinigt wurden. Im „TALON™“-System sind Cobaltionen an eine Sepharose-Matrix in einem Chelatkomplex gebunden. Zwei weitere Bindestellen stehen für eine Chelatbildung mit Histidinresten eines exprimierten Proteins zur Verfügung. Da Poly-Histidin-Fusionsproteine bei der Cobalt-Affinitätschromatographie selektiver als bei der Nickel-Affinitätschromatographie gebunden werden sollen, können die gebundenen Proteine unter milderen Bedingungen eluiert werden. Die Verwendung der Cobalt-Affinitätschromatographie führte jedoch nicht zu einem Vorteil bei den nachfolgenden Aktivitätsmessungen. Eine Aktivität der heterolog in *E. coli* exprimierten Oxidoreduktase konnte nicht nachgewiesen werden. Die Beobachtungen von *Arakawa* waren nicht reproduzierbar und vermutlich auf experimentelle Fehler zurückzuführen.

3.5.2 Biosynthetische Untersuchungen nach Expression in *Streptomyces lividans*

3.5.2.1 Arbeiten zur heterologen Überexpression von Aminotransferase, Oxidoreduktase und Phosphatase (RifK-M) in *Streptomyces lividans*

Die heterologe Expression der AHBA-Synthase, der Oxidoreduktase und ggf. der Phosphatase in *E. coli* lieferte nur geringe Proteinausbeuten. Außerdem war die Oxidoreduktase-Aktivität überaus niedrig und oft nicht reproduzierbar (s. 3.5.1.2). Daher sollte untersucht werden, ob sich eine Expression in einem Streptomyceten besser eignete, um aktive Proteine zu erhalten. Aus der Literatur war bereits beschrieben, dass Gene aus Streptomyceten oft nur schwer in *E. coli* exprimierbar sind (*Kieser et al., 2000*). Viele Promotoren aus Streptomyceten sind in *E. coli* nicht regulierbar und auch die Translation verläuft nicht effizient (*Kieser et al., 2000*). Zusätzlich ist die Löslichkeit der entstehenden Proteine in einem Streptomyceten-System oft sehr viel besser als in *E. coli*. Da der

Rifamycin-Produzent *Amycolatopsis mediterranei* sehr nah mit Streptomycceten verwandt ist, sollte versucht werden, die Gene *rifK* (AHBA-Synthasegen), *rifL* (Oxidoreduktasegen) und *rifM* (Phosphatasegen) in *Streptomyces lividans* zu exprimieren.

Mit dem Plasmid pIJ4123 stand ein Expressionsvektor zur Verfügung, mit dem Poly-Histidin-Fusionsproteine in Streptomycceten exprimiert werden können. Ein Derivat dieses Vektors, pIJ6021, ermöglicht die Expression nativer Proteine in Streptomycceten (Takano *et al.*, 1995). Da die Gene *rifK*, *rifL* und *rifM* im Genom von *A. mediterranei* unmittelbar hintereinander liegen, sollten die Gene in der gleichen Reihenfolge in die Plasmide pIJ4123 und pIJ6021 inseriert werden. Die Klonierungsstelle der Plasmide pIJ4123 und pIJ6021 enthält nur Restriktionsschnittstellen für NdeI, BamHI und EcoRI, die für Ligationen genutzt werden können. Da die Enzyme BamHI und EcoRI die Gene *rifK*-*rifM* schneiden, musste eine aufwendige Klonierungsstrategie angewandt werden, um eine Ligation im richtigen Leseraster zu ermöglichen. Für eine einfachere Handhabung erfolgten möglichst viele Schritte im Klonierungsvektor Litmus28, der in *E. coli* replizierbar ist, da die Plasmide pIJ4123 und pIJ6021 keinen Replikationsursprung für *E. coli* besitzen. Ein Teil der Klonierungsstrategie ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

Das Plasmid pRM028 mit einem 15,8 kb KpnI-Fragment des Rifamycin-Clusters aus *A. mediterranei* (u. a. die Gene *rifK*, *rifL*, *rifM*) diene als Ausgangspunkt für die Klonierungen. Ein 3,4 kb EcoRI/ BsrGI-Fragment wurde aus pRM028 (s. Tab. 2.7) isoliert, auf dem sich die Gene *rifK*, *rifL* und *rifM* befanden. Da das *rifK*-Gen nach den ersten 22 Nukleotiden durch das Enzym EcoRI hydrolysiert wurde, fehlte das entsprechende 5'-Ende mit dem Start-Codon von *rifK* auf dem isolierten EcoRI/ BsrGI-Fragment. Um das *rifK*-Gen vollständig in die Expressionsvektor pIJ4123 oder pIJ6021 ligieren zu können, wurde ein PCR-Ansatz gewählt. Als DNA-Matrize wurde das Plasmid pRM028 verwendet. Mit den Oligonukleotiden StreptK-MExfw und StreptK-MExrev2 (s. 2.1.4) wurde ein 0,7 kb-Fragment mit dem N-terminalen Ende des *rifK*-Gens amplifiziert (2.5.5.2). Dabei wurden an den Enden des PCR-Produktes neue Restriktionsschnittstellen synthetisiert. An das 5'-Ende wurden Schnittstellen für die Enzyme HindIII und NdeI eingebaut. Ein Teil der NdeI-Schnittstelle (CATATG) bildet zugleich das Start-Codon von *rifK*. An das 3'-Ende des PCR-Produktes wurde eine Erkennungssequenz für das Enzym XhoI eingeführt (s. Abb. 3.25). Das PCR-Fragment wurde mit den Endonukleasen HindIII und XhoI hydrolysiert (s. 2.5.6.1) und in einen HindIII/ XhoI restringierten Vektor Litmus28 (s. Tab. 2.5) kloniert (2.5.8.3). Das erhaltene Plasmid 9 Lit28 H/X 0.7 wurde mit den Enzymen EcoRI und BsiWI gespalten (s. 2.5.6.1, vgl. Abb. 3.25). Der DNA-Anteil, der

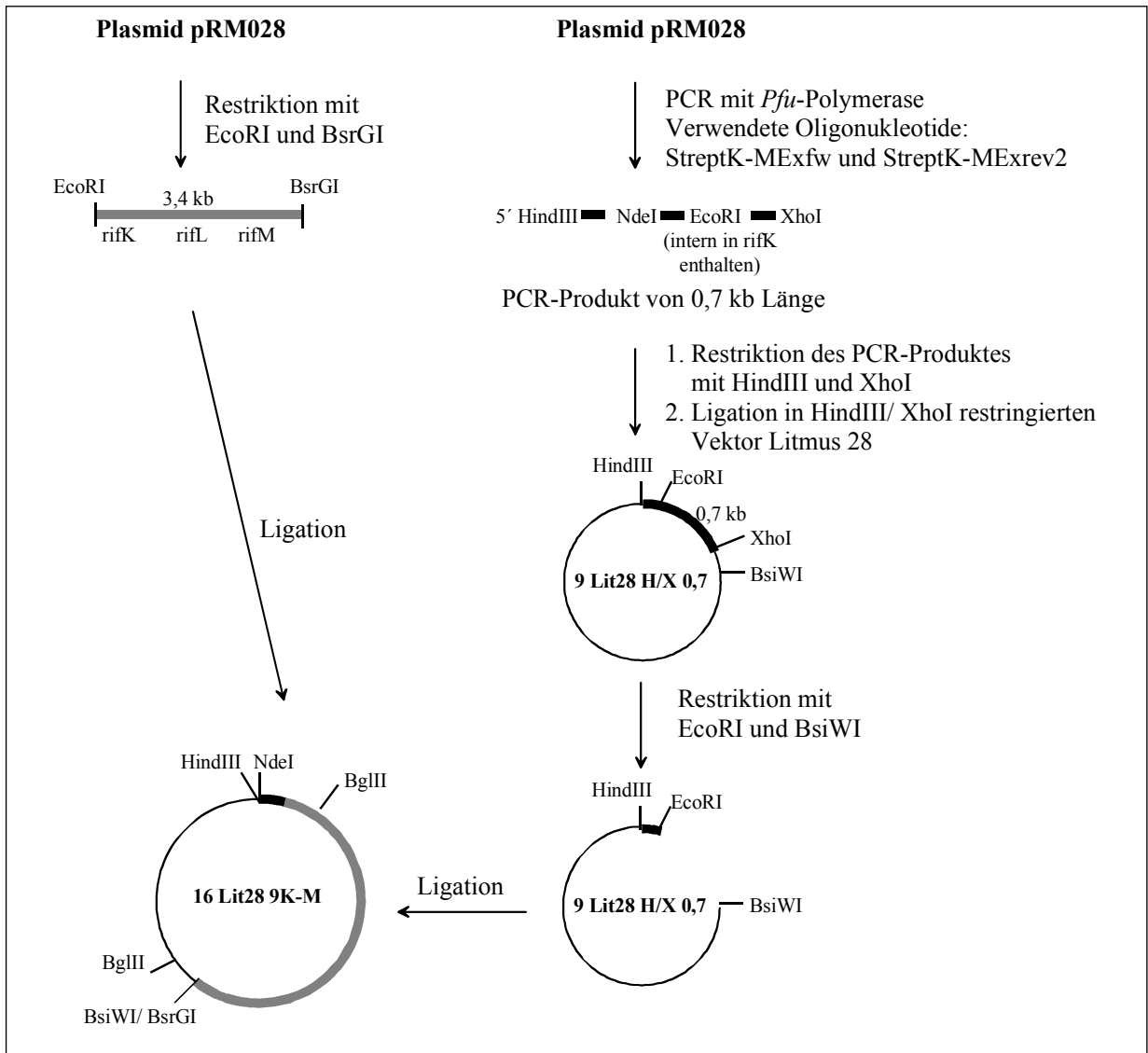


Abbildung 3.25 Klonierungsstrategie zur heterologen Expression der Gene *rifK*, *rifL* und *rifM* in *S. lividans* TK24. Erste Schritte, um die drei Gene in die Plasmide pIJ4123 und pIJ6021 zu ligieren. Die gezeigten Klonierungsschritte finden in *E. coli* statt.

die Vektor-DNA und die ersten 22 Nukleotiden von *rifK* (bis zur EcoRI-Schnittstelle) enthält, wurde isoliert (vgl. Abb. 3.25). Das isolierte DNA-Fragment wurde mit dem 3,4 kb EcoRI/BsrGI-Fragment ligiert (s. 2.5.6.5, vgl. Abb. 3.25). Die Schnittstellen BsrGI (T'GTACA) und BsiWI (C'GTACG) sind miteinander kompatibel. Kompetente Zellen von *E. coli* XL1blue wurden mit dem erzeugten Plasmid transformiert (s. 2.5.8.3). Das generierte Plasmid 16 Lit28 9K-M enthält die vollständigen Gene *rifK*, *rifL* und *rifM* in einer Kassette hintereinander. Diese Genkassette sollte jeweils in die Expressionsvektoren pIJ4123 und pIJ6021 ligiert werden. Als Klonierungsstellen standen in den beiden Vektoren nur Restriktionsschnittstellen für NdeI, EcoRI und BamHI zur Verfügung. Problematisch war, dass Schnittstellen für EcoRI und BamHI auch innerhalb der zu inserierenden DNA enthalten waren. Mit Hilfe der NdeI-Schnittstelle, die durch die gewählte Strategie an den Beginn der Genkassette eingeführt

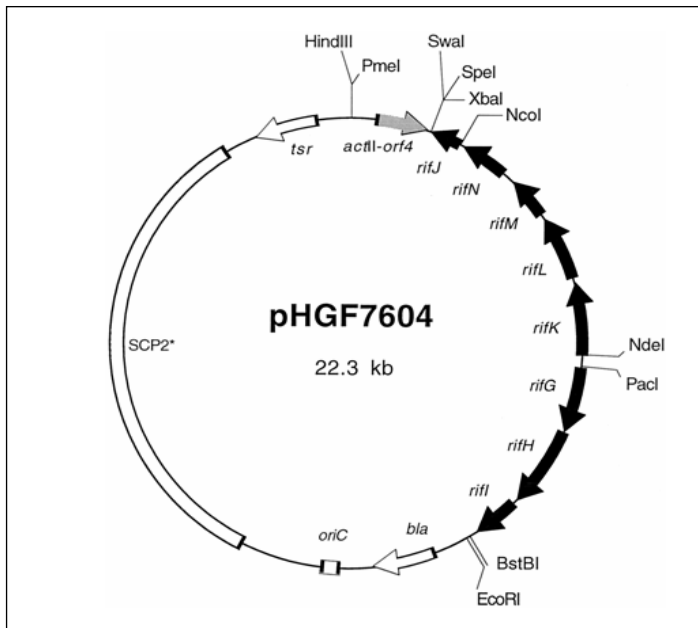
wurde, sollten die Gene im richtigen Leseraster kloniert werden. Das C-terminale Ende der Genkassette sollte über eine BamHI/ BglII-Schnittstelle mit der Vektor-DNA ligiert werden, da die Schnittstellen von BglII (A'GATCT) und BamHI (G'GATCC) miteinander kompatibel sind.

Das Plasmid 16 Lit28 9K-M wurde mit NdeI hydrolysiert (s. 2.5.6.1) und die DNA gereinigt (s. 2.5.3.1). Dann wurde die Plasmid-DNA mit der Endonuklease BglII partiell hydrolysiert. Dazu wurde die DNA mit 0,5 U des Enzyms BglII für 1 h hydrolysiert. Der Ansatz wurde im Agarosegel getrennt (s. 2.5.4). Das Enzym BglII schneidet das Plasmid 16 Lit28 9K-M an zwei Stellen (s. Abb. 3.25). Durch die Partialhydrolyse sollte versucht werden, die Restriktion innerhalb der Genkassette zu verhindern, um ein NdeI/ BglII-Fragment von 3,5 kb isolieren zu können. Die Bildung kleinerer Fragmente sollte unterdrückt werden. Das 3,5 kb-NdeI/ BglII-Fragment, das die Gene *rifK*, *rifL* und *rifM* enthielt, wurde dann mit der NdeI/ BamHI-restringierten Vektor-DNA von pIJ4123 ligiert (s. 2.5.6.5). In einem zweiten Ansatz wurde das 3,5 kb Fragment mit dem NdeI/ BamHI restringierten Vektor-DNA von pIJ6021 ligiert. Da die erzeugten Plasmide keinen Replikationsursprung für eine Vermehrung in *E. coli* enthielten, mussten direkt Zellen von *S. lividans* 1326 oder *S. lividans* TK24 mit den Plasmiden transformiert werden. In Protoplasten von *S. lividans* (s. 2.5.10) wurde die Plasmid-DNA eingebracht (s. 2.5.11). Trotz wiederholter Protoplastierung und Transformation von *S. lividans* konnten keine Klone erzeugt werden, die die Plasmide pIJ4123 bzw. pIJ6021 mit der inserierten Genkassette von *rifK*, *rifL* und *rifM* enthielten.

3.5.2.2 Heterologe Expression von pHGF7604 in *Streptomyces lividans* TK24

Zur heterologen Expression von AHBA-Biosynthesegenen in *Streptomyces coelicolor* erstellten Yu *et al.* (2001) das Plasmid pHGF7604. Die acht Gene *rifG-N* aus *A. mediterranei* wurden in pHGF7604 (s. Abb. 3.26) inseriert. Die Coexpression dieser acht Gene unter der Kontrolle des *act*-Promotors (*actII-orf4* Gen) in *S. coelicolor* führte zur AHBA-Bildung (350-400 mg/ l). Einzelne Gene der Kassette in pHGF7604 wurden deletiert, um die Auswirkungen auf die AHBA-Produktion zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser acht Gene für die AHBA-Biosynthese ausreichend war (Yu *et al.*, 2001).

Da eine Überexpression von *RifK*, *RifL* und *RifM* in *S. lividans* nicht gelang (s. 3.5.2.1), wurde das Plasmid pHGF7604 in dieser Arbeit verwendet, um die ersten Schritte der AHBA-Biosynthese zu untersuchen. Die Gene aus pHGF7604 sollten in *S. lividans* heterolog exprimiert werden, um die Aktivität der exprimierten Proteine nach einer Reinigung im zellfreien Rohextrakt zu untersuchen.

**Abbildung 3.26**

Plasmid pHGF7604 (Yu *et al.*, 2001 entnommen). Der bifunktionelle Vektor lässt sich in *E. coli* (ColE1/ *oriC* Replikationsursprung) und in Streptomyceten (SCP2* Replikationsursprung) replizieren. Zur Selektion in *E. coli* kodiert das β -Lactamasegen (*bla*) für eine Penicillinresistenz. Ein *tsr*-Gen vermittelt Resistenz gegenüber Thiostrepton in Streptomyceten. Die Gene *rifG-N* stammen aus dem Rifamycin-Cluster von *A. mediterranei*. RifG-N kodieren für Enzyme der AHBA-Biosynthese. Werden die acht Gene *rifG-N* in *S. coelicolor* heterolog exprimiert, kann AHBA gebildet werden (Yu *et al.*, 2001).

Der Expressionsstamm *S. lividans* TK24 wurde protoplastiert (s. 2.5.10) und mit dem Plasmid pHGF7604 transformiert (s. 2.5.11). 60 ml modifiziertes R5-Medium mit Zusatz von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Thiostrepton wurden mit dem rekombinanten Stamm *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) beimpft (s. 2.6.4.1). Da kein entsprechender Kontrollvektor (ohne die Gene *rifG-N*) verfügbar war, mit dem der Stamm *S. lividans* TK24 transformiert werden konnte, wurde zur Kontrolle der Stamm *S. lividans* TK24 in modifiziertem R5-Medium kultiviert. Die Stämme wurden für eine Woche kultiviert. Die Anzucht fand unter den Bedingungen statt, bei denen die Bildung von AHBA nachgewiesen werden konnte (Yu *et al.*, 2001). Unter diesen Bedingungen mussten aktive Genprodukte von *rifG-N* gebildet worden sein. Die Expression der Gene erfolgte konstitutiv. Eine Induktion der Genexpression oder eine Überexpression der entsprechenden Proteine war nicht möglich.

Interessanterweise bekamen die Kulturen der rekombinanten *S. lividans*-Stämme eine blaue Farbe. *S. lividans* kann wie *S. coelicolor* das rot-blaue Antibiotikum Actinorhodin bilden. Unter physiologischen Bedingungen produziert *S. lividans* jedoch sehr wenig Actinorhodin. Die Bildung von Actinorhodin wird gesteigert, wenn regulatorische Gene der Actinorhodinbiosynthese in *S. lividans* kloniert werden. Der *actII*-Promotor (Gen *actII-orf4*) stammt aus dem Actinorhodin-Cluster und reguliert in pHGF7604 die Gentranskription. Die Actinorhodinbildung wurde demnach in rekombinanten Stämmen von *S. lividans*/ (pHGF7604) aktiviert.

Nach der Kultivierung wurden die Zellen aufgeschlossen, und der zellfreie Rohextrakt wurde gewonnen (s. 2.6.4.1). Für die nachfolgende Aktivitätsbestimmung war die Zugabe des Proteasehemmers PMSF (1mM) zum Aufschlusspuffer entscheidend. Das zellfreie Lysat, das

nach dem Zellaufschluss mit Ultraschall erhalten wurde, wurde zweimal über PD-10 Säulen von niedermolekularen Bestandteilen gereinigt (s. 2.6.4.1). Dadurch wurde verhindert, dass bei der Aktivitätstestung (s. 2.6.5.2) Bestandteile des Reaktionsansatzes in der Messküvette präzipitierten. Der durch die Gelfiltration gereinigte zellfreie Rohextrakt wurde zur Aktivitätsbestimmung der Oxidoreduktase verwendet.

3.5.2.3 Charakterisierung der exprimierten Proteine von pHGF7604 im zellfreien Rohextrakt aus *Streptomyces lividans* TK24

Die Aktivität der Oxidoreduktase RifL wurde im zellfreien Rohextrakt aus *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) bestimmt (s. 2.6.5.2). Der Cofaktor der Oxidoreduktase, NAD^+ , wurde bei der enzymatischen Reaktion zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. Die Zunahme an $\text{NADH} + \text{H}^+$ wurde bei 340 nm photometrisch verfolgt (s. 2.6.5.2). Falls nicht anders angegeben, wurde mit einer Substratkonzentration von 6 mM (Endkonzentration) UDP-Glucose gearbeitet.

Um zu prüfen, ob auch NADP^+ als Cofaktor der Oxidoreduktase reduziert wird, wurde NADP^+ anstelle von NAD^+ inkubiert. Das Absorptionsmaximum von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ liegt ebenfalls bei 340 nm. Die Reaktion wurde unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt (s. 2.6.5.2). Bei der Verwendung von NADP^+ nahm die Absorption bei 340 nm nicht zu.

Einfluss der Proteinmenge auf die Enzymaktivität

Vor Beginn der Enzymcharakterisierung wurde die in den Inkubationen eingesetzte Proteinmenge variiert. Die Bedingungen, die für die nachfolgenden Enzyminkubationen

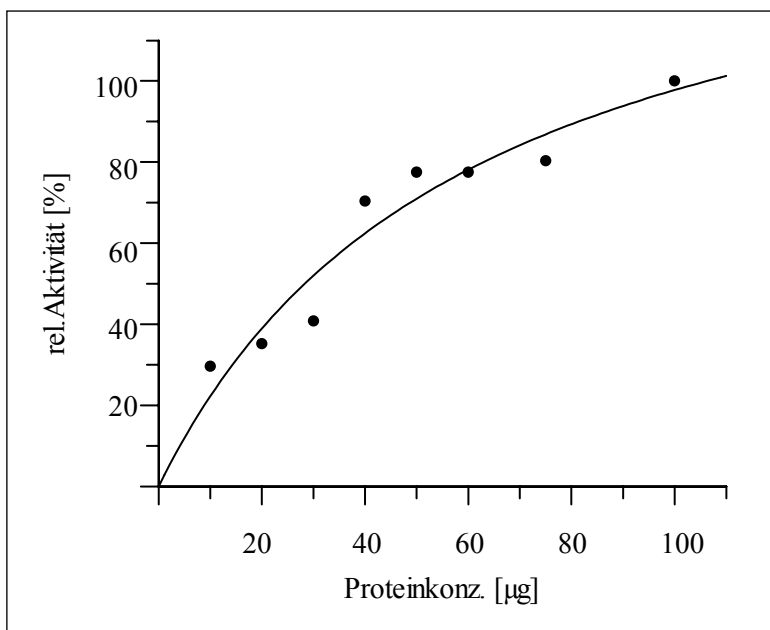


Abbildung 3.27 Aktivität der Oxidoreduktase RifL in Abhängigkeit von Enzymkonzentrationen von 10–100 µg.

gewählt werden sollten, sollten eine möglichst enge Annäherung an die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} ermöglichen. Außerdem ist es für die experimentelle Bestimmung der Enzymaktivität notwendig, im Sättigungsbereich des Enzyms zu arbeiten. Der Linearitätsbereich des gewählten Testsystems wurde durch die Bestimmung der Enzym-

aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge festgelegt. Es wurden die Aktivitäten für Enzymkonzentrationen von 10 - 150 µg Protein (zellfreier Proteinrohextrakt aus *S. lividans* TK24/ (pHGF7604)) pro ml Inkubationsansatz bestimmt (s. Abb. 3.27). Bei einer Enzymkonzentration von 150 µg Protein pro ml Inkubationsansatz wurde zunächst eine Zunahme der Aktivität beobachtet, die jedoch nach wenigen Minuten völlig absank. Als eine Erklärung wäre denkbar, dass das Substrat bereits erschöpft war. Bei den weiteren Arbeiten wurde mit einer Enzymkonzentration von 40 µg Protein pro ml Inkubationsansatz gearbeitet.

Bestimmung des pH-Optimums

Enzymaktivitäten sind entscheidend vom pH-Wert des umgebenden Milieus abhängig. Der pH-Wert beeinflusst den Ionisationsgrad der funktionellen Gruppen der Aminosäuren. Die Konformität des Enzyms, aber auch die Ausbildung eines Enzymkomplexes verschiedener miteinander interagierender Proteine hängen vom pH-Wert ab. Der Ladungszustand der ionisierbaren Aminosäureseitenketten kann auch die Substratbindung beeinflussen. Der optimale pH-Wert ist daher ein wichtiges Kriterium der Enzymcharakterisierung.

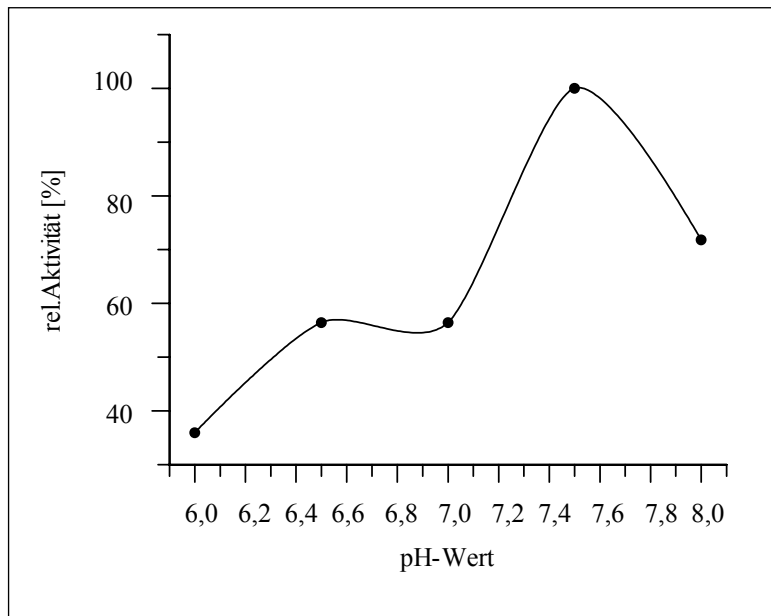


Abbildung 3.28 pH-Optimum der Oxidoreduktase RifL

Der Aktivitätstest zur Bestimmung des pH-Optimums wurde wie unter 2.6.5.2 beschrieben durchgeführt. Die einzelnen Aktivitäten wurden in 0,5er Einheiten in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,0 bestimmt. Da der isoelektrische Punkt von RifL bei pH 6,168 lag, war es nicht möglich, die Aktivität in einem pH-Bereich unterhalb von pH 6,0 zu messen.

Abbildung 3.28 zeigt, dass das pH-Optimum der Oxidoreduktase bei pH 7,5 lag. Bei pH 6,5 und pH 7,0 blieb die Aktivität gleich. Bei pH 7,5 fanden alle weiteren Messungen statt.

Untersuchungen zur Substratspezifität

Es wurde untersucht, wie spezifisch die Oxidoreduktase RifL angebotene Substrate oxidiert. Der enzymatische Test wurde nach 2.6.5.2 durchgeführt. Als Substrate wurden neben UDP-Glucose auch ADP-Glucose, GDP-Glucose und TDP-Glucose in der Reaktion eingesetzt.

CDP-Glucose war weder käuflich noch im Zuge einer Umfrage bei Arbeitsgruppen in Deutschland, die sich mit Nukleotiden beschäftigen, zu erwerben und wurde daher nicht untersucht. Die Aktivität der Oxidoreduktase wurde außerdem nach Zugabe der Substrate D-Fructose, D-Glucose, β -D-Glucose-1-phosphat und α -D-Glucose-1-phosphat bestimmt. Alle Substrate wurden jeweils in einer Endkonzentration von 6 mM eingesetzt.

In Abbildung 3.29 ist das Ergebnis für die Zuckernukleotide dargestellt. Es sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen gezeigt. UDP-Glucose wurde als einziges Substrat spezifisch umgesetzt. Die Absorptionsänderungen für D-Fructose, D-Glucose, β -D-Glucose-1-phosphat und α -D-Glucose-1-phosphat entsprachen denen für ADP-Glucose, GDP-Glucose und TDP-Glucose. Eine enzymatische Umsetzung durch die Oxidoreduktase fand nicht statt.

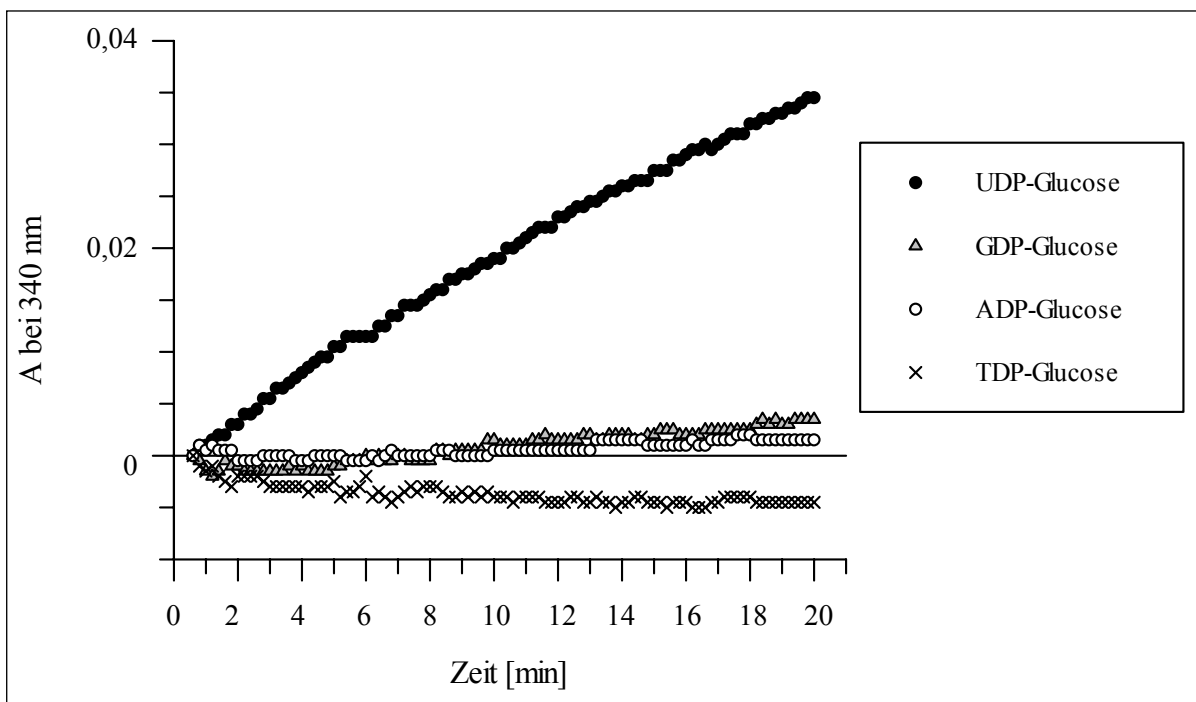


Abbildung 3.29 Untersuchungen zur Substratspezifität der Oxidoreduktase. A=Absorption

Bestimmung der kinetischen Konstanten

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten nach Michaelis und Menten wurden die zuvor ermittelten optimalen Bedingungen gewählt. Es wurde mit einer Enzymkonzentration von 40 μ g Protein des zellfreien Extraktes von *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) gearbeitet. Der pH-Wert lag bei pH 7,5. Die Enzymaktivität wurde bei UDP-Glucose-Konzentrationen von 2-16 mM (Endkonzentration) bestimmt (s. 2.6.5.2). In Kontrollreaktionen wurde die Enzymaktivität des zellfreien Extraktes von *S. lividans* TK24 unter den gleichen Bedingungen gemessen (2.6.5.2). Die Zunahme der Absorption bei 340 nm über 20 Minuten ist in Abbildung 3.30 für die unterschiedlichen Substratkonzentrationen gezeigt. Die Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte aufgetragen. Die

Aktivität der Oxidoreduktase nimmt mit zunehmender Substratkonzentration deutlich zu. Bei der Kontrolle wurde keine Aktivität festgestellt.

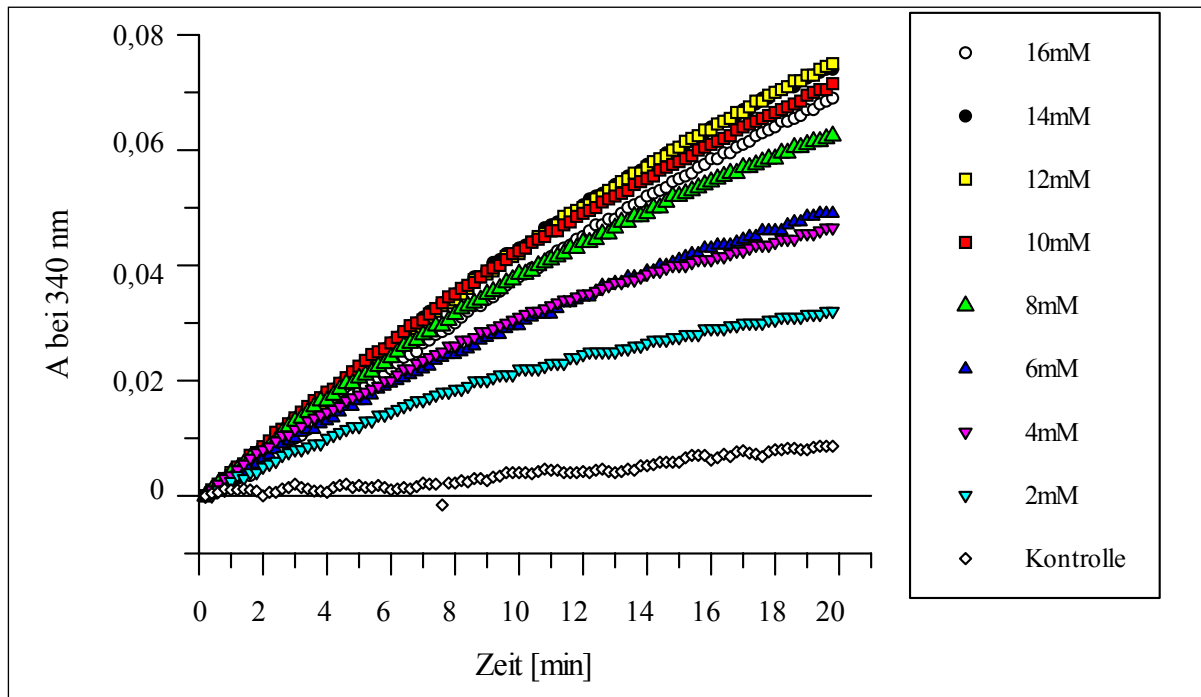


Abbildung 3.30 Enzymatische Umsetzung von UDP-Glucose durch die Oxidoreduktase RifL. Die Änderung der Absorption A (bei 340 nm) über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde für Substratkonzentrationen von 2-16 mM (Endkonzentration) verfolgt. Als Kontrolle wurde der zellfreie Rohextrakt von *S. lividans* TK24 bei den verschiedenen UDP-Glucose-Konzentrationen (2-16 mM) in den Inkubationen eingesetzt.

Die Michaelis-Konstante K_M eines Enzyms gibt die Substratkonzentration an, bei der die Umsetzung eines Substrates mit der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit erfolgt. Der K_M -Wert charakterisiert damit die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat und wird immer für eine definierte Enzymkonzentration angegeben. Je höher der K_M -Wert ist, desto höher muss die Substratkonzentration sein, damit die Reaktion bei halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Ein hoher K_M -Wert bezeichnet damit eine geringe Substrataffinität des Enzyms. In Abbildung 3.31 ist die Michaelis-Menten-Kurve für 40 μ g Protein aus dem zellfreien Rohextrakt von *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) dargestellt.

Die Michaelis-Menten-Gleichung, nach der die Michaelis-Konstante bestimmt wird, ist nur gültig, wenn die eingesetzte Substratkonzentration über den Reaktionszeitraum konstant bleibt. Werden geringe Substratkonzentrationen inkubiert, muss eine Reaktionsdauer gewählt werden, bei der die Umsetzung über den gesamten Zeitraum linear verläuft. Über einen Zeitraum von 10 Minuten verlief die enzymatische Umsetzung bei allen gewählten Substratkonzentrationen linear (s. Abb. 3.30). Das erste Intervall von 10 Minuten wurde zur Bestimmung der Aktivität und damit der Reaktionsgeschwindigkeit herangezogen.

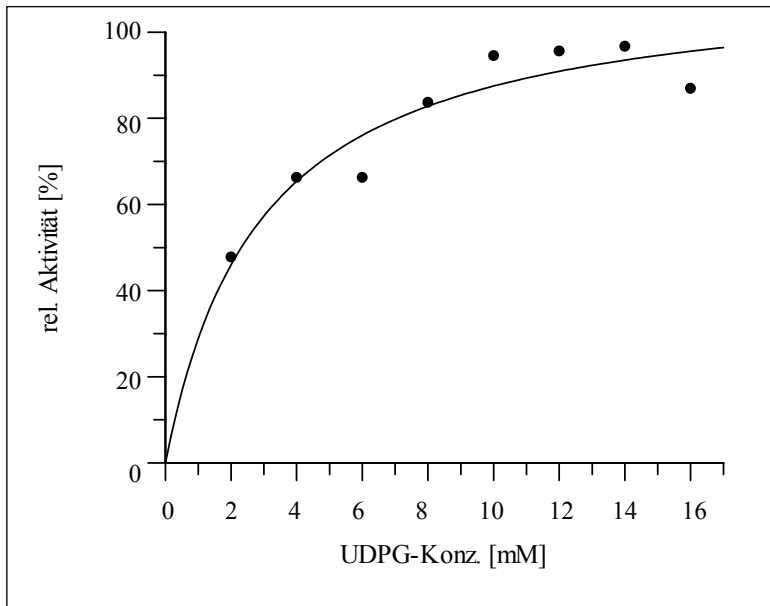


Abbildung 3.31 Michaelis-Menten-Kurve für die Oxidoreduktase RifL. Die relative Aktivität der Oxidoreduktase ist in Abhängigkeit zu den unterschiedlichen Substratkonzentrationen von 2-16 mM (Endkonzentration) dargestellt.

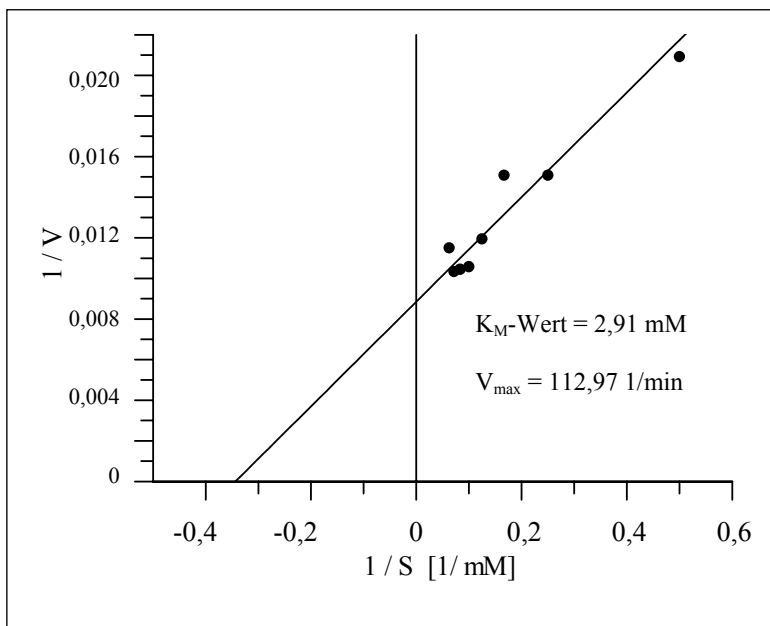


Abbildung 3.32 Lineweaver-Burk-Diagramm der Oxidoreduktase

Die kinetischen Konstanten wurden nach einer Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt. Nach Lineweaver und Burk können K_M und V_{max} aus den Schnittpunkten der Lineweaver-Burk-Geraden (s. Abb. 3.32) mit der x- und y-Achse ermittelt werden. Der K_M -Wert der Oxidoreduktase (Aktivitätsmessung im gereinigten zellfreien Extrakt) lag bei 2,91 mM. Die maximale Geschwindigkeit betrug 112,97

1/min. Die Konstanten sind auf 40 μ g Protein (zellfreier Rohextrakt von *S. lividans* TK24/ (pHGF7604)) bezogen. Der K_M -Wert gibt an, dass die Affinität der Oxidoreduktase zur UDP-Glucose unter den gewählten Bedingungen relativ gering ist. Liegen die K_M -Werte im mikromolaren Bereich, haben die Enzyme eine hohe Substrataffinität. Das Substrat wird rasch umgesetzt (Stryer, 1996).

Einfluss verschiedener Stickstoffdonatoren auf die Enzymaktivität

Die Untersuchungen zur Expression der Oxidoreduktase und der AHBA-Synthase in *E. coli* führte nicht zur Bildung aktiver Proteine. Es konnte aber gezeigt werden, dass beide Enzyme miteinander interagieren. Daher könnten die enzymatischen Umsetzungen beider Enzyme in den Anfangsschritten der AHBA-Biosynthese eng miteinander gekoppelt sein. Für die AHBA-Synthase wurde postuliert, dass sie als Aminotransferase eine Aminogruppe einführt.

Die 3-Keto-Verbindung der UDP-Glucose würde dann mit Hilfe der AHBA-Synthase an der 3-Position transaminiert (s. a. Abb. 1.4). Der zellfreie Rohextrakt aus *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) enthält neben der Oxidoreduktase RifL auch die exprimierte AHBA-Synthase RifK aus *A. mediterranei*. Daher sollte der Einfluss verschiedener Stickstoffdonatoren auf die Enzymaktivität der Oxidoreduktase untersucht werden.

Eine nachfolgende Umsetzung der oxidierten UDP-Glucose mit einem Stickstoffdonor könnte das bei der Oxidationsreaktion gebildete Produkt abfangen und die Ausbildung eines thermodynamischen Gleichgewichtes unterbinden. In diesem Fall wäre die Geschwindigkeit der Oxidationsreaktion erhöht. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach 2.6.5.2. Das Substrat UDP-Glucose wurde in einer Endkonzentration von 6 mM zugegeben. Zu den Inkubationsansätzen wurde zusätzlich der jeweilige Stickstoffdonor (2 mM Endkonzentration) zugefügt. Als mögliche Stickstoffdonatoren wurden Glutamin, Glutamat, Asparagin, Aspartat und Ammoniumchlorid eingesetzt. Alle Inkubationen wurden mindestens zweifach durchgeführt. Die Zugabe von Glutamin, Glutamat oder Ammoniumchlorid beeinflusst die Enzymaktivität der Oxidoreduktase kaum (s. Abb. 3.33). Die Absorptionsänderungen lagen im Bereich der Kontrolle, bei der kein Stickstoffdonor zugefügt wurde. Wurde Aspartat in den Ansätzen mit inkubiert, konnte eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität beobachtet werden. Die Zugabe von Asparagin führte zu einer Verdoppelung der Absorptionsänderung (über 20 Minuten) im Vergleich zu Enzyminkubationen ohne Stickstoffdonor.

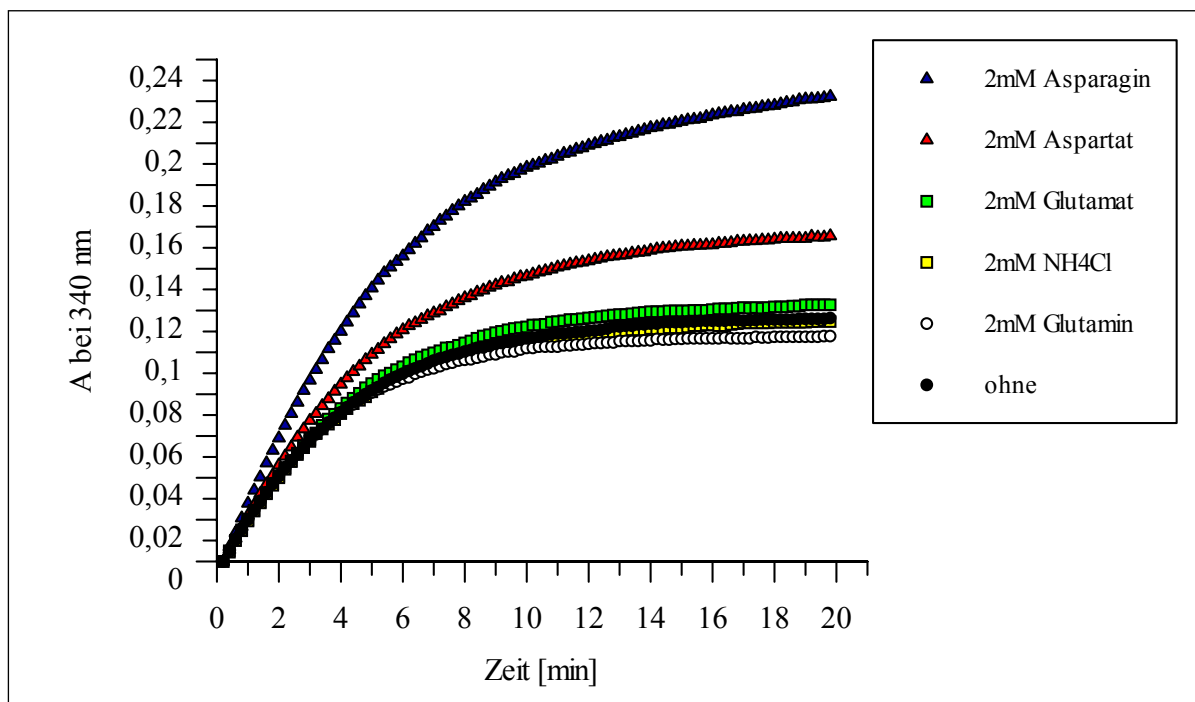


Abbildung 3.33 Einfluss verschiedener Stickstoffdonatoren auf die Enzymaktivität (zellfreier Extrakt aus *S. lividans* TK24/ (pHGF7604)). Gezeigt ist die Änderung der Absorption bei 340 nm über einen Zeitraum von 20 Minuten.

3.5.2.4 Heterologe Expression und anschließender Aktivitätstest der Deletionsmutanten von Oxidoreduktase (pHGF7607) und Phosphatase (pHGF7608) in *S. lividans* TK24

Die Plasmide pHGF7607 und pHGF7608 (s. Tab. 2.7) sind Derivate des Plasmids pHGF7604 (s. Abb. 3.26). Das Plasmid pHGF7607 enthält eine Deletion von 627 bp im Oxidoreduktasegen *rifL*. Im Plasmid pHGF7608 wurde ein Teil der Phosphatase *rifM* entfernt (Yu *et al.*, 2001). Bei der heterologen Expression in *S. coelicolor* konnte gezeigt werden, dass sowohl die Oxidoreduktase *RifL* als auch die Phosphatase *RifM* für die AHBA-Bildung essentiell sind (Yu *et al.*, 2001).

Die beiden Plasmide sollten in dieser Arbeit genutzt werden, um weitere enzymatische Umsetzungen zu untersuchen, bei denen einmal die Oxidoreduktase und einmal die Phosphatase im zellfreien Extrakt aus einem entsprechend transformierten *S. lividans*-Stamm fehlte. Ein zellfreier Extrakt, in dem keine Oxidoreduktase *RifL* vorlag, sollte gleichzeitig auch als Negativkontrolle dienen, um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen.

Protoplasten von *S. lividans* TK24 wurden jeweils mit den Plasmiden pHGF7607 und pHGF7608 transformiert (s. 2.5.11). Die rekombinanten Stämme *S. lividans* TK24/ (pHGF7607) und *S. lividans* TK24/ (pHGF7608) wurden nach 2.6.4.1 kultiviert. Anschließend erfolgten der Zellaufschluss und die Reinigung des zellfreien Rohextraktes mittels Gelfiltration unter den gleichen Bedingungen, die auch für den rekombinanten Stamm *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) angewandt wurden (s. 2.6.4.1).

Die Enzymaktivität wurde mit 40 µg des zellfreien Rohextraktes von *S. lividans* TK24/ (pHGF7607) bestimmt (s. 2.6.5.2). Es konnte bei wiederholter Bestimmung bei verschiedenen Substratkonzentrationen keine Absorptionsänderung bei 340 nm detektiert werden. Durch die Deletion des Oxidoreduktasegens wurde die oxidative Umsetzung der UDP-Glucose unterbunden. Diese Kontrollreaktion bestätigte die bisherigen Ergebnisse (s. 3.5.2.3).

Der Funktionstest wurde auch für enzymatische Inkubationen verfolgt, die mit 40 µg Protein des zellfreien Rohextraktes aus *S. lividans* TK24/ (pHGF7608) durchgeführt wurden. Auch hier ließ sich keine Aktivität feststellen. Fehlte die Phosphatase *RifM* im zellfreien Extrakt, war auch die Oxidoreduktase nicht mehr aktiv. Dieses Ergebnis weist auf eine gemeinsame Rolle der Oxidoreduktase, der AHBA-Synthase und der Phosphatase in den ersten Schritten der AHBA-Biosynthese hin. Die drei Proteine scheinen miteinander zu interagieren und bilden vermutlich einen gemeinsamen Enzymkomplex, der die Umsetzung von UDP-Glucose zu Kanosamin katalysiert.

3.6 Untersuchungen an dem Moos *Claopodium crispifolium*, Thuidiaceae

Das Maytansinoid Ansamitocin P3 wurde auch aus den Moosarten *Claopodium crispifolium* und *Anomodon attenuatus* (Familie der Thuidiaceae) isoliert (Spjut et al., 1988; Suwanborirux et al., 1990). Aufgrund größerer Unterschiede in der Bioaktivität der einzelnen Moosisolate gegenüber Krebszelllinien (KB Zellen, P388 Zellen) diskutierten die Autoren, ob besiedelnde Mikroorganismen für das Vorkommen des Maytansinoids verantwortlich sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit sollte die mikrobielle Besiedlung des Moooses *Claopodium crispifolium* untersucht werden. Die möglichen bakteriellen Isolate sollten dann mit Hilfe molekularbiologischer Methoden auf ein Vorkommen der AHBA-Biosynthesegene untersucht werden. Dazu sollte zunächst das Moos *C. crispifolium* in Oregon, USA gesammelt werden.

3.6.1 Sammlung von *Claopodium crispifolium* in Oregon, USA

Spjut et al. (1988) beschrieben die Standorte in Oregon, USA, von denen die bisher untersuchten Moosisolate von *C. crispifolium* gesammelt wurden. Im gleichen Gebiet wurden im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Stellen Proben von *C. crispifolium* genommen (s. Tab. 3.6). Zuvor konnten im Herbarium der University of Washington, Seattle, USA Belegexemplare von *C. crispifolium* gesichtet werden. Die Arten *Claopodium crispifolium* und *Claopodium bolanderi* ähneln sich morphologisch allerdings so stark, dass nur mit Hilfe des Mikroskops eine Bestimmung durchgeführt werden kann. Eine ausführliche Beschreibung liefert Schofield (1992). Eine abschließende botanische Bestimmung wurde deshalb im Anschluss an die Sammlung durch Shelly Evans von der University of Washington, Abteilung Forest Resources in Seattle und David H. Wagner vom Northwest Botanical Institute, Eugene, Oregon, USA vorgenommen. Jeweils ein Belegexemplar wurde in das Herbarium des Institutes für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn, aufgenommen. Jeweils ein weiteres Belegexemplar ging an Richard Spjut, der die Identität der einzelnen Isolate ebenfalls bestätigte (persönliche Mitteilung).

3.6.2 Isolierung und Analyse von assoziierten Aktinomyceten mit *C. crispifolium*

Zur Isolierung von Bakterien, die mit *Claopodium crispifolium* assoziiert waren, wurden Teile des jeweiligen Moosisolats dreimal in absoluten Ethanol getaucht und nach kurzem Trocknen auf verschiedene Isolierungsmedien (s. 2.1.6.2) aufgelegt. Als Isolierungsmedium wurden das ISP 2-Medium (s. 2.1.6.2), das Medium NL1153 (s. 2.1.6.4) und das CSA-Medium (mit 0,4 g

Tabelle 3.6 Sammlung von *Claopodium Spezies (Thuidiaceae)* in Oregon, USA

Pflanze	Ref.Nr.	Standort	QDGRS	
<i>C. crispifolium</i>	115009	USA, Oregon, Benton County, Whinney Road, 3 Meilen nach Alsea auf Hwy 34 von Philomath Richtung Waldport, Höhe 76m, auf Baumstämmen von Ahorn	44123CB	44°22' Breite, 123°40' Länge
<i>C. crispifolium</i>	315009	USA, Oregon, Benton County, Siuslaw National Forest, Lobster Valley Road, entlang der Straße auf der Seite des Lobster Creek, Höhe 30m, vom Stamm von Ahornbäumen verunreinigt mit wenig <i>Porella navicularis</i> u. <i>Hypnum subimponens</i>	44123CA	44°19' Breite, 123°48-50' Länge
<i>C. crispifolium</i>	415009	USA, Oregon, Benton County, Siuslaw National Forest, Lobster Valley Road, entlang der Straße auf der Seite des Lobster Creek, Höhe 30m, vom Stamm von Ahornbäumen wenig von <i>Homalothecium fulgescens</i> , <i>Porella navicularis</i> u. <i>H. subimponens</i>	44123CA	44°19' Breite, 123°46-48' Länge
<i>C. crispifolium</i>	5a16009 5b16009 5c16009 5d16009	USA, Oregon, Lane County, Whittaker Creek, Hwy 126 (westbound), links in die Whittaker Valley Rd., Höhe 45m, Standorte entlang der Straße 5a16009 auf Ahorn, Baumrinde, wenig <i>Porella cordeana</i> 5b16009 Rinde von Erlen, wenig <i>Eurhynchium pulchellum</i> 5d16009 Stämme von Ahorn, Anteile von <i>Neckera douglasii</i> , <i>Isothecium stoloniferum</i>	44123CC	44°00' Breite, 123°40' Länge
<i>C. crispifolium</i>	6a16009	USA, Oregon, Lane County, Archie Knowles Campground, nah Hwy 126 (westbound) von Eugene kommend. Höhe 30m, auf Baumrinden und gefällten Baumstämmen wenig von <i>Isothecium stoloniferum</i> u. <i>Metzgeria conjugata</i>	44123CC	44°01' Breite, 123°48' Länge
<i>C. crispifolium</i>	7a16009	USA, Oregon, Lane County/ Benton County, Triangle Lake, Hwy 36 von Junction City Richtung Florence, 1 Meile nach dem See, rechts im Wald, Höhe 76m, auf Stämmen von Erle oder Ahorn	44123CD	44°10' Breite, 123°35' Länge
<i>C. bolanderi</i>	7b16009 7c16009	s. Ref.Nr. 7a16009	44123CD	44°10' Breite, 123°35' Länge
<i>C. crispifolium</i>	8a16009	USA, Oregon, Lane County/ Benton County, Triangle Lake, Hwy 36 von Junction City Richtung Florence, 1 Meile rechts nach Verlassen des Sees, Höhe 76m, auf Felsen an schattigen Plätzen	44123CD	44°10' Breite, 123°35' Länge
<i>C. bolanderi</i>	8b16009	s. Ref.Nr. 8a16009	44123CD	44°10' Breite, 123°35' Länge

Casein; 1 g Stärke; 0,5 g KNO₃, 0,2 g K₂HPO₄; 0,1 g MgHPO₄; 0,1 g CaCO₃ und 15 g Agar in 1 l H₂O) verwendet. Das Moos wurde nach kurzer Zeit entfernt und die Agarplatten für 2-5 Tage bei 28 °C bebrütet. Um einen ausreichenden Schutz gegen Pilzkontaminationen zu erreichen, wurde den Isolationsmedien Propiconazol in einer Konzentration von 10 ppm im Medium und Nystatin (50 µg/ ml Endkonzentration) zugefügt. Auf den Agarplatten gewachsene bakterielle Isolate wurden vereinzelt. Es wurden insgesamt 347 Bakterien isoliert, davon 90 Bakterien auf dem ISP 2-Medium, 90 Isolate auf NL1153-Medium und 167 Bakterien auf CSA-Medium. 5 Isolate waren im morphologischen Aussehen ähnlich. Der größte Teil der Isolate gehörte zu den Aktinomyceten.

Um die Vielzahl der Isolate zu untersuchen, wurde in einem „Screening-Programm“ das Vermögen der einzelnen Stämme untersucht, Sekundärstoffe zu produzieren, die den Maytansin sensitiven Pilz *P. avellaneum* hemmen. Um Kultivierungsbedingungen zu finden, die eine möglichst sichere Erkennung eines Antibiotikaproduzenten ermöglichen, wurden die Stämme auf den drei verschiedenen Medien ISP 2, CSA und NL1153 angezogen und jeweils in einer modifizierten Bioautographie mit *P. avellaneum* getestet. Dazu wurde abweichend von 2.7.2.3 das mit Pilzsporen versetzte Biotest-Medium (2.1.6.5) in Petrischalen gegossen. Aus einer gut bewachsenen Agarplatte des jeweiligen Bakterienisolates wurde mit einem Korkbohrer (Durchmesser 0,5 cm) ein Agarblöckchen ausgestochen und auf das Biotest-Medium gelegt. Nachdem die Platten bebrütet wurden, wurde untersucht, ob der Pilz durch das Bakterium in seinem Wachstum gehemmt wurde. Bei diesem Versuch wurde davon ausgegangen, dass das Bakterium einen möglichen antibiotisch wirksamen Sekundärstoff in das Festmedium abgibt. Insgesamt inhibierten 17 Isolate den Maytansin sensitiven Pilz *P. avellaneum* (s. Anhang). Aus den Bakterien wurde die genomische DNA isoliert (s. 2.5.1.1). Nach einer Hydrolyse der DNA mit den Enzymen SacI und PstI (s. 2.5.6.1) wurden Southern Hybridisierungen mit einer heterologen AHBA-Synthasegen-Sonde aus *A. pretiosum* durchgeführt. Bei 5 Isolaten zeigten sich Hybridisierungssignale mit der heterologen Sonde (s. Anhang). In PCR-Reaktionen mit den AHBA-Synthasegen spezifischen Oligonukleotiden AHBA1f und AHBA2r (s. 2.1.4) wurde versucht, die für AHBA-Synthasegene charakteristische Bande von 400 bp aus der genomischen Bakterien-DNA zu amplifizieren, um anschließend die Fragmente klonieren und sequenzieren zu können. Die PCR-Reaktionen (s. 2.5.5.2) wurden mit allen 17 Isolaten durchgeführt, deren Sekundärstoffe eine Wachstumshemmung von *P. avellaneum* hervorriefen. Trotz mehrfacher Wiederholung der PCR und Reamplifikationen der PCR konnten bei keinem der Isolate Fragmente von 400 bp amplifiziert werden. Aus diesem Grund wurden die Bakterien nicht weiter bearbeitet.

4 Diskussion

4.1 Höhere Pflanzen als Orte der Maytansinbiosynthese?

4.1.1 Untersuchungen zum biogenetischen Ursprung der Maytansine in Höheren Pflanzen

Der biogenetische Ursprung von Maytansinoiden in Höheren Pflanzen konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. In Höheren Pflanzen finden sich diese Verbindungen nur in den Pflanzenfamilien der *Celastraceae*, *Euphorbiaceae* und *Rhamnaceae*. Die enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Pflanzenfamilien sprach zunächst dafür, dass die Pflanzen Maytansinoide als Sekundärstoffe produzieren. Die Beobachtung der unterschiedlichen Maytansinoidspektren in Höheren Pflanzen und Bakterien lieferte einen weiteren Grund für diese Annahme: Die Variabilität der Acylseitenkette am C₃-Atom ist in Höheren Pflanzen wesentlich größer als z.B. im Bakterium *Actinosynnema pretiosum*. Einige Molekülvariationen (wie Maytanbicyclinol, s. Abb. 1.6) sind einzigartig für Maytansinoide, die aus Pflanzen isoliert wurden. Eine konvergente Entwicklung der Maytansinbiosynthese in Bakterien und Höheren Pflanzen erscheint allerdings aufgrund der komplexen Struktur der Verbindungen sehr unwahrscheinlich.

Aufgrund der engen Verwandtschaft der Pflanzenfamilien mit Maytansinoidvorkommen ist vorstellbar, dass ein Horizontaler Gentransfer erfolgte, bevor sich die Familien im Laufe der Evolution weiter differenzierten. Da die Gene für die Biosynthese von Antibiotika in Bakterien meist in einem Cluster vorliegen (*Hopwood et al., 1988*), wäre ein einziges Transferereignis von Bakterien auf Höheren Pflanzen ausreichend, um die Gene der Maytansinoidbiosynthese zu übertragen. Wenn die Maytansinoide in den Pflanzen gebildet werden, müssen auch die entsprechenden Gene in den Pflanzen vorhanden sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde in *Putterlickia verrucosa* nach Genen gesucht, die für Schlüsselenzyme der Maytansinoidbiosynthese kodieren. Eines dieser Gene ist das AHBA-Synthasegen. Die AHBA-Synthase katalysiert die Umsetzung von aDHS zu AHBA, der Vorstufe der Ansamycine inklusive der Maytansinoide (s. 1.1 und 1.2). Die Amidsynthase ermöglicht den Ringschluss der Polyketidkette mit der Starter-Einheit AHBA.

Ein pflanzliches AHBA-Synthasegen oder ein Gen mit Homologien zur Amidsynthase von *A. mediterranei* konnte bei Hybridisierungsexperimenten nach Southern im Rahmen dieser Arbeit nicht detektiert werden (s. 3.1.2). Dies kann bedeuten, dass diese Gene der Maytansinoidbiosynthese nicht in Pflanzen vorkommen. Auf der anderen Seite kann jedoch

nicht ausgeschlossen werden, dass die Homologien zwischen den bakteriellen und den putativen pflanzlichen Genen zu gering waren. Eine Hybridisierung der heterologen Sonden mit der pflanzlichen DNA fände dann auch unter niedrig stringenten Bedingungen nur unzureichend statt.

Der GC-Gehalt von ca. 44 % der DNA aus *Putterlickia verrucosa* unterscheidet sich erheblich von dem GC-Gehalt (ca. 70 %) der Aktinomyceten (Hoffmann, 1997). Dementsprechend ist auch der Codongebrauch in *Putterlickia verrucosa* im Gegensatz zu dem in Aktinomyceten sehr unterschiedlich. Für Untersuchungen mit Hilfe der PCR wurden degenerierte Oligonukleotide aus konservierten Bereichen des AHBA-Synthasegens abgeleitet und dem Codongebrauch von *Putterlickia verrucosa* angeglichen (s. 3.1.1). Diese Versuche mit Hilfe der PCR berücksichtigten, dass ein Horizontaler Gentransfer evolutionsgeschichtlich sehr früh stattgefunden haben könnte und sich die Gene der Maytansinoidbiosynthese im Laufe der Zeit an den Codongebrauch von *Putterlickia verrucosa* angepasst haben könnten. Im Gegenzug wurde eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden AHBA1f/ AHBA2r durchgeführt, die sich direkt von bakteriellen AHBA-Synthasegenen ableiteten und nicht dem pflanzlichen Codongebrauch angepasst wurden. Diese Untersuchung sollte mögliche pflanzliche AHBA-Synthasegene erfassen, die von Bakterien in einem Horizontalen Gentransfer übertragen wurden ohne sich an den Codongebrauch von *Putterlickia verrucosa* anzugleichen.

Die Suche nach einem pflanzlichen AHBA-Synthasegen mit Hilfe der PCR war ebenfalls erfolglos. Dies bestätigte frühere Ergebnisse von Hoffmann (1997) und Breuer (1995). Im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen wurden die Oligonukleotide aus den konservierten Bereichen der AHBA-Synthase, die bei Analysen der Kristallstruktur der AHBA-Synthase aus *A. mediterranei* ermittelt wurden, abgeleitet (Eads et al., 1999). Zudem wurde genomische DNA aus zwei verschiedenen Zellkulturen von *Putterlickia verrucosa* gewonnen. Eine Zellkultur war aus einer Maytansin führenden Pflanze etabliert worden. Die zweite Zellkultur entstand aus einem Individuum der Art *Putterlickia verrucosa*, in der kein Maytansin gefunden wurde.

Dass kein pflanzliches AHBA-Synthasegen nachgewiesen werden konnte, kann verschiedene Ursachen haben:

- Der Degenerierungsgrad der Oligonukleotide war zu hoch, und es konnten nur unspezifische PCR-Produkte erhalten werden. Durch den unterschiedlichen Codongebrauch der Pflanzen und der Aktinomyceten war es jedoch nicht möglich, Oligonukleotide mit einem geringeren Degenerierungsgrad zu verwenden.

- Ein Oligonukleotid sollte nicht nur von einem bakteriellen AHBA-Synthasegen abgeleitet werden, bevor es dem Codongebrauch von *P. verrucosa* angeglichen wurde, sondern von allen bereits bekannten bakteriellen AHBA-Synthasegenen. Auch hier ergab sich bereits ein geringer Degenerierungsgrad, obwohl diese Bakterien alle relativ nah miteinander verwandt sind.
- Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein AHBA-Synthasegen aus *P. verrucosa* eine sehr viel geringere Homologie zu bakteriellen AHBA-Synthasegenen aufweist als erwartet. Auch wenn einzelne Aminosäuren, die z.B. für die Bindung des Cofaktors Pyridoxalphosphat verantwortlich sind, stark konserviert sind, könnten eventuell benachbarte Aminosäuren völlig verschieden von Aminosäuren sein, die in bakteriellen Genen konservierte Aminosäuren flankieren.
- Schwierigkeiten kann zudem die Struktur der eukaryotischen Gene bereiten. Introns unterbrechen kodierende Bereiche eines Gens. Vielleicht ließen sich einige Bereiche durch die erstellten Oligonukleotide nicht amplifizieren, da ihre Bindestellen im pflanzlichen Genom durch Introns unterbrochen wurden. Wie häufig Introns eine Gensequenz unterbrechen, hängt vom jeweiligen Organismus ab. Die Sequenzierung der zwei Isogene der DAHP-Synthase aus *P. verrucosa* zeigte, dass ein Isogen zwei kleinere Introns enthielt und das zweite Isogen durch ein 827 bp großes Intron unterbrochen wurde (Hoffmann, 1997).
- Die Pflanzen produzieren keine Maytansine. Daher sind in *Putterlickia verrucosa* keine Gene der Anfangsschritte der Maytansinbiosynthese vorhanden.

Molekularbiologische Untersuchungen von genomischer DNA aus *Putterlickia verrucosa*-Zellkulturen gaben keine Hinweise auf mögliche pflanzliche Biosynthesegene. Weitere Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Maytansinbildung keine Biosyntheseleistung der Pflanzen selbst ist:

- Nicht aus jeder Pflanze von *P. verrucosa* konnte Maytansin isoliert werden. Einzelne individuelle Pflanzen der Art enthielten Maytansinoide, andere jedoch nicht (Pullen et al., 2003). Das Auftreten von intraspezifischen Variabilitäten in einer Pflanzenart ist generell bekannt. Ist die Variabilität mit einer chemischen Differenzierung verbunden, wird von einer „chemischen Rasse“ gesprochen. Voraussetzung für das Vorliegen einer chemischen Rasse ist, dass das chemische Merkmal genetisch fixiert ist und vererbt wird. Die Möglichkeit, dass das Vorkommen von Maytansinoiden in einzelnen Pflanzen von *P. verrucosa* auf unterschiedliche chemische Rassen zurückzuführen ist, wurde jedoch durch

die Beobachtungen an einem pflanzlichen Klon von *P. verrucosa* widerlegt. Einige Pflanzen wurden als Stecklinge im Gewächshaus angezogen, die aus Trieben einer Maytansin führenden Pflanze aus dem Botanischen Garten in Pretoria (Südafrika) erhalten wurden. Im Gegensatz zur ursprünglichen „Mutterpflanze“ waren in den Klonen keine Maytansine nachweisbar (Pullen et al., 2003). Gegen das Vorliegen von chemischen Rassen spricht außerdem, dass einzelne Pflanzen eines Habitates Unterschiede in ihrem Maytansinvorkommen zeigen. Zwei Pflanzen von *P. verrucosa* eines Habitates befanden sich etwa im gleichen Entwicklungsstadium. Die eine der beiden Pflanzen enthielt Maytansinoide, bei dem anderen Individuum waren keine Maytansinoide nachweisbar (Pullen et al., 2003).

- Berichte, nach denen Zellkulturen von *Putterlickia verrucosa* Maytansin produzieren (Misawa et al., 1983) konnten nicht bestätigt werden (Pullen et al., 2003). Nach Untersuchungen von Kutney et al. (1981) konnten auch aus Zellkulturen von *Maytenus buchananii* keine Maytansinoide isoliert werden. Eine cytotoxische Aktivität des Extraktes aus Zellkulturen von *M. buchananii* wurde auf den Sekundärstoff Tingenon zurückgeführt (Kutney et al., 1981).
- Maytansine kommen auch in Moosen (*Suwanborirux et al., 1990*) vor. Die Hypothese eines Horizontalen Gentransfers ist für Moose nur schwer zu begründen, da Moose einer völlig anderen Abteilung des Pflanzenreichs zugeordnet werden als Höhere Pflanzen der Unterklasse *Rosidae*.
- Die intakten Pflanzen von *P. verrucosa* sind mit einer Vielzahl von Mikroorganismen vergesellschaftet. Arbeiten unseres Arbeitskreises (von Bamberg, 1999; Pullen, 2000; Meurer, 2002; Wings, persönliche Mitteilung) belegen eindrucksvoll das Spektrum an Epi- und Endophyten, mit denen *Putterlickia verrucosa*-Pflanzen assoziiert sind.

Nach den bisherigen Ergebnissen scheinen Mikroorganismen, die als Endo- oder Epiphyten Sekundärstoffe bilden und diese an den Wirtsorganismus abgeben, eher für das Vorkommen von Maytansinoiden in Höheren Pflanzen verantwortlich zu sein. Die Betrachtung der mikrobielle Besiedlung Maytansin führender Pflanzen mit Mikroorganismen gewann daher an Bedeutung.

4.1.2 Ökologische Aspekte der Besiedlung von Höheren Pflanzen mit Mikroorganismen

Mikroorganismen können als Epiphyten oder Endophyten Höhere Pflanzen besiedeln. Als Epiphyten werden Organismen bezeichnet, die auf einem anderen Organismus wachsen. Der Begriff „Endophyt“ wurde zunächst nur für Pilze verwendet (Carroll, 1988). Weitergehende Definitionen fassen unter Endophyten inzwischen Bakterien oder Pilze zusammen, die innerhalb pflanzlicher Gewebe leben ohne bei Pflanzen Krankheiten auszulösen (Wilson, 1995; Sturz et al., 2000; Tan und Zou, 2001).

Da es sich bei den bisher isolierten Ansamycinen (Lancini, 1986) um bakterielle Sekundärstoffe handelt, konzentrierten sich die Arbeiten in unserem Arbeitskreis auf die Untersuchung von Bakterien, die mit Maytansin führenden Pflanzen assoziiert sind (Pullen et al., 2003). Ähnliche Schlussfolgerungen wurden bereits von Spjut et al. (1988) gezogen, der vermutete, dass assoziierte Bakterien für das Vorkommen von Maytansinoiden in Moosen verantwortlich sind.

Aus drei verschiedenen Arten der *Celastraceae* (*Putterlickia verrucosa*, *Putterlickia retrospinosa*, *Maytenus aquifolia*) wurden endophytische Bakterien isoliert, die der Gattung *Streptomyces* angehören (Pullen et al., 2002). Zwei der isolierten Endophyten, *S. setonii* und *S. sampsonii*, sind für die Kartoffel, *Solanum tuberosum*, pathogen (Takeuchi et al., 1996). Bei den Wirtspflanzen *P. verrucosa* und *M. aquifolia* wurden keine Krankheitssymptome festgestellt (Pullen et al., 2002). Offensichtlich können Mikroorganismen daher für eine Pflanzenspezies pathogen, mit einer anderen Art jedoch endophytisch vergesellschaftet sein. Die jeweilige Funktionalität ist dabei anscheinend sowohl vom Wirt als auch vom besiedelnden Mikroorganismus abhängig (Pullen et al., 2002).

Da Maytansinoide in *P. verrucosa*-Pflanzen im inneren Holz älterer Zweige und Wurzeln gefunden wurden, sich die Verbindungen jedoch nicht in jüngeren Zweigen oder Blättern nachweisen ließen, könnten Maytansin produzierende Bakterien ausgehend von den Wurzeln die Pflanze besiedeln (Pullen et al., 2003). Bestätigend dazu wurde die stärkste antibiotische Aktivität gegenüber dem Maytansin sensitiven Pilz *Penicillium avellaneum* in den Wurzeln einer Maytansin führenden Pflanze gefunden (Meurer, 2002). Aus der Literatur ist bekannt, dass endophytische Bakterien überwiegend in unteren Pflanzenteilen zu finden sind (Fisher et al., 1992). Ein Beispiel, in dem endophytisch lebende Mikroorganismen im Wurzelbereich Antibiotika bilden, wurde beschrieben: Aktinomyceten produzieren in den Wurzelknöllchen von *Alnus glutinosa* das Antibiotikum Alnumycin (Bieber et al., 1998).

Ökologisch betrachtet kann eine Vergesellschaftung von Mikroorganismen mit Pflanzen eine wechselseitige Beziehung charakterisieren, die oft symbiontisch ist. Die Endophyten erhalten Nährstoffe und Schutz durch die Wirtspflanze. Pflanzen, die mit Mikroorganismen besiedelt sind, besitzen eine erhöhte „Fitness“ (Tan und Zou, 2001) im Vorteil gegenüber nicht besiedelten Pflanzen. Nach Sturz *et al.* (2000) sowie Tan und Zou (2001) lassen sich die ökologischen Aspekte wie folgt zusammenfassen:

- Assoziationen von Mikroorganismen mit Pflanzen können das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen beschleunigen, da die Mikroorganismen wachstumsfördernde Stoffe produzieren.
- Der Stickstoff-Stoffwechsel wird durch Bakterien, die Stickstoff fixieren, erhöht. Den Pflanzen steht mehr verwertbarer Stickstoff zur Verfügung.
- Die Resistenz der Pflanzen gegenüber Stress und veränderten Umweltbedingungen, wie z.B. Trockenheit, wird erhöht.
- Die besiedelte Pflanze wird vor pathogenen Mikroorganismen oder auch Herbivoren geschützt, da die Endophyten Sekundärstoffe produzieren, die für Pflanzenpathogene toxisch sind. Neben antibiotisch wirksamen Substanzen werden von den besiedelnden Mikroorganismen Siderophore oder hydrolytische Enzyme gebildet (Hallmann *et al.*, 1997; Shoda 2000).

Maytansinoide sind starke Spindelgifte (s. 1.1). Unter der Annahme, dass Maytansinoide durch Pflanzen besiedelnde Mikroorganismen produziert werden, erhielte eine mikrobiell besiedelte Pflanze möglicherweise einen Sekundärstoff, der vor einem pathogenen Pilzbefall schützt. Die ökologische Adaptationsfähigkeit der Pflanze wäre damit erhöht. In der Literatur wird z.B. von einer Symbiose des Pilzes *Epichloe typhina* aus der Familie der *Claviceptaceae* mit Gräsern berichtet. *Epichloe typhina* produziert Ergot-Alkaloide, die den Gräsern als Fraßschutz gegen Insekten und weitere Schädlinge dienen (Siegel und Schradl, 1991). In einem anderen Beispiel bildet der Stamm *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* das Ansamycin-Antibiotikum Geldanamycin und schützt dadurch die Erbse (*Pisum sativum* L.) vor Wurzelfäule, die durch *Rhizoctonia solani* verursacht wird (Rothrock und Gottlieb, 1984).

Araújo *et al.* (2001) untersuchten *in vitro* die wechselseitigen Beziehungen zwischen endophytischen Pilzen und Bakterien, die jeweils von Citruspflanzen isoliert wurden. Der isolierte Pilz *Guignardia citricarpa* ist für Citruspflanzen fakultativ pathogen. Sekundärstoffe, die von *G. citricarpa* abgegeben wurden, hemmten das Wachstum einiger endophytischer *Bacillus* Arten. Das Wachstum des Bakteriums *Pantoea agglomerans* wurde dagegen durch

die Metabolite des Pilzes stimuliert. Die Ergebnisse zeigen, dass die mikrobielle Besiedlung einer Pflanze ein Zusammenspiel verschiedenster Organismen bedeutet, die sich gegenseitig beeinflussen. Bei älteren Pflanzen ist mit dem Vorkommen einer stabileren und einheitlicheren mikrobiellen Besiedlung zu rechnen, da sich die einzelnen Mikroorganismen adaptiert haben oder sich nicht dauerhaft auf bzw. in einer Pflanze ansiedeln konnten (*Araújo et al., 2001*). Eine Pflanze kann damit als eigenes ökologisches System betrachtet werden, in dem Nischen durch verschiedene, sich gegenseitig beeinflussende Mikroorganismen besetzt werden. Jedes pflanzliche Ökosystem ist dabei individuell von anderen verschieden.

Die Kommunikationsmechanismen zwischen Pflanzen, besiedelnden Mikroorganismen und Pathogenen sind bisher wenig untersucht. Die Kommunikation zwischen Bakterien erfolgt durch Signalmoleküle (N-Acylhomoserinlaktone), die die Genexpression in Bakterien regulieren (*Salmond et al., 1995*). Der Begriff „Quorum sensing“ charakterisiert ein solches Signalsystem, das die Populationsdichte von Bakterien misst und verschiedene physiologische Prozesse, wie z.B. die Antibiotikabiosynthese, reguliert (*Swift et al., 1996; Sturz et al., 2000*). Umgekehrt könnte ein pathogener Befall einer Pflanze zur Bildung von pflanzlichen Signalmolekülen führen, die von besiedelnden Bakterien erkannt werden und die dann antibiotisch wirksame Substanzen bilden. Ein solcher Stimulus könnte erst die Bildung spezifischer Sekundärstoffe induzieren. Ein Maytansin produzierender Mikroorganismus konnte bisher nicht gefunden werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei der Suche ein mögliches stimulierendes Signalmolekül, das die Bildung von Maytansinoiden reguliert und erst die Expression entsprechender Gene ermöglicht, fehlte bzw. vernachlässigt wurde.

4.2 *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 – eine taxonomische Bestimmung

Ein bakterielles Isolat (F18-98) aus der Rhizosphäre einer Maytansin führenden Pflanze von *Putterlickia verrucosa* konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der 16S rDNA und 16S-23S rDNA-Sequenzierung phylogenetisch in die Gattung *Kitasatospora* eingeordnet werden (s. 3.2). Weitere morphologische, physiologische und biochemische Eigenschaften wurden untersucht (*Groth et al., 2003*) und führten zur Charakterisierung einer neuen Art mit der Bezeichnung *Kitasatospora putterlickiae* F18-98.

Die phylogenetische Einteilung von *Kitasatospora* Arten war Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Die Gattung *Kitasatospora* (früher *Kitasatosporia*) wurde 1982 durch *Omura et al.* von der Gattung *Streptomyces* abgetrennt. Wurden die Zellen der *Kitasatospora* Arten hydrolysiert, konnte im Unterschied zu Streptomyceten *meso*-Diaminopimelinsäure und

Galaktose detektiert werden (Omura et al., 1982). Streptomyceten besitzen im Luftmycel und im vegetativen Mycel nur das LL-Isomer der Diaminopimelinsäure. Bei den Arten der Gattung *Kitasatospora* ist im Luftmycel ebenfalls LL-Diaminopimelinsäure zu finden. Im vegetativen Mycel enthalten *Kitasatospora* Spezies jedoch meso-Diaminopimelinsäure (Takahashi et al., 1983). Nach taxonomischen Studien von Wellington et al. (1992 b) wurden die Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* zwischenzeitlich wieder zum Taxon *Streptomyces* zusammengeführt. Nachdem weitere Stämme genotypisch untersucht wurden, konnte die Gattung *Kitasatospora* als eigenständige Gattung „re“-etabliert werden (Zhang et al., 1997). Ein entscheidendes Kriterium für die Etablierung zweier getrennter Gattungen war die Bestimmung der 16S-23S rDNA „Spacerregion“. Neun charakteristische Nukleotide (s. Abb. 3.4) sind nur in der 16S-23S rDNA „Spacerregion“ von Stämmen der Gattung *Kitasatospora* zu finden (Zhang et al., 1997). Die Analyse dieser Intergenregion bei dem in dieser Arbeit untersuchten Isolat F18-98 ermöglichte eine eindeutige Zuordnung zur Gattung *Kitasatospora*.

Die Gattung *Kitasatospora* gehört zur Familie der *Streptomycetaceae*. Bisher wurden 11 *Kitasatospora* Arten beschrieben (Groth et al., 2003). Zwei weitere Arten, *Streptomyces kifunensis* und *Streptomyces aureofaciens*, ließen sich nach der genotypischen Charakterisierung ebenfalls der Gattung *Kitasatospora* zurechnen (Groth et al., 2003). Die phylogenetische Analyse der 16S rDNA-Sequenzierung zeigte, dass der Stamm *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 zusammen mit den Spezies *Kitasatospora azatica* und *K. kifunensis* ein eigenes Cluster innerhalb der Gattung *Kitasatospora* bildete. Zu diesen beiden Arten war auch die Sequenzhomologie der 16S rDNA am höchsten (s. 3.2.1).

Phenotypisch sind die Arten der Gattung *Kitasatospora* durch ein stark verzweigtes Substratmycel gekennzeichnet. Im Luftmycel sind die Sporen zu langen Ketten zusammengefügt. Auch der Stamm *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 ist durch intensiv verzweigtes Substratmycel charakterisiert. In Flüssigkulturen wachsen die Sporen von *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 zunächst zu Hyphen aus, die dann in irreguläre Abschnitte mit Sporen-ähnlichem Aussehen fragmentieren (Groth et al., 2003).

Wenn ein Maytansin produzierender Mikroorganismus für das Vorkommen von Maytansinoiden in Höheren Pflanzen und Moosen verantwortlich ist, muss dieser Mikroorganismus in einer hohen Populationsdichte auf oder in den jeweiligen Pflanzen leben, um ausreichend hohe Konzentrationen an Maytansinoiden bilden zu können. *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 war mit der Rhizosphäre einer Maytansin führenden *Putterlickia*

verrucosa-Pflanze assoziiert. Falls diese Vergesellschaftung charakteristisch für Maytansin führende Pflanzen von *P. verrucosa* ist, müsste der Stamm auch aus der Rhizosphäre weiterer *P. verrucosa*-Pflanzen isoliert werden können. Um zu zeigen, dass die Isolierung von *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 kein zufälliges Ergebnis war, wurde die Rhizosphäre einer weiteren Maytansin führenden *Putterlickia verrucosa*-Pflanze mit der SSCP-Methode („Single-strand conformation polymorphism“, Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus) untersucht (S. Wings, persönliche Mitteilung). Dabei wurde der Stamm *K. putterlickiae* auch in der Rhizosphäre dieser Pflanze nachgewiesen (S. Wings, persönliche Mitteilung).

Auch wenn mit der SSCP-Methode keine quantitative Aussage über das Vorkommen von *Kitasatospora putterlickiae* in der Rhizosphäre Maytansin führender Pflanzen möglich ist, zeigt die Untersuchung, dass die Isolierung des Stammes kein zufälliges Ereignis war. *K. putterlickiae* F18-98 könnte ein Mikroorganismus sein, der gezielt eine ökologische Nische an Maytansin führenden Pflanzen besetzt. Bei der Analyse des Sekundärstoffspektrums konnte eine Maytansinbildung bis jetzt nicht nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen (s. 3.3 und 3.4) zur Sekundärstoffbildung und zur genetischen Ausstattung des Stammes werden in den folgenden Abschnitten (s. 4.3 und 4.4) diskutiert.

4.3 Die Familie der *Streptomycetaceae* als Sekundärstoffbildner

4.3.1 Physiologische und genetische Faktoren der Sekundärstoffproduktion

Die Untersuchungen zum Sekundärstoffspektrum von *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 (s. 3.3) zeigen, dass unabhängig von der Art der produzierten Sekundärstoffe, in die [Carboxyl-¹⁴C₁]-AHBA eingebaut wurde, drei Aspekte bei der Kultivierung des Stammes zu beobachten waren:

- Eine mögliche Katabolitrepression durch Glucose
- Nur ältere Kulturen von *K. putterlickiae* bilden Sekundärstoffe mit antibiotischer Aktivität.
- Geringe Produktionsraten des Antibiotikums

Aus diesen Beobachtungen lässt sich vermuten, dass physiologische und genetische Mechanismen das Ausmaß und die Qualität der Produktbildung bestimmen. Um die Bedingungen für die Kultivierung von *K. putterlickiae*, u. a. in Fermentern, optimieren zu können und dadurch die Produktbildung zu steigern, ist es wichtig, diese Mechanismen möglichst umfassend zu verstehen. Im Folgenden wird ausführlich auf die jeweiligen

Mechanismen eingegangen, die den genannten Beobachtungen bei der Kultivierung von *K. putterlickiae* zugrunde liegen können.

Katabolitrepression

Bei dem physiologischen Faktor der Katabolitregulation bewirken hohe Anteile an Glucose oder anderen leicht verwertbaren Kohlenstoffquellen, aber auch überschüssige Ammonium- oder Phosphationen im Medium eine verminderte Sekundärstoffproduktion. Während der schnellen Wachstumsphase erfolgt nur eine geringe Sekundärstoffproduktion, da diese reprimierend wirksamen Substrate verhindern, dass ein für die Sekundärstoffproduktion optimaler Entwicklungszustand des Mycels erreicht wird (Rose, 1979). Als Beispiel für eine Katabolitregulation durch einen Überschuss an Glucose gilt die Penicillinbiosynthese durch *Penicillium chrysogenum*. Ist Glucose zusammen mit Lactose im Anzuchtmedium von *P. chrysogenum* vorhanden, beginnt die Biogenese des Penicillins erst, wenn Glucose als Katabolitrepresor verbraucht ist (Rose, 1979).

K. putterlickiae unterliegt vermutlich einer Katabolitrepression durch Glucose (s. 3.3). Um die Katabolitrepression in *K. putterlickiae* F18-98 zu umgehen, bleibt die Möglichkeit statt Glucose Glycerol im Nährmedium zu verwenden, wie dies bereits im M2-Glycerin-Medium (s. 2.1.6.4) verwirklicht wurde. Möglich ist auch, Glucose in Raten zu den Kultivierungsansätzen zu geben. Die Konzentrationen des Zuckers sollten dann unterhalb des reprimierend wirksamen Niveaus liegen. Dieses Niveau ist für den Stamm *K. putterlickiae* allerdings noch nicht bekannt. Ob der Stamm *K. putterlickiae* einer Katabolitrepression durch Ammonium- oder Phosphationen unterliegt, wurde nicht untersucht. Um eine Katabolitrepression durch überschüssige Ammoniumionen zu vermeiden, wurden Zeolithe als Ammoniumionen bindendes und langsam freisetzendes Mittel erfolgreich angewandt (Masuma et al., 1982). Wurden Phosphat bindende Agenzien wie Aluminiumoxid zu Kulturanzuchten eines Streptomyeten, dessen Antibiotikaproduktion durch Phosphationen gehemmt wurde, gegeben, ließ sich die Ausbeute an Antibiotikum erhöhen (Masuma et al., 1986). Es könnte versucht werden, die Produktbildung von *K. putterlickiae* F18-98 durch die Zugabe von entsprechenden Agenzien zu den Kultivierungen zu optimieren.

Die Mechanismen, durch welche die Katabolitrepression vermittelt wird, sind durch eine Vernetzung verschiedenster Regelkreise nicht vollständig analysierbar (Gräfe, 1992). Im Beispiel der Penicillinbiosynthese ist die Katabolitregulation mit allgemeinen Kontrollmechanismen wie der zentralen Aminosäureregulation des Stoffwechsels verknüpft

(Martinez-Blanco *et al.*, 1989). Neben zahlreichen indirekten Effekten der reprimierenden Substrate auf das Wachstum, den pH-Wert der Nährlösung oder die Verfügbarkeit von biosynthetischen Vorstufen und Coenzymen konnten auch einzelne direkte inhibierende Wirkungen auf die Enzyme des Sekundärstoffwechsels beobachtet werden (Gräfe, 1992). Ein Phosphatüberschuss führte bei *Streptomyces griseus* zur Hemmung der p-Aminobenzoensäure-Synthetase. Die Candicidinbildung wurde dadurch inhibiert (Gräfe, 1992). Für *Streptomyces fradiae* wurde nachgewiesen, dass überschüssige Glucose die β -Oxidation der Fettsäuren reprimiert. Die Vorstufe Acetyl-CoA stand damit nicht ausreichend für die Biosynthese von Tylosin zur Verfügung (Gräfe, 1992).

Die meisten Streptomyceten nutzen die Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg) zur Katabolisierung von Glucose (Cochrane, 1961). Etliche Stämme aus der Familie der *Streptomycetaceae* schalten während der Sekundärstoffbildung von der Glykolyse auf den Pentosephosphatweg um (Kieser *et al.*, 2000). Die Katabolitregulation verläuft in Streptomyceten ähnlich wie in anderen Bakterien. Außerdem ist in *S. coelicolor* die ATP-abhängige Glucosekinase (GlkA) entscheidend an der Katabolitregulation beteiligt. Die Glucosekinase GlkA vermittelt regulatorische Effekte auf der Ebene der Transkription (Angell *et al.*, 1994). Das Enzym scheint kein DNA-bindendes Protein zu sein, sondern modifiziert vermutlich Transkriptionsfaktoren, die direkt die Genexpression katabolitregulierender Gene regulieren.

Phasenabhängigkeit der Sekundärstoffbildung und Korrelation mit der morphologischen Differenzierung

Nur ältere Kulturen von *K. putterlickiae* lieferten antibiotisch aktive Sekundärstoffe (s. 3.3.3). Dies deutet auf eine Phasenabhängigkeit des Sekundärmetabolismus und eine Korrelation mit der morphologischen Differenzierung hin. Bei Stämmen der *Streptomycetaceae* finden auf drei verschiedenen Ebenen eines hierarchisch gegliederten Regulationssystems Prozesse statt, die von der vegetativen Entwicklung zur morphologischen Differenzierung „umschalten“. Die Bildung von Antibiotika beginnt in der Übergangsphase zwischen vegetativem Wachstum und der Entwicklung eines Sporen-tragenden Luftmycels (Chater, 1989). Die enge Verknüpfung der morphologischen Differenzierung mit der Antibiotikabildung wird bei der Betrachtung der regulatorischen Kaskade deutlich (Chater und Bibb, 1997): Auf der ersten Ebene koordinieren übergeordnete Gene, u. a. die *bld*-Gene (Lawlor *et al.*, 1987), weitere pleiotrope Gene, die die Biosynthese verschiedener Sekundärstoffe in einem Stamm aktivieren. Auf der zweiten Ebene kodiert z.B. in *S. coelicolor* eines dieser pleiotropen Gene

(afsA) für die A-Faktor-Synthetase. Das Enzym katalysiert die Bildung des A-Faktors, der Antibiotikabiosynthesen reguliert (*Horinouchi et al., 1989*). Die dritte Ebene wird durch so genannte Biosyntheseweg-spezifische Regulatoren repräsentiert. Mutationen dieser Gene beeinflussen spezifisch die Biosynthese eines Sekundärstoffes (*Arias et al., 1999*).

Die übergeordneten bld-Gene demonstrieren deutlich die Verknüpfung der morphologischen Differenzierung mit der Sekundärstoffproduktion. Bld-Mutanten sind Stämme ohne Luftmycel und Sporenbildung, die keine Antibiotika mehr bilden (*Plaskitt und Chater, 1995*). Das bldA-Gen kodiert für die einzige tRNA, die für die Translation des Leucin-Codons UUA verantwortlich ist. Die Nukleotidfolge TTA ist aufgrund des hohen GC-Gehaltes der Streptomycceten (ca. 70 %) relativ selten. Das Codon ist vermutlich in Genen, die für vegetatives Wachstum kodieren, weniger häufig vorhanden, als in Genen, die für die morphologische Differenzierung verantwortlich sind (*Gräfe, 1992*). Das Leucin-Codon tritt auch häufig in spezifischen Regulatorgenen der Antibiotikabiosynthese auf (*Leskiw et al., 1991*). Eine verstärkte Expression nichtvegetativer Gene mit TTA könnte daher an der Umschaltung des Stoffwechsels beteiligt sein (*Hopwood, 1989; Mendez und Chater, 1987; Horinouchi et al., 1990*).

Auf der Transkriptionsebene werden multiple Promotor-Strukturen genutzt, um selektiv die Transkription differenzierungs- und Sekundärstoff-spezifischer Gene zu kontrollieren (*Chater, 1998*). Das Minimal-Enzym der RNA-Polymerase (α , α , β , β' -Untereinheiten) kann mit unterschiedlichen σ -Faktoren („vegetative“ und „nicht-vegetative“) zum Holoenzym vervollständigt werden. Dabei wird die Promotorerkennung der RNA-Polymerase entsprechend verändert. Einmal können verstärkt Gene der vegetativen Entwicklung exprimiert werden, zum anderen findet die Expression von Genen des Sekundärstoffwechsels und der Differenzierung gehäuft statt (*Guijarro et al., 1988; Buttner, 1989*).

Auf der Ebene der Translation bestimmt die Heterogenität der Translations-Initiationsstelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) über die Effektivität der Translation der mRNA. Aufgrund einer geringeren Bindung an die Bindestelle des Ribosoms wird nicht-vegetative mRNA während des Wachstums zu einem geringeren Anteil translatiert (*Rebello et al., 1989*).

Streptomycceten, die in Flüssigkulturen angezogen werden, können oft nicht alle Stadien der morphologischen Entwicklung durchlaufen. Die teilweise gemeinsame Regulation der Sekundärstoffproduktion und der morphologischen Differenzierung führt dazu, dass auch die Bildung von Sekundärstoffen in Flüssigkulturen vermindert sein kann (*Kieser et al., 2000*). Die Ausbildung von Sporen und die Produktion von Sekundärstoffen erfolgt am besten auf festen Oberflächen. Um die Sekundärstoffproduktion von *K. putterlickiae* zu steigern, könnte

das Mycel von Cellophanfolien, die auf die Oberfläche entsprechender Agarplatten gelegt wurden, abgenommen werden. Bei dieser Methode würde die Sporenbildung begünstigt. In einer anderen Methode extrahierten *McDaniel et al. (1995)* direkt auf Agarplatten gewachsene Kulturen. Der bewachsene Agar wurde zerkleinert und mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Diese Kultivierung und Aufarbeitung könnte auch bei *K. putterlickiae* die Sekundärstoffbildung fördern. Nachteilig erscheint jedoch, dass sich diese Methode nur im Kleinmaßstab durchführen lässt.

Geringe Produktbildung

Das Problem der geringen Bildung der antibiotisch aktiven Sekundärstoffe in *K. putterlickiae* kann neben den bisher erläuterten Maßnahmen nur durch die Selektion leistungstärkerer Stämme behoben werden. Wildstämme sind meistens keine einheitlichen Genotypen. Je nach Kulturbedingung spalten sich die Wildstämme in verschiedene Klone auf, die wiederum als eigene Populationen vermehrt werden können. Eine genetische Variante könnte verstärkt den gesuchten Sekundärstoff produzieren. Das Auftreten genetischer Instabilität kann jedoch dazu führen, dass ein Klon zum Wildstamm-Typ revertiert oder sich in weitere genetische Varianten aufspaltet.

Weitere Möglichkeiten wie den jeweiligen Stamm unter Stressbedingungen zu kultivieren oder die Erzeugung von Mutanten führten bei der biotechnologischen Entwicklung von Leistungsstämmen z. T. zum Erfolg (*Gräfe, 1992*). Problematisch erscheint allerdings, dass eine Stammoptimierung nicht automatisch erfolgsversprechend ist und es sich um einen langwierigen Prozess handeln kann. Für jeden Stamm ist dabei eine spezifische Optimierung durchzuführen.

4.3.2 *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 als möglicher Ansamycin-Produzent

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen zum Sekundärstoffspektrum von *K. putterlickiae* F18-98 bildet der Stamm kein Maytansin (s. 3.3). Bei Fütterungsversuchen mit radioaktiv markierter AHBA wurde kein Sekundärstoff nachgewiesen, der in der Chromatographie die gleichen Trenneigenschaften wie Maytansin oder Ansamitocin P3 aufwies und in den gleichzeitig die radioaktiv markierte Vorstufe eingebaut wurde. Bei der Bioautographie der Extrakte aus *K. putterlickiae* mit dem Pilz *Penicillium avellaneum* (*Hanka et al., 1974*) hemmten zwei Sekundärstoffe aus der Ethylacetatphase das Pilzwachstum (s. 3.3.3). Die Hemmzonen lagen jedoch nicht auf der Höhe von Maytansin und Ansamitocin, sondern zeigten geringere Rf-Werte. Bei der Trennung auf Kieselgelplatten mit dem Fließmittel

Chloroform:Methanol (95/ 5) werden unpolare Stoffe zu einem geringeren Anteil zurückgehalten und wandern eine größere Strecke auf der DC-Platte (hoher Rf-Wert) als polare Substanzen. Die beiden Sekundärstoffe aus *K. putterlickiae*, die eine antibiotische Aktivität gegenüber *P. avellaneum* zeigen, müssen aufgrund ihrer im Vergleich zu Maytansin geringeren Rf-Werte eine entsprechend geringere Polarität als Maytansin besitzen.

Da die Arbeiten am Hans-Knöll-Institut in Jena zur Strukturaufklärung der radioaktiv markierten Produkte noch nicht abgeschlossen sind, können bislang nur hypothetische Überlegungen zur Art der gebildeten Naturstoffe angestellt werden.

Um *K. putterlickiae* bzgl. seines Sekundärstoffpotentials weiter zu charakterisieren, wurden molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Ein AHBA-Synthasegen wurde im Rahmen dieser Arbeit aus genomischer DNA von *K. putterlickiae* kloniert und überexprimiert. Der Aktivitätstest zeigte, dass es sich bei dem Genprodukt um eine funktionsfähige AHBA-Synthase handelt (s. 3.4.1). Das AHBA-Synthasegen lag mit weiteren Genen, die für die Maytansinoidbiosynthese kodieren, in einem Cluster (s. 3.4.2 und 4.4.3).

Interessanterweise ließ sich bisher die Bildung von Aminohydroxybenzalkohol in Extrakten von *K. putterlickiae* nachweisen (*I. Sattler*, persönliche Mitteilung). Entweder handelt es sich bei dem isolierten Produkt um ein Nebenprodukt der Biosynthese oder ein möglicher Biosyntheseweg mit Beteiligung des AHBA-Synthasegens wurde unterbrochen. Die Reduktion von AHBA zum entsprechenden Alkohol könnte auch durch die Bedingungen während der Aufarbeitung entstanden sein. Bisher ist kein Bakterienstamm bekannt, der nur AHBA produziert. AHBA diente bei den Ansamycin-Produzenten stets als biosynthetische Vorstufe der mC₇N-Einheit und Startermolekül der Polyketidsynthese. Damit unterstreicht diese Beobachtung die Funktionsfähigkeit der sequenzierten AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae*.

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei *K. putterlickiae* um einen weiteren Ansamycin-Bildner handelt. Pflanzen der Art *Putterlickia verrucosa* wären damit mit einem Ansamycin bildenden Aktinomyceten assoziiert.

Das Vorkommen von Ansamycinen ist für *Kitasatospora* Arten bisher nicht beschrieben. Bestätigt sich die Annahme, dass *K. putterlickiae* ein Ansamycin-Produzent ist, wäre der Stamm der erste seiner Gattung. Aus einigen Stämmen der Gattung *Kitasatospora* konnten verschiedene Sekundärstoffe mit biologischer Aktivität isoliert werden. Dabei wurden vor allem Peptidantibiotika nachgewiesen, wie z.B. Propioxatin A und B aus *K. setae* (*Inaoka et al.*, 1986), Phosalacin aus *K. phosalacinea* (*Omura et al.*, 1984) oder Cystargin aus *K.*

cystarginea (Uramoto et al., 1988). Antifungale Makrolidantibiotika wie Bafilomycin (Setamycin) konnten aus *Kitasatospora* Arten isoliert werden (Chung et al., 1999; Omura et

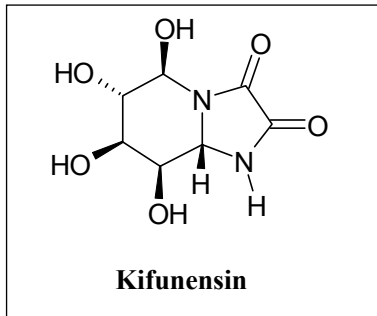


Abbildung 4.1 Kifunensin aus *Kitasatospora kifunensis*

al., 1982). Für den mit *K. putterlickiae* nah verwandten Stamm *K. kifunensis* ist die Bildung des Alkaloids Kifunensin (s. Abb. 4.1) beschrieben (Elbein et al., 1990). Für *K. azaticus*, ebenfalls eng mit *K. putterlickiae* verwandt, ist keine Naturstoffisolierung beschrieben. Der neu zur Gattung *Kitasatospora* zu zählende Stamm *K. aureofaciens* (früher *Streptomyces aureofaciens*) produziert Chlortetracyclin (Groth et al., 2003).

4.4 Ein Gencluster aus *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

4.4.1 Analyse der AHBA-Synthase aus *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

Ein in dieser Arbeit sequenzierter 1167 bp großer DNA-Abschnitt aus *Kitasatospora putterlickiae* F18-98 zeigt Homologien zu bekannten AHBA-Synthasen (s. 3.4.1.3). Neben einer AHBA-Synthase aus *A. mediterranei* (RifK) sind bereits AHBA-Synthasen aus *Streptomyces achromogenes* (Rub14), *Streptomyces hygroscopicus* (GdnA) und *Streptomyces lavandulae* (MitA) bekannt. Der Stamm *Streptomyces collinus* besitzt zwei verschiedene AHBA-Synthasen (AnsF im Ansatrienin-Cluster und NapF im Naphthomycin-Cluster; von Bamberg, 1999). In *A. pretiosum* konnten zwei AHBA-Synthasegene (asm24 und asm 43) nachgewiesen werden, die ca. 68 kp auseinander liegen. Das AHBA-Synthasegen (asm24) im Cluster I von *A. pretiosum* liegt benachbart zu einem Polyketidsynthasegen. Das zweite AHBA-Synthasegen (asm43) ist im Cluster II mit weiteren Genen der AHBA-Biosynthese, z.B. den Genen für die Oxidoreduktase und die Phosphatase, assoziiert. Beide Cluster werden zur Ansamitocinbiosynthese benötigt (Yu et al., 2002).

Durch die Degenerierung des genetischen Codes und den hohen GC-Gehalt der DNA von Aktinomyceten werden konservierte Bereiche in den AHBA-Synthasegenen eher durch Homologievergleiche auf Aminosäureebene erfasst. Der Aminosäurevergleich der AHBA-Synthase KitA aus *Kitasatospora putterlickiae* mit den weiteren bekannten AHBA-Synthasen ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die AHBA-Synthase KitA aus *K. putterlickiae* zeigt die höchste Sequenzhomologie auf Aminosäureebene zur AHBA-Synthase GdnA aus *S. hygroscopicus* (73,6 % identische Aminosäuren).

Die Kristallstrukturanalyse der AHBA-Synthase aus *A. mediterranei* (Eads et al., 1999) identifizierte einzelne Aminosäuren, die an der Bindung des Cofaktors PLP beteiligt sind. Die Kristallstruktur wurde außerdem für einen Komplex des Enzyms mit Gabaculin, einem Inhibitor der AHBA-Synthase, analysiert. Aufgrund der ähnlichen chemischen Strukturen von Gabaculin, aDHS und AHBA konnten Aminosäuren detektiert werden, die vermutlich mit dem Substrat aDHS und nachfolgend mit dem Produkt AHBA Wechselwirkungen eingehen. In allen bisher untersuchten AHBA-Synthasen sind die Aminosäuren, die an der Bindung des Cofaktors PLP (s. Abb. 4.2, schwarze Pfeile) beteiligt sind, konserviert. Die Aminosäure Lysin 188 (K188; Zählung stets auf die AHBA-Synthase von *A. mediterranei* bezogen) bildet mit der Carbonylfunktion des Cofaktors PLP eine Schiff'sche Base, ein so genanntes „internes Aldimin“ (s. Abb. 4.3). Die Asparaginsäure 159 (D159) ist durch eine Salzbildung mit PLP verbunden. Die weiteren Aminosäuren stabilisieren die Bindung des Cofaktors (s. Abb.4.4). Basierend auf den konservierten Aminosäuren, die an der PLP-Bindung beteiligt sind, wurden die degenerierten Oligonukleotide für die Suche nach AHBA-Synthasegenen in *Putterlickia verrucosa* abgeleitet (s. 3.1.1). Diejenigen Aminosäuren, die vermutlich die Bindung des Substrates aDHS unterstützen, sind ebenfalls in allen Genen konserviert (s. Abb. 4.2, rote Pfeile).

Erste Vergleiche der Proteinsequenz des AHBA-Synthasegens von *A. mediterranei* (Kim et al., 1998) mit Proteinsequenzen, die in der Genbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) veröffentlicht wurden, zeigte deutliche Homologien zur Protein-Superfamilie der PLP- oder PMP-abhängigen Aminotransferasen und Dehydratasen (SMAT [secondary metabolite aminotransferases], Piepersberg, 1994). Die Proteine der Superfamilie sind häufig bei Antibiotikabiosynthesen an der Bildung von Desoxyzuckern oder Aminocyclitolen beteiligt (Liu und Thorson, 1994; Ahlert et al., 1997). Die sekundärmetabolischen Aminotransferasen werden durch ein typisches Sequenzmotiv, das in allen AHBA-Synthasen konserviert ist, charakterisiert. Das Sequenzmotiv [G-(D,V,T)-(E,V,Q)-x₇₆₋₈₄-(E,Q,R)-D-x₁₀₋₁₂-(G,D,Q)-x₃₋₅-G-x₈₋₁₀-S-x₄-K-x₄₋₅-(G,A,L,F)-(E,D,Q)-G-G] (Ahlert et al., 1997) ist in Abbildung 4.2 durch eine Einrahmung der Sequenzen angegeben. Die Zahlen, die zwischen den konservierten Aminosäuren angegeben sind, kennzeichnen die Anzahl der beliebigen Aminosäuren an dieser Position.

Die beiden Subgruppen der Protein-Superfamilie unterscheiden sich in der Cofaktor-Bindung: Die Aminotransferasen sind PLP-abhängig; die Dehydratasen binden den Cofaktor PMP. Anstelle der in den Aminotransferasen und AHBA-Synthasen konservierten Aminosäure Lysin enthalten die Dehydratasen zwei Histidin-Moleküle (Pascarella und Bossa, 1994; Kim

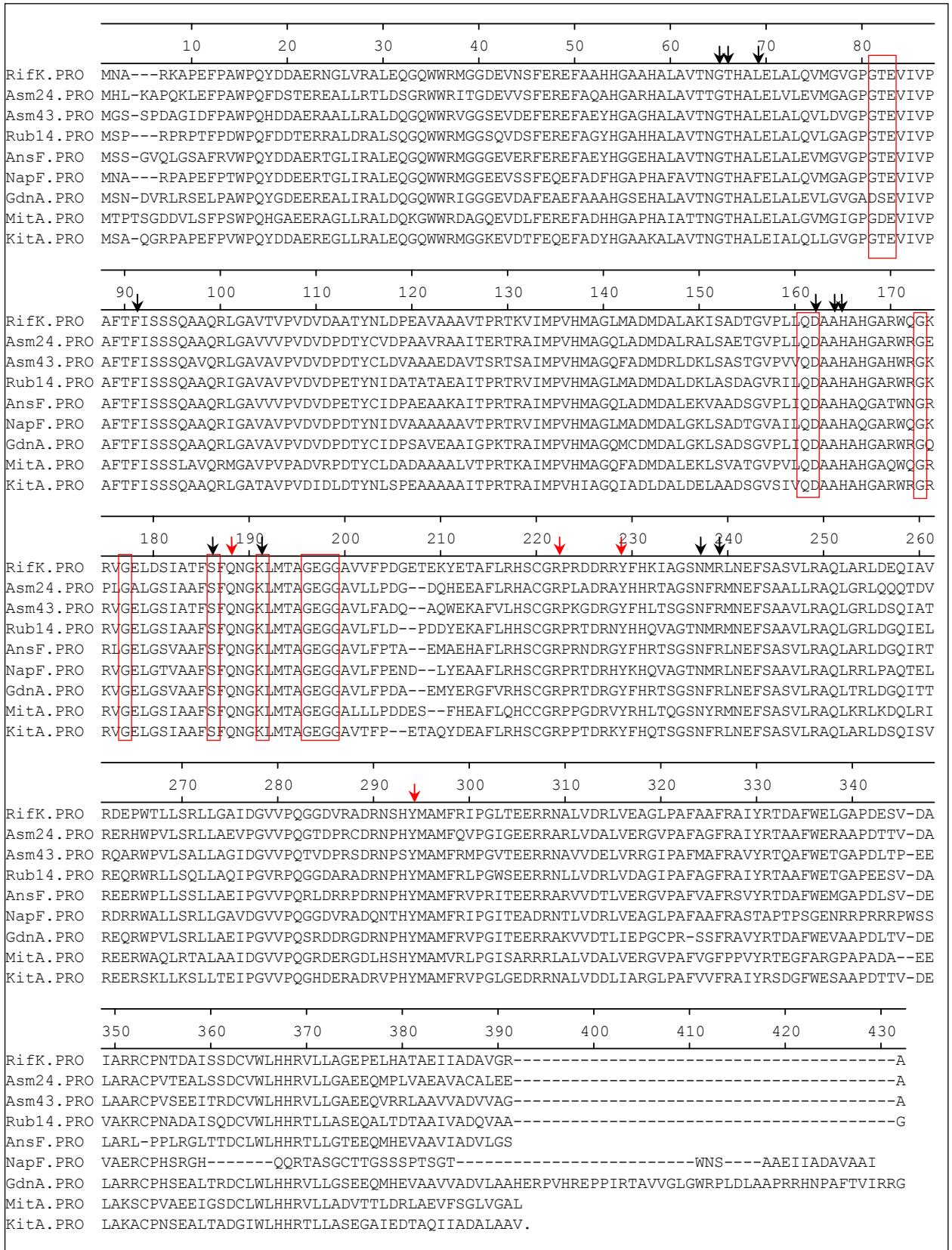


Abbildung 4.2 Aminosäurevergleich der AHBA-Synthase KitA aus *K. putterlickiae* mit den bisher vollständig sequenzierten AHBA-Synthasen aus *A. mediterranei* (RifK), *A. pretiosum* (Asm24 und Asm43), *S. achromogenes* (Rub14), *S. collinus* (AnsF und NapF), *S. hygroscopicus* (GdnA) und *S. lavandulae* (MitA). Die Daten wurden mit dem Computerprogramm „MegAlign“ (s. 2.5.14.5) prozessiert. Hoch konservierte Aminosäuren, die an der Bindung des Cofaktors PLP beteiligt sind, sind mit einem schwarzen Pfeil; Aminosäuren, die die Substratbindung unterstützen mit einem roten Pfeil markiert. Das hoch konservierte Sequenzmotiv der SMATs ist eingerahmt (Ahlert et al., 1997).

et al., 1998). Die Dehydratasen besitzen außerdem mehrere Cysteinmoleküle, die eine Eisen-Schwefel-([2Fe-2S])-Bindestelle repräsentieren. Die Cysteinreste kommen weder in den PLP-abhängigen Aminotransferasen noch in den AHBA-Synthasen vor. Obwohl die AHBA-Synthasen funktionell eher zu den Dehydratasen gezählt werden, besitzen sie eine höhere Sequenzhomologie zur PLP-abhängigen Aminotransferase-Subgruppe (*Kim et al.*, 1998).

Ein Aminosäuresequenzvergleich kann zwar Homologien zu bereits bekannten Proteinen aufzeigen, beweist aber nicht die tatsächliche Funktion des kodierten Enzyms. Um die AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* von den Aminotransferasen der SMAT-Familie zu unterscheiden, wurde die Enzymaktivität getestet. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit die AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* in *E. coli* BL21(DE3)pLysS als Poly-Histidin-Fusionsprotein überexprimiert. Im Funktionstest katalysierte die AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* die Umsetzung von aDHS zu AHBA (s. 3.4.1.5).

Bei der Umsetzung von aDHS zu AHBA handelt es sich um eine α , β -Dehydratisierung und eine stereospezifische 1,4-Enolisierung (*Kim et al.*, 1998; *Eads et al.*, 1999; s. Abb. 4.3).

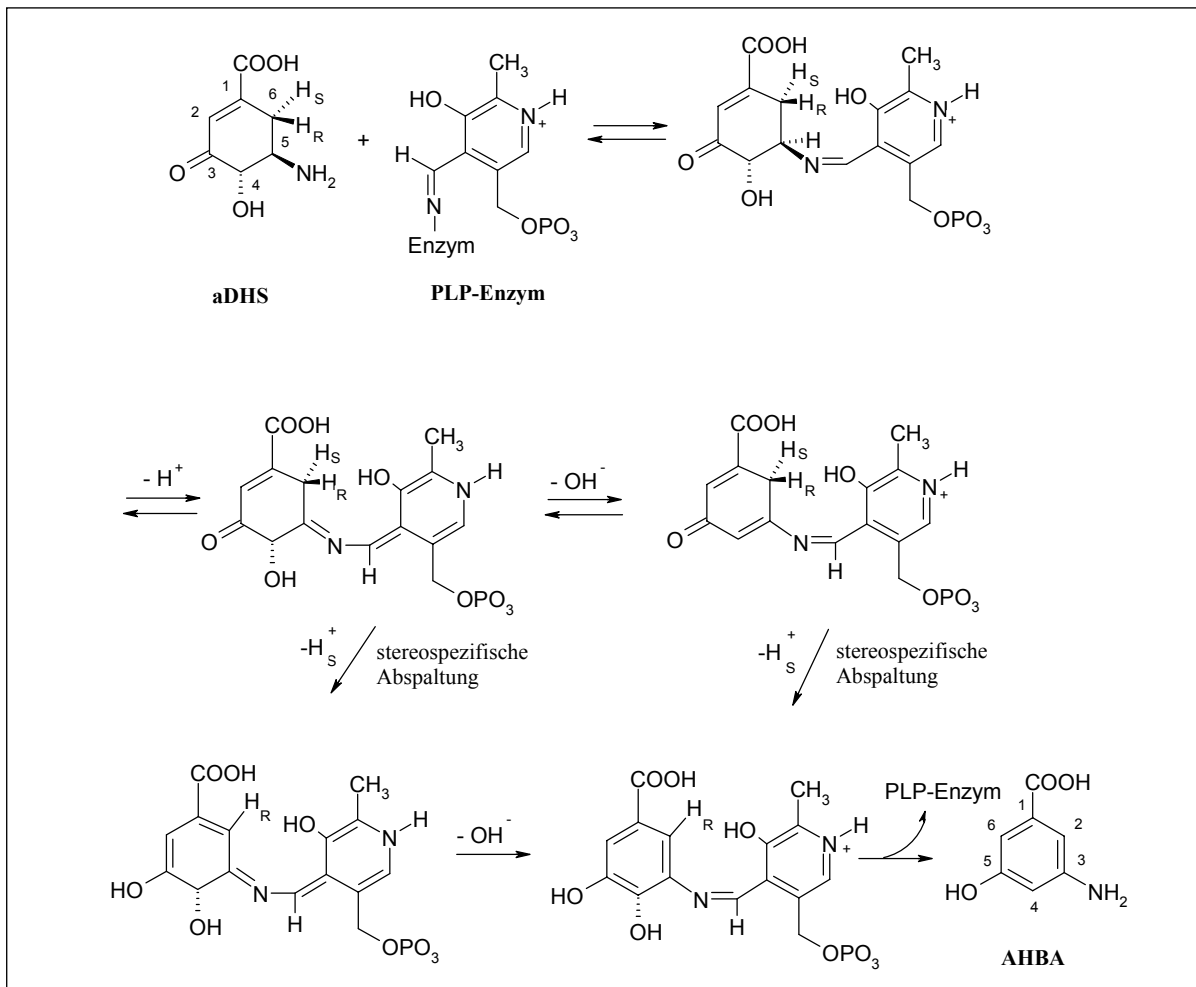


Abbildung 4.3 Bildung von AHBA aus Aminodehydroshikimisäure (aDHS). (*Kim et al.*, 1998)

Die hohe Sequenzhomologie der AHBA-Synthasen zu Enzymen der SMAT-Proteinfamilie (s. o.) weckte das Interesse, welche Aminosäuren determinieren, ob es sich bei dem Enzym um eine Aminotransferase oder eine Dehydratase handelt. Die Faltung der AHBA-Synthase aus *A. mediterranei* ähnelte der Faltung der Aspartat-Aminotransferase AAT (Eads *et al.*, 1999). Die Aminosäuren, die an der Bindung des Cofaktors PLP beteiligt sind, sind bis auf die Aminosäure Lysin (K188 in *A. mediterranei*) und die Aminosäure Aspartat (D159 in *A. mediterranei*) innerhalb der Aspartat-Aminotransferase-Familie nicht streng konserviert. Die Aminosäuren, die die PLP-Bindung stabilisieren, sind sich jedoch ähnlich. Ein interessanter Unterschied zeigte sich, wenn verglichen wird, welche Aminosäuren die 3-Hydroxylgruppe von PLP stabilisieren. Durch das Ketoenamintautomer (s. Abb. 4.4) liegt hier eine negative Ladung. Bei den AHBA-Synthasen bildet die konservierte Aminosäure Histidin162 (H162) eine Wasserstoffbrücke zur O3-Position von PLP aus (vgl. Abb.4.4). Transaminasen enthalten in dieser Position meist einen Glutamin- oder einen Histidinrest. Vermutliche Dehydratasen besitzen an der Stelle jedoch eine saure Aminosäure (Kim *et al.*, 1998; Thorson *et al.*, 1993; Pascarella und Bossa, 1994). Obwohl die Umsetzung von aDHS zu AHBA funktionell von einer Dehydratase katalysiert wird, besitzen die AHBA-Synthasen außergewöhnliche Ähnlichkeiten zu Aminotransferasen.

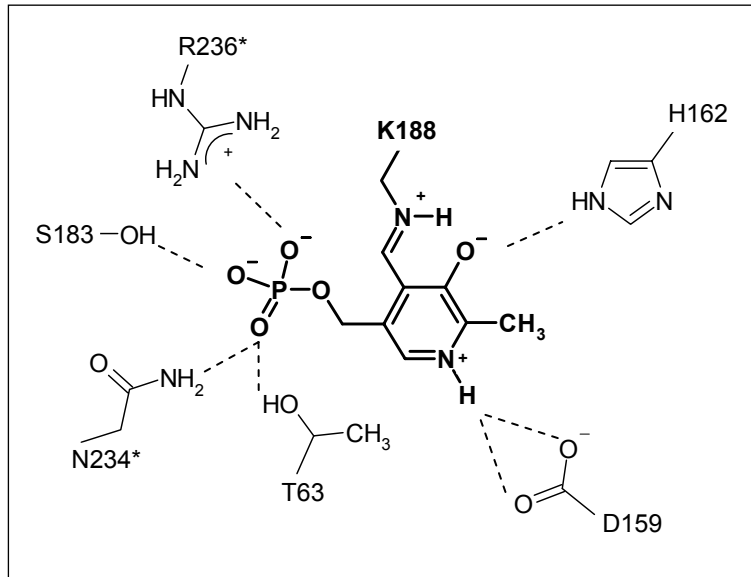


Abbildung 4.4 PLP-Enzym-Komplex. Das interne Aldimin liegt als protoniertes als Ketoenamintautomer vor. Gezeigt sind die Aminosäuren der AHBA-Synthase von *A. mediterranei*, die an der Bindung von PLP beteiligt sind. Lysin188 (K188) ist an PLP kovalent gebunden. Aspartat159 (D159) geht ionische Wechselwirkungen mit dem protonierten Stickstoff (N1) von PLP ein. Die Aminosäuren Histidin162 (H162), Threonin63 (T63), Asparagin234 (N234), Serin183 (S183) und Arginin236 (R236) stabilisieren die Bindung (Eads *et al.*, 1999).

Für die AHBA-Synthase wird eine zweite Funktion als Aminotransferase postuliert (s. a. 1.2.1). Im zweiten Schritt der AHBA-Biosynthese würde die AHBA-Synthase eine Transaminierung katalysieren, bei der UDP-Kanosamin gebildet wird. Untersuchungen zu den ersten Schritten der AHBA-Biosynthese und zu den Funktionalitäten der AHBA-Synthase sowie der Oxidoreduktase wurden auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt (s. 3.5).

Ausführlich wird auf diese enzymatischen Reaktionen in Abschnitt 4.5.2 und 4.5.3 eingegangen.

In einer „site-directed mutagenesis“ wurden einige konservierte Aminosäuren der AHBA-Synthase von *A. mediterranei*, die an der PLP- oder Substratbindung beteiligt sind (s. Abb. 4.2), ausgetauscht (Yu *et al.*, unveröffentlicht). Die mutierten AHBA-Synthasen wurden in *E. coli* exprimiert und ihre Fähigkeit geprüft, αDHS zu AHBA umzusetzen. Wie erwartet, wurde nach dem Austausch von Lysin188 zu Aspartat188 und dem Austausch von Aspartat159 zu Alanin159 keine Aktivität festgestellt. Trotz des Austausches der Aminosäure Histidin162 zu Leucin162 war allerdings noch eine katalytische Aktivität messbar (K_M -Wert von 281 μmol gegenüber einem K_M -Wert von 122 μmol im Wildtyp; Yu *et al.*, unveröffentlicht). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Konservierung der Aminosäure Histidin162 für die Dehydratase-Aktivität nicht absolut notwendig ist. Inwieweit diese Aminosäure für eine mögliche Aminotransferase-Aktivität der AHBA-Synthase essentiell ist, bleibt offen. Eine entsprechend mutierte AHBA-Synthase wäre hinsichtlich ihrer Aminotransferase-Aktivität ebenfalls zu untersuchen (s. 4.5.3).

4.4.2 Sequenzierung der Oxidoreduktase und Phosphatase

Im Genom von *K. putterlickiae* konnte unmittelbar stromabwärts des AHBA-Synthasegens ein offenes Leseraster (ORF) mit signifikanter Homologie zu Oxidoreduktasen der AHBA-Biosynthese sequenziert werden (s. 3.4.3.2). Durch Untersuchungen an der AHBA-Biosynthese in *A. mediterranei* konnte gezeigt werden, dass die Oxidoreduktase (RifL) für die Bildung von AHBA essentiell ist. Eine *A. mediterranei*-Mutante ohne Oxidoreduktasegen war nicht mehr in der Lage Rifamycin zu produzieren. Mit der Zugabe von AHBA wurde die Rifamycinbildung wiederhergestellt (Yu *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der Oxidoreduktase RifL aus *A. mediterranei* untersucht (s. a. 3.5 und 4.5). Die Oxidoreduktase katalysiert die Umsetzung von UDP-Glucose zur entsprechenden 3-Keto-Verbindung. Eine entsprechende Funktion kann daher auch für die Oxidoreduktase KitO aus *K. putterlickiae* angenommen werden.

Die höchste Aminosäurehomologie (berechnet mit „BlastP“, NCBI, s. 2.5.14.5) besteht mit 58 % identischen Aminosäuren zur Oxidoreduktase des Geldanamycin-Bildners *S. hygrosopicus*. Insgesamt weisen die Oxidoreduktasen untereinander nicht so hohe Homologien auf wie die AHBA-Synthasen. So haben z.B. die Oxidoreduktasen NapG und AnsG aus *Streptomyces collinus* nur zu 35 % identische Aminosäuren (von Bamberg, 1999).

Bei früheren Sequenzvergleichen der Oxidoreduktasen aus *A. mediterranei* (RifL) wurden Homologien zu Pur10, einer Oxidoreduktase des Puromycin-Clusters (*Tercero et al., 1996*) ermittelt (*August et al., 1998*). Für die Oxidoreduktase Pur10 wird die Oxidation von ATP zu 3'-Keto-3'-deoxyATP postuliert (*Rubio, 1998*). Weitere signifikante Aminosäure-Übereinstimmungen besitzen die Oxidoreduktasen der AHBA-Biosynthese mit Glucose-Fructose-Oxidoreduktasen, z.B. aus *Zymomonas mobilis* (*Loos et al., 1993*). Dieses Enzym oxidiert Glucose zu Gluconolacton und reduziert Fructose zu Sorbitol. Die Glucose-Fructose-Oxidoreduktase (Gfor) aus *Z. mobilis* gehört zur Proteinfamilie der GFO-IDH-MocA-Familie. Das MocA-Protein gehört zu den Rhizopin-katabolisierenden Proteinen. MocA katalysiert vermutlich die NADH-abhängige Dehydrogenase-Reaktion (*Rossbach et al., 1994*). Die Proteine der GFO-IDH-MocA-Familie nutzen NAD oder NADP als Cofaktor. Dementsprechend enthalten die Proteinsequenzen ein hochkonserviertes Glycin-reiches N-terminales Faltungsmotiv, das die NAD(P)-bindende $\beta\beta$ -Rossmannfalte repräsentiert (*Rossmann et al., 1975; Wierenga et al., 1986*).

Die Supersekundärstruktur der $\beta\beta$ -Rossmannfalte ist auch in den Oxidoreduktasen der AHBA-Biosynthese zu finden (s. Abb. 4.5). Das charakteristische Sequenzmotiv GxGxxG (x = beliebige Aminosäure) der NAD/ NADH-Bindedomäne liegt im N-terminalen Bereich der Oxidoreduktasen aus *A. mediterranei*, *S. collinus* (NapG), *S. hygroscopicus* und *K. putterlickiae*. Bei Enzymen, die als Cofaktor NADP verwenden, findet sich stattdessen das Sequenzmotiv GxGxxA. Wurde das Glycin-reiche Motiv GxGxxA der Glucose-Fructose-Oxidoreduktase aus *Z. mobilis* zu GxGxxG mutiert, änderte sich die Coenzym-Spezifität des Enzyms nicht (*Wiegert et al., 1997*). Zur Klärung der Frage, welche Aminosäuren für eine NAD- oder eine NADP-Abhängigkeit der jeweiligen Enzyme verantwortlich sind, wurden weitere Mutationen in das Glucose-Fructose-Oxidoreduktasegen aus *Z. mobilis* eingeführt und untersucht: Die letzte konservierte Aminosäure der NAD-Bindedomäne ist eine negativ geladene Aminosäure (Aspartat oder Glutamat; Abb. 4.5 s. Dreieck), die in NADP-Bindedomänen fehlt (*Wierenga et al., 1986; Hamukoglu und Gutfinger, 1989*). In der NADP-bindenden Glucose-Fructose-Oxidoreduktase Gfor aus *Z. mobilis* findet sich in der Position ein Serinrest (Abb. 4.5, s. Dreieck). Durch einen Austausch der Aminosäure Serin (S116) gegen die saure Aminosäure Aspartat (D116) konnte die Glucose-Fructose-Oxidoreduktase Gfor beide Cofaktoren (NAD und NADP) nutzen (*Wiegert et al., 1997*). Das mutierte Enzym zeigte Glucose-Dehydrogenase-Aktivität. Die Reduktion von Fructose und die Oxidation von Sorbitol wurde von dem mutierten Protein nicht mehr katalysiert (*Wiegert et al., 1997*). Die

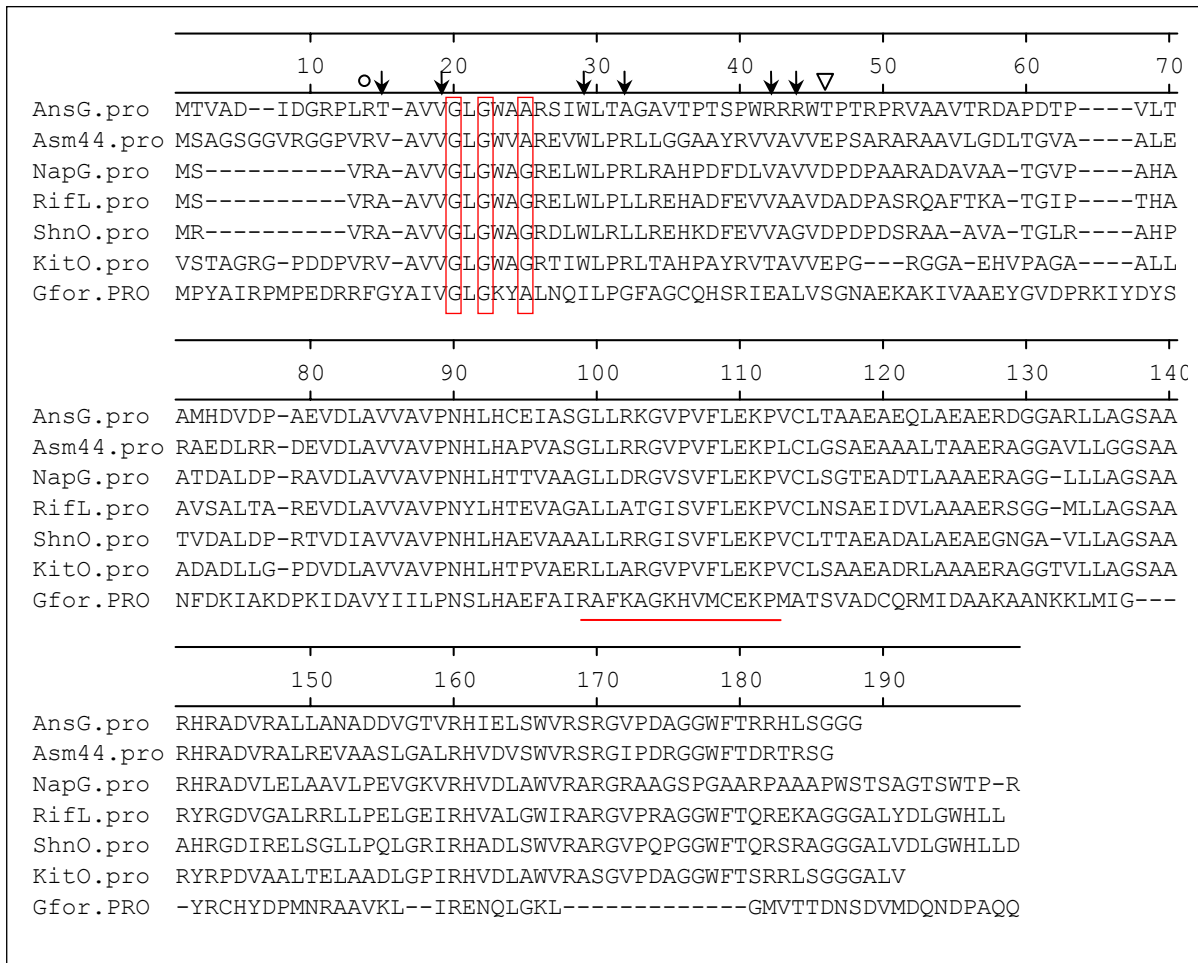


Abbildung 4.5 Vergleich der ersten 180 Aminosäuren der Oxidoreduktase KitO aus *K. pouterlickiae*, aus *A. mediterranei* (RifL), *A. pretiosum* (Asm44), *S. collinus* (AnsG und NapG), *S. hygroscopicus* (ShnO) mit N-terminalen Aminosäuren der Glucose-Fructose-Oxidoreduktase (Gfor) von *Z. mobilis* (Wiegert *et al.*, 1997). Die Daten wurden mit dem Computerprogramm „MegAlign“ (s. 2.5.14.5) prozessiert. Symbole kennzeichnen Aminosäuren des Motivs der β -Rossmannfalte (Wierenga *et al.*, 1986): offener Kreis, basische od. hydrophile Aminosäuren; schwarze Pfeile, hydrophobe Aminosäuren; Dreieck, saure Aminosäuren. Das Sequenzmotiv GxGxxG der Rossmannfalte ist eingerahmt. Das vermutliche Sequenzmotiv AGKHVxCEKP (Wiegert *et al.*, 1997) von einer neuen Klasse von Zucker-Dehydrogenasen, wie von Gfor, ist unterstrichen.

letzte konservierte Aminosäure des Motivs scheint damit die Spezifität eines Enzyms für den Cofaktor (NAD oder NADP) stärker zu beeinflussen als eine Änderung des Glycin-reichen Motivs (GxGxxG/A).

Obwohl die Oxidoreduktase AnsG (*S. collinus*) und Asm 44 (*A. pretiosum*) im Glycin-reichen Motiv ein Alaninrest besitzen, findet sich an der Stelle der letzten konservierten Aminosäure bei allen Oxidoreduktasen eine saure Aminosäure (Aspartat, D bzw. Glutamat, E). Dies lässt vermuten, dass die Oxidoreduktasen den Cofaktor NAD benötigen.

Der Aminosäurevergleich von Enzymen der GFO-IDH-MocA-Familie lieferte ein hoch konserviertes Motiv AGKHVxCEKP (x = beliebige Aminosäure), das vermutlich eine neue Klasse von Zucker-Dehydrogenasen charakterisiert (Wiegert *et al.*, 1997). Dieses

Sequenzmotiv ist in Abbildung 4.5 für die Glucose-Fructose-Oxidoreduktase aus *Z. mobilis* dargestellt. Interessanterweise ist der entsprechende Bereich auch bei den Oxidoreduktasen hoch konserviert. Das Sequenzmotiv findet sich allerdings nur teilweise wieder. Anstelle des Motivs AGKHVxCEKP könnte für die Oxidoreduktasen ein Motiv mit xGxxVFLCEKP (x = beliebige Aminosäuren) postuliert werden. Die Ähnlichkeit der Oxidoreduktasen zu einer neuen Klasse von Zucker-Dehydrogenasen lässt auf die Funktionalität der Enzyme schließen. In der AHBA-Biosynthese katalysiert die Oxidoreduktase RifL die Oxidation von UDP-Glucose in der 3-Position (s. 3.5.2.3).

Wird mit dem Computerprogramm „Blast“ (s. 2.5.14.5) die Sequenz der Oxidoreduktase von *K. putterlickiae* auf konservierte Domänen hin untersucht, finden sich zusätzlich Homologien zur MviM-Proteinfamilie. Zu dieser Proteinfamilie ist bislang wenig bekannt. Es werden Proteine mit vermutlicher Dehydrogenase-Aktivität zusammengefasst. Neben dem Protein MviM aus *Zymomonas mobilis* (Protein Accession Nr.: AAF13758), zu dem bisher nichts publiziert wurde, gehören u. a. eine NDP-3-Keto-6-deoxyhexose-3-ketoreduktase aus *Streptomyces rochei* (Mochizuki et al., 2003) oder so genannte Bi-Domänen-Oxidoreduktasen aus *Streptomyces* Arten (Bentley et al., 2002; Wang et al., 2003) zu dieser Proteinfamilie. Der C-terminale Abschnitt der Bi-Domänen-Oxidoreduktasen hat Homologien zur MviM-Proteinfamilie.

Welche Faltungsmotive der MviM-Proteinfamilie innerhalb der Oxidoreduktasen konserviert sind, ist bisher nicht bekannt. Mögliche Rückschlüsse auf die Funktionalität der Oxidoreduktasen müssen damit bislang unbeantwortet bleiben.

717 bp des dritten offenen Leserasters (ORF) des sequenzierten Abschnitts aus *K. putterlickiae* zeigen signifikante Homologien zu Phosphatasen der AHBA-Biosynthese. Die höchste Sequenzhomologie auf Aminosäurenebene besteht zu 65 % zur Phosphatase ShnP aus *S. hygrosopicus* (identische Aminosäuren in Prozent, bezogen auf überlappende Bereiche). Wie die Oxidoreduktase ist auch die Phosphatase für die Bildung von AHBA essentiell. Wurde das Phosphatasegen rifM in dem Rifamycin-Bildner *A. mediterranei* inaktiviert, konnte kein Rifamycin produziert werden. Die Zugabe von AHBA zur Kultur des mutierten *A. mediterranei*-Stammes stellte die Rifamycinproduktion wieder her (Yu et al., 2001).

Die Phosphatasen haben Ähnlichkeit zu Phosphoglycolat-Phosphatase autotropher und fakultativ autotropher Bakterien. Die Phosphoglycolat-Phosphatase von *Ralstonia eutropha* (früher *Alcaligenes eutrophus*; Schäferjohann et al., 1993) und von *Rhodobacter sphaeroides* (Gibson und Tabita, 1997) dephosphorylieren Phosphoglycolat zu Glycolat im Calvin-Zyklus.

Glycolat wird dann zu Glyoxylat oxidiert und dem Aminosäure- oder Energiestoffwechsel zugeführt (vgl. *Stryer, 1996*).

4.4.3 Weitere Gene der Maytansinbiosynthese – ein Vergleich der Gencluster

In Aktinomyceten sind die Gene für die Biosynthese von Antibiotika im Chromosom geclustert (*Hopwood et al., 1988*). Die Gencluster für einige Ansamycine wie Rifamycin (*August et al., 1998*) und Ansamitocin (*Yu et al., 2002*) wurden durch die Kombination einer Sonde für die AHBA-Synthase mit einer Sonde für die Polyketidsynthase im jeweiligen Genom identifiziert. Eine ähnliche Strategie wurde auch für *Kitasatospora putterlickiae* angewandt. Der Stamm *K. putterlickiae*, der aus der Rhizosphäre einer Maytansin führenden Pflanze von *P. verrucosa* isoliert wurde, besitzt eine funktionsfähige AHBA-Synthase (s. 3.4.1.5). Bei dem Bakterium sollte geprüft werden, ob weitere Gene für eine Maytansinoidbiosynthese im Genom vorliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine AHBA-Synthase, eine Oxidoreduktase, eine Phosphatase und Teile einer Typ-I-Polyketidsynthase von *K. putterlickiae* sequenziert. Arbeiten von *Wings (2001)* führten zur Sequenzierung einer aDHQ-Dehydratase und Teilen einer Kinase (s. Tab. 3.3). Mit Hilfe von Southern Hybridisierungen konnten im Rahmen dieser Arbeit ein aDAHP-Synthasegen und ein aDHQ-Synthasegen in der Cosmid-DNA von *K. putterlickiae* detektiert werden. Damit wurden alle Gene, die für die Bildung von AHBA essentiell sind (*Yu et al., 2001*), im Genom von *K. putterlickiae* gefunden. Der Aufbau des möglichen Clusters in *K. putterlickiae* wird in Abbildung 4.6 mit weiteren Ansamycin-Clustern verglichen.

Bei der Suche nach weiteren Genen der Maytansinoidbiosynthese konnte durch Southern Hybridisierungen das Vorkommen einer Typ-I-Polyketidsynthase (PKS) bestätigt werden (s. 3.4.2.3). Das Gen, das für die PKS kodiert, liegt direkt stromabwärts des Phosphatasegens. Die Sequenzanalyse des 5'-Endes dieses Gens zeigte hohe Homologien (61 % identische Aminosäuren) zur „AsmA Loading Domain“ (*Yu et al., 2002*). Diese Domäne der Polyketidsynthase AsmA von *A. pretiosum* besteht aus einem Acyl-Carrier-Protein (ACP) und einer Acyl-CoA-Ligase. Für die entsprechende Domäne der PKS von *A. mediterranei* konnte gezeigt werden, dass diese Domäne die PKS mit der aromatischen Startereinheit AHBA belädt (*Tang et al., 1998*). Durch Sequenzierung weiterer Teile des PKS-Gens in *K. putterlickiae* wurden typische PKS-Domänen für Acyltransferasen und Ketosynthasen detektiert. Damit entspricht die Polyketidsynthase von *K. putterlickiae* vermutlich dem charakteristischen modularen Aufbau von Typ-I-Polyketidsynthasen (*Cane et al., 1998*).

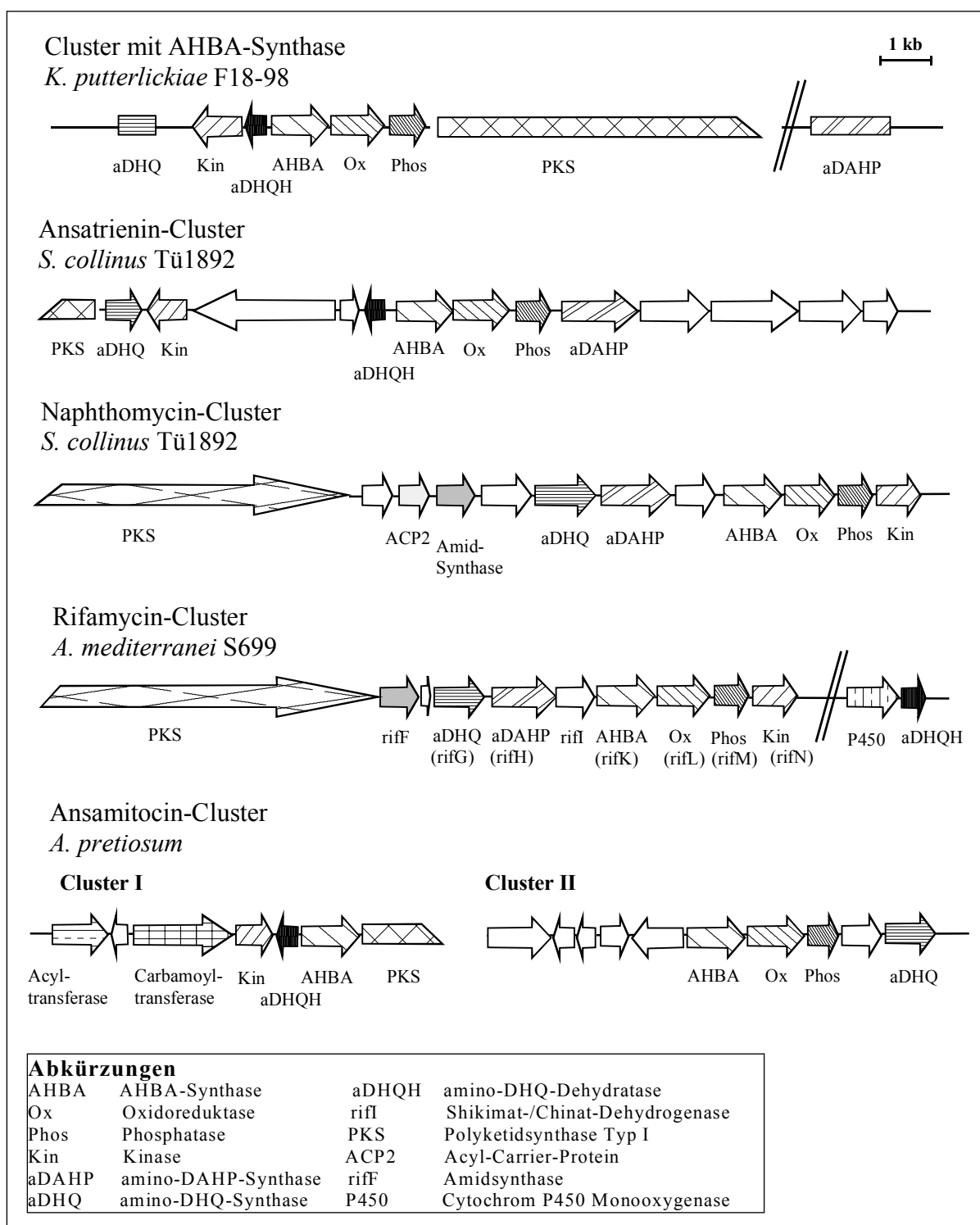


Abbildung 4.6 Vergleich der Biosynthesecluster von Ansatrienin, Naphthomycin, Rifamycin und Ansamitocin mit dem Cluster aus *K. putterlickiae*. Jeder Pfeil entspricht einem offenem Leseraster (ORF). Die Pfeilrichtung und die Größe geben jeweils die Transkriptionsrichtung und die relative Größe der ORFs wieder. Die Gene, die in *K. putterlickiae* nur mittels Southern Hybridisierungen nachgewiesen wurden, sind als Rechtecke dargestellt.

Eine Amidsynthase, die die Kettenverlängerung der PKS beendet und die Säureamidbindung mit der Aminogruppe der AHBA katalysiert, konnte im Genom von *K. putterlickiae* nicht gefunden werden. Ein Grund für ein negatives Ergebnis könnte die geringe Homologie der

bereits bekannten Amidsynthesen untereinander sein. Die verwendete heterologe Sonde für die Amidsynthase (s. 3.4.2.3) war daher vermutlich nicht besonders spezifisch. Dies könnte dazu geführt haben, dass die verwendete heterologen Sonde (s. 3.4.2.3) nicht mit der DNA von *K. putterlickiae* hybridisierte.

Mit der genomischen DNA von *K. putterlickiae* hybridisierte nur noch die Sonde des Acyltransferasegens (*asm19*) von *A. pretiosum*. Die Acyltransferase von *A. pretiosum* besitzt Homologien zu den Enzymen MdmB aus *Streptomyces mycarofaciens* (Hara und Hutchinson, 1992) und *AcyA* aus *Streptomyces thermotolerans* (Arisawa et al., 1996). Beides sind Makrolid-O-Acyltransferasen. Die Funktionalität der Acyltransferase wurde durch Geninaktivierungsexperimente bestätigt. Eine Mutante von *A. pretiosum*, in der Teile des Gens deletiert wurden, produzierte weder Ansamitocin P3 noch den entsprechenden Alkohol, Maytansinol. Stattdessen bildete die Mutante N-Desmethyl-4,5-desepoxymaytansinol (Yu et al., 2002). Das Ergebnis zeigt, dass die Acylierung der 3-Hydroxylgruppe nicht der letzte Schritt der Maytansinoidbiosynthese ist. Der Alkohol Maytansinol wurde nicht mit Hilfe der Acyltransferase zu Ansamitocin P3 umgesetzt (Moss et al., 2002). Die Acyltransferase kondensiert kurze aktivierte CoA-Ester an die 3-Hydroxylgruppe von N-Desmethyl-4,5-desepoxymaytansinol (Moss et al., 2002). Die aktivierten CoA-Ester wie z.B. Propionyl-CoA oder Isobutyryl-CoA könnten durch die Oxidation der entsprechenden Alkohole oder alternativ aus Aminosäuren entstanden sein (Hatano et al., 1984). Interessanterweise besitzt die Acyltransferase aus *A. pretiosum* hohe Substratspezifität bezüglich des Makrolidrings, der „Alkoholkomponente“. Auf der anderen Seite zeigt das Enzym eine hohe Toleranz gegenüber den verschiedenen kurzen aktivierten CoA-Ester, den „Säurekomponenten“. Diese Eigenschaft charakterisiert auch die Makrolid-O-Acyltransferasen MdmB und *AcyA* (Hara und Hutchinson, 1992; Arisawa et al., 1996). Ein mögliches Acyltransferasegen in *K. putterlickiae* könnte damit ähnliche Funktionen besitzen.

Southern Hybridisierungen mit Sonden für eine Halogenase, eine Carbamoyltransferase und eine 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase waren negativ (s. 3.4.2.3). In den Versuchen wurde dabei sowohl genomische als auch Cosmid-DNA von *K. putterlickiae* untersucht. Entweder fehlen diese Gene der Maytansinoidbiosynthese in *K. putterlickiae* oder die gesuchten Gene lassen sich mit der verwendeten Methode nicht nachweisen. Die Amidsynthase aus *A. pretiosum* wurde ebenfalls bei Southern Hybridisierungen nicht im Genom detektiert (Hoffmann, 1997). Erst die Sequenzierung ermöglichte den Nachweis der Amidsynthase im Ansamitocin-Cluster (Yu et al., 2002).

Bei einem Vergleich der Biosynthesecluster von Rifamycin, Naphthomycin, Ansatrienin und Ansamitocin mit dem möglichen Cluster aus *K. putterlickiae* fällt zunächst auf, dass die Gene für die AHBA-Synthase, die Oxidoreduktase und die Phosphatase stets hintereinander angeordnet sind. Die einzige Ausnahme bildet das Cluster I von *A. pretiosum*, in dem das zweite AHBA-Synthasegen ohne die beiden weiteren Gene vorliegt. Dieses AHBA-Synthasegen ist unmittelbar vor dem Gen der Polyketidsynthase lokalisiert. Eine ähnliche, allerdings nicht völlig identische, räumliche Nähe des AHBA-Synthasegens zum Polyketidsynthasegen findet sich auch in dem möglichen Cluster von *K. putterlickiae*.

Es stellt sich die Frage, ob das Gencluster aus *K. putterlickiae* für die Biosynthese eines Ansamycins kodiert. Einen sicheren Beweis würden Geninaktivierungsexperimente dieses Clusters liefern. Schwierig ist allerdings, dass nicht bekannt ist, welche Sekundärstoffe der Stamm produziert. Daher kann nicht geprüft werden, ob ein bestimmter Sekundärstoff nicht mehr gebildet wird. Problematisch erscheint außerdem, dass der Stamm nur unter bestimmten Bedingungen sehr geringe Mengen an antibiotisch aktiven Substanzen produziert (s. 3.3 und 4.3). Ein Verlust dieser antibiotisch aktiven Sekundärstoffe bedeutet damit nicht notwendigerweise eine Inaktivierung des Genclusters. Die Aussage eines entsprechenden Experimentes ist also fraglich.

Dass das Gencluster aus *K. putterlickiae* mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Biosynthese eines Ansamycins kodiert, zeigt der Nachweis aller Gene, die für eine AHBA-Bildung essentiell sind. AHBA war bisher nie Biosyntheseendprodukt, so dass die Verstoffwechselung zu einem Ansamycin höchstwahrscheinlich auch in *K. putterlickiae* erfolgt. In dem Cluster von *K. putterlickiae* liegen die Gene der AHBA-Biosynthese in räumlicher Nähe zu einem Typ-I-Polyketidsynthasegen. Dieser Aufbau entspricht dem weiteren Ansamycin-Cluster (s. Abb. 4.6). Die Homologie des 5'-Endes des Polyketidsynthasegens von *K. putterlickiae* zur Ladedomäne der PKS von *A. pretiosum* deutet daraufhin, dass die PKS von *K. putterlickiae* mit der aromatischen Startereinheit (AHBA) beladen wird.

Eine heterologe Expression des Genclusters könnte den durch das Cluster kodierten Sekundärstoff von *K. putterlickiae* nachweisen und damit gleichzeitig die Funktion des Genclusters untersuchen. Der heterologe Wirtstamm, wie z.B. *S. lividans*, sollte kein Ansamycin produzieren. Dieser Wirtstamm würde mit einem Cosmid, das das Cluster aus *K. putterlickiae* trägt, transformiert, und die Gene sollten exprimiert werden. Voraussetzung für ein erfolgreiches Experiment wäre jedoch, dass das gesamte Cluster auf einem Cosmid lokalisiert ist, damit die Biosynthese nicht auf einer Zwischenstufe stehen bleibt. Vorteilhaft

wäre auch, wenn der gesuchte Sekundärstoff bereits bekannt ist. Eine Analytik für den entsprechenden Stoff aus einer Vielzahl von Sekundärstoffen des Wirtsstammes (u. a. Actinorhodin und Undecylprodigiosin in *S. lividans*) ließe sich dann einfacher entwickeln.

4.5 Biochemische Untersuchungen zur AHBA-Biosynthese

Die Biosynthese von Naturstoffen ist in die gesamte Organisation der Genexpression und in physiologische Abläufe eingebettet (*Gräfe, 1992*). Sind die genetischen Grundlagen der Produktbildung bekannt, können Fragen zur regulatorischen Kontrolle der Biosynthesewege leichter beantwortet werden.

Für den Aminoshikimatweg sind einige regulatorische Aspekte bereits bekannt. So wird die DAHP-Synthase von *A. mediterranei* durch Rifamycin inhibiert (*Gygax et al., 1982*). Auf der anderen Seite kann die AHBA-Synthase durch DAHP aktiviert werden (*Kim et al., 1998*). Dies lässt eine gegenseitige Regulierung („cross-regulation“) des Shikimat- und des Aminoshikimatweges vermuten.

Wie die ersten Schritte der AHBA-Bildung ablaufen, war bislang nicht vollständig geklärt. Insbesondere Anfangsschritte einer Biosynthese unterliegen oft regulatorischen Kontrollen. Der erste Schritt einer Biosynthese wird häufig durch das gebildete Produkt in einer Endproduktregulierung gehemmt. Untersuchungen zu den Anfangsschritten der AHBA-Biosynthese können dazu beitragen, die Ursache einer limitierten Sekundärstoffbildung, wie z.B. in *K. putterlickiae* F18-98 (s. 3.3) zu erkennen.

4.5.1 Die Anfangsschritte der AHBA-Biosynthese bis zur Bildung von 4-Amino-3,4-dideoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (aDAHP)

Beim Aminoshikimatweg ging man lange Zeit davon aus, dass eine bifunktionelle Glutamin-Amidohydrolase/ DAHP-Synthase das Zwischenprodukt 4-Amino-3,4-dideoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (aDAHP) bildet. Die modifizierte aDAHP-Synthase sollte Erythrose-4-phosphat (E4P) zu 1-Deoxy-1-imino-D-erythrose-4-phosphat (iminoE4P) umwandeln und das Imin mit PEP kondensieren (s. 1.2.1). Eine Inaktivierung der aDAHP-Synthase RifH in *A. mediterranei* führte zu einer verminderten Rifamycinproduktion. Die Mutation konnte jedoch zumindest zu einem geringen Teil durch die entsprechenden DAHP-Synthase des Shikimatwegs kompensiert werden (*Yu et al., 2001*). Weitere Mutationsversuche und die heterologe Expression der an der AHBA-Biosynthese beteiligten Enzyme von *A. mediterranei* (*Yu et al., 2001*) zeigten, dass neben der AHBA-Synthase RifK auch die Oxidoreduktase RifL, die Phosphatase RifM und die Kinase RifN für die Bildung von AHBA

essentiell waren. Für diese Enzyme sind keine entsprechenden Proteine des Shikimatwegs bekannt. Eine Beteiligung der drei Enzyme an der Bildung von aDAHP erschien wahrscheinlich.

Um nachzuweisen, dass 1-Deoxy-1-imino-D-erythrose-4-phosphat (iminoE4P) mit PEP zu aDAHP kondensiert, verfolgten *Guo und Frost (2002 a)* aufgrund der chemischen Instabilität von iminoE4P die Strategie, iminoE4P in situ zu bilden und im gleichen Reaktionsansatz enzymatisch umzusetzen. IminoE4P wurde dazu durch einen Transketolase-katalysierten Ketoltransfer von 3-Amino-3-deoxy-D-fructose-6-phosphat (aF6P) auf D-Ribose-5-phosphat (R5P) erzeugt (s. Abb. 4.7). Gebildetes iminoE4P wurde dann direkt mit PEP zu aDAHP kondensiert. Diese Reaktion wurde durch die aDAHP-Synthase (RifH) aus *A. mediterranei* katalysiert (*Guo und Frost, 2002 a*). Wurde anstelle der isolierten aDAHP-Synthase RifH ein zellfreier Extrakt von *A. mediterranei* verwendet, bei dem die RifH-Aktivität zuvor bestimmt wurde, wurden neben aDAHP als weitere Produkte AHBA sowie die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin nachgewiesen. Die aromatischen Aminosäuren wurden über den Shikimatweg gebildet, da iminoE4P in einer Nebenreaktion rasch zu E4P hydrolysiert wurde. E4P war dabei das Ausgangssubstrat der DAHP-Synthase des Shikimatwegs (s. Abb. 4.7). In einer Kontrollreaktion wurde eine Ketolgruppe von D-Fructose-6-phosphat (F6P) in einer Transketolase-Reaktion auf D-Ribose-5-phosphat übertragen. Es entstand E4P. Dieses Substrat wurde in einem zellfreien Extrakt von *A. mediterranei* mit Glutamin und Ammoniumsulfat inkubiert. Die in situ Produktion von E4P und die nachfolgende enzymatische Abfangreaktion wurden wie in der oben beschriebenen Nachweisreaktion in einem einzigen Ansatz durchgeführt. Bei der Kontrollreaktion wurde nur DAHP gebildet; aDAHP wurde nicht nachgewiesen. Eine Transaminierung von E4P zu imino-E4P konnte daher nicht stattgefunden haben. Durch diese Experimente konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der aDAHP-Synthase RifH um eine bifunktionelle Glutamin-Amidohydrolase/ DAHP-Synthase handelt (vgl. 1.2.1). Der Versuch zeigte eindeutig, dass die Aldehydfunktion von E4P keine Schiff'sche Base mit entstandenem Ammoniak ausbildet. Als Schlussfolgerung konnte weder aus Glutamin noch aus Ammoniumsulfat über eine Glutamin-Amidohydrolase katalysierte Reaktion Ammoniak produziert worden sein.

Wurde dagegen 3-[¹⁵N]-Amino-3-deoxy-D-6,6-[²H₂]-fructose-6-phosphat mit aF6P verdünnt und in den Inkubationsversuchen mit zellfreiem Extrakt aus *A. mediterranei* eingesetzt, konnte nach der Aufreinigung das entsprechende Markierungsmuster in aDAHP detektiert

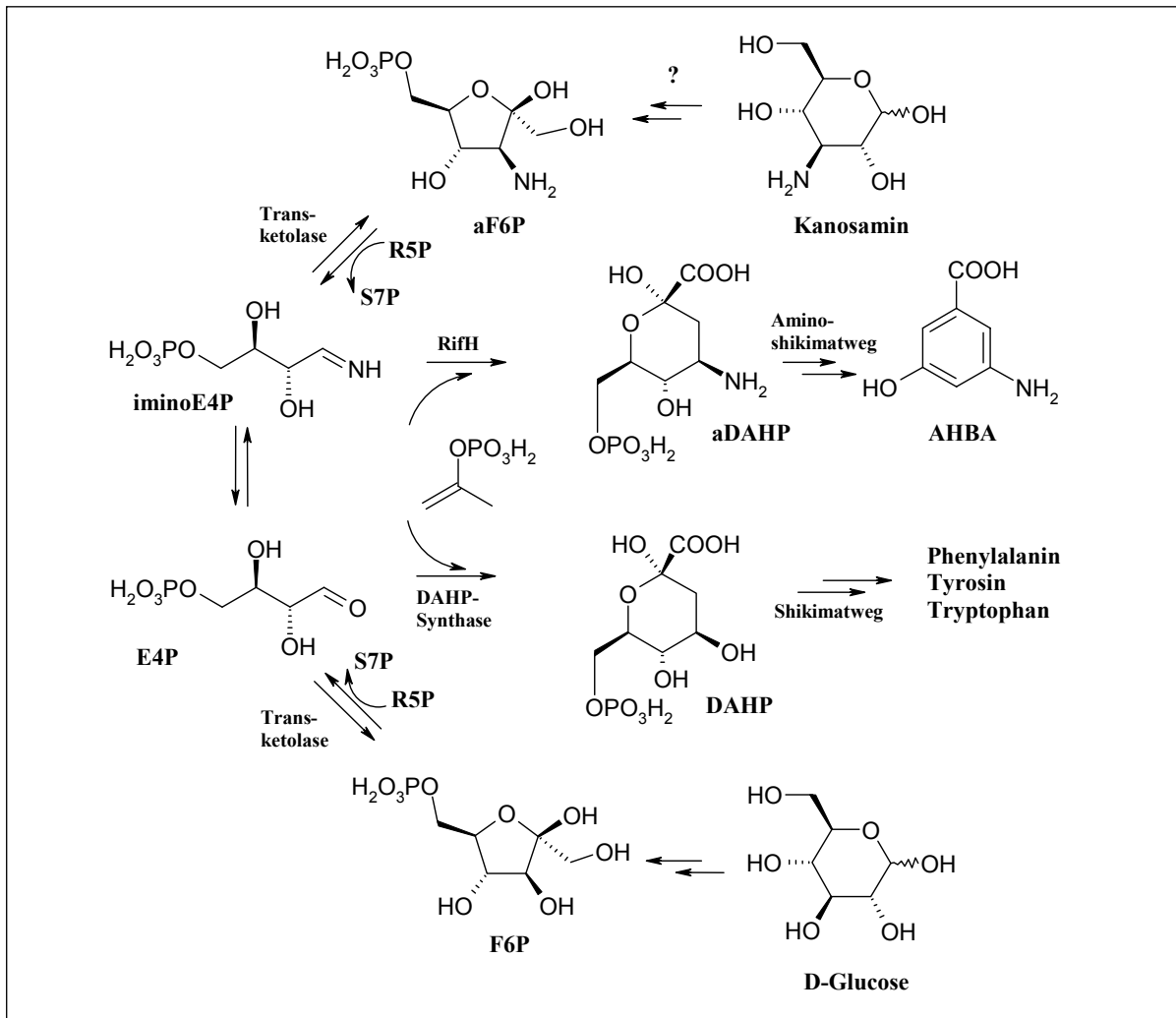


Abbildung 4.7 In situ Bildung von iminoE4P aus 3-Amino-3-deoxy-D-fructose-6-phosphat (aF6P) und Nachweis der enzymatischen Umsetzung von 1-Imino-1-deoxy-D-erythrose-4-phosphat (iminoE4P) zu 4-Amino-3,4-dideoxy-D-arabino-heptulose-7-phosphat (aDAHP) mit zellfreien Extrakten von *A. mediterranei* nach Guo und Frost (2002a). Als Kontrollreaktion folgte die Umsetzung von D-Fructose-6-phosphat (F6P) zu 3-Deoxy-D-arabino-heptulose-7-phosphat (DAHP) im zellfreien *A. mediterranei*-Extrakt. E4P: Erythrose-4-phosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; R5P: D-Ribose-5-phosphat; S7P: D-Sedoheptulose-7-phosphat; AHBA: 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure; RifH: aDAHP-Synthase aus *A. mediterranei*.

werden (Guo und Frost, 2002 a). 3-Amino-fructose-6-phosphat (aF6P) war damit eine Vorstufe der AHBA-Biosynthese.

3-Amino-3-deoxy-D-glucose (synonym Kanosamin) könnte nach einer Phosphorylierung und Isomerisierung zu Aminofructose-6-phosphat umgewandelt werden. In vielen Mikroorganismen wurde Kanosamin als biosynthetisches Endprodukt mit antibakterieller Aktivität nachgewiesen (Umezawa et al., 1967 a/ b; Dolak et al., 1980; Tsuno et al., 1986; Fusetani et al., 1987; Milner et al., 1996). Kanosamin ist auch ein Bestandteil des Aminoglykosid-Antibiotikums Kanamycin, das von *Streptomyces kanamyceticus* produziert wird (Umezawa et al., 1957). Ende der 60er Jahre wurden Untersuchungen zur Biosynthese von Kanosamin in *Bacillus pumilus* (früher *B. aminoglucosidicus*) durchgeführt (Umezawa et

al., 1968). In Fütterungsexperimenten wurde [U-¹⁴C]-Glucose mit ATP, UTP, Glutamin, MgSO₄ und NAD in einem zellfreien Extrakt von *B. pumilus* inkubiert. Bei der Reaktion wurde radioaktiv markiertes Kanosamin gebildet. Der Einfluss der verschiedenen Cofaktoren auf die Biosynthese wurde geprüft. Für eine maximale Ausbeute an radioaktiv markiertem Kanosamin war die Zugabe von ATP und UTP notwendig. Wurde UTP durch GTP oder CTP ersetzt, war die Bildung des Aminozuckers um mehr als ein Drittel reduziert. Dieses Ergebnis wurde durch die Umsetzung von UDP-[U-¹⁴C]-Glucose, Glutamin und NAD in einem zellfreiem *B. pumilus*-Extrakt zu radioaktiv markiertem Kanosamin bestätigt (*Umezawa et al.*, 1968). Aus den Experimenten postulierten *Umezawa et al.* (1968) einen Biosyntheseweg zur Bildung von Kanosamin. Dabei wurde davon ausgegangen, dass UDP-Glucose an der 3-Position zu UDP-3-Keto-D-glucose unter Reduktion von NAD oxidiert wird. Für den nächsten Schritt wurde eine Aminierung von UDP-3-Keto-D-glucose zu UDP-3-Amino-3-deoxy-D-glucose vorgeschlagen. Durch die Abspaltung des Uridindiphosphats sollte Kanosamin enthalten werden. Interessanterweise entspricht dieses Biosyntheschema den ersten Schritten der inzwischen neu postulierten AHBA-Biosynthese (vgl. 1.2.1, Abb. 1.4).

Dementsprechend überprüften *Guo und Frost* (2002 b), ob die Inkubation von deuterierter UDP-Glucose, NAD und Glutamin in zellfreien Extrakten von *A. mediterranei* ebenfalls zur Bildung von Kanosamin führt. Deuteriertes Kanosamin wurde in diesem Reaktionsansatz gebildet. Die Inkubation von UDP-Glucose mit ATP, D-Ribose-5-phosphat und PEP in zellfreiem *A. mediterranei*-Lysat erbrachte allerdings keine detektierbaren Mengen an aDAHP oder DAHP. Die Autoren führten dies auf eine mögliche geringe Aktivität der Aminoglucokinase in den lysierten Zellen von *A. mediterranei* zurück, die die Phosphorylierung von Kanosamin zu Kanosamin-6-phosphat katalysieren soll (*Guo und Frost*, 2002 b).

Für die heterolog exprimierte Kinase RifN aus *A. mediterranei* konnte nachgewiesen werden, dass dieses Enzym die Phosphorylierung von Kanosamin zu Kanosamin-6-phosphat katalysiert. Kanosamin wurde unter Zusatz von ATP durch die Kinase RifN umgesetzt. Weitere Zucker wie z.B. Glucose und Zuckerderivate wie z.B. 3-Amino-3-deoxy-D-fructose waren keine Substrate für die Kinase RifN (*Arakawa et al.*, 2002).

Die Anfänge der AHBA-Biosynthese (s. Abb. 1.4) waren damit bereits in einigen einzelnen Schritten untersucht. Die ersten Reaktionsschritte bis zur Bildung von Kanosamin, für die eine Beteiligung der Oxidoreduktase RifL, der AHBA-Synthase (Aminotransferase) RifK und der Phosphatase RifM postuliert wurde, wurden in dieser Arbeit enzymatisch untersucht.

4.5.2 Zur Interaktion von Oxidoreduktase, Aminotransferase und Phosphatase

Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten der AHBA-Synthase (Aminotransferase), Oxidoreduktase und der Phosphatase aus *A. mediterranei* wurden die Proteine zunächst in *E. coli* coexprimiert. Die Coexpression der AHBA-Synthase RifK mit der Oxidoreduktase RifL aus *A. mediterranei* in *E. coli* zeigte eine Interaktion der beiden Proteine (K. Arakawa, persönliche Mitteilung; s. a. 3.5.1.2).

Die Interaktion wurde entdeckt, da die AHBA-Synthase an das Poly-Histidin-Fusionsprotein der Oxidoreduktase gebunden hatte und bei der Affinitätschromatographie mit diesem eluiert wurde. Das Fusionsprotein agierte dabei als „Köder“. Eine ähnliche Methode zur Bestimmung von Interaktionen zwischen Proteinen ist die Affinitätsreinigung von Proteinen, die an GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteine binden („GST pulldown“; Ausubel *et al.*, 1999). Ein zu untersuchendes Protein wird bei dieser Methode mit [³⁵S]-Methionin markiert. Besitzt das markierte Protein eine Affinität zu einem zweiten Protein mit einem GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsanteil, bildet sich zwischen den beiden Proteinen während einer Inkubation ein Enzymkomplex, der bei der Affinitätschromatographie gemeinsam eluiert wird. Bei der Verwendung einer solchen Methode ist das Ergebnis durch die Anzahl der coexprimierten Proteine limitiert. Dementsprechend konnte bei der Coexpression der AHBA-Synthase RifK und der Oxidoreduktase RifL aus *A. mediterranei* nur eine Aussage zur Interaktion dieser zwei Proteine getroffen werden.

Durch die Coexpression der AHBA-Synthase RifK, der Oxidoreduktase RifL als Poly-Histidin-Fusionsprotein und der Phosphatase RifM aus *A. mediterranei* in *E. coli* sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit auch die Phosphatase RifM an der Ausbildung eines Enzymkomplexes beteiligt ist (s. 3.5.1.2). Zugleich wurde versucht, die Enzymaktivität der Oxidoreduktase durch die Coexpression der drei Proteine zu steigern. Nach der Reinigung über die Nickel-Affinitätschromatographie wurden im Eluat die Proteinbanden für die AHBA-Synthase und die Oxidoreduktase detektiert. Es zeigte sich nur eine sehr schwache Proteinbande, die der Phosphatase RifM entsprach (s. 3.5.1.2). Da die Affinität der Oxidoreduktase 6xHis-RifL zur Nickel-Nitriloacetat-Agarose nur recht schwach ausgeprägt war (K. Arakawa, persönliche Mitteilung), wurde abweichend von den sonst üblichen Bedingungen (s. 2.6.3.4) bei der Affinitätschromatographie nur mit Imidazolkonzentrationen bis zu 5 mM (laut Protokoll sonst 20 mM) gewaschen. Höhere Imidazolkonzentrationen hätten sonst zur frühzeitigen Verdrängung der Oxidoreduktase aus der Bindung der Nickelmatrix geführt. Dementsprechend war es allerdings schwieriger, unspezifisch bindende Proteine abzutrennen. Da bei der Aufreinigung der drei coexprimierten Proteine die

Phosphatase RifM nur sehr schwach im Eluat sichtbar war, dieses Protein aber sonst sehr gut exprimiert wurde, war nach der Coexpression von RifK, RifL und RifM in *E. coli* nicht eindeutig festzulegen, ob die drei Enzyme interagieren. Die Enzymaktivität der Oxidoreduktase konnte nach dieser Coexpression nicht gesteigert werden. Die Arbeiten zur Funktionalität der Oxidoreduktase aus *A. mediterranei* zeigten deutlich, dass es in *E. coli* nicht möglich war, aktive Enzyme zu erhalten, obwohl unterschiedliche Bedingungen bei der Anzucht und der Aufreinigung verwendet wurden (s. 3.5.1.2). Die Verwendung unterschiedlicher Expressionsplasmide und die Expression in verschiedenen *E. coli*-Stämmen brachten keine Vorteile.

Die Aktivität der Oxidoreduktase RifL wurde daraufhin im zellfreien Rohextrakt aus *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) bestimmt (s. 3.5.2.3). Dazu wurden die acht Gene, die für die Enzyme der AHBA-Biosynthese kodieren (Plasmid pHGF7604, s. 3.5.2.2), in *S. lividans* TK24 coexprimiert. Nach der heterologen Expression der Plasmidderivate pHGF7607 (Deletion der Oxidoreduktase) und pHGF7608 (Deletion der Phosphatase) von Plasmid pHGF7604 in *S. lividans* wurde bei der Aktivitätsbestimmung keine Absorptionsänderung bei 340 nm gemessen (s. 3.5.2.4). Die Oxidoreduktase RifL konnte durch die Deletion großer Bereiche des Gens die Oxidation der UDP-Glucose an der 3-Position nicht mehr katalysieren. Dieser Versuch bestätigte damit die enzymatischen Untersuchungen. Wurde das Phosphatasegen aus der Genkassette deletiert, war auch die Oxidoreduktase nicht mehr aktiv (s. 3.5.2.4). Damit wurde eine gemeinsame Rolle für die Oxidoreduktase und die Phosphatase bestätigt. Die AHBA-Synthase, die Oxidoreduktase und die Phosphatase bilden vermutlich einen gemeinsamen Enzymkomplex, der die Umsetzung von UDP-Glucose zu UDP-Kanosamin erst ermöglicht.

Hinweise auf eine mögliche Interaktion der drei Proteine ergab bereits eine Sequenzanalyse. Bei einem Vergleich der bekannten Ansamycin-Gencluster (s. a. Abb. 4.6) fällt auf, dass die Gene für die AHBA-Synthase, die Oxidoreduktase und die Phosphatase in allen Clustern stets hintereinander liegen. Die Reihenfolge aller weiteren Gene ist in den verschiedenen Biosyntheseclustern nicht konserviert. *Dandekar et al. (1998)* vermuteten, dass die Proteine, die von konservierten Genpaaren kodiert werden, funktionell interagieren. So ist z.B. die Genanordnung im Tryptophan-Operon in den unterschiedlichen Genomen nicht konserviert. Die Ausnahme bildet das Genpaar *trpB* und *trpA*. Die Gene kodieren für die zwei Untereinheiten der Tryptophansynthase, die eine einzige Reaktion katalysiert (*Dandekar et al., 1998*). Die Transkription der konservierten Genpaare erfolgt meist einheitlich in eine

Richtung (*Dandekar et al., 1998*). Bei den bisherigen Clustern folgen das Oxidoreduktase- und das Phosphatasegen in der gleichen Transkriptionsrichtung auf das AHBA-Synthasegen. Da beim Ansamycin-Cluster in *A. mediterranei* stromabwärts des AHBA-Synthasegens keine Promotor- oder Terminationssequenzen vorhanden sind, verläuft die Transkription der AHBA-Synthase und der Oxidoreduktase gekoppelt. Die Translation kann in *A. mediterranei* möglicherweise unabhängig ablaufen, da eine eindeutige ribosomale Bindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) stromaufwärts des Oxidoreduktasegens gefunden wurde. Im Gegensatz dazu ist in *S. collinus* auch die Translation gekoppelt. Vor dem Oxidoreduktasegen wurde im Ansatrienin- als auch im Naphthomycin-Cluster keine Ribosomenbindestelle gefunden (*von Bamberg, 1999*). Bei *K. putterlickiae* könnte eine mögliche ribosomale Bindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz GAACG) in den Positionen von -10 bis -6 vor dem Start-Codon der Oxidoreduktase liegen (vgl. *Strohl et al., 1992*). Terminations- oder Promotorsequenzen zwischen dem AHBA-Synthasegen und dem Oxidoreduktasegen von *K. putterlickiae* fehlen. Damit findet bei *K. putterlickiae* die Transkription der beiden Gene vermutlich gekoppelt statt. Die Translation kann vermutlich unabhängig voneinander verlaufen. Die Versuche zur Enzymaktivität (s. 3.5.1.2 und 3.5.2.3) zeigen jedoch deutlich, dass nur eine gemeinsame Genexpression zu aktiven und löslichen Enzyme führt. Daher scheint auch die Translation gekoppelt zu sein. Die gemeinsame Translation ist vermutlich für eine korrekte Faltung der Proteine notwendig, um einen funktionsfähigen Enzymkomplex ausbilden zu können.

Im Gegensatz zum Rifamycin-Gencluster in *A. mediterranei*, in dem sich das Oxidoreduktasegen *rifL* und das Phosphatasegen *rifM* direkt anschließen, findet sich in *A. pretiosum* eine Intergenregion von 280 bp zwischen den Genen der Oxidoreduktase und der Phosphatase. Auch bei *K. putterlickiae* trennt eine Intergenregion von 166 bp diese beiden Gene. Obwohl der DNA-Abschnitt eindeutig in den nicht-kodierenden Bereich gehört (vgl. „FramePlot“ Analyse, s. Anhang), ist der GC-Gehalt so hoch wie in den kodierenden Abschnitten. Die Intergenregion von 280 bp in *A. pretiosum* besitzt ebenfalls einen überdurchschnittlich hohen GC-Gehalt. Dies lässt vermuten, dass es sich bei der Intergenregion nicht um einen Promotor handelt (*Hoffmann, 1997*).

Interessant erscheint, dass im Ansamitocin-Gencluster in *A. pretiosum* zwei AHBA-Synthasegene vorkommen. Das AHBA-Synthasegen *asm43* ist im Gegensatz zum AHBA-Synthasegen *asm24* mit den Genen, die für die Oxidoreduktase und die Phosphatase kodieren, assoziiert (vgl. Abb. 4.6). In allen anderen bisher bekannten Ansamycin-Biosyntheseclustern wurde nur ein AHBA-Synthasegen gefunden. Obwohl beide AHBA-Synthasen von *A. pretiosum* die Aromatisierung von aDHS zu AHBA katalysieren, könnten beide Enzyme für

unterschiedliche Reaktionen optimiert sein (*Yu et al., 2002*). Die AHBA-Synthase Asm24 wäre eher als Dehydratase im letzten Biosyntheseschritt aktiv. Im Gegensatz dazu könnte die AHBA-Synthase Asm43 als Aminotransferase für die Einführung des Stickstoffs im zweiten Schritt der AHBA-Biosynthese optimiert sein. Diese Vermutung beruht auf der möglichen funktionellen Interaktion konservierter Genpaare (*Dandekar et al., 1998*). Da die Lage des AHBA-Synthasegens (asm43), des Oxidoreduktasegens (asm44) und des Phosphatasegens (asm45) wie in den weiteren Ansamycin-Biosyntheseclustern konserviert ist (Cluster II, vgl. Abb. 4.6), ist für diese Genprodukte eine funktionelle Interaktion eher zu erwarten als zwischen der AHBA-Synthase Asm24, der Oxidoreduktase und der Phosphatase.

Bislang ist über die Art des möglichen Enzymkomplexes zwischen der AHBA-Synthase, der Oxidoreduktase und der Phosphatase nichts bekannt. Die Enzyme könnten sowohl zu einem Multienzymkomplex gehören oder nur transient einen Enzymkomplex ausbilden. Die bisherigen Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass eine Interaktion der drei Proteine für die Katalysierung der ersten Biosyntheseschritte notwendig ist. Im letzten Reaktionsschritt der AHBA-Biosynthese liegt die AHBA-Synthase als Homodimer vor und ist in dieser Form als Dehydratase aktiv. Ob diese Dimerstruktur auch in dem Enzymkomplex, der die ersten Schritte der Biosynthese katalysiert, enthalten ist, ist noch nicht untersucht. Es ist wahrscheinlich, dass u. a. strukturelle Unterschiede bestimmen, welche Reaktion die AHBA-Synthase katalysiert.

4.5.3 Heterologe Expression von pHGF7604 in *S. lividans* und Charakterisierung der exprimierten Proteine - eine enzymatische Betrachtung der ersten Reaktionsschritte der AHBA-Biosynthese

Die Aktivität der Oxidoreduktase wurde im zellfreien Lysat aus *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) ermittelt (s. 3.5.2.3). Obwohl die acht Gene des Plasmids pHGF7604 in *S. lividans* nur konstitutiv exprimiert wurden (eine Überexpression war mit diesem Plasmid nicht möglich, da ein induzierbarer Promotor fehlte), konnten im Rohextrakt reproduzierbare Aktivitäten gemessen werden. Die Oxidoreduktase RifL oxidiert UDP-Glucose an der 3-Hydroxylgruppe zu 3-Keto-3-deoxy-UDP-glucose. Weitere Zuckernukleotide und Substrate wie D-Fructose, D-Glucose sowie α - oder β -D-Glucose-1-phosphat wurden nicht umgesetzt. UDP-Glucose ist damit spezifisches Substrat der Oxidoreduktase. Dies ist für den bakteriellen Sekundärstoffwechsel eher ungewöhnlich. Für die Biosynthese von Desoxyzuckern und Aminoszuckern, die z. T. strukturelle Bestandteile von Antibiotika wie Erythromycin oder

Daunorubicin sind, verwenden die Bakterien meist TDP-Glucose (Liu und Thorson, 1994). Das Bakterium *Yersinia pseudotuberculosis* verwendet CDP-Glucose als Substrat für die Biosynthese von CDP-Ascarylose, einer 3,6-Dideoxyhexose (Liu und Thorson, 1994). Nukleotidzucker sind im Primärstoffwechsel Substrate für die Polymerisation von Monosacchariden zu Disacchariden und Glycogen. Bakterien speichern Kohlenhydrate wie tierische Organismen in Form von Glycogen. Bakterien nutzen als aktivierte Form der Glucose allerdings ADP-Glucose anstatt UDP-Glucose, die von tierischen Organismen verwendet wird (Nelson und Cox, 2001).

Bei der Sequenzanalyse der Oxidoreduktasen (s. 4.4.2) konnte ein hochkonserviertes Glycinreiches N-terminales Faltungsmotiv, das die NAD-bindende $\beta\alpha\beta$ -Rossmannfalte repräsentiert (Rossmann et al., 1975; Wierenga et al., 1986), nachgewiesen werden. Demnach sollten die Oxidoreduktasen NAD^+ als Cofaktor nutzen. Der enzymatische Aktivitätsnachweis bestätigte diese Vermutung. Wurde NADP^+ anstelle von NAD^+ in die Reaktionsansätze gegeben, fand keine enzymatische Umsetzung statt. Die Oxidoreduktase benötigt damit spezifisch NAD^+ als Reduktionsäquivalent.

Die kinetischen Konstanten nach Michaelis und Menten wurden mit 40 μg Protein des zellfreien Extraktes von *S. lividans* TK24/ (pHGF7604) bestimmt. Der K_M -Wert der Oxidoreduktase von 2,91 mM zeigt an, dass die Affinität des Enzyms zum Substrat unter den gewählten Bedingungen relativ gering ist (Stryer, 1996), da sich der Wert im millimolaren Bereich bewegt. Diese Substratkonzentration wird physikalisch in den Bakterien wahrscheinlich nie erreicht. Es erscheint aber durchaus möglich, dass die Oxidoreduktase des Aminoshikimatwegs physiologisch nie in Substratsättigung arbeitet. Substrate des Primärstoffwechsels würden damit nur langsam dem Sekundärstoffwechsel der Bakterien zugeführt.

K_M -Werte für weitere Oxidoreduktasen aus anderen Ansamycin-Clustern sind bislang nicht bekannt. Die Oxidoreduktase Pur10 des Puromycin-Clusters besitzt eine hohe Ähnlichkeit zur Oxidoreduktase RifL (s. 4.4.2). Der K_M -Wert für das als Poly-Histidin-Fusionsprotein exprimierte Enzym Pur10 beträgt 0,49 mM für das Substrat ATP, das zu 3'-Keto-3'-deoxyATP oxidiert wird (Rubio et al., 1998). Die Affinität des Enzyms Pur10 zum Substrat ATP ist damit viel höher. Könnte die Aktivität der Oxidoreduktase RifL ebenfalls nach einer Überexpression und Aufreinigung bestimmt werden, wären eventuell höhere K_M -Werte als im zellfreien Rohextrakt möglich. Die Klonierung eines entsprechenden Expressionskonstruktes in *S. lividans* ist bis jetzt noch nicht gelungen (s. 3.5.2.1). Ursache dafür könnte die

aufwendige Klonierungsstrategie sein, bei der am Ende durch eine Partialhydrolyse das gewünschte Fragment von *rifK*, *rifL* und *rifM* erhalten werden soll. Dieses wurde dann in einen Vektor zur Überexpression in Streptomyceten (pIJ4123) eingebracht. Da sich der Vektor pIJ4123 nicht in *E. coli* vermehren lässt, erfolgte direkt eine Protoplastentransformation von *S. lividans*. Kritisch bei der Protoplastentransformation ist u. a. die DNA-Konzentration, die in die Protoplasten eingeführt werden soll. Durch die Partialhydrolyse war es bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch evt. nicht möglich, ausreichend hohe DNA-Konzentration für die Protoplastierung zu erhalten.

Der Einfluss verschiedener Stickstoffdonatoren auf die Enzymaktivität der Oxidoreduktase wurde geprüft. Die deutlichste Steigerung der Enzymaktivität wurde bei der Zugabe von Asparagin beobachtet. Aspartat steigerte die Enzymaktivität in geringerem Ausmaß. Die Zugabe von Glutamin, Glutamat oder Ammoniumchlorid zeigte keine Änderung der Enzymaktivität der Oxidoreduktase. Die Aktivität entsprach der Aktivität, die ohne Stickstoffdonor gemessen wurden.

Durch die Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die enzymatischen Umsetzungen der Oxidoreduktase und der AHBA-Synthase eng miteinander gekoppelt sind. Indirekt wurde durch diese Experimente gezeigt, dass die AHBA-Synthase eine zweite Funktion als Aminotransferase einnimmt. Außergewöhnlich erscheint, dass die AHBA-Synthase den zweiten und den letzten Reaktionsschritt der AHBA-Bildung katalysiert. Bifunktionelle Enzyme wie die GMP-Synthetase oder die Asparaginsynthetase enthalten meist zwei Domänen, die zwei verschiedene Teilreaktionen einer Gesamtreaktion katalysieren. So ist z.B. die N-terminale Region der Asparaginsynthetase, einer Glutamin-Amidotransferase, für die Hydrolyse von Glutamin verantwortlich. Das C-terminale Motiv des Enzyms bildet die Bindungstasche für ATP und Aspartat. In diesem Bereich der Asparaginsynthetase reagiert das Aspartyl-Intermediat dann mit NH_3 zu Asparagin (Huang *et al.*, 2001). Die AHBA-Synthase benötigt in ihrer Funktion als Dehydratase als auch als Aminotransferase den Cofaktor PLP, der durch die Aminosäure Lysin188 (s. 4.4.1) kovalent mit dem Enzym verbunden ist. Damit katalysiert die AHBA-Synthase im Gegensatz zu den oben beschriebenen bifunktionellen Enzymen vermutlich beide Reaktionen in ihrem aktiven Zentrum. Welche Aminosäuren bestimmen, ob es sich um eine Aminotransferase oder um eine Dehydratase handelt, wurde bereits unter 4.4.1 diskutiert. Die AHBA-Synthase von *A. mediterranei* besitzt wie Transaminasen in Position 162 ein konserviertes Histidinmolekül. Dehydratasen haben an der Stelle eine saure Aminosäure (Kim *et al.*, 1998; Thorson *et al.*,

1993; Pascarella und Bossa, 1994). Ob die Aminosäure Histidin162 einen Einfluss darauf hat, dass die AHBA-Synthase auch als Transaminase aktiv ist, könnte durch eine gerichtete Mutation („site-directed mutagenesis“) an Position 162 geprüft werden. Die Aminosäure Histidin wäre gegen andere Aminosäure auszutauschen und die Aktivität des modifizierten Enzyms als Aminotransferase zu untersuchen.

Asparagin wurde als Substrat von der Aminotransferase am besten umgesetzt. Ob dabei der Amin- oder der Amidstickstoff des Asparagins übertragen wurde, müsste durch ¹⁵N-Markierungen der verschiedenen Stickstoffe des Substrates geprüft werden. Asparagin als Substrat einer Aminotransferase ist sehr ungewöhnlich. Es sind bisher nur drei Aminotransferasen, die den Amidstickstoff von Glutamin übertragen, bekannt: Die Aktivität der L-Glutamin:Scyllo-inosose Aminotransferase des Streptomycin-Produzenten *S. griseus*, wurde getestet (Ahlert, et al., 1997). Des Weiteren wurde eine L-Glutamin:2-Deoxy-scyllo-inosose Aminotransferase, die für die Biosynthese von Butirosin in *Bacillus circulans* benötigt wird, identifiziert (Tamegai et al., 2002). Bei Pflanzen und Bakterien überträgt die Glutamin:2-Oxoglutarat Aminotransferase (GOGAT, synonym: Glutamat-Synthase) die Amidogruppe von Glutamin auf 2-Oxoglutarat. Es entsteht Glutamat (Nelson und Cox, 2001). Im Gegensatz zu den anderen bekannten Aminotransferase katalysierten Reaktionen handelt es um eine irreversible reduktive Aminierung. In Chloroplasten ist reduziertes Ferredoxin der Elektronendonator, in nichtgrünen Zellen NADH + H⁺. Der Cofaktor PLP fehlt. Damit unterscheidet sich die GOGAT erheblich von den PLP-abhängigen Aminotransferasen.

Nach Untersuchungen durch Jiao et al. (1984) sollte der Amidstickstoff von Glutamin in Rifamycin eingebaut werden. Dies widerspricht den Ergebnissen in dieser Arbeit. Jiao et al. (1984) verglichen zunächst nur Glutamin, Glutamat und Ammoniumsulfat miteinander und prüften den Effekt auf die Rifamycinproduktion. In weiteren Versuchen wurde der Effekt des Inhibitors der Glutamin-Synthetase DON auf die Rifamycinbildung untersucht. In Inkubationen mit Asparagin, Glutamin, Glutamat bzw. Aspartat wurde der Inhibitor DON zugefügt. In Kontrollen wurden die Aminosäuren ohne den Hemmstoff inkubiert. Dabei zeigte sich, dass Asparagin die Rifamycinbiosynthese erheblich steigerte, diese aber auch zu über 97 % durch DON gehemmt wurde. Wurden dagegen Glutamin und DON in einem Ansatz inkubiert, war die Rifamycinbildung unbeeinflusst. Jiao et al. (1984) interpretierten dieses Ergebnis damit, dass Asparagin kein direkter Stickstoffdonor sei, sondern zuvor zu Glutamin umgewandelt werden müsse. In welchem Ausmaß Asparagin im Vergleich zu Glutamin die Rifamycinproduktion steigerte, ist aus den Angaben leider nicht zu entnehmen, da die Autoren unterschiedliche Einheiten und Bezugsgrößen verwendeten. Die Beobachtung,

dass Asparagin als Stickstoffdonor eine wichtige Rolle in der Rifamycinbiosynthese spielt, passt allerdings zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen. Im Einzelnen müsste der Reaktionsmechanismus an der überexprimierten AHBA-Synthase, ggf. auch im Komplex mit der Oxidoreduktase und der Phosphatase untersucht werden. Da bisher zu wenig über die Aminotransferasereaktion bekannt war und das Substrat der AHBA-Synthase, 3-Keto-3-deoxy-UDP-Glucose, chemisch instabil ist, war es schwierig ein geeignetes enzymatisches Testsystem zu finden.

Die Aktivitätssteigerung der Oxidoreduktase bei der Zugabe des Stickstoffdonors Asparagin könnte in zwei unterschiedlichen Ansätzen erklärt werden. Zum einen wird das Produkt der Oxidoreduktase durch die Transaminierung dem chemischen Gleichgewicht der Reaktion entzogen. Als Folge wird weiteres Substrat (UDP-Glucose) oxidiert. Da eine Interaktion der Oxidoreduktase und der AHBA-Synthase gezeigt werden konnte, könnte zum anderen eine Kanalisierung der Zwischenprodukte stattfinden. Eine Kanalisierung von Zwischenprodukten kann bei Multienzymkomplexen als auch multifunktionellen Enzymen auftreten (*Huang et al., 2001*). Der Vorteil der Kanalisierung gegenüber einer freien Diffusion der Reaktionsprodukte besteht in einer verkürzten Transitzeit der Produkte von einem aktiven Zentrum zum nächsten. Chemisch labile Zwischenprodukte können dadurch vor Zersetzungsreaktionen geschützt werden. Außerdem kann durch die Kanalisierung ein chemisches Gleichgewicht einer Reaktion verschoben werden (*Huang et al., 2001*). Beispiele für die Kanalisierung von Zwischenprodukten wurden durch die Methode der Röntgenstrukturanalyse verstärkt untersucht. Bei der Tryptophansynthase, die die letzten zwei Reaktionen der Tryptophanbiosynthese katalysiert, gelangt das Zwischenprodukt Indol durch einen hydrophoben Tunnel vom aktiven Zentrum der α -Untereinheit zum aktiven Zentrum der β -Untereinheit. Beide Untereinheiten beeinflussen sich dabei gegenseitig in einer „allosterischen Kommunikation“, um eine effiziente katalytische Umsetzung zu gewährleisten (*Huang et al., 2001*).

Das Produkt der Oxidoreduktase, 3-Keto-3-deoxy-UDP-Glucose, ist chemisch labil. Eine Kanalisierung dieses Produktes zum aktiven Zentrum der AHBA-Synthase könnte dieses Intermediat vor einer Zersetzungsreaktion bewahren. Die katalytische Aktivität würde gesteigert. Für einen Enzymkomplex wie den aus der Oxidoreduktase, der AHBA-Synthase und vermutlich der Phosphatase ist eine koordinierte Regulation der Enzymaktivitäten eine wichtige Voraussetzung. Das Modell einer „allosterischen Kommunikation“ könnte auch für diese Enzyme gelten. Ein solcher Mechanismus müsste im Einzelnen untersucht werden.

4.5.4 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Die Anfangsschritte der AHBA-Biosynthese verlaufen nach einem weitaus komplizierteren Biosyntheseweg als bisher angenommen. An der enzymatischen Umsetzung ist vermutlich ein Enzymkomplex aus Oxidoreduktase, AHBA-Synthase und Phosphatase beteiligt. Die AHBA-Synthase katalysiert den zweiten Schritt der Biosynthese als Aminotransferase. In einer zweiten Funktion als Dehydratase setzt die AHBA-Synthase aDHS zu AHBA im letzten Schritt des Biosyntheseweges um. Es dürfte spannend sein, festzustellen, wann die AHBA-Synthase als Aminotransferase und wann als Dehydratase arbeitet. Die Regulation der Enzymaktivität ist vermutlich eng mit der Regulation des AHBA-Biosynthesewegs verknüpft. Eventuell kann die AHBA-Synthase sogar nur dann als Aminotransferase katalytisch tätig sein, wenn eine Interaktion mit der Oxidoreduktase auftritt. Die Biosynthese der AHBA als Vorstufe vieler Antibiotika findet damit nur statt, wenn verschiedene Enzyme miteinander interagieren und koordiniert zusammenarbeiten.

Zukünftige Arbeiten, die zu einem erweiterten Verständnis der ersten Schritte der AHBA-Biosynthese führen, sind aufgeführt:

- Nach der Umsetzung von UDP-Glucose im zellfreien Extrakt von *S. lividans*/ (pHGF7604) sind die Reaktionsprodukte der AHBA-Synthase und der Oxidoreduktase, UDP-Kanosamin und Kanosamin, analytisch nachzuweisen. Das Reaktionsprodukt der Oxidoreduktase, 3-Keto-3-deoxy-UDP-Glucose, lässt sich vermutlich aufgrund seiner chemischen Instabilität nicht isolieren.
- Ein Derivat des Plasmids pHGF7604, in dem die AHBA-Synthase deletiert wurde, ist bislang nicht erzeugt worden. Die Expression einer solchen Deletionsmutante der AHBA-Synthase in *S. lividans* und eine nachfolgende enzymatische Aktivitätsbestimmung würde den Einfluss der AHBA-Synthase für den zweiten Reaktionsschritt weiter bestätigen. Es ist zu vermuten, dass bei einer Deletion der AHBA-Synthase die Komplexbildung mit der Oxidoreduktase verhindert wird. Wenn dieser Enzymkomplex für die Aktivierung der Oxidoreduktase notwendig ist, könnte eine enzymatische Umsetzung der UDP-Glucose nicht stattfinden.
- Die Überexpression der Oxidoreduktase, der AHBA-Synthase und der Phosphatase aus *A. mediterranei* in *S. lividans* ist bisher nicht gelungen. Vielleicht könnte ein Wechsel des Systems (anstelle der Klonierung der Gene von *A. mediterranei*, z.B. die Klonierung von *A. pretiosum*-Genen) helfen, spezielle Schwierigkeiten u. a. bei der Wahl der Restriktionsenzyme zu vermeiden. Würde ein Protein als Poly-Histidin-Fusionsprotein exprimiert, könnte mit Hilfe der Affinitätschromatographie ggf. der gesamte

Enzymkomplex gereinigt werden. Die Aktivitätsbestimmung gereinigter Proteine ermöglicht eine wesentlich genauere Charakterisierung der Enzyme.

- Untersuchungen zum Zusammenspiel der Oxidoreduktase, der AHBA-Synthase und der Phosphatase können genauere Aufschlüsse über die Bildung eines Enzymkomplexes liefern. Die Komplexbildung der Oxidoreduktase mit der AHBA-Synthase könnte z.B. durch einen gerichteten Austausch einzelner Aminosäuren der AHBA-Synthase („site-directed mutagenesis“) untersucht werden. Die mutierte AHBA-Synthase würde dann mit der Oxidoreduktase coexprimiert, und es würde geprüft, ob weiterhin ein Komplex zwischen beiden Enzymen gebildet wird. Umgekehrt ließe sich auch die Oxidoreduktase durch eine „site-directed mutagenesis“ modifizieren und könnte dann mit der AHBA-Synthase coexprimiert werden.

Bei den Untersuchungen zum biogenetischen Ursprung der Maytansinoide in Höheren Pflanzen wurde bisher die AHBA-Synthase als ein Schlüsselenzym der Ansamycinbiosynthese in den Mittelpunkt gerückt. Das Gen der AHBA-Synthase wurde sowohl in pflanzlichen Zellen von *P. verrucosa* als auch in Mikroorganismen, die mit Maytansin führenden Pflanzen vergesellschaftet sind, gesucht. Die neueren Erkenntnisse zur Rolle der AHBA-Synthase als bifunktionellem Enzym könnten zu einer neuen Diskussion über die AHBA-Synthase als „Screening-Target“ führen.

Da die AHBA-Synthase vermutlich an der Biosynthese von Kanosamin beteiligt ist, stellt sich die Frage, ob dieses Enzym auch in Mikroorganismen vorkommt, die Kanosamin als biosynthetisches Endprodukt bilden, wie z.B. *Bacillus pumilus*. Eine AHBA-Synthase würde in diesen Bakterien nur die Funktion der Aminotransferase nutzen. Die weitere Umsetzung von Kanosamin zu aDAHP und schließlich zu AHBA findet in diesen Bakterien wahrscheinlich nicht statt. Die AHBA-Synthase wäre nicht mehr als Dehydratase aktiv. Ob der Biosyntheseweg hier bereits frühzeitig abbricht, weil weiterführende Biosynthesegene fehlen, ist bislang nicht untersucht. Wird die AHBA-Synthase als Zielobjekt zur Identifizierung von Maytansinoidproduzenten genutzt, wäre in diesem Fall damit zu rechnen, dass dieses Gen in etlichen Mikroorganismen zu finden ist, die selbst kein AHBA bilden. Erst der Nachweis der weiteren AHBA-Biosynthesegene könnte dann zeigen, ob das Bakterium fähig ist, AHBA zu bilden.

Bei den Bakterien, die Kanosamin als Endprodukt bilden, ist allerdings eine konvergente Entwicklung der Kanosaminbiosynthese nicht völlig auszuschließen.

5 Zusammenfassung

Maytansinoide Naturstoffe sind potente Verbindungen mit antineoplastischer Aktivität, die aus Höheren Pflanzen, Bakterien und aus Moosen isoliert wurden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem biogenetischen Ursprung der Maytansinoide in Höheren Pflanzen. In *Putterlickia verrucosa*-Zellkulturen wurde mittels PCR nach einem AHBA-Synthasegen gesucht. Dazu wurden degenerierte Oligonukleotide aus konservierten Bereichen bakterieller AHBA-Synthasegene abgeleitet und dem pflanzlichen Codongebrauch angepasst. Die Sequenzierung der verschiedenen PCR-Produkte ergab keine Homologien zu bakteriellen AHBA-Synthasegenen. Auch in „Southern Blots“ hybridisierten die Gensonden der AHBA-Synthase und der Amidsynthase nicht mit genomischer DNA von *P. verrucosa*. In *Putterlickia verrucosa* sind vermutlich keine Gene der Maytansinbiosynthese vorhanden. Dass Gene der Maytansinbiosynthese in einem Horizontaler Gentransfer zwischen Bakterien und Höheren Pflanzen übertragen wurden, ist damit unwahrscheinlich.

Die mikrobielle Besiedlung Maytansin führender Pflanzen wurde untersucht. Von 347 Bakterienisolaten, die mit dem Moos *C. crispifolium* assoziiert waren, hemmten nur 17 das Wachstum des Maytansin sensitiven Pilzes *P. avellaneum*. Mit der PCR wurden bei diesen Bakterien keine AHBA-Synthasegene nachgewiesen.

Die 16S und die 16S–23S rDNA eines bakteriellen Isolates F18-98 aus der Rhizosphäre einer Maytansin führenden *Putterlickia verrucosa*-Pflanze wurde sequenziert. Nach weiteren taxonomischen Arbeiten von *Groth et al. (2003)* wurde der Stamm als die neue Art *Kitasatospora putterlickiae* charakterisiert.

In dieser Arbeit wurde das Sekundärstoffspektrum von *K. putterlickiae* auf eine mögliche Maytansinoidbildung untersucht. Dazu wurde der Stamm in verschiedenen Medien kultiviert und die radioaktiv markierte Vorstufe AHBA zugefügt. Nur bei einigen Kulturanzuchten wurde AHBA in Sekundärstoffe von *K. putterlickiae* eingebaut. Der stärkste Einbau wurde bei der Verwendung von M2-Glycerin-Medium beobachtet. *K. putterlickiae* unterliegt vermutlich einer Katabolitrepression. In der Ethylacetatphase wurden mehrere radioaktiv markierte Produkte nachgewiesen, die nicht Maytansin und Ansamitocin P3 sind. Die Strukturaufklärung dieser Verbindungen am HKI in Jena ist noch nicht abgeschlossen.

Wie in einer Bioautographie mit *Penicillium avellaneum* gezeigt wurde, produzieren nur ältere Kulturen von *K. putterlickiae* Sekundärstoffe mit geringer antibiotischer Aktivität.

Bei *K. putterlickiae* wurde bereits in vorherigen Arbeiten ein PCR-Produkt mit Homologien zu AHBA-Synthasen amplifiziert (Pullen, 2000). Mit Hilfe einer homologen AHBA-Synthasegen-Sonde wurde in dieser Arbeit ein Gencluster mit einem AHBA-Synthasegen aus einer Cosmid-Bank von *K. putterlickiae* identifiziert. Das AHBA-Synthasegen wurde sequenziert, als Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und gereinigt. In einem Aktivitätstest katalysierte die AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* die Bildung von AHBA.

Durch Southern Hybridisierungen wurden alle weiteren Gene der AHBA-Biosynthese in *K. putterlickiae* detektiert. Ein Oxidoreduktase- und ein Phosphatasegen wurden vollständig sequenziert. Ein Gen für die Polyketidsynthase wurde in Teilen sequenziert. Das Gencluster zeigt deutliche Homologien zu anderen Ansamycin-Clustern. In Southern Hybridisierungen mit genomischer DNA von *K. putterlickiae* wurden Homologien zur Acyltransferase der Maytansinoidbiosynthese gefunden. Aufgrund der molekularbiologischen Untersuchungen könnte es sich bei dem Stamm *K. putterlickiae* um einen möglichen Ansamycin-Produzenten handeln.

In weiteren Arbeiten wurden die Anfangsschritte der AHBA-Biosynthese in *A. mediterranei* untersucht, die von der Oxidoreduktase, der AHBA-Synthase und der Phosphatase katalysiert werden sollten (Arakawa et al., 2002). Es war bekannt, dass die Oxidoreduktase und die AHBA-Synthase interagieren. In dieser Arbeit wurden die Oxidoreduktase und die AHBA-Synthase in *E. coli* coexprimiert, aufgereinigt und die Aktivität bestimmt. Die in *E. coli* exprimierten Proteine waren inaktiv.

Da eine Überexpression der Oxidoreduktase, der AHBA-Synthase und der Phosphatase in *S. lividans* nicht gelang, wurde *S. lividans* mit dem Plasmid pHGF7604 transformiert. Das Plasmid enthält die AHBA-Biosynthesegene rifG-N aus *A. mediterranei*. Die Aktivität der Oxidoreduktase wurde im zellfreien Extrakt aus *S. lividans*/ (pHGF7604) bestimmt. UDP-Glucose wurde bei pH 7,5 spezifisch umgesetzt. Der K_M -Wert lag bei 2,91 mM. Die Zugabe von Asparagin oder Aspartat steigerte die Oxidoreduktase-Aktivität. Die Aminosäuren sind Substrate der AHBA-Synthase, die auch eine Aminotransferase-Funktion besitzt. Die Funktionen der Oxidoreduktase und der AHBA-Synthase sind eng miteinander gekoppelt. Zellfreie Extrakte von Deletionsmutanten der Oxidoreduktase und der Phosphatase zeigten keine Enzymaktivität. Damit bilden die Oxidoreduktase, die AHBA-Synthase und die Phosphatase vermutlich einen Enzymkomplex, der UDP-Glucose zu Kanosamin umsetzt.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlert J, Distler J, Mansouri K, Piepersberg W.** Identification of stsC, the gene encoding the L-glutamine:scyllo-inosose aminotransferase from streptomycin-producing *Streptomyces*. *Arch.Microbiol.* 1997; 168:102-113.
- Altenbuchner J, Cullum J.** DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. *Mol.Gen.Genet.* 1984; 195:134-138.
- Alting-Mees MA, Sorge JA, Short JM.** pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods Enzymol.* 1992; 216:483-495.
- Amábile-Cuevas CF, Chicurel ME.** Horizontal gene transfer. *American Scientist* 1993; 81:322-341.
- Anderson M, Kibby JJ, Rickards RW, Rothschild JM.** Biosynthesis of the mitomycin antibiotics from 3-amino-5-hydroxybenzoic acid. *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 1980; 1277-1278.
- Angell S, Lewis CG, Buttner MJ, Bibb MJ.** Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol.Gen.Genet.* 1994; 244:135-143.
- Arakawa K, Muller R, Mahmud T, Yu TW, Floss HG.** Characterization of the early stage aminoshikimate pathway in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid: the RifN protein specifically converts kanosamine into kanosamine 6-phosphate. *J.Am.Chem.Soc.* 2002; 124:10644-10645.
- Araujo WL, Maccheroni WJ, Aguilar-Vildoso CI, Barroso PA, Saridakis HO, Azevedo JL.** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can.J.Microbiol.* 2001; 47:229-236.
- Arias P, Fernandez-Moreno MA, Malpartida F.** Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *J.Bacteriol.* 1999; 181:6958-6968.
- Arisawa A, Kawamura N, Takeda K, Tsunekawa H, Okamura K, Okamoto R.** Cloning of the macrolide antibiotic biosynthesis gene *acyA*, which encodes 3-O-acyltransferase, from *Streptomyces thermotolerans* and its use for direct fermentative production of a hybrid macrolide antibiotic. *Appl.EnvIRON.Microbiol.* 1994; 60:2657-2660.
- August PR, Tang L, Yoon YJ, Ning S, Muller R, Yu TW, Taylor M, Hoffmann D, Kim CG, Zhang X, Hutchinson CR, Floss HG.** Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem.Biol.* 1998; 5:69-79.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** *Short Protocols in Molecular Biology*. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood D.** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 2002; 417:141-147.
- Berg G, Fritze A, Roskot N, Smalla K.** Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *J.Appl.Microbiol.* 2001 a; 91:963-971.

- Berg G, Marten P, Minkwitz A, Brückner S.** Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces* sp. DSMZ 12424. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 2001 b; 108:1-10.
- Bibb MJ, Ward JM, Hopwood DA.** Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature* 1978; 274:398-400.
- Bibb MJ, Findlay PR, Johnson MW.** The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use in the simple and reliable identification of protein coding sequences. *Gene* 1984; 30:157-166.
- Bieber B, Nüske J, Ritzau M, Gräfe U.** Alnumycin a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. *J.Antibiot.* 1998; 51:381-382.
- Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schoner BE.** Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 1992; 116:43-49.
- Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res.* 1979; 7:1513-1523.
- Blackwell JR, Horgan R.** A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* 1991; 295:10-12.
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976; 72:248-254.
- Breuer M.** *Biosynthese von Ansamycinen. Molekularbiologische Untersuchungen der Aminohydroxybenzoatsynthase von Streptomyces collinus Tü1892.* Bonn: Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 1995.
- Buades C, Moya A.** Phylogenetic analysis of the isopenicillin-N-synthetase horizontal gene transfer. *J.Mol.Evol.* 1996; 42:537-542.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM.** XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. *Biotechniques* 1987; 5:376-378.
- Bushmann F.** *Lateral DNA transfer. Mechanisms and consequences.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Buttner MJ.** RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol.Microbiol.* 1989; 3:1653-1659.
- Byrne KM, Shafiee A, Nielsen JB, Arison B, Monaghan RL, Kaplan L.** The biosynthesis and enzymology of an immunosuppressant, immunomycin, produced by *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascofeticus*. *Dev.Ind.Microbiol.* 1993; 32:29-43.
- Cane DE, Walsh CT, Khosla C.** Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* 1998; 282:63-68.
- Carroll BJ, Moss SJ, Bai L, Kato Y, Toelzer S, Yu TW, Floss HG.** Identification of a set of genes involved in the formation of the substrate for the incorporation of the unusual "glycolate" chain extension unit in ansamitocin biosynthesis. *J.Am.Chem.Soc.* 2002; 124:4176-4177.
- Carroll G.** Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988; 69:2-9.

- Caruso M, Colombo AL, Fedeli L, Paves A, Quaroni S, Saracchi M, Ventrella G.** Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Ann.Microbiology* 2000; 50:3-13.
- Casati R, Beale JM, Floss HG.** Biosynthesis of ansatrienin. Nonincorporation of shikimic acid into the mC₇N unit and stereochemistry of its conversion to the cyclohexanecarboxylic acid. *J.Am.Chem.Soc.* 1987; 109:8102-8104.
- Chari RV, Martell BA, Gross JL, Cook SB, Shah SA, Blattler WA, McKenzie SJ, Goldmacher VS.** Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Res.* 1992; 52:127-131.
- Chater KF.** Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends.Genet.* 1989; 5:372-377.
- Chater KF.** Genetic regulation of secondary metabolic pathways in *Streptomyces*. *Ciba.Found.Symp.* 1992; 171:144-156.
- Chater KF, Bibb MJ.** Regulation of bacterial antibiotic production. In: Kleinkauf H, Döhren Hv, eds. *Biotechnology Vol. 7: Products of Secondary Metabolism.* Weinheim, VCH Press, 1997:57-105.
- Chater KF.** Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* 1998; 144:1465-1478.
- Chung YR, Sung KC, Mo HK, Son DY, Nam JS, Chun J, Bae KS.** *Kitasatospora cheerisanensis* sp. nov., a new species of the genus *Kitasatospora* that produces an antifungal agent. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1999; 49:753-758.
- Clade D.** *Die Ansamitocincluster in Actinosynnema pretiosum und die Entwicklung einer Transformationsmethode.* Bonn: Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 2001.
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH.** PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic.Acids.Res.* 1996; 24:3546-3551.
- Cochrane VW.** Physiology of actinomycetes. *Ann.Rev.Microbiol.* 1961; 15:1-26.
- Cole RB.** *Electrospray Ionization Mass Spectrometry.* Wiley, 1997.
- Costa GL, Grafsky A, Weiner MP.** Cloning and analysis of PCR-generated DNA fragments. *PCR.Methods Appl.* 1994; 3:338-345.
- Costa GL, Weiner MP.** Polishing with T4 or Pfu polymerase increases the efficiency of cloning of PCR fragments. *Nucleic.Acids.Res.* 1994; 22:2423.
- Dandekar T, Snel B, Huynen M, Bork P.** Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. *Trends.Biochem.Sci.* 1998; 23:324-328.
- Dolak LA, Castle TM, Dietz A, Laborde AL.** 3-Amino-3-deoxyglucose produced by a *Streptomyces* sp. *J.Antibiot.* 1980; 33:900-901.
- Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ, Katz L.** Molecular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 1991; 252:675-679.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic.Acids.Res.* 1988; 16:6127-6145.
- Dunstan DI, Short KC.** Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol.Plant* 1977; 41:70-72.

- Eads JC, Beeby M, Scapin G, Yu TW, Floss HG.** Crystal structure of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) synthase. *Biochemistry* 1999; 38:9840-9849.
- Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC.** Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic.Acids.Res.* 1989; 17:7843-7853.
- Egan S, Wiener P, Kallifidas D, Wellington EM.** Phylogeny of *Streptomyces* species and evidence for horizontal transfer of entire and partial antibiotic gene clusters. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001; 79:127-133.
- Elbein AD, Tropea JE, Mitchell M, Kaushal GP.** Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I. *J.Biol.Chem.* 1990; 265:15599-15605.
- Evans PD, Cook SN, Riggs PD, Noren CJ.** LITMUS: multipurpose cloning vectors with a novel system for bidirectional in vitro transcription. *Biotechniques* 1995; 19:130-135.
- Fisher PJ, Petrini O, Lappin Scott HM.** The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytol.* 1992; 122:299-305.
- Floss HG, Anderson JA.** Biosynthesis of the ergot toxins. In: Steyn PS, ed. *The biosynthesis of mycotoxins - a study in secondary metabolism*. New York, Academic Press, 1980:17-67.
- Floss HG, Beale JM.** Untersuchungen zur Biosynthese von Antibiotika. *Angew.Chem.* 1989; 101:147-179.
- Fusetani N, Ejima D, Matsunaga S, Hashimoto K, Itagaki K, Akagi Y, Taga N, Suzuki K.** 3-Amino-3-deoxy-D-glucose: an antibiotic produced by a deep-sea bacterium. *Experientia* 1987; 43:464-465.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp.Cell Res.* 1968; 50:151-158.
- Gassen HG.** *Gentechnische Methoden*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1991.
- Gekko K, Timasheff SN.** Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* 1981; 20:4677-4686.
- Ghisalba O, Nuesch J.** A genetic approach to the biosynthesis of the rifamycin-chromophore in *Nocardia mediterranei*. IV. Identification of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid as a direct precursor of the seven-carbon amino starter-unit. *J.Antibiot.(Tokyo.)* 1981; 34:64-71.
- Gibson JL, Tabita FR.** Analysis of the cbbXYZ operon in *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* 1997; 179:663-669.
- Gräfe U.** *Biochemie der Antibiotika: Struktur - Biosynthese - Wirkmechanismus*. Heidelberg; Berlin; New York: Spektrum, Akademische Verlagsgesellschaft, 1992.
- Grond S.** *Die Bildung von 1-O-Acylrhamnosiden und anderen Metaboliten durch dirigierte Biosynthese mit Streptomyces griseoviridis (Tü3634) und Untersuchung ihrer Biogenese*. Göttingen: Cuvillier Verlag, 1997.
- Groth I, Schütze B, Boettcher T, Pullen CB, Rodriguez C, Leistner E, Goodfellow M.** *Kitasatospora putterlickiae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil and the transfer of *Streptomyces kifunensis* to the genus *Kitasatospora* as *Kitasatospora kifunensis* comb. nov., and emended description of *Streptomyces aureofaciens* Duggar 1984. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 2003; im Druck

- Guijarro J, Santamaria R, Schauer A, Losick R.** Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated polypeptide. *J.Bacteriol.* 1988; 170:1895-1901.
- Guo J, Frost JW.** Biosynthesis of 1-deoxy-1-imino-D-erythrose 4-phosphate: a defining metabolite in the aminoshikimate pathway. *J.Am.Chem.Soc.* 2002 a; 124:528-529.
- Guo J, Frost JW.** Kanosamine biosynthesis: a likely source of the aminoshikimate pathway's nitrogen atom. *J.Am.Chem.Soc.* 2002 b; 124:10642-10643.
- Gygax D, Christ M, Ghisalba O, Nuesch J.** Regulation of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid 7-phosphate synthetase in *Nocardia mediterranei*. *FEMS Microbiol.Lett.* 1982; 15:169-173.
- Haber A, Johnson RD, Rinehart KLJ.** Biosynthetic origin of the C₂ units of geldanamycin and distribution of label from D-[6-¹³C]glucose. *J.Am.Chem.Soc.* 1977; 99:3541-3544.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can.J.Microbiol.* 1997; 43:895-914.
- Hanahan D.** *DNA Cloning, Volume 1.* London, UK: IRL Press Ltd., 1985.
- Hanka LJ, Barnett MS.** Microbiological assays and bioautography of maytansine and its homologues. *Antimicrob.Ag.Chemother.* 1974; 6:651-652.
- Hanukoglu I, Gutfinger T.** cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. *Eur.J.Biochem.* 1989; 180:479-484.
- Hara O, Hutchinson CR.** A macrolide 3-O-acyltransferase gene from the midecamycin-producing species *Streptomyces mycarofaciens*. *J.Bacteriol.* 1992; 174:5141-5144.
- Hatano K, Akiyama S, Asai M, Rickards RW.** Biosynthetic origin of aminobenzenoid nucleus (C₇N-unit) of ansamitocin, a group of novel maytansinoid antibiotics. *J.Antibiot.* 1982; 35:1415-1417.
- Hatano K, Higashide E, Akiyama S, Yoneda M.** Selective accumulation of ansamitocins P-2, P-3 and P-4, and biosynthetic origins of their acyl moieties. *Agric.Biol.Chem.* 1984; 48:1721-1729.
- Hatano K, Mizuta E, Akiyama S, Higashide E, Nakao Y.** Biosynthetic origin of the ansa-structure of ansamitocin P-3. *Agric.Biol.Chem.* 1985; 49:327-333.
- Hezari M, Croteau R.** Taxol biosynthesis: an update. *Planta Med.* 1997; 63:291-295.
- Hezari M, Ketchum RE, Gibson DM, Croteau R.** Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. *Arch.Biochem.Biophys.* 1997; 337:185-190.
- Higashide E, Asai M, Ootsu K, Tanida S, Kozai Y, Hasegawa T, Kishi T, Sugino Y, Yoneda M.** Ansamitocin, a group of novel maytansinoid antibiotics with antitumor properties from *Nocardia*. *Nature* 1977; 270:721-722.
- Hill AM, Harris JP, Siskos AP.** Investigation of glycerol incorporation into soraphen A. *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 1998; 2361-2362.
- Hoffmann D.** *Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese der Ansamitocine in Actinosynnema pretiosum und der Maytansine in Putterlickia verrucosa.* Bonn: Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 1997.

- Hopwood DA, Wright HM.** Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol.Gen.Genet.* 1978; 162:307-317.
- Hopwood DA.** Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Pro.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 1988; 235:121-138.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrempf H.** *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual.* Norwich: The John Innes Foundation, 1985.
- Hopwood DA.** Antibiotics: opportunities for genetic manipulation. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 1989; 324:549-562.
- Horinouchi S, Suzuki H, Nishiyama M, Beppu T.** Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* gene (afsA) responsible for A-factor biosynthesis. *J.Bacteriol.* 1989; 171:1206-1210.
- Horinouchi S, Kito M, Nishiyama M, Furuya K, Hong SK, Miyake K, Beppu T.** Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* 1990; 95:49-56.
- Hornemann U, Eggert JH, Honor DP.** Role of D-[4-¹⁴C]erythrose and [3-¹⁴C]pyruvate in the biosynthesis of the meta-C-C₆-N unit of the mitomycin antibiotics in *Streptomyces verticillatus*. *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 1980; 11-13.
- Huang X, Holden HM, Raushel FM.** Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu.Rev.Biochem.* 2001; 70:149-180.
- Inaoka Y, Takahashi Y, Kinoshita T.** Propioxatins A and B, new enkephalinase B inhibitors. II. Structural elucidation. *J.Antibiot.(Tokyo.)* 1986; 39:1378-1381.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990; 96:23-28.
- Issell BF, Crooke ST.** Maytansine. *Cancer Treat Rev.* 1978; 5:199-207.
- Jerpseth B, Greener A, Short JM, Viola J, Kretz PL.** XL1-Blue MRF⁻ *E. coli* cells: McrA⁻, McrCB⁻, McrF⁻, Mrr⁻, HsdR⁻ derivative of XL1-Blue cells. *Strategies* 1992; 5:81-83.
- Jerpseth B, Greener A, Short JM, Viola J, Kretz PL.** New restriction minus derivatives of XL1-Blue *E. coli* cells. *Strategies* 1993; 6:24.
- Jiao RS, Liu CJ, Jin ZK, Zhang XC, Ni LY, Lu ZM.** The route of incorporation of nitrogen atom into rifamycin during its biosynthesis. *Sci.Sin.[B.]* 1984; 27:380-390.
- Karlsson A, Sartori G, White RJ.** Rifamycin biosynthesis: Further studies on origin of the ansachian and chromophore. *Eur.J.Biochem.* 1974; 47:251-256.
- Kato Y, Bai L, Xue Q, Reville WP, Yu TW, Floss HG.** Functional expression of genes involved in the biosynthesis of the novel polyketide chain extension unit, methoxymalonyl-acyl carrier protein, and engineered biosynthesis of 2-desmethyl-2-methoxy-6-deoxyerythronolide B. *J.Am.Chem.Soc.* 2002; 124:5268-5269.
- Kibby JJ, McDonald IA, Rickards RW.** 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid as a key intermediate in ansamycin and maytansinoid biosynthesis. *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 1980; 768-769.

- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA.** *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- Kim C-G, Kirschning A, Bergon P, Ahn Y, Wang JJ, Shibuya M, Floss HG.** Formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC₇N units in ansamycin antibiotics, by a new variant of the shikimate pathway. *J.Am.Chem.Soc.* 1992; 114:4941-4943.
- Kim C-G.** *Biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of the mC₇N unit in ansamycin antibiotics*. Seattle: Dissertation, University of Washington, 1994.
- Kim C-G, Kirschning A, Bergon P, Zhou P, Su E, Sauerbrei B, Ning S, Ahn Y, Breuer M, Leistner E, Floss HG.** Biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC₇N units in ansamycin antibiotics. *J.Am.Chem.Soc.* 1996; 118:7486-7491.
- Kim CG, Yu TW, Fryhle CB, Handa S, Floss HG.** 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC₇N units in rifamycin and related antibiotics. *J.Biol.Chem.* 1998; 273:6030-6040.
- Klenow H, Henningsen I.** Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1970; 65:168-175.
- Knippers R.** *Molekulare Genetik*. 7. Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1997.
- Komoda Y, Kishi T.** Maytansinoids. *Med.Chem.* 1980; 16:353-389.
- Kupchan SM, Komoda Y, Court WA, Thomas GJ, Smith RM, Karim A, Gilmore CJ, Haltiwanger RC, Bryan RF.** Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *J.Am.Chem.Soc.* 1972 a; 94:1354-1356.
- Kupchan SM, Komoda Y, Thomas GJ, Hintz HPJ.** Maytanprine and Maytanbutine, new antileukaemic ansa macrolides from *Maytenus buchananii*. *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 1972 b; 1065.
- Kupchan SM, Komoda Y, Branfman AR, Dailey RG, Zimmerly VA.** Novel maytansinoids. Structural interrelations and requirements for antileukemic activity. *J.Am.Chem.Soc.* 1974; 96:3706-3708.
- Kupchan SM, Komoda Y, Branfman AR, Sneden AT, Court WA, Thomas GJ, Hintz HP, Smith RM, Karim A, Howie GA, Verma AK, Nagao Y, Dailey RGJ, Zimmerly VA, Sumner WCJ.** The maytansinoids. Isolation, structural elucidation, and chemical interrelation of novel ansa macrolides. *J.Org.Chem.* 1977; 42:2349-2357.
- Kutney JP, Beale MH, Salisbury P, Stuart KL, Worth BR, Townsley PM, Chalmers WT, Nilsson K, Jacoli GG.** Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of *Maytenus buchananii*. *Phytochemistry* 1981; 20:653-657.
- Ladino CA, Chari RV, Bourret LA, Kedersha NL, Goldmacher VS.** Folate-maytansinoids: target-selective drugs of low molecular weight. *Int.J.Cancer* 1997; 73:859-864.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- Lancini G.** Ansamycins. In: *Biotechnology, Volume 4*. Weinheim, Verlag Chemie, 1986:431-463.
- Larson GM, Schaneberg BT, Sneden AT.** Two new maytansinoids from *Maytenus buchananii*. *J.Nat.Prod.* 1999; 62:361-363.

- Lawlor EJ, Baylis HA, Chater KF.** Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes Dev.* 1987; 1:1305-1310.
- Leskiw BK, Bibb MJ, Chater KF.** The use of a rare codon specifically during development? *Mol.Microbiol.* 1991; 5:2861-2867.
- Lion T, Haas OA.** Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal.Biochem.* 1990; 188:335-337.
- Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, Kedersha NL, Ariniello PD, Goldmacher VS, Lambert JM, Blattler WA, Chari RV.** Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996; 93:8618-8623.
- Liu HW, Thorson JS.** Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* 1994; 48:223-256.
- Loos H, Sahm H, Sprenger GA.** Glucose-fructose oxidoreductase, a periplasmic enzyme of *Zymomonas mobilis*, is active in its precursor form. *FEMS Microbiol.Lett.* 1993; 107:293-298.
- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ.** High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 1991; 108:1-6.
- Martin JF, Liras P.** Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann.Rev.Microbiol.* 1989; 43:173-206.
- Martinez-Blanco H, Reglero A, Ferrero MA, Fernandez-Canon JM, Luengo JM.** Repression of phenylacetic acid transport system in *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255 by free amino acids and ammonium salts. *J.Antibiot.* 1989; 42:1416-1423.
- Masuma R, Tanaka Y, Omura S.** Enhancement of cerulenin production by a natural zeolite, an ammonium ion-trapping agent. *J.Antibiot.* 1982; 35:1184-1193.
- Masuma R, Tanaka Y, Tanaka H, Omura S.** Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. *J.Antibiot.* 1986; 39:1557-1564.
- McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood D, Khosla C.** Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature* 1995; 375:549-554.
- Mendez C, Chater KF.** Cloning of whiG, a gene critical for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J.Bacteriol.* 1987; 169:5715-5720.
- Meurer K.** *Untersuchungen zum Vorkommen von Maytansinoiden in Höheren Pflanzen. Ein Beitrag zur Suche nach einem maytansinproduzierenden Mikroorganismus.* Bonn: Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 2002.
- Milner JL, Silo-Suh L, Lee JC, He H, Clardy J, Handelsman J.** Production of Kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl.Enviroin.Microbiol.* 1996; 62:3061.
- Misawa M, Hayashi M, Takayama S.** Production of antineoplastic agents by plant tissue cultures. I. Induction of callus tissues and detection of the agents in cultured cells. *Planta Med.* 1983; 49:115-119.

- Mochizuki S, Hiratsu K, Suwa M, Ishii T, Sugino F, Yamada K, Kinashi H.** The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism. *Mol.Microbiol.* 2003; 48:1501-1510.
- Moss SJ, Bai L, Toelzer S, Carroll BJ, Mahmud T, Yu TW, Floss HG.** Identification of asm19 as an acyltransferase attaching the biologically essential ester side chain of ansamitocins using N-desmethyl-4,5-desepoxymaytansinol, not maytansinol, as its substrate. *J.Am.Chem.Soc.* 2002; 124:6544-6545.
- Mothes K.** Zur Geschichte unserer Kenntnisse über die Alkaloide. *Pharmazie* 1981; 36:199-209.
- Nelson DL, Cox MM.** *Lehninger Biochemie*. 3.Auflage Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2001.
- Nielsen KM, Gebhard F, Smalla K, Bones AM, van Elsas JD.** Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. *Theor.Appl.Genet.* 1997; 95:815-821.
- Nielsen KM, Bones AM, Smalla K, van Elsas JD.** Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria--a rare event? *FEMS Microbiol.Rev.* 1998; 22:79-103.
- Noh MJ, Yang JG, Kim KS, Yoon YM, Kang KA, Han HY, Shim SB, Park HJ.** Isolation of a novel microorganism, *Pestalotia heterocornis*, producing paclitaxel. *Biotechnol.Bioeng.* 1999; 64:620-623.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA.** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000; 405:299-304.
- Okanishi M, Suzuki K, Umezawa H.** Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: cultural condition and morphological study. *J.Gen.Microbiol.* 1974; 80:389-400.
- Omura S, Takahashi Y, Iwai Y, Tanaka H.** *Kitasatospora*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *J.Antibiot.* 1982; 35:1013-1019.
- Omura S, Murata M, Hanaki H, Hinotozawa K, Oiwa R, Tanaka H.** Phosalacine, a new herbicidal antibiotic containing phosphinothricin. Fermentation, isolation, biological activity and mechanism of action. *J.Antibiot.(Tokyo)* 1984; 37:829-835.
- Pascarella S, Bossa F.** Similarity between pyridoxal/pyridoxamine phosphate-dependent enzymes involved in dideoxy and deoxyaminosugar biosynthesis and other pyridoxal phosphate enzymes. *Protein Sci.* 1994; 3:701-705.
- Petrini O.** Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews J, Hirano S, eds. *Microbial Ecology of Leaves*. New York, Berlin, Heidelberg, London, Springer Verlag, 1991:179-197.
- Piepersberg W.** Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. *Crit.Rev.Biotechnol.* 1994; 14:251-285.
- Plaskitt KA, Chater KF.** Influences of developmental genes on localised glycogen deposition in colonies of a mycelial prokaryote, *Streptomyces coelicolor* A3(2): a possible interface between metabolism and morphogenesis. *Phil.Trans.R.Soc.B.* 1995; 347:105-121.
- Potgieter M.** *Biosynthetic studies on geldanamycin and pactamycin*. Illinois: Dissertation, Univ. Illinois, Urbana, 1983.
- Powell RG, Weisleder D, Smith Jr CR, Kozolowski J, Rohwedder WK.** Treflorine, Trenudine, and N-Methyltrenudone: novel maytansinoid tumor inhibitors containing two fused macrocyclic rings. *J.Am.Chem.Soc.* 1982; 104:4929-4934.

- Prelog V, Oppolzer W.** [Ansamycins, a novel class of microbial metabolites]. *Helv.Chim.Acta* 1973; 56:1179-1187.
- Pullen C.** *Untersuchungen zum Vorkommen von Maytansinen in südafrikanischen Celastraceen und texanischen Rhamnaceen.* Bonn: Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 2000.
- Pullen C, Schmitz P, Meurer K, Bamberg DD, Lohmann S, De Castro F, Groth I, Schlegel B, Mollmann U, Gollmick F, Grafe U, Leistner E.** New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of *Celastraceae*. *Planta* 2002; 216:162-167.
- Pullen CB, Schmitz P, Hoffmann D, Meurer K, Boettcher T, von Bamberg D, Pereira AM, De Castro F, Hauser M, Geertsema H, van Wyk A, Mahmud T, Floss HG, Leistner E.** Occurrence and non-detectability of maytansinoids in individual plants of the genera *Maytenus* and *Putterlickia*. *Phytochemistry* 2003; 62:377-387.
- Rai SS, Wolff J.** Localization of the vinblastine-binding site on beta-tubulin. *J.Biol.Chem.* 1996; 271:14707-14711.
- Rao RN, Richardson MA, Kuhstoss SA.** Cosmid shuttle vectors for cloning and analysis of *Streptomyces* DNA. *Methods Enzymol.* 1987; 153:166-198.
- Ravry MJ, Omura GA, Birch R.** Phase II evaluation of maytansine (NSC 153858) in advanced cancer. A Southeastern Cancer Study Group trial. *Am.J.Clin.Oncol.* 1985; 8:148-150.
- Rebollo A, Gil JA, Liras P, Asturiase JA, Martin JF.** Cloning and characterization of a phosphate-regulated promoter involved in phosphate control of candicidin biosynthesis. *Gene* 1989; 79:47-58.
- Reider PJ, Roland DM.** Maytansinoids. In: Brossi A, ed. *The Alkaloids, Vol. XXIII.* New York, Academic Press, 1984:71-156.
- Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, Kupchan SM.** Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science* 1975; 189:1002-1005.
- Rinehart Jr KL, Potgieter M, Jin W-Z, Pearce CJ, Wright DA.** Biosynthetic studies on antibiotics employing stable isotopes. In: Umezawa H, Demaein DL, Hata T, Hutchinson CR, eds. *Trends in antibiotic research: Genetics, biosynthesis, action and new substances.* Tokyo, Japan Antibiotics Research Association, 1982:171-184.
- Rose AC.** *Economic Microbiology.* London/ New York: Academic Press, 1979.
- Roszbach S, Kulpa DA, Roszbach U, de Bruijn FJ.** Molecular and genetic characterization of the rhizopine catabolism (mocABRC) genes of *Rhizobium meliloti* L5-30. *Mol.Gen.Genet.* 1994; 245:11-24.
- Rossmann MG, Liljas A, Brändén C-I, Banaszak LJ.** Boyer PD, ed. *The Enzymes, Vol. 11.* New York, 1975:61-102.
- Rothrock CS, Gottlieb D.** Role of antibiotics in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can.J.Microbiol.* 1984; 30:1440-1447.
- Royo J, Gimez E, Hueros G.** CMP-KDO synthetase: a plant gene borrowed from gram-negative eubacteria. *Trends.Genet.* 2000; 16:432-433.
- Rubio MA, Espinosa JC, Tercero JA, Jimenez A.** The Pur10 protein encoded in the gene cluster for puromycin biosynthesis of *Streptomyces alboniger* is an NAD-dependent ATP dehydrogenase. *FEBS Lett.* 1998; 437:197-200.

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-491.
- Sakai K, Ichikawa T, Yamada K, Yamashita M, Tanimoto M, Hikita A, Ijuin Y, Kondo K.** Antitumor principles in mosses: the first isolation and identification of maytansinoids, including a novel 15-methoxyansamitocin P-3. *J.Nat.Prod.* 1988; 51:845-850.
- Salmond GPC, Bycroft BW, Stewart GSAB, Williams P.** The bacterial "enigma": cracking the code of cell-cell communication. *Mol.Microbiol.* 1995; 16:615-624.
- Sambrook J, Russell DW.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1977; 74:5463-5467.
- Schäferjohann J, Yoo JG, Kusian B, Bowien B.** The cbb operons of the facultative chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus* encode phosphoglycolate phosphatase. *J.Bacteriol.* 1993; 175:7329-7340.
- Schlegel HG.** *Allgemeine Mikrobiologie.* 7.Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1992.
- Schoepfer R.** The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* 1993; 124:83-85.
- Schofield WB.** *Royal British Columbia Museum Handbook "Some common mosses of British Columbia".* Dept. of Botany, University of British Columbia, 1992.
- Schulz B, Römmert A-K, Dammann U, Aust H-J, Strack D.** The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycol.Res.* 1999; 103:1275-1283.
- Scopes RK.** *Protein purification: principles and practice.* 3rd. ed. New York : Springer Verlag, 1994.
- Sensi P, Margalith P, Timbal MT.** Rifamycin, a new antibiotic; preliminary report. *Farmaco Ed.Sci.* 1959; 14:146-147.
- Shirling EB, Gottlieb D.** Method for classification of *Streptomyces* species. *IJSB* 1966; 16:313-340.
- Shoda M.** Bacterial control of plant diseases. *J.Biosci.Bioeng.* 2000; 89:515-521.
- Shuman S.** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J.Biol.Chem.* 1994; 269:32678-32684.
- Siegel MR, Schradl CL.** Fungal endophytes of grasses: detrimental and beneficial association. In: Andrews JH, Hirano SS, eds. *Microbial Ecology of Leaves.* Springer Verlag, 1991.
- Smith Jr CR, Powell RG.** Chemistry and pharmacology of maytansinoid alkaloids. In: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives.* 1984:149-204.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE.** Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986; 321:674-679.
- Smith S.** Technology evaluation: C242-DM1, ImmunoGen Inc. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 2001; 3:198-203.

- Snedden AT, Beemsterboer GL.** Normaytansine, a new antileukemic ansa macrolide from *Maytenus buchananii*. *J.Nat.Prod.* 1980; 43:637-640.
- Southern EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 1975; 98:503-517.
- Spjut RW, Cassady JM, McCloud T, Suffness M, Norris DH, Cragg GM, Edson ChF.** Variation in cytotoxicity and antitumor activity among samples of the moss *Claopodium crispifolium* (Tuidiaceae). *Econ.Bot.* 1988; 42:62-72.
- Staley AL, Rinehart KL.** Biosynthesis of the streptovaricins: 3-amino-5-hydroxybenzoic acid as a precursor to the meta-C₇N unit. *J.Antibiot.(Tokyo.)* 1991; 44:218-224.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D.** Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 1993; 260:214-216.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D, Grothaus P, Bignami G.** The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J.Nat.Prod.* 1995; 58:1315-1324.
- Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM.** Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 1996; 142:435-440.
- Strohl WR.** Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic.Acids.Res.* 1992; 20:961-974.
- Stryer L.** *Biochemistry*. 4th ed. Macmillan Publishers Ltd., 1996.
- Studier FW, Moffatt BA.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* 1986; 189:113-130.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW.** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 1990; 185:60-89.
- Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Nowak J.** Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on growth. *Biol.Fertil.Soils* 1997; 25:13-19.
- Sturz AV, Christie BR, Nowak J.** Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit.Rev.Plant Sci.* 2000; 19:1-30.
- Summerton J, Atkins T, Bestwick R.** A rapid method for preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* 1983; 133:79-84.
- Suwanborirux K, Chang C-J, Spjut RW, Cassady JM.** Ansamitocin P-3, a maytansinoid, from *Claopodium crispifolium* and *Anomodon attenuatus* or associated *Actinomycetes*. *Experientia* 1990; 46:117-120.
- Swift S, Throup JP, Williams P, Salmond GPC, Stewart GSAB.** Quorum sensing: a population density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends.Biochem.Sci.* 1996; 21:214-219.
- Takahashi Y, Iwai Y, Omura S.** Relationship between cell morphology and the types of diaminopimelic acid in *Kitasatospora setalba*. *J.Gen.Appl.Microbiol.* 1983; 29:459-465.
- Takano E, White J, Thompson CJ, Bibb MJ.** Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* 1995; 166:133-137.

- Takeuchi T, Sawada H, Tanaka F, Matsuda I.** Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rDNA sequences. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1996; 46:476-479.
- Tamegai H, Nango E, Kuwahara M, Yamamoto H, Ota Y, Kuriki H, Eguchi T, Kakunima K.** Identification of L-glutamine: 2-deoxy-scyllo-inosose aminotransferase required for the biosynthesis of butirosin in *Bacillus circulans*. *J.Antibiot.* 2002; 55:707-714.
- Tan RX, Zou WX.** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat.Prod.Rep.* 2001; 18:448-459.
- Tang L, Yoon YJ, Choi CY, Hutchinson CR.** Characterization of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase involved in rifamycin B biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei*. *Gene* 1998; 216:255-265.
- Tanida S, Izawa M, Hasegawa T.** Ansamitocin analogs from a mutant strain of *Nocardia*. I. Isolation of the mutant, fermentation and antimicrobial properties. *J.Antibiot.(Tokyo.)* 1981; 34:489-495.
- Tercero JA, Espinosa JC, Lacalle RA, Jimenez A.** The biosynthetic pathway of the aminonucleoside antibiotic puromycin, as deduced from the molecular analysis of the pur cluster of *Streptomyces alboniger*. *J.Biol.Chem.* 1996; 271:1579-1590.
- Thigpen JT, Ehrlich CT, Creasman WT, Curry S, Blessiong JA.** Phase II study of maytansine in the treatment of advanced or recurrent adenocarcinoma of the ovary. A gynecologic oncology group study. *Am.J.Clin.Oncol.* 1983; 6:273-275.
- Thompson CJ, Ward JM, Hopwood DA.** DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species. *Nature* 1980; 286:525-527.
- Thompson CJ, Kieser T, Ward JM, Hopwood DA.** Physical analysis of antibiotic-resistance genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. *Gene* 1982; 20:51-62.
- Thorson JS, Lo SF, Liu HW.** Biosynthesis of 3,6-dideoxyhexoses: new mechanistic reflections upon 2,6-dideoxy, 4,6-dideoxy, and amino sugar construction. *J.Am.Chem.Soc.* 1993; 115:6993-6994.
- Tsuno T, Ikeda C, Numata K, Tomita K, Konishi M, Kawaguchi H.** 3,3'-Neotrehalosadiamine (BMY-28251), a new aminosugar antibiotic. *J.Antibiot.(Tokyo.)* 1986; 39:1001-1003.
- Umezawa H, Maeda K, Ueda M, Yagishita Y, Kondo S, Okami Y, Utahara R, Osato Y, Nitta K, Takeuchi T.** Production and isolation of a new antibiotic kanamycin. *J.Antibiot.* 1957; 10:181-188.
- Umezawa S, Umino K, Shibahara S, Omoto S.** Studies of aminosugars. XVII. Production of 3-amino-3-deoxy-D-glucose by *Bacillus* species. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* 1967 a; 40:2419-2421.
- Umezawa S, Umino K, Shibahara S, Hamada M, Omoto S.** Fermentation of 3-amino-3-deoxy-D-glucose. *J.Antibiot.(Tokyo.)* 1967 b; 20:355-360.
- Umezawa S, Shibahara S, Omoto S, Takeuchi T, Umezawa H.** Studies on the biosynthesis of 3-amino-3-deoxy-D-glucose. *J.Antibiot.(Tokyo.)* 1968; 21:485-491.
- Uramoto M, Itoh Y, Sekiguchi R, Shin-ya K, Kusakabe H, Isono K.** A new antifungal antibiotic, cystargin: fermentation, isolation, and characterization. *J.Antibiot.(Tokyo)* 1988; 41:1763-1768.
- Vining LC.** Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity--a review. *Gene* 1992; 115:135-140.

- von Bamberg D.** *Untersuchungen zur Biosynthese von Ansamycinen in Streptomyces collinus Tü1892 und zum Vorkommen von Maytansinoïden in Höheren Pflanzen.* Bonn: Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 1999.
- Walker K, Croteau R.** Taxol biosynthetic genes. *Phytochemistry* 2001; 58:1-7.
- Wang J, Li G, Lu H, Zheng Z, Huang Y, Su W.** Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiol.Lett.* 2000; 193:249-253.
- Wang L, Li S, Li Y.** Isolation and sequencing of glycosyltransferase gene and UDP-glucose dehydrogenase gene that are located on a gene cluster involved in a new exopolysaccharide biosynthesis in *Streptomyces*. *DNA Seq.* 2003; 14:141-145.
- Wang Y, Zhang Z, Ruan J.** A proposal to transfer *Microbispora bispora* (Lechevalier 1965) to a new genus, *Thermobispora* gen. nov., as *Thermobispora bispora* comb. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1996 a; 46:933-938.
- Wang Y, Zhang Z, Ruan J.** Phylogenetic analysis reveals new relationships among members of the genera *Microtetraspora* and *Microbispora*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1996 b; 46:658-663.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT.** Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J.Am.Chem.Soc.* 1971; 93:2325-2327.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME.** Plant antitumor agents: colubrinol acetate and colubrinol, antileukaemic ansa macrolides from *Colubrina texensis*. *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 1973; 390.
- Weber W, Zähler H, Damberg M, Russ P, Zeeck A.** Ansatrienin A und B, fungistatische Antibiotika aus *Streptomyces collinus*. *Zentralbl.Bakteriol.Hyg.* 1981; 1:122-124.
- Wellington EM, Cresswell N, Herron PR.** Gene transfer between *Streptomyces* in soil. *Gene* 1992 a; 115:193-198.
- Wellington EMH, Stackebrandt E, Sanders D, Wolstrup J, Jorgensen NOG.** Taxonomic status of *Kitasatospora* and proposed unification with *Streptomyces* on the basis of phenotypic and 16S rRNA analysis and emendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339^{AL}. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1992 b; 42:156-160.
- White RJ, Martinelli E.** Ansamycin biogenesis: incorporation of (1-13C)glucose and (1-13C)glycerate into the chromophore of rifamycin S. *FEBS Lett.* 1974; 49:233-236.
- Wiegert T, Sahn H, Sprenger GA.** The substitution of a single amino acid residue (Ser-116 --> Asp) alters NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* into a glucose dehydrogenase with dual coenzyme specificity. *J.Biol.Chem.* 1997; 272:13126-13133.
- Wierenga RK, Terpstra P, Hol WG.** Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J.Mol.Biol.* 1986; 187:101-107.
- Wilson D.** Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 1995; 73:274-276.
- Wings S.** *Molekularbiologische Untersuchung eines Bakteriums aus der Rhizosphäre von Putterlickia verrucosa.* Bonn: Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 2001.
- Woese CR.** Bacterial evolution. *Microbiol.Rev.* 1987; 51:221-271.

- Wolpert-DeFilippes MK, Adamson RH, Csyk RL, Johns DG.** Initial studies on the cytotoxic action of maytansine, a novel ansa-macrolide. *Biochem.Pharmacol.* 1975; 24:751-754.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW.** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic.Acids.Res.* 1989; 17:3469-3478.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J.** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985; 33:103-119.
- Yu TW, Muller R, Muller M, Zhang X, Draeger G, Kim CG, Leistner E, Floss HG.** Mutational analysis and reconstituted expression of the biosynthetic genes involved in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the starter unit of rifamycin biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* S699. *J.Biol.Chem.* 2001; 276:12546-12555.
- Yu TW, Bai L, Clade D, Hoffmann D, Toelzer S, Trinh KQ, Xu J, Moss SJ, Leistner E, Floss HG.** The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002; 99:7968-7973.
- Zhang Z, Wang Y, Ruan J.** A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1997; 47:1048-1054.

7 Anhang

7.1 Taxonomische Bestimmung von *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

7.1.1 Phylogenetischer Stammbaum zur Einordnung des Stammes F18-98

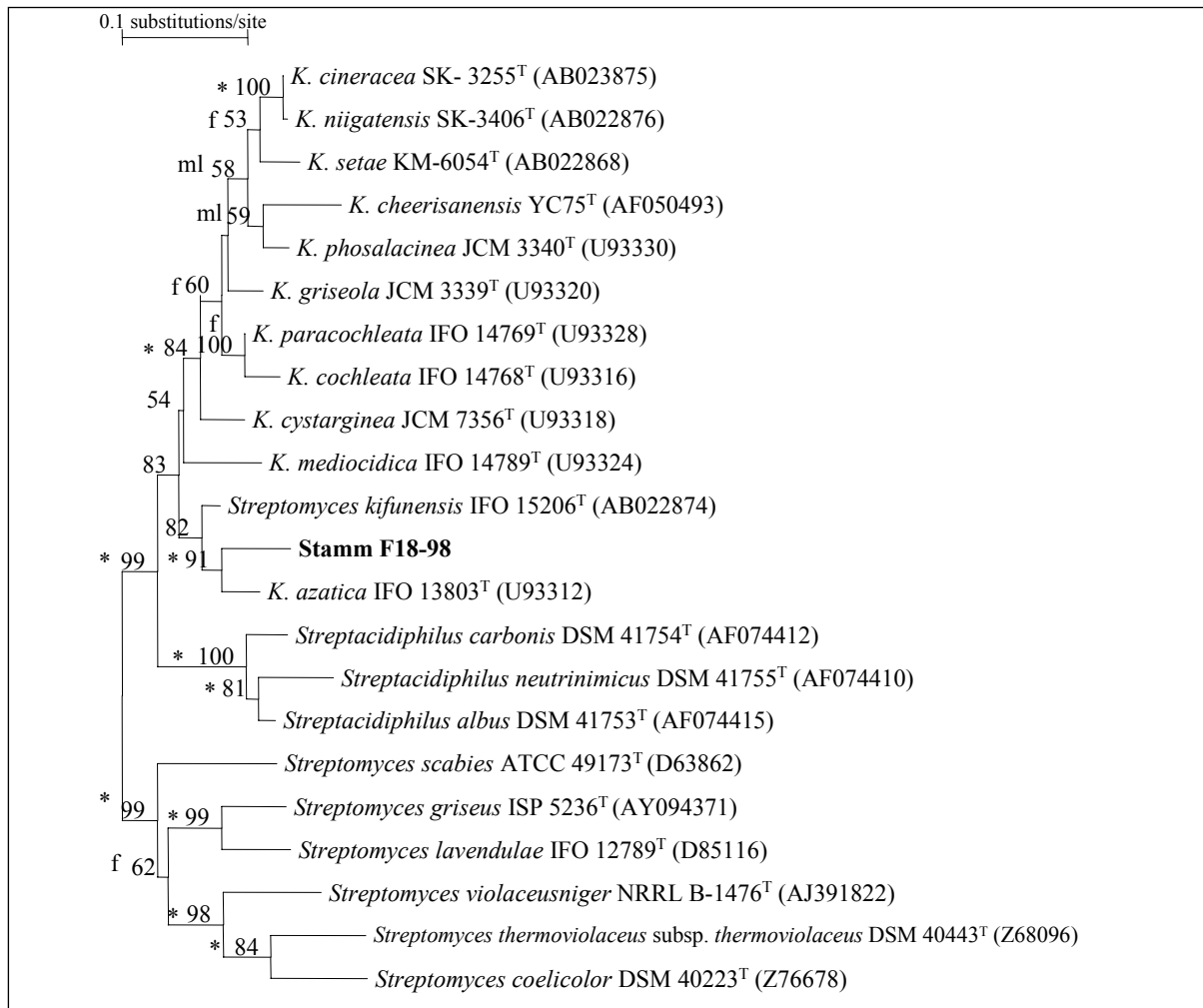


Abbildung 7.1 Phylogenetischer Stammbaum der 16S rDNA Sequenzen, der die Stellung des Stammes F18-98 innerhalb des *Kitasatospora*-Stammbaumes anzeigt (erstellt mit dem Computerprogramm „PHYDIT“ in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Goodfellow, Newcastle, UK). Für weitere Angaben s. a. Groth *et al.*, 2003.

7.1.2 Sequenz der 16S rDNA des Bakterienisolates F18-98

GATATCGAATTCAGTAGTGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC
 GGTGAAGCCCTTCGGGGTGGATCCAGTGCGCAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCT
 GGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCTGGGACCGCATGGTTTCGGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGC
 GCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCC
 GCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCAC
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
 CGGCCTGTCGCGTCGGATGTGAAAAGCCGGGGCTTAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGXAGGGG
 AGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGCCATTA

CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGG
 TGTTGGTCACATTCCACGTGATCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC
 CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
 GACATATGCCGGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACA
 GGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTGCACACGTGC
 TACAATGGTCGGTACAAAAGGGTGCATGCCGTGAGGCGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTG
 CAACTCGACCCATGAAGTTGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACAC
 CGCCCGTCACGTACGAAAGTCCGTAAACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTGTTGGGATGGAGCCGTCGAAGGTGGGACCAG
 CGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTAATCGAATTCGATATC

7.1.3 Sequenz der 16S-23S rDNA „Spacerregion“ des Isolates F18-98

AAGGAGCACATAGCAGCTTCGGGCGAATGTCCGGAGTGCTCGTTCATGGGTGGAACGTTGACTATTCCGGCACACTGGGTTT
 GGTCTGTAGTACTGCTTCGGCGTGAACACAGGGCGTCTCATCCGGTGTGTCGGGCACGTTGTTGGGTCTGAGGGAAACGG
 AAACGTACCTCGGTGATGCCGGCCCATGCTTGTGAGGTGGGTGCTGGTCTGTTGAGAACTGCACAGTGGACGCGAGC
 ATCTGT

Alle aufgeführten Sequenzen zur taxonomischen Bestimmung des Isolates F18-98 sind auch auf der beiliegenden CD unter /Sequenzen/ 16S-Sequenzierung gespeichert.

7.2 Sequenzen des Clusters aus *Kitasatospora putterlickiae* F18-98

Die partielle Nukleotidsequenz des Clusters und die hierin ermittelten offenen Leseraster in Aminosäuresequenz befinden sich auf der beiliegenden CD unter /Sequenzen/ Cluster F18-98.

An dieser Stelle sind nur die Aminosäuresequenzen von *K. putterlickiae* F18-98 für die Oxidoreduktase und die Phosphatase noch einmal aufgeführt.

Oxidoreduktase KitO

VSTAGRGPDDPVRVAVVGLGWAGRTIWLPRLLTAHPAYRVTAVVEPGRGGAEHVPAGAALLADADLLGPDVLDLAVVAVPNHLHT
 PVAERLLARGVPVFLEKPVCLSAEADRLAAAERAGGTVLLAGSAARYRPDVAALTELAADLGPVIRHVDLAWVRASGVPDAGGW
 FTSRRLSGGGALVDLGHLLDQAQAVLGGDVRIPSVLGSLSADFVNDGGRGAGWRGTEGPAGAGDVEDTARGFLLTDTGVSVAV
 RASWASHEPVDTRITVEGATGSATLECTFGFSPNRRVPRLRTRDRGVTTEVPLPGEVGTTEYVRQLDELPAALLADPATRGAAVNR
 AHHTISVIERLYAAARAPRPRLDDEAAALAV.

Phosphatase KitP

MPIDQPAATPTTRPDGHALAAFLPLRAVVFDDLGIVVDSFDMRRAFLTAEEVVDGDNPPFEEYSRHLGRYFPDIMRIMGLPLA
 LEEPFVRESYRLAPQVTVHAGARELLIDLNRGVRLLAVATGKSGPRARSLLDQLGLLHHFDHVLGSDEVPRAKPAPDIVLRALELL
 DVPAERTVMVGDAVTDLASARGAGVGAIAALWGETDEAALLAERPDAVLRPGDLLALLPEVPAH.

7.3 „FramePlot“-Analyse des DNA-Abschnitts (3337 bp) mit dem AHBA-Synthase-, Oxidoreduktase- und Phosphatasegen aus *K. putterlickiae* F18-98

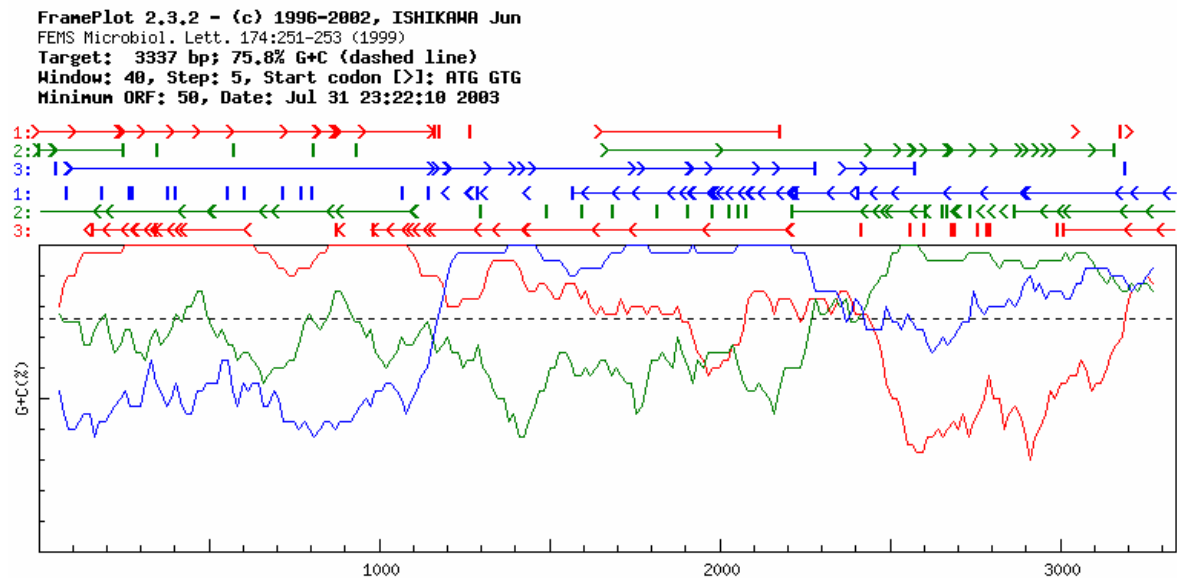


Abbildung 7.2 Analyse des DNA-Abschnitts von 3337 bp aus *K. putterlickiae* mit „FramePlot 2.1“ (s. 3.4.3.2). Das Programm zeigt die sechs unterschiedlichen Leseraster der DNA an und ermittelt für diese den GC-Gehalt. Für kodierende Bereiche liegt der GC-Gehalt oberhalb des durchschnittlichen GC-Gehaltes der eingegebenen Sequenz von 75,8 % (angezeigt durch die waagerechte gestrichelte Linie). Mögliche Start- (ATG und GTG) und Stop-Codons werden durch Pfeile (>) bzw. Striche (|) angezeigt. Das AHBA-Synthasegen beginnt an Position 1 im Leseraster +1 (s. rote Linie). Beinahe unmittelbar nach dem Stop-Codon des AHBA-Synthasegens beginnt der für die Oxidoreduktase kodierende Genabschnitt im Leseraster +3 (dargestellt durch die blaue Linie). Im Leseraster +2 (grüne Linie) folgt auf das Oxidoreduktasegen in einem geringen Abstand das Gen der Phosphatase.

7.4 Cosmid-Karte für die Cosmide pTBc1 und pTBc2

Cosmidkartierung von pTBc1/ pTBc2

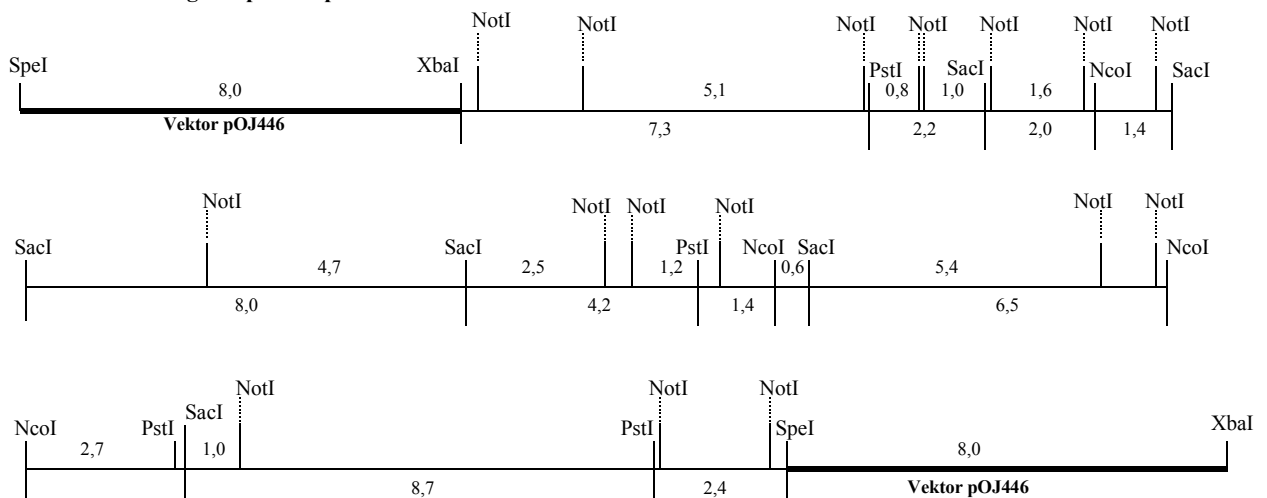


Abbildung 7.3 Linerisierte Cosmid-Karte der Cosmide pTBc1/ pTBc2 (der DNA-Abschnitt des Cosmid-Vektors pOJ446 ist aus Gründen der Übersichtlichkeit am Anfang und Ende der inserierten DNA eingezeichnet). Schnittstellen für das Enzym NotI sind nur aufgeführt, soweit sie sich sicher bei der Kartierung ermitteln ließen.

7.5 ESI-MS-Spektrogramme für den Funktionstest der AHBA-Synthese

Display Report

Analysis Info:

File:
 Date acquired: Tue Aug 14 14:22:56 2001
 Instrument: Esquire-LC 00066
 Task :
 Method :
 Description: AHBA lprSETB AHBA

Printed: Tue Aug 14 14:26:51 2001

Operator : Default

Sample :

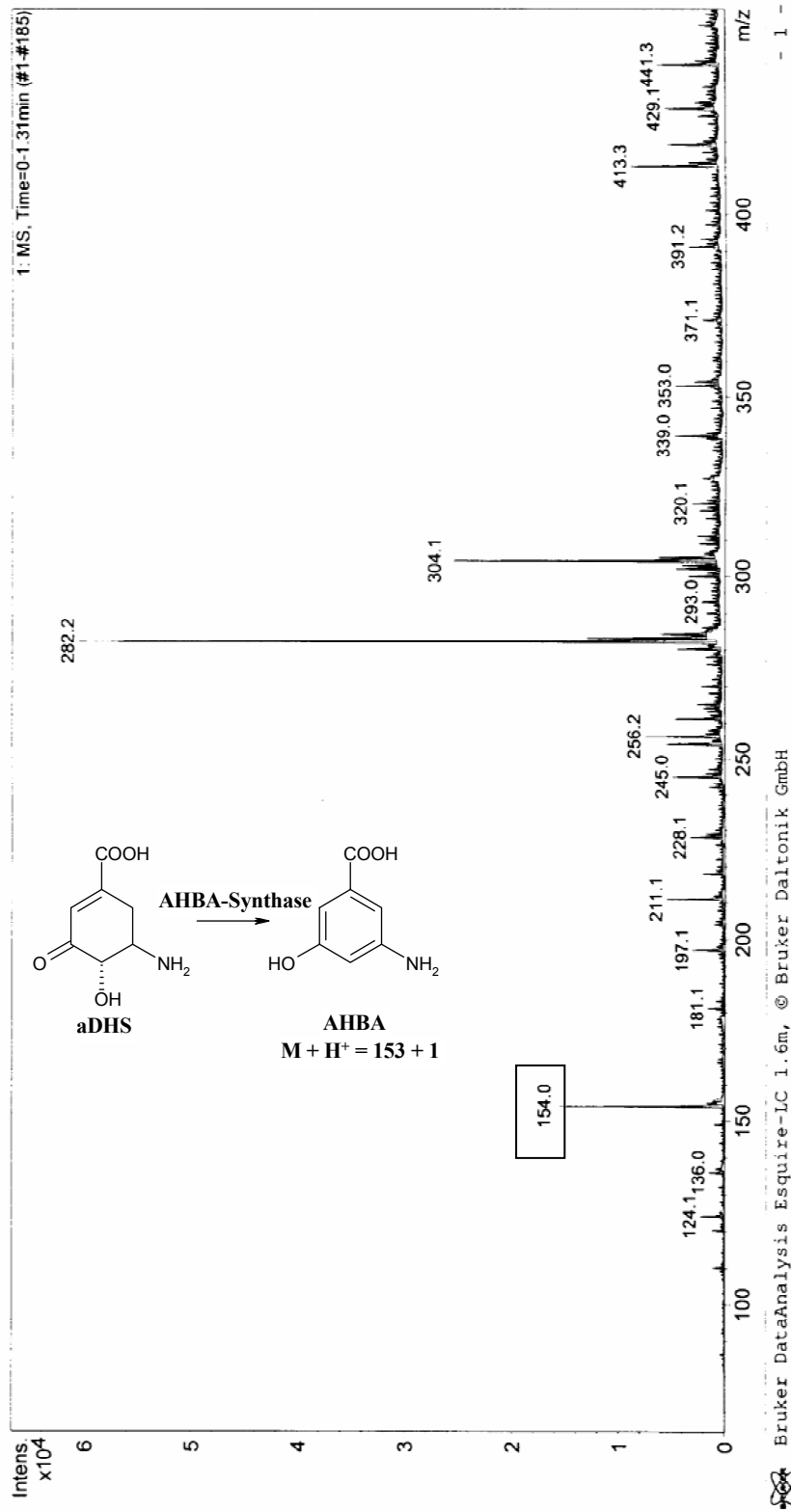


Abbildung 7.4 ESI-MS-Spektrogramm. Untersuchung der Aktivität der AHBA-Synthase aus *K. putterlickiae* im zellfreien Extrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ 1pRSETB (AHBA). Detektion der Umsetzung von Aminodehydroshikimisäure (aDHS) zu AHBA (s. a. 3.4.1.5).

Display Report

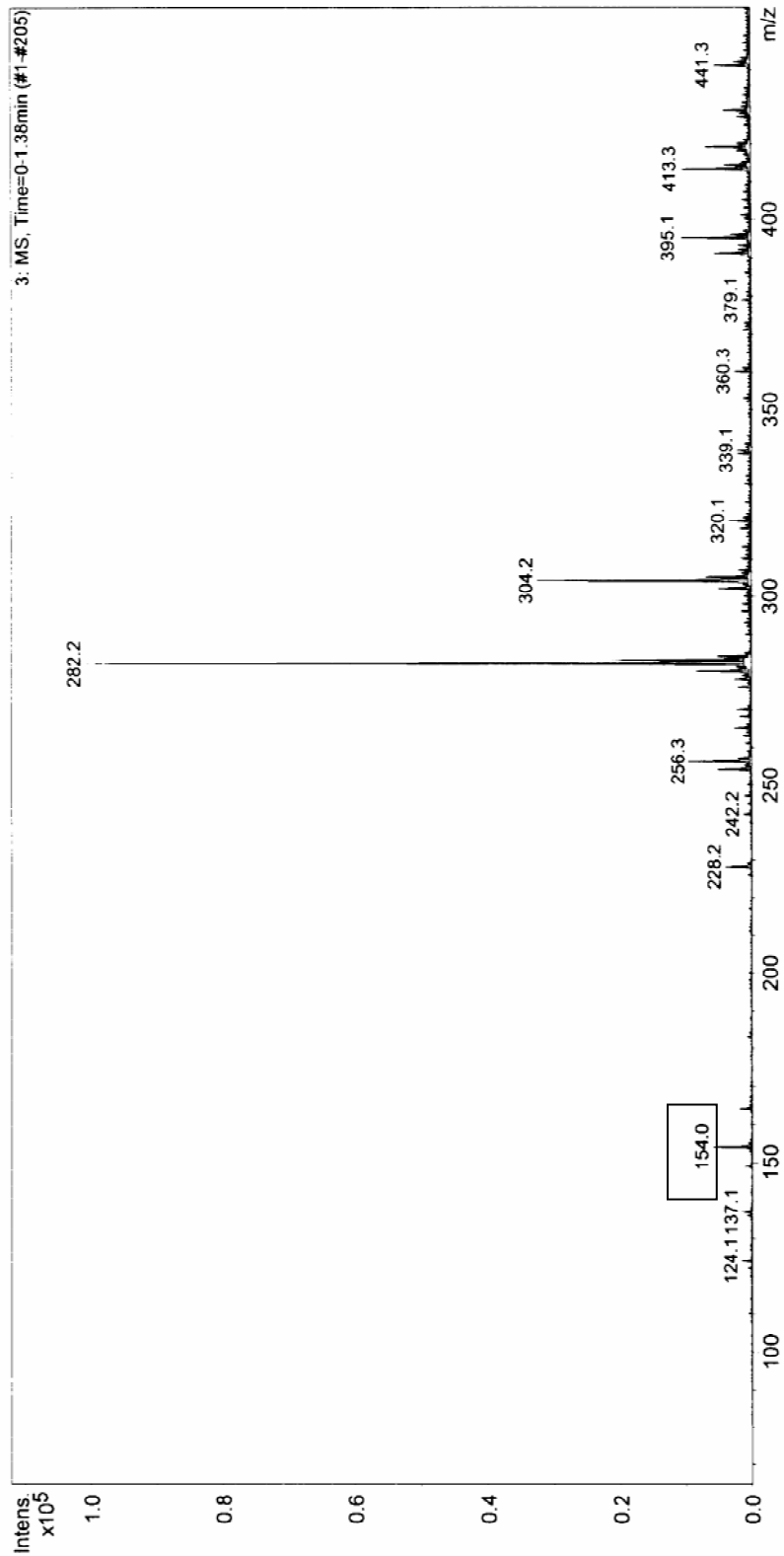
Analysis Info:

File:
 Date acquired: Tue Aug 14 14:43:16 2001
 Instrument: Esquire-LC 00066
 Task :
 Method :
 Description: AHBA E6 positive control

Printed: Tue Aug 14 14:45:36 2001

Operator : Default

Sample :




 Bruker DataAnalysis Esquire-LC 1.6m, © Bruker Daltonik GmbH
 Licensed to Mass Spectrometry Facility, University of Washington Chemistry Department

Abbildung 7.5 ESI-MS-Spektrogramm. Positivkontrolle. Untersuchung der Aktivität der AHBA-Synthase aus *A. mediterranei* im zellfreien Extrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/EAHBA6. Detektion der Umsetzung von Aminodehydroshikimisäure (aDHS) zu AHBA (s. a. 3.4.1.5).

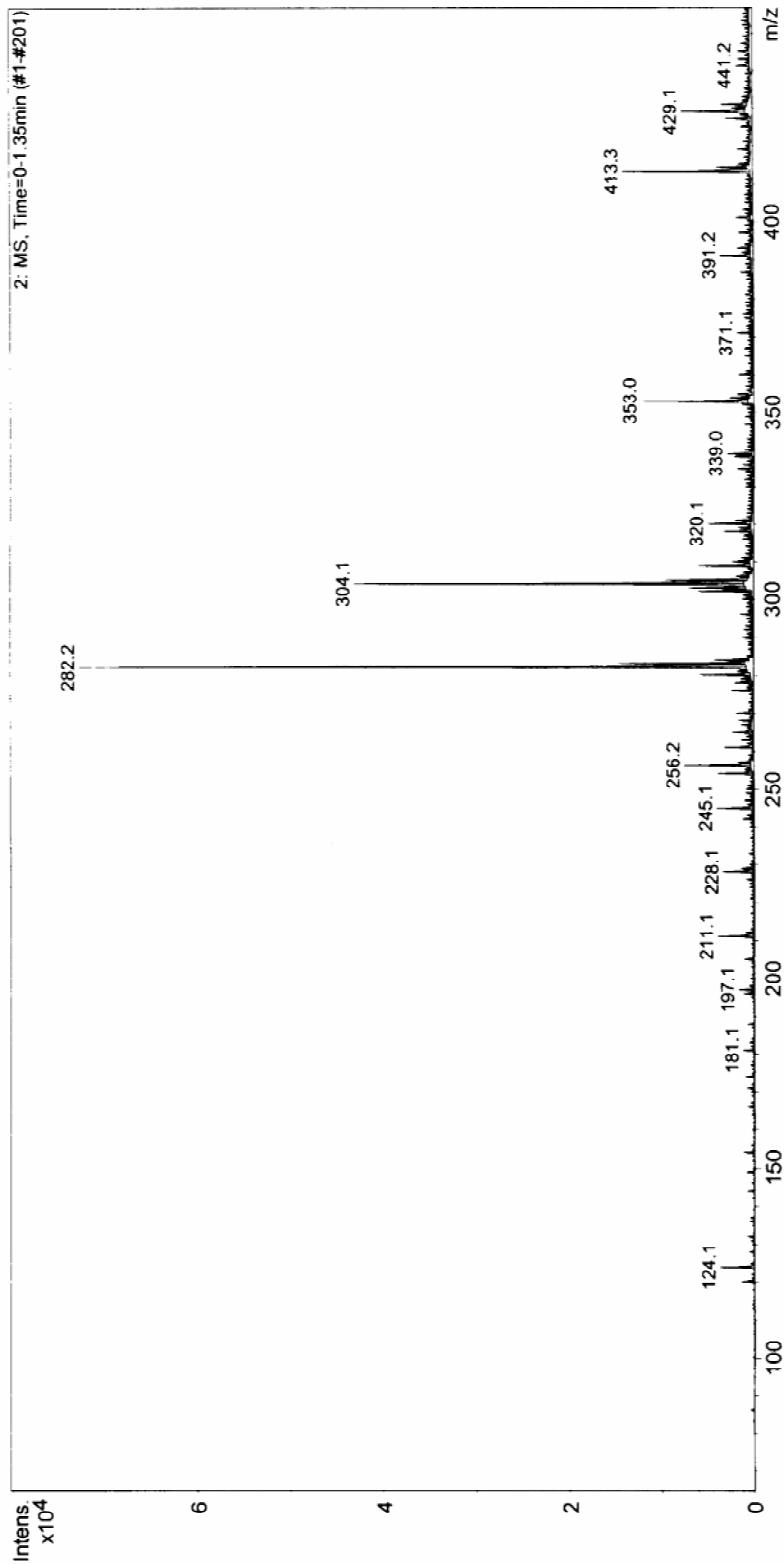
Display Report

Analysis Info:

File:
 Date acquired: Tue Aug 14 14:34:45 2001
 Instrument: Esquire-LC 00066
 Task :
 Method :
 Description: AHBA negative control

Printed: Tue Aug 14 14:37:37 2001

Operator : Default
 Sample :



Bruker DataAnalysis Esquire-LC 1.6m, © Bruker Daltonik GmbH
 Licensed to Mass Spectrometry Facility, University of Washington Chemistry Department

Abbildung 7.6 ESI-MS-Spektrogramm. Negativkontrolle. Kontrollinkubation mit dem zellfreien Extrakt von *E. coli* BL21(DE3)pLysS/ pRSET B. Eine Bildung von AHBA konnte nicht detektiert werden (s. a. 3.4.1.5).

7.6 Bakterienisolate von *Claopodium crispifolium*

Tabelle 7.1 Bakterienisolate mit antibiotischer Aktivität gegen *P. avellaneum*

Bakterienisolat	Isolationsmedium	Biotest mit	Hemmhof [mm]	Southern Hybridisierung [AHBA-Synthase]
4Z1C	CSA	CSA	10 mm	positiv
4Z2C	CSA	CSA	11 mm	
4Z7C	CSA	CSA	20 mm	
5aZ3G	NL1153	NL1153	20 mm	
5aZ4G	NL1153	NL1153	21 mm	
5bZ3C	CSA	CSA	11 mm	
7aY1C	CSA	CSA	9 mm	
7aY1G	NL1153	NL1153	24 mm	positiv
7aY6C	CSA	CSA	22 mm	positiv
7bY4C	CSA	CSA	schwach	
7cY1C	CSA	CSA	12 mm	
7cY7C	CSA	CSA	11 mm	
7cZ1C	CSA	CSA	12 mm	
7cZ1G	NL1153	ISP 2	17 mm	positiv
7cZ4C	CSA	CSA	15 mm	
7cZ6C	CSA	CSA	11 mm	
8bZ4C	CSA	CSA	10 mm	positiv

7.7 Karten der verwendeten Vektoren

Die Angaben zu den verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren befinden sich auf der beiliegenden CD unter /Vektoren.

7.8 Herstellerangaben

Auf der beiliegenden CD finden sich die Herstellerangaben zum

- DNeasy Plant Mini and Plant Maxi Kit, Qiagen
- QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen
- QIAexpressionist, Qiagen
- TALON Metal Affinity Resin User Manual, BD Biosciences
- DIG Application Manual for Filter Hybridisation, Roche
- Sequenzieren mit ABI-Prism, Applied Biosystems
- TOPO-TA-Cloning Kit, Invitrogen
- pGem-T-Easy-Vektor Kit, Promega
- Centriplus-Konzentratoren, Millipore/ Amicon
- Gigapack III Gold Packing Extract, Stratagene