
Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen zur Biosynthese
von Novobiocin
in *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

Marion Steffensky

Tag der mündlichen Prüfung:

18.09.2000

Dekan:

Prof. Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. L. Heide

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Wohlleben

I	ZUSAMMENFASSUNG	1
II	EINLEITUNG.....	3
1	Streptomyces - eine Gattung mit großem Potential zur Produktion von Sekundärmetaboliten	3
2	Die Gruppe der Aminocumarin-Antibiotika	4
2.1	Struktur, Biosynthese und bisherige Klonierungsstrategien	4
2.2	Wirkungsweise der Aminocumarin-Antibiotika.....	6
2.2.1	Die bakterielle DNA-Gyrase als Target der Aminocumarin-Antibiotika	6
2.2.2	Wirkungsspektrum und therapeutische Anwendungsgebiete des Novobiocins	8
3	Kombinatorische Biosynthese als gentechnologisches Verfahren zur gezielten Arzneistoff-Modifikation und Optimierung von Wirkstoffstrukturen.....	9
4	Aromatische Prenyltransferasen.....	11
5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	12
III	MATERIAL UND METHODEN.....	15
1	Chemikalien, Säulenmaterialien, Nährmedien, Puffer und Synthesen.....	15
1.1	Chemikalien und Medienbestandteile	15
1.2	Säulenmaterialien	16
1.3	Enzyme und Kits	17
1.4	Medienbestandteile	17
1.4.1	Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	18
1.4.2	Medien zur Kultivierung von Streptomyceten	19
1.4.3	Medien zur Protoplastentransformation von Streptomyceten.....	20
1.5	Antibiotika.....	20
1.6	Puffer und Lösungen.....	21
1.6.1	Puffer zur Enzymreinigung.....	21
1.6.2	Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung von Proteingelen	22
1.6.3	Lösungen zur Proteinbestimmung	23
1.6.4	Puffer zur DNA-Gelelektrophorese	23
1.6.5	Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten.....	23
1.6.6	Lösungen zur Transformation und Selektion von <i>E. coli</i>	24
1.6.7	Puffer zur DNA-Isolierung	24
1.6.8	Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierungen	25
2	Plasmide und Bakterienstämme.....	26
2.1	Vektoren.....	26
2.2	Bakterienstämme	29
3	Kulturbedingungen	30
3.1	Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i>	30
3.2	Anzucht und Kultivierung von Streptomyceten	30

3.2.1	Anzucht in Fest- und Flüssigmedien.....	30
3.2.2	Herstellung von Sporensuspensionen und Glycerindauerkulturen.....	30
4	Methoden der Molekularbiologie.....	31
4.1	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	31
4.1.1	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen	31
4.1.2	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i> und Blau-Weiß-Selektion	31
4.2	Elektroporations-vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	31
4.2.1	Herstellung elektrotransformationskompetenter Zellen	32
4.2.2	Elektroporation.....	32
4.3	Protoplastierung von <i>Streptomyces lividans</i> TK24	32
4.4	Transformation von Streptomyceten.....	32
4.5	Isolierung von Plasmid-DNA	33
4.5.1	Plasmidminipräparationen aus <i>E. coli</i>	33
4.5.2	Plasmidmaxipräparationen aus <i>E. coli</i>	33
4.5.3	Plasmid-Isolierung aus Streptomyceten	33
4.6	Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA.....	34
4.6.1	Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA	34
4.6.2	Alkoholfällung.....	34
4.6.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	34
4.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	34
4.7.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	35
4.8	DNA-Manipulationen.....	35
4.8.1	Restriktionsspaltung von DNA	35
4.8.2	Auffüllreaktion von DNA mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase	36
4.8.3	Dephosphorylierung von DNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase	36
4.8.4	DNA-Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase.....	36
4.8.5	Southern Hybridisierung von DNA.....	36
4.8.5.1	Enzymabhängige „Random Prime“- DIG-Markierung von DNA-Fragmenten.....	36
4.8.5.2	Chemische DIG-Markierung von DNA-Fragmenten	37
4.8.5.3	Southern Blot.....	37
4.8.5.4	Hybridisierung, Waschbedingungen und Detektion	38
4.8.6	Cosmid-Kartierungs-Methode	38
4.8.7	PCR-Methoden	39
4.8.7.1	Cosmid-Kartierung	39
4.8.7.2	Herstellung von Plasmidkonstrukten zur Überexpression der Novobiocinsäure-Synthetase	40
4.9	Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung	41
4.9.1	Geräte, Kits und Sequenzierreaktion	42
4.9.2	Bedingungen der Cycle Sequencing-Amplifikation.....	42
4.9.3	Herstellung des Sequenziergels und Laufbedingungen	42
4.9.4	Sequenzauswertung	43
5	Methoden der Biochemie	43
5.1	Herstellung von zellfreien Enzymrohextrakten.....	43
5.1.1	Standard-Zellaufschluß von <i>E. coli</i>	43
5.1.2	Herstellung von Enzymrohextrakt zur Reinigung rekombinant exprimierter Novobiocinsäure-Synthetase in <i>E. coli</i>	43
5.1.3	Zellanzucht und Zellaufschluß von <i>Streptomyces spheroides</i> DSM 40292 zur Untersuchung der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dimethylallyltransferase-Aktivität	44

5.1.4	Zellanzucht und Zellaufschluß von <i>Streptomyces lividans</i> TK24 zur Untersuchung rekombinant exprimierter Proteine.....	44
5.2	Proteingehaltsbestimmung	44
5.3	Bestimmung von Enzymaktivitäten	45
5.3.1	Bestimmung der DMAPP-IPP-Isomerase- und Phosphatase-Aktivität.....	45
5.3.2	Bestimmung der 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität	45
5.3.3	Bestimmung der Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität.....	45
5.3.4	ATP- 32 -P]PP _i -Austauschreaktion.....	46
5.4	Verfahren zur Enzymreinigung und -charakterisierung	46
5.4.1	Geräte, Regenerierung und Lagerung der Säulenmaterialien.....	46
5.4.2	Partielle Reinigung der 4HPP Dimethylallyltransferase aus <i>S. spheroides</i> DSM 40292..	47
5.4.2.1	DEAE-Sephacel-Säule.....	47
5.4.2.2	Ammoniumsulfat-Fällung (0-70%)	47
5.4.3	Reinigung der Novobiocinsäure-Synthetase	47
5.4.3.1	Nickel-Affinitäts-Chromatographie	47
5.4.3.2	Gelfiltrations-Chromatographie über Superdex 200	48
5.4.4	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes.....	48
5.4.5	Ultrazentrifugation	49
5.4.6	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
5.4.7	Bestimmung der Löslichkeit des überexprimierten Novobiocinsäure-Synthetase-Histidin-Fusionsproteins.....	50
5.4.8	Resolubilisierung von Inclusion Bodies.....	50
5.4.8.1	Waschen von Inclusion Bodies	50
5.4.8.2	Resolubilisierung von Inclusion Bodies.....	50
6	Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen.....	51
6.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	51
6.1.1	Geräte, Säulen und Fließmittel	51
6.1.2	Analytik von 3DMA-4HPP und anderen prenylierten Aromaten	51
6.1.3	Analytik von Novobiocin und Novobiocinsäure	52
6.2	Präparative Isolierung von 3DMA-4HPP.....	53
6.3	Präparative Isolierung von Novobiocinsäure	53
6.4	Enzymatische Synthese und präparative Isolierung von GBA	54
6.5	Präparative Isolierung von GBA-Ring B (Dimethylallyl-Novobiocinsäure).....	54
7	Radioaktivitätsmessungen im Szintillationszähler	54
7.1	Quantifizierung von Isopentenol und Dimethylallylalkohol.....	54
7.2	Quantifizierung des im 4HPP Dimethylallyltransferase-Assay gebildeten 3DMA-4HPP	55
7.3	Quantifizierung von 32 -P]ATP	55
8	Synthese von Drupanin	55
IV	ERGEBNISSE.....	57
1	Identifizierung der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dimethylallyltransferase aus <i>Streptomyces spheroides</i>	57
1.1	Einleitung	57
1.2	Detektion von 4-Hydroxyphenylpyruvat Prenyltransferase-Aktivität in Rohextrakten von <i>Streptomyces spheroides</i> DSM 40292	57
1.3	Lokalisation der 4HPP Dimethylallyltransferase	58

1.4	Partielle Reinigung der 4HPP Dimethylallyltransferase.....	59
1.5	Identifizierung der Reaktionsprodukte der 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktion.....	60
1.5.1	¹ H-NMR-Spektroskopie.....	61
1.5.2	Massenspektroskopie.....	62
1.5.3	Interpretation der Ergebnisse.....	63
1.6	Charakterisierung der 4HPP Dimethylallyltransferase aus <i>S. spheroides</i>	64
1.6.1	Metallionenabhängigkeit.....	65
1.6.2	Bestimmung des pH-Optimums.....	65
1.6.3	Bestimmung des Temperaturoptimums.....	66
1.6.4	Substratspezifität.....	67
1.6.5	Stabilität.....	67
2	Identifizierung und Sequenzierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters aus <i>S. spheroides</i> NCIMB 11891.....	68
2.1	Einleitung.....	68
2.2	Charakterisierung und Analyse der Cosmide 9-6G und 10-9C.....	68
2.2.1	Restriktionskartierung und Hybridisierungskartierung.....	69
2.2.2	Sequenzierung der Cosmide 9-6G und 10-9C.....	74
2.2.2.1	<i>Enzyme der Desoxyzucker-Biosynthese</i>	78
2.2.2.2	<i>Glycosyltransferase</i>	79
2.2.2.3	<i>Oxidoreduktasen</i>	79
2.2.2.4	<i>Methyltransferasen</i>	81
2.2.2.5	<i>Carbamoyltransferase</i>	83
2.2.2.6	<i>Adenylat-bildende Enzyme</i>	83
2.2.2.7	<i>ABC-Transporter</i>	87
2.2.2.8	<i>Proteine mit regulatorischer Funktion</i>	89
2.2.2.9	<i>Resistenzgen gyrB^R</i>	91
2.2.2.10	<i>Weitere Proteine mit unbekannter Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese</i>	91
2.2.2.11	<i>Begrenzung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters</i>	92
3	Identifizierung des 4-Hydroxyphenylpyruvat Dimethylallyltransferase-Gens.....	93
3.1	Entwicklung von Klonierungsstrategien.....	93
3.2	Screening von heterolog exprimierten Cosmid-Subklonen nach 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität.....	94
3.2.1	Subklonierung.....	94
3.2.2	Test auf Plasmidstabilität von pEM4-Konstrukten in <i>S. lividans</i> TK24.....	95
3.2.3	Funktionelle Untersuchung von Cosmidsubklonen auf 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität.....	96
3.3	Screening der Cosmide mit einer degenerierten Prenyltransferase-Sonde.....	96
3.4	Sequenzanalyse der Cosmide und Homologievergleich auf Proteinebene.....	99
4	Klonierung und funktionelle Expression der Novobiocinsäure-Synthetase aus <i>S. spheroides</i> NCIMB 11891.....	100
4.1	Identifizierung des Novobiocinsäure-Synthetase-Gens.....	100
4.2	Heterologe Überexpression von <i>novL</i> in <i>E. coli</i>	104
4.2.1	Überexpression von <i>novL</i> in <i>E. coli</i> als N-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein.....	105
4.2.2	Überexpression von <i>novL</i> in <i>E. coli</i> als C-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein.....	106
4.2.2.1	<i>Präparation des C-terminalen Novobiocinsäure-Synthetase-Histidin-Fusionsproteins unter denaturierenden Bedingungen und Rückfaltung</i>	109

4.2.2.2	Erhöhung der Löslichkeit der rekombinanten Novobiocinsäure-Synthetase durch Optimierung der Expressionsbedingungen.....	110
4.2.3	Reinigung der Novobiocinsäure-Synthetase als C-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein.....	111
4.3	Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Novobiocinsäure-Synthetase aus <i>S. spheroides</i>	113
4.3.1	Bestimmung der Zeit-, Proteinmengen- und Cofaktor-Abhängigkeit.....	114
4.3.2	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes.....	114
4.3.3	Bestimmung des pH-Optimums.....	114
4.3.4	Einfluß der Ionenstärke.....	115
4.3.5	Substratspezifität des Nukleotidtriphosphates.....	115
4.3.6	Substratspezifität.....	116
4.3.7	Michaelis-Menten-Kinetik der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion.....	118
4.3.8	ATP-abhängiger Mechanismus der Aktivierung.....	118
V	DISKUSSION.....	121
1	Klonierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters aus <i>S. spheroides</i> NCIMB 11891 ...	121
2	Kartierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters.....	123
3	Sequenzierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters.....	124
3.1	Biosynthesegene des Desoxyzuckers Novoise (Ring C).....	124
3.2	Biosynthese der Aminocumarin-Einheit (Ring B).....	127
3.3	Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit (Ring A).....	130
3.3.1	Die Prenylierung erfolgt auf der Stufe des 4-Hydroxyphenylpyruvates.....	130
3.3.2	Die Suche nach dem 4HPP Dimethylallyltransferase-Gen.....	132
3.3.3	Seitenkettenverkürzung des Tyrosins zur prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure.....	135
3.4	Verknüpfung der Ringsysteme und abschließende Modifikationen.....	136
3.5	Begrenzung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters.....	138
3.6	Homologien zum Coumermycin A1-Biosynthese-Cluster.....	139
4	Funktionelle Untersuchungen zur Novobiocinsäure-Synthetase.....	140
4.1	<i>novL</i> codiert für die Amidsynthetase.....	140
4.2	Überexpression und Reinigung der Novobiocinsäure-Synthetase als C-terminales Hexahistidin-Fusionsprotein.....	142
4.3	Biochemischer Nachweis der Adenylierungsfunktion von NovL.....	143
4.4	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Novobiocinsäure-Synthetase.....	144
VI	LITERATUR.....	147
VII	ANHANG.....	165
1	DNA-Sequenz der bei der Cosmid-Kartierungsmethode verwendeten Sonden SuperCos 1-T3 und SuperCos 1-T7.....	165
2	Sequenzierung eines 53,1 kb Abschnitts (Cosmide 9-6G und 10-9C) aus dem Novobiocin-Biosynthesecluster aus <i>S. spheroides</i> NCIMB 11891.....	166

Abkürzungen

(His) ₆	Hexahistidin
°C	Grad Celsius
μ	mikro
4CL	4-Coumarat:CoA Ligase
4HB	4-Hydroxybenzoesäure
4HPL	4-Hydroxyphenyllactat
4HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
6xHis	Hexahistidin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding Casette
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphat-Hydrolase
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CDM	chemisch definiertes Medium
CoA	Coenzym A
cpm	Impuls pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DIG	Digoxigenin
DMA	Dimethylallyl
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMS	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuclease
dNDP	Desoxynukleosiddiphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPFG-NOE	double pulsed-field-gradient nuclear overhauser effect
dpm	digits per minute
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	electron impact
ESI	electron spray impact
FGPP	Farnesylgeranyldiphosphat
FPP	Farnesyldiphosphat
g	Gramm
GBA	3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure
GC-Gehalt	Gehalt an Guanotin und Cytosin
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GPP	Geranylsiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
gyrB	Gyrase B

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCOOH	Ameisensäure
HMW	high molecular weight
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HTH	Helix-Turn-Helix
Hz	Hertz
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
k	kilo
kat	katal, katalytische Aktivität (Umsetzung von 1 mol Substrat pro Sekunde)
K_{av}	Koeffizient zur Erstellung einer Kalibrierungskurve
kb	Kilobasenpaare
eV	Elektronenvolt
k_m	Michaelis-Menten-Konstante
KP _i	Kaliumphosphat-Puffer
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
LB	Luria und Broth
LMW	Low molecular weight
M	molar
m	milli
mcs	multiple cloning site
MDR	Multiple Drug Resistance
min	Minuten
M_r	Molekulargewicht
MS	Massenspektrum
n	nano
n.b.	nicht beschrieben
n.d.	nicht detektiert
NAD	β -Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
NBSS	Novobiocinsäure-Synthetase
NCIMB	National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria
NDP	Nukleosiddiphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat-Agarose
NMR	nuclear magnetic resonance
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p	pico
p.a.	pro analysis
pB SK(-)	pBluescript SK(-)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG 1000	Polyethylenglykol
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP _i	Diphosphat
ppm	parts per million
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
RBS	ribosomale Bindungsstelle
Ring A	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure
Ring B	3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcumarin
Ring C	Noviose
RNase	Ribonuklease
RP	reversed phase

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S.	<i>Streptomyces</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tris-Maleat	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-maleat
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTP	Thymidintriphosphat
U	unit
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v	Volumen
V_0	Ausschlußvolumen
V_e	Elutionsvolumen
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
V_t	Totvolumen
w	Gewicht
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

Weitgehende Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**Wissenschaftliche Publikationen:**

Steffensky, M., Li, S.-M., Vogler, B., Heide, L. (1998) Novobiocin biosynthesis in *Streptomyces spheroides*: identification of a dimethylallyl diphosphate: 4-hydroxyphenylpyruvate dimethylallyl transferase. FEMS Microbiol. Lett. **161**: 69-74

Steffensky, M., Mühlenweg, A., Wang, Z.-X., Li, S.-M., Heide, L. (2000) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. Antimicrob. Agents Chemother. **44**: 1214-1222

Steffensky, M., Li, S.-M., Heide, L. (2000) Cloning, overexpression, and purification of novobiocic acid synthetase from *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891. J. Biol. Chem. **275**: 21754-21760

Tagungsbeiträge:**Poster:**

Steffensky, M., Mühlenweg, A., Wang, Z.-X., Li, S.-M., Vogler, B., Heide, L. Biosynthesis of the antibiotic Novobiocin. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Tübingen 1998.

Vortrag:

Steffensky, M., Mühlenweg, A., Wang, Z., Hennig, S., Wemmakor, E., Li, S., Heide, L. Cloning of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Freiburg 1999.

I Zusammenfassung

Novobiocin (Albamycin[®], Pharmacia & Upjohn) ist ein Humanantibiotikum, das in den USA zur Therapie von Infektionen mit multiresistenten, grampositiven Bakterien zugelassen ist. Es wird von *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891 produziert. Novobiocin besteht aus einer prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit (Ring A), einer substituierten 3-Aminocumarin-Einheit (Ring B) und einem Desoxyzucker (Ring C) (siehe Kapitel II, Abb. 1).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit stand die biochemische Aufklärung der Prenylierungsreaktion innerhalb der Biosynthese der substituierten 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit (Ring A) im Mittelpunkt. Es gelang der Nachweis einer Dimethylallyldiphosphat:4-Hydroxyphenylpyruvat Dimethylallyltransferase (4HPP Dimethylallyltransferase), die spezifisch die Umsetzung von 4-Hydroxyphenylpyruvat (4HPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) zu 3-Dimethylallyl-4-hydroxyphenylpyruvat katalysiert. Das Reaktionsprodukt wurde durch MS- und ¹H-NMR-Spektroskopie identifiziert. Nach partieller Reinigung der 4HPP Dimethylallyltransferase durch DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie wurde die Prenyltransferase hinsichtlich Metallionen-Abhängigkeit, pH-Optimum, Temperatur-Optimum und Substratspezifität für das aromatische und isoprenoide Substrat charakterisiert. Es handelte sich um ein lösliches Protein. Aufgrund seiner Eigenschaften konnte eine klare Abgrenzung zu aromatischen Prenyltransferasen des Primärstoffwechsels und zu bisher bekannten, vergleichbaren Enzymen des Sekundärstoffwechsels aufgezeigt werden. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die 4HPP Dimethylallyltransferase in die Novobiocin-Biosynthese involviert ist, und daß die Isoprenylierung im Verlauf der Biosynthese von Ring A auf der Stufe des 4HPP erfolgt.

Der zweite Teil dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Identifizierung und Sequenzierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters. In Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe waren durch Screening einer Cosmidbank von *S. spheroides* mit homologen dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Sonden zwei unterschiedliche Cosmidgruppen detektiert worden. Durch Sequenzierarbeiten im Rahmen dieser Arbeit konnte das Novobiocin-Resistenz-Gen *gyrB*^R innerhalb einer der Cosmid-Gruppen identifiziert werden. Diese Cosmid-Gruppe wurde detailliert kartiert. Im Bereich der Cosmide 9-6G und 10-9C, welche einen etwa 58 kb großen genomischen Bereich umfaßten, wurden 53,1 kb einzelsträngig und davon 30,5 kb doppelsträngig sequenziert. Ein zentraler Bereich von 25,6 kb ist in der Datenbank Genbank[™] unter der Datenbanknummer AF170880 hinterlegt. Die Sequenzanalyse ergab das Vorliegen von 42 offenen Leserahmen innerhalb der gesamten Region, von denen 14 eine putative Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese zugeordnet werden konnte.

Ein Funktionsnachweis des identifizierten Clusters wurde durch die Klonierung und heterologe Expression der Novobiocinsäure-Synthetase erbracht. Die Expression eines 9,7 kb großen *EcoRI*-Fragmentes aus Cosmid 9-6G in *Streptomyces lividans* TK24 führte zu Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität. Die Herstellung und Expression verkürzter Konstrukte belegte, daß diese Enzymaktivität durch ein einziges Gen, *novL*, codiert wird. Das 527 Aminosäuren große Enzym NovL mit einem theoretischen Molekulargewicht von 56.885 Da konnte sowohl als N- als auch als C-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein aktiv in

Escherichia coli überexprimiert werden. Die rekombinante Novobiocinsäure-Synthetase NovL-(His)₆ wurde bis zur annähernden Homogenität durch Nickel-Affinitäts- und Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt. Das gereinigte Enzym katalysierte die ATP-abhängige Bildung der Amidbindung zwischen 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoessäure (Ring A) und 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcumarin (Ring B) zur Novobiocinsäure. NovL zeigte ausgeprägte Homologien zur Familie der Adenylat-bildenden Enzyme. Die Bildung eines Acyl-Adenylat-Intermediates aus Ring A und ATP konnte mit Hilfe eines ATP-PP_i-Austausch-Assays demonstriert werden. Die Novobiocinsäure-Synthetase weist sowohl Aktivierungs- als auch Transferfunktion auf, kann also auch die Übertragung der Acyl-Gruppe auf die Aminogruppe von Ring B katalysieren. Durch Gelfiltrations-Chromatographie konnte gezeigt werden, daß das Enzym in seiner nativen Form als Monomer vorliegt. Die Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion war spezifisch für das Nukleotidtriphosphat ATP und abhängig von der Anwesenheit divalenter Kationen. Ferner zeigte die Reaktion die typische Michaelis-Menten-Kinetik, und es konnten K_m -Werte von 19 μM für Ring A und 131 μM für Ring B ermittelt werden. Es wurde eine Wechselzahl von 2,9 s^{-1} für das gereinigte Enzym berechnet. Bei der Bestimmung der Substratspezifität wurde von den getesteten Ring A-Analoga lediglich 3-Geranyl-4-hydroxybenzoessäure und zu einem geringeren Maß 3-Methyl-4-aminobenzoessäure als Substrat akzeptiert.

Der im ersten Teil der Arbeit biochemisch nachgewiesenen 4HPP Dimethylallyltransferase konnte bisher keines der sequenzierten Strukturgene zugeordnet werden.

II Einleitung

1 Streptomyces - eine Gattung mit großem Potential zur Produktion von Sekundärmetaboliten

Die Gattung Streptomyces gehört mit mehr als 600 Arten zur Gruppe der obligat aeroben, grampositiven coryneformen Bakterien und Actinomyceten (Bergey, 1984; Woese, 1987). Ihre charakteristische morphologische Komplexität, die sich in ihrer Fähigkeit zum filamentösen Wachstum und zur Differenzierung in Substrat- und Luftmycel äußert, gab ursprünglich Anlaß für erste genetische Untersuchungen an dieser extrem heterogenen Gruppe von Bodenbakterien. Die morphologische Differenzierung des vegetativen Substratmycels zum charakteristischen Luftmycel bei verschlechterten Milieubedingungen und der schließlich eintretende Prozeß der Sporulation erfordert eine vielgestaltige und flexible metabolische Aktivität zur Produktion Differenzierungs- und Zellzyklus-spezifischer Signalsubstanzen. Sie geht also auch mit einer physiologischen Differenzierung einher (Chater, 1998). Die außerordentliche Stoffwechselvariabilität zeigt sich ebenso in der Produktion einer Fülle von Sekundärmetaboliten, die während der Differenzierungsphase gebildet werden, darunter auch von antibiotisch wirksamen Substanzen (Maplestone et al. 1992).

Mehr als 70 % der bisher bekannten nahezu 10.000 Sekundärmetabolite, die als Bakterizide, Fungizide, Viruzide, Zytostatika, Insektizide, Herbizide usw. wirksam sind, werden durch die Ordnung der Actinomycetales gebildet (Gräfe, 1992). Die Genetik der Streptomyceten zeichnet sich durch eine Vielzahl besonderer struktureller und funktioneller Merkmale aus:

Die Genome der Streptomyceten sind mit einer Grösse von 8.000-10.000 kb verhältnismäßig groß und weisen einen extrem hohen GC-Gehalt von durchschnittlich mehr als 70 % auf (Bibb et al. 1984; Gladek und Zakrzewska, 1984). Auffällig ist ferner die genetische Instabilität der Streptomyceten, die sich in einer hohen Deletions- und Amplifikations-Frequenz zeigt (Voff und Altenbuchner, 1998). Die Klonierung einer Vielzahl von Genen, die in die Biosynthese von Antibiotika, Pigmenten und anderen Sekundärmetaboliten involviert sind, führte zu einem umfassenden Bild der Organisation dieser nicht für das Wachstum essentiellen Gene. Gene für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten, sowie Gene für Resistenzen, Regulation und Transport sind im Gegensatz zu eukaryontischen Organismen in Streptomyceten in großen Gen-Clustern lokalisiert (Martin und Liras, 1989; Chater, 1992; Maplestone et al. 1992). Die zeitliche Kopplung von Sekundärmetabolit-Produktion und morphologischer Differenzierung wird zumindest zu einem gewissen Anteil durch gemeinsame regulatorische Elemente koordiniert. Diese regulatorischen Mechanismen operieren sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene. Die Nutzung multipler Promotor-Strukturen und die auf alternativen Sigma-Faktoren basierende Heterogenität der RNA-Polymerase erlauben eine direkte Kontrolle der selektiven Transkription differenzierungs- und Sekundärmetabolit-spezifischer Gen-Gruppen (Buttner, 1989; Chater, 1998).

Bereits gegen Ende der 60er Jahre starteten erste Projekte zur Aufklärung der Biosynthesewege einer Vielzahl mikrobieller Wirkstoffe auf molekularbiologischer Ebene bis hin zur Charakterisierung der beteiligten Enzyme. Fundierte Erkenntnisse liegen zum Beispiel für Vertreter der Makrolid-Antibiotika, Tetracycline, Anthracycline, Aminoglykoside und Peptid-Antibiotika vor. Die Gruppe der Aminocumarin-Antibiotika, zu denen auch das durch *Streptomyces spheroides* und *S. niveus* gebildete Novobiocin gehört, sind bisher weitgehend unerforscht und sind Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

2 Die Gruppe der Aminocumarin-Antibiotika

2.1 Struktur, Biosynthese und bisherige Klonierungsstrategien

Novobiocin, Coumermycin A1 und Clorobiocin sind strukturell eng verwandte Streptomyceten-Antibiotika, deren Gemeinsamkeit auf dem Vorhandensein einer Aminocumarin-Einheit beruht (Abb. 1). Im Novobiocin ist diese Aminocumarin-Einheit (Ring B) einerseits O-glykosidisch mit einer 6-Desoxyzucker-Komponente, der Noviose (Ring C), und andererseits über eine Amidbindung mit der Carboxylgruppe eines prenylierten Aromaten, der 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A), verknüpft. Im Clorobiocin ist die Methylgruppe der Aminocumarin-Einheit durch ein Chloratom ersetzt; anstelle der Carbamoylgruppe der Noviose befindet sich eine 5-Methyl-2-pyrrolylcarbonyl-Gruppe. Methylierte Pyrrolringsysteme sind auch in der Struktur des Coumermycins A1 zu finden. Dort sind zwei 6-Desoxyzucker-Cumarin-Einheiten jeweils amidartig mit einem zentralen methylierten Pyrrolring anstelle von Ring A verknüpft. Novobiocin wird durch *S. spheroides* und *S. niveus* produziert, Coumermycin A1 wird durch *S. rishiriensis* DSM 40489 gebildet. Als Clorobiocin-Produzent ist *S. hygrosopicus* NRRL 3418 bekannt.

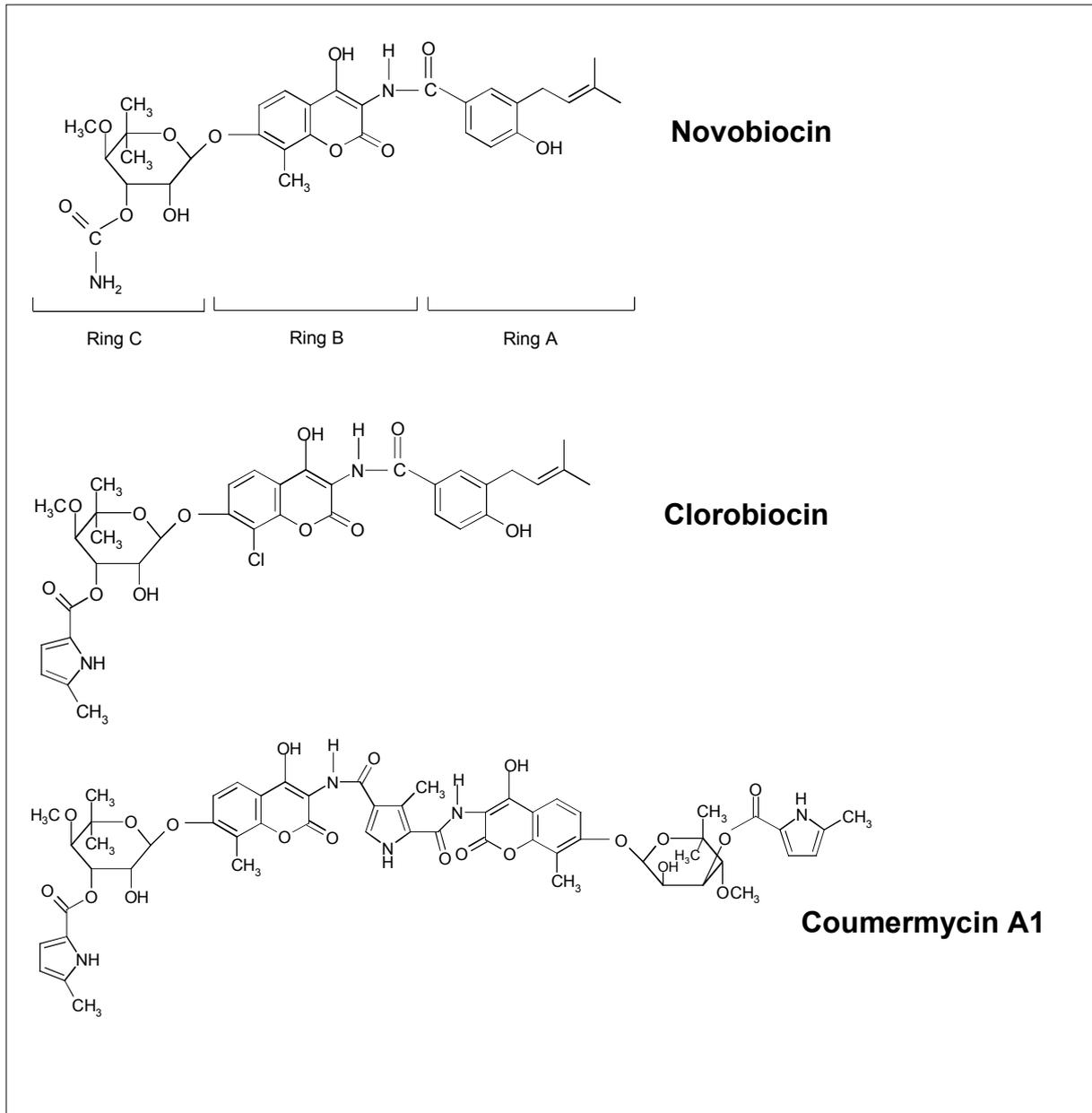


Abb. 1: Struktur von Novobiocin und strukturell verwandten Cumarinen Clorobiocin und Coumermycin A1.

Während zur Biosynthese des Clorobiocins keine Daten in der Literatur vorliegen, wurden Studien zur Biosynthese des Novobiocins in den 60er und 70er Jahren durchgeführt. Allerdings waren vorwiegend Inkorporationsexperimente Gegenstand damaliger Untersuchungen und lieferten Erkenntnisse über biosynthetische Vorstufen und Intermediate. Tyrosin fungiert als Vorstufe für die Aminocumarin- und die substituierte 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit (Bunton et al. 1963; Calvert et al. 1972; Kominek und Sebek, 1974); der 6-Desoxyzucker Noviose wird direkt aus Glucose gebildet (Birch et al. 1962). Die Methylgruppen an Position 4 und 5 der Noviose, wie auch die an Position 8 der Aminocumarin-Einheit, stammen aus *S*-Adenosyl-Methionin (Birch et al. 1962), die Carbamoylgruppe an Position 3 des Desoxyzuckers wird wahrscheinlich durch Carbamoylphosphat bereitgestellt (Kominek, 1972). Fütterungsexperimente neueren

Ursprungs mit ^{13}C -Glucose belegten eindeutig, daß der Dimethylallyl-Rest von Ring A nicht über den Mevalonatweg, sondern über den alternativen Rohmer-Pathway durch Kondensation von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat gebildet wird (Li et al. 1998; Orihara et al. 1998). Das einzige bisher detektierte Enzym der Novobiocin-Biosynthese ist die Novobiocinsäure-Synthetase, welches die Knüpfung der Amidbindung zwischen Ring A und Ring B katalysiert (Kominek und Meyer, 1975).

Die Untersuchungen zur Biosynthese des Coumermycins A1 begrenzten sich auf Arbeiten zur Bildung des Pyrrolrings, welcher sich vom L-Prolin ableitet (Scannell und Kong, 1969).

Studien auf molekularbiologischer Ebene beschränkten sich in den letzten Jahren auf Arbeiten zur Erforschung des Resistenz-Mechanismus' Novobiocin-produzierender Organismen und resultierten in der Identifizierung und Klonierung des Novobiocin-Resistenzgens *gyrB^R* (Thiara und Cundliffe, 1988 und 1993). Versuche zur Klonierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters durch Herstellung von Novobiocin-Defekt-Mutanten von *S. niveus* und Komplementation mit Wildtyp-DNA führten nicht zum Ziel, insbesondere da sich die Transformierbarkeit dieses Streptomyceten als problematisch erwies (Cushing, 1989; Hussain und Ritchie, 1991).

Die Klonierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters und Charakterisierung der beteiligten Enzyme könnte Aufschluß über die einzelnen Schritte zur Bildung der Aminocumarine geben und somit Informationen über die Entstehung der strukturellen Variabilität innerhalb dieser Substanzklasse liefern.

2.2 Wirkungsweise der Aminocumarin-Antibiotika

2.2.1 Die bakterielle DNA-Gyrase als Target der Aminocumarin-Antibiotika

Die antimikrobielle Wirkung des Novobiocins beruht auf der Interaktion mit der bakteriellen DNA-Gyrase, einer DNA-Topoisomerase des Typs II, welche ubiquitär in allen Prokaryonten zu finden ist (Maxwell, 1997). Topoisomerasen katalysieren topologische Veränderungen der DNA: die Entfernung von negativen DNA-Supercoils bewirkt eine Relaxation der DNA. Die Fähigkeit der DNA-Gyrase zur Einführung negativer Supercoils in doppelsträngige DNA-Moleküle ist einzigartig für diese Enzymgruppe und bietet die Grundlage für Replikation, Rekombination und Transkription. Die Gyrase besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten GyrA und GyrB, die im aktiven Enzym einen tetrameren A_2B_2 -Komplex bilden. Der Mechanismus der DNA-Überspiralisierung ist intensiv untersucht worden, da dieser, abgesehen von seiner Eigenschaft als Angriffspunkt antibakterieller Wirkstoffe, auch als Modellsystem zur Erforschung von DNA-Protein-Wechselwirkungen diente (Reece and Maxwell, 1991). Die DNA wird während der Umwindung um den A_2B_2 -Komplex kovalent über einen Tyrosinrest an das Enzym gebunden, und unter ATP-Hydrolyse werden negative Supercoils eingeführt. Ein DNA-Strang wird dabei durch die entstandene Öffnung hindurchgeführt, und der DNA-Doppelstrang wird anschließend wieder verknüpft. Auf diese Weise werden zwei negative Supercoils in die DNA eingebracht. Die Funktion der A-Untereinheit (GyrA) besteht in der Einführung des Doppelstrangbruchs und der

Wiederverknüpfung der DNA. Diese Funktion wird durch den 59-64 kDa großen N-terminalen Bereich dieser Untereinheit wahrgenommen. Der C-terminale Bereich (33 kDa) ist in die DNA-Protein-Interaktionen involviert. Die ATPase-Aktivität ist im amino-terminalen Bereich (43 kDa) der B-Untereinheit (GyrB) lokalisiert, während die carboxy-terminale Domäne (47 kDa) an der Bindung der A-Untereinheit und der DNA beteiligt ist. Diese Erkenntnisse wurden unter anderem durch röntgenstrukturspektroskopische Untersuchungen erhalten (Jackson et al. 1991; Wigley et al. 1991).

Cumarin-Antibiotika inhibieren die durch die Gyrase katalysierte Überspiralisierung der DNA, spezifisch die ATPase-Aktivität der B-Untereinheit. Die ATP-unabhängige Relaxation negativ superspiralisierter DNA bleibt hingegen unbeeinflusst. Novobiocin wirkt als kompetitiver Inhibitor, indem es an die N-terminale 24 kDa große Subdomäne von GyrB bindet. Durch Röntgenstrukturanalysen konnte gezeigt werden, daß die Interaktion auf Wasserstoffbrückenbindungen insbesondere mit der Hydroxyl-Gruppe an Position 2 und der Carbamoyl-Gruppe der Zuckerkomponente des Novobiocins beruhen. Auch der Carbonyl-Sauerstoff an Position 2 des Aminocumarin-Rings ist an der Bindung beteiligt. Weiterhin liegen mehrere hydrophobe Kontakte zwischen Gyrase und Cumarin-Ring und Isopentenyl-Gruppe des Novobiocins vor (Lewis et al. 1996; Tsai et al. 1997). Sowohl Novobiocin als auch Clorobiocin binden GyrB als Monomer (Tsai et al. 1997), wohingegen Coumermycin A1 GyrB als Dimer stabilisiert (Maxwell, 1997).

Anhaltspunkte dafür, daß die Interaktion der Gyrase mit dem Cumarin-Ring von essentieller Bedeutung für die Sensitivität der Enzymaktivität sind, lieferten erste Experimente mit natürlich vorkommenden Cumarin-resistenten Stämmen (Contreras und Maxwell, 1992). Mutationen am Arginin-Rest an Position 136 der 24 kDa amino-terminalen GyrB-Subdomäne, der mit dem Carbonyl-Sauerstoff an Position 2 des Aminocumarin-Rings interagiert, äußerten sich *in vitro* in einer verringerten Aminocumarin-Sensitivität des Enzyms. Gerichtete Mutagenesen an Asn46 und Asp73, die Wechselwirkungen mit der 2-OH-Gruppe beziehungsweise Carbamoyl-Gruppe der Novoise eingehen, führten zu einer reduzierten Aminocumarin-Bindung und belegten die Bedeutsamkeit der Zucker-Einheit für die Wirksamkeit des Novobiocins (Kampranis et al. 1999).

2.2.2 Wirkungsspektrum und therapeutische Anwendungsgebiete des Novobiocins

Novobiocin wird in den Vereinigten Staaten als humantherapeutisches Antiinfektivum unter dem Handelsnamen Albamycin® (Pharmacia & Upjohn) vertrieben und ist vorwiegend gegen grampositive Keime wirksam. Aufgrund von Nebenwirkungen und Verträglichkeitsproblemen wurde Novobiocin jedoch hauptsächlich als Reserve-Antibiotikum eingesetzt (Gräfe, 1992).

In den letzten Jahren ist das Interesse an Novobiocin, insbesondere aufgrund seiner nachgewiesenen *in-vitro*-Aktivität gegen multiresistente, darunter auch Vancomycin-resistente Erreger wie Staphylokokken (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*) (Walsh et al. 1985; Proctor et al. 1987) und Enterokokken (*E. faecium*) (Freeman et al. 1995; Montecalvo et al. 1995), vor allem in Kombination mit dem Makrolid Rifampicin (Martin, 1994) oder Fluorochinolonen (French et al. 1993; Landman et al. 1993), wieder gestiegen. Die Wirksamkeit in Kombination mit Rifampicin bei oraler Applikation konnte auch durch randomisierte klinische Studien belegt werden (Arathoon et al. 1990). Synergistische Effekte beruhen dabei auf einer reduzierten Resistenzentwicklung (Walsh et al. 1993). Die klinische Relevanz dieser Kombination zeigte sich auch bei der Prophylaxe Katheter-assoziiertes Infektionen von Krebspatienten mit fortgeschrittenem Melanom während der Interleukin-2-Therapie (Raad et al. 1998). Im veterinärmedizinischen Bereich wird Novobiocin zusammen mit Penicillin zur Behandlung boviner Mastitis wirksam gegen Infektionen mit Staphylokokken, Streptokokken und gramnegativen Keimen eingesetzt (Thornsberry et al. 1997).

Abgesehen von seiner Effektivität als Antiinfektivum interferiert Novobiocin auch mit metabolischen Prozessen in eukaryontischen Tumorzellen. So stellen eukaryontische Topoisomerasen Targets cytostatisch wirksamer Therapeutika dar, deren Wirkung auf der Tatsache basiert, daß Tumorzellen eine erhöhte Zellteilungsfrequenz aufweisen. Für die Topoisomerase-Inhibitoren Etoposid oder Teniposid konnte gezeigt werden, daß Novobiocin deren cytotoxische Wirkung potenzieren kann (Lorico et al. 1992; Rappa et al. 1992). Eine Wirksamkeit der Aminocumarine zeigte sich auch im Zusammenhang mit seiner anti-Hsp90-Aktivität (Marcu et al. 2000). Hsp90 ist ein eukaryotisches Hitzeschockprotein mit Schlüsselfunktion für die Stabilität und Funktion multipler Zellsignalsubstanzen, wie zum Beispiel onkogener Proteinkinasen. Dieses Chaperon ist in die Zellproliferation involviert und in 2-10-fach höherer Konzentration in Tumorzellen zu finden. Die Hsp90-inhibierende Aktivität des Novobiocins konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden: im Tierversuch wurde der Level der onkogenen Raf-1-Proteinkinase um 71 % gesenkt. Dabei erfolgt die Wirkung des Novobiocins nicht über eine Inhibition der Topoisomerase II wie bei den Podophyllumtoxinen, sondern durch spezifische Interaktion mit C-terminalen Hsp90-Bereichen.

Des Weiteren wurde von immun-modulierenden Eigenschaften des Novobiocins auf menschliche Monocyten berichtet (Lührmann et al. 1998). Zum Beispiel interagiert Novobiocin mit Signaltransduktionsprozessen, die in die Lipopolysaccharid-induzierte Cytokin-Bildung involviert sind, durch Inhibition der ADP-Ribosylierung. Ferner wurde *in vitro* eine Suppression der TNF- α -Produktion beobachtet und über die Wirksamkeit des Novobiocins als Apoptose-Inhibitor spekuliert.

Eine Übersicht über die beschriebenen Effekte des Novobiocins und weiterer potentieller therapeutischer Einsatzgebiete des Novobiocins ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Therapeutische Einsatzmöglichkeiten des Novobiocins. n.b. = nicht beschrieben

Wirkung	Zielstruktur	Wirkspektrum	synergistische Effekte	Referenz
antiinfektiv	bakterielle DNA-Gyrase	grampositive Keime, multiresistente Pathogene: - Staphylokokken - Enterokokken - Streptokokken	Kombinations-therapie mit: - Rifampicin - Fluorochinolone - Penicillin	Martin, 1994 Montecalvo et al. 1995 French et al. 1993
antiviral	Replikation	Vaccinia-Virus	n.b.	Sekiguchi und Shuman, 1997
cytostatisch	eukaryontische Topoisomerase I und II	Tumorzellen	Kombinations-therapie mit Zytostatika (Etoposid, Teniposid, Topotecan)	Rappa et al. 1992 Schwarz et al. 1993
	Hsp-90-Chaperon	humane, periphere Blutzellen und murine Splenocyten	n.b.	Marcu et al. 2000
antiproliferativ	multifaktoriell	Tumorzellen	additive Wirkung mit Butyrat und Tiazofurin	Nordenberg et al. 1992
immunmodulierend	ADP-Ribosylierung, Interleukin- und Cytokin-Produktion, CD14-Ausschüttung	humane Monocyten	n.b.	Lührmann et al. 1998

3 Kombinatorische Biosynthese als gentechnologisches Verfahren zur gezielten Arzneistoff-Modifikation und Optimierung von Wirkstoffstrukturen

Die erfolgreiche Klonierung einer Vielzahl von Biosynthese-Clustern, die für die Synthese potenter bioaktiver Naturstoffe verantwortlich sind, und die Aufklärung spezifischer Biosynthese-Schritte führte zu der Idee, daß das gewonnene Basiswissen zur Erzeugung modifizierter oder sogar neuer Arzneistoffe mit Hilfe von gentechnologischen Verfahren wie dem der „Kombinatorischen Biosynthese“ genutzt werden könnte (Katz und Hutchinson, 1992; Hutchinson, 1998). Dieses Konzept gewann nicht zuletzt im Hinblick auf die Gewinnung von antibiotischen Wirkstoffen mit verbesserter Wirksamkeit, Wirkungselektivität, Verträglichkeit und Pharmakokinetik, sondern insbesondere auch angesichts der aufkommenden Resistenzproblematik durch multiresistente, pathogene Mikroorganismen an pharmazeutischer und wirtschaftlicher Bedeutung.

Große Fortschritte bei der Herstellung rekombinanter Naturstoffe wurden für die Klasse der Polyketid-Antibiotika erzielt, die durch Polyketid-Synthasen (PKS) gebildet werden (Hutchinson, 1999). PKS katalysieren die Kondensation von Acyl-CoA-Einheiten unter CO₂-Abspaltung zu einem Polyketid-Grundgerüst, welches in Folge durch Reduktase-, Dehydratase- und Enoylreduktase-Komponenten der Polyketidsynthase modifiziert werden kann. Je nachdem, ob die katalytischen Domänen modular in großen multifunktionellen PKS oder iterativ auf kleineren monofunktionalen Proteinen angeordnet sind, unterscheidet man zwischen Typ I und II Polyketid-Synthasen. Durch die Herstellung hybrider Typ II PKS konnte eine Vielzahl neuer Substanzen, wie zum Beispiel das Tetracenomycin M (Künzel et al. 1997), hergestellt werden. Zahlreiche rekombinante Polyketide (Erythromycin-, Methymycin-, Spiramycin-, Tylosin-, Doramectin-Analoga) wurden durch Deletion, Substitution, Insertion, Verlagerung oder Inaktivierung einzelner Domänen modularer PKS' oder gesamter Module gewonnen (Baltz, 1998).

Ähnliche Erfolge hat man auch bei der Herstellung analoger glycosylierter Antibiotika erzielt. Der Austausch bestimmter Zucker-Biosynthesegene, z.B. des Ketoreduktase-Gens im Doxorubicin-/Daunorubicin-Produzenten *S. peucetius* führte zur Produktion der klinisch relevanten Analoga Epirubicin und 4'-Epidaurorubicin (Madduri et al. 1998).

Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) sind ähnlich wie PKS multifunktionelle, modulare Enzyme zur Biosynthese von Peptid-Antibiotika. Jedes Modul besteht aus spezifischen Domänen zur Aminosäure(-Derivat)-Erkennung, -Aktivierung, und Bildung der Peptidbindung (Stachelhaus und Marahiel, 1995). Die Anordnung der Module entspricht der Aminosäure(-Derivat)-Reihenfolge im fertig synthetisierten Antibiotikum. Durch Substitution einzelner Module gelang die Herstellung funktioneller Hybrid-Peptidsynthetasen (Symmank et al. 1999; Mootz und Marahiel, 1999; Mootz et al. 2000).

Vorraussetzung für die Anwendbarkeit der Kombinatorischen Biosynthese zur gezielten Herstellung von neuen, pharmakologisch aktiven Wirkstoffen sind jedoch Kenntnisse über die benötigten Biosynthese-Gene, Regulatoren, sowie über die an der Biosynthese beteiligten Enzyme, ihre kinetischen Parameter und Substrat-Spezifitäten.

Die Klonierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters und das heute zur Verfügung stehende Wissen darüber, wie Aminocumarin-Antibiotika mit der DNA-Gyrase interagieren und insbesondere welche aktiven Gruppen dieser Substanzen an der Bindung an die Gyrase beteiligt sind, eröffnet neue Möglichkeiten zur Erzeugung neuer Novobiocin-Derivate mit Hilfe der modernen Gentechnik. Unter Beibehaltung struktureller Eigenschaften, die eine Rolle bei den Gyrase-Wirkstoff-Interaktionen spielen, wären Wirkstoffabwandlungen mit dem Ziel einer gesteigerten Aufnahmefähigkeit durch die Bakterien und einer reduzierten Toxizität für eukaryotische Systeme denkbar.

Kürzlich wurde über die Entwicklung neuer, synthetischer Aminocumarin-Derivate berichtet (Laurin et al. 1999a und b; Ferroud et al. 1999; Peixoto et al. 2000). Während sowohl Ring B als auch Ring C essentiell für die Bindung des Novobiocins an die Gyrase sind, kann die Struktur von Ring A ohne Verlust der antibiotischen Aktivität variiert werden (Althaus et al. 1988; Laurin et al. 1999a). Es wurde vermutet, daß die Struktur von Ring A die Aufnahme

des Antibiotikums durch die bakterielle Membran beeinflusst (Reusser und Dolak, 1986; Althaus et al. 1988). Unter diesem Gesichtspunkt wäre die Klonierung des oder der Gene für die Novobiocinsäure-Synthetase und die Ermittlung der Substratspezifität dieses Enzym interessant, um Novobiocin-Derivate mit einem modifizierten Ring A zu entwickeln.

4 Aromatische Prenyltransferasen

Prenyltransferasen sind universell sowohl in pro- als auch eukaryontischen Organismen zu finden. Sie katalysieren die Übertragung einer allylischen Prenylgruppe auf ein nicht-allylisches Prenyldiphosphat oder einen nicht-isoprenoiden Akzeptor und sind an der Biosynthese einer Vielzahl verschiedener Substanzen mit unterschiedlichsten Funktionen beteiligt.

Die an erster Reaktion beteiligten Prenyltransferasen der Isoprenoid-Biosynthese werden gemäß ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung und der Prenyl-Kettenlänge und Stereospezifität des Endprodukts unabhängig von ihrer Funktion in vier Hauptgruppen klassifiziert (Ogura und Koyama, 1998). Zur Gruppe I gehören beispielweise die kurzkettigen Prenyldiphosphat-Synthasen, wie Geranyldiphosphat- (GPP), Farnesyldiphosphat- (FPP), Geranylgeranyldiphosphat- (GGPP) und Farnesylgeranyldiphosphat- (FGPP)- Synthasen, die eine Kettenlänge bis C_{25} synthetisieren können. Diese kurzkettigen Prenyldiphosphate stellen Vorstufen von Steroiden, Carotinoiden und Monoterpenen dar. Die Produkte der Gruppe II–Prenyltransferasen (Hexa- und Heptaprenyldiphosphat-Synthasen) bestehen aus 30 bis 35 C-Atomen. Diese Enzyme spielen zum Beispiel eine Rolle bei der Bildung der isoprenoiden Ubichinon- und Menachinon-Seitenkette. Von langkettigen (*E*)-Prenyltransferasen (Gruppe III) spricht man, wenn die Kettenlänge C_{35} überschreitet (Octaprenyldiphosphat-, Solanesyldiphosphat- und Decaprenyldiphosphat-Synthasen). Gruppe IV-Prenyltransferasen (Nonaprenyl-, Undecaprenyl- und Dehydrodolichyldiphosphat-Synthasen) schließlich sind zur Synthese von (*Z*)-Prenylketten befähigt. Diese meist mit der Membran assoziierten Enzyme sind in die Biosynthese der bakteriellen Zellwand und eukaryotischer Glyoproteine involviert.

Auch Proteine selbst können Prenylgruppen-Akzeptoren darstellen. So haben prenylierte Proteine eine bedeutende Funktion bei intra- und interzellularen Signaltransduktionsprozessen (Casey und Seabra, 1996). DMAPP-tRNA-Transferasen sind wichtig zu Stabilisierung von tRNA-mRNA-Wechselwirkungen während der Translation (Moore und Poulter, 1997).

Aromatische Prenyltransferasen können die Funktion essentieller Primärstoffwechsellzyme besitzen, sind aber auch im Sekundärstoffwechsel präsent. Sie katalysieren die Isoprenylierung aromatischer Ringsysteme und sind beispielsweise an der Bildung von Ubichinon und Plastochinon, den membrangebundenen Proteinkomplexen innerhalb der respiratorischen beziehungsweise photosynthetischen Elektronentransportkette, beteiligt (Soballe und Poole, 1999). Eine beachtliche Anzahl von Phytoalexinen, pflanzliche Sekundärmetaboliten mit antimikrobiellen Eigenschaften, gehören strukturell zu den prenylierten Isoflavonoiden (Tahara und Ibrahim, 1995).

Auch die Biosynthese des Novobiocins erfordert die Einführung eines isoprenoiden Substituenten an ein aromatisches Ringsystem (Abb. 2). Während L-Tyrosin als Ausgangsprodukt der Biosynthese dieser Struktureinheit nachgewiesen wurde, konnte bisher nicht eindeutig bestimmt werden, welche Verbindung im Verlauf der Tyrosin-Seitenkettenverkürzung prenyliert wird. Die Aufklärung der Prenylierungs-Reaktion während der Bildung des Novobiocins und die molekularbiologische und biochemische Charakterisierung des involvierten Enzyms könnten sinnvolle Ansatzpunkte für die gentechnische Erzeugung neuer Wirkstoffstrukturen liefern.

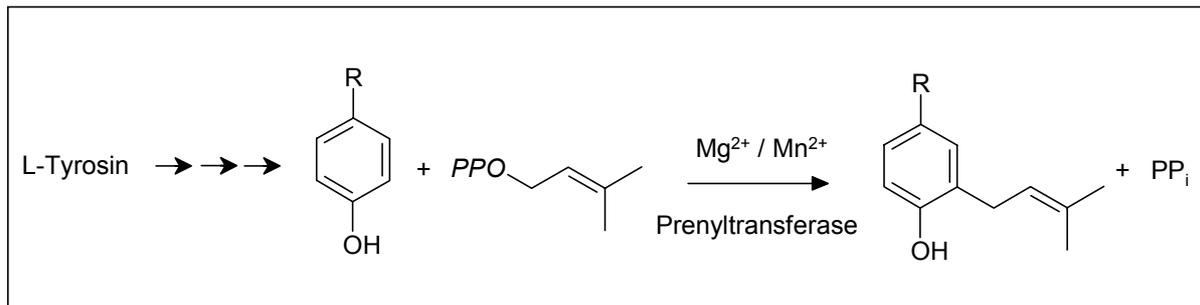


Abb. 2: Postulierte Isoprenylierungs-Reaktion im Verlauf der Biosynthese von Ring A des Novobiocins.

5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Novobiocin-Biosynthese durch Klonierung und Sequenzierung des Biosynthese-Gen-Clusters, sowie die aktive, heterologe Expression eines zentralen Biosynthese-Gens. Damit soll eine Grundlage für den Einsatz der „Kombinatorischen Biosynthese“ als gentechnologisches Verfahren zur zukünftigen Erzeugung neuer, pharmazeutisch relevanter Novobiocin-Derivate geschaffen werden.

Durch Screening einer Cosmidbank von *S. spheroides* NCIMB 11891 mit homologen Sonden für das Strukturgen eines zentralen, an der Biosynthese des 6-Desoxyzuckers des Novobiocins beteiligten Enzyms, der dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase, waren in Vorarbeiten zwei verschiedene Cosmidgruppen identifiziert worden, welche möglicherweise die Gene zur Novobiocin-Biosynthese enthielten.

Folgende Untersuchungen sollen im Hinblick auf die gegebene Zielsetzung durchgeführt werden:

- Sequenzierarbeiten innerhalb beider Cosmidgruppen sollen zunächst Anhaltspunkte zum Vorliegen potentieller Novobiocin-Biosynthesegene oder Resistenzgene liefern und damit zur Identifizierung des Novobiocin-Biosyntheseclusters beitragen.
- Nach Kartierung und Sequenzierung der identifizierten Cosmide soll den sequenzierten Genen eine mögliche Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese zugeordnet und damit die Möglichkeit zur Erstellung eines hypothetischen Biosynthese-Schemas geschaffen werden.

Schwerpunktmäßig sollen Biosynthese-Enzyme biochemisch näher charakterisiert werden, mit deren Hilfe eine Modifizierung der Struktur des Ring A ermöglicht werden könnte:

- Aufklärung der Prenylierungsreaktion innerhalb der Ring A-Biosynthese und biochemische Charakterisierung der aromatischen Prenyltransferase
- Klonierung, heterologe Überexpression und homogene Reinigung der Novobiocinsäure-Synthetase

Die Expression dieser charakteristischen Biosynthese-Gene würde gleichzeitig einen Funktionsnachweis des Clusters liefern.

III Material und Methoden

1 Chemikalien, Säulenmaterialien, Nährmedien, Puffer und Synthesen

1.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Chemikalien wurden vorwiegend von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Alle Medienbestandteile stammen von der Firma Difco (Augsburg). Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile sind nachfolgend aufgelistet:

Tab. 2: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

Hersteller	Bezeichnung
Acros Organics, Schwerte	GTP
Amersham, Buckinghamshire, England	[1- ¹⁴ C]IPP
Biotrend, Köln	[1- ¹⁴ C]DMAPP [1- ¹⁴ C]GGPP
Fluka, Buchs	Novobiocin 4-Hydroxybenzoesäure (4HB) Maleinsäure
FMC BioProducts, Rockland, USA	NuSieve [®] GTG [®] Agarose
Lancaster, Mühlheim a.M.	L-Prolin 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure
Merck, Darmstadt	ATP L-Tyrosin
NEN Life Science Products, Boston, MA, USA	[³² P]Tetranatriumpyrophosphat
Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA	3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methyl-cumarin (Ring B) Novobiocinsäure
Roth, Karlsruhe	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris) 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) 1,4-Dithiothreitol (DTT) Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG) Maleinsäure Phenol/Chloroform (pH 8,0) Rotiphorese [®] Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) Rotiszint [®] Eco Plus (Szintillationscocktail) Polyethylenglykol (PEG 1000)

Fortsetzung Tab. 2: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

Roth, Karlsruhe	Sodiumdodecylsulfat (SDS) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-maleat (Tris-Maleat)
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blau G-250 N-Lauroylsarkosin (Na-Salz, 35 %)
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	3-Methyl-4-aminobenzoessäure 7-Amino-4-methylcumarin Ammoniumpersulfat (APS) Bromphenolblau 3-(Carboxymethylaminomethyl)-4-hydroxybenzoessäure CTP p-Cumarsäure 3,5-Di- <i>tert.</i> -butyl-4-hydroxybenzoessäure Dimethylformamid (DMF) Dimethylsulfoxid (DMSO) 4-Hydroxyphenyllactat (4HPL) 4-Hydroxyphenylpyruvat (4HPP) Imidazol β -Mercaptoethanol t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100) Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) TTP
Südzucker, Mannheim	Saccharose, feine Raffinade
USB	Polyacrylamid (5% Mix) für Sequenziergele

1.2 Säulenmaterialien

Die verwendeten Säulenmaterialien wurden als Fertigsäulen oder Suspensionen bezogen und grundsätzlich bei 4°C in 20% (v/v) Ethanol gelagert.

Tab. 3: Säulenmaterialien

Hersteller	Säulenmaterial
Pharmacia, Freiburg	DEAE Sephacel (Suspension)
	HiLoad 26/60 Superdex 200 (Fertigsäule)
	Sephadex G-25 (Suspension und Fertigsäulen PD-10, NAP-10, NAP-5)
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

1.3 Enzyme und Kits

Tab. 4 : Kits und Enzyme

Hersteller	Bezeichnung
Amersham, Braunschweig	Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis Restriktionsendonukleasen T4-DNA-Ligase Texas Red™-Labeled T3-17mer Sequencing Primer Texas Red™-Labeled T7-17mer Sequencing Primer Thermo Sequenase Core Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP, RPN 2440
Boehringer Mannheim, Mannheim	DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II DIG-Chem-Link Labeling and Detection Set DNA Molecular Weight Marker II und VII, DIG-markiert
GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe	1 kb DNA- Leiter High Molecular Weight DNA Markers
Machery-Nagel, Düren	Nucleobond®Kit PC100
Merck, Darmstadt	Lysozym (zur DNA-Isolierung)
New England Biolabs, Schwalbach	Restriktionsenzyme
Perkin-Elmer, Weiterstadt	AmpliTaq Gold™ Polymerase
Pharmacia, Freiburg	alkalische Phosphatase Gel Filtration Calibration Kit
Qiagen	QIAEX II Gel Extraction Kit II (150) RNase A
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	Lysozym (zur Protoplastierung)
Stratagene	cloned <i>Pfu</i> -Polymerase Restriktionsendonukleasen
USB, Cleveland, Ohio, USA	DNA Sequencing Gel Mix Kit Restriktionsendonukleasen

1.4 Medienbestandteile

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Medien aufgeführt. Die Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, jeweils auf 1 l Medium. Im Falle von Festmedien wurden vor Autoklavieren (20 min, 121°C) 1,8-2% (w/v) Agar zugesetzt. Antibiotika und andere hitzelabile Substanzen wurden erst nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4°C.

1.4.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Tab. 5: Nährmedien und -lösungen zur Kultivierung von *E. coli*. Die Angaben beziehen sich, falls nicht anders angegeben, jeweils auf 1 l Medium.

Medium	Zusammensetzung	Herstellung	
LB-Medium (verändert nach Sambrook et al. 1989)	Trypton	10,0 g	Bestandteile in Leitungswasser lösen, auf pH 7,0 einstellen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren
	Hefeextrakt	5,0 g	
	NaCl	5,0 g	
	Glucose	1,0 g	
NZCYM (Sambrook et al. 1989)	Bacto Casein	10,0 g	Bestandteile in Leitungswasser lösen, auf pH 7,0 einstellen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren
	Bacto Casamino Acids	1,0 g	
	Hefeextrakt	5,0 g	
	NaCl	5,0 g	
Spurenelementlösung (Hoffman et al. 1995)	MgSO ₄	0,98 g	mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen und autoklavieren
	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	288 mg	
	MnSO ₄ * 7 H ₂ O	142 mg	
	H ₃ BO ₃	62 mg	
	NaMoO ₄ * 2 H ₂ O	48 mg	
	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	48 mg	
	KI	83 mg	
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	125 mg		
	H ₂ SO ₄ (0,25 M)	1 ml	
Minimalmedium (verändert nach Hoffman et al. 1995)	KH ₂ PO ₄	3,0 g	Bestandteile in H ₂ O _{bidest} lösen, auf pH 7,0 einstellen, auf 970 ml auffüllen und autoklavieren
	Na ₂ HPO ₄	6,0 g	
	NaCl	0,5 g	
	NH ₄ Cl ₂	0,5 g	
	MgSO ₄	0,5 g	
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,025 g	
	nach dem Autoklavieren steril zugeben:		
	Spurenelementlösung	2 ml	1,12 g FeSO ₄ * 7 H ₂ O in 95 ml H ₂ O _{bidest} lösen, Zugabe von 5 ml 0,25 M H ₂ SO ₄ und autoklavieren
	MgSO ₄ (1 M)	10 ml	
	Glucose [20 % (w/v)]	20 ml	
FeSO ₄ * 7 H ₂ O (1,12 %)	1 ml		

1.4.2 Medien zur Kultivierung von Streptomyceten

Tab. 6: Medien zur Kultivierung von Streptomyceten. Die Angaben beziehen sich, falls nicht anders angegeben, jeweils auf 1 l Medium.

Medium	Zusammensetzung	Herstellung	
HA-Medium	Hefeextrakt	4,0 g	Bestandteile in Leitungswasser lösen, auf pH 7,3 einstellen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren
	Malzextrakt	10,0 g	
	Glucose	4,0 g	
	nach dem Autoklavieren steril zugeben:		
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O (1 M)	1 ml	
CRM-Medium	Saccharose (Südzucker)	103,0 g	Bestandteile in Leitungswasser lösen, auf pH 7,0 einstellen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren
	Tryptic Soy Broth	20,0 g	
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	10,0 g	
	Hefeextrakt	7,5 g	
	Glycin	7,5 g	
	nach dem Autoklavieren steril zugeben:		
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O (1 M)	10 ml	
CDM-Medium (Novobiocinproduktionsmedium und Expressionsmedium) (Kominek, 1972)	tri-Natrium-Citrat * 2 H ₂ O	6,0 g	Bestandteile nacheinander in H ₂ O ^{bide} st lösen, vor MgSO ₄ * 7 H ₂ O-Zugabe auf pH 7,2 einstellen, restliche Bestandteile lösen, auf pH 7,2 einstellen, auf 900 ml auffüllen und autoklavieren
	L-Prolin	6,0 g	
	K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	2,0 g	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5 g	
	NaCl	5,0 g	
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	2,05 g	
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,4 g	
	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g	
	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g	
	nach dem Autoklavieren steril zugeben:		
	Glucose [30 % (w/v)]	100 ml	

1.4.3 Medien zur Protoplastentransformation von Streptomyceten

Tab. 7: Nährmedien und Nährlösungen zur Protoplastentransformation von Streptomyceten. Die Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, jeweils auf 1 l Medium.

Medium	Zusammensetzung	Herstellung	
Spurenelementlösung	ZnCl ₂	40 mg	Bestandteile in H ₂ O <small>bidest</small> lösen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren
	FeCl ₃ * 6 H ₂ O	200 mg	
	CuCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg	
	MnCl ₂ * 4 H ₂ O	10 mg	
	Na ₂ B ₄ O ₆ * 10 H ₂ O	10 mg	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	10 mg	
R2YE-Medium (Hopwood et al. 1985)	Saccharose	103,0 g	Bestandteile in H ₂ O <small>bidest</small> lösen, auf 1 l auffüllen und autoklavieren
	K ₂ SO ₄	0,25 g	
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	10,12 g	
	Glucose	10,0 g	
	Casaminosäuren	0,1 g	
	Spurenelementlösung	2,0 ml	
	Hefeextrakt (Difco)	5,0 g	
	TES-Puffer	5,73 g	
	Agar	25,0 g	
	nach dem Autoklavieren steril zugeben:		
	K ₂ HPO ₄ (0,5 %)	10,0 ml	
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O (5 M)	4,0 ml	
	L-Prolin (20 %)	15,0 ml	
NaOH (1 N)	7,0 ml		

1.5 Antibiotika

Die Antibiotika wurden in Stammlösungen mit den angegebenen Konzentrationen angefertigt und bei –20°C gelagert. Wässrige Lösungen wurden durch einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Lösungen in DMSO und Ethanol sind autosteril. Die Antibiotika wurden den Medien nach Abkühlen unter eine Temperatur von 50°C steril in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

Tab. 8: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration in		Lösungsmittel	Hersteller
	Stammlösung [mg/ml]	Medium [µg/ml]		
Carbenicillin	50	50	H ₂ O	Roth
Chloramphenicol	34	34	Ethanol	Merck
Thiostrepton	50	20-50	DMSO	Fluka

1.6 Puffer und Lösungen

1.6.1 Puffer zur Enzymreinigung

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in H₂O bidest angesetzt und bei 4°C gelagert.

Tab. 9: Puffer zur Enzymreinigung

Medium	Zusammensetzung	
PMSF-Stammlösung	PMSF	50 mM in Isopropanol
Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
	Lysozym	1 mg/ml
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
Puffer A	Tris-HCl	50 mM (pH 7,5)
	Glycerin	10 % (w/v)
	DTT	2 mM
	PMSF	20 µM
Puffer B	Puffer A	
	+ NaCl	1 M
Puffer C	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	DTT	5 mM
	PMSF	50 µM
Puffer D	Puffer C	
	+ NaCl	150 mM

1.6.2 Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Angaben gelten für die Benutzung der Mini-PROTEAN® II Elektrophorese-Kammer (BIO-RAD, Cell) und entsprechen den Angaben des Herstellers-Handbuches.

Tab. 10: Puffer und Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Herstellung / Bemerkung	
Sammelgel (4%)	H ₂ O _{bidest}	6,1 ml	vor Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung unter Vakuum 10 min entgast
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml	
	10 % (w/v) SDS	0,1 ml	
	Rotiphorese®Gel 30	1,33 ml	
	10 % (w/v) APS	0,05 ml	
	TEMED	0,01 ml	
Trenngel (12 %)	H ₂ O _{bidest}	3,35 ml	vor Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung unter Vakuum 10 min entgast
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	
	10 % (w/v) SDS	0,1 ml	
	Rotiphorese®Gel 30	4,0 ml	
	10 % (w/v) APS	0,05 ml	
	TEMED	0,005 ml	
Probenpuffer (1x)	H ₂ O _{bidest}	3,8 ml	β-Mercaptoethanol wurde erst kurz vor Verwendung des Probenpuffers zugegeben; Lagerung bei Raumtemperatur
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,0 ml	
	Glycerin	0,8 ml	
	10 % (w/v) SDS	1,6 ml	
	β-Mercaptoethanol	0,4 ml	
	1 % (w/v) Bromphenolblau	0,4 ml	
5x Laufpuffer	Tris base	15,0 g	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l; Lagerung bei 4°C
	Glycin	72,0 g	
	SDS	5,0 g	
Fixierlösung	H ₂ O _{bidest}	70 % (v/v)	Lagerung bei Raumtemperatur
	Essigsäure	10 % (v/v)	
	Methanol	20 % (v/v)	
Coomassie Brilliant Blau G-250-Lösung	Coomassie Brilliant Blau G-250	0,25% (w/v)	Lagerung bei Raumtemperatur
	H ₂ O _{bidest}	45 % (v/v)	
	Essigsäure	10 % (v/v)	
	Methanol	45 % (v/v)	
Entfärberlösung	H ₂ O _{bidest}	45 % (v/v)	Lagerung bei Raumtemperatur
	Essigsäure	10 % (v/v)	
	Methanol	45 % (v/v)	

1.6.3 Lösungen zur Proteinbestimmung

Bradford-Färbelösung (nach Bradford, 1976) (5x):

70 mg Serva Blau R 250 in 50 ml Ethanol lösen, Zugabe von 100 ml H₃PO₄ [85%, (v/v)], mit H₂O_{bidest} auf 200 ml auffüllen.

Die Stammlösung wurde bei 4°C aufbewahrt, vor Gebrauch 1:5 mit H₂O_{bidest} verdünnt und über einen Faltenfilter filtriert. Die gebrauchsfertige Bradford-Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

1.6.4 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese

Tab. 11: Puffer zur DNA-Gelelektrophorese. Die Puffer wurden mit H₂O_{bidest} hergestellt, autoklaviert und, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
5x TBE-Puffer	Tris base	54,0 g
	Borsäure	27,5 g
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	20 ml
50x TAE	Tris base	242 g
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
	Eisessig	57,1 ml
Ladepuffer	Glycerin	30 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung für Agarose-Gele	TE-Puffer + Ethidiumbromid	1 µg/ml

1.6.5 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten

Die Einzelbestandteile der Lösungen wurden in H₂O_{bidest} angesetzt, getrennt autoklaviert und steril zusammengegeben. Eine Lagerung erfolgte nach Aliquotierung bei -20°C.

Tab. 12: Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten.

Puffer	Zusammensetzung	
Protoplastierungspuffer (P-Puffer) (Thompson et al. 1982)	Saccharoselösung [12 % (w/v)]	85,5 ml
	Spurenelementlösung (siehe 1.4.3)	0,2 ml
	TES (0,25 M, pH 7,2)	10 ml
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O (1 M)	1,0 ml
	K ₂ SO ₄ (140 mM)	1,0 ml
	KH ₂ PO ₄ (40 mM)	1,0 ml
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O (250 mM)	1,0 ml

Fortsetzung Tab. 12: Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten

Transformationspuffer (T-Puffer) (Thompson et al. 1982)	Saccharoselösung [25 % (w/v)]	1,0 ml
	Spurenelementlösung (siehe 1.4.3)	0,03 ml
	PEG 1000 [50 % (w/v)]	5,0 ml
	K ₂ SO ₄ (140 mM)	0,1 ml
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O (5 M)	1,0 ml
	Tris-Maleat (0,5 M, pH 8,0)	1,0 ml
	KH ₂ PO ₄ (40 mM)	0,1 ml
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O (1 M)	0,1 ml
	H ₂ O bidest	2,0 ml

1.6.6 Lösungen zur Transformation und Selektion von *E. coli*

Tab. 13: Medien und Stammlösungen zur Transformation und Blau-Weiß-Selektion

Medium / Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
SOC-Medium	Bacto-Trypton NaCl KCl MgCl ₂ MgSO ₄ Glucose	0,5 % (w/v) 10 mM 2,5 mM 10 mM 10 mM 20 mM
		Bestandteile in H ₂ O bidest lösen, auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren
IPTG-Lösung		80 mg/ml
		in H ₂ O bidest lösen und sterilfiltrieren (0,2 µm Membranfilter) 10 µl pro Platte ausplattieren
X-Gal-Lösung		20mg/ml
		in DMF ansetzen, autosteril 40 µl pro Platte ausplattieren

1.6.7 Puffer zur DNA-Isolierung

Tab. 14: Puffer zur Plasmid-Isolierung aus Streptomyceten und *E. coli*. Die Puffer wurden mit H₂O bidest angesetzt.

Puffer	Zusammensetzung	Herstellung
STE-Puffer	Tris-HCl NaCl EDTA	10 mM 100 mM 1 mM
		auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren
STET-Puffer	STE-Puffer mit Triton X-100 Lysozym (Merck)	
		5,0 % (v/v) 600 µg/ml
		vor Gebrauch frisch ansetzen

Fortsetzung Tab. 14: Puffer zur Plasmid-Isolierung aus Streptomyceten und *E. coli*

L1-Puffer	Glucose	50 mM	auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren
	Tris-HCl	25 mM	
	EDTA	10 mM	
L2-Lösung	L1-Puffer mit Lysozym (Sigma)	4 mg/ml	Lysozym vor Gebrauch zugeben
L3-Lösung	NaOH	0,4 N	NaOH- und SDS-Lösung getrennt ansetzen und jeweils vor Gebrauch frisch 1:1 mischen
	SDS	2 % (w/v)	
L4-Lösung	Kaliumacetat	29,44 g	Kaliumacetat in 60 ml H ₂ O _{bidest} lösen, Essigsäure zugeben und auf 100 ml H ₂ O _{bidest} auffüllen, autoklavieren
	Eisessig	11,5 ml	
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM	auf pH 7,6 einstellen
	EDTA	1 mM	

1.6.8 Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierungen

Tab. 15: Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierungen. Die Puffer wurden mit H₂O_{bidest} angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Die Angaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf 1 l Puffer.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure	0,1 M	mit HCl auf pH 7,5 einstellen
	NaCl	150 mM	
Blocking-Puffer	Magermilchpulver	3,0 g	mit Maleinsäure-Puffer auf 100 ml auffüllen
Detektions-Puffer	Tris-HCl	0,1 M	pH 9,5 einstellen
	NaCl	0,1 M	
Depurinierungslösung	HCl	250 mM	
Denaturierungslösung	NaOH	0,5 N	
	NaCl	1,5 M	
Neutralisierungspuffer	Tris-HCl	0,5 M	pH 7,5 einstellen
	NaCl	3 M	
20x SSC	tri-Natrium-Citrat * 2 H ₂ O	0,3 M	pH 7,0 einstellen
	NaCl	3 M	
Prähybridisierungs-Puffer	5x SSC	96,51 ml	frisch ansetzen
	Magermilchpulver	3 g	
	10 % (w/v) SDS	0,2 ml	
	35 % (w/v) N-Lauroylsarkosin	0,29 ml	

Fortsetzung Tab. 15: Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierungen

Hybridisierungs-Lösung	5x SSC	9,8 ml	frisch ansetzen
	Magermilchpulver	0,15 g	
	10 % (w/v) SDS	0,02 ml	
	35 % (w/v) N-Lauroylsarkosin	0,029 ml	
2x Waschpuffer	10 % (w/v) SDS	1 ml	frisch ansetzen
	2x SSC	99 ml	
0,5x Waschpuffer	10 % (w/v) SDS	1 ml	frisch ansetzen
	5x SSC	10 ml	
	H ₂ O <small>bidest</small>	89 ml	
Tween-Waschpuffer	Tween 20	0,8 ml	frisch ansetzen
	Maleinsäure-Puffer	400 ml	
Antikörper-Lösung	Blocking-Lösung	20 ml	frisch ansetzen
	Maleinsäure-Puffer	20 ml	
	Anti-DIG-AP-Konjugat	4 µl	

2 Plasmide und Bakterienstämme

2.1 Vektoren

Tab. 16: Vektoren, Plasmide und Cosmide

Vektor	Größe [kp]	Eigenschaften	Hersteller/Referenz
Litmus 28	2,823	Amp ^r , M13-origin, ColE1-origin, lacZ' (α -Komplementation)	New England Biolabs; Evans et al. 1995
pBlueskript SK(-) (pBSK(-))	2,958	Amp ^r , lacZ' (α -Komplementation), f1(-)-origin, ColE1-origin	Stratagene; Short et al. 1988
pBC SK(-)	3,399	Cam ^r , lacZ' (α -Komplementation), f1(-)-origin, ColE1-origin	Stratagene
pEM4	ca. 7,9	Streptomyces- <i>E. coli</i> Shuttle Vektor, bla ^r , tsr ^r , lacZ' (α -Komplementation), konstitutiver <i>ermE</i> up-Promotor	Quirós et al. 1998
pGEM-11Zf(+)	3,223	Amp ^r , f1-origin, ColE1-origin, lacZ' (α -Komplementation)	Promega
pQE70	3,427	Amp ^r , <i>E. coli</i> -Überexpressionsvektor, Expression eines C-terminalen Histidin-Fusionsproteins, T5-Promotor, ColE1-origin, synthetische RBS II	Qiagen; Bujard et al. 1987

Fortsetzung Tab. 16: Vektoren, Plasmide und Cosmide

pRSet B	2,939	Amp ^r , <i>E. coli</i> - Überexpressionsvektor, Expression eines N-terminalen Histidin-Fusionsproteins, T7-Promotor, f1-origin, ColE1-origin	Invitrogen; Schoepfer, 1993
pUWL201	ca. 6,9	Streptomyceten- <i>E. coli</i> -Shuttle Vektor, bla ^r , tsr ^r , konstitutiver <i>ermE</i> up-Promotor, ColE1-origin	U. Wehmeier, persönliche Mitteilung
SuperCos 1	7,939	Cosmidvektor, Amp ^r , Neo ^r , S40-origin, Vektor der <i>S. spheroides</i> NCIMB 11891 Genbank	Stratagene
9-6G 10-9C 2-9A 2-6G	ca. 52,4 ca. 51,9 ca. 43 ca. 42,8	Cosmide aus der <i>S. spheroides</i> NCIMB 11891 – Genbank im Cosmidvektor SuperCos 1	Z. Wang, persönliche Mitteilung
pSL1(-)	ca. 21,4	13,535 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus p9-6GE4 in pEM4; enthält <i>orf15</i> bis <i>orf9</i> (<i>orf15</i> unvollständig) hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor	S.-M. Li, persönliche Mitteilung
pSL2(+)	ca. 18,1	10,16 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus p9-6GE2 in pEM4; enthält <i>nov21</i> bis <i>novG</i> hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor	S.-M. Li, persönliche Mitteilung
pSL2(-)	ca. 18,1	10,16 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pSL2(+) in pEM4, jedoch in umgekehrter Orientierung hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor	S.-M. Li, persönliche Mitteilung
pSL3(+)	ca. 17,6	9,74 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus p9-6GE9 in pEM4; enthält <i>novH</i> bis <i>novN</i> hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor	S.-M. Li, persönliche Mitteilung
pSL4(+)	ca. 21,9	14 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus p10-9CE1 in pEM4; enthält <i>orf13</i> bis <i>orf3</i> hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor	S.-M. Li, persönliche Mitteilung
pSL4(-)	ca. 21,9	14 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus pSL4(+) in pEM4, jedoch in umgekehrter Orientierung hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor	S.-M. Li, persönliche Mitteilung

Tab. 17: Eigene Plasmid-Konstrukte. Im folgenden werden alle relevanten zur Cosmidkartierung und zu Expressionsversuchen verwendeten Konstrukte aufgeführt. Die jeweilige Orientierung der Inserts innerhalb der Multiple-Cloning-Site (MCS) ist durch die Lage der enthaltenen offenen Leserahmen in Bezug auf die Sequenzierprimer T3 und T7 bzw. M13-forward und M13-reverse angegeben. Zur Sequenzierung hergestellte Konstrukte werden nicht gesondert aufgeführt.

Konstrukt	Größe [kb]	Beschreibung
p9-6GE1	ca. 5,8	5,8 kb Cosmidfragment nach Insertdeletion aufgrund Plasmidinstabilität aus Cosmid 9-6G entstanden; enthält Teilbereiche von <i>gyrB</i> ^R
p9-6GE2	13,12	10,16 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 9-6G in pBSK(-); trägt T3- <i>nov21</i> , <i>nov20</i> und <i>novA</i> bis <i>novG-T7</i>
p9-6GE4	16,49	13,54 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 9-6G in pBSK(-); trägt T7- <i>orf15</i> , 16, 17, 11, 10, 18, 14 und 9 (<i>orf15</i> unvollständig)-T3
p9-6GE5	5,06	2,10 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 9-6G in pBSK(-); trägt T7- <i>novT</i> und <i>novU</i> (beide unvollständig)-T3
p9-6GE6	5,61	2,656 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 9-6G in pBSK(-); trägt T7- <i>novQ</i> , <i>R</i> , <i>S-T3</i>
p9-6GE7	5,87	2,91 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 9-6G (3'-Randbereich des Cosmids) in pBSK(-); enthält T3- <i>novV</i> , <i>W</i> , <i>gyrB</i> ^R (<i>gyrB</i> ^R unvollständig)-T7
p9-6GE9	12,70	9,74 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 9-6G in pBSK(-); enthält T3- <i>novHIJKLMN-T7</i>
p9-6GE9-R	12,70	9,74 <i>EcoRI</i> -Insert aus p9-6GE9 in umgekehrter Orientierung in pBSK(-), enthält T7- <i>novHIJKLMN -T3</i>
p10-9CE1	ca. 16,96	14 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 10-9C in pBSK(-); trägt T7- <i>orf13</i> , 7, 6, 5, 4, 1, 2 und 3-T3
pMS50	5,78	2,82 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus Cosmid 9-6G; enthält T3- <i>orf17</i> , 10, 11 (nur <i>orf10</i> vollständig)-T7
pMS64	4,91	1,95 kb <i>EcoRI</i> - <i>BglII</i> -Fragment aus p9-6GE9 über <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> in pBSK(-), enthält <i>novH</i>
pMS65	ca. 8,85	1,95 kb <i>EcoRI</i> - <i>BglII</i> -Fragment aus p9-6GE9 über <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> hinter den <i>ermE</i> up-Promotor in pUWL201; enthält <i>novH</i> mit RBS
pMS66	6,11	3,16 kb <i>EcoRI</i> - <i>NcoI</i> -Fragment in pBSK(-) nach <i>NcoI</i> - <i>SpeI</i> -Verdau von p9-6GE9-R, Herstellung von blunt ends und Religation; trägt <i>novH</i> und <i>novI</i>
pMS67	7,06	4,11 kb <i>EcoRI</i> - <i>SnaBI</i> -Fragment in pBSK(-) nach <i>SnaBI</i> - <i>SpeI</i> -Verdau von p9-6GE9-R, Herstellung von blunt ends und Religation; trägt <i>novHIJKL</i>
pSM69	9,90	6,95 kb <i>EcoRI</i> - <i>PfI</i> -Fragment in pBSK(-) nach <i>PfI</i> - <i>SpeI</i> -Verdau von p9-6GE9-R, Herstellung von blunt ends und Religation; trägt <i>novH</i> , <i>novI</i> , <i>novJ</i> und <i>novK</i>
pMS70	ca. 10,06	3,16 kb <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> -Fragment aus pMS66 in pUWL201; trägt <i>novH</i> und <i>novI</i> hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor, jeweils mit RBS
pMS71	ca. 11,01	4,11 kb <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> -Fragment aus pMS67 in pUWL201; trägt <i>novHIJ</i> jeweils mit RBS hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor
pMS73	ca. 13,85	6,95 kb <i>EcoRI</i> - <i>XbaI</i> -Fragment aus pMS69 in pUWL201; trägt <i>novHIJKL</i> jeweils mit RBS hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor
pMS74	8,50	5,55 kb <i>NotI</i> -Fragment aus p9-6GE9 in pBSK(-); enthält T3- <i>novHIJK-T7</i>

Fortsetzung Tab. 17: Eigene Plasmid-Konstrukte

pMS75	ca. 12,5	5,55 kb <i>EcoRI-XbaI</i> -Fragment aus pMS74 in pUWL201; trägt <i>novHIJK</i> jeweils mit RBS hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor
pMS76	5,32	2,1 kb <i>ApaI</i> -Fragment aus p9-6GE9 in pGEM-11Zf(+); enthält M13-forward- <i>novL</i> -M13reverse
pMS77	ca. 9,0	2,1 kb <i>EcoRI-XbaI</i> -Fragment aus pMS76 in pUWL201; trägt <i>novL</i> mit RBS hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor
pMS78	7,27	1,95 kb <i>EcoRI-BglII</i> -Fragment aus p9-6GE9 über <i>EcoRI-BamHI</i> in pM76; enthält M13-forward- <i>novH</i> , <i>novL</i> - M13-reverse
pMS79	ca. 10,98	4,08 kb <i>EcoRI-XbaI</i> -Fragment aus pMS78 in pUWL201; trägt <i>novH</i> und <i>novL</i> mit RBS hinter dem <i>ermE</i> up-Promotor
pMS80	5,0	Überexpressionskonstrukt mit <i>novL</i> ; <i>novL</i> wurde über PCR amplifiziert (1,584 kb) und über eine <i>SphI-BamHI</i> -Schnittstelle vor den 6xHis-Tag in pQE70 ligiert
pMS82	4,53	Überexpressionskonstrukt mit <i>novL</i> ; <i>novL</i> wurde über PCR amplifiziert (1,608 kb) und über eine <i>BglII-EcoRI</i> -Schnittstelle hinter den 6xHis-Tag in pRSet B ligiert
pMS84	4,98	Überexpressionskonstrukt mit <i>novL</i> ohne 6xHis-Tag in pQE70; der C-terminale 6xHis-Tag in pMS80 wurde durch <i>BamHI-HindIII</i> -Verdau, Herstellung von blunt-ends und Religation entfernt
pMS85	4,43	Überexpressionskonstrukt mit <i>novL</i> ohne 6xHis-Tag in pRSetB; der N-terminale 6xHis-Tag in pMS82 wurde durch <i>NdeI</i> -Verdau und Religation entfernt

2.2 Bakterienstämme

Tab. 18: Bakterienstämme

<i>E. coli</i>	relevante Marker	Hersteller / Referenz
XL1 Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet')</i>]	Stratagene; Bullock et al. 1987
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen
Streptomyces		
<i>S. spheroides</i> NCIMB 11891	Wildtypstamm, Novobiocinproduzent	The National Collections of Industrial, Food & Marine Bacteria, Ltd, Aberdeen, Schottland
<i>S. spheroides</i> DSM 40292	Wildtypstamm, Novobiocinproduzent	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>S. lividans</i> TK24	Wirtsstamm zur heterologen Expression, Novobiocin-sensitiv	Hopwood et al. 1985

3 Kulturbedingungen

3.1 Anzucht und Kultivierung von *E. coli*

Generell erfolgte die Anzucht von *E. coli* in LB-Flüssigmedium (siehe 1.4.1) in Erlenmeyerkolben mit Schikane über Nacht (16-18 h) bei einer Inkubationstemperatur von 37°C und unter Schütteln bei 170 rpm. Zur Herstellung von Einzelkolonien wurde die Bakteriensuspension auf LB-Festmedium im Verdünnungsausstrich mit einer Platinöse ausgestrichen. Eine Selektion erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium (s. 1.5).

Zur Anzucht in Überexpressionsexperimenten wurde die Inkubationstemperatur auf 30°C reduziert und die IPTG-Induktion bei Erreichen einer OD_{600nm} von 0,7 durchgeführt.

E. coli-Dauerkulturen wurden hergestellt, indem zu 770 µl einer spät-logarithmischen Bakteriensuspension 230 µl 87% ige (v/v) Glycerin-Lösung steril zugesetzt wurden. Eine Lagerung erfolgte bei -70°C.

3.2 Anzucht und Kultivierung von Streptomyceten

3.2.1 Anzucht in Fest- und Flüssigmedien

Die Kultivierung von Streptomyceten zwecks Stammhaltung, Transformation und DNA-Isolation wurde generell in HA-Medium (s. 1.4.2) durchgeführt. Zur Novobiocinproduktion und für Expressionsexperimente wurde CDM-Medium, zur Protoplastierung CRM-Medium verwendet (s. 1.4.2). Die Anzucht erfolgte auf Festmedien oder in 50-80 ml Medium in 300 ml-Erlenmeyer-Schikanekolben bzw. in 220 ml Medium in 1 l-Erlenmeyer-Schikanekolben bei 28°C unter Schütteln mit 170 rpm. Um ein homogeneres Wachstum in Flüssigkulturen zu erzielen wurden pro Kolben etwa 10-15 Glasperlen (Durchmesser: 2,85-3,3 mm) steril zugesetzt. Eine Selektion wurde durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium erzielt (s. 1.5).

3.2.2 Herstellung von Sporensuspensionen und Glycerindauerkulturen

Zur Langzeitkonservierung wurden Sporensuspensionen oder Glycerindauerkulturen hergestellt.

Zum Anlegen von Sporensuspensionen wurde 1 ml Streptomycetenflüssigkultur oder 10-20 µl Sporensuspension auf einer HA-Agarplatte steril ausplattiert und anschließend 15-20 min unter der Sterilbank getrocknet. Die Kultivierung erfolgte über 3-6 Tage bei 28°C bis zur Sporulation. Die Sporen wurden nach Zugabe von 9 ml einer 0,1% igen Tween 20-Lösung mit Hilfe einer Impföse abgekratzt und abgeschwemmt. Die Suspension wurde anschließend 1 min bei maximaler Leistung gevortext, und eine Trennung von Mycelresten und Sporen wurde durch Filtration durch sterile Watte erzielt. Nach Zentrifugation (2.100 x g, 6 min, 4°C) wurden die Sporen zunächst mit 20 % iger Glycerinlösung (v/v) gewaschen, pelletiert und die Sporen in 1-3 ml der Glycerinlösung resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Für die Herstellung von Glycerindauerkulturen wurden 80 ml einer 1-2 Tage kultivierten Flüssigkultur abzentrifugiert (4.300 x g, 10 min, 4°C), das Zellpellet in 15 ml 15% iger Glycerinlösung (v/v) gewaschen, pelletiert und anschließend in 10 ml 15% iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde steril in 1 ml-Aliquote aufgeteilt und bei -70°C gelagert. Die Inokulation wurde nach Auftauen mit jeweils 0,5 ml der Glycerindauerkultur pro 50 ml Flüssigmedium durchgeführt, wobei eine Homogenisierung des Mycels durch Verwendung von Insulinspritzen erzielt wurde.

4 Methoden der Molekularbiologie

4.1 CaCl_2 -vermittelte Transformation von *E. coli*

(verändert nach Sambrook et al. 1989)

4.1.1 Herstellung CaCl_2 -kompetenter Zellen

5 ml LB-Medium wurden mit einer *E. coli*-Einzelkolonie beimpft unter nach Zugabe des entsprechenden Antibiotikums bei 37°C und 170 rpm über Nacht angezogen. 2 ml dieser Vorkultur dienten als Inokulum für 100 ml LB-Medium, das bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 unter den angegebenen Bedingungen weiterkultiviert wurde. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei 4°C durchgeführt. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (2.750 x g, 7 min) in 30 ml eiskalter 0,1 M MgCl_2 -Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (2.100 x g, 10 min). Die Zellen wurden vorsichtig in 30 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. vorheriger Schritt) wurden die Zellen vorsichtig in 3-5 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung mit 15 % Glycerin (v/v) resuspendiert und zu 200 μl -Aliquoten bei -70°C gelagert.

4.1.2 CaCl_2 -vermittelte Transformation von *E. coli* und Blau-Weiß-Selektion

Pro Transformationsansatz wurden 200 μl CaCl_2 -kompetente *E. coli*-Zellen (s. 4.1.1) mit 1-10 μl der einzubringenden DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einer 2-minütigen Hitzeschockbehandlung bei 42°C unterworfen und unmittelbar darauf einige Minuten auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurde 1 ml LB-Medium steril zum Ansatz zugegeben und die Zellen unter Schütteln 1 h bei 37°C inkubiert. 200 μl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Nach kurzer Zentrifugation des restlichen Ansatzes (420 x g, 3 min, 4°C) wurden die Zellen vorsichtig in 200 μl LB-Medium resuspendiert und auf eine weitere LB-Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden 16 h bei 37°C bebrütet.

Blau-Weiß-Selektion:

Bei Transformationen mit Klonierungsvektoren, welche das lacZ' -Gen zur α -Komplementation der β -Galactosidase enthielten, wurde eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide durchgeführt. Während der 60-minütigen Regenerationsdauer wurden die Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten mit einem Gemisch aus 40 μl X-Gal-Lösung (s. 1.6.6), 10 μl IPTG-Lösung (s. 1.6.6) und 150 μl H_2O (steril) pro Platte ausplattiert und 30-40 min offen unter der Sterilbank zum Verdampfen des toxischen Lösungsmittels DMF getrocknet. Die Transformationsansätze wurden anschließend wie oben beschrieben ausplattiert und bebrütet.

4.2 Elektroporations-vermittelte Transformation von *E. coli*

Plasmide mit einer Größe von mehr als 30 kb (vor allem Cosmide) wurden durch die effizientere Elektroporationsmethode (Transformationsrate: $10^9 - 10^{10}$ Transformanden/ μg DNA) unter Verwendung der *E. coli* Pulser™-Transformations-Apparatur (BIO-RAD, Cell) in *E. coli* eingebracht.

4.2.1 Herstellung elektrotransformationskompetenter Zellen

Die Präparation der Zellen richtete sich nach den Angaben des *E. coli* Pulser™-Herstellerhandbuches (BIO-RAD), Kapitel 5. Die Zellen einer 100 ml-Kultur wurden mehrfach in steriler, eiskalter 10 % iger (v/v) Glycerin-Lösung gewaschen, in 1,5 ml eiskalter 20 % iger (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert und zu 60 µl-Aliquoten bei -70°C gelagert.

4.2.2 Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte genau nach den Angaben des Geräte-Herstellers (BIO-RAD, Cell) mit 1-2 µl DNA, welche zur Verringerung der Leitfähigkeit möglichst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst war. Als Regenerations-Medium wurde SOC-Medium (s. 1.6.6) verwendet.

4.3 Protoplastierung von *Streptomyces lividans* TK24

100 ml einer 36 –48 h alten, in CRM-Medium (s. 1.4.2) gewachsenen Kultur wurden 10 min bei $2.100 \times g$ und 4°C zentrifugiert, zweimal mit je 20 ml TE-Puffer mit 10 % (w/v) Saccharose gewaschen und anschließend in 10 ml Protoplastierungspuffer (P-Puffer) (s. 1.6.5) mit 2 mg/ml Lysozym (Sigma) resuspendiert. Der Protoplastierungsansatz wurde 15-90 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Währenddessen wurde die Protoplastierungs-Effizienz in 15-minütigen Abständen mikroskopisch nach steriler Probenahme verfolgt. Nach ausreichender Protoplastierung wurde der Ansatz auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 5 ml eiskaltem P-Puffer gestoppt. Zur Abtrennung von Mycelresten wurde der Ansatz durch sterile Quarzwolle filtriert und, die Filtrationseinheit nochmals mit 2 ml P-Puffer durchspült und das Filtrat 7 min bei $700 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die Protoplasten wurden vorsichtig in 0,5 – 3 ml P-Puffer resuspendiert und zu 100 µl-Aliquoten in einem Eisbad bei -70°C eingefroren und zur Verwendung schnell unter lauwarmem Wasser aufgetaut.

Zur Überprüfung des Anteils nicht-protoplastierter Zellen wurden 20 µl der Protoplastensuspension mit 200 µl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gemischt und der Ansatz auf eine R2YE-Platte (s. 1.4.3) ausplattiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem die gleiche Menge Protoplastensuspension mit 200 µl P-Puffer ausplattiert wurde. Die Bestimmung der Anzahl der regenerierungsfähigen Protoplasten erfolgte durch Ausplattieren von geeigneten Verdünnungsstufen in P-Puffer auf R2YE-Platten.

4.4 Transformation von Streptomyceten

Das Einbringen von Plasmid-DNA in Streptomyceten-Protoplasten wurde durch die Polyethylenglykol-vermittelte Transformation nach Hopwood et al. (1985) realisiert. Alle Schritte wurden, sofern möglich, auf Eis durchgeführt. 100 µl Protoplastensuspension (etwa 10^9 regenerationsfähige Zellen) wurden mit 100 µl P-Puffer (s. 1.6.5) verdünnt. Nach Zugabe von 5-10 µg DNA (aus Nukleobond AX-100-Präparationen, s. 4.5.2) in einem Volumen von maximal 10 µl wurde der Ansatz unmittelbar mit 500 µl T-Puffer (s. 1.6.5) versetzt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Der Transformationsansatz wurde auf 3-4 R2YE-Platten ausplattiert. Zur Regeneration wurden die Agarplatten 14 Stunden bei 28°C bebrütet und zur Selektion mit 200 µl einer 5 mg/ml Thiostrepton-Lösung in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ überschichtet. Nach 3-5 Tagen weiterer Bebrütung bei 28°C wurden Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt und zur weiteren Selektion auf HA-Agarplatten mit 50 µg/ml Thiostrepton ausgestrichen.

4.5 Isolierung von Plasmid-DNA

4.5.1 Plasmidminipräparationen aus *E. coli*

Die nachfolgend beschriebene, nach Holmes und Quigley (1981) veränderte Methode wurde routinemäßig für Restriktionsanalysen, Klonierungsexperimente und zur Isolierung von Cosmiden eingesetzt. Es wurden Ausbeuten bis zu 25 µg erzielt. Die in den Präparationen enthaltene RNA wurde gegebenenfalls durch Behandlung mit RNase A entfernt. Alle verwendeten Puffer sind unter 1.6.7 aufgeführt.

E. coli-Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37°C und 170 rpm in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden abzentrifugiert (1.811 x g, 5 min, 4°C), der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen und das Zellpellet in 500 µl STE-Puffer resuspendiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 400 µl STET-Puffer aufgenommen und 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach einer 1-minütigen Inkubation bei 100°C wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt und dann 20 min bei 17.500 x g und RT zentrifugiert. Denaturierte Proteine und genomische DNA wurden mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 40 µl 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 300 µl eiskaltem Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 17.500 x g, 4°C) wurde der Überstand dekantiert und die pelletierte DNA mit 1 ml 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen (5 min, 17.500 x g, 4°C), getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -24°C. Für Restriktionsanalysen wurden 0,25 - 0,5 µl der Plasmid-DNA eingesetzt.

4.5.2 Plasmidmaxipräparationen aus *E. coli*

Größere Plasmidmengen mit einem höheren Reinheitsgrad durch Abtrennung von RNA, Proteinen, Kohlehydraten und anderen Metaboliten wurden nach Aufreinigung der Plasmid-DNA über Nukleobond AX-100-Säulen (Machery-Nagel, Düren) (s. 1.3) erhalten. Die Aufarbeitung von Zellmaterial aus 50 ml Bakteriensuspension richtete sich genau nach Angaben des Herstellers und führte zu einer Ausbeute von 80-160 µg Plasmid-DNA, die in 160 µl TE-Puffer, pH 7,6 (s. 1.6.7) oder sterilem H₂O_{bidest} (zur Sequenzierung) gelöst wurde. Die Lagerung erfolgte bei -24°C. Die so erhaltene DNA wurde sowohl zur Transformation in *S. lividans* TK24 (s. 4.4) als auch zur DNA-Sequenzierung am Vistra DNA Sequencer 725 (Molecular Dynamics, Krefeld) (s. 4.9) und zur Auftragssequenzierung durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) verwendet.

4.5.3 Plasmid-Isolierung aus Streptomycceten

Eine DNA-Isolierung von Plasmiden bis zu einer Größe von etwa 25 kb im geringen Maßstab war durch eine nach Hopwood et al. (1985) modifizierte Methode möglich. Dabei wird der Mureinsacculus der bakteriellen Zellwand durch Lysozym-Behandlung abgebaut und die so entstandenen Sphäroblasten werden durch alkalische Lyse in Gegenwart von SDS aufgeschlossen. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind unter 1.6.7 aufgelistet.

2 ml einer über 1-2 Tage bei 28°C unter Schütteln bei 170 rpm in HA-Medium (s. 1.4.2) mit 30 µg/ml Thiostrepton kultivierten Streptomycceten-Suspension wurden abzentrifugiert (2.240 x g, 10 min, 4°C), mit 500 µl L1-Puffer gewaschen und in 500 µl L2-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 20-30 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 650 µl L3-Lösung mehrmals invertiert und weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 650 µl eiskalter L4-Lösung, vorsichtigem Invertieren und 10-minütigem Inkubieren auf Eis wurden Zellfragmente und Proteine durch Zentrifugation (17.500 x g, 20 min, 4°C) entfernt und das klare Lysat durch Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 4.6.1) weiter aufgereinigt. Die in der wässrigen Phase enthaltene DNA wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an eiskaltem Isopropanol und Invertieren 15 min bei RT gefällt. Das nach Zentrifugation

(17.500 x g, 20 min, 4°C) erhaltene DNA-Präzipitat wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (s. 1.6.7) 30 min bei 4°C gelöst. Eine Lagerung erfolgte bei -24°C. Zur Restriktionsanalyse wurden 5-10 µl Plasmid-DNA eingesetzt.

4.6 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

4.6.1 Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA

Zur Abtrennung von Proteinen von DNA-Präparationen wurden DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen Rotiphenol (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1), Roth, Karlsruhe) versetzt, durch Vortexen gut durchmischt und zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (1-5 min, 17.500 x g, 4°C). Die obere wässrige, die DNA enthaltende Phase wurde vorsichtig abgezogen und verbliebene Phenolreste durch Ethanolfällung (s. 4.6.2) entfernt.

4.6.2 Alkoholfällung

Sowohl eine Aufkonzentrierung als auch Reinigung der DNA von niedermolekularen Substanzen wird durch Alkoholfällung erzielt. Zur DNA-Lösung wurde das 0,1-fache Volumen 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 5,2) und das 3-fache Volumen eiskalten 98 % igen Ethanol oder das 0,8 bis 1-fache Volumen Isopropanol zugegeben und der Ansatz nach Invertieren bei Verwendung von Ethanol 20 min bei -70°C bzw. 5 min bei RT bei Verwendung von Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (17.500 x g, 20 min, 4°C) wurde das DNA-Präzipitat mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer oder sterilem H₂O_{bidest} gelöst.

4.6.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Quantifizierung von DNA mit hohem Reinheitsgrad erfolgte photometrisch nach geeigneter Verdünnung in H₂O_{bidest} mit einem GeneQuant Photometer (Pharmacia, Freiburg) bei 260 nm. Die Berechnung des DNA-Gehalts erfolgte auf der Grundlage, daß eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht.

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen mit Verunreinigungen von RNA oder Proteinen erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Ethidiumbromid-Färbung durch Abschätzung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der eines geeigneten DNA-Größenstandards mit bekannter Konzentration.

4.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Molekülgröße wurde durch Horizontal-Gelelektrophorese unter Verwendung einer GNA-100-Apparatur (Pharmacia, Freiburg) mit einem Spannungsgeber (BIORAD, Modell 3000xi) erzielt. Durch Verwendung von 0,4-1,5 % igen (w/v) Agarosekonzentrationen (Agarose ultrapure, USB, Cleveland, USA) konnten DNA-Fragmente im Bereich von 0,5 bis 50 kb aufgetrennt werden. Zur Trennung von Fragmenten < 500 bp wurden 3,5% (w/v) NuSieve[®]GTG[®] Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) eingesetzt. Die Herstellung der Agarosegele wurde nach den Angaben von Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die zur Kartierung eingesetzten 0,4% igen Agarosegele (14,5 x 21 cm und 14,5 x 16 cm) wurden zu Erhöhung der Stabilität auf eine dünne 1,5 % ige Agaroseunterlage

aufgeschichtet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen im Verhältnis 1:1 mit Ladepuffer (s. 1.6.4) versetzt. Als Elektrophorese-Puffer diente gewöhnlich 1x TAE (s. 1.6.4), zur Kartierung wurde 0,5x TBE (s. 1.6.4) eingesetzt. Die Elektrophorese analytischer Gele wurde bei einer konstanten Spannung von 50 - 70 V bei RT durchgeführt; bei den zur Kartierung eingesetzten TBE-Gelelen erfolgte die Trennung bei 40-50 V (ca. 16-20 mA) über 22-24 h bei 4°C. Folgende DNA-Standardmarker dienten zur Größenbestimmung, wobei die eingesetzte Menge in Klammern angegeben ist:

- 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL, Karlsruhe): 0,5 - 12 kb (300 ng)
- High Molecular Weight Marker (Gibco BRL, Karlsruhe): 8,3 – 48,5 kb (125 ng) (zur Kartierung wurden 50 ng nach chemischer DIG-Markierung eingesetzt (s. 4.8.5.2))
- DNA Molecular Weight Marker II und VII, DIG-markiert (Boehringer Mannheim, Mannheim): 0,564 – 23,13 kb und 0,359 – 8,576 kb für Southern-Blot-Hybridisierungen (je 50 ng)

Zur Detektion der DNA-Fragmente wurden die Agarosegele 15-30 min in 300 ml Ethidiumbromidlösung (s. 1.6.4) inkubiert und anschließend unter UV-Durchlicht bei 312 nm (Transilluminator IL-200 M, Bachofer, Reutlingen) betrachtet. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Eagle-Eye II-Systems (Stratagene, Heidelberg).

4.7.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung präparativer DNA-Restriktionsansätze wurde das Agarose-Gel Ethidiumbromid-gefärbt und das Agarosestück des entsprechenden DNA-Fragmentes unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (150) (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Nach Ethanol-Fällung der erhaltenen DNA wurde diese in TE-Puffer (s. 1.6.7) gelöst.

4.8 DNA-Manipulationen

4.8.1 Restriktionsspaltung von DNA

Die DNA-Restriktionsspaltungen wurden gemäß der vom Hersteller angegebenen, enzymespezifischen Inkubationstemperatur und mit den mitgelieferten Puffern über einen Zeitraum von 1-2 h in einem Gesamtvolumen von 10-120 µl durchgeführt. Vorhandene RNA wurde durch Zugabe von RNase A in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml zum Restriktionsverdau zerstört. Falls erforderlich wurden die Restriktionsenzyme unter den jeweils enzymabhängigen Bedingungen durch Erhitzen (15 min, 80°C), Ethanol-Fällung (4.6.2) oder Phenol-Chloroform-Behandlung (4.6.1) inaktiviert.

Partielle Restriktionsspaltung:

Eine partielle Spaltung der DNA war zur Cosmid-Kartierung durch das Cosmid-Kartierungs-Verfahren (s. 4.8.6) notwendig und wurde sowohl durch Variation der Enzymkonzentration als auch der Reaktionszeit erzielt. Die Partialverdau wurden mit jeweils unterschiedlichen Enzymkonzentrationen (0,05 bis 0,25 Units/µg DNA) in Abhängigkeit von der Anzahl der im Cosmid enthaltenen Schnittstellen mit einer DNA-Menge von 16-20 µg in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Während der Inkubation bei der entsprechenden Temperatur wurden nach 5, 10, 15, 20 und 30 min jeweils 5 µl des Ansatzes entnommen und die Reaktion gestoppt, indem die Aliquote in eisgekühlte Eppendorfgefäße mit 3 µl vorgelegter 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) einpipettiert wurden. Jeweils 500 ng DNA der Partialverdau wurden zur Ermittlung der optimalen Bedingungen durch Agarose-Gelelektrophorese mit 0,4 % Agarose aufgetrennt (s. 4.7).

4.8.2 Auffüllreaktion von DNA mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase

Mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase aus *E. coli* konnten doppelsträngige DNA-Fragmente mit überhängenden 5'-Enden aufgefüllt werden. 3'-überhängende Enden werden aufgrund der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms entfernt. Die somit erhaltenen „glatten Enden“ konnten in einer anschließenden „blunt-end-Ligation“ religiert werden. Zu diesem Zweck wurde etwa 1-4 µg DNA mit 0,2 mM dNTP-Mix (jeweils 0,2 mmol Nukleotid), 1x T4-DNA-Polymerase-Puffer, 1 mg/ml BSA und 4 U T4-DNA-Polymerase (Amersham, Braunschweig) in einem Gesamtvolumen von 20 µl 5 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Phenolisierung (s. 4.6.1) gestoppt.

4.8.3 Dephosphorylierung von DNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase

Zur Vermeidung von intramolekularer Ligation der DNA wurde die dazu notwendige 5'-Phosphatgruppe durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase entfernt. Die zu dephosphorylierende DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 1x One-phor-all-buffer und 0,1 U alkalischer Phosphatase (Pharmacia, Freiburg) 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung (20 min bei 85°C) abgestoppt.

4.8.4 DNA-Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase

Zu Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA in Gegenwart von ATP wurde die T4-DNA-Ligase (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Ligationsansätze enthielten in einem Volumen von 10 µl 1 U T4-DNA-Ligase, 1x Ligationspuffer und 0,1 mM rATP. Linearisierter Vektor und das zu klonierende Insert wurden im Verhältnis 1:10 bis 1:100 eingesetzt. Die Ligation erfolgte 2 h bei RT und der Ansatz wurde ohne weitere Behandlung in *E. coli* eingebracht.

4.8.5 Southern Hybridisierung von DNA

Alle zur Immobilisierung und Southern Hybridisierung verwendeten Puffer und Lösungen sind unter 1.6.8 aufgeführt. Grundsätzlich wurden alle Schritte nach den Angaben der jeweils benutzten Kits durchgeführt.

4.8.5.1 Enzymabhängige „Random Prime“- DIG-Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente im Größenbereich zwischen 200 und 1000 bp wurden enzymatisch mit Hilfe des DIG-High Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kits II (Boehringer Mannheim, Mannheim) Digoxigenin-markiert. Die Sonde wurde aus 0,5 –1 µg der zu markierenden DNA, die zuvor nach Restriktionsverdau aus Agarosegelen eluiert und nach Phenol-Chloroform-Extraktion gefällt wurde, nach Anleitung des Kits hergestellt. Dabei kommt es zum zufälligen Einbau von DIG-gekoppeltem dUTP während der DNA-Synthese mit Klenow-DNA-Polymerase I. Nicht eingebautes, freies DIG-dUTP wurde durch LiCl-EtOH-Fällung entfernt. Ebenso wurde die Sonden-Detektion und Quantifizierung der Labeling-Effizienz nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die auf Southern-Blot-Hybridisierung basierende Cosmid-Kartierungs-Methode wurden folgende Sonden aus dem Cosmidvektor SuperCos 1 hergestellt, die eine Kartierung vom T3- bzw. T7-Promotor-seitigen Bereich erlaubten:

SuperCos 1-T3: Herstellung der Sonde aus einem 512 bp *ScaI-EcoRI*-Fragment

SuperCos 1-T7: Herstellung der Sonde aus einem 813 bp *BamHI-SspI*-Fragment

Die DNA-Sequenzen der SuperCos 1-T3 und -T7-Sonden befinden sich im Anhang (s. VII 1).

4.8.5.2 Chemische DIG-Markierung von DNA-Fragmenten

Die chemische DIG-Markierung mit Hilfe des DIG-Chem-Link Labeling and Detection Sets (Boehringer Mannheim, Mannheim) eignet sich auch zur Markierung von DNA-Längenstandards und Oligonukleotiden im Größenbereich unter 100 bp. Hierbei kommt es zur nicht-kovalenten koordinativen Bindung von DIG-Chem-Link an die Position N7 der Guanosin- und Adenosin-Basen. Durchschnittlich wird jede 10. Base innerhalb der DNA markiert.

DIG-Markierung des High Molecular Weight DNA-Markers (8,2 – 48,5 kb):

Unter Standardbedingungen wird die DNA zum Teil auch fragmentiert. Um die ursprüngliche Größe des DNA-Markers nicht zu verändern, wurden folgende milde Markierungsbedingungen für eine geringe Markierungsdichte gewählt:

1 µg High Molecular Weight DNA-Marker (8,2 – 48,5 kb) (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe) wurden mit 0,2 µl DIG-Chem-Link-Reagenz 1 auf 20 µl Endvolumen mit H₂O_{bidest} aufgefüllt und nach Durchmischung 30 min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Stop-Lösung abgestoppt und der Reaktionsansatz nach LiCl-Ethanol-Fällung in 40 µl TE-Puffer gelöst. Für Southern-Blot-Hybridisierungen wurden 50 ng des DIG-markierten Markers auf Agarosegele aufgetragen.

DIG-Markierung der Prenyltransferase-Sonde PT1:

Zur Identifizierung des 4HPP Dimethylallyltransferase-Gens aus *S. spheroides* NCIMB 11891 wurde eine degenerierte 30 bp-Oligonukleotid-Sonde (PT1) aus einem konservierten Bereich der Prenyl-Bindungsstelle verschiedener Prenyltransferasen mit folgender Sequenz abgeleitet und durch die Firma Perkin Elmer (Weiterstadt) synthetisiert:

PT1: 5'-CTS HTS CWS GAC GAC VTS CCS KSS RTS GAC -3'

Die DIG-Markierung wurde unter folgenden Bedingungen mit Hilfe des DIG-Chem-Link Labeling and Detection Sets (Boehringer Mannheim, Mannheim) durchgeführt:

2 µg PT1-Sonde wurden mit 2 µl DIG-Chem-Link-Reagenz 1 in einem Gesamtvolumen von 20 µl H₂O 30 min bei 85°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 5 µl Stop-Lösung abgestoppt. Die markierte Sonde wurde direkt zur Hybridisierung eingesetzt, wobei 10 ml Hybridisierungslösung mit 110 pmol PT1-Sonde (1 µg DNA) verwendet wurden.

4.8.5.3 Southern Blot

Nach Restriktion und gelelektrophoretischer Auftrennung von 5-10 ng Plasmid-DNA bzw. 10-750 ng Cosmid-DNA in TBE-Puffer und Ethidiumbromid-Färbung (s. 4.7) wurde das Agarosegel 5 min in Depurinierungslösung und anschließend 2 mal 15 min in Denaturierungslösung inkubiert. Diese alkalische Depurinierung ermöglicht aufgrund der durch Strangbrüche hervorgerufenen Fragmentierung der DNA einen leichteren Transfer größerer Fragmente (> 10 kb) beim Blotting. Nach zweimaligem Waschen über je 15 min in Neutralisierungslösung fand der Transfer der einzelsträngigen DNA auf eine Hybond-N Nylonmembran (Amersham, Braunschweig) mittels Kapillartransfer (Sambrook et al. 1989) mit 20x SSC-Puffer über einen Zeitraum von 16 h statt. Danach wurde die DNA durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert, indem diese 60 s auf der Vorder- und 30 s auf der Rückseite mit UV-Licht bei 312 nm bestrahlt wurde.

4.8.5.4 Hybridisierung, Waschbedingungen und Detektion

Die gebloottete und fixierte Nylonmembran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt und zwischen 2 und 4 Stunden prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 10-11 ml Hybridisierungslösung und der entsprechenden unmittelbar zuvor denaturierten (10 min, 100 °C) Sonde über Nacht bei der jeweils spezifischen Hybridisierungstemperatur. Unspezifische Bindungen wurden durch Waschen mit jeweils 2 mal 2x SSC mit 0,1% SDS bei RT und 0,5x SSC mit 0,1 % SDS bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur entfernt. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz unter Verwendung von Hyperfilm ECL-Röntgenfilmen der Firma Amersham (Braunschweig).

In Tab. 19 ist eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sondenkonzentrationen, Hybridisierungs- und Waschbedingungen dargestellt. Das Volumen der jeweiligen Waschlösung betrug in Abhängigkeit von der Membrangröße 100 ml/100 cm².

Tab. 19: Zusammenfassung der DNA-Sonden-Konzentrationen, Hybridisierungs- und Waschbedingungen der durchgeführten Southern-Hybridisierungen

Sonde	gebloottete DNA-Menge	Markierung	Sonden-Konzentration pro ml Hybridisierungslösung [ng/ml]	Hybridisierungstemperatur [°C]	Expositionsdauer [min]
SuperCos1-T3 und SuperCo1-T7	je 50, 250 und 700 ng Cosmid 9-6G und 10-9C	random-prime	16	68	30
PT1	je 10 und 100 ng Cosmid 9-6G, 10-9C und 2-9A	DIG-Chem-Link	100 (11 pmol/ml)	45 50 55 65	120

Entfernung der Sonden:

Nach Hybridisierung und Detektion konnten die Membranen nach Entfernung der gebundenen Sonde für neue Hybridisierungen eingesetzt werden. Dazu wurde die Membran gut in H₂O_{bidest} gespült und anschließend je 3 mal mit 150 ml 0,2 M NaOH / 0,1 % SDS (37°C) und 2x SSC (RT) gewaschen. Eine Lagerung der Membranen war nach leichtem Antrocknen zwischen Whatmanpapier bei 4°C möglich.

4.8.6 Cosmid-Kartierungs-Methode

Zur Charakterisierung der mittels dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Sonde identifizierten Cosmide wurde neben der Restriktionskartierung eine auf Southern Hybridisierung basierende, nicht-radioaktive Cosmid-Kartierungs-Methode etabliert. Diese Methode orientierte sich nach dem im Cosmid-Mapping-Kit der Firma Takara Biomedicals (Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg) angewandten Verfahren und erlaubt eine Kartierung rekombinanter, in den Cosmid-Vektor SuperCos 1 einklonierter DNA bis zu einer Größe von 40 kb.

Das zu kartierende Cosmid wird dazu durch ein Restriktionsenzym linearisiert, welches im Optimalfall lediglich eine Schnittstelle im SuperCos 1-Vektor im Abstand von 200 bp zum einklonierten Insert, jedoch keine (oder maximal eine) Schnittstelle im Insert aufweist. In dieser Arbeit wurde *HindIII* verwendet, dessen Spaltsequenz allerdings einmal im mittleren Bereich der Cosmide auftrat. Anschließend wurde das linearisierte Cosmid mit dem zu kartierenden Restriktionsenzym partialverdaut, so daß unterschiedlich lange DNA-Fragmente

entstanden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente mit 0,4% igen Agarosegelen (s. 4.7) erfolgte die Detektion durch Southern Hybridisierung mit Sonden, die aus SuperCos 1-Sequenz-Bereichen seitlich des inklonierten Inserts (Bereiche der T3- und T7-Promotor-Bindungsstelle) ausgewählt wurden (s. Anhang VII 1). Die Länge der einzelnen detektierten DNA-Fragmente repräsentiert den Abstand der spezifischen Restriktionsschnittstellen vom rechten oder linken Ende der Cosmid-Klone. Die Kartierung war so von beiden Seiten möglich.

Die Kartierung der Cosmide 9-6G und 10-9C wurde mit *EcoRI* und *BglII* durchgeführt: Für die Kartierung mit einem Restriktionsenzym wurden je 100 – 120 µg des entsprechenden Cosmids mit 120 U *HindIII* vollständig verdaut und anschließend durch Phenol-Chloroform-Behandlung und EtOH-Fällung gereinigt. Mit jeweils 20 µg des Cosmids wurden Partialverdau mit dem zu kartierenden Restriktionsenzym mit jeweils 5-6 verschiedenen Enzymkonzentrationen zwischen 0,05 und 0,25 Units/µg DNA wie unter 4.8.1 beschrieben durchgeführt. In einem Vorversuch wurde zuvor der am besten geeignete Enzymkonzentrations-Bereich ermittelt. Die Qualität der Partialverdau wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 500 ng des entsprechenden Partialverdau überprüft. Von dem Partialverdau mit optimalen Ergebnissen wurden jeweils 50, 250 und 700 ng DNA und geeignete DIG-markierte Größenstandards gelelektrophoretisch aufgetrennt und Ethidiumbromid-gefärbt (s. 4.7). Die DNA wurde anschließend wie unter 4.8.5 beschrieben auf eine Nylonmembran geblottet und unter den in Abschnitt 4.8.5.4 aufgeführten Bedingungen mit der SuperCos 1-T3-Sonde hybridisiert. Nach Möglichkeit wurde der Blot nach Entfernung der Sonde zur erneuten Hybridisierung mit der SuperCos 1-T7-Sonde wiederverwendet. Die Herstellung und enzymatische DIG-Markierung der beiden Kartierungs sonden ist in Abschnitt 4.8.5.1 beschrieben. Nach Chemolumineszenz-Detektion wurde der Abstand der Restriktionsschnittstellen über eine Eichkurve mit Hilfe der Größenstandards bestimmt.

4.8.7 PCR-Methoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden mit einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Weiterstadt) in einem Volumen von 100 µl durchgeführt.

4.8.7.1 Cosmid-Kartierung

Nach Erstellung einer Restriktionskarte für die Cosmide 9-6G und 10-9C mit Hilfe der Cosmid-Kartierungs-Methode (s. 4.8.6) sollte die Orientierung der klonierten größeren *EcoRI*-Fragmente (Subklone p9-6GE4, p9-6GE2, p9-6GE9, p10-9CE3, p10-9CE4, p9-6GE5, p9-6GE6, p10-9CE2 und p10-9CE1) innerhalb der Cosmide durch PCR-Amplifikation mit jeweils 3 Primern pro Ansatz bestimmt werden. Die PCR-Primer wurden jeweils aus den Endbereichen der Fragmente abgeleitet und dergestalt kombiniert, daß die Reaktion mit jeweils einem Primer eines *EcoRI*-Fragmentes mit beiden Primern des benachbarten Fragmentes durchgeführt wurde. Die Primer wurden dabei so gewählt, daß PCR-Produkte im Bereich zwischen ca. 300 und 1500 bp amplifiziert wurden, die Sequenzbereiche der jeweiligen benachbarten Fragmente stromauf- und stromabwärts der *EcoRI*-Schnittstelle enthielten. Durch die unterschiedliche Größe der möglichen PCR-Produkte konnte bestimmt werden, welche Primer-Kombination (und somit welche Fragment-Orientierung) vorliegt. Um weiterhin eine PCR-Klonierung der überlappenden PCR-Produkte zu ermöglichen wurden *HindIII* bzw. *XbaI*-Schnittstellen in die Primer eingebaut, wobei maximal 3 Basen der 23-25 bp großen Oligonukleotide zum Einbringen der Schnittstellen verändert wurden. Folgende Primer wurden abgeleitet, wobei die Erkennsequenzen der eingeführten Schnittstellen unterstrichen und im Vergleich zur Originalsequenz veränderte Basen fett markiert sind:

MS1: 5'- TCCAGTG**AAGCTT**GTCTCGAACGCCA -3' (*HindIII*)

MS2: 5'- AGGCCTCG**TCTAGAT**GTAGCTCG -3' (*XbaI*)

MS3: 5'- TTGCCTCT**AGAACCGT**CCCGGTG -3' (*XbaI*)

MS4: 5'- TCGGT**AAGCTT**GGTGTCTGGGCA -3' (*HindIII*)

MS5: 5'- GTACA**AAGCTT**AGTCGAGTGA**CTGG** -3' (*HindIII*)

MS6: 5'- CGCATT**AAGCTT**CGCTTTCGCAAG -3' (*HindIII*)

MS7: 5'- AGGCC**AAGCTT**ACACCGATCCGG -3' (*HindIII*)

MS8: 5'- AGTGGT**TCTAGAC**GTGCAGCCAC -3' (*XbaI*)

MS9: 5'- AAGCG**TCTAGA**AATGCCTTGCCAC -3' (*XbaI*)

MS10: 5'- TAGCCGAA**AAGCTT**CTGGCCATAG -3' (*HindIII*)

MS11: 5'- TCCTGTT**AAGCTT**CATGCGGCCAC -3' (*HindIII*)

MS12: 5'- AGGGTGT**TCTAGAC**GTCTGGGAC -3' (*XbaI*)

Die Lage der einzelnen Primer innerhalb der Gesamtsequenz ist im Anhang (VII 2) dargestellt.

Die Primer-Kombinationen MS1-MS2-MS3; MS2-MS3-MS4; MS5-MS6; MS7-MS8-MS9; MS8-MS9-MS10 und MS11-MS12 wurden unter folgenden Bedingungen in PCR-Reaktionen eingesetzt:

Substanz	Endkonzentration	Cyclus	Temperatur	Zeit	Cyclen
10x-PCR-Puffer (Perkin Elmer)	1X	Hotstart	95 °C	5 min	1
Primer 1 bis 3	je 22 pmol	Denaturierung Annealing Elongation	95°C	90 s	35
9-6G oder 10-9C	500 ng		70°C	2 min	
dNTP-Mix	0,2 mM		72°C	2 min	
AmpliTaq-Gold- Polymerase (Perkin-Elmer)	2,5 U		4°C	∞	1

4.8.7.2 Herstellung von Plasmidkonstrukten zur Überexpression der Novobiocinsäure-Synthetase

Die Novobiocinsäure-Synthetase (NBSS) sollte zur Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie sowohl als C- als auch als N-terminales 6xHistidin-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden zur PCR-Amplifikation folgende 3 Primer aus der Sequenz von *novL* aus *S. spheroides* NCIMB 11891 abgeleitet (eingeführte Schnittstellen sind fett markiert):

novL-1: 5'-TAGCCAC**GCATGCC**GAACAAGGATCAC-3'

novL-3: 5'- CAT**CGAATTCTCAGGATCC**CCTGTCCACCA-3'

novL-4: 5'-CGAA**AGATCTCCACATATG**GCGAACAAGG-3'

Zur Klonierung von *novL* als C-terminales 6xHistidin-Fusionsprotein wurde die PCR-Reaktion mit den Primern novL-1 und novL-3 durchgeführt, wobei durch Primer novL-1 eine *SphI*-Schnittstelle eingebracht wurde, und dadurch eine Änderung des Startcodons von GTG nach ATG mit sich führte. Durch Primer novL-3 wurde eine zusätzliche *BamHI*-Schnittstelle eingeführt, wodurch das ursprüngliche Stopcodon entfernt und eine in-frame-Ligation des C-Terminus an den 6xHis-Tag ermöglicht wurde. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Substanz	Endkonzentration	Cyclus	Temperatur	Zeit	Cyclen
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase Reaktionspuffer (10x)	1X	Hotstart	96 °C	6 min	1
DMSO	5 % (v/v)	Denaturierung	95°C	90 s	27
pMS76	100 ng	Annealing	72°C	45 s	
dNTP-Mix	0,2 mM	Elongation	72°C	4 min	
Pimer novL-1 und novL-3	je 22 pmol		4°C	∞	1
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (Stratagene)	2,5 U				

Das PCR-Produkt wurde durch geeignete Restriktionsverdau geprüft und nach *SphI*-*BamHI*-Verdau in die gleichen Schnittstellen des Überexpressionsvektors pQE70 ligiert. Das erhaltene Konstrukt wurde pMS80 benannt.

Um überprüfen zu können, ob das Anhängen des His-Tags an NovL die NBSS-Aktivität beeinflusst, wurde das entsprechende Konstrukt auch ohne His-Tag hergestellt: Zur Entfernung des C-terminalen His-Tags wurde pMS80 *BamHI*-*HindIII*-verdaut und nach anschließender Herstellung von blunt-ends durch T4-DNA-Polymerase religiert (=Konstrukt pMS84).

Die Amplifikation von *novL* unter Verwendung der Primer novL-4 und novL-3 diente zur Klonierung der Novobiocinsäure-Synthetase als N-terminales 6xHistidin-Fusionsprotein. Durch Primer novL-4 wurden eine *BglII*-Schnittstelle zur in-frame-Ligation des His-Tags an den N-Terminus eingebracht. Außerdem wurde eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt, die eine Entfernung des His-Tags nach *NdeI*-Verdau und Religation ermöglichte (Konstrukt pMS85) und ebenfalls eine Änderung des Startcodons von GTG zu ATG bewirkte. Mit Hilfe von Primer novL-3 wurde eine *EcoRI*-Schnittstelle zur Klonierung des Expressionskonstruktes eingebracht. Außerdem wurde der C-Terminus um 2 Aminosäuren von ursprünglich -VDR zu -VDRGS verlängert. Die PCR wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wobei jedoch die Annealing-Temperatur auf 65°C reduziert wurde. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls durch geeignete Restriktionsverdau überprüft und nach *BglII*-*EcoRI*-Verdau in die gleichen Schnittstellen des Überexpressionsvektors pRSet B ligiert. Das erhaltene Konstrukt wurde pMS82 benannt.

4.9 Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung

Ein Großteil der in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzierungen wurden durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Teilbereiche der Subklone p9-6GE1, p9-6GE2, p9-6GE4, p9-6GE5, p9-6GE6, p9-6GE7 und p10-9CE1 wurden nach dem nun folgenden Didesoxy- oder Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger et al. (1977) durchgeführt. Zur Sequenzierung wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase in einer PCR-Reaktion („Cycle Sequencing“) ausgehend von spezifischen Universal-Primern (T3- und T7-Primer bzw.

M13-forward und M13–reverse) ein zur Template-DNA komplementärer Strang neugebildet. Die Polymerase-Reaktion wird in 4 getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt. Als Substrat für das Enzym werden zusätzlich zu den normalen 4 dNTPs je ein Didesoxynukleotid (ddNTP) zugesetzt. Der Einbau des ddNTPs bewirkt den Abbruch der Synthese, da im ddNTP keine freie 3'-OH-Gruppe mehr verfügbar ist. In jeden Ansatz wird zum jeweiligen dNTP das entsprechende ddNTP in einem bestimmten Verhältnis zugegeben, so daß es statistisch an jeder Position, an der dieses Didesoxynukleotid eingebaut wird, zum Kettenabbruch kommt. Man erhält ein Gemisch aus teilweise aufsynthetisierten DNA-Molekülen unterschiedlicher Länge, welches nach Denaturierung in vier parallelen Spuren gelelektrophoretisch über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt wird.

4.9.1 Geräte, Kits und Sequenzierreaktion

Die Sequenzierungen wurden am automatischen Sequenzierer Vistra 725 (Molecular Dynamics, Krefeld) durchgeführt. Als Universalprimer wurden die mit dem Fluoreszenzfarbstoff TexasRed™ markierten T3- und T7-Primer (USB, Cleveland, Ohio) verwendet, welcher vom Helium-Neon-Laser des Sequenziergerätes bei einer Wellenlänge von 594 nm angeregt und bei 615 nm emittiert wird. Die Detektion erfolgt durch ein Diodenarray-System. Die Sequenzierreaktion enthielt alle Bestandteile nach Angaben des Thermo-Sequense Core Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP, RPN 2440 (Amersham, Braunschweig) und jeweils 3-5 µg template-DNA in einem Gesamtvolumen von 8 µl.

4.9.2 Bedingungen der Cycle Sequencing-Amplifikation

Die PCR-Reaktion wurde mit dem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Weiterstadt) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Cyclen
Denaturierung	98 °C	5 min	1
Denaturierung	98 °C	30 s	25
Annealing und Elongation	60 °C	30 s	
Endelongation	60 °C	30 s	1
Kühlung auf	4 °C	∞	1

Nach Beendigung der Reaktion wurden pro Probe jeweils 2,5 µl Loading Dye zugesetzt und die Proben ca. 25 min bei RT in einer Vakuumzentrifuge bis auf ein Volumen von etwa 2,5 µl eingengt.

4.9.3 Herstellung des Sequenziergels und Laufbedingungen

Das Sequenziergel wurde mit Hilfe des DNA Sequencing Gel Mix Kits (USB, Ohio) hergestellt. Dazu wurden 25 ml Gel-Mix (5,0 % Acrylamid, 0,5 % Bisacrylamid, 7,0 M Harnstoff in TBE) durch Zugabe von 175 µl APS (10 %) und 21 µl TEMED innerhalb von 1,5-2 h auspolymerisiert. Mit Hilfe eines Haifischkamms konnten 10 Templates unter folgenden Laufbedingungen sequenziert werden:

- Spannung: 1.400 V
- Laufpuffer: 1x TBE
- Temperatur: 45°C
- Vorlauf: 10 min
- Laufzeit: 480 min

4.9.4 Sequenzauswertung

Die Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes DNASIS for Windows Version 2.1 (1995), Hitachi Software Engineering, San Bruno, USA. Die Identifikation offener Leserahmen erfolgte durch das CODONPREFERENCE-Programm (Devereux et al. 1984) unter Berücksichtigung des für Streptomycceten typischen Codongebrauchs (Wright und Bibb, 1992).

Homologievergleiche auf DNA- und Proteinebene wurden über Internet-NCBI-Blast-Analyse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1>) (Gish and States, 1993; Altschuh et al. 1990). Weitere Datenbankrecherchen erfolgten unter Nutzung von SWISSPROT und EMBL.

5 Methoden der Biochemie

5.1 Herstellung von zellfreien Enzymrohextrakten

5.1.1 Standard-Zellaufschluß von *E. coli*

Zur Bestimmung der Löslichkeit heterolog überexprimierter rekombinanter Proteine und von Enzymaktivitäten in Rohextrakten in *E. coli* XL1 Blue MRF⁺ und BL21(DE3)pLysS wurden 100 ml Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit 5 ml einer Übernacht-Vorkultur (37°C, 170 rpm, Inokulation mit einer Einzelkolonie) angeimpft und unter Schütteln mit 180 rpm bei 30 bzw. 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 wurde mit 0,2 - 1 mM IPTG induziert und die Zellsuspension nach weiterer 3-4-stündigen Kultivierung pelletiert (4.300 x g, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden 1 mal mit 50 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen, pelletiert und anschließend in 1 - 1,5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) pro g Feuchtgewicht resuspendiert. Der Aufschluß erfolgte durch Ultraschall (Branson Sonifier 250, Mikrospitze, Output: 200 W) mit einer 5-minütigen Beschallzeit und 50 % Intervallpausen bei 4°C. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (30 min, 17.500 x g, 4°C) abgetrennt und der Überstand über Sephadex G-25 NAP-10-Säulen entsalzt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford (s. 5.2) bestimmt.

5.1.2 Herstellung von Enzymrohextrakt zur Reinigung rekombinant exprimierter Novobiocinsäure-Synthetase in *E. coli*

Die Reinigung der Novobiocinsäure-Synthetase erfolgte nach heterologer Überexpression als C-terminales Histidin-Fusionsprotein mit Hilfe des Expressionskonstruktes pMS80 in *E. coli* XL1 Blue MRF⁺. 80 ml einer mit einer Einzelkolonie des transgenen *E. coli* XL1 Blue MRF⁺:pMS80 beimpften LB-Übernacht-Kultur mit 50 µg/ml Carbenicillin dienten als Vorkultur für die Inokulation von insgesamt 1000 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin (5 x 200 ml in 1 l-Erlenmeyerkolben mit Schikane). Nach Kultivierung bei 30°C unter Schütteln mit 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde mit 0,5 mM IPTG Endkonzentration induziert. 3 Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation: 6.200 x g, 10 min, 4°C), mit 100 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen und das Zellpellet nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach 15-minütigem Auftauen der Zellen bei 4°C wurden insgesamt 3-4 g Zellen (Feuchtgewicht) in 1 ml Lysepuffer (s. 1.6.1) pro g Zellen Feuchtgewicht resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluß erfolgte mit Hilfe eines Sonifiers (Branson Sonifier 250, Mikrospitze) bei 4°C im Eisbad unter Beschallung von 6 x 10 Sekunden bei 200 W mit jeweils 10-sekündiger Intervallpause. Nach anschließender Zugabe von 10 µg/ml RNase A und 5 µg/ml DNase I wurde das Lysat nochmals 10 min bei 4°C inkubiert, bevor restliche

Zellfragmente durch Zentrifugation (30 min, 17.500 x g, 4°C) abgetrennt wurden. Das so gewonnene klare Lysat wurde nach Bestimmung des Proteingehaltes (s. 5.2) in weiteren säulenchromatographischen Reinigungsschritten aufgearbeitet.

5.1.3 Zellanzucht und Zellaufschluß von *Streptomyces spheroides* DSM 40292 zur Untersuchung der 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität

Zur Herstellung kleinerer Mengen an Rohextrakt (aus bis zu 10 g Zellen Feuchtgewicht) wurden zwei 300 ml-Schikane-Erlenmeyerkolben mit je 50 ml CDM-Medium mit je 1 ml einer spät-logarithmischen *S. spheroides* DMS 40292-Vorkultur in 50 ml CDM-Medium, die zuvor mit 20 µl Sporensuspension beimpft wurde, angeimpft und 4-5 Tage bei 28°C unter Schütteln mit 170 rpm kultiviert.

Zur partiellen Enzymreinigung wurden größere Rohextrakt-Mengen aus bis zu 180 g Zellen Feuchtgewicht aus insgesamt 2,84 l CDM-Medium hergestellt: hier dienten je 5 ml einer spät-logarithmischen *S. spheroides* DSM 40292-Vorkultur als Inokulum für je 220 ml CDM-Medium in 1 l-Schikane-Erlenmeyerkolben und die Anzucht erfolgte unter den oben beschriebenen Bedingungen mit einer Schüttelfrequenz von nur 150 rpm.

Die Zellen wurden ab einer Novobiocin-Produktion von mindestens 25 µg/ml (siehe 6.1.3) geerntet (Zentrifugation: 4.300 x g, 15 min, 4°C), zweimal mit je 50 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt: Die Zellen wurden pro g Feuchtgewicht in 1 ml Puffer A mit 0,05 g/ml PVPP (s. 1.6.1) resuspendiert und unter Zugabe von Seesand 30 min gemörsert. Nach Abtrennung von Zellfragmenten durch Zentrifugation (27.000 x g, 30 min, 4°C) und Bestimmung des Proteingehaltes (s. 5.2) wurde der Rohextrakt für weitere Bestimmungen der Enzymaktivität über Sephadex G-25-Säulen entsalzt oder zur Enzymreinigung in anderen säulenchromatographischen Verfahren aufgearbeitet.

5.1.4 Zellanzucht und Zellaufschluß von *Streptomyces lividans* TK24 zur Untersuchung rekombinant exprimierter Proteine

Die Zellanzucht von *S. lividans* TK24-Transformanten mit den zu untersuchenden Expressionsplasmiden erfolgte in 300 ml-Erlenmeyer-Schikanekolben mit Glasperlen und je 50 ml CDM-Medium (s. 1.4.2) mit 20 µg/ml Thiostrepton, die mit je 500 µl Glycerindauerkulturen der entsprechenden Transformanten beimpft wurden. Nach einer Kultivierung von 4-5 Tagen bei 28°C und einer Schüttelfrequenz von 170 rpm, wurden die Zellen durch Zentrifugation (4.300 x g, 15 min, 4°C) geerntet, mit 50 ml Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen und pro g Zellen Feuchtgewicht in 1 ml Puffer A (s. 1.6.1) zur Untersuchung der 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität (s. 5.3.2) bzw. Puffer C (s. 1.6.1) zur Untersuchung der Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität (siehe 5.3.3) resuspendiert. Der Zellaufschluß wurde wie in Abschnitt 5.1.3 beschrieben durch Mörsern durchgeführt und der erhaltene, zentrifugierte Rohextrakt über Sephadex G-25-Säulen entsalzt.

5.2 Proteingehaltsbestimmung

Der Proteingehalt von Enzymlösungen und Rohextrakten wurde nach der Methode von Bradford (1976) über eine Eichgerade mit BSA als Standard über einen Bereich von 5-100 µg/ml ermittelt. 100 µl der in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) verdünnten Enzym- oder BSA-Lösung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz (s. 1.6.3) versetzt und die Absorption nach 5 min Inkubation bei RT spektralphotometrisch bei 595 nm vermessen. Als Referenz wurden 100 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 1 ml Bradfordlösung eingesetzt.

5.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

5.3.1 Bestimmung der DMAPP-IPP-Isomerase- und Phosphatase-Aktivität

Im DMAPP-IPP-Isomerase-Assay wird das gebildete DMAPP durch ethanolische Säurehydrolyse in den entsprechenden Alkohol hydrolysiert und durch die anschließende Extraktion mit Heptan vom säurestabilen IPP abgetrennt.

Im Rohextrakt enthaltene Phosphatasen bewirken eine Störung des DMAPP-IPP-Isomerase-Assays, da sie eine Hydrolyse der Prenyldiphosphate zum entsprechenden Alkohol katalysieren. Aus diesem Grund wurde die DMAPP-IPP-Isomerase-Aktivität jeweils unter Berücksichtigung möglicher Phosphatase-Aktivitäten bestimmt. Dazu wurde das durch Phosphatasen gebildete Isopentenol durch Heptan-Extraktion vom nichtzersetzten Substrat IPP abgetrennt.

Die Bestimmung der DMAPP-IPP-Isomerase- und Phosphatase-Aktivität wurde nach Heide und Berger (1989) durchgeführt und wie folgt modifiziert:

Der DMAPP-IPP-Isomerase-Assay enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 μl 2,4 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IPP (0,5 kBq), 45 μM IPP, 2,5 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) und 50-200 μg Protein. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 400 μl Ethanol und 20 μl 37% iger HCl abgestoppt. Nach 60-minütiger Hydrolyse bei 37°C wurde der Reaktionsansatz mit 800 μl Heptan extrahiert. 500 μl des Heptan-Überstandes wurden nach Zentrifugation des Reaktionsansatzes (3.000 x g, 10 min, RT) zur besseren Phasentrennung entnommen und mit Hilfe des Szintillationszählers (s. 7.2) vermessen.

Der Reaktionsansatz des Phosphatase-Assay enthielt die gleichen Komponenten wie der des DMAPP-IPP-Isomerase-Assays. Die Reaktion wurde jedoch durch Abkühlen auf 0°C gestoppt und ohne Säurehydrolyse direkt mit 800 μl Heptan extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben angegeben.

5.3.2 Bestimmung der 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität

Der Prenyltransferase-Assay enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 μl 50 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1,5 bis 8,2 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]DMAPP (305 bis 1.665 Bq), 10 μM DMAPP, 2,5 mM 4HPP, 0,5 mM MgCl_2 und 50-75 μg Protein. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 μl $\text{HCOOH}_{\text{konz.}}$ gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde mit 500 μl Ethylacetat extrahiert, um das entstandene 3DMA-4HPP vom 4HPP abzutrennen. 450 μl der Ethylacetatphase wurden nach Phasentrennung durch Zentrifugation (3.000 x g, 10 min, RT) entnommen, eingeeengt und der Rückstand wurde in 100 μl Methanol gelöst und entweder über HPLC (s. 6.1.2) oder mit Hilfe des Szintillationszählers (s. 7.2) analysiert.

Als Kontrolle wurden jeweils Aktivitätsbestimmungen mit hitzeinaktiviertem Protein (30 min, 100°C) in Anwesenheit aller Assaykomponenten und mit nativem Protein in Abwesenheit des Substrates 4HPP durchgeführt.

5.3.3 Bestimmung der Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität

Der Novobiocinsäure-Synthetase-Assay enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 μl 1 mM Ring A, 1 mM Ring B, 5 mM ATP, 5 mM MnCl_2 und 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). Aktivitätsbestimmungen mit zellfreiem Rohextrakt wurden mit 20-100 μg Protein und einer Inkubationsdauer von 20 min durchgeführt, während mit gereinigtem Enzym maximal 5 μg Protein eingesetzt und die Inkubationsdauer auf 7 min reduziert wurde. Die Reaktion wurde bei 30°C durchgeführt und durch Zugabe von 5 μl 1,5 M Trichloressigsäure-Lösung gestoppt. Die gebildete Novobiocinsäure wurde zweimal mit 500 μl Ethylacetat extrahiert und die Ethylacetat-Phase nach Vereinigung in einer Vakuumzentrifuge bei 30°C abgedampft. Der

Rückstand wurde in einem Methanol:H₂O_{bidest}-Gemisch (1:1) resuspendiert und mittels HPLC analysiert (s. 6.1.3).

5.3.4 ATP-[³²P]PP_i-Austauschreaktion

Die ATP-abhängige Aktivierung von Carbonsäuren in Form eines Acyladenylates kann durch einen ATP-[³²P]PP_i-Austausch nachgewiesen werden. Da es sich bei der Reaktion $\text{ATP} + \text{R-COOH} \rightleftharpoons \text{R-CO}\sim\text{AMP} + \text{PP}_i$ um einen reversiblen Vorgang handelt, kann die substratabhängige Bildung von [³²P]ATP nach Zugabe von [³²P]PP_i zum Reaktionsgemisch beobachtet werden. Eine Trennung von radioaktivem ATP und nicht umgesetztem [³²P]PP_i erfolgt durch Zugabe von Aktivkohle, welche lediglich [³²P]ATP bindet (Gevers et al. 1969). Der ATP-[³²P]PP_i-Austausch-Assay enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 5 mM MnCl₂, 5 mM ATP, 0,1 mM Na₄(PO₄)₂, 34,41 KBq [³²P]PP_i, 4 µg gereinigte Novobiocinsäure-Synthetase und 1 mM der zu testenden Substrate Ring A oder Ring B. Als Kontrollen wurden hitzeinaktivierte Novobiocinsäure-Synthetase bzw. BSA eingesetzt. Nach einer Inkubation von 20 min bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Stopmix (1,2 % (w/v) Aktivkohle, 0,1 M Na₄(PO₄)₂, 3% (v/v) Perchlorsäure) gestoppt. Die Aktivkohle wurde durch Zentrifugation (17.500 x g, 5 min, RT) pelletiert, zweimal mit je 1 ml H₂O_{bidest} gewaschen und in schließlich in 0,5 ml H₂O_{bidest} resuspendiert. Die an die Aktivkohle gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationszähler gemessen (s. 7.3).

5.4 Verfahren zur Enzymreinigung und -charakterisierung

5.4.1 Geräte, Regenerierung und Lagerung der Säulenmaterialien

Die säulenchromatographischen Verfahren wurden mit folgenden Biochromatographie-Anlagen der Firma Pharmacia (Freiburg) durchgeführt:

FPLC-Anlage: Die Anlage bestand aus zwei P-500 Doppelkolben-Pumpen, einem UV-MII Durchflußphotometer (280 nm), einem GradiFrac Fraktionssammler und einem LCC-501 Chromatographie-Controller. Die Probenauftragung erfolgte über eine 2 ml-Probenschleife mit Hilfe eines MV-7 Injektionsventils. Die UV-Absorption wurde über einen 2-Kanal-Flachbettschreiber aufgezeichnet.

Piccolo-System 50: Die Anlage bestand aus einer P-50 Displacement Pumpe, einem UV1-Durchflußphotometer (280 nm) und einem GradiFrac Fraktionssammler, der zur Steuerung der Anlage diente. Hinter die UV-Durchflußküvette war ein Leitfähigkeitsdetektor angeschlossen. UV-Absorption und Leitfähigkeit wurden über einen 2-Kanal-Flachbettschreiber (REC-102) aufgezeichnet.

Als Suspension vorliegende Säulenmaterialien (s. 1.2) wurden in C-Leersäulen der Firma Pharmacia (Freiburg) bzw. der Firma Qiagen (Hilden) nach den entsprechenden Empfehlungen des Herstellers gepackt und anschließend mit dem 3-5-fachen Säulenvolumen des entsprechenden Puffers equilibriert. Die Reinigungsschritte wurden stets bei 4°C durchgeführt.

Folgende Säulenmaterialien wurden nach Gebrauch zur Wiederverwendung regeneriert und in 20 % Ethanol (v/v) bei 4°C gelagert:

Sephadex G-25: Nach Gebrauch wurden die Säulen mit dem jeweils 5-fachen Säulenvolumen H₂O_{bidest} und 0,1 N NaOH gespült. Anschließend wurde bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes mit H₂O_{bidest} gewaschen.

DEAE-Sephacel: Die Regeneration erfolgte durch Waschen mit jeweils 3-fachem Säulenvolumen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 0,1 M NaCl, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 0,1 N NaOH, $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$.

HiLoad 26/60 Superdex 200: Zur Regeneration wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Nach 5-maligem Gebrauch wurde das Material mit je 3 Säulenvolumina 0,5 N NaOH und $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gepflegt.

5.4.2 Partielle Reinigung der 4HPP Dimethylallyltransferase aus *S. spheroides* DSM 40292

5.4.2.1 DEAE-Sephacel-Säule

Der nach Zellanzucht und Zellaufschluß von *Streptomyces spheroides* DSM 40292 (s. 5.1.3) erhaltene zellfreie Rohextrakt (zwischen 160 und 190 ml) wurde über eine P-1-Schlauchpumpe mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine mit Puffer A (s. 1.6.1) equilibrierte DEAE-Sephacel-Säule (Säulenvolumen ca. 170 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit 100 ml Puffer A gewaschen, bis keine Proteine mehr von der Säule eluierten und die Basislinien-UV-Absorption wieder erreicht wurde. Die Elution erfolgte unter Auffangen von 10 ml-Fractionen in folgendem nicht-linearen NaCl-Gradienten in Puffer B (Tab. 20):

Tab. 20: Nicht-linearer-Gradient der DEAE-Sephacel-Säule

Volumen [ml]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0	100	0
100	100	0
500	50	50
750	0	100
950	0	100

Die Fraktionen, in denen Prenyltransferase-Aktivität detektiert werden konnte, wurden vereinigt und durch Ammoniumsulfat-Fällung aufkonzentriert.

5.4.2.2 Ammoniumsulfat-Fällung (0-70%)

Zu den Prenyltransferase-aktiven DEAE-Sephacel-Fractionen wurden 70 % (w/v) fein gemörseretes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ langsam unter Rühren bei 4°C zugegeben und weitere 30 min gerührt. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation (27.000 x g, 30 min, 4°C) abgetrennt, in 2,4 ml Puffer A aufgenommen und über eine mit Puffer A equilibrierte Sephadex-G25-Säule (PD-10) entsalzt.

5.4.3 Reinigung der Novobiocinsäure-Synthetase

5.4.3.1 Nickel-Affinitäts-Chromatographie

Die Novobiocinsäure-Synthetase wurde als C-terminales 6xHistidin-Fusionsprotein in *E. coli* XL1 Blue MRF' überexprimiert (Expressionskonstrukt pMS80), was die Möglichkeit zur Verwendung der Nickel-Affinitäts-Chromatographie bietet. In dieser Arbeit wurde als Matrix Ni-NTA-Agarose (Nickel-Nitriloacetat-Agarose) der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und die Reinigung nach Anleitung des „The QIAexpressionist“-Handbuches (Qiagen, 3. Auflage, Stand März 1999) unter nativen Bedingungen durchgeführt. Die Bindungskapazität dieses Materials beträgt 5-10 mg His-Tag-Fusionsprotein pro ml Säulenmaterial.

Zellanzucht und Zellaufschluß erfolgten unter den in 5.1.2 beschriebenen Bedingungen. Dabei wurde der Zellaufschluß in Natriumphosphat-Puffer anstelle von Tris-HCl-Puffer durchgeführt, da Puffer mit sekundären oder tertiären Aminen eine Reduktion der Ni²⁺-Ionen bewirken. Zwischen 3-4 ml des erhaltenen zellfreien, klaren Lysates wurden mit 1 ml Ni-NTA-Suspension (50% [w/v] Ni-NTA-Agarose in 30 % [v/v] Ethanol) 60 min bei 4°C unter leichtem Rühren inkubiert. Das Gemisch wurde in eine leere Säule überführt, die Säule zwei mal mit 4 ml Waschpuffer (s. 1.6.1) gewaschen und das Fusionsprotein anschließend mit 2 ml Elutionspuffer (s. 1.6.1) eluiert. Das Eluat wurde auf eine HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule aufgetragen.

5.4.3.2 Gelfiltrations-Chromatographie über Superdex 200

Das Eluat der Nickel-Affinitätschromatographie-Säule wurde auf eine mit Puffer D (s. 1.6.1) equilibrierte HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Hilfe der FPLC-Anlage im selben Puffer mit einer Flußrate von 1,5 ml/min und bei einer Fraktionsgröße von 6 ml.

5.4.4 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Das native Molekulargewicht der als 6xHis-Fusionprotein gereinigten Novobiocinsäure-Synthetase wurde durch eine HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule (Länge: 60 cm, Innendurchmesser: 26 mm) bei einer Flußrate von 1,5 ml/min bestimmt, deren Trennbereich zwischen 10 und 600 kDa lag. Zur Eichung wurde eine Trennung mit den in Tab. 21 aufgeführten Eichproteinen aus den Pharmacia Gel Filtration Calibration Kits HMW und LMW in 1 ml Puffer C durchgeführt. Das Ausschlußvolumen der Säule wurde mit Dextran Blau 2000 (M_r 2.000 kDa) bestimmt. Der K_{av} -Koeffizient berechnet sich folgendermaßen: $K_{av} = V_e - V_0 / V_t - V_0$ mit V_e = Elutionsvolumen des Eichproteins, V_0 = Ausschlußvolumen = Elutionsvolumen von Dextran Blau 2000 (111 ml), V_t = Bettvolumen der Säule = Elutionsvolumen von Aceton (291 ml).

Tab. 21: Eichung der Superdex 200-Gelfiltrationsäule. M_r = Molekulargewicht, V_e =Elutionsvolumen der Eichsubstanz, K_{av} =Koeffizient zur Erstellung einer Kalibrierungskurve (Berechnung s. oben).

Eichsubstanz	M_r [kDa]	Konzentration [mg/ml]	V_e	K_{av}
Dextran Blau 2000	2000	2,0	111	
Aldolase	158	2,0	166,5	0,308
Albumin	67	7,0	190,5	0,442
Ovalbumin	43	6,3	207	0,533
Ribonuclease A	13,7	8,0	247,5	0,758

Durch Auftragung des K_{av} -Quotienten des jeweiligen Eichproteins gegen den Logarithmus des dazugehörigen Molekulargewichtes kann eine Kalibrierungskurve zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Novobiocinsäure-Synthetase erstellt werden (s. Abb. 3).

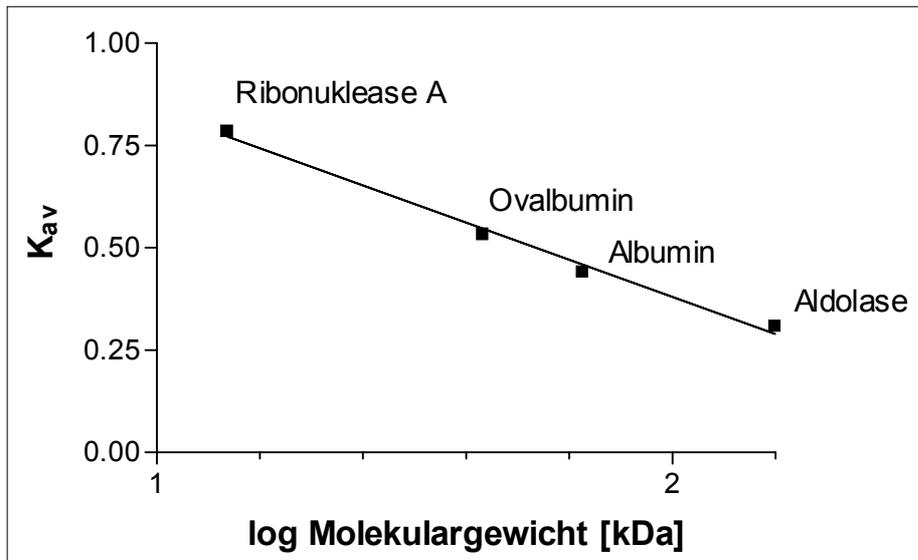


Abb. 3: Kalibrierungskurve für die Superdex 200-Gelfiltrationssäule.

5.4.5 Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation diente zur Separation von Membranfraktionen und löslichen Proteinen, wodurch eine Lokalisierung der 4HPP Dimethylallyltransferase ermöglicht wurde. Dazu wurde zellfreier Rohextrakt aus *S. spheroides* (s. 5.1.3) 60 min bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge L5-75, Beckman Instruments, Dreieich). Nachdem die Membranfraktion mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 gewaschen und anschließend im ursprünglichen Volumen resuspendiert wurde, erfolgte die Prenyltransferase-Aktivitäts-Bestimmung (s. 5.3.2) sowohl in der Membranfraktion als auch Überstand.

5.4.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proteinauftrennung erfolgte in 12%-igen Polyacrylamidgelen (Gelgröße 70 x 80 x 0,5 mm) mit Hilfe einer Mini-PROTEAN II Elektrophorese-Zelle der Firma BIO-RAD (Cell) über 45 min bei 200 V. Die Herstellung und Zusammensetzung der dazu verwendeten Lösungen richtete sich nach den Angaben des Herstellerhandbuches und ist in 1.6.2 beschrieben. Die Proteinproben wurden vor Auftragen 1:4 mit (1x)-Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard dienten 13 µg Low Molecular Weight-Standard (Amersham Pharmacia Biotech) mit Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α-Lactalbumin (14,4 kDa).

Die Gele wurden anschließend nach 10-minütiger Fixierung in Fixierlösung (s. 1.6.2) 5-10 min mit Coomassie Brilliant Blau G-250 (s. 1.6.2) gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurden die Gele maximal 90 min in Entfärberlösung und dann gut mit H₂O_{bidest} gespült.

5.4.7 Bestimmung der Löslichkeit des überexprimierten Novobiocinsäure-Synthetase-Histidin-Fusionsproteins

Eine Abschätzung des löslichen Anteils des heterolog überexprimierten Novobiocinsäure-Synthetase-Histidin-Fusionsproteins im Vergleich zum Gesamtprotein (löslicher und unlöslicher Anteil) erfolgte über SDS-PAGE. Zur Detektion von sowohl löslich als auch unlöslich exprimiertem Protein wurden die nach IPTG-Induktion geernteten Zellen (s. 5.1.1) mit 10 µl (1x)-Probenpuffer (s. 1.6.2) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und die Proteine mittels SDS-PAGE (s. 5.4.6) aufgetrennt. Durch Auftragen des nach Zellaufschluß zentrifugierten zellfreien Rohextraktes wird eine Detektion des löslichen Proteinanteils ermöglicht.

5.4.8 Resolubilisierung von Inclusion Bodies

Oftmals kommt es bei Überexpressionsexperimenten zur Bildung sogenannter unlöslicher Inklusionskörperchen („Inclusion Bodies“). Dies wird auf eine intermolekulare Assoziation hydrophober Domänen während des Faltungsprozesses zurückgeführt. Bei Cystein-haltigen Proteinen kann es auch zur Bildung von Disulfidbindungen kommen, welche ebenfalls zur unkorrekten Faltung beitragen können. Eine Resolubilisierung und Wiederauffaltung des Histidin-Fusionsproteins kann man durch Behandlung der Inclusion Bodies mit Denaturantien wie Guanidin-HCl, SDS, Harnstoff oder Detergenzien erzielen.

5.4.8.1 Waschen von Inclusion Bodies

Unter Umständen ist das Zielprotein nicht wirklich unlöslich, sondern lediglich an Membranfragmente im Zellpellet assoziiert und kann durch Waschen mit Detergenzien fraktioniert werden. In dieser Arbeit wurde die Fraktionierung in Anlehnung an eine von Sambrook et al. (1989) beschriebene Methode durch Waschen mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 getestet. Zellen, die mit 1 mM IPTG induziert worden waren, wurden 4 h nach Induktion wie unter 5.1.1 beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (17.500 x g, 30 min, 4°C) wurde das Pellet in 9 Volumina 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 % (v/v) TritonX-100 resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert und Überstand und lösliches Pellet durch SDS-PAGE (s. 5.4.6) analysiert.

5.4.8.2 Resolubilisierung von Inclusion Bodies

Zur Resolubilisierung wurden die Inclusion Bodies wie folgt nach Sambrook et al. (1989) behandelt:

Ca. 0,1 – 0,2 g Inclusion Bodies wurden in 100 µl Resolubilisierungspuffer (50 mM KP_i (pH 8,0), 50 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 0,1 mM PMSF) resuspendiert und 1 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 9 Volumina KP_i (pH 10,7) wurde der Ansatz weitere 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde eine Aufrechterhaltung des pH-Wertes durch Zugabe von 1 M KOH erzielt. Nach Erniedrigung des pH-Wertes auf pH 8,0 durch Zugabe von 1 M HCl und weiterer 30-minütiger Inkubation wurde der Ansatz 15 min bei RT und 12.000 x g zentrifugiert und das resolubilisierte Protein im Überstand und den übrigen Fraktionen durch SDS-PAGE analysiert. Der Resolubilisierungsüberstand wurde vor und nach Umpufferung über Sephadex-G25-NAP-5-Säulen auf Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität (s. 5.3.3) hin untersucht.

6 Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen

6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

6.1.1 Geräte, Säulen und Fließmittel

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer, nichtradioaktiver und radioaktiver Substanzen wurden in dieser Arbeit zwei HPLC-Anlagen der Firma Waters (Eschborn) verwendet, deren Detektion durch den Anschluß eines UV-Durchflußdetektors (Waters, Eschborn) oder eines Radioaktivitäts-Durchflußdetektors (Berthold GmbH & Co., Wildbad) ermöglicht wurde. Sowohl die Steuerung der HPLC-Systeme als auch die Auswertung erfolgte über die Millennium-Software. Die einzelnen Komponenten beider HPLC-Anlagen sind in Tab. 22 aufgeführt.

Tab. 22 : Komponenten der HPLC-Anlagen

Komponente	Anlage 1	Anlage 2 (Radioaktivanlage)
Pumpen	Waters 510	Waters 501
Autosampler	Waters 717 Plus	Waters 717
UV-Detektor	Waters 486 Absorbance Detector	Waters 486 Absorbance Detector
Radioaktivitäts-Durchflußdetektor	-	LB 507 A
Software	Millenium V2.15.01	Millenium V2.00

Die Trennung erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/min über eine Multospher RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (CS-Chromatographie, Langerwehe), der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 µm) (CS-Chromatographie, Langerwehe) vorgeschaltet war.

Als Fließmittelkomponenten wurden Methanol (Lichrosolv, Merck), Ameisensäure (p.a.) und H₂O_{bidest.} verwendet. Die Fließmittel wurden vor Gebrauch durch Filtration über einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) von Partikeln befreit und unter Vakuum entgast.

Fließmittel A: H₂O_{bidest.} : Ameisensäure (99:1)
 Fließmittel B: Methanol : Ameisensäure (99:1)

6.1.2 Analytik von 3DMA-4HPP und anderen prenylierten Aromaten

Die Qualifizierung und Quantifizierung von 3DMA-4HPP und anderen prenylierten Aromaten erfolgte durch Elution mit einem linearen Gradienten über 35 min unter folgenden Bedingungen (Tab. 23):

Tab. 23: Gradient zur Analytik von 3DMA-4HPP

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	65	35
5,0	65	35
15,0	0	100
17,0	0	100
17,1	65	35
25,0	65	35

Zur präparativen Isolierung von 3DMA-4HPP wurde folgender lineare Gradient verwendet:

Tab. 24: Gradient zur Reinigung des präparativ isolierten 3DMA-4HPP

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	65	35
5,0	65	35
25,0	0	100
27,0	0	100
27,1	65	35
35,0	65	35

Die Detektion erfolgte über Radioaktivitätsmessung und über die Absorption bei 270 nm. Eine Quantifizierung erfolgte über die gemessene Radioaktivität, die aus dem eingesetzten Substrat [1-¹⁴C]DMAPP stammt und basiert auf der Voraussetzung, daß dieses die gleiche spezifische Radioaktivität wie die daraus enzymatisch entstandenen prenylierten Aromaten aufweist. Es wurde eine Eichkurve aus steigenden [1-¹⁴C]DMAPP-Mengen und den entsprechenden, durch den Radiodurchflußdetektor erhaltenen Peakflächen erstellt, die zur Berechnung der gebildeten Produktmengen diente. Dabei wurde ein Korrekturfaktor mit einbezogen, der das Verhältnis von eingesetztem radioaktivem zu nichtradioaktivem Substrat und das Injektionsvolumen mit berücksichtigte.

6.1.3 Analytik von Novobiocin und Novobiocinsäure

Zur Überprüfung der Novobiocin-Produktion wurde *S. spheroides* in CDM-Flüssig-Medium (s. 1.4.2) 5-8 Tage bei 28°C unter Schütteln mit 170 rpm kultiviert. Nach Abzentrifugieren der Kultur (17.500 x g, 30 min, 4°C) wurde ein Aliquot des Medienüberstandes (85 µl) direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Die Detektion der im Novobiocinsäure-Synthetase-Assay gebildeten Novobiocinsäure bzw. Novobiocinsäure-Derivate erfolgte ebenso wie die des Novobiocins durch Gradienten-Elution über einen Zeitraum von 25 min bei einer Detektionswellenlänge von 305 nm unter folgenden Bedingungen:

Tab. 25: Gradient zur Analytik von Novobiocin und Novobiocinsäure

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	40	60
2,0	40	60
13,0	0	100
19,0	0	100
19,1	40	60
25,0	40	60

Eine Quantifizierung wurde über Eichgeraden mit Novobiocin (Fluka, Buchs) und Novobiocinsäure (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA) durchgeführt. Die Standardsubstanzen wurden zu diesem Zweck in Methanol gelöst.

6.2 Präparative Isolierung von 3DMA-4HPP

Zur Identifizierung der durch die 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktion in *S. spheroides* enzymatisch gebildeten Reaktionsprodukte durch ¹H-NMR- und Massen-Spektroskopie waren größere Substanzmengen erforderlich. Zu diesem Zweck wurden 141 mg partiell gereinigte 4HPP Dimethylallyltransferase aus insgesamt 5 Reinigungsprozeduren in mehreren größeren Inkubationsansätzen zur enzymatischen Synthese von 3DMA-4HPP unter den in Tab. 26 aufgelisteten Bedingungen eingesetzt:

Tab. 26: Bedingungen zur enzymatischen 3DMA-4HPP-Synthese

Bestandteil	Endkonzentration
DMAPP	400 µM
4HPP	2,5 mM
MgCl ₂	0,5 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
partiell gereinigte 4HPP	0,7 mg/ml
Dimethylallyltransferase	

Die Inkubationen wurden jeweils unmittelbar nach Enzymreinigung 90 min bei 37°C durchgeführt und durch Einfrieren bei -70°C gestoppt. Die Reaktionsansätze wurden bei -70°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Zur Isolierung der Reaktionsprodukte wurden alle Reaktionsansätze vereinigt (156 ml) und nach Ansäuerung mit 8,0 ml gesättigter Citronensäure auf pH 2,0 dreimal mit 170 ml Ethylacetat (p.a.) ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wurde dreimal mit 85 ml H₂O_{bidest} gewaschen und durch Zugabe von 50 g Na₂SO₄ (Suprapur, Merck) getrocknet. Nach Filtration über Quarzwolle wurde das Filtrat im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Rückstände wurden in Methanol aufgenommen und die Reaktionsprodukte durch präparative HPLC-Trennung unter Verwendung des in Tab. 24 aufgeführten linearen Gradienten weiter aufgereinigt.

Im Prenyltransferase-Assay mit radioaktiv markiertem Substrat [1-¹⁴C]DMAPP konnten zwei enzymatisch gebildete Reaktionsprodukte detektiert werden. Um sicherzustellen, daß es sich bei den aus den Inkubationsansätzen zu isolierenden Substanzen um die prenylierten Reaktionsprodukte handelte, wurde ein Gemisch aus einem geringen Anteil der präparativ isolierten Reaktionsprodukte und radioaktiv markierten Reaktionsprodukten mittels HPLC getrennt, die durch UV-Absorption bei 270 nm detektierten Substanzpeaks aufgefangen, und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen (s. 7.2).

Die aufgefangenen Fraktionen der somit identifizierten beiden separierten Reaktionsprodukte wurden jeweils vereinigt, das Fließmittel abrotiert, die Proben im Exsikkator unter Vakuum getrocknet und einer ¹H-NMR- und MS-Analyse unterzogen.

6.3 Präparative Isolierung von Novobiocinsäure

Nach heterologer Expression von *novL* in *S. lividans* TK24 mit Hilfe des Expressionskonstruktes pMS77 konnte bei Durchführung des Novobiocinsäure-Synthetase-Assays mit zellfreiem Rohextrakt ein enzymatisches Reaktionsprodukt detektiert werden, dessen Identifizierung als Novobiocinsäure nach präparativer Isolation durch Massenspektroskopie erfolgen sollte. Größere Mengen des Reaktionsproduktes wurden aus einem Inkubationsansatz mit den für den Novobiocinsäure-Synthetase-Assay (s. 5.3.3) beschriebenen Bedingungen erhalten. Die Inkubation wurde in einem Gesamtvolumen von 15 ml mit insgesamt 22,5 mg Protein (2,8 ml eines über Sephadex G-25 entsalzten Rohextraktes aus *S. lividans* TK24:pMS77) über einen Zeitraum von 60 min bei 30°C durchgeführt. Durch Zugabe von 750 µl 1,5 M Trichloressigsäure wurde die Reaktion

gestoppt und der Reaktionsansatz 3 mal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden abrotiert und der Rückstand in 1 ml Methanol:H₂O_{bidest} (1:1) resuspendiert. Das Reaktionsprodukt wurde durch präparative HPLC-Trennung mit dem in Tab. 25 aufgeführten linearen Gradienten aufgereinigt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden vereinigt, das Fließmittel abrotiert und der Rückstand im Exsikkator getrocknet. Eine EI-MS-Analyse der Probe wurde an einem TSQ70 Spektrometer (Finnigan, Bremen) unter Verwendung von Dichlormethan als Lösungsmittel durchgeführt.

6.4 Enzymatische Synthese und präparative Isolierung von GBA

GBA wurde enzymatisch aus 4HB und GPP durch die 4HB-Polyprenyltransferase aus *E. coli* AN385:pALMU3 gebildet (Melzer und Heide, 1994). Der Inkubationsansatz (3 ml) wurde 60 min bei 37°C inkubiert und enthielt folgende Bestandteile:

Tab. 27: Inkubationsansatz zur enzymatischen Synthese von GBA

Bestandteil	Endkonzentration
4HB	0,4 mM
GPP	2 mM
MgCl ₂	50 mM
KF	1 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
Membranfraktion aus <i>E. coli</i> AN385:pALMU3	0,2 mg/ml

Durch Zugabe von 90 µl konzentrierter HCOOH wurde die Reaktion gestoppt und die entstandene GBA mit 3 mal 10 ml n-Hexan extrahiert. Die n-Hexan-Phase wurde abrotiert und der Rückstand in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst und bei -24°C gelagert.

6.5 Präparative Isolierung von GBA-Ring B (Dimethylallyl-Novobiocinsäure)

Zur Bestätigung der Identität des durch die Novobiocinsäure-Synthetase aus dem Ring A-Analogon GBA und Ring B enzymatisch gebildeten Reaktionsproduktes, wurden 50 µg gereinigte Novobiocinsäure-Synthetase, 0,5 mM GBA, 1 mM Ring B, 5 mM ATP, 5 mM MnCl₂ und 50 mM Tris-CHL (pH 8,0) in einem Gesamtvolumen von 1 ml 20 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1,5 M Trichloressigsäure gestoppt und das Reaktionsprodukt 3 mal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Abrotieren der vereinigten Ethylacetatphase wurde der Rückstand in Methanol:H₂O_{bidest} (1:1) gelöst und das Reaktionsprodukt durch präparative HPLC-Trennung mit dem in Tab. 25 aufgeführten linearen Gradienten aufgereinigt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden vereinigt, das Fließmittel abrotiert und der Rückstand im Exsikkator getrocknet. Eine EI-MS-Analyse der Probe wurde an einem TSQ70 Spektrometer (Finnigan, Bremen) unter Verwendung von Methanol als Lösungsmittel durchgeführt.

7 Radioaktivitätsmessungen im Szintillationszähler

7.1 Quantifizierung von Isopentenol und Dimethylallylalkohol

Die Quantifizierung des im Phosphatase-Assay gebildeten Isopentenols und des im DMAPP-IPP-Isomerase-Assay gebildeten Dimethylallyl-Alkohols erfolgte durch Radioaktivitätsmessung. Nach Zugabe von 9 ml Szintillationscocktail (Rotiszint[®] Eco Plus, Roth) zu 500 µl

Probe wurde die Messung in einem Tri-Carb 2100TR Szintillationszähler (Conberra-Packard, Dreieich) über einen Zeitraum von 3 min durchgeführt (siehe 5.3.1). Hintergrundaktivitäten durch chemische Zersetzung wurden in einem Kontrollassay mit hitzeinaktiviertem Protein bestimmt und entsprechend subtrahiert. Die Berechnung der gebildeten Produktmenge erfolgte über die spezifische Radioaktivität des Substrates [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IPP und unter Einbeziehung eines Korrekturfaktors, der das Verhältnis von eingesetztem radioaktivem zu nichtradioaktivem Substrat und das eingesetzte Probevolumen mit berücksichtigte.

7.2 Quantifizierung des im 4HPP Dimethylallyltransferase-Assay gebildeten 3DMA-4HPP

Zur Quantifizierung des im Prenyltransferase-Assay gebildeten 3DMA-4HPP wurde neben der HPLC-Analytik auch die Radioaktivitätsmessung angewandt, da diese vor allem bei der Enzymreinigung eine verkürzte Meßzeit im Vergleich zur HPLC-Analyse aufwies und aufgrund der niedrigeren Nachweisgrenze eine Reduzierung der [$1\text{-}^{14}\text{C}$]DMAPP-Endkonzentration im Assay auf $1,5\ \mu\text{M}$ [305 Bq] erlaubte. Dazu wurden $50\ \mu\text{l}$ von insgesamt $500\ \mu\text{l}$ des Ethylacetat-Extraktes mit $3\ \text{ml}$ Szintillationscocktail (Rotiszint[®] Eco Plus, Roth) versetzt und die Messung über 3 min in einem Tri-Carb 2100TR Szintillationszähler (Conberra-Packard, Dreieich) durchgeführt. Hintergrundaktivitäten durch chemische Zersetzung oder andere enzymatische Umsetzungen wurden durch Kontrollassays mit einerseits denaturiertem Protein und andererseits nativem Protein in Abwesenheit des aromatischen Substrates 4HPP bestimmt und entsprechend subtrahiert. Die Berechnung der gebildeten 3DMA-4HPP-Menge erfolgte über die spezifische Radioaktivität des Substrates [$1\text{-}^{14}\text{C}$]DMAPP und unter Einbeziehung eines Korrekturfaktors, der das Verhältnis von eingesetztem radioaktivem zu nichtradioaktivem Substrat und das eingesetzte Probevolumen mit berücksichtigte.

7.3 Quantifizierung von [$^{32}\text{-P}$]ATP

Die Radioaktivität des an Aktivkohle gebundenen [$^{32}\text{-P}$]ATP wurde 5 Stunden nach Zugabe von $9\ \text{ml}$ Szintillationscocktail (Rotiszint[®] Eco Plus, Roth) in einem Tri-Carb 2100TR Szintillationszähler (Conberra-Packard, Dreieich) gemessen, nachdem sich die Aktivkohle in den Proben abgesetzt hatte. Die Meßzeit betrug 30 min. Die Berechnung der gebildeten ATP-Menge erfolgte unter Verwendung der im störungsunanfälligeren Kanal B ($50\text{-}1700\ \text{keV}$) gemessenen cpm und einer Zählerausbeute von 98%.

8 Synthese von Drupanin

Das Ring A-Analogon Drupanin (3-Dimethylallyl-4-hydroxymethylsäure) wurde aus Plicatin B, welches von R. Bates (Bangkok, Thailand) zur Verfügung gestellt wurde, durch methanolische Verseifung nach Bates et al. 1995 synthetisiert. $10\ \text{mg}$ Plicatin B wurden in $170\ \mu\text{l}$ Methanol (Lichrosolv) gelöst und nach Zugabe von $114\ \mu\text{l}$ 5%iger (w/v) NaOH 1 h bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurde der Ansatz durch Zugabe von $25\ \mu\text{l}$ konzentrierter HCOOH auf einen pH-Wert von 2-3 gebracht. Die Methanolphase wurde in der Vakuumzentrifuge abgedampft und das entstandene Drupanin 2 mal mit je $1\ \text{ml}$ Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte Ethylacetatphase wurde mit $2,7\ \text{ml}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen bis der pH-Wert bei etwa 6 lag. Nachdem die Ethylacetat-Phase bis zur Trockne eingeeengt worden war, wurde der Rückstand im Exsikkator getrocknet und bei -24°C gelagert. Die Ausbeute der Verseifung wurde durch HPLC-Analyse (s. 6.1.3) untersucht und betrug $> 96\ \%$.

IV Ergebnisse

1 Identifizierung der 4-Hydroxyphenylpyruvat Dimethylallyltransferase aus *Streptomyces spheroides*

1.1 Einleitung

Die ersten biochemischen Untersuchungen zur Novobiocin-Biosynthese in der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich auf die innerhalb der Biosynthese von Ring A auftretende Prenylierungsreaktion.

Die zu der Zeit verfügbaren Daten zur Biosynthese dieser prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit des Aminocumarin-Antibiotikums beschränkten sich auf Arbeiten der 60er und 70er Jahre an *Streptomyces niveus* und basierten vorwiegend auf Fütterungsexperimenten mit möglichen Biosynthese-Vorstufen. Demnach erfolgt die Biosynthese von Ring A ausgehend von Tyrosin (Bunton et al. 1963; Kominek und Sebek, 1974), wobei in einer bis dahin nicht geklärten Reaktionsfolge eine Verkürzung der C₃-Seitenkette und Prenylierung des aromatischen Rings erfolgt.

Unter der Annahme, daß die Tyrosin-Seitenkettenverkürzung über 4-Hydroxyphenylpyruvat (4HPP) und 4-Hydroxymzimtsäure und im Anschluß daran über einen β -Oxidationsmechanismus in Analogie zum Fettsäure-Abbau stattfinden könnte (Calvert et al. 1972), sollte die Prenyltransferase-Reaktion mit den in Frage kommenden aromatischen Substraten *in vitro* nachgewiesen werden. Als isoprenoides Substrat wurde dabei zunächst das kostengünstigere [1-¹⁴C]Isopentenylidiphosphat (IPP) eingesetzt, welches durch die ubiquitär vorkommende DMAPP-IPP-Isomerase in das eigentliche Substrat Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) umgewandelt wird. In Vorversuchen konnte die DMAPP-IPP-Isomerase-Aktivität in *S. spheroides* bestätigt werden. Nach Etablierung des Prenyltransferase-Assays in *S. spheroides* wurden die späteren Messungen mit [¹⁴C]DMAPP durchgeführt.

1.2 Detektion von 4-Hydroxyphenylpyruvat Prenyltransferase-Aktivität in Rohextrakten von *Streptomyces spheroides* DSM 40292

Mit einem radioaktiven Prenyltransferase-Assay konnten im zellfreien Rohextrakt aus *Streptomyces spheroides* DSM 40292 mit HPLC-Analytik zwei aus den Substraten 4HPP und DMAPP gebildete Reaktionsprodukte detektiert werden (siehe 1.5, Abb. 5). Ihre Bildung war sowohl substrat- als auch enzymabhängig (Tab. 28).

Tab. 28: Substrat- und Enzymabhängigkeit der 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktion. Die Reaktion wurde jeweils mit 100 µg zellfreiem Rohextrakt aus *S. spheroides* DMS 40292 unter den in Kapitel III 5.3.2 angegebenen Bedingungen mit jeweils 8,1 µM [1-¹⁴C]DMAPP und 2,5 mM des zu testenden aromatischen Substrates durchgeführt.

Assay-Komponenten	Spez. Aktivität ¹ [pkat/mg Protein]	Relative Aktivität [%]
4HPP	0,737	100
- 4HPP	< 0,1	< 13,6
4HPP, hitzedenaturierter Rohextrakt	< 0,1	< 13,6
4-Hydroxyphenyllactat (4HPL)	< 0,1	< 13,6
4-Hydroxymzimtsäure	< 0,1	< 13,6
4-Hydroxybenzoesäure (4HB)	< 0,1	< 13,6

¹Die spezifische Aktivität wurde aus der Radioaktivitätsmenge des Produktes berechnet, wobei vom Einbau von 1 mol [¹⁴C]DMAPP in 1 mol Produkt ausgegangen wurde.

Mit dem isoprenoiden Substrat IPP konnte ebenfalls eine Produktbildung beobachtet werden, die substrat- und enzymabhängig war. IPP wird durch die DMAPP-IPP-Isomerase, welche im Rohextrakt von *S. spheroides* mit einer Aktivität von 1,26 pkat/mg Protein nachgewiesen werden konnte, in DMAPP umgewandelt.

1.3 Lokalisation der 4HPP Dimethylallyltransferase

Für eine weitere Charakterisierung der 4HPP Dimethylallyltransferase war der Nachweis der Lokalisation des Enzyms wichtig. Nach Abtrennung der löslichen Proteine von der Membranfraktion durch Ultrazentrifugation (s. III 5.4.5) konnte die enzymatische Gesamtaktivität vollständig im Überstand wiedergefunden werden, wohingegen die Membranfraktion keinerlei Aktivität aufwies (Tab. 29).

Tab. 29: Bestimmung der 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität nach Ultrazentrifugation. Die Aktivität wurde vergleichend im Rohextrakt und nach Ultrazentrifugation in löslicher Fraktion und Membranfraktion bestimmt.

Fraktion	Gesamtprotein pro Fraktion [mg]	Gesamtaktivität		Spezifische Aktivität	
		[pkat]	[%]	[pkat/mg Protein]	[%]
Rohextrakt	12,6	12,2	100	0,97	100
lösliche Fraktion	9,5	14,6	119,7	1,54	159
Membranfraktion	3,6	< 0,01	< 0,08	< 0,1	< 10,3

1.4 Partielle Reinigung der 4HPP Dimethylallyltransferase

Zur Identifizierung der beiden in der Prenyltransferase-Reaktion aus 4HPP und DMAPP auftretenden Reaktionsprodukte durch $^1\text{H-NMR}$ - und Massen-Spektroskopie war die Herstellung größerer Substanzmengen notwendig. Zuvor sollte für das Enzym ein Reinigungsverfahren entwickelt werden, das die Bereitstellung ausreichender Enzym- und somit Reaktionsproduktmengen gewährleistet.

Die partielle Reinigung der löslichen 4HPP-Dimethylallyltransferase aus *S. spheroides* DSM 40292 umfaßte einen säulenchromatographischen Schritt mit einer DEAE-Sephacel-Anionenaustauschersäule und eine daran anschließende Enzym-Aufkonzentrierung durch Ammoniumsulfat-Fällung. Genaue Angaben zur Durchführung der Reinigungsprozedur und zu den gewählten Bedingungen sind dem Abschnitt III 5.4.2 zu entnehmen. Die im folgenden beschriebene Reinigungsstrategie wurde insgesamt 5 mal durchgeführt, und die Ergebnisse eines repräsentativen Verlaufes sind in Tab. 30 dargestellt.

DEAE-Sephacel-Anionenaustausch-Chromatographie:

Zellfreier Rohextrakt aus *S. spheroides*-Zellsuspensionen (s. III 5.1.3) mit einer Novobiocin-Mindestproduktion von 25 $\mu\text{g/ml}$ wurde direkt auf eine DEAE-Sephacel-Säule (Säulenvolumen: 170 ml) aufgetragen und die gebundenen Proteine mit einem nicht-linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M NaCl eluiert (s. Abb. 4).

Die 4HPP Dimethylallyltransferase eluierte zwischen 150 und 230 mM NaCl. Die hohe Wiederfindungsrate von 341 % deutet auf eine Abtrennung im Rohextrakt vorhandener inhibierender Substanzen oder auf um die Substrate 4HPP und DMAPP konkurrierende Enzyme hin. Bei einem Reinigungsfaktor von 39,6 konnten mehr als 90 % der Fremdproteine abgetrennt werden.

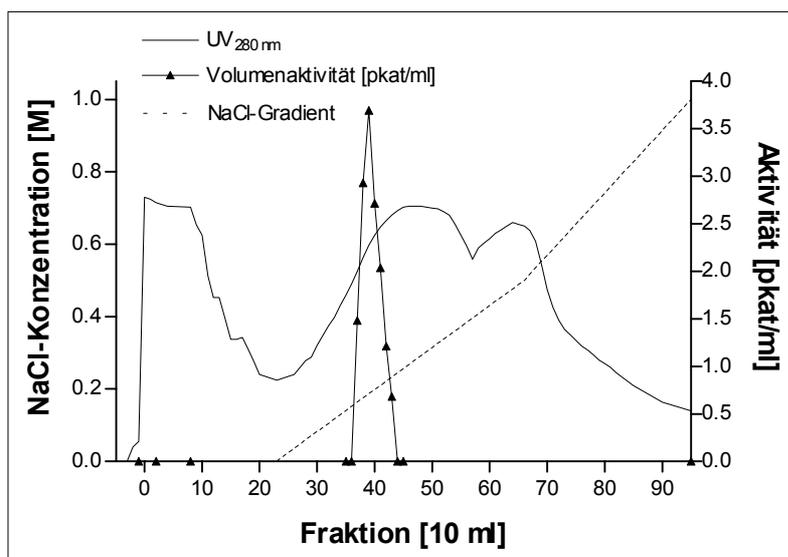


Abb. 4: Elutionsprofil der Reinigung der 4HPP Dimethylallyltransferase durch DEAE-Sephacel-Anionenaustausch-Chromatographie.

Ammoniumsulfat-Fällung:

Alle aktiven DEAE-Sephacel-Fractionen wurden durch Ammoniumsulfatfällung (0-70 % Sättigung) aufkonzentriert. Nach Resuspendieren des Pellets und anschließender Entsalzung über Sephadex-G25-Säulenmaterial konnten nahezu 95 % der aufgetragenen Enzymaktivität wiedergefunden und nochmals knapp 25 % der Fremdproteine abgetrennt werden.

Letztendlich konnte die 4HPP Dimethylallyltransferase nach einer Abtrennung von mehr als 93 % der Fremdproteine mit einem Reinigungsfaktor von 49,1 (s. Tab. 30) partiell gereinigt werden.

Die Verarbeitung von insgesamt 774 g Zellen aus 13,8 l Zellkultur in 5 Reinigungsprozeduren lieferte 141 mg aufkonzentriertes, partiell gereinigtes Enzym, durch welches in einem Inkubationsgroßansatz genügend große Reaktionsproduktmengen enzymatisch hergestellt werden konnten.

Tab. 30: Partielle Reinigung der 4HPP Dimethylallyltransferase aus *S. spheroides* DSM 40292.

Fraktion	Gesamtprotein	Gesamtaktivität		Spezifische Aktivität [pkat/mg]	Reinigungsfaktor [-fach]
	[mg]	[pkat]	[%]		
Rohextrakt	492,0	105,3	100,0	0,2	1
DEAE-Sephacel	43,2	359,1	341,0	8,3	39,6
Ammoniumsulfat-fällung (0-70 %)	33,0	340,4	323,3	10,3	49,1

1.5 Identifizierung der Reaktionsprodukte der 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktion

Wie auch schon im Rohextrakt konnte mit partiell gereinigter 4HPP Dimethylallyltransferase die Bildung von zwei aus 4HPP und DMAPP gebildeten Reaktionsprodukten detektiert werden (Abb. 5). Zur Strukturaufklärung wurde das aus 5 Reinigungsprozeduren erhaltene aufkonzentrierte Enzym (141 mg) in Inkubationsansätzen größeren Maßstabs unter den ermittelten optimalen Prenyltransferase-Reaktionsbedingungen (s. 1.6) eingesetzt, und die beiden Reaktionsprodukte wie unter III 6.2. beschrieben präparativ isoliert und über HPLC gereinigt. Es konnten zwischen 0,5 und 1 mg des jeweiligen Reaktionsproduktes isoliert werden.

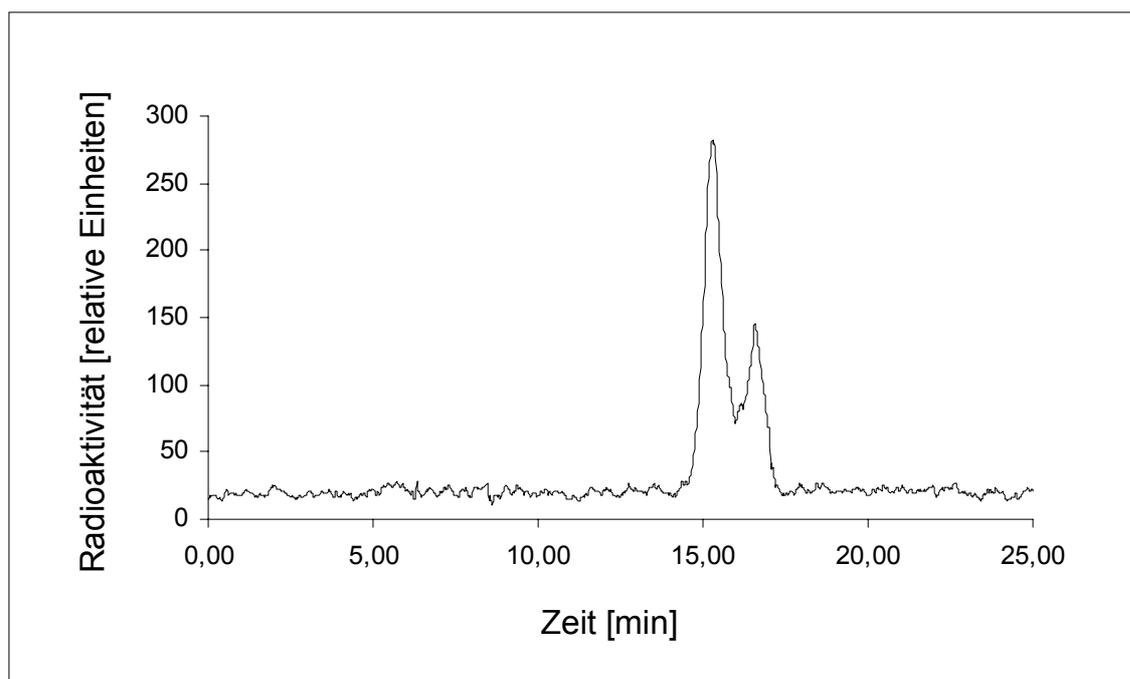


Abb. 5: HPLC-Chromatogramm der in der 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktion nach Inkubation von 4HPP und DMAPP gebildeten Reaktionsprodukte. Der Nachweis der Produktbildung erfolgte im radioaktiven 4HPP Dimethylallyltransferase-Assay mit partiell gereinigtem Enzym.

1.5.1 $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Die Strukturaufklärung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. B. Vogler, Institut für Chemie, Universität Hohenheim, Stuttgart.

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der beiden isolierten Substanzen wurden in d_6 -Aceton bei 500 MHz und $24,5^\circ\text{C}$ aufgenommen und zeigten in beiden Fällen Signale für 3-(3'-Dimethylallyl-4'-hydroxyphenyl)-2-hydroxypropensäure (3DMA-4HPP): $\delta_{\text{ppm}} = 7,62$ (dd, $J = 2,3$ Hz, 8,8 Hz, H-6'), 7,48 (d, 2,3 Hz, H-2'), 6,75 (d, 8,8 Hz, H-5'), 6,05 (s, H-3), 5,33 (br t, 7,4 Hz, H-2''), 3,31 (d, 7,4 Hz, H-1''), 1,71 (br s, CH_3 -5''), trans), 1,68 (br s, CH_3 -4'', cis). Das entsprechende $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist für eines der Reaktionsprodukte in Abb. 6, A dargestellt.

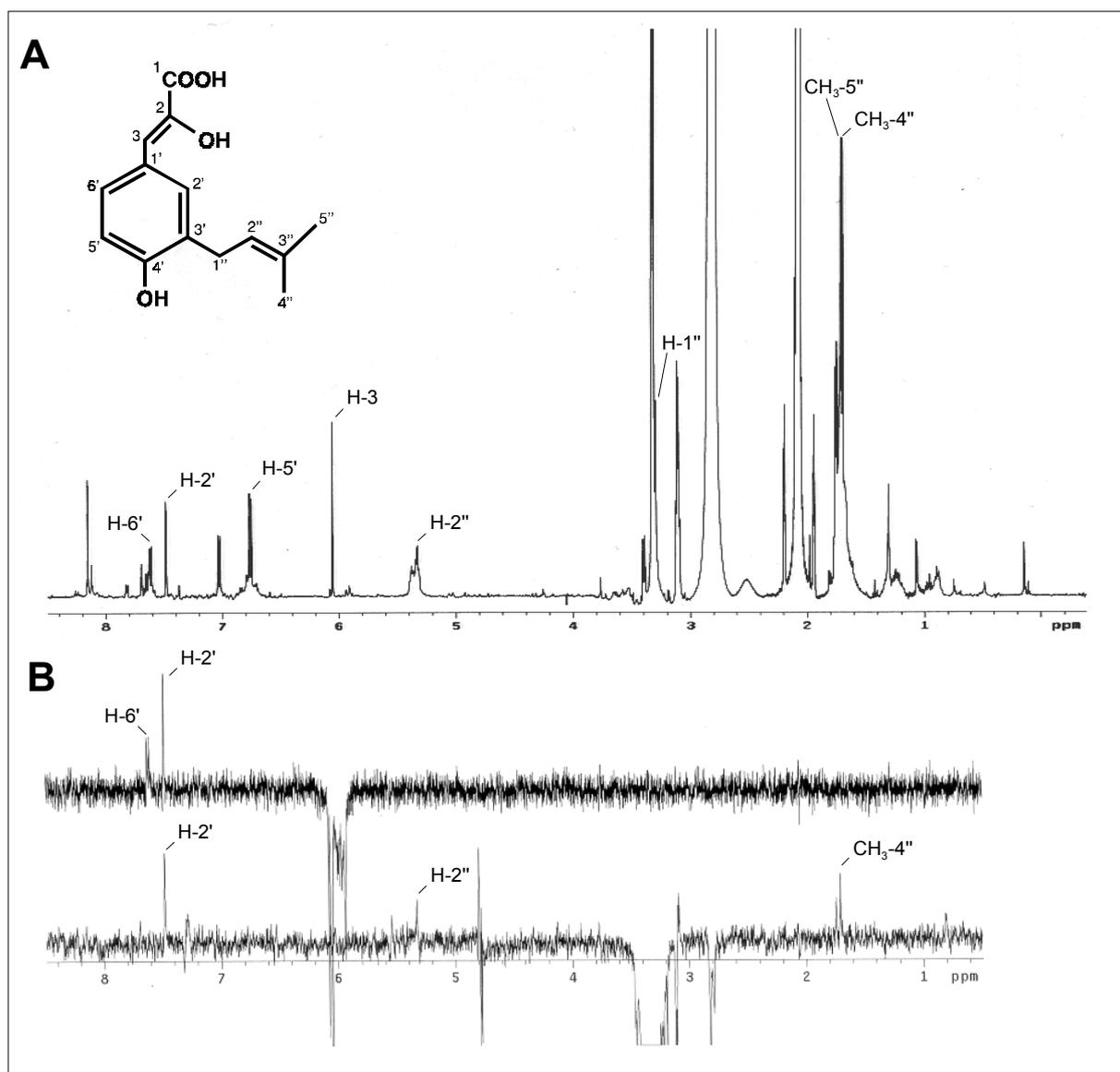


Abb. 6: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der als 3DMA-4HPP identifizierte Reaktionsprodukte (A) und DPGF-NOE-Spektrum (B).

Diese Ergebnisse wurden weiterhin durch DPGF-NOE-Experimente (double pulsed-field-gradient nuclear Overhauser effect) (Stott et al. 1997) bestätigt. Dabei zeigte H-3 positive NOE-Verstärkungssignale zu H-2' und H-6' (Abb. 6, B). Ein weiteres DPGF-NOE-Experiment lieferte den Nachweis der Prenylierung des aromatischen Ringsystems an C-3'. Nach Anregung von H-1'' wurden positive Signalverstärkungen an H-2'', CH₃-4'' und H-2' beobachtet.

1.5.2 Massenspektroskopie

Von beiden Reaktionsprodukten wurden ESI-MS-Spektren an einem TSQ 700 Massenspektrometer (Finnigan) in Methanol aufgenommen. Auch hier zeigten die Spektren für beide Substanzen Molekularionen bei $m/z = 247$ (M-1), was dem theoretisch für prenyliertes 4HPP (Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$) berechneten Molekulargewicht von 248

entsprach (Abb. 7). Die Fragmentierungs-Sequenz ähnelte der für 4HPP (Cassidei et al. 1980) beschriebenen Abfolge:

3DMA-4HPP: m/z (relative Intensität): 247 (M-1, 100), 203 (7), 201 (3), 175 (69).

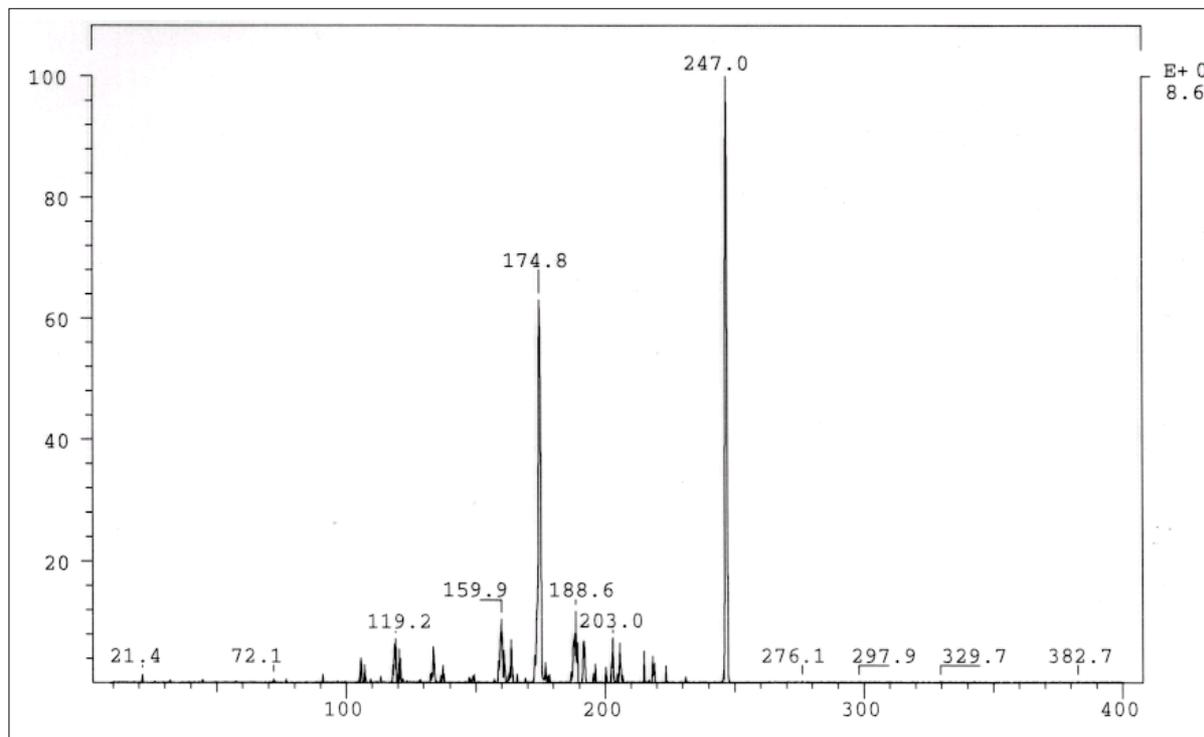


Abb. 7: Massenspektrum der als 3DMA-4HPP identifizierten Reaktionsprodukte.

1.5.3 Interpretation der Ergebnisse

Die Daten der $^1\text{H-NMR}$ -Analyse belegten, daß beide Reaktionsprodukte identisch waren, wobei ihre Struktur als Enol-Form von 3-Dimethylallyl-4-hydroxyphenylpyruvat identifiziert werden konnte. Bei den nach HPLC-Analytik detektierten beiden Signalpeaks handelt es sich vermutlich um die Keto- und Enol-Form dieser Substanz. Das Auftreten der Keto-Enol-Tautomerie wurde schon für das Substrat der Prenyltransferase-Reaktion, 4HPP, beschrieben (Büchner und Kirberger, 1952; Cassidei et al. 1980). Außerdem wurde beobachtet, daß das Gleichgewicht der Reaktion in organischen Lösungsmitteln fast vollständig zur Enolform hin verschoben ist. In Aceton liegt 4HPP zu 98 % in der Enolform vor (Cassidei et al. 1980). Da die $^1\text{H-NMR}$ -Analyse beider Reaktionsprodukte eben unter diesen Bedingungen erfolgte, kann somit die Übereinstimmung der Spektren erklärt werden. In wässrigen Systemen dagegen dominiert pH-abhängig die Ketoform. Die Verwendung eines Wasser-Methanol-Ameisensäure-Gemisches während der HPLC-Analytik ermöglichte das Auftreten beider Tautomerformen. Dabei ist die Reaktionsgeschwindigkeit der tautomeren Umwandlung im sauren pH-Bereich so langsam, daß selbst eine Papierchromatographische Trennung beider Formen erzielt werden konnte (Schwarz, 1961). Die während der HPLC-Trennung beobachteten Reaktionsprodukte der Prenyltransferase-Reaktion repräsentieren mit hoher Wahrscheinlichkeit die Keto- und Enolform des

prenylierten 4HPPs (Abb. 8), wobei eine genaue Zuordnung der jeweiligen Form zum entsprechenden HPLC-Peak nicht möglich war. Die Tatsache, daß identische $^1\text{H-NMR}$ -Spektren für beide Reaktionsprodukte erhalten wurden, liegt im nahezu vollständigen Vorliegen des in Aceton gelösten 3DMA-4HPPs als Enolform begründet.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Isoprenylierung innerhalb der Ring A-Biosynthese auf der Stufe des 4-Hydroxyphenylpyruvates stattfindet und bestätigen die von Calvert et al. (1972) erbrachten Ergebnisse der Fütterungsexperimente.

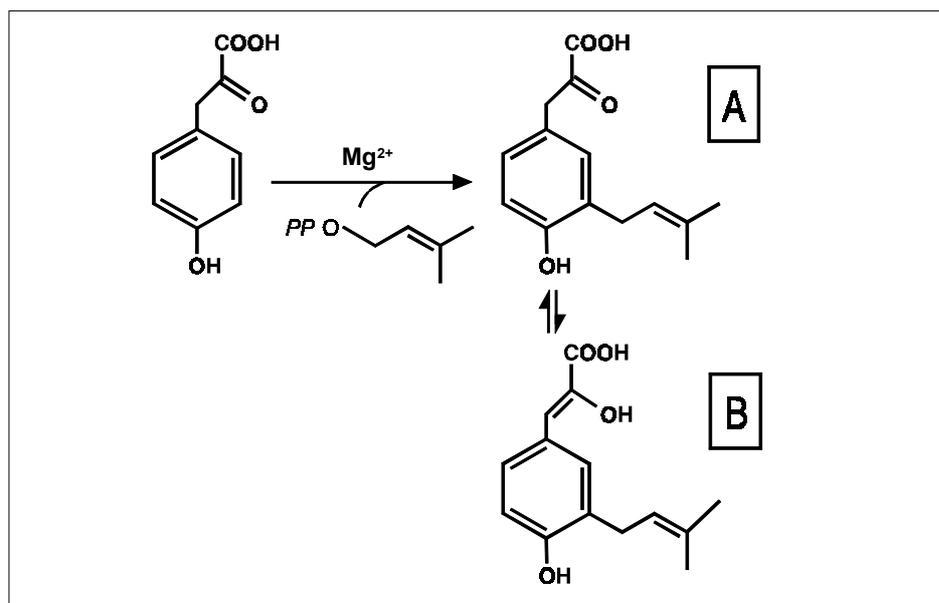


Abb. 8: Darstellung der 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktion und der gebildeten tautomeren Formen des Reaktionsproduktes 3DMA-4HPP. A: Ketoform ; B: Enolform.

1.6 Charakterisierung der 4HPP Dimethylallyltransferase aus *S. spheroides*

Die partiell gereinigte 4HPP Dimethylallyltransferase wurde biochemisch charakterisiert. Dabei stand die Ermittlung optimaler Prenyltransferase-Reaktionsbedingungen im Hinblick auf die für eine Strukturaufklärung der Reaktionsprodukte erforderliche Substanzmenge im Vordergrund. Hierbei zeigten die eingangs für die Etablierung des Reinigungsstrategie durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisation der Prenyltransferase, daß es sich um ein lösliches Enzym handelt (s. 1.3). Diese Eigenschaft zeichnet bereits seine Abgrenzung zu membrangebundenen Prenyltransferasen des Primärstoffwechsels, wie zum Beispiel der an der Biosynthese des respiratorischen Elektronenüberträgers Ubichinon (Ashby et al. 1992; Melzer und Heide, 1994) oder des Menachinons (Shineberg und Young, 1976) beteiligten Polyprenyltransferasen, vor. Die Ermittlung der Substratspezifität der 4HPP Dimethylallyltransferase diente auch zur Differenzierung des vorliegenden Enzyms von aromatischen Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen einer Vielzahl anderer Organismen. Sie könnte somit weitere Belege für eine spezifische Beteiligung innerhalb der Novobiocin-

Biosynthese und insbesondere über die Stufe des innerhalb der Ring A-Biosynthese zu prenylierenden Intermediates liefern.

Die Charakterisierung der 4HPP Dimethylallyltransferase wurde mit säulenchromatographisch partiell gereinigtem Enzym durchgeführt. Die enzymatische Reaktion zeigte eine lineare Proteinmengenabhängigkeit bis 100 µg Protein pro Inkubationsansatz und Zeitlinearität bis zu einer Inkubationsdauer von 30 min. Ebenso wies sie für die Substrate 4HPP und DMAPP den erwarteten hyperbolischen Verlauf einer bimolekularen enzymabhängigen Reaktion auf.

1.6.1 Metallionenabhängigkeit

Die Metallionenabhängigkeit wurde für Magnesium- und Manganionen untersucht und zeigte eine maximale Aktivitätserhöhung bei 0,5 mM für beide Kationen (Abb. 9), wobei in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen nur 75 % der im Vergleich mit Mg^{2+} -Ionen erhaltenen Werte beobachtet werden konnten.

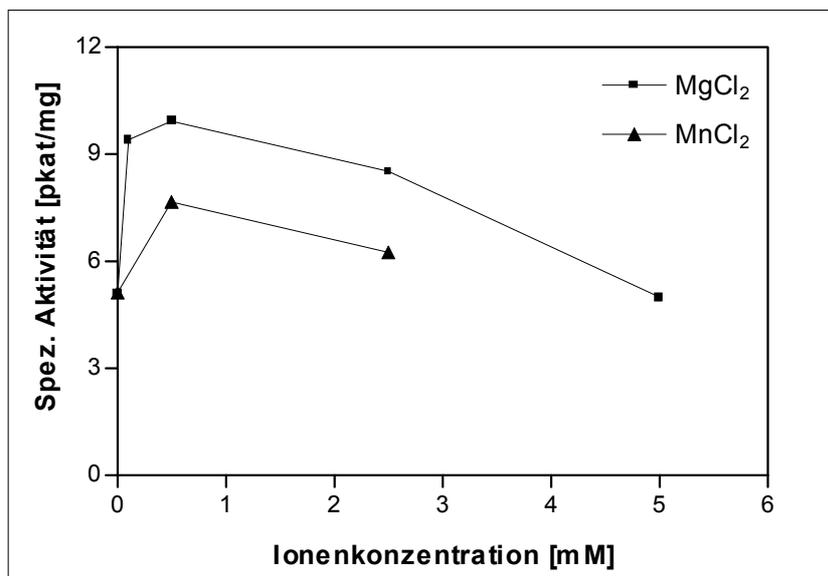


Abb. 9: Metallionenabhängigkeit der 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktion. Der Einfluß der untersuchten divalenten Kationen wurde durch Bestimmung der 4HPP Dimethylallyltransferaseaktivität (s. III 5.3.2) in Gegenwart des entsprechenden Chlorid-Salzes bestimmt.

1.6.2 Bestimmung des pH-Optimums

Das pH-Optimum der 4HPP Dimethylallyltransferase wurde mit Hilfe von 4 Puffersystemen bestimmt und lag sowohl in Tris-HCl- als auch in Bis-Tris-Puffer um pH 7 (Abb. 10). Halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeiten wurden etwa bei pH 5 und 8,5 beobachtet. Dabei konnten in Phosphat-Puffer nur durchschnittlich 30 % der in Tris-Puffer detektierten Aktivität beobachtet werden. Der inhibierende Effekt von Phosphat-Puffer wurde bereits mehrfach für Primärstoffwechsellzyme beschrieben (Stoll und Blanchard, 1990).

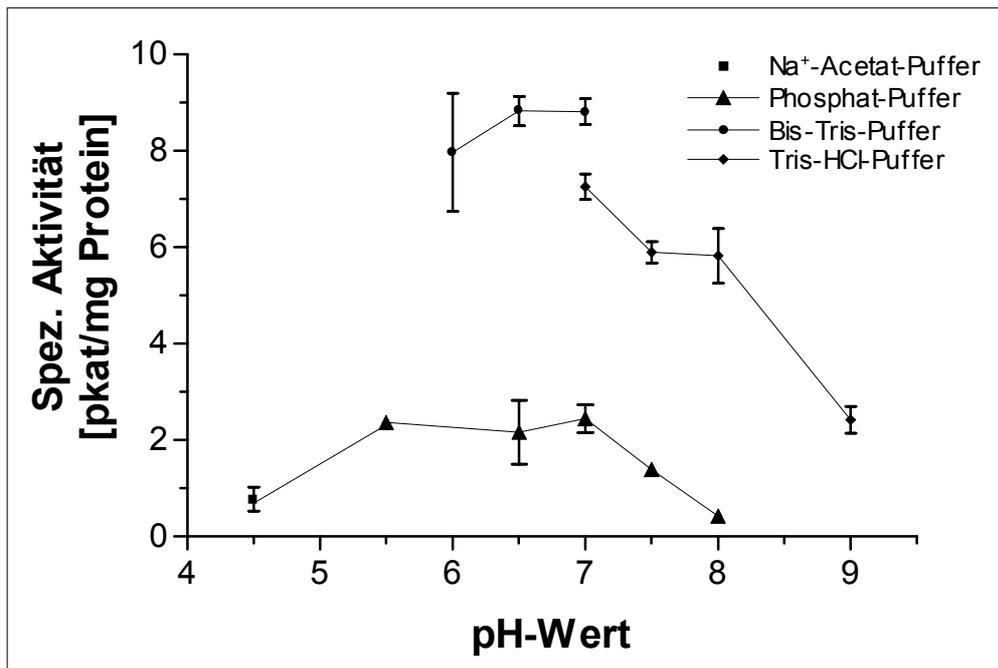


Abb. 10: pH-Abhängigkeit der 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktion.

1.6.3 Bestimmung des Temperaturoptimums

Wie für mesophile Bodenbakterien zu erwarten, zeigte die 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktion ein Temperatur-Optimum zwischen 30 und 40°C (Abb. 11).

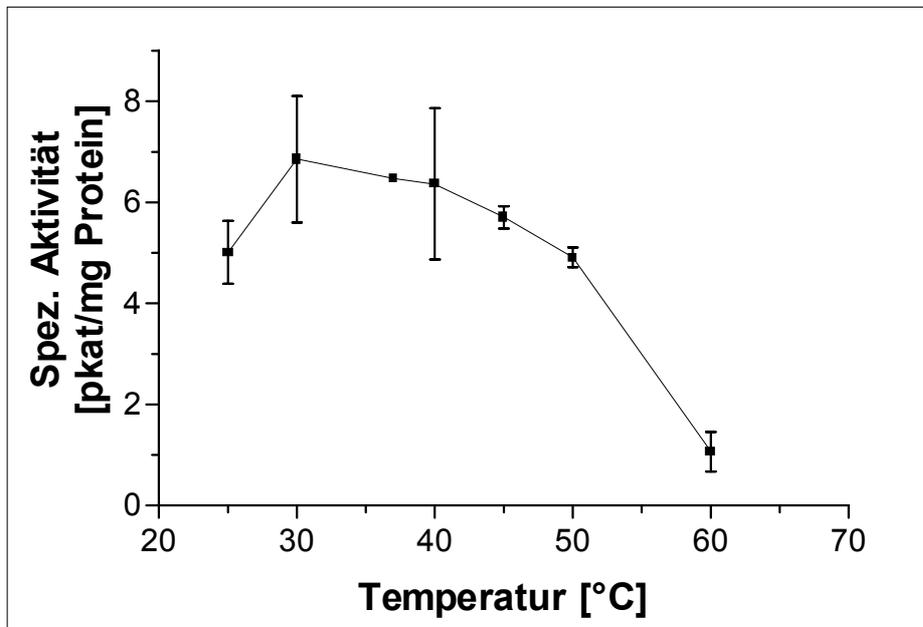


Abb. 11: Temperatur-Abhängigkeit der 4HPP-Dimethylallyltransferase-Reaktion.

1.6.4 Substratspezifität

Die Überprüfung der Substratspezifität wurde sowohl für das aromatische Substrat als auch für die Prenyldiphosphate IPP und GPP durchgeführt (Tab. 31). Von den getesteten aromatischen Verbindungen wurde neben dem eigentlichen Substrat 4HPP lediglich 4-Hydroxyphenyllactat in geringem Maß umgesetzt. Die Inkubation mit dem Prenyldiphosphat $[1-^{14}\text{C}]$ IPP führte, wie schon im Rohextrakt beobachtet, zu einer 30% igen Produktbildung im Vergleich zu derjenigen mit $[1-^{14}\text{C}]$ DMAPP. Allerdings konnte immerhin noch eine DMAPP-IPP-Isomerase-Aktivität von 0,193 pkat/mg im verwendeten partiell gereinigten Enzym festgestellt werden, so daß ein Teil des eingesetzten Substrates wahrscheinlich zu DMAPP umgesetzt wurde. $[1-^{14}\text{C}]$ GPP wurde unter Standardbedingungen nicht als Seitenkettensubstrat akzeptiert. Erst nach Erhöhung der Konzentration auf 36 μM konnte eine geringe Produktbildung nachgewiesen werden.

Tab. 31: Substratspezifität der 4HPP Dimethylallyltransferase. Die Prenyltransferase-Aktivität wurde jeweils nach Zugabe des aromatischen bzw. isoprenoiden Substrates in einer Endkonzentration von 2,5 mM bzw. 18 μM untersucht.

Substrat	Spezifische Aktivität [pkat/mg Protein]	Relative Aktivität [%]
aromatisches Substrat (2,5 mM):		
4-Hydroxyphenylpyruvat	2,62	100
4-Hydroxyphenyllactat	0,15	5,7
4-Hydroxymizsäure	< 0,1	< 3,8
4-Hydroxybenzaldehyd	< 0,1	< 3,8
4-Hydroxybenzoesäure	< 0,1	< 3,8
L-Tyrosin	< 0,1	< 3,8
isoprenoide Seitenkettensubstrate (18 μM):		
Dimethylallyldiphosphat	2,62	100
Isopentenylidiphosphat	0,78	29,8
Geranyldiphosphat	< 0,1	< 3,8

1.6.5 Stabilität

Die partiell gereinigte 4HPP Dimethylallyltransferase konnte nach Zugabe von 2 mM DTT, 20 μM PMSF und 10 % (w/v) Glycerin problemlos bei -20°C gelagert werden. Nach 7-tägiger Lagerung konnte unter diesen Bedingungen kein Aktivitätsverlust verzeichnet werden; nach 4-monatiger Aufbewahrung wurden noch 75 % der Ausgangsaktivität detektiert. Dagegen brachte eine 3-tägige Lagerung bei 4°C einen 48% igen Aktivitätsverlust mit sich. Das Enzym wurde unmittelbar nach Durchführung der Reinigung unter den oben genannten Bedingungen eingefroren oder direkt zur weiteren Charakterisierung eingesetzt.

2 Identifizierung und Sequenzierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters aus *S. spheroides* NCIMB 11891

2.1 Einleitung

Im Rahmen des in unserer Arbeitsgruppe begonnenen Projektes zur Identifizierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters wurde durch L. Heide eine Cosmidbank des Novobiocinproduzenten *S. spheroides* NCIMB 11891 im SuperCos 1-Vektor hergestellt. Die Klonierungsstrategie des Clusters basierte auf einem Screening mit einem dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gen. Die Struktur des Novobiocins enthält unter anderem eine 6-Desoxyhexose (Ring C), an deren Biosynthese im allgemeinen dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase beteiligt sind (Liu et al. 1994; Piepersberg, 1994). Mit Hilfe von degenerierten Primern aus konservierten N-terminalen Bereichen von dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (Decker et al. 1996) konnten über PCR aus genomischer DNA von *S. spheroides* zwei unterschiedliche Fragmente durch Z. Wang amplifiziert werden (554 bp und 537 bp), die über Sequenzvergleiche als putative dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase identifiziert werden konnten. Das Screening der Cosmidbank mit diesen beiden homologen Dehydratase-Sonden führte zur Detektion von zwei unterschiedlichen Cosmidgruppen 1 und 2 mit jeweils vier überlappenden Cosmiden.

Zur Überprüfung, welche der beiden Cosmidgruppen die gesuchten Biosynthesegene des Novobiocins enthält, wurden im weiteren folgende Ansätze verfolgt:

Random-Sequenzierungen innerhalb beider Cosmidgruppen im Rahmen dieser Arbeit sollten Hinweise auf das Vorliegen von Novobiocin-Biosynthesegenen und eventuell Resistenzgenen liefern.

Parallel wurde durch A. Mühlenweg ein Screening der beiden Cosmidgruppen mit einer homologen Sonde aus Bereichen des *gyrB^R*-Resistenz-Gens durchgeführt, welches schon in den 80er Jahren von Thiara und Cundliffe (Thiara und Cundliffe, 1988 und 1993) identifiziert worden war.

2.2 Charakterisierung und Analyse der Cosmide 9-6G und 10-9C

Erste Sequenzierarbeiten wurden am Cosmid 9-6G aus Cosmidgruppe 1 nach Subklonierung mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* durchgeführt. Gleich zu Beginn konnten über einen sequenzierten Bereich von 371 bp des Subklons p9-6GE1 hohe Homologien zum Novobiocin-Resistenzgen *gyrB^R* (Thiara und Cundliffe, 1993) festgestellt werden. Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß Cosmidgruppe 1 die gesuchten Novobiocin-Biosynthese-Gene trägt.

Aus dieser vorliegenden *gyrB^R*-Sequenz wurde durch A. Mühlenweg mittels PCR das entsprechende Fragment aus genomischer DNA von *S. spheroides* amplifiziert, kloniert und als homologe Sonde zur Southern Hybridisierung der beiden Cosmidgruppen eingesetzt

(Dissertationsschrift A. Mühlenweg, 1999). Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß das Novobiocin-Resistenzgen *gyrB*^R lediglich auf Cosmiden der Gruppe 1 lokalisiert war.

Zur weiteren Charakterisierung der Cosmidgruppe 1 wurden Restriktionskartierung, die in dieser Arbeit etablierte Methode der nicht-radioaktiven Hybridisierungskartierung und DNA-Sequenzanalysen eingesetzt.

2.2.1 Restriktionskartierung und Hybridisierungskartierung

Erste Ergebnisse der durch Z. Wang durchgeführten Restriktionskartierung mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *BglII*, *XhoI*, *NotI* und *HindIII* ergaben, daß von den 4 überlappenden Cosmiden die Cosmide 9-6G und 10-9C mit etwa 58 kb den gesamten Bereich aller Cosmide abdeckten. Eine genaue Kartierung dieser beiden Cosmide für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BglII* lieferte die auf Southern-Hybridisierung basierende Cosmid-Kartierungs-Methode. Eine genaue Beschreibung dieser Methode ist in Kapitel III 4.8.6 zu finden. Die durch *HindIII*-Restriktionsverdau im SuperCos 1-Vektor linearisierten Cosmide wurden mit *EcoRI* bzw. *BglII* partialverdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Blotten mit den Kartierungs sonden SuperCos 1-T3 bzw. SuperCos 1-T7 hybridisiert. Da die beiden Cosmide im mittleren Bereich ebenfalls eine *HindIII*-Schnittstelle aufwiesen, war keine vollständige Kartierung von beiden Seiten, sondern jeweils nur eine Analyse mit der entsprechenden Sonde bis zur *HindIII*-Schnittstelle möglich.

In Abb. 12 und Abb. 13 ist ein typischer Partialverdau nach gelelektrophoretischer Auftrennung und die Southern Hybridisierungen der mit *EcoRI* und *BglII*-partialverdauten Cosmide 9-6G und 10-9C dargestellt.

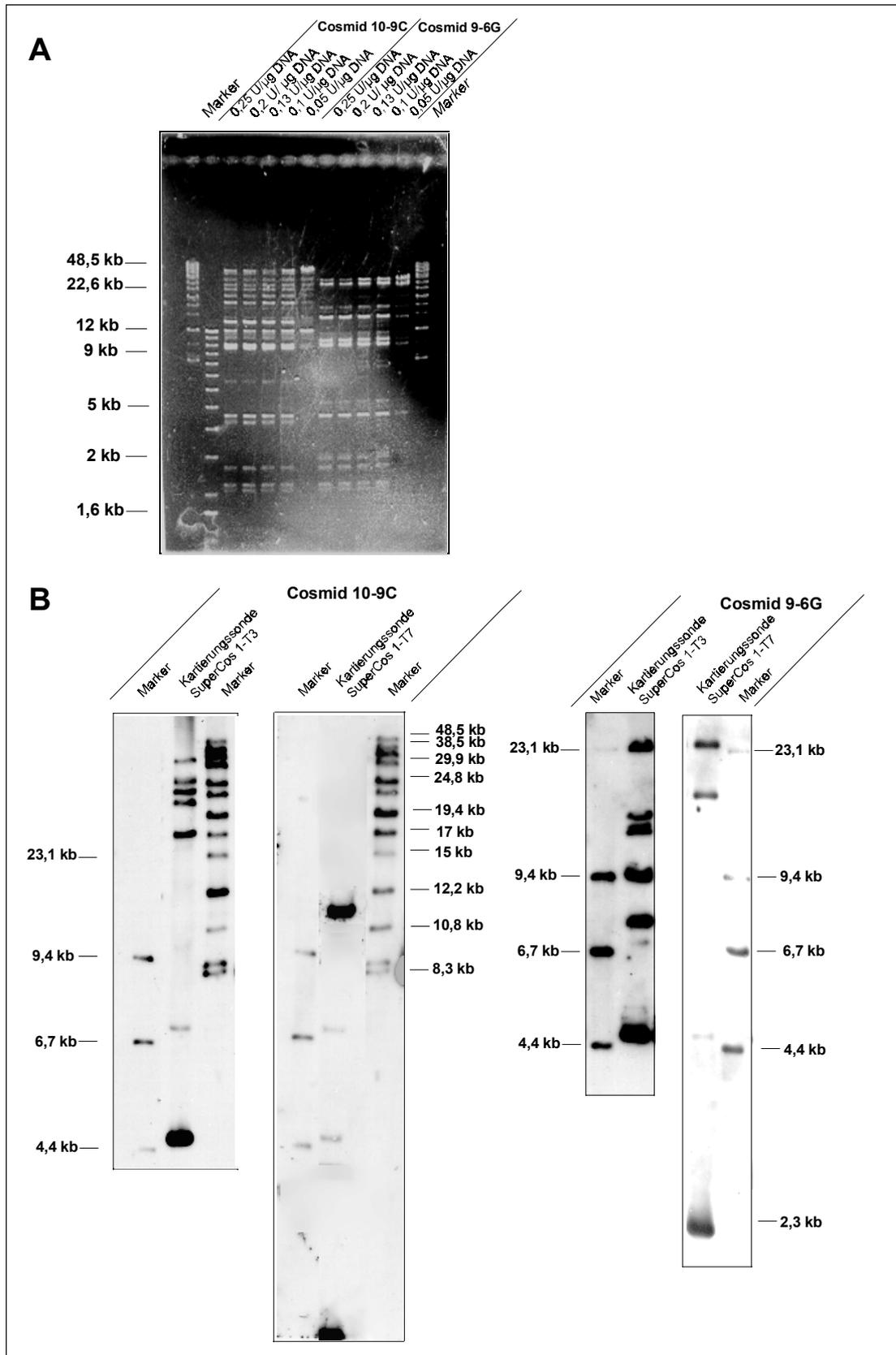


Abb. 12: Kartierungsanalyse der Cosmide 9-6G und 10-9C mit *Eco*RI.

A. Partieller *Eco*RI-Restriktionsverdau der Cosmide 9-6G und 10-9C. Die Cosmide wurden mit unterschiedlichen Restriktionsenzymmengen wie unter III 4.8.1 beschrieben partialverdaut. Die mit 0,13 U *Eco*RI/µg DNA verdaute DNA wurde zur Kartierung wie in Kapitel III 4.8.6 beschrieben eingesetzt.

B. Southern Hybridisierungen der *Eco*RI-partialverdauten Cosmide.

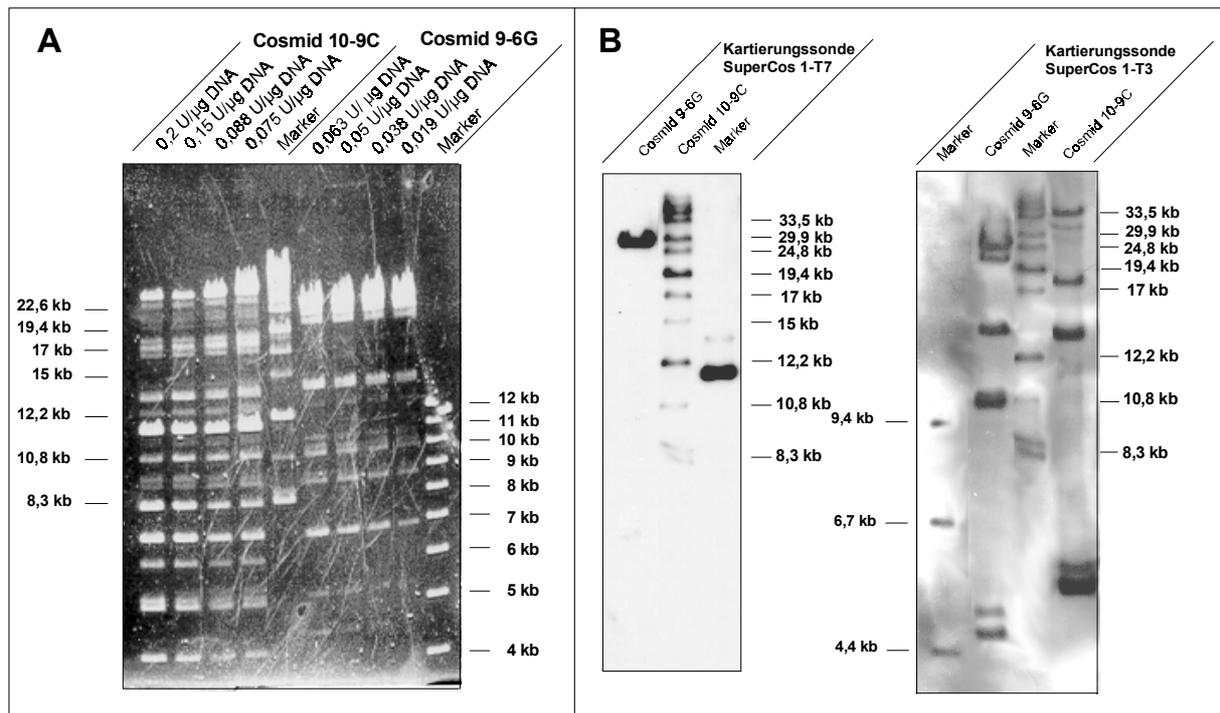


Abb. 13: Kartierungsanalyse der Cosmide 9-6G und 10-9C mit *Bgl*II.

A. Partieller *Bgl*II-Restriktionsverdau der Cosmide 9-6G und 10-9C. Die Cosmide wurden mit unterschiedlichen Restriktionsenzym-Mengen wie unter III 4.8.1 beschrieben partialverdaut. Die mit 0,063 U *Bgl*II/µg DNA verdaute DNA von Cosmid 9-6G bzw. 0,15 U *Bgl*II/µg DNA verdaute DNA von Cosmid 10-9C wurde zur Kartierung wie in Kapitel III 4.8.6 beschrieben eingesetzt.

B. Southern Hybridisierungen der *Bgl*II-partialverdauten Cosmide.

Die Länge der einzelnen detektierten DNA-Fragmente repräsentiert den Abstand der spezifischen Restriktionsschnittstellen von der T3- beziehungsweise T7-Promotor-Seite der Cosmid-Klone. Eine Zusammenfassung der aus den Southern Hybridisierungen, erhaltenen Ergebnisse ist unter Berücksichtigung von Restriktionskartierungen und Sequenzanalysen in Tab. 32 und dargestellt.

Tab. 32: Zusammenfassung der durch Southern Hybridisierung erhaltenen Ergebnisse der Cosmid-Kartierung. Die Tabelle enthält eine Auflistung der nach Southern Hybridisierung mit den Hybridisierungssonden SuperCos 1-T7 beziehungsweise –T3 detektierten Fragmente für die Cosmide 9-6G und 10-9C. Die Lage der *EcoRI*- und *BglII*-Schnittstellen der kartierten genomischen DNA aus *S. spheroides* NCIMB 11891 in Bezug auf den T7-Promotor des SuperCos1-Vektors ist unter Berücksichtigung der nach vollständigem Restriktionsverdau erhaltenen Fragmentgrößen und den aufgeführt. Die mit Stern gekennzeichneten Fragmente stellen SuperCos 1-Fragmente ohne Insert dar. n.d. = nicht detektiert.

EcoRI-Kartierung				
Kartierungssonde	detektierte Fragmente nach Southern Hybridisierung [kb]		Lage der Fragmente in Bezug auf den T7- Pomotor [kb]	
	Cosmid 9-6G	Cosmid 10-9C	Cosmid 9-6G	Cosmid 10-9C
SuperCos 1-T7	24,5 17,0 2,2 (*)	10,96 2,2 (*)	13,5 10,1 9,7	10,1 9,7 2,7
SuperCos 1-T3	23,2 14,3 13,2 12,7 9,7 7,5 4,5 (*)	32,58 25,5 22,9 20,75 17 4,5 (*)	0,8 0,5 2,7 2,1 3,0	2,1 4,2 14
BglII-Kartierung				
Kartierungssonde	detektierte Fragmente nach Southern Hybridisierung [kb]		Lage der Fragmente in Bezug auf den T7- Pomotor [kb]	
	Cosmid 9-6G	Cosmid 10-9C	Cosmid 9-6G	Cosmid 10-9C
SuperCos 1-T7	24,95	11,8	25,6	10
SuperCos 1-T3	22,75 21,379 13,91 10,0 4,5	31,6 26,7 23,6 17,9 13,6 5,2	7,2 3,8 5,6	7,2 3,8 5,6 0,9 (n.d.) 4,4 10

Die Cosmid-Kartierungsmethode erlaubte zum Teil die Ermittlung von Restriktionsschnittstellen-Abständen von weniger als 1 kb. Dies konnte jedoch nicht mehr für Hybridisierungssignale mit einer Größe von mehr als 15 kb erreicht werden, da sich in diesem Bereich die Trennleistung der 0,4 % igen Agarosegele als limitierender Faktor erwies. Die in Abb. 14 dargestellte Kartierung ist deshalb auch durch die Ergebnisse der späteren Sequenzanalyse (s. 2.2.2) ergänzt.

Die Orientierung der einzelnen großen *EcoRI*-Fragmente innerhalb der Cosmide konnte nicht vollständig durch die Kartierung und die Sequenzanalyse ermittelt werden, da sich die Restriktionsschnittstellen oftmals in intergenischen Bereichen befanden oder die erhaltenen Sequenzdaten keine eindeutigen Zuordnungen zuließen. Durch PCR-Amplifikation mit jeweils drei spezifischen Primern konnten eindeutige Resultate in Bezug auf die jeweilige Subklon-Orientierung erzielt werden. Die PCR-Reaktionen wurden mit Primern aus

Randbereichen der benachbarten Fragmente durchgeführt, wobei ein Primer des entsprechenden Fragmentes stets mit beiden Primern des benachbarten Fragmentes kombiniert wurde. Das Primerdesign wurde dabei so ausgewählt, daß je nach Orientierung der Fragmente unterschiedlich große PCR-Produkte zwischen 300 und 1500 bp amplifiziert wurden. Die einzelnen Primer sind im Kapitel III 4.8.7.1 aufgeführt; ihre Lage innerhalb der Gesamtsequenz ist in Abb. 14 und im Anhang, Abschnitt VII 2 dargestellt.

Mit den in Tab. 33 aufgeführten Ergebnissen konnte der Nachweis für die Orientierung der entsprechenden *EcoRI*-Subklone erbracht werden. Die Orientierung von p10-9CE2 und p10-9CE1 lag durch bisherige Ergebnisse schon vor und sollte lediglich bestätigt werden.

Tab. 33: Ermittlung der Subklon-Orientierung innerhalb der Cosmide durch spezifische PCR-Amplifikation.

Primer Kombination	Primerursprung	theoretisch möglich PCR-Produktgröße	detektierte PCR-Produkt-Größe
MS2–MS3–MS4	MS2: p9-6GE9	MS2-MS4	650
	MS3: p9-6GE9	MS3-MS4	
	MS4: p9-6GE2		
MS7-MS8-MS9	MS7: p9-6GE6	MS7-MS8	820
	MS8: p9-6GE5	MS7-MS9	
	MS9: p9-6GE5		
MS11-MS12	MS11: p10-9CE2 MS12: p10-9CE1	782	850

Auf der Basis der ausgewerteten Daten konnte eine in Abb. 14 dargestellte Restriktionskarte erstellt werden, welche einen etwa 58 kb großen, genomischen DNA- Bereich von *S. sphaeroides* NCIMB 11891 repräsentierte.

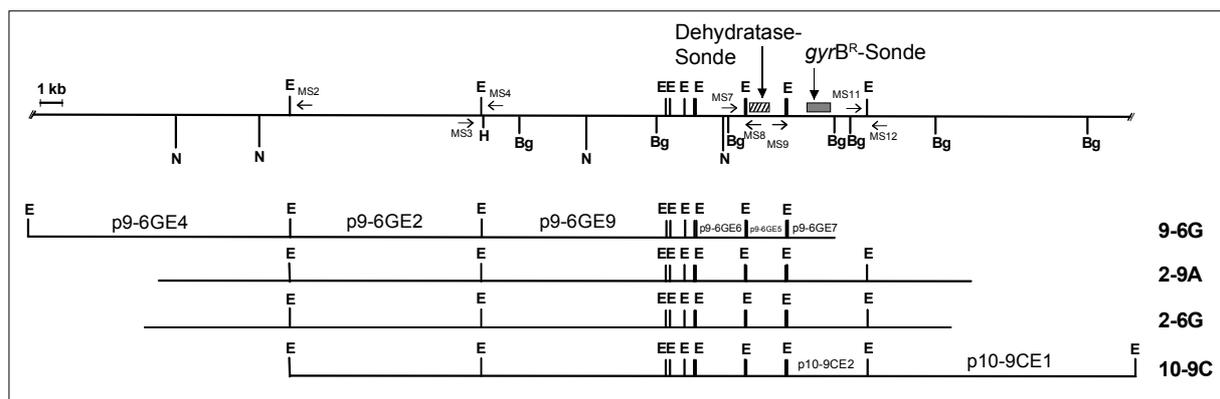


Abb. 14: Restriktionskarte der mit dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase- und *gyrB*^R-Sonde hybridisierenden Cosmide. Restriktionsenzyme wurden wie folgt abgekürzt: Bg = *Bgl*III, E = *EcoRI*, H = *Hind*III, N = *NotI*. Die Lage der mit der homologen dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase- und *gyrB*^R-Sonde hybridisierten *EcoRI*-Fragmente und ebenso der zur Kartierung ausgewählten Primer ist entsprechend gekennzeichnet. Aus den Cosmiden 9-6G und 10-9C wurden die in der Graphik bezeichneten *EcoRI*-Subklone hergestellt.

2.2.2 Sequenzierung der Cosmide 9-6G und 10-9C

Zur weiteren molekularbiologischen und biochemischen Charakterisierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters wurde das Cosmid 9-6G vollständig, und Bereiche des Cosmids 10-9C partiell sequenziert. 6,5 kb des Cosmids 9-6G wurden im Rahmen der Dissertationsarbeit von A. Mühlenweg sequenziert. 30,5 kb des insgesamt 53,1 kb umfassenden sequenzierten Bereiches wurden doppelsträngig sequenziert. Dazu wurden die kartierten 0,5 - 14 kb großen *EcoRI*-Fragmente der Cosmide 9-6G und 10-9C in den Vektor pBSK(-) kloniert, welche wiederum gegebenenfalls nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI, *Bgl*II, *Kpn*I, *Nco*I, *Not*I, *Sac*II, *Sal*I und *Sma*I im Größenbereich zwischen 0,2 und 5 kb weiter in die Klonierungsvektoren pB SK(-), pBC SK(-) oder Litmus 28 subkloniert wurden. Die Herstellung von über benachbarte *EcoRI*-Fragmente überlappenden Subklonen erfolgte nach Subklonierung mit *Hind*III – *Not*I und *Bgl*II. Erste Sequenzierarbeiten erfolgten wie unter III 4.9 beschrieben, ein Großteil der Nukleotidsequenz wurde jedoch durch Auftragssequenzierung durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) ermittelt. Es wurden jeweils Universal-Primer (T3, T7, M13-reverse, M13-univers) und interne Primer eingesetzt. Die Erstellung der Gesamtsequenz erfolgte nach Auswertung von 132 Einzelsequenzierreaktionen mit den in Kapitel III 4.9.4 aufgeführten Software-Programmen. In Abb. 15 ist die Sequenzierungsstrategie und die Lage der detektierten offenen Leserahmen innerhalb der untersuchten Cosmide zusammengefaßt. 25,6 kb des doppelsträngig sequenzierten Bereiches (*novA* bis *gyrB^R*) sind in der Datenbank GenBank unter der Datenbanknummer AF170880 hinterlegt. Die Gesamt-DNA-Sequenz ist im Anhang unter Abschnitt VII 2 aufgeführt.

Die DNA wies den für Streptomyceten typischen GC-Gehalt von 68,7 % auf (Wright und Bibb, 1992). Die Sequenzanalyse offenbarte das Vorliegen von 42 offenen Leserahmen (ORF), von denen 38 vollständig sequenziert wurden. Zusammenfassend ist in Tab. 34 eine Auflistung aller detektierten offenen Leserahmen mit den durch Homologievergleich zugewiesenen möglichen Funktionen aufgeführt. Die Auflistung enthält zusätzlich die für eine Ribosomen-Bindungsstelle in Frage kommende Shine-Dalgarno-Sequenz (Bibb und Cohen, 1982; Strohl, 1992).

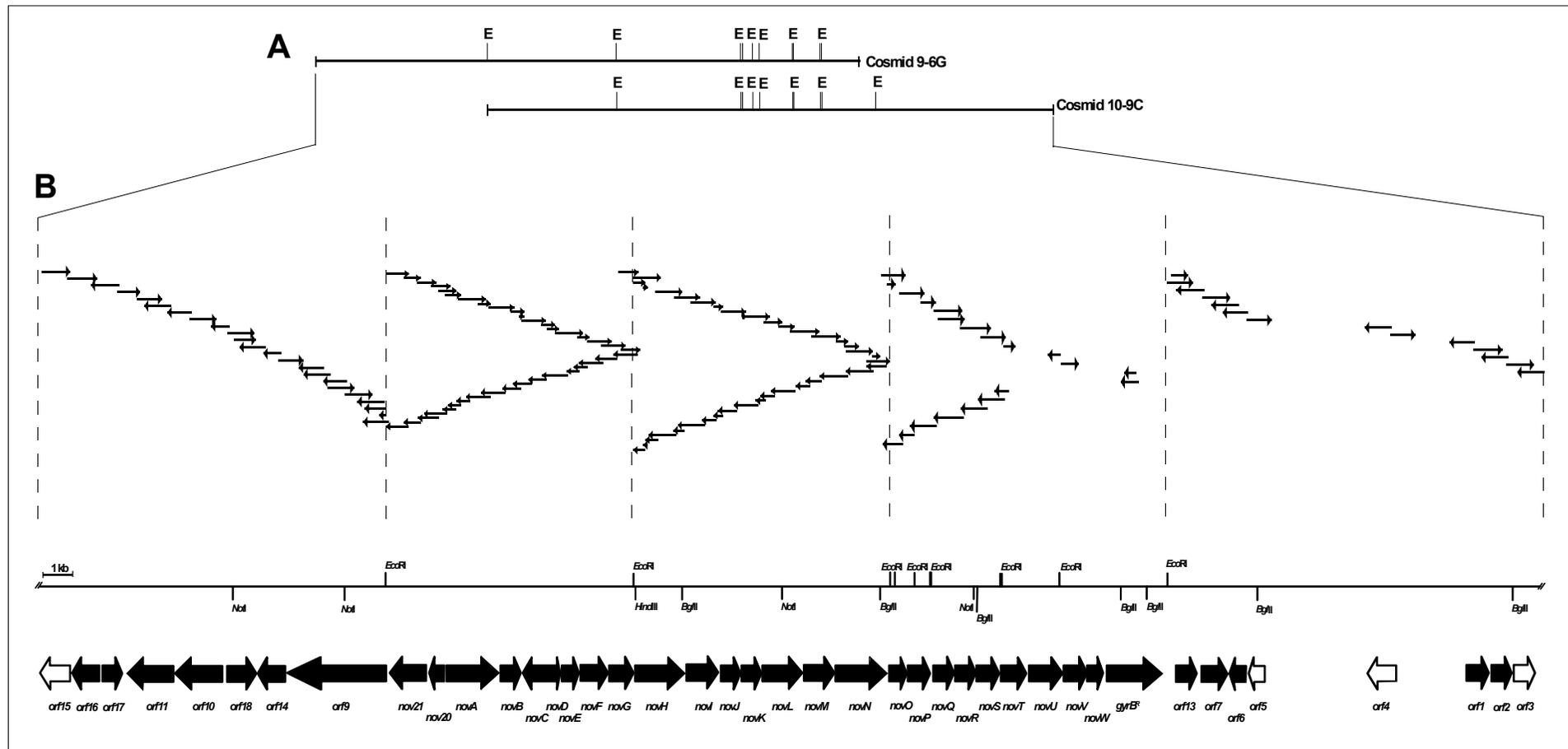


Abb. 15: Sequenzierung der Cosmide 9-6G und 10-9C und Restriktionskarte mit Anordnung der detektierten offenen Leserahmen. A. Übersicht der Cosmide 9-6G und 10-9C. B. Darstellung der Sequenzierungsstrategie. Die einzelnen Sequenzierungsreaktionen sind durch dünne Pfeile gekennzeichnet; dicke Pfeile repräsentieren offene Leserahmen (ORF), wobei weiß hinterlegte Pfeile unvollständig sequenzierte ORF's darstellen. Von dem etwa 58 kb umfassenden Bereich wurden insgesamt 53,1 kb und davon wiederum 30,5 kb von *nov21* bis *gyrB*^R doppelsträngig sequenziert. Die Sequenzierreaktionen im Bereich von *novT* bis *gyrB*^R wurden größtenteils im Rahmen der Dissertation von A. Mühlenweg durchgeführt und sind hier nicht vollständig aufgeführt. Der Sequenzbereich von *novA* bis *gyrB*^R (25,6 kb) ist in der Datenbank GenbankTM unter der Datenbanknummer AF170880 hinterlegt.

Tab. 34: Zusammenfassung der auf den Cosmiden 9-6G und 10-9C identifizierten Gene und ihrer putativen Funktionen. Noch unvollständig sequenzierte, offene Leserahmen sind mit *, nicht sequenzierte Shine-Dalgarno-Bereiche sind mit ** gekennzeichnet. Nukleotide, die zum 3'-Ende der 16S-rRNA (3'-UCUUUCCUCCACUAG-5') (Bibb und Cohen, 1982) komplementär sind, wurden unterstrichen. Vermutete Startcodons sind fett hinterlegt. Im Falle nur geringer Homologien ist ein (?) angegeben. Putative Funktionen innerhalb der Novobiocin-Biosynthese sind durch die im postulierten Biosyntheseschema (s. Abb. 35) gekennzeichneten römischen Zahlen dargestellt.

Gen	Genprodukt-Größe [Aminosäuren]	mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz	Homologien zu	mögliche Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese	Referenz
orf15	*	GCGCAGGCGCCG <u>GAG</u> CATGTCG <u>TG</u>	unbekannt	unbekannt	-
orf16	351	TCGGGGCCG <u>GAAGC</u> GAGGCAAGATG	Helicase (?)	unbekannt	Redenbach et al. 1996
orf17	240	ATCATGC <u>GGG</u> ACGACGATGATG	hypothetisch, unbekannt	unbekannt	-
orf 11	595	GGAAGAGATCG <u>AGG</u> AATCCGCATG	ABC-Transporter (StrW)	Novobiocin-Export (?)	Beyer et al. 1996
orf 10	620	TCCACGACTCACTGGGACGTCATG	ABC-Transporter (StrV)	Novobiocin-Export (?)	Beyer et al. 1996
orf 18	380	GGTACCCGTGATGGGACGTC <u>CG</u> TG	unbekannt (integrales Membranprotein)	unbekannt	Redenbach et al. 1996
orf 14	346	CCAAGGTCTCAGGAGGGCGCCG <u>TG</u>	Regulator (?)	unbekannt	Redenbach et al. 1996; Raibaud et al. 1991
orf 9	1294	AACGGAAGG <u>CAT</u> GGGACCAGATG	Subtilisin-ähnliche Protease	unbekannt	Suzuki et al. 1997
nov21	494	CGTCAGCTCCTCTGGAGGCTTCATG	Oxidoreduktase (?)	unbekannt	Nomura et al. 1992; Redenbach et al. 1996; Nakatsu et al. 1997
nov20	156	GTAGTCCTGTTATTATTCGCCATG	Regulator (?)	unbekannt	Redenbach et al. 1996
novA	635	AAGCCCTCTCGAAGGAGCCCATG	ABC-Transporter	Resistenz (?)	van Wangeningen et al. 1998
novB	284	TTGTCCGGGTTAGCGTGCCCGCATG	Aminodesoxychorismat-Lyase (?)	unbekannt	Cole et al. 1998; Tomb et al. 1997
novC	352	GCGGCGGGGAATACAGGACATG	Oxidoreduktase (?)	unbekannt	Redenbach et al. 1996
novD	143	CCCGCCCGGGACGGCAGGATG	hypothetisch	unbekannt	Cole et al. 1998
novE	217	CCGAGGGGAAGAGAGGCATCGTG	LmbU aus <i>Streptomyces lincolnensis</i>	unbekannt	Peschke et al. 1995
novF	362	AAGGGATTGCGGGAGATCAATG	Oxidoreduktase	unbekannt	Redenbach et al. 1996; van Wangeningen et al. 1998
novG	318	ATTAAGTCCTATGGGGTTACATG	Regulator (?)	Regulator (?)	Distler et al. 1987
novH	600	GGAGACTTAAGGGGAAGTTTG	Peptidsynthetase	Ring B-Biosynthese (?) (X)	van Wangeningen et al. 1998
novI	407	CGACCCTCGAGGAGTGAGAGATG	Cytochrom P ₄₅₀	Ring B-Biosynthese (?) (X)	Lauer et al. 2000
novJ	262	GGGGCGGGAGGCGTGCGGATG	3-Ketoacyl-[ACP]-Reduktase	Ring B-Biosynthese (?) (XI)	Shen und Byers, 1996

Fortsetzung Tab. 34: Zusammenfassung der auf den Cosmiden 9-6G und 10-9C identifizierten Gene mit putativer Funktion.

novK	244	CACGTCG <u>ACGGCGG</u> TCGGCCATG	3-Ketoacyl-[ACP]-Reduktase	Ring B-Biosynthese (?) (XII)	Redenbach et al. 1996
novL	527	TTCGCGAAAGGTAGCCACTGGTG	Novobiocinsäure-Synthetase	Amidbindung (VI)	Redenbach et al. 1996
novM	379	ACAGGTGAGGTGGTTCATTGATG	Glycosyltransferase	Glykosylierung (VII)	Fernández et al. 1998; Westrich et al. 1999
novN	677	GTGCTCGCAGATTGGAACGACATG	Carbamoyltransferase	Carbamoylierung (IX)	Freiberg et al. 1997; Coque et al. 1995; Luka et al. 1993
novO	230	CCCAACACGAGGGGCATCGAGATG	C-Methyltransferase	Ring B-Biosynthese (XIII)	Peschke et al. 1995
novP	262	GCCTGGACCCGAGTGAGGGGTG	O-Methyltransferase	Noviose-Biosynthese (VIII)	Inouye et al. 1994; Fouces et al. 1999
novQ	271	TTCGCCCAGGCGCCACCCTGTG	unbekannt	unbekannt	-
novR	270	TCGATCACCGGAGGTGCCCGATG	Aldolase (?)	Ring A-Biosynthese	Redenbach et al. 1996
novS	288	CATGGAGCCCGCGTCCCGTCATG	dTDP-4-Keto-6-Desoxyhexose-Reduktase	Noviose-Biosynthese (IV)	Pissowotzki et al. 1991; Draeger et al. 1999
novT	336	AGAGAAAGGAGGGGCCGAGATG	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase	Noviose-Biosynthese (II)	Linton et al. 1995
novU	420	TCCATGAGGGGAAGGAAGAAATG	C-Methyltransferase	Noviose-Biosynthese (V)	Haydock et al., 1991; Gaisser et al. 1998
novV	297	GATCGCCGAGGGGGTCGCTGGTTG	dTDP-1-Glucose-Synthase	Noviose-Biosynthese (I)	Ma et al. 1997
novW	207	GTTGAAGGAGGTGAAGCCGTCGTG	dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose-3,5-Epimerase	Noviose-Biosynthese (III)	Pissowotzki et al. 1991
gyrB^R	677	CCATGCCCGAAAGAGAGTTTCCGTG	resistente Gyrase B	Resistenz	Thiara und Cundliffe, 1993
orf13	318	CCACGCGTACGCTGGCACCGTG	Transkriptionsregulator (?)	unbekannt	Ohnishi et al. 1999
orf7	332	CGCGAAAGGACAACCCCTCATG	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	unbekannt	Kormanec et al. 1995
orf6	219	GCCGGCCGCAGTGTGCGGATCGTG	ATP-Bindeprotein eines Oligopeptid-Transporters	unbekannt	Abouhamad und Manson, 1994; Alloing et al. 1990
orf5	*	**	ATP-Bindeprotein eines Oligopeptid-Transporters	unbekannt	Perego et al. 1991
orf4	*	ACCGGCCAGGAGGGCCGTCTTGTG	Substrat-Bindeprotein eines Dipeptid-Transporters	unbekannt	Perego et al. 1991
orf1	307	GCTGGCGGGGGATACCTGCCGTG	Substrat-Bindeprotein eines Zucker-Transporters (?)	unbekannt	Schlösser et al. 1999
orf2	268	CCATCTGCCGCAGTACGTAGCCGTG	ATP-Bindeprotein eines Zucker-Transporters (?)	unbekannt	Schlösser et al. 1999
orf3	*	CACGACCAAGGAGGACGCCCGATG	ATP-Bindeprotein eines Zucker-Transporters (?)	unbekannt	Schlösser et al. 1999

Eine ausführlichere Auswertung der Nukleotid-Sequenz wird im folgenden für diejenigen Gene aufgeführt, denen eine mögliche Funktion innerhalb des postulierten Novobiocin-Biosynthese-Schemas zugeordnet werden konnte und erfolgt gemäß der funktionellen Einteilung ihrer Genprodukte.

2.2.2.1 Enzyme der Desoxyzucker-Biosynthese

Innerhalb eines Bereiches von 4,8 kb direkt stromaufwärts des Resistenzgens *gyrB^R* befinden sich fünf offene Leserahmen, von denen vier mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Funktion innerhalb der Biosynthese des Desoxyzuckers Noviose zugeordnet werden können. Ein hypothetisches Biosyntheschema (siehe auch Kapitel V, Abb. 35) umfaßt Nukleotidylierung von Glucose-1-phosphat durch eine dTDP-1-Glucose-Synthase (NovV), Umsetzung der dTDP-Glucose zu dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose mittels einer dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (NovT), 3,5-Epimerisierung (dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose-3,5-Epimerase, NovW) und 4-Ketoreduktion (dTDP-4-Keto-6-Desoxyhexose-Reduktase, NovS). Das Genprodukt von *novU* weist mit 36 % Identität Homologien zu einer C-Methyltransferase aus *Saccharomyces erythraea* (Haydock et al. 1991; Gaisser et al. 1998) auf und könnte eine Rolle bei der Methylierung des Desoxyzuckers an C-5“ spielen.

Eine detaillierte Auswertung der für *novT*, *novU*, *novV* und *novW* erhaltenen Nukleotidsequenzen findet sich in der Dissertationsschrift von A. Mühlenweg (1999).

dTDP-4-Keto-6-Desoxyhexose-Reduktase:

Der 867 bp große ORF *novS* codiert für ein abgeleitetes Genprodukt von 288 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 31,7 kDa. Die Datenbankanalyse ergab hohe Ähnlichkeiten zu dTDP-4-Keto-6-Desoxyhexose-Reduktasen aus *Streptomyces griseus* (Pissowotzki et al. 1991) (Identität 53 %) und *Streptomyces antibioticus* (Draeger et al. 1999) (Identität 55 %), welche an der Desoxyzucker-Biosynthese des Aminoglykosids Streptomycin beziehungsweise der Polyketid-Antibiotika Oleandomycin und Granaticin beteiligt sind.

Die Sequenz von NovS enthält Ähnlichkeiten zu einem hochkonservierten Glycin-reichen, N-terminalen Motiv, welches die $\beta\alpha\beta$ -Rossmannfalte Nukleotid-bindender Enzyme repräsentieren könnte (Rossmann et al. 1975, Wierenga et al. 1985). Weiterhin konnte das für die Superfamilie der NAD(P)(H)-abhängigen Oxidoreduktasen charakteristische Yx_3K -Motiv (x = beliebige Aminosäure) (Labesse et al. 1994; Jörnvall et al. 1995) in NovS detektiert werden. Dieses Motiv befindet sich im aktiven Zentrum. Die katalytischen Tyrosin- und Lysin-Reste agieren als Protonen-Donor, wobei Lysin mit der Hydroxylgruppe der Nicotinamid-Ribose des Cofaktors, und Tyrosin mit der des Substrates interagiert. Eine Identifizierung von NovS als dTDP-4-Keto-Rhamnose-Reduktase könnte durch den entsprechenden Funktionsnachweis erfolgen.

2.2.2.2 Glycosyltransferase

Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz von *novM* (1140 bp, 379 Aminosäuren) ließ ausgeprägte Homologien zu einer Vielzahl von Glycosyltransferasen erkennen, darunter zu der im Mithramycin-Biosynthese-Cluster von *Streptomyces argillaceus* (Fernández et al. 1998) lokalisierten oder der im Landomycin-Produzenten *Streptomyces cyanogenus* (Westrich et al. 1999) detektierten Glycosyltransferase. Für das Enzym aus *Streptomyces argillaceus* konnte ein funktioneller Nachweis durch Geninaktivierungsexperimente erbracht werden. Die Identität mit NovM auf Proteinebene betrug 45 % beziehungsweise 41 %. Das für UDP-Glycosyltransferasen charakteristische Motiv HHGGxxT (x = variable Aminosäure) (Fernández et al. 1998) konnte auch innerhalb des C-terminalen Bereiches der NovM-Sequenz gefunden werden. Das Genprodukt von *novM* katalysiert mit hoher Wahrscheinlichkeit die Glykosylierungsreaktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese.

2.2.2.3 Oxidoreduktasen

Im Bereich der Cosmide 9-6G und 10-9C konnten insgesamt 6 offene Leserahmen mit Homologien zu Oxidoreduktasen entdeckt werden, über deren Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese keine sichere Aussage möglich ist. Das für eine putative $\beta\alpha\beta$ -Rossmannfalte charakteristische Motiv GxGxxG (x = beliebige Aminosäure) der NAD(P)⁺/NAD(P)H-Bindedomäne konnte im N-terminalen Bereich aller ORFs mit Ausnahme von *novC* und *novI* gefunden werden.

nov21:

Die vom 1485 bp großen ORF *nov21* abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt 29 % Identität zu einer putativen Oxidoreduktase aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Redenbach et al. 1996). Jeweils 28 % und 27 % Identität wurden weiterhin zu Dehydrogenasen des Phthalat- und Chlorbenzoat-Katabolismus in *Pseudomonas putida* (Nomura et al. 1992) und *Alcaligenes sp.* (Nakatsu et al. 1997) gefunden. Die Funktion von Nov21 für die Novobiocin-Biosynthese ist unbekannt.

novC:

Für den 1059 bp langen ORF *novC*, der für ein 352 Aminosäuren langes Protein mit einer Molmasse von 37,9 kDa codiert, wurden im Sequenzvergleich auf Proteinebene Homologien zu einer Vielzahl von Monooxygenasen festgestellt. Mit 46 % Identität konnten die höchsten Homologien zu einer putativen Monooxygenase aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Redenbach et al. 1996) beobachtet werden. Auch hier liegt kein Hinweis für eine offensichtliche Beteiligung von NovC innerhalb der Novobiocin-Biosynthese vor.

novF:

Die aus *novF* (1089 bp) abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte im Homologievergleich 44 % Identität zu einer putativen Prephenat-Dehydrogenase aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Redenbach et al. 1996) und 43 % Identität zu einer möglichen Prephenat-Dehydrogenase

aus *Amycolatopsis orientalis* (van Wageningen et al. 1998). Durch Prephenat-Dehydrogenasen wird in einem der letzten Schritte der L-Tyrosin-Biosynthese Prephenat zu 4-Hydroxyphenylpyruvat (4HPP) umgesetzt (Ahmad und Jensen, 1988). 4HPP stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Intermediat der Ring A-Biosynthese dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine 4HPP Dimethylallyltransferase identifiziert werden (siehe 1), die angesichts ihrer hohen Substratspezifität für 4HPP wahrscheinlich die Isoprenylierungsreaktion innerhalb der Ring A-Biosynthese katalysiert. Durch Fütterungsversuche mit L-[¹⁴C]-Tyrosin konnten Bunton und seine Mitarbeiter zeigen, daß Tyrosin mit hoher Effizienz in das 4-Hydroxybenzoesäure-Derivat inkorporiert wird (Bunton et al. 1963). Durch weitere Untersuchungen müßte geklärt werden, ob 4HPP auch direkt aus dem Shikimat-Chorismat-Weg in Ring A eingebaut wird, und ob die Funktion von NovF tatsächlich in der Umwandlung von Prephenat in 4HPP besteht.

novI:

Für das vom 1224 bp großen ORF *novI* abgeleitete, 407 Aminosäuren lange Produkt wurden signifikante Homologien zu Enzymen der Cytochrom P450-Superfamilie, darunter zu NikQ aus *Streptomyces tendae* (40 % Identität) (Lauer et al. 2000), Orf20 aus dem Chloroeremomycin-Produzenten *Amycolatopsis orientalis* (38 % Identität) (van Wageningen et al. 1998) und zu P-450lin aus *Pseudomonas incognita* (36 % Identität) (Ropp et al. 1993) beobachtet. NikQ wurde durch Insertionsinaktivierungs- und Komplementationsexperimente eine Funktion innerhalb der 4-Formyl-4-imidazolin-2-on-Bildung während der Biosynthese des Peptidyl-Nukleosid-Antibiotikums Nikkomycin X zugeschrieben. Dabei wurde vermutet, daß NikQ bifunktionell für die β -Hydroxylierung von L-Histidin und die daran anschließende Fragmentierung zu 4-Formyl-4-imidazolin-2-on verantwortlich sein könnte. Die Biosynthese des Chloroeremomycins erfordert zwei β -Hydroxylierungsschritte an Tyrosin-Rest 2 und 6, woran das Produkt von *orf20* beteiligt sein könnte. Bei P-450lin handelt es sich nachweislich um eine 8-Methyl-Linalool-Hydroxylase. Das Enzym konnte aktiv in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden.

Die Biosynthese der Aminocumarin-Einheit des Novobiocins erfolgt über die Vorstufe Tyrosin (Bunton et al. 1963; Clavert et al. 1972). Dabei stammt die Aminogruppe des Ring B aus dem Tyrosin. Ebenso bleibt das heterocyclische Sauerstoffatom des Aminocumarins aus der Carboxylgruppe des Tyrosins erhalten, wie Inkorporationsexperimente mit Carboxyl-[¹⁸O]-Tyrosin zeigten. Es wurde vermutet, daß der Ringschluß über eine oxidative Cyclisierung erfolgt. Die Biosynthese des 3-Amino-4,7-dihydroxycumarins könnte also nach stereospezifischer Einführung einer β -Hydroxyl-Gruppe über Oxidation und oxidative Cyclisierung ablaufen. *NovI* stellt einen möglichen Kandidaten für die besagte β -Hydroxylierungsreaktion dar. Bakterielle Cytochrom P450-Enzyme der Klasse I nutzen zwei weitere Komponenten für den Elektronen-Transport während der Monooxygenase-Reaktion: eine FAD-abhängige Reduktase, die die Elektronen vom NAD(P)H empfängt und ein Eisen-Schwefel-Ferredoxin, welches die Elektronen weiter von der Reduktase zum Substratbindenden Cytochrom P450 überträgt (Munro und Lindsay, 1996). Unmittelbar stromabwärts von *novI* wurden zwei Gene, *novJ* und *novK*, mit Homologien zu 3-Ketoacyl-[Acyl-Carrier-Protein]-Reduktasen gefunden; ein für Ferredoxin codierendes Gen konnte nicht innerhalb

des sequenzierten Bereiches detektiert werden. Möglicherweise können beide Komponenten durch andere Redoxsysteme ersetzt werden (O'Keefe and Harder, 1991). Erkenntnisse durch Inaktivierungsexperimente sowie ein biochemischer Nachweis der Hydroxylierungsreaktion könnten zur weiteren Klärung der postulierten Reaktionsfolge beitragen.

novJ und novK:

Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz von *novJ* (789 bp) codiert für ein 262 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 26,8 kDa, die von *novK* (735 bp) für ein 244 Aminosäuren langes Protein der Molmasse 25,6 kDa. *novK* ist unmittelbar hinter *novJ* lokalisiert, wobei das Startcodon von *novK* teilweise mit dem Stopcodon von *novJ* überlappt. Beide abgeleiteten Genprodukte weisen Homologien zu 3-Ketoacyl-[Acyl-Carrier-Protein]-Reduktasen der Fettsäure-Biosynthese auf, welche die Reduktion des über einen Phosphopantethein-Cofaktor an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebundenen Ketoacyl-Restes zum entsprechenden Hydroxyacyl-ACP katalysieren. 46 % der Aminosäuren von NovJ sind identisch zu FabG aus *Vibrio harveyi* (Shen und Byers, 1996). Vergleichsweise geringere Homologien wurden für NovK zum entsprechenden Enzym in *Streptomyces coelicolor* A3(2) mit 38 % Identität (Redenbach et al. 1996) gefunden. NovJ und NovK sind zu 35 % identisch. Das konservierte Motiv GxxxGxG (x=variable Aminosäure) der NAD(P)⁺/NAD(P)H-Bindungsstelle (Jörnvall et al. 1995) innerhalb der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (short-chain dehydrogenases/reductases, SDR) tritt auch in der Sequenz der abgeleiteten Genprodukte auf.

Die Biosynthese der Aminocumarin-Einheit (Ring B) erfolgt wie schon beschrieben ausgehend von Tyrosin, und das gegenwärtig postulierte Biosyntheschema umfaßt die Aktivierung des Tyrosins mit anschließender Hydroxylierung an C-3, Oxidation, sowie eine oxidative Cyclisierung (siehe auch *novI*). Demzufolge könnten die beiden letzten Reaktionsschritte durch die Genprodukte von *novJ* und *novK* katalysiert werden, zumal ähnliche Gene mit mehr als 90 % Identität auf Nukleotidebene sich auch im Coumerymycin A1-Biosynthesecluster befinden (persönliche Mitteilung, Z. Wang). Die Hypothese bedarf weiterer experimenteller Bestätigung wie z.B. durch entsprechende Inaktivierungsexperimente oder durch Identifizierung der jeweiligen Intermediate beim funktionellen Aktivitätsnachweis.

2.2.2.4 Methyltransferasen

In Fütterungsexperimenten mit L-[¹⁴C]-Methionin an *Streptomyces niveus* konnte eine 10 % ige Einbaurate ins Novobiocin-Gerüst beobachtet werden, wobei eine gleichmäßige Verteilung des Isotopes zwischen der Methylgruppe an C-8' der Aminocumarin-Einheit und der Methylgruppen an C-4 und C-5 der Noviose festgestellt wurde (Birch et al. 1960). Innerhalb des Cosmids 9-6G konnten 3 ORFs (*novO*, *novP* und *novU*) mit Homologien zu S-Adenosyl-Methionin (SAM)-abhängigen Methyltransferasen detektiert werden, deren Beteiligung innerhalb der Novobiocin-Biosynthese in Frage kommen könnte. Sowohl NovP als auch NovO wiesen Regionen mit Ähnlichkeiten zu dem an der SAM-Bindung beteiligten

konservierten Motiv hh(D/E)hGxGxG (h = hydrophobe Aminosäure, x = variable Aminosäure) (Kagan und Clarke, 1994) auf. Beide Gene sind nebeneinander lokalisiert.

novU:

Der ehemals als *nov7* bezeichnete ORF wurde durch Agnes Mühlenweg sequenziert (Mühlenweg, 1999). Die vom 1263 bp langen ORF *novU* abgeleitete Aminosäuresequenz (420 Aminosäuren, theoretisches Molekulargewicht 45,96 kDa) zeigte signifikante Homologien (36 % Identität) zu einer dNDP-Hexose-3-C-Methyltransferase (TylCIII) aus dem Tylosin-Produzenten *S. fradiae* (Bate et al. 2000). Des Weiteren fanden sich 36 % Identität zu der an der Mycarose-Biosynthese beteiligten 3-C-Methyltransferase EryBIII aus *Saccharopolyspora erythraea* (Haydock et al. 1991; Gaisser et al. 1998), deren Funktionalität durch Punktmutagenese demonstriert werden konnte. Außerdem wurden jedoch auch 34 % Identität von NovU zu einer putativen Hydroxylase aus dem Vancomycin-Biosynthese-Cluster aus *Amycolatopsis orientalis* (van Wageningen et al. 1998) registriert. Durch Inaktivierungsexperimente könnten Hinweise für eine C-Methylierung an Position 5 der Noviose geliefert werden.

novO:

Ebenso konnten für das vom 693 bp langen *novO* codierte 230 Aminosäuren lange Genprodukt (berechnetes Molekulargewicht 25,4 kDa) Homologien zu C-Methyltransferasen beobachtet werden. Es wurden 27 % Identität zum Genprodukt von *ImbW*, einer putativen Methyltransferase aus dem Lincomycin-Produzenten *Streptomyces lincolnensis* (Peschke et al. 1995) verzeichnet. NovO könnte die C-Methylierung von Ring B katalysieren.

novP:

Datenbankrecherchen ergaben Homologien zu O-Methyltransferasen für die von *novP* (789 bp) abgeleitete Aminosäuresequenz (262 Aminosäuren, theoretische Molmasse 29,9 kDa). Somit könnte NovP in die O-Methylierung der Noviose an C-4 involviert sein. Die Genprodukte von *mycF* aus *Micromonospora griseorubida* (Inouye et al. 1994) und von *tylF* aus *Streptomyces fradiae* (Fouces et al. 1999) besaßen die höchsten Homologien zu NovP (53 und 49 % Identität). Die von beiden Streptomyceten gebildeten Makrolide enthalten den O-methylierten Zucker Mycinose. Für MycF konnte die Mycinamycin III-O-Methyltransferase-Aktivität nach heterologer Expression in *E. coli* funktionell nachgewiesen werden. Ebenso wie im MycF-Protein ist das zentrale Glycin innerhalb des SAM-Bindungsstellen-Motives (VLE/DxGxGxG, x = variable Aminosäure) durch Tryptophan ersetzt.

2.2.2.5 Carbamoyltransferase

Eine Vielzahl verschiedener Antibiotika und anderer Metabolite des Sekundärstoffwechsels enthalten Carbamoyl-Gruppen, deren Transfer durch Carbamoyltransferasen katalysiert wird. Intensive Untersuchungen auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene wurden für die in der Cephamycin-Biosynthese beteiligte 3'-Hydroxymethylcephem-O-Carbamoyltransferase aus *Nocardia lactamdurans* und *Streptomyces clavuligerus* (Coque et al. 1995) durchgeführt. Das entsprechende Strukturgen *cmcH* wurde kloniert, und die Expression in *Streptomyces lividans* führte zum funktionellen Nachweis der Enzymaktivität.

Die vom 2034 bp großen ORF *novN* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte 29 % Identität zu *CmcH*. Ebenso wie *CmcH* wies *NovN* Homologien zu O-Carbamoyltransferasen aus *Rhizobium* sp. (Freiberg et al. 1997) und *Bradyrhizobium japonicum* (Luka et al. 1993) auf (45 % und 33 % Identität), welche in die Biosynthese von carbamoylierten Lipo-Oligosaccharid-Nodulations-Faktoren involviert sind. Außerdem wurden 36 % Identität zur Carbamoyltransferase *MmcS* aus dem Mitomycin C-Produzenten *Streptomyces lavendulae* gefunden (Mao et al. 1999). Die Ergebnisse des Homologievergleiches sprechen dafür, daß *NovN* die O-Carbamoylierung des 6-Desoxyzuckers an Position C-3 katalysieren könnte. Die Carbamoylgruppe der Noviose stammt nachweislich aus CO₂ (Kominek, 1972), wobei vermutlich Carbamoylphosphat als Carbamoylgruppen-Donor fungiert.

2.2.2.6 Adenylat-bildende Enzyme

Durch Auswertung der Sequenzdaten konnten 2 Gene mit Homologien zu Vertretern der Adenylat-bildenden Enzyme gefunden werden (Turgay et al. 1992).

novH:

Der 1803 bp lange ORF *novH* (Startcodon: TTG) codiert für ein 600 Aminosäuren langes Genprodukt mit einem berechneten Molekulargewicht von 63,5 kDa und zeigte signifikante Homologien zu nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen. So wurden 46 % identische Aminosäuren zu PCZA361.18 aus *Amycolatopsis orientalis* (van Wageningen et al. 1998), 27 % Identität zur Tyrocidin-Synthetase aus *Bacillus brevis* (Mootz und Marahiel, 1997) und 26 % Identität zur Gramacidin S-Synthetase I aus *Bacillus cereus* (Krätzschar et al. 1989) festgestellt. Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen gehören wie 4-Coumarat:CoA-Ligasen, Acetyl-CoA-Ligasen, CoA-Synthetasen der längerkettigen Fettsäuresynthese und Luciferasen zur Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme, deren Gemeinsamkeit sich in der enzymatischen Aktivierung des Acyl-Substrates in Form eines Acyl-Adenylates äußert (Trugay et al. 1992). Die meist modular aufgebauten nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen besitzen ebenso wie alle anderen Vertreter dieser Superfamilie ein Adenylierungsmodul mit mehreren hochkonservierten Motiven, denen bestimmte Funktionen während der Adenylat-Bildung, wie zum Beispiel Nukleotid-Bindung (Abb. 16, Motive A5 und A7), Pyrophosphat-Freigabe (Abb. 16, Motive A3 und A8) und Adenylierung der Carboxylgruppe (Motiv A10, Abb. 16), zugewiesen werden konnten (Marahiel et al. 1997, Stuitable et al. 2000). Den Motiven A1 und A2 wird eher eine strukturelle Funktion zugeschrieben; beide sind weit vom

aktiven Zentrum entfernt. Eine Substratbindungsfunktion wurde für Motiv A4 beschrieben. Die Rolle von Motiv A6 ist bisher nicht geklärt. Im Gegensatz zu den genannten Vertretern sind nicht-ribosomale Peptidsynthetasen zu einer kovalenten Bindung des aktivierten Substrates in Form eines Thioesters über einen kovalent gebundenen 4'-Phosphopantethein-Cofaktor befähigt. Innerhalb der von *novH* abgeleiteten Aminosäure-Sequenz konnten 8 konservierte Motive des Adenylierungsmoduls und die hoch konservierte 4'-Phosphopantetheinyl-Bindungsstelle (T-Motiv: LGxH/DSL, x = beliebige Aminosäure) gefunden werden. Die detektierten Motive innerhalb von NovH sind im Alignment mit anderen nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen in Abb. 16 dargestellt.

Eine Vielzahl von Peptidantibiotika und anderer Substanzen bakteriellen und fungalen Ursprungs werden unter Katalyse von multifunktionellen Enzymkomplexen gemäß dem Thiotemplate-Mechanismus (Stachelhaus und Marahiel, 1995) gebildet. Dabei beschränkt sich die Substratspezifität nicht auf die in der ribosomalen, Nukleinsäure-abhängigen Protein-Biosynthese genutzten 21 proteinogenen Aminosäuren, sondern diverse Gruppen verschiedenster Substanzen (modifizierte proteinogene Aminosäuren, nicht-proteinogene Aminosäuren, Carbonsäuren, Amine) können verknüpft werden. Unter diesem Gesichtspunkt war die Beteiligung einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase an der Bildung der Amidbindung zwischen den Tyrosin-Derivaten Ring A und Ring B des Novobiocins denkbar, zumal die ATP-Abhängigkeit der Reaktion schon in Rohextrakt von *S. spheroides* nachgewiesen worden war (Kominek und Meyer, 1975). Die mögliche Rolle von NovH innerhalb der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion wird ausführlich in Abschnitt 4.1 beschrieben.

Enzym	Amino- säure	Sequenz	Amino- säure	Sequenz	Amino- säure	Sequenz
Motiv		A1		A2		A3
NovH	47	LSYDEVNARA	87	SVLAVAKAGAVFLPLDYNHP	170	AAFDLAYVIYTSGSGTRPKG
GRSA	65	LYHEENVKA	105	GILAVLKAGGAYVPIDIEYP	180	.STDLAYVIYTSGTTGNPKG
PCZA361.18	35	LYAEENGEA	75	AILAVHKAGAAVVPDIDYYP	148	LPDHPAYVIYTSGSGTGPKG
SpsnbDE	491	LYAEENARA	531	ALLAVLKAGGAYLPVDIAYP	1646	LPAPHPAYVIYTSGSGTAPKG
TycA	53	LSYQELNRKA	93	AILAVLKAGGAYVPIDIEYP	168	.PTDLAYVIYTSGITGKPKG
SvsnbDE	93	VDYADLNARA	133	AVLAVLKAGGAYLPIDPEYP	1260	HPLHPAYVIYTSGSGTGLPKG
Consensus		lTY-eLN--A		a-LAV-K-G-aylPiD--yP		----LAYVIYTSGSgTG-PGK
Enzym	Amino- säure	Sequenz	Amino- säure	Sequenz	Amino- säure	Sequenz
Motiv		A4		A5		A6
NovH	222	EGFDAY	308	LINAYGPTEC	355	APGEI GELYLSGAGLACGYL
GRSA	232	ISFDAS	319	YINAYGPTET	368	SVGEAGELCIGGGLARGYV
PCZA361.18	200	ESFDAA	288	MINAYGPTEA	335	PDGDV GELYMTCEGLARGYL
SpsnbDE	1698	ISFDAA	1785	MVNAYGLTET	1832	PPGVT GEMVYSGAGVARGYL
TycA	220	MSFDAS	307	YINAYGPTET	357	PTGSE GELCIGGVGLARGYV
SvsnbDE	1312	ISFDAA	1399	MTNAYGPTEA	1446	PPGVV GELYLAGGGLARGYR
Consensus		--FDAa-		--NAYGPTE-		p-G--GEL-i-G-GLArgYL
Enzym	Amino- säure	Sequenz	Amino- säure	Sequenz		
Motiv		A7		A8		
NovH	391	ADGERMYRTGDL	411	ILFHGRIDDOVELRGFVELGEVESVLSQH		
GRSA	403	-PGEKLYKTGDQ	423	IEYLGRIDNOVKIRGHRVELGEVESTLLKH		
PCZA361.18	371	GGGERMYRTGDR	391	LVFVGRVDDOLKVRGHRTEPGEVESALLAV		
SpsnbDE	1872	ETGIRMYRTGDL	1892	LHFAGRADOOVKIRGFRTEPGETETVLTAE		
TycA	392	-PGEKMYRTGDL	412	IEFLGRIDHOVKIRGHRTELGETESVLLAE		
SvsnbDE	1482	TPCARMYRTGDL	1502	LEFAGRIDHOVKIRGFRTEPGEVEAALAEH		
Consensus		--GermYrTGDL		--f-GR-D-QvkiRG-RiElgEve----h		
Enzym	Amino- säure	Sequenz				
Motiv		T				
NovH	548	LDVRSNFFEM GGNSILAVDL				
GRSA	560	IGIKDNFYAL GGDSIKAIQV				
PCZA361.18	526	VGVDDSFEDI GGHSLLATRL				
SpsnbDE	4526	VGTDDNFEL GGHSMLATRL				
TycA	550	IGIRDNFYSL GGDSICAIQV				
SvsnbDE	587	VGIHEDFFDL GGHSLLATRL				
Consensus		-g--d-Ff-l GGHSi-A---				

Abb. 16: Vergleich der konservierten Motive von NovH aus *S. spheroides* NCIMB 11891 mit nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen. GRSA (Gramicidin S-Synthetase) aus *Bacillus cereus* (Krättschmar et al. 1989), PCA136.18 (Peptidsynthetase) aus *Amycolatopsis orientalis* (van Wageningen et al. 1998), SpsnbDE (Pristinamycin I Synthetase) aus *Streptomyces pristinaespiralis* (De Crécy-Lagard, 1997a), TycA (Tyrocidin-Synthetase) aus *Bacillus brevis* (Mootz und Marahiel, 1997), SvsnbDE (Virginamycin S Synthetase) aus *Streptomyces virginiae* (De Crécy-Lagard, 1997b). Die Motive A1 bis A8 stellen konservierte Bereiche der Adenylierungsdomäne, Motiv T die 4'-Phosphopantethein-Bindungsstelle dar.

novL:

Der 1584 bp lange ORF *novL* beginnt 7 bp hinter *novK* (Startcodon: GTG) und zeigte einen für Streptomyceten typischen GC-Gehalt von 70,1 %. Auch das von *novL* abgeleitete 527 Aminosäuren lange Produkt wies wie NovH Homologien zur Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme auf, allerdings vorwiegend zu 4-Coumarat:CoA-Ligasen und Acyl-CoA-Ligasen. Höchste Homologien wurden mit 41 % Identität zu einer putativen Acyl-CoA-Ligase aus *Streptomyces coelicolor* (Redenbach et al. 1996) und mit 35 % Identität zu einer 4-Coumarat:CoA-Ligase aus *Oryza sativa* (Zhao et al. 1990) registriert. In Abb. 17 ist ein Sequenzvergleich von NovL mit konservierten Bereichen verschiedener Acyl-CoA-Ligasen und 4-Coumarat:CoA Ligasen dargestellt, welche in die Adenylierung involviert sind. Insbesondere die Motive Box I (SSGTTGxPKG_V, x = variable Aminosäure) und Box II (GEICIRG) sind bei 4-Coumarat:CoA Ligasen hoch konserviert (Stuible et al. 2000) und ähneln den in Peptidsynthetasen auftretenden Motiven A3 beziehungsweise A6. Die Peptidsynthetase-Motive A8 (GRxDxQVKIRGxRIELGEIE) und A10 (NGK(VL)DR) sind charakteristisch für alle Adenylat-bildenden Enzyme. Kürzlich konnte durch Mutationsanalyse bestätigt werden, daß der konservierte Lysin-Rest aus Motiv Box I und der Arginin-Rest aus Motiv A8 kooperativ die Pyrophosphat-Freigabe bei der Adenylat-Bildung koordinieren (Stuible et al. 2000). Der Lysin-Rest innerhalb von Motiv A10 interagiert sowohl mit der Carboxylgruppe des zu adenylierenden Substrates als auch mit den O-4' und O-5'-Atomen der Ribose des Nukleotids (Marahiel et al. 1997). Für das zentrale Cystein aus Box I wurde eine Beteiligung an der Thiolbildung bei 4-Coumarat:CoA-Ligasen diskutiert (Becker-André et al. 1991). Seine hypothetische funktionelle Bedeutung konnte jedoch durch Mutationsanalysen widerlegt werden (Stuible et al. 2000). Im Gegensatz zu Peptidsynthetasen und NovH wurde in NovL keine 4'-Phosphopantethein-Bindungsstelle (T-Motiv LGx(HD)SL, x = beliebige Aminosäure) gefunden.

Auch für NovL wurde eine mögliche Beteiligung innerhalb der ATP-abhängigen Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion untersucht. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 4.1 dargestellt.

Enzym	Amino- säure	Sequenz	Amino- säure	Sequenz
NovL	181	SGTTGQPKGV	364	GEVVVHG
SCE36.03	180	GTTGIPKGI	366	GEVLVRS
MtFadD8	220	GTTGKPKGV	406	GEICVSG
MTH657	198	SGTTGFPGV	389	GEICCRG
DR1692	228	GTTGVPKGA	418	GELWVAG
4CLORYSA	210	SGTTGLPKGV	406	GEICIRG
At4CL2	204	SGTTGLPKGV	400	GEICIRG
4CL1	195	SGTTGLPKGV	391	GEICIRG
Pt4CL1	186	SGTTGLPKGV	382	GEICIRG
4CL2	193	SGTTGLPKGV	389	GEICIRG
Motiv		Box I		Box II
NovL	411	GRMREVVKVQDTRVSPTEVE	500	NTGKVNRLRV
SCE36.03	413	DRIKEMIVVGGHVYPAELE	502	AVGKPKRRL
MtFadD8	453	DRVKDMIVTGGFNVPREVE	549	GLGKPKKAV
MTH657	436	GRIKDMIIRGGENIYPREIE	525	ASGKVQKFKL
DR1692	469	DRKKELI IAGGHNIYPREVE	558	AVGKTLRRQL
4CLORYSA	454	DRLKEI I KYRGFQVAPAELE	540	PSGKILRKEL
At4CL2	448	DRLKELI KYKGFQVAPAELE	537	PSGKILRKDL
4CL1	439	DRLKELI KYKGFQVAPAEIE	528	PSGKILRKDL
Pt4CL1	430	DRLKELI KYKGFQVAPTELE	519	PSGKILRKNL
4CL2	437	DRLKELI KYKGFQVAPAELE	526	PSGKILRKDL
Motiv		A8		A10

Abb. 17: Aminosäure-Sequenzvergleich von NovL mit konservierten Bereichen von Acyl-CoA-Ligasen und 4-Coumarat:CoA-Ligasen. Acyl-CoA-Ligasen: SCE36.03, *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Redenbach et al. 1996); MtFadD8, *Mycobacterium tuberculosis* (Cole et al. 1998); DR1692, *Deinococcus radiodurans* (White et al. 1999). 4-Coumarat:CoA-Ligasen: 4CLORYSA, *Oryza sativa* (Zhao et al. 1990); At4CL2, *Arabidopsis thaliana* (Ehling et al. 1999); 4CL1, *Nicotiana tabacum* (Lee und Douglas, 1996); Pt4CL1, *Populus tremuloides* (Hu et al. 1998); 4CL2, *Solanum tuberosum* (Becker-André et al. 1991).

2.2.2.7 ABC-Transporter

Innerhalb des untersuchten Bereiches konnten mehrere offene Leserahmen detektiert werden, deren Genprodukte Bestandteile von ABC-Transportern (ABC= ATP-Binding Casette) darstellen (Schneider und Hunke, 1998). ABC-Transporter repräsentieren eine vielgestaltige Klasse von Membrantransportproteinen, welche die Translokation von Substanzen durch die Membran mit der durch ATP-Hydrolyse gewonnenen Energie koppeln. Typischerweise sind ABC-Transporter aus charakteristischen Teilbereichen aufgebaut: sie enthalten hydrophobe, membran-integrale und hydrophile, ATP-hydrolysierende Domänen, welche auf einem einzigen Polypeptid oder auf verschiedenen Untereinheiten lokalisiert sein können. Die ATP-Bindedomänen weisen 2 charakteristische Motive auf, Walker A Motiv (GxxGxGKS/T, x = variable Aminosäure) und Walker B Motiv (hhhhDEAT, h = hydrophobe Aminosäure), die an der Nukleotid-Bindung beteiligt sind. Insgesamt konnten wahrscheinlich 4 ABC-Transporter identifiziert werden.

orf10 und orf11:

orf10 (1863 bp) und *orf11* (1788 bp) codieren für 620 beziehungsweise 595 Aminosäure große Proteine, die Ähnlichkeiten zu den Transporterproteinen StrV beziehungsweise StrW (19 % bzw. 28 % Identität) aus dem 5'-Hydroxy-Streptomycin-Biosynthesecusters aus *Streptomyces glaucescens* und *S. griseus* aufweisen (Beyer et al. 1996). Die Funktion dieses vermutlich als Heterodimer vorliegenden Transporters wurde im Export Streptomycin-ähnlicher Aminoglykoside vermutet, wobei jedoch keine Resistenz-vermittelnden Eigenschaften festgestellt werden konnten. Eine ähnliche Funktion im Novobiocin-Biosynthese-Cluster bedarf weiterer experimenteller Bestätigung.

novA:

Der 1908 bp große ORF *novA* konnte ebenfalls anhand der detektierten Walker A und B Motive als ABC-Transporter identifiziert werden. Das 635 Aminosäuren große Genprodukt zeigte hohe Homologien zu multidrug-resistance (MDR)-Transportern wie etwa dem im Vancomycin-Biosynthese-Cluster aus *Amycolatopsis orientalis* befindlichen *orf2* (42 % Identität) (van Wageningen et al. 1998). Im N-terminalen Bereich von NovA sind im Kyte-Doolittle-Hydrophobizitäts-Blot (Abb. 18) hydrophobe Bereiche erkennbar, die auf das Vorliegen einer Transmembran-Domäne hinweisen. Die mögliche Beteiligung von NovA an einem durch aktiven Antibiotika-Export vermittelten Resistenzmechanismus müsste auch hier durch weitere experimentelle Ergebnisse belegt werden.

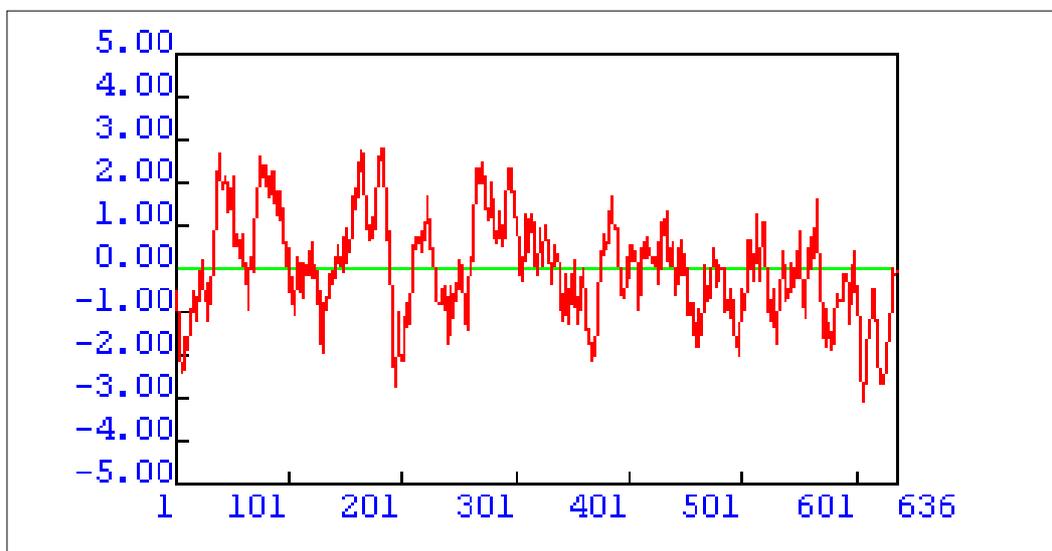


Abb. 18: Hydrophobizitäts-Blot nach Kyte-Doolittle von NovA. Der Hydrophobizitätsblot wurde mit Hilfe des Programms WDNASIS Version 2.1 erstellt. Positive Werte der Ordinate repräsentieren hydrophobe, negative Werte hydrophile Bereiche.

orf4, orf5 und orf6:

Homologievergleiche auf Proteinebene ergaben Hinweise für das Vorliegen eines Peptid-Transporters (siehe auch Tab. 34). Es konnten Homologien zu Di- und Oligopeptid-Transportern aus *E. coli* (Abouhamad und Manson, 1994), *Streptococcus pneumoniae* (Alloing et al. 1990) und *Bacillus subtilis* (Perego et al. 1991) gefunden werden. Bei Orf5 und Orf6 handelt es sich vermutlich um ATP-Bindeproteine (27,4 % Identität zwischen Orf5 und OPPD aus *Bacillus subtilis*; 30,4 % Identität von Orf6 zu DPPF aus *E. coli*). Für Orf4 wurden mit 25 % Identität etwas geringere Homologien zu OPPA aus *B. subtilis* festgestellt, einem Substrat-Bindeprotein des Oligopeptid-Transporters, welches vermutlich als initialer Rezeptor des Oligopeptid-Substrates fungiert. Die erwähnten Operons der Peptid-Transporter enthalten gewöhnlich noch zwei weitere Gene, deren Produkte hydrophobe Transmembranproteine darstellen. Entsprechend deren Lokalisation innerhalb der *opp*-Operons könnten sich vergleichbare Gene in *S. spheroides* zwischen *orf4* und *orf5* befinden. Ein Bereich von etwa 3,4 kb wurde dort noch nicht sequenziert (siehe Abb. 15).

orf1, orf2 und orf3:

Diese unmittelbar stromabwärts von *orf4* bis *orf6* befindlichen Gene (s. Abb. 15) könnten aufgrund ihrer Homologien zur Gruppe der Zucker-Transporter zugeordnet werden. Orf1, Orf2 und Orf3 weisen Homologien zu CBP, CEBF und CEBG (Identität 28 %, 38 % und 39%) aus dem *ceb*-Operon aus *Streptomyces reticuli* (Schlösser et al. 1999) auf, einem induzierbaren ATP-abhängigen Cellobiose- und Cellotriose-Aufnahmesystem. CBP codiert für das Cellobiose-Bindeprotein, ein in der Cytoplasmamembran verankertes Lipoprotein, das für die Substratspezifität des Transporters verantwortlich ist. CebF und CebG codieren jeweils für integrale Membranproteine.

2.2.2.8 Proteine mit regulatorischer Funktion

Innerhalb des sequenzierten Bereiches konnten vier offene Leserahmen mit Homologien zu regulatorisch wirksamen Proteinen gefunden werden. Ihre mögliche regulatorische Beteiligung an der Transkription von Novobiocin-Biosynthese-Genen bedarf eingehender weiterer Untersuchungen, wie zum Beispiel Operatorbindungsstudien. DNA-bindende Regulatorproteine liegen in ihrer aktiven Form meist als Dimer vor und zeichnen sich durch ein charakteristisches Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv aus. Zwei α -helicale Bereiche sind pro Untereinheit des Dimers direkt an der DNA-Bindung beteiligt: ein α -helicaler Abschnitt liegt in der großen Rinne der DNA, der andere liegt quer darüber (Pabo und Sauer, 1984). Dieses HTH-Motiv Ax_3Gx_5V/I (x = beliebige Aminosäure) kam in allen im folgenden beschriebenen Regulator-Proteinen vor.

orf14:

orf14 (1041 bp, Genprodukt: 346 Aminosäuren, theoretisches Molekulargewicht 37,2 kDa) wies auf Proteinebene signifikante Homologien zu putativen Transkriptions-Regulatoren aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) auf (70 % identische Aminosäuren zum Genprodukt von SCF51A.11) (Redenbach et al. 1996). Mit 32 % Identität wurden auch Homologien zum Biolaphos-Biosynthese-Regulator-Protein BrpA aus *Streptomyces hygroscopicus* (Raibaud et al. 1991) detektiert. Das für die Subfamilie der transkriptionalen Aktivatorproteine charakteristische Helix-Turn-Helix-Motiv Ax₃Gx₅V (Pabo und Sauer, 1984) konnte im C-terminalen Bereich von Orf14 detektiert werden.

nov20:

Auch für das 156 Aminosäuren große Produkt des Gens *nov20* (471 bp) konnten Homologien zu möglichen Transkriptions-Regulatoren aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Redenbach et al. 1996) verzeichnet werden (Identität 38 %), allerdings zum Repressor-Homologon MarR. *marR* ist Bestandteil des *mar*-Lokus in *E.coli*, einem regulatorischen, chromosomalen Bereich, der die Ausbildung multipler Antibiotika-Resistenz kontrolliert (Cohen et al. 1993). Das davon abgeleitete Protein MarR fungiert dabei als Repressor des Operons, dessen Transkription durch verschiedene Antibiotika induziert werden kann.

novG und orf13:

Der mit einem Abstand von 196 bp vor dem Gen *novH* befindliche ORF *novG* ist 957 bp lang und codiert für ein 318 Aminosäure großes Protein (M_r 34,3 kDa), das 46 % Identität zum positiven Regulator StrR der Streptomycin-Biosynthese in *Streptomyces griseus* hat (Distler et al. 1987). StrR ist Bestandteil einer A-Faktor-abhängigen, regulatorischen Signal-Transduktions-Kaskade. Der A-Faktor (2-Isocapryloyl-3R-hydroxymethyl-γ-butyrolacton) löst dabei die Streptomycin-Biosynthese aus, indem er an den Repressor ArpA bindet. ArpA wiederum bindet an die Promotor-Region des Transkriptions-Aktivators AdpA, dessen Vorhandensein Voraussetzung für die Transkription von StrR ist. StrR aktiviert letztendlich die Expression verschiedener Streptomycin-Biosynthese-Gene, indem es an multiple, definierte DNA-Bindestellen (inverted repeats) bindet (Retzlaff und Distler, 1995). Das typische Helix-turn-Helix-Motiv DNA-bindender Enzyme Ax₃Gx₅V konnte innerhalb der Sequenz von StrR und auch von NovG gefunden werden.

Unmittelbar stromaufwärts von *orf7* ist wahrscheinlich ein weiterer Regulator lokalisiert, der durch das Gen *orf13* (956 bp) codiert wird und Homologien zum Transkriptions-Aktivator AdpA aus *Streptomyces griseus* aufweist (41 % Identität) (Ohnishi et al. 1999).

Ob NovG und Orf13 eine analoge regulatorische Funktion innerhalb des Novobiocin-Biosynthese-Clusters aufweisen, müsste im weiteren verifiziert werden.

2.2.2.9 Resistenzgen *gyrB^R*

Das für die Novobiocin-resistente B-Untereinheit der Gyrase codierende Gen *gyrB^R* (2033 bp, 678 Aminosäuren, M_r 74,4 kDa) wurde während anfänglicher Randomsequenzierungsarbeiten innerhalb dieser Arbeit zwecks Identifizierung des Novobiocin-Biosyntheseclusters detektiert und ansequenziert. Eine doppelsträngige Sequenzierung des *gyrB^R*-Gens wurde in der Dissertationsarbeit von A. Mühlenweg (1999) durchgeführt. Es zeigten sich prägnante Sequenzunterschiede zu der von Thiara und Cundliffe (1993) veröffentlichten Sequenz (lediglich 79 % Identität). Deshalb wurde das in dieser Arbeitsgruppe sequenzierte Gen als *ngyrB^R* bezeichnet.

2.2.2.10 Weitere Proteine mit unbekannter Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese

Den im folgenden besprochenen Genen konnte auf der Basis von Sequenzvergleichen keine eindeutige Funktion zugeordnet werden, oder ihre mögliche Beteiligung innerhalb der Novobiocin-Biosynthese war nicht offensichtlich.

orf15, orf17, orf18, novD und *novQ*:

Für die offenen Leserahmen *orf15, orf17, orf18, novD* und *novQ* (siehe auch Tab. 34) ergaben Datenbankrecherchen keine auffälligen Homologien zu bereits bekannten Proteinen beziehungsweise Homologien zu Proteinen mit unbekannter Funktion.

Für die von *orf16* (1143 bp) abgeleitete Aminosäuresequenz (380 Aminosäuren) wurden Homologien zu einer möglichen Helicase aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Redenbach et al. 1996) mit einer Identität von 22 % festgestellt.

orf9:

Das vom 3885 bp großen *orf9* abgeleitete Genprodukt (1294 Aminosäuren, M_r 135,6 kDa) wies ausgeprägte Homologien zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen auf. Dabei wurden 38 % identische Aminosäuren zu der membranverankerten Protease SAM-P45 aus *Streptomyces albogriseolus* (Suzuki et al. 1997) festgestellt, deren Funktion innerhalb morphologischer Differenzierungsprozesse diskutiert wurde.

novB:

Das von *novB* abgeleitete 284 Aminosäuren große Produkt weist Homologien zu Aminodesoxychorismat (ADC)-Lyasen aus der *p*-Aminobenzoat-Biosynthese von *Mycobacterium tuberculosis* (Cole et al. 1998) (34 % Identität) und *Helicobacter pylori* (Tomb et al. 1997) (31 % Identität) auf. Dieses Pyridoxalphosphat-abhängige Enzym katalysiert die Bildung von *p*-Aminobenzoat und Pyruvat aus 4-Amino-4-desoxychorismat. Es bleibt zu klären, ob NovB eine Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese hat oder ein Primärstoffwechsellenzym darstellt.

novE:

Der offene Leserahmen *novE* ist 654 bp lang und codiert für ein 217 Aminosäuren großes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 34,4 kDa. Im Sequenzvergleich zeigten sich lediglich Homologien zu LmbU, einem Protein aus dem Lincomycin-Biosynthese-Cluster von *Streptomyces lincolnensis* 78-11 (Peschke et al. 1995) mit unbekannter Funktion. Da dieses Gen auch im Coumermycin A1-Cluster detektiert wurde (*cum28*), ist eine Funktion innerhalb der Aminocumarin-Biosynthese wahrscheinlich.

novR:

novR (813 bp, Genprodukt: 270 Aminosäuren, theoretisches Molekulargewicht: 29,9 kDa) zeigte im Homologievergleich eine 48 % ige Identität zu einer putativen Aldolase aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Redenbach et al. 1996). Die Beteiligung einer Aldolase innerhalb der Novobiocin-Biosynthese wäre bei der Tyrosin-Seitenkettenverkürzung während der Ring A-Bildung denkbar. Nach Prenylierung des 4HPP könnte die Abspaltung der C2-Einheit in Form einer Retroaldol-Reaktion erfolgen, welche durch NovR katalysiert werden könnte.

orf7:

Das 333 Aminosäuren lange Genprodukt von *orf7* (999 bp, theoretisches Molekulargewicht 35,3 kDa) konnte über Sequenzvergleich eindeutig als Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) identifiziert werden. Mit 86 % Identität wurden höchste Homologien zur GAPDH aus *Streptomyces aureofaciens* (Kormanec et al. 1995) gefunden.

2.2.2.11 Begrenzung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters

Die im Bereich stromabwärts des Novobiocin-Resistenzgens *ngyrB^R* detektierten Gene weisen Homologien zu Primärstoffwechsellenzymen auf, die vermutlich nicht mehr zum Novobiocin-Biosynthese-Cluster gehören. Neben den erwähnten Zucker- und Peptidtransportern (*orf1* bis *orf6*) konnte das Genprodukt von *orf7* als Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) identifiziert werden. Unmittelbar stromaufwärts von *orf7* ist ein Regulator (*orf13*) lokalisiert, der möglicherweise Bestandteil eines Signal-Transduktions-Systems sein könnte (siehe Abb. 15 und 2.2.2.8). Das Resistenzgen *ngyrB^R* beziehungsweise das Regulator-Gen *orf13* repräsentiert möglicherweise das rechte Ende des Novobiocin-Biosynthese-Clusters.

Unklarer gestaltet sich die Situation hinsichtlich der linksseitigen Begrenzung des Clusters. Stromaufwärts des Peptidsynthetase-Homologons NovH sind neben putativ regulatorischen Genen und Oxidoreduktasen mehrere Gene lokalisiert, deren abgeleitete Produkte Ähnlichkeiten zu Proteinen unbekannter Funktion aufwiesen beziehungsweise keine signifikanten Homologien zu bekannten Enzymen erkennen ließen. In diesem Bereich ließen sich keine konkreten Zuordnungen hinsichtlich einer möglichen Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese machen. Die beiden dort befindlichen ABC-Transportersysteme (NovA und Orf10/Orf11) könnten unter Resistenz-vermittelnden Gesichtspunkten als Novobiocin-Exporter fungieren.

3 Identifizierung des 4HPP Dimethylallyltransferase-Gens

3.1 Entwicklung von Klonierungsstrategien

Nachdem die Cosmidbank von *S. spheroides* NCIMB hergestellt und ein Screening mit homologen dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gen-Sonden zur Detektion einer Gruppe von vier überlappenden Cosmiden führte, auf welchen auch das Novobiocin-Resistenzgen *ngyrB^R* lokalisiert war, lag die Vermutung nahe, daß dieser DNA-Bereich zumindest Teile des Novobiocin-Biosynthese-Clusters und damit möglicherweise das 4HPP Dimethylallyltransferase-Gen enthielt.

Eine eindeutige Identifizierung des 4HPP Dimethylallyltransferase-Gens durch Sequenzanalysen ist nicht zu erwarten, da aromatische Prenyltransferasen untereinander nur sehr geringe Homologien aufweisen. Die im folgenden beschriebenen Arbeiten wurden vor den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Sequenzarbeiten durchgeführt.

Eine Möglichkeit bei der Suche nach dem 4HPP Dimethylallyltransferase-Gen könnten Komplementationsexperimente mit Defektmutanten des Novobiocinproduzenten, die nicht mehr zur Biosynthese von Ring A befähigt sind, bieten. Das Verfahren der Komplementation von Defektmutanten durch Transformation mit Wildtyp-DNA-Bereichen führte beispielsweise bei der Identifizierung des für die aromatische 4HB-Polyprenyltransferase codierenden *ubiA*-Gens zum Erfolg (Siebert et al. 1992).

Im Zuge der durch Ritchie und seine Mitarbeiter durchgeführten funktionellen Untersuchungen zu Novobiocin-Resistenz-vermittelnden Sequenzen und zur Regulation der Resistenzinduktion an *Streptomyces niveus* (Mitchell et al. 1990; Hoggarth und Ritchie, 1995) wurden Novobiocin-defiziente Stämme durch ungerichtete N-Methyl-N'-nitro-nitrosoguanidin (MNNG)- Mutagenese hergestellt (Cushing, 1989; Hoggarth et al. 1995). Allerdings zeigte eine Charakterisierung der isolierten Mutanten, daß diese in 90 % aller Fälle eine Blockierung innerhalb der Ring B-Biosynthese aufwiesen bzw. die Fähigkeit zur Novobiocinsäure-Produktion gänzlich verloren hatten. Eine zwecks Klonierung des 4HPP Dimethylallyltransferase-Gens verwendbare Isolierung von Ring A-defizienten Mutanten wurde jedoch nicht erzielt.

Ein weiterer Ansatz stellt der funktionelle Nachweis der 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität nach Expression größerer Cosmidteilbereiche in einem geeigneten Wirt gleicher Gattung, der nicht die Fähigkeit zur Novobiocin-Produktion besitzt, dar. Diese Strategie bot sich in dieser Arbeit an, da die nötigen Kenntnisse und die experimentelle Methodik für einen biochemischen Nachweis der 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität aus den vorhergehenden Untersuchungen vorlagen beziehungsweise schon etabliert worden waren. Die Expressionsversuche wurden nach Klonierung von 9 bis 14 kb großen Cosmid-Fragmenten in den *E. coli*-Streptomyceten-Shuttle-Vektor pEM4 (Quirós et al. 1998) in *Streptomyces lividans* TK24 durchgeführt.

Parallel wurde versucht, eine Identifizierung des 4HPP Dimethylallyltransferase-Gens durch Screenen der Cosmide mit einer degenerierten Sonde zu erzielen, welche aus hoch konservierten Bereichen verschiedener Prenyltransferasen abgeleitet wurde.

Die in dieser Arbeit angewandten Klonierungsstrategien werden nachfolgend beschrieben.

3.2 Screening von heterolog exprimierten Cosmid-Subklonen nach 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität

3.2.1 Subklonierung

Zur Identifizierung des 4HPP Dimethylallyltransferase-Gens wurden 9 bis 14 kb große *EcoRI*-Fragmente aus den Cosmiden 9-6G und 10-9C, welche mit etwa 58 kb den gesamten Bereich aller detektierten Cosmide umfaßten, in den den *E.coli*-Streptomycesen-Shuttle-Vektor pEM4 (Quirós et al. 1998) kloniert (Durchführung durch S. Li). Bei diesem Vektor handelt es sich um ein vom Multi-Copy-Vektor pWHM4 (Vara et al. 1989) abgeleitetes Derivat, welches zusätzlich den *ermE* up Promotor des Erythromycin-Resistenzgens aus *Saccharopolyspora erythraea* (Bibb et al. 1985) enthält. Die erfolgreiche Expression unter der Kontrolle dieses starken konstitutiven Promotors wurde vielfach beschrieben (Bao et al. 1998; Tang et al. 1996). Da noch keine vollständigen Sequenzinformationen über die untersuchten Cosmide vorlagen und insofern Daten über die Orientierung einzelner Gene innerhalb der Fragmente und das Vorhandensein eigener Promotoren noch ausstanden, wurden die einzelnen *EcoRI*-Fragmente jeweils in beiden möglichen Orientierungen hinter den *ermE* up Promotor des Vektors kloniert. In Abb. 19 ist sowohl die ursprüngliche Lage der untersuchten *EcoRI*-Fragmente innerhalb der Cosmide, als auch die Umklonierungsstrategie der Expressionskonstrukte veranschaulicht. Die Umklonierungsarbeiten in den pEM4-Vektor wurden durch S.-M. Li durchgeführt. Für einen Teil der kleineren *EcoRI*-Fragmente (Subklone p9-6GE5, p9-6GE6 und p9-6GE7) lagen schon Sequenzdaten vor, und neben der Identifizierung des Resistenzgens *ngyrB^R* auf p9-6GE7 konnte einigen offenen Leserahmen über Sequenzvergleich eine putative Funktion innerhalb der Zucker-Biosynthese des Novobiocins zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurden diese Cosmid-Bereiche zunächst nicht in die Expressionsversuche mit einbezogen.

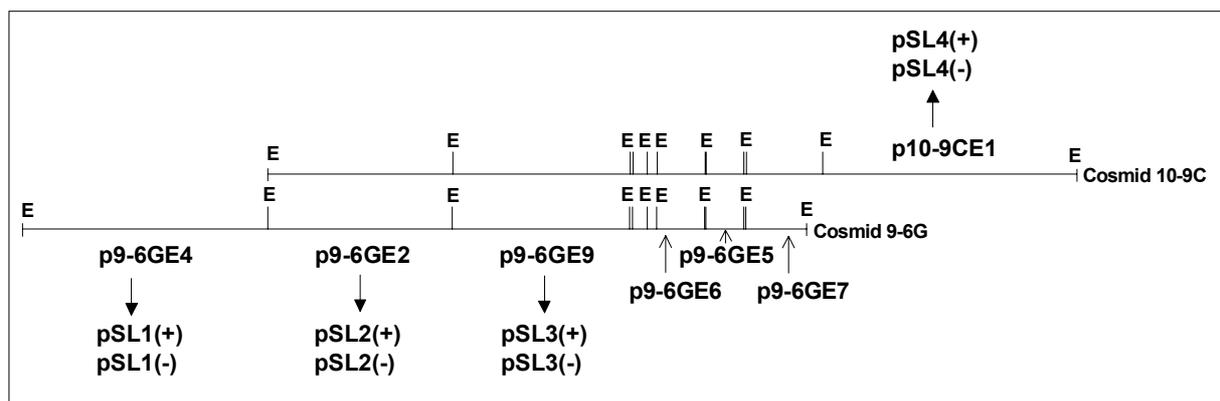


Abb. 19: Lage der zum Screenen nach 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität eingesetzten Expressionskonstrukte innerhalb der untersuchten Cosmide. Die jeweils unterschiedliche Orientierung der Inserts in den erhaltenen Expressionskonstrukten ist mit (+) bzw. (-) gekennzeichnet; E = *EcoRI*-Schnittstelle.

Sämtliche Konstrukte wurden in *S. lividans* TK24 eingebracht. Die erhaltenen Transformanten wurden 2-3 Tage auf HA-Agarplatten unter Thiostrepton-Selektion (50 µg/ml) kultiviert, in HA-Flüssigmedium überimpft und nach weiterer 2-3 tägiger Anzucht zur Sporulation auf HA-Agarplatten ausplattiert. Aus der verbliebenden Zellsuspension wurde

zum Nachweis der erfolgreichen Transformation das entsprechende Expressionskonstrukt wieder reisoliert und mittels geeigneter Restriktionsverdau auf Nativität untersucht. Die Transformanden wurden in Form transgener Sporen bei -70°C gelagert.

3.2.2 Test auf Plasmidstabilität von pEM4-Konstrukten in *S. lividans* TK24

Neben dem Nachweis der Transformation war jedoch die Sicherstellung der Stabilität der Plasmidkonstrukte nach Replikation und anschließender Übertragung auf die Tochterzellen eine Voraussetzung für erfolgreiche Expressionsversuche. Insbesondere bei großen Multicopy-Konstrukten, wie sie auch hier eingesetzt wurden, kann es auch unter Konstanzhaltung des Selektionsdrucks zu Modifikationen wie DNA-Rearrangements und Insertdeletionen kommen (Kieser et al. 1982; Lee et al. 1986; Pigac et al. 1988).

Die Plasmidstabilität unter Selektionsdruck wurde für mehrere Transformanden eines jeweiligen Konstruktes überprüft. Zu diesem Zweck wurden nachweislich transgene Sporen in HA-Flüssigmedium über 2-3 Tage angezogen und anschließend nochmals in zwei aufeinanderfolgenden Passagen überimpft. Aus Zellen der 3. Subkultivierung wurde nach Plasmidisolierung die Nativität des jeweiligen Konstruktes über das erhaltene Restriktionsmuster überprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 35 dokumentiert und zeigen, daß vor allem für Konstrukte mit einer Insertgröße von mehr als 10 kb keine Plasmidstabilität nach mehrfacher Subkultivierung gewährleistet werden konnte, da alle untersuchten Konstrukte einer vollständigen Deletion des Inserts unterlagen. Hingegen wiesen die Konstrukte pSL2 und pSL3 geringere strukturelle Instabilitäten auf. Hier unterlag lediglich eines der isolierten Plasmide (pSL3(+)) einer Modifizierung, die sich in einem Teilverlust des Inserts zeigte.

Tab. 35: Test auf Plasmidstabilität von pEM4-Konstrukten in *S. lividans* TK24

Konstrukt	Insertgröße [kb]	Anzahl der untersuchten Transformanden	Transformanden mit nativem Konstrukt nach 3 Kultivierungspassagen
pEM4	-	2	2
pSL1(+)	13,5	3	0
pSL1(-)	13,5	4	0
pSL2(+)	10,1	2	2
pSL2(-)	10,1	1	1
pSL3(+)	9,7	1	0
pSL4(+)	14	1	0
pSL4(-)	14	1	0

Durch Herstellung von Glycerindauerkulturen bei einem möglichst frühen Stadium zur Vermeidung längerer Kultivierungspassagen konnte eine zufriedenstellende Reduzierung der strukturellen Plasmidinstabilität erzielt werden. Nach Transformation wurden die Einzelkulturen großflächig auf HA-Agarplatten ausgestrichen und nach Bebrütung in HA-Flüssigmedium überimpft. Von dieser erhaltenen Zellsuspension wurden einerseits Glycerindauerkulturen angelegt (siehe Kapitel III 3.2.2) und nach einer weiteren Überimpfungspassage Kontrollplasmidisolierungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß bei nur einem von neun untersuchten Transformanden mit den Plasmiden pSL1(-),

pSL4(+) und pSL4(-) eine Insert-Teildeletion detektiert wurde; pSL1(+)-Transformanden wiesen stets einen vollständigen Insertverlust auf. Alle pSL2 und pSL3-Konstrukte konnten nativ isoliert werden. Somit war mit Ausnahme von Konstrukt pSL1(+) eine stabile Grundlage für weitere Expressionsexperimente gegeben.

3.2.3 Funktionelle Untersuchung von Cosmidsubklonen auf 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität

Anfängliche Kontrolluntersuchungen ergaben, daß *S. lividans* TK24 als Expressionswirt geeignet erschien, da im zellfreien Rohextrakt keine 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität detektierbar war. Zunächst wurden die Transformanden *S. lividans*:pSL2(+), *S. lividans*:pSL2(-), *S. lividans*:pSL3(-) und *S. lividans*:pSL4(-) auf 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität gescreent. Die Inkubationsdauer des 4HPP Dimethylallyltransferase-Assays betrug neben 30 min auch 180 min, um gegebenenfalls geringste Enzymaktivitäten oberhalb der Nachweisgrenze registrieren zu können. Es zeigte sich, daß bei einigen Transformanden nach HPLC-Analytik ein Reaktionsprodukt mit der Retentionszeit eines 4HPP Dimethylallyltransferase-Reaktionsprodukt-Peaks beobachtet werden konnte. Allerdings trat dieser Peak auch in der entsprechenden denaturierten Kontrolle auf. Weitere Kontrollexperimente zeigten, daß dieser Peak nur während der Inkubation und in Gegenwart der Substrate 4HPP, DMAPP und des nativen oder denaturierten Rohextraktes auftrat. Wahrscheinlich handelte es sich um eine zeitabhängige nicht-enzymatische Reaktion, die auch nach Inkubation mit hitzedenaturiertem Rohextrakt oder nach Vorinkubation des Rohextraktes mit Proteinase K stattfand, gleichzeitig jedoch nicht mehr auftrat, wenn der Rohextrakt durch BSA-Lösung ersetzt wurde. Insgesamt ist die Aussagefähigkeit der Kontrollversuche jedoch als gering einzustufen, da die gewonnenen Daten nicht reproduzierbar waren. Für die vorliegende Fragestellung erwies sich *S. lividans* TK24 unter den gegebenen Bedingungen nicht als geeigneter Expressionswirt.

3.3 Screening der Cosmide mit einer degenerierten Prenyltransferase-Sonde

Alternativ wurden die Cosmide zur Lokalisierung des 4HPP Dimethylallyltransferase-Gens mit einer degenerativen Sonde aus konservierten Prenyltransferase-Bereichen gescreent.

Die bis heute vorliegenden Sequenzdaten zu aromatischen Prenyltransferasen sind recht beschränkt, und die Homologien zwischen Prenyltransferasen der Isoprenoid-Biosynthese sind nur gering. Zwei hoch konservierte, Asparaginsäure-reiche Bereiche (DDxxD, x= beliebige Aminosäure) erwiesen sich als funktionell bedeutsam und wurden als Prenyldiphosphat-Bindungsstelle diskutiert (Ashby und Edwards, 1990; Joley und Edwards, 1993; Song und Poulter, 1994; Koyama et al. 1996). Aus Sequenzalignments einer Vielzahl sowohl pro- als auch eukaryotischer Prenyltransferasen wurden folgende Consensus-Motive abgeleitet (in eckigen Klammern dargestellte Aminosäuren repräsentieren die für diese Position variablen Aminosäuren, x bedeutet beliebige Aminosäure):

Motiv I: [LIVM] (2) -x-D-D-x(2,4)-D-x(4)-R-R-[GH]

Motiv II: [LIVMFY]-G-x(2)-[FYI]-Q-[LIVM]-x-D-D-[LIVMFY]-x-[DNG]

Durch röntgenstrukturspektroskopische Untersuchungen an einer Farnesyldiphosphat-Synthase konnte die Bindung der Diphosphat-Gruppen über Magnesium-Brücken an die Carboxylgruppen der Aspartat-Reste aus Motiv I nachgewiesen werden (Tarshis et al. 1996). Aus dem Bereich des Motiv I der in Tab. 36 aufgeführten Prenyltransferasen wurde unter Berücksichtigung des Streptomyceten-typischen Codon-Gebrauches folgende degenerierte 30 bp-Sonde (PT1-Sonde) abgeleitet:

PT1-Sonde: 5'-CTS HTS CWS GAC GAC VTS CCS KSS RTS GAC -3'

Tab. 36: Sequenzvergleich der konservierten Domäne I von Prenyltransferasen. Hoch konservierte Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Hexaprenyldiphosphat-Synthasen: HEP2, GRC3, COQ1; Octaprenyl- und Nonaprenyldiphosphatsynthasen: PREA, ISPB; Farnesyldiphosphat-Synthasen: IDSA, ISPA; Geranylgeranyldiphosphat-Synthasen: GGPP, CRTE. Die PT1-Sonde wurde aus dem in der Consensus-Sequenz unterstrichenen Bereich abgeleitet.

Enzym	Aminosäure	Domäne 1	Ursprung	Datenbank-nummer
HEP2_BACST	80	SLVHDDV..IDDADLRRG	<i>B. stearoothermophilus</i>	P55785
GRC3_BACSU	108	SLVHDDV..IDDAELRRG	<i>B. subtilis</i>	P31114
COQ1_YEAST	189	SLLHDDV..IDHSDTRRG	<i>S. cerevisiae</i>	P18900
PREA_CYAPA	84	SLVHDDI..LDES DVRRG	<i>Cyanophora paradoxa</i>	P31171
PREA_PORPU	84	SLVHDDV..IDECSTRRG	<i>Porphyra purpurea</i>	P51268
ISPB_ECOLI	80	TLLHDDV..VDES DMRRG	<i>E. coli</i>	P19641
ISPB_HAEIN	86	SLLHDDV..VDES DMRRG	<i>H. influenzae</i>	P44916
IDSA_METJA	84	TLIHDDI..MDNDDERRG	<i>M. janaschii</i>	Q58270
IDSA_METTH	80	SLIHDDI..MDDEMRRG	<i>M. thermoautotrophicum</i>	Q26156
ISPA_BRAJA	111	TLVHDDL PAMDDV LRRG	<i>B. japonicum</i>	Q45220
ISPA_RHISN	111	TLVHDDL PAMDDV LRRG	<i>Rhizobium spez.</i>	P55539
ISPA_ECOLI	80	SLIHDDL PAMDDDL LRRG	<i>E. coli</i>	P22939
ISPA_HAEIN	81	SLIHDDL PAMDDNL LRRG	<i>H. influenzae</i>	P45204
ISPA_BACST	82	SLIHDDL PSMDDDL LRRG	<i>B. stearoothermophilus</i>	Q08291
ISPA_BACSU	91	SLIHDDL PCMDDDL LRRG	<i>B. subtilis</i>	P54383
GGPP_SULAC	78	TLVHDDI..MQDNIRRG	<i>S. acidocaldarius</i>	P39464
GGPP_NEUCR	177	SLLVDDV..EDNSV LRRG	<i>N. crassa</i>	P24322
GGPP_ARATH	151	SLIHDDL PCMDNDL LRRG	<i>A. thaliana</i>	P34802
GGPP_CAPAN	153	SLIHDDL PCMDNDL LRRG	<i>C. paradoxa</i>	P80042
CRTE_CYAPA	85	SLIHDDL PAMDNDSYRRG	<i>Cyanophora paradoxa</i>	P48368
CRTE_ERWHE	89	SLMLDDMPCMDNAELRRG	<i>E. herbicola</i>	P22873
CRTE_ERWUR	90	SLILDDMPCMDDAKLRRG	<i>R. uredorora</i>	P21684
CRTE_RHOCA	76	SLVHDDL PAFDNADIRRG	<i>R. capsulatus</i>	P17060
CRTE_RHOSH	76	SLVHDDL PCFDDAEIRRG	<i>R. spheroides</i>	P54976
Consensus		<u>SLIHDDLPCMDDDLRRG</u>		

Die PT1-Sonde wurde nach chemischer DIG-Markierung zur Southern-Hybridisierung mit den Dehydratase- und *ngrB*^R-positiven Cosmiden 9-6G, 10-9C und 2-9A, die jeweils mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*-, *BamHI*- und *BglII* geschnitten wurden, eingesetzt. Die Stringenz wurde durch Variation der Hybridisierungstemperatur in 5°C-Schritten zwischen 45 und 60°C verändert. Lediglich bei niedriger Stringenz konnten Hybridisierungssignale

detektiert werden, die jedoch eher unspezifischer Natur waren. Abb. 20 zeigt eine Darstellung der gelelektrophoretisch nach Restriktionsverdau aufgetrennten Cosmid-Fragmente und den entsprechenden Southern Blot nach Hybridisierung mit der PT1-Sonde bei 45°C.

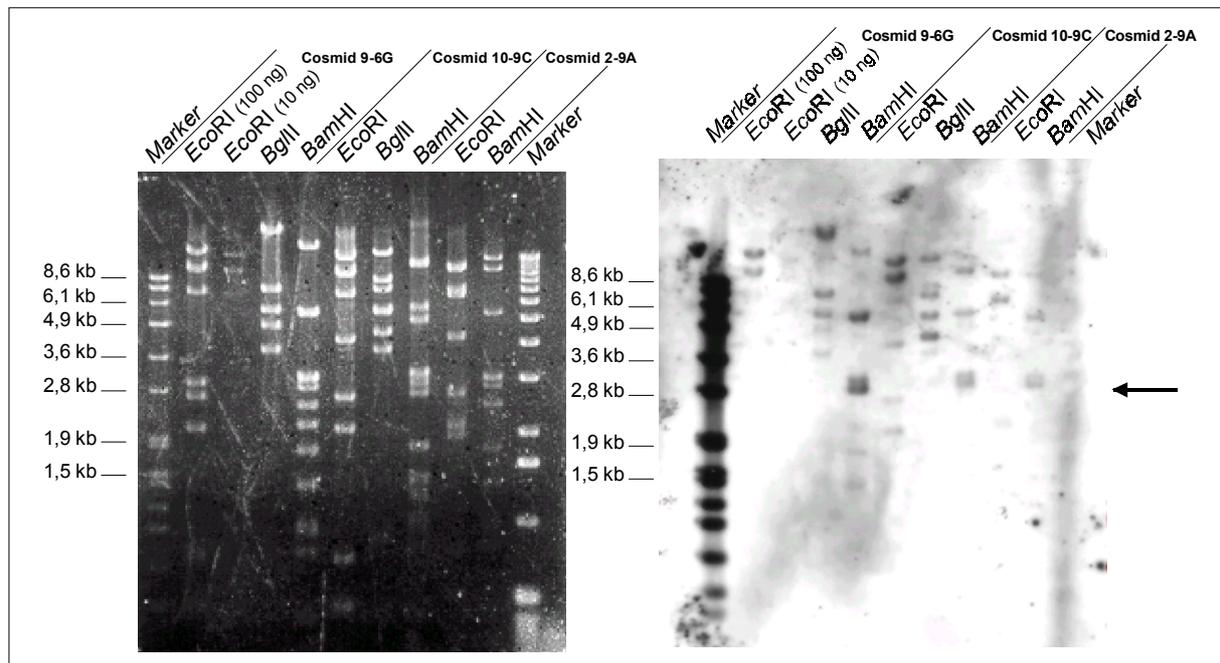


Abb. 20: *EcoRI*-, *Bam*HI- und *Bgl*II-Restriktionsverdau der untersuchten Cosmide und Southern Blot nach Hybridisierung mit der Prenyltransferase-Sonde PT1. Die Hybridisierungstemperatur betrug 45°C. Der Pfeil markiert das nach Detektion aus Cosmid 9-6G klonierte 2,8 kb *Bam*HI-Fragment.

Ein vergleichsweise verstärktes Signal wurde im *Bam*HI-verdauten Cosmid 9-6G bei einer Größe von etwa 2,8 kb detektiert. Dieses 2,8 kb *Bam*HI-Fragment wurde zwecks Sequenzanalyse in pBluescript SK(-) kloniert (Konstrukt pMS50). Die Auswertung der Nukleotidsequenz zeigte das Vorliegen von 3 offenen Leserahmen, *orf17*, *orf10* und *orf11*, wobei sich lediglich *orf11* vollständig auf dem Subklon befand (siehe auch Sequenzanalyse in Abschnitt 2.2.2). Durch Datenbankrecherchen wurden keine Homologien zu bekannten Proteinen für Orf17 gefunden. Orf10 und Orf11 zeigten Homologien zu ABC ("ATP binding cassette")-Transportern, welche sich durch hochkonservierte, sogenannte Walker A- und Walker B-Motive auszeichnen (Schneider und Hunke, 1998). Insbesondere wiesen diese ORFs hohe Homologien zu den Transporterproteinen StrV bzw. StrW (19 % bzw. 28 % Identität) innerhalb des 5'-Hydroxy-Streptomycin-Biosyntheseclusters aus *Streptomyces glaucescens* auf, deren Funktion innerhalb der Biosynthese und des Exportes Streptomycin-ähnlicher Aminoglykoside spekuliert wird (Beyer et al. 1996). Nach Auswertung der Sequenzdaten zeichnete sich also kein eindeutiger Hinweis für das Vorliegen einer Prenyltransferase auf Subklon pMS50 ab.

Durch Screening der Cosmide mit der degenerierten PT1-Sonde konnte das 4HPP Dimethylallyltransferase-Gen nicht identifiziert werden, da offenbar unspezifische Hybridisierungssignale auftraten.

3.4 Sequenzanalyse der Cosmide und Homologievergleich auf Proteinebene

Im Verlauf dieser Arbeit wurden 53,1 kb (davon 6,5 kb durch A. Mühlenweg) innerhalb der Cosmide 9-6G und 10-9C sequenziert (s. 2.2.2), wobei im Sequenzvergleich durch Datenbankrecherchen keinerlei Homologien zu Prenyltransferasen aufgezeigt werden konnten. Eine gezielte Suche der offenen Leserahmen nach den Prenyltransferase-Motiven I und II ergab, daß diese in keinem der detektierten Gene vollständig identifiziert werden konnten. Hingegen konnten die motivisch hochkonservierten Bereiche DDxxD und DDxxxxD in 17 % aller untersuchten Gene detektiert werden. Eine Identifizierung des 4HPP Dimethylallyltransferase-Gens innerhalb der Cosmide 9-6G und 10-9C konnte nach Auswertung der vorliegenden Sequenzdaten nicht erzielt werden. Die Problematik spiegelt sich in der Tatsache wider, daß die Homologien verschiedenster Prenyltransferasen untereinander nur sehr gering sind und sich nur auf einzelne Aminosäuren beziehungsweise äußerst kurze Motive beschränken, welche den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge nicht für eine Identifizierung geeignet erscheinen. Des weiteren sind die über aromatische Prenyltransferasen des Sekundärstoffwechsels vorliegenden Kenntnisse auf molekularbiologischer Ebene nur sehr limitiert.

Letztendlich besteht dennoch Klärungsbedarf hinsichtlich der Frage, ob das gesuchte Gen tatsächlich auf den bis jetzt untersuchten Cosmiden lokalisiert ist. Zwar konnte bisher über Sequenzvergleiche noch nicht allen detektierten offenen Leserahmen eine mögliche Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese zugewiesen werden, dennoch muß die Möglichkeit, daß das Novobiocin-Biosynthese-Cluster sich nicht vollständig auf dem über 58 kb erstreckenden Bereich der Cosmide befindet, berücksichtigt werden.

4 Klonierung und funktionelle Expression der Novobiocinsäure-Synthetase aus *S. spheroides* NCIMB 11891

Nachdem das Novobiocin-Biosynthese-Cluster durch Screening der Cosmidbank aus *S. spheroides* NCIMB 11891 mit homologen dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Sonden und durch Detektion des Novobiocin-Resistenzgens *ngyrB^R* und weiterer Gene mit möglicher Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese identifiziert werden konnte, war ein Funktionsnachweis des Clusters unerlässlich. Dieser Funktionsnachweis wurde zum einen durch ein durch A. Mühlenweg durchgeführtes Geninaktivierungsexperiment mit dem dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gen (*novT*) erbracht und zum anderen durch die aktive heterologe Expression eines Schlüsselenzyms der Novobiocin-Biosynthese, der Novobiocinsäure-Synthetase (NBSS), geliefert. Dieses Enzym katalysiert ATP-abhängig die Bildung der Amidbindung zwischen Ring A und Ring B. Die enzymatische Reaktion wurde schon Mitte der 70er Jahre durch Kominek und Meyer im Rohextrakt von *S. niveus* nachgewiesen (Kominek und Meyer, 1975). Das oder die Novobiocinsäure-Synthetase-Struktur-Gen(e) sollten innerhalb der Cosmide 9-6G und 10-9C durch funktionellen Aktivitätsnachweis identifiziert und im weiteren nach Klonierung überexprimiert, bis zur Homogenität gereinigt und biochemisch unter Berücksichtigung des Reaktionsmechanismus' charakterisiert werden.

4.1 Identifizierung des Novobiocinsäure-Synthetase-Gens

Zur Identifizierung des Novobiocinsäure-Synthetase-Gens sollten größere Cosmid-Bereiche nach heterologer Expression in einem geeigneten Streptomycceten funktionell auf Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität hin untersucht werden. Voraussetzung hierfür war die Optimierung eines Novobiocinsäure-Synthetase-Assays in Anlehnung an die durch Kominek und Meyer (1975) beschriebene Methode. Das Produkt der Reaktion, die Novobiocinsäure, wurde durch HPLC nach Gradienten-Elution mit einem Wasser-Methanol-Ameisensäure-Gemisch detektiert (siehe Kapitel III 5.3.3 und 6.1.3). Die Expression erfolgte, wie schon beim Screening auf 4HPP Dimethylallyltransferase-Aktivität in Kapitel 3.1 beschrieben, mit 9-14 kb großen *EcoRI*-Fragmenten der Cosmide 9-6G und 10-9C, welche zu diesem Zweck in beiden Orientierungen in den *E.coli*-Streptomycceten-Shuttle-Vektor pEM4 (Quirós et al. 1998) kloniert wurden. Die erhaltenen Expressionskonstrukte wurden in *Streptomyces lividans* TK24 einbegracht und die entsprechenden Transformanden nach Nachweis der Transformation durch Plasmidisolierung auf Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität hin untersucht. Das Screening wurde durch S. Hennig und S.-M. Li durchgeführt, und es konnte Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität mit durchschnittlich 9,1 pkat/mg Protein nach Expression eines 9,7 kb *EcoRI*-Fragmentes aus Cosmid 9-6G im Konstrukt pSL3(+) im Rohextrakt detektiert werden. Die Lage dieses exprimierten Bereiches innerhalb des Cosmides 9-6G ist auch in Abb. 19 (Abschnitt 3.2) dargestellt. In Transformanden, die lediglich den leeren Vektor pEM4 enthielten, konnte dagegen keine Aktivität beobachtet werden.

Die Sequenzbewertung zeigte, daß dieses Fragment 6 offene Leserahmen (*novH* bis *novN*) enthielt, die alle in der gleichen Orientierung vorlagen. Die Lage der betreffenden Gene innerhalb des Novobiocin-Biosynthese-Clusters ist auch in Abb. 21 verdeutlicht. Für eine

Beteiligung an der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion kamen vor allem zwei Gene, die zur Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme gehörten, *novH* und *novL*, in Frage. Bei den Genprodukten von *novI*, *novJ* und *novK* handelt es sich wahrscheinlich um Oxidoreduktasen. *novM* codiert mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine Glycosyltransferase, und *novN* zeigte Homologien zu O-Carbamoyltransferasen (siehe Abschnitt 2.2.2). Sequenzanalysen ergaben Homologien zu nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen für *novH* und zu Acyl-CoA-Ligasen und 4-Coumarat:CoA-Ligasen für das von *novL* abgeleitete Produkt (siehe 2.2.2.6). Um die an der Reaktion beteiligten Gene zu identifizieren, wurden ausgehend von dem 9,7 kb *EcoRI*-Fragment Verkürzungskonstrukte hergestellt und nach Transformation in *S. lividans* TK24 auf NBSS-Aktivität hin untersucht. Die jeweilige Klonierungsstrategie ist in Tab. 37, die Lage der Expressionskonstrukte innerhalb des Clusters ist übersichtsmäßig in Abb. 21 dargestellt.

Tab. 37: Klonierungsstrategien zur Herstellung verschiedener Expressionskonstrukte zwecks Identifizierung des Novobiocinsäure-Synthetase-Gens. MCS = Multiple Cloning Site.

Expressions-konstrukt	Klonierungsstrategie	enthaltene ORFs
pSL3(+)	Klonierung des 9,74 kb <i>EcoRI</i> -Fragmentes aus Cosmid 9-6G in pEM4	<i>novHIJKLMN</i>
pMS73	<i>PflMI-Spel</i> -Verdau von p9-6GE9-R (9,74 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 9-6G in pBSK(-), <i>SpeI</i> -Schnittstelle der MCS befindet sich stromabwärts von <i>novN</i>) bewirkt Deletion eines 2,78 kb großen Bereiches mit den Genen <i>novM</i> und <i>novN</i> . Herstellung von blunt-ends durch T4-DNA-Polymerase und Religation (pMS69). Klonierung des 6,96 kb großen Inserts aus pMS69 gerichtet über <i>EcoRI-XbaI</i> hinter den Promotor von pUWL201 (pMS73).	<i>novHIJKL</i>
pMS75	Klonierung des 5,55 kb <i>NotI</i> -Fragmentes aus p9-6GE9 (9,74 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 9-6G in pBSK(-), <i>NotI</i> -Schnittstelle der MCS befindet sich stromabwärts von <i>novN</i>) in pBSK(-) (Konstrukt pMS74, <i>XbaI</i> -Schnittstelle der MCS befindet sich stromabwärts von <i>novK</i>). gerichtete Umklonierung über <i>EcoRI-XbaI</i> hinter den Promotor von pUWL201 (pMS75).	<i>novHIJK</i>
pMS71	<i>SnaBI-Spel</i> -Verdau von p9-6GE9-R (<i>SpeI</i> -Schnittstelle der MCS befindet sich stromabwärts von <i>novN</i>) bewirkt Deletion eines 5,63 kb großen Bereiches mit den Genen <i>novL</i> bis <i>novN</i> . Herstellung von blunt-ends durch T4-DNA-Polymerase und Religation (pMS66). Klonierung des 4,1 kb großen Inserts aus pMS66 über <i>EcoRI-XbaI</i> gerichtet hinter den Promotor von pUWL201 (pMS71).	<i>novHIJ</i>
pMS65	Klonierung des 1,95 kb großen <i>EcoRI-BglII</i> -Fragmentes aus p9-6GE9 über <i>EcoRI-BamHI</i> gerichtet hinter den Promotor von pUWL201 (pMS65).	<i>novH</i>
pMS77	Klonierung des 2,1 kb <i>Apal</i> -Fragmentes aus p9-6GE9 in pGEM-11Zf(+) (<i>XbaI</i> -Schnittstelle der MCS befindet sich stromabwärts von <i>novL</i>) (pMS76). Umklonierung über <i>EcoRI-XbaI</i> hinter den Promotor von pUWL201 (pMS77).	<i>novL</i>
pMS79	Klonierung des 1,95 kb großen <i>EcoRI-BglII</i> -Fragmentes aus p9-6GE9 (<i>novH</i>) in die <i>EcoRI-BamHI</i> -Schnittstellen der MCS von Konstrukt pMS76 (pMS78). gerichtete Umklonierung des 4,08 kb großen Inserts über <i>EcoRI-XbaI</i> hinter den Promotor von pUWL201 (pMS79).	<i>novH, novL</i>

Als Expressionsvektor wurde der Multi-Copy *E. coli*-Streptomyceten-Shuttle-Vektor pUWL201 (U. Wehmeier, Wuppertal) verwendet, der ebenso wie pEM4 den konstitutiven *ermE* up Promotor des Erythromycin-Resistenzgens aus *Saccharopolyspora erythraea* (Bibb et al. 1985) enthält. Bei den Klonierungen wurde die Orientierung der zu klonierenden Gene berücksichtigt und so gewählt, daß stets die Transkriptionsrichtung des Promotors vorlag. Die erhaltenen Konstrukte wurden jeweils durch Restriktions-Kontrollverdaus auf ihre Richtigkeit hin überprüft und in *S. lividans* TK24 eingebracht. Die Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivitätsbestimmungen wurden im Rohextrakt von jeweils zwei nachweislichen Transformanten des entsprechenden Konstruktes durchgeführt (siehe Kapitel III 5.3.3) und die Ergebnisse sind in Abb. 21, B dargestellt.

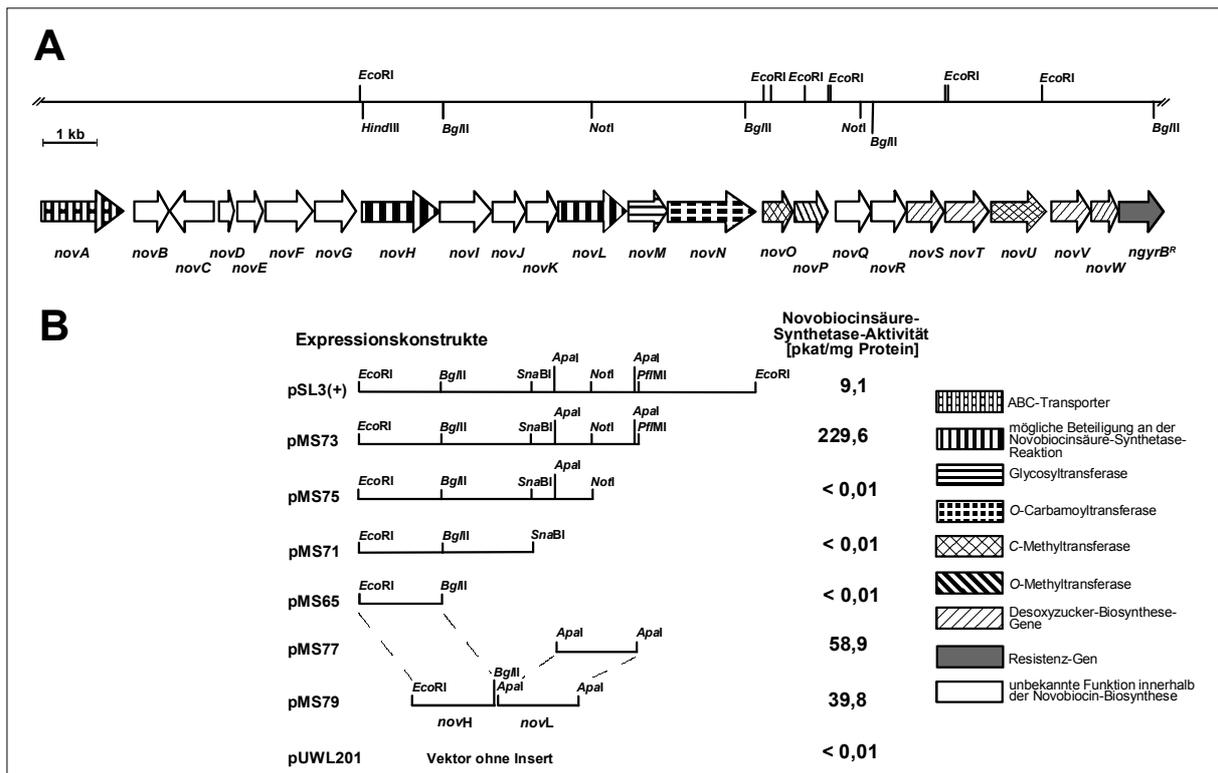


Abb. 21: Schematische Darstellung der zur heterologen Expression der Novobiocinsäure-Synthetase hergestellten Expressionskonstrukte. A. Ausschnitt der Restriktionskarte des Novobiocin-Biosynthese-Clusters mit putativer Funktions-Zuordnung. **B.** Lage der Expressionskonstrukte innerhalb des Clusters und Ergebnisse der Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivitätsbestimmungen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen mit zwei unabhängigen Transformanten durchgeführt.

Es zeigte sich, daß die Expression von *novL* essentiell für die Enzymaktivität war. Während mit Konstrukt pMS73 hohe Aktivitäten (229,6 pkat/mg Protein) beobachtet werden konnten, war mit allen weiteren verkürzten Konstrukten (pMS75 und pMS71) keine NBSS-Aktivität mehr detektierbar. Auch die alleinige Expression von *novH* (Konstrukt pMS65) führte nicht zur Novobiocinsäure-Bildung.

Die Detektion von NBSS-Aktivität konnte schließlich auf die ausschließliche Expression von *novL* (Konstrukt pMS77) eingeschränkt werden. Die Novobiocinsäure-Bildung erwies sich als enzym- und substratabhängig und zeigte einen linearen Reaktionsverlauf bis 200 µg Protein pro Inkubationsansatz und bis zu einer Inkubationsdauer von 45 min. Die Identität des

enzymatischen Produktes der Reaktion, der Novobiocinsäure, konnte nach präparativer Isolierung und Reinigung wie unter Kapitel III 6.3 beschrieben durch EI-MS-Analyse bestätigt werden. Ebenso wie beim Referenzspektrum mit authentischer Novobiocinsäure wurde im MS-Spektrum des Reaktionsproduktes eine Masse von 395,2 bestimmt, die mit dem theoretisch berechneten Molekulargewicht (Summenformel Novobiocinsäure: $C_{22}H_{21}NO_6$) übereinstimmte (Abb. 22).

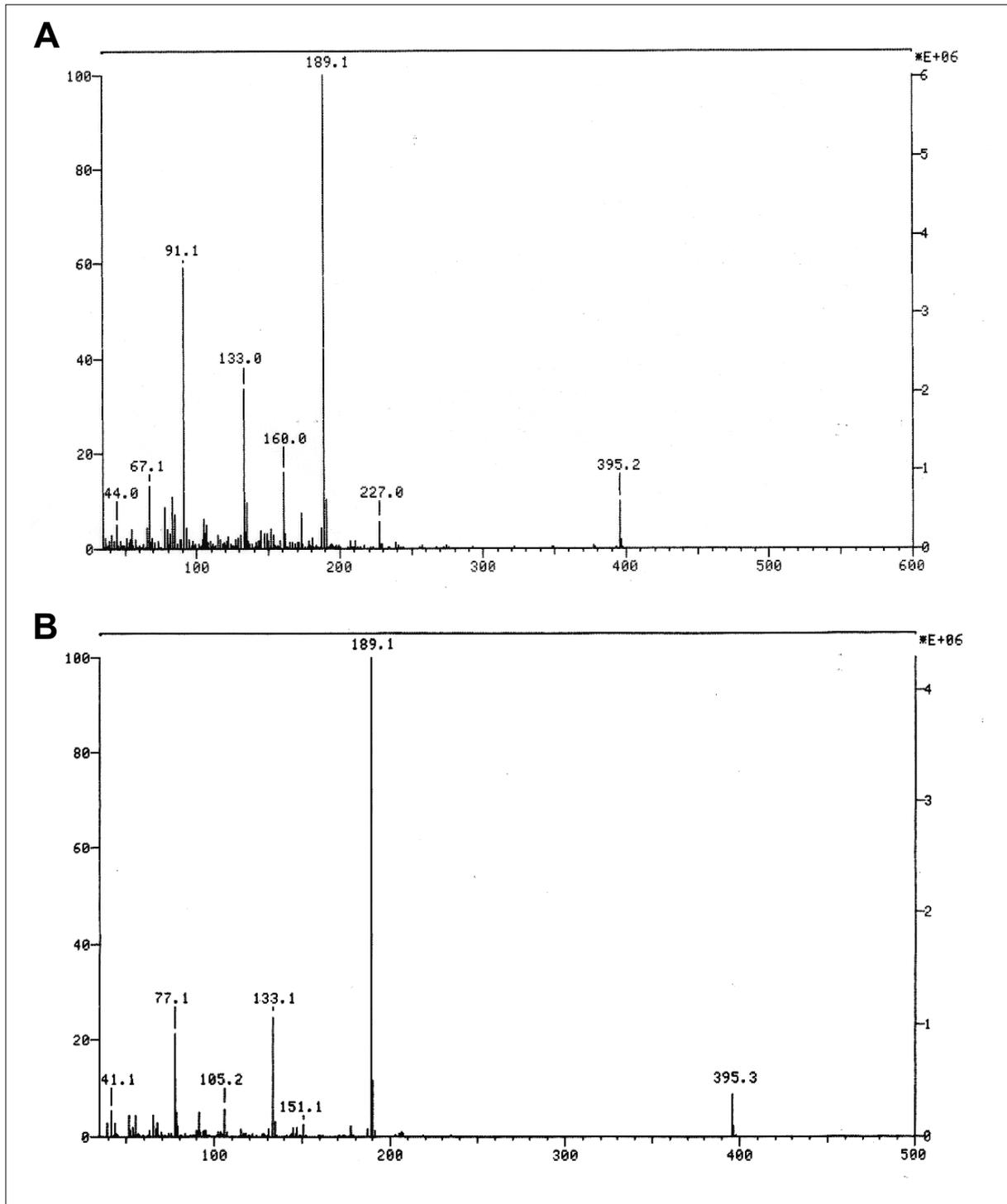


Abb. 22: EI-Massenspektren des in der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion gebildeten Reaktionsproduktes (A) und der Novobiocinsäure-Referenzsubstanz (B).

Eine gemeinsame Expression von *novH* und *novL* führte nicht zu höheren NBSS-Aktivitäten im Vergleich zur Expression von *novL* alleine (Abb. 21). Ebenso konnte nach gemeinsamer Inkubation der Rohextrakte der einzeln exprimierten Gene (Konstrukt pMS65 und pMS77) im NBSS-Assay keine höheren Aktivitäten registriert werden (Tab. 38).

Tab. 38: Untersuchung zur Funktion von NovH und NovL innerhalb der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion. Die Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität wurde nach heterologer Expression der verschiedenen Expressionskonstrukte im Rohextrakt mit jeweils 100 µg Protein bestimmt. Bei der gemeinsamen Inkubation der Rohextrakte einzeln exprimierter Konstrukte pMS77 und pMS65 wurden je 100 µg Rohextrakt eingesetzt.

Rohextrakt aus Transformanten mit Expressionskonstrukt	heterolog exprimierte Gene	Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität [pkat]	relative Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität [%]
pMS77	<i>novL</i>	5,89	100
pMS65	<i>novH</i>	< 0,001	< 0,01
pMS79	Coexpression von <i>novH</i> und <i>novL</i>	3,98	67,6
Mischung von Rohextrakten aus pMS77 und pMS65	Einzelexpression von <i>novH</i> und <i>novL</i>	2,32	39,4
pUWL201	-	< 0,001	< 0,01

Diese Resultate deuteten darauf hin, daß die Novobiocinsäure-Reaktion alleine durch NovL katalysiert wird, und daß das Peptidsynthetase-Homologon NovH nicht involviert war.

4.2 Heterologe Überexpression von *novL* in *E. coli*

Der Nachweis der ausschließlichen Beteiligung von NovL an der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion sollte durch Überexpression von *novL* und Reinigung des Enzyms bis zur Homogenität erfolgen. Zu diesem Zweck bot sich eine heterologe Überexpression von *novL* als Hexa-Histidin-Fusionsprotein in *E. coli* an, welche die Möglichkeit einer effektiven Reinigung über Nickel-Affinitäts-Chromatographie erlaubte. Die Expression von Streptomyceten-Enzymen mit anfusioniertem His-Tag in ihrer aktiven Form und anschließende Reinigung wurde mehrfach beschrieben (Ingham et al. 1996; Parry und Li, 1997; Trauger und Walsh, 2000). Um möglicherweise auftretende positionsbedingte, negative Effekte des 6xHis-Tags auf die Enzymaktivität wahrzunehmen, sollte NovL sowohl als C- als auch als N-terminales 6xHis-Fusionsprotein überexprimiert werden.

4.2.1 Überexpression von *novL* in *E. coli* als N-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein

Zur Überexpression der Novobiocinsäure-Synthetase mit N-terminal anfusioniertem Hexa-Histidin-Tag wurde *novL* in den Vektor pRSet B der Firma Invitrogen unter die Kontrolle des Bakteriophagen-T7-Promotors kloniert. Durch PCR-Amplifikation von *novL* mit den Primern novL-4 und novL-3 wurde vor den N-Terminus von *novL* eine *Bgl*II-Schnittstelle eingebracht, welche eine in-frame-Klonierung an den His-Tag von pRSet B ermöglichte. Zusätzlich wurde eine *Nde*I-Schnittstelle eingeführt, die eine Änderung des *novL*-Startcodons von GTG zu ATG mit sich brachte und die Entfernung des His-Tags durch *Nde*I-Verdau und Religation erlaubte. Im C-terminalen Bereich hatte die Verwendung des Primers novL-3, welcher auch für die Herstellung des C-terminalen Fusionsproteins genutzt wurde (siehe 4.2.2), eine Verlagerung des *novL*-Stopcodons um 6 Basen stromabwärts und damit eine Verlängerung des exprimierten Proteins von -VDR zu -VDRGS zur Folge (siehe Kapitel III 4.8.7.2). Eine schematische Darstellung des erhaltenen Konstruktes pMS82 ist in Abb. 23 dargestellt.

Ein entsprechendes Kontrollkonstrukt ohne His-Tag wurde durch *Nde*I-Verdau und Religation von pMS82 hergestellt. Das erhaltene Konstrukt wurde als pMS85 bezeichnet.

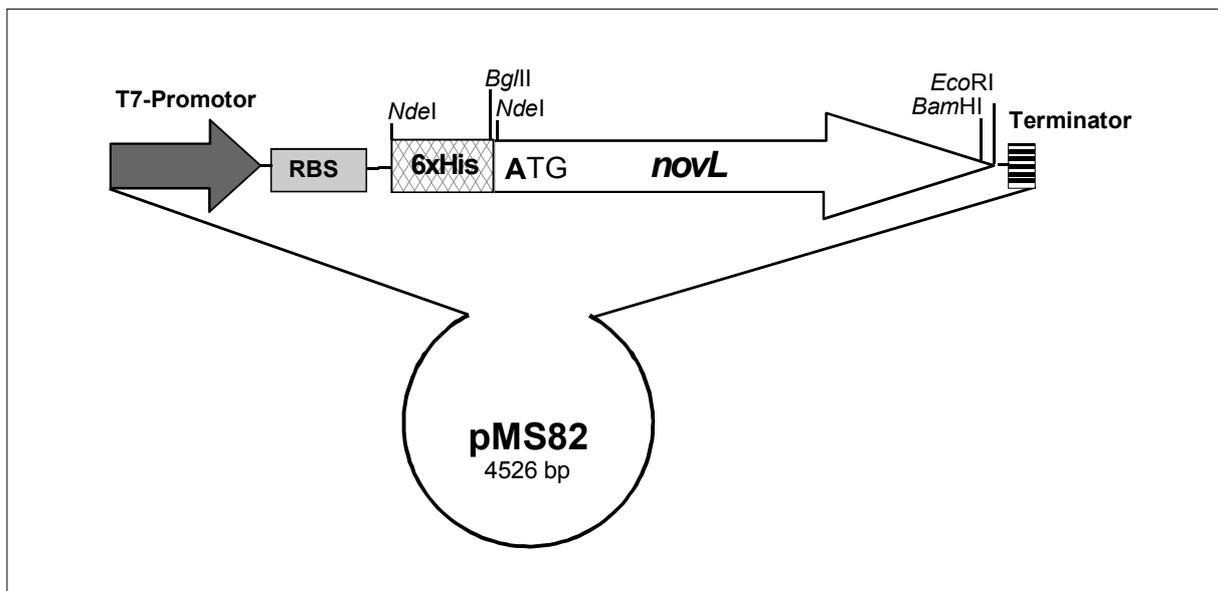


Abb. 23: Überexpressionskonstrukt pMS82 zur Expression von NovL als N-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein. Das mit Hilfe der Primer novL-4 und novL-3 amplifizierte Gen wurde über *Bgl*II und *Eco*RI in den Vektor pRSet B ligiert. Ein entsprechendes Konstrukt ohne His-Tag (pMS85) wurde nach *Nde*I-Verdau und Religation erhalten. RBS = ribosomale Bindungsstelle.

Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Dieser Stamm enthält DE3 Lysogen und das Plasmid pLysS (Cam^R). *E. coli* BL21(DE3) exprimiert die T7 RNA-Polymerase und erlaubt die Induktion rekombinanter Gene mit IPTG. pLysS exprimiert konstitutiv geringe Mengen an T7-Lysozym, welches die Basis-Expression des rekombinanten Gens durch Inhibition der T7-RNA-Polymerase verhindert. Abb. 24 verdeutlicht, daß in *E. coli*:pMS82 nach IPTG-Induktion zeitabhängig die Expression eines etwa 62,5 kDa großen Proteins auftrat (theoretisch erwartete Proteingröße 61,45 kDa). In der Kontrolle konnte diese

Proteinbande nicht beobachtet werden. Ohne His-Tag (Konstrukt pMS85) wurde eine etwa 61 kDa große Proteinbande detektiert (theoretisch erwartete Proteingröße 57,06 kDa).

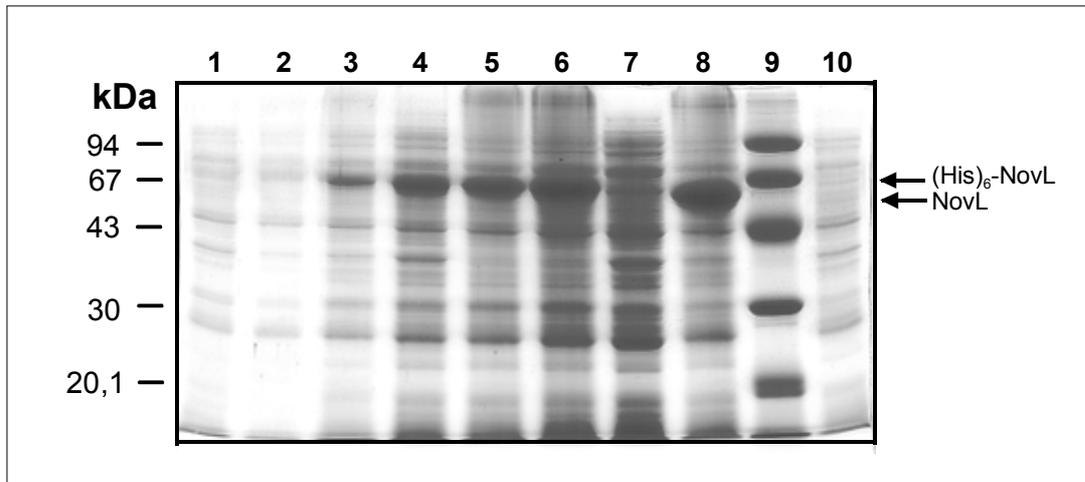


Abb. 24: SDS-PAGE (12 % Polyacrylamid) des zeitlichen Verlaufs der Expression des N-terminalen Hexa-Histidin-NovL-Fusionsproteins in *E.coli* BL21(DE3)pLysS. Es wurde jeweils das Gesamtzellprotein vor (Spur 1) und nach Induktion von *E.coli*:pMS82 mit 1 mM IPTG jeweils stündlich bis 5 Stunden nach Induktion aufgetragen (Spur bis 2-6). Der Anteil des löslich exprimierten Proteins ist in Spur 7 aufgetragen; die Kontrolle mit leerem Vektor pRSet B befindet sich in Spur 10. Das Gesamtzellprotein der ohne His-Tag exprimierten Novobiocinsäure-Synthetase (Konstrukt pMS85), 5 h nach Induktion ist in Spur 8 zu sehen. Spur 9 enthält den Marker. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung gefärbt.

Die Novobiocinsäure-Synthetase konnte im pRSet B-Expressionssystem mit und ohne His-Tag nur mit äußerst geringen Aktivitäten (0,743 bzw. 0,705 pkat/mg Protein) in *E.coli* exprimiert werden. Im Vergleich zur spezifischen Aktivität im *S. spheroides*-Wildtyp mit 53,97 pkat/mg Protein wurden weniger als 1,4 % der Aktivität gefunden, was zu einem gewissen Teil in der Expression als größtenteils unlöslicher „Inclusion Bodies“ begründet lag.

Im Anschluß sind die Ergebnisse nach Fusion des His-Tags an den C-Terminus von NovL vergleichend gegenübergestellt.

4.2.2 Überexpression von *novL* in *E.coli* als C-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein

Zur Überexpression der Novobiocinsäure-Synthetase mit anfusioniertem Hexa-Histidin-Tag am C-Terminus wurde der pQE70-Vektor der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dieses System erlaubt eine hohe Transkription unter dem Bakteriophagen-T5-Promotor und unter zwei *lac*-Operator Sequenzen, welche die *lac*-Repressor-Bindung verstärken.

novL wurde über PCR amplifiziert, wobei das Einbringen geeigneter Restriktionsschnittstellen eine in-frame-Klonierung des C-Terminus an den 6xHis-Tag des Vektors erlaubte (siehe Kapitel III 4.8.7.2). In Abb. 25 ist eine schematische Darstellung des Überexpressionskonstruktes zu sehen. Durch Verwendung von Primer *novL*-1 wurde eine

SphI-Schnittstelle anstelle des natürlichen Startcodons eingeführt, so daß eine Klonierung von *novL* hinter die synthetische Ribosomenbindungsstelle RBSII von pQE70 möglich war. Im Gegenprimer *novL*-3 wurde das natürliche Stopcodon durch Einbringen einer *Bam*HI-Schnittstelle eliminiert, so daß eine in-frame-Ligation über *Bam*HI an den 6xHis-Tag des Vektors erfolgen konnte. Das erhaltene Konstrukt wurde pMS80 benannt.

Ein entsprechendes Konstrukt ohne His-Tag (pMS85) wurde wie in Kapitel III 4.8.7.2 erläutert hergestellt.

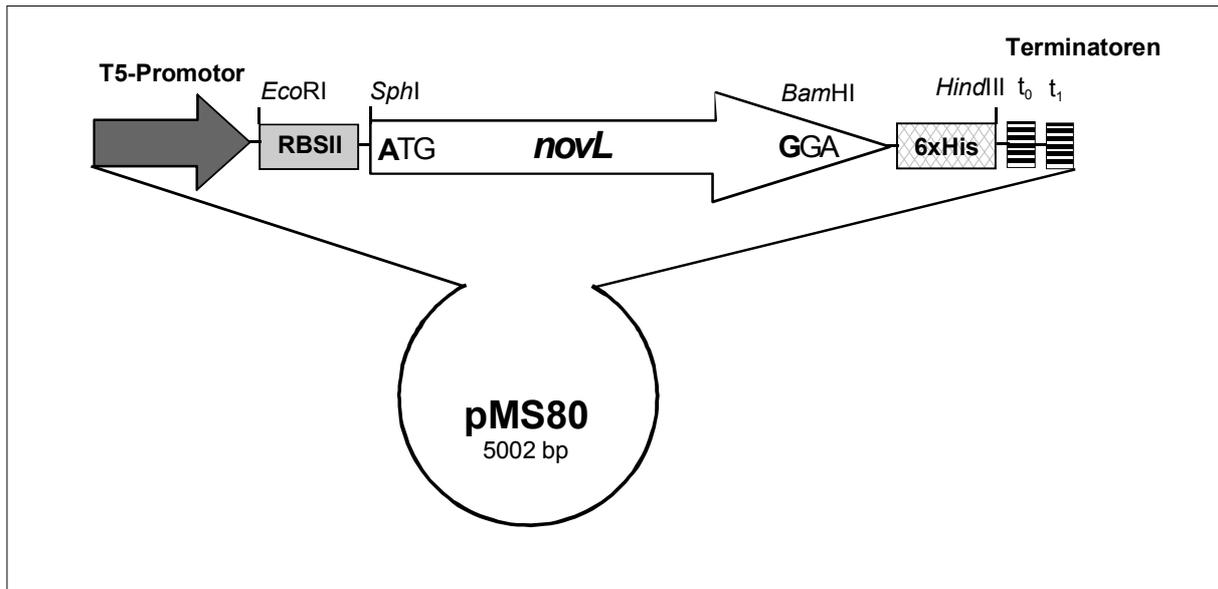


Abb. 25: Überexpressionskonstrukt pMS80 zur Expression von NovL als C-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein. Das mit Hilfe der Primer *novL*-1 und *novL*-3 amplifizierte Gen wurde über *SphI* und *Bam*HI in den Vektor pQE70 ligiert. Ein entsprechendes Konstrukt ohne His-Tag (pMS84) wurde nach *Bam*HI-*Hind*III-Verdau, Herstellung von blunt-ends und Religation erhalten.

Die Expression erfolgte in *E. coli* XL1 Blue MRF^r, einem Stamm mit *lac*-Repressor-Produktion aufgrund einer *lacI^r*-Mutation. Nach Induktion einer pMS80-transgenen Kultur mit IPTG konnte im weiteren Wachstumsverlauf in der SDS-PAGE-Analyse die zunehmende Expression eines Proteins von etwa 60,6 kDa detektiert werden, dessen Molekulargewicht dem für das NovL-Fusionsprotein theoretisch berechneten Wert von 58,1 kDa in etwa entsprach (Abb. 26). In der entsprechenden *E. coli*-Kontrollkultur, die lediglich den leeren Vektor pQE70 enthielt, trat diese Proteinbande nicht auf.

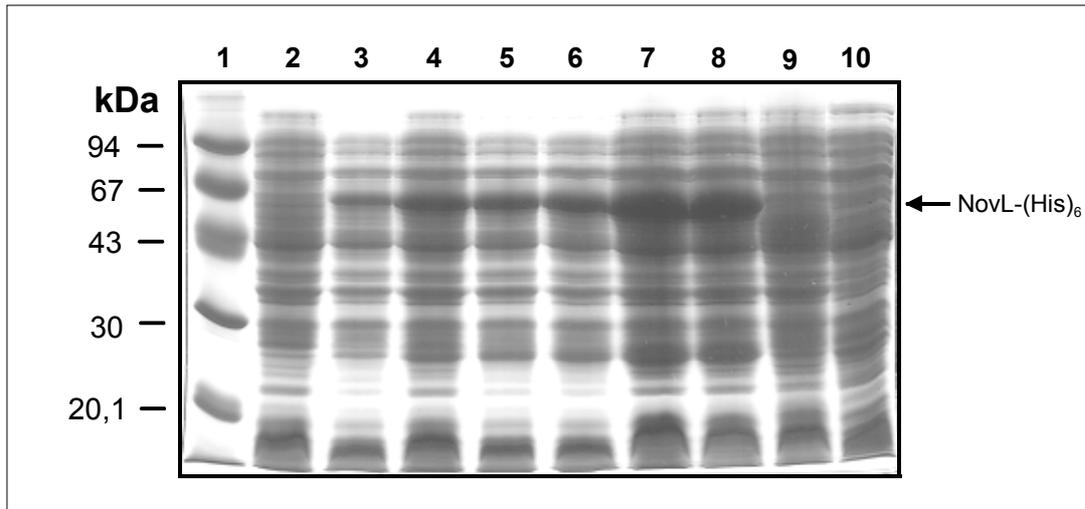


Abb. 26: SDS-PAGE (12 % Polyacrylamid) des zeitlichen Verlaufs der Expression des C-terminalen Hexa-Histidin-NovL-Fusionsproteins in *E.coli* XL1 Blue MRF⁺. Aufgetragen wurde das Gesamtzellprotein vor (Spur 2) und jeweils stündlich bis 5 Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG (Spur bis 3-7). Der Anteil des löslich exprimierten Proteins ist in Spur 10 aufgetragen; die Kontrolle mit leerem Vektor pQE70 befindet sich in Spur 9. Spur 8 enthält das Gesamtzellprotein von pMS84 (Konstrukt ohne His-Tag), 5 h nach Induktion. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung visualisiert.

Eine Bestimmung der enzymatischen Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität im Rohextrakt pMS80-transgener, IPTG-induzierter *E.coli*-Kulturen ergab mit durchschnittlich 5,11 pkat/mg Protein spezifische Aktivitäten, die lediglich knapp 9,5 % der im *S. spheroides* NCIMB 11891-Wildtyp gemessenen Werte (53,97 pkat/mg Protein) entsprachen. Die beobachtete Novobiocinsäure-Bildung war enzym- und substratabhängig. Vor Induktion konnte keine Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität registriert werden. Die Fusion des Hexa-Histidin-Tags an den C-Terminus von NovL hatte offensichtlich keinen Einfluß auf die Enzymaktivität, da im Kontrollexpressionskonstrukt pMS84 ohne His-Tag vergleichbare Werte erzielt wurden.

Eine Analyse des Anteils des gebildeten löslichen, überexprimierten Zielproteins zeigte, daß nur ein geringer Teil von NovL in löslicher Form vorlag (siehe Abb. 26). Im Vergleich wurden in der SDS-PAGE das Gesamtzellprotein und der lösliche Enzymextrakt nach Zellaufschluß und Zentrifugation aufgetragen (s. Kapitel III 5.4.7). Die Bildung sogenannter unlöslicher „Inclusion Bodies“ ist meist eine Folge intermolekularer Assoziation hydrophober Domänen während der Proteinfaltung („The QIAexpressionist“, 1999) und auf hohe Expressionsraten zurückzuführen. Inclusion Bodies stellen einen limitierenden Faktor für eine effektive Enzymreinigung unter nativen Bedingungen dar. Allerdings besteht auch die Möglichkeit einer Reinigung des Histidin-Fusionsproteins unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Rückfaltung. Alternativ kann eine Erniedrigung der Expressionsrate durch eine entsprechende Angleichung der Expressionsbedingungen eine Erhöhung der Bildung funktionell aktiven Enzyms mit sich bringen. Beide Strategien wurden überprüft und sind im folgenden beschrieben. Die Optimierung der Löslichkeit wurde mit dem C-terminalen Histidin-Fusionsprotein durchgeführt, da mit diesem System 7-fach höhere Aktivitäten im Vergleich zum pRSet B-Expressionssystem erzielt werden konnten.

4.2.2.1 Präparation des C-terminalen Novobiocinsäure-Synthetase-Histidin-Fusionsproteins unter denaturierenden Bedingungen und Rückfaltung

100 ml *E.coli*:pMS80-Zellkultur wurden bei einer OD_{600} von 0,6 mit 1 mM IPTG induziert und nach weiteren 4 h Wachstum bei 37°C geerntet und wie unter Kapitel III 5.1.1 beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation vom löslichen Anteil getrennt. Eventuell an die Membranfraktion des Zellpellets assoziiertes Protein wurde durch Waschen mit 0,5 % (v/v) Triton-X-100-Lösung fraktioniert (Kapitel III 5.4.8.1). Die unlösliche Fraktion wurde durch Harnstoffbehandlung solubilisiert und anschließend durch pH-Erniedrigung und Verdünnung renaturiert (III 5.4.8.2). Der Anteil des resolubilisierten Proteins in den jeweiligen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE-Analyse detektiert. Zusätzlich wurde die Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität nach Rückfaltung im umgepufferten Solubilisat bestimmt. Die SDS-PAGE (Abb. 27) verdeutlicht, daß die überexprimierte Novobiocinsäure-Synthetase tatsächlich unlöslich war, da nach Waschen der Inclusion Bodies der Hauptteil des Proteins im Pellet verblieb. Durch die Behandlung mit 8 M Harnstoff konnte ein geringer Teil der denaturierten Novobiocinsäure-Synthetase nach Verdünnung des Denaturans' wieder in Lösung gebracht werden, wie das Auftreten zweier Proteinbanden im Bereich von 61-64 kDa in der SDS-PAGE verdeutlichte. Allerdings wies das Resolubilisat auch nach Umpufferung keine NBSS-Synthetase-Aktivität mehr auf. Durch die angewandte Methode war zwar grundsätzlich eine Rückfaltung möglich, diese ging jedoch ohne die gewünschte Wiederherstellung der Enzymaktivität einher. Die Detektion zweier Proteinbanden im erwarteten Bereich deutet auf eine mögliche Protein-Degradation durch die Harnstoffbehandlung hin.

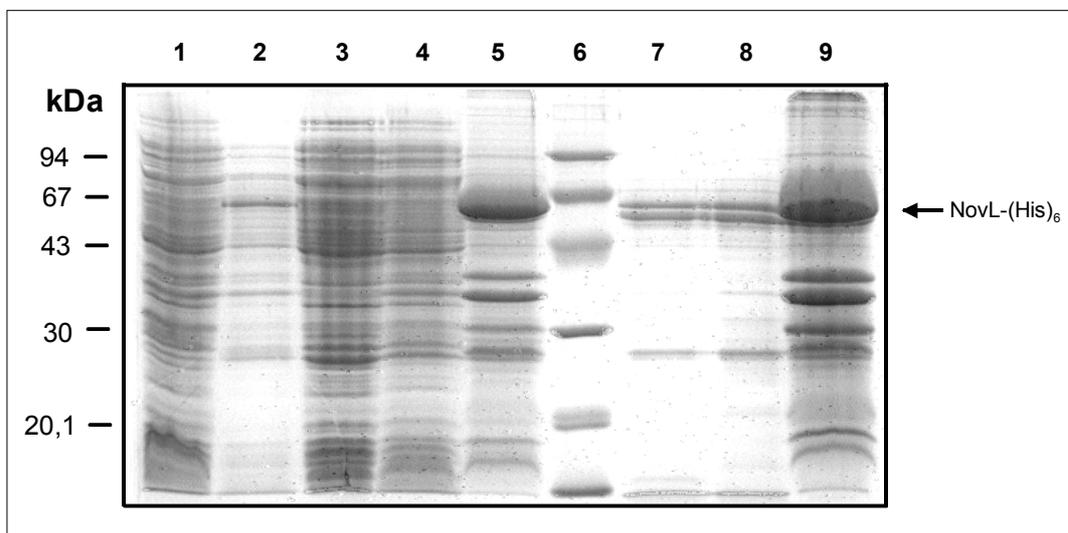


Abb. 27: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (12 % Polyacrylamid) zur Solubilisierung der Inclusion Bodies durch Behandlung mit 8 M Harnstoff und anschließender Rückfaltung. Dargestellt sind Gesamtzellprotein vor Induktion (Spur 1), 4 h nach IPTG-Induktion (Spur 2), lösliche Fraktion nach 4 h Induktion (Spur 3), Überstand nach Waschen der Inclusion Bodies mit 0,5 % Triton X-100 (Spur 4), Inclusion Body-Pellet nach Waschen mit 0,5 % Triton X-100 (Spur 5), Proteingrößenstandard (Spur 6), nach Harnstoffbehandlung (8 M) und Verdünnung rückgefaltete NovL vor Umpufferung (Spur 7) und nach Umpufferung (Spur 8), verbliebenes Inclusion Body-Pellet nach Harnstoffbehandlung (Spur 9).

4.2.2.2 Erhöhung der Löslichkeit der rekombinanten Novobiocinsäure-Synthetase durch Optimierung der Expressionsbedingungen

Auch eine Erniedrigung der Expressionsrate durch Variation der Kultivierungsbedingungen kann den Anteil des löslich exprimierten, nativen Zielproteins bewirken. Hilfreiche Maßnahmen stellen hierbei Reduktion der Wachstumstemperatur, Induktion zu einer späteren Wachstumsphase, Erniedrigung der IPTG-Konzentration und Minimierung der Expressionsperiode dar („The QIAexpressionist“, 1999). Weiterhin kann die Wahl eines anderen Wirtsstammes oder die Ergänzung des Kulturmediums mit Metallionen die Proteinlöslichkeit positiv beeinflussen. Durch Hoffman und seine Mitarbeiter wurde ein Fed-Batch-Fermentationsverfahren entwickelt, das eine Senkung des unlöslichen Anteils des exprimierten Metalloproteins von 60 % auf 10 % mit sich brachte (Hoffman et al. 1995). Bei dem angewandten Fermentationsverfahren wurde Vollmedium durch Eisen- und Magnesium-Salz-haltiges Minimalmedium und IPTG durch Lactose als Induktor ersetzt. Lactose verringert die Induktionsstärke im Expressionssystem. Es wurde vermutet, daß Metall-Aufnahme und Einbau in das untersuchte Metalloprotein limitierende Schritte für die Bildung des funktionsfähigen Enzyms darstellten und durch eine Reduktion der Wachstumsrate erhöht werden könnten.

In Tab. 39 sind die erhaltenen Resultate nach Variation einzelner, die Expressionrate beeinflussender Parameter und ihre Auswirkung in Bezug auf die Aktivität der überexprimierten Novobiocinsäure-Synthetase aufgeführt.

Tab. 39: Optimierung der Löslichkeit überexprimierter NovL-(His)₆.

Bedingungen						
Medium	Wachstums- temperatur [°C]	OD₆₀₀	IPTG-Kon- zentration [mM]	Wachs- tumsdauer nach Induktion	Spez. Aktivität [pkat/mg]	Aktivitäts- erhöhung [-fach]
LB	37	0,53	1	4 h	5,11	1
LB	37	0,65	1	3 h	14,06	2,8
LB	30	0,71	0,5	3 h	460,96	90,2
LB	30	0,65	0,2	3 h	232,88	45,6
LB mit 10 mM MgSO ₄	30	0,5	0,2	3 h	201,86	39,5
Minimalmedium mit je 10 mM MgSO ₄ und FeSO ₄	30	0,72	0,5	3 h	8,29	1,6

Die Daten belegen, daß auch im Fall der Überexpression von NovL-(His)₆ durch Erniedrigung der Expressionsrate die Bildung korrekt gefalteter, nativer Novobiocinsäure-Synthetase signifikant erhöht werden konnte. Eine 90-fache Steigerung der spezifischen Aktivität konnte letztendlich durch eine Kombination folgender Maßnahmen erzielt werden:

- Reduktion der Wachstumstemperatur von 37 auf 30°C
- Induktion bei einer höheren Zelldichte ($OD_{600} = 0,7$)
- Erniedrigung der IPTG-Konzentration von 1 auf 0,5 mM
- Reduktion der Expressionsdauer nach Induktion von 4 auf 3 Stunden

Auch die Art des verwendeten Mediums ist offensichtlich von Bedeutung. Im Gegensatz zu den Ergebnissen durch Hoffman et al. (1995) konnte nach Wachstum in Magnesium- und Eisen-supplementiertem Minimalmedium keine deutliche Aktivitätssteigerung beobachtet werden. Auch die Zugabe von $MgSO_4$ zum LB-Medium zeigte keine positiven Effekte.

Mit einer spezifischen Aktivität von 461 pkat/mg Protein in *E.coli* wurden 8,5-fach höhere Werte als im Wildtyp *S. spheroides* und doppelt so hohe Aktivitäten wie nach heterologer Expression in *S. lividans* TK24 erzielt. Somit war die Grundlage für eine Reinigung des rekombinanten Enzyms gegeben.

4.2.3 Reinigung der Novobiocinsäure-Synthetase als C-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein

pMS80-transgene *E.coli* XL1 Blue MRF⁻-Zellen wurden in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,7 kultiviert und mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach weiterem 3-stündigem Wachstum wurden die Zellen aus 1 l Kultur geerntet und, wie in Kapitel III 5.1.2 beschrieben, aufgeschlossen. NovL-(His)₆ wurde aus zellfreiem Enzymextrakt unter nativen Bedingungen über zwei säulenchromatographische Schritte, Nickel-Affinitäts-Chromatographie und Gelfiltrations-Chromatographie an Superdex 200, wie unter III 5.4.3 beschrieben, gereinigt.

Aus der Reinigungstabelle (Tab. 40) wird ersichtlich, daß die Novobiocinsäure-Synthetase mit einer Ausbeute von 55 % 115-fach gereinigt werden konnte. Ausgehend aus 1 l Zellkultur (4 g Biomasse) konnten im Zwei-Schritt-Reinigungsverfahren 1,4 mg natives Enzym mit einer Gesamtaktivität von 70,8 nkat erhalten werden.

Tab. 40: Reinigung der Novobiocinsäure-Synthetase nach Überexpression als C-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein in *E. coli* XL1 Blue MRF⁻.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [nkat]	Spezifische Aktivität [nkat/mg Protein]	Reinigung [-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	289,9	128,4	0,44	1	100
Nickel-Affinitäts-Chromatographie	4,3	69,3	16,1	36,6	54,0
Superdex TM 200 Gelfiltration	1,4	70,8	50,6	115,0	55,1

Dabei kam es zu einem 56 % igen Verlust der Gesamtaktivität nach der Nickel-Affinitäts-Chromatographie. Durchschnittlich 7,2 % der Gesamtaktivität wurden im Durchlauf und in der Waschfraktion (Waschpuffer mit 20 mM Imidazol) der Affinitätssäule gefunden. Denkbar wäre, daß der His-Tag aufgrund der Proteinfaltung nicht vollständig für eine Bindung an das Säulenmaterial zugänglich war. Es kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, daß

Proteasen eine Abspaltung des His-Tags verursachten. Es zeigte sich außerdem, daß das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol die Stabilität der Novobiocinsäure-Synthetase erheblich beeinträchtigte. Während nach 7-stündiger Aufbewahrung in Gegenwart von 250 mM Imidazol bei 4°C noch keine Aktivitätsverluste registriert werden konnten, wurden nach 23 h im Vergleich zur Kontrolle nur noch 3,1 % der Ausgangs-Aktivität detektiert.

Der anschließende gelchromatographische Reinigungsschritt an Superdex 200 diente sowohl zur weiteren Abtrennung von Fremdproteinen, als auch zur Entfernung des Imidazols. Das Elutionsprofil ist in Abb. 28 dargestellt. In Gegenwart von 50 µM PMSF und 5 mM DTT konnte nach zweitägiger Aufbewahrung bei 4°C lediglich ein 22 % iger Aktivitätsverlust beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen war auch eine Lagerung bei -20°C möglich. Nach 14 Tagen konnten dann immerhin noch 58 % der ursprünglichen Aktivität gemessen werden.

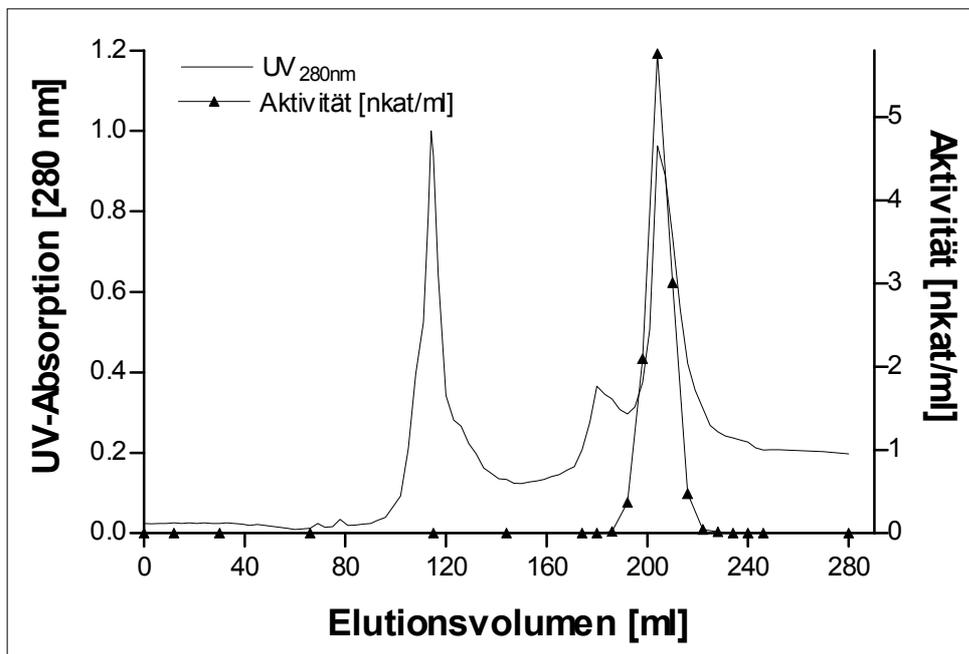


Abb. 28: Elutionsprofil der Reinigung der rekombinanten Novobiocinsäure-Synthetase durch Gelfiltrations-Chromatographie an Superdex 200.

Der Verlauf der Reinigung ist mittels SDS-PAGE in Abb. 29 dargestellt und zeigt, daß schon die Nickel-Affinitäts-Chromatographie einen effektiven Reinigungsschritt darstellt. Nach Gelfiltration lag die rekombinante Novobiocinsäure-Synthetase NovL-(His)₆ annähernd homogen vor.

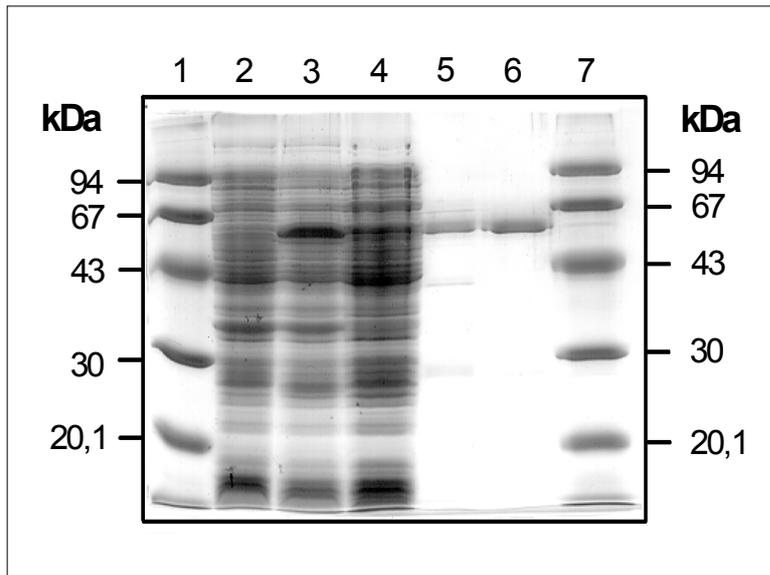


Abb. 29: SDS-PAGE des Verlaufs der Reinigung des Novobiocinsäure-Synthetase-Fusionsproteins NovL-(His)₆ nach heterologer Überexpression in *E.coli* XL1 Blue MRF'. Spur 1 und 7: Proteingrößenstandard; Spur 2: Gesamtzellprotein vor Induktion; Spur 3: Gesamtzellprotein 3 h nach IPTG-Induktion; Spur 4: zellfreier Enzymextrakt mit löslichem Proteinanteil (70 µg Protein); Spur 5: Nickel-Affinitätschromatographie (1,85 µg Protein); Spur 6: Superdex™ 200 (1 µg Protein).

Hiermit war der Nachweis erbracht, daß NovL alleine die Bildung der Amid-Bindung zwischen Ring A und Ring B katalysiert. Eine Beteiligung anderer Enzyme an der Reaktion konnte durch die homogene Reinigung des Enzyms in seiner aktiven Form ausgeschlossen werden.

4.3 Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Novobiocinsäure-Synthetase aus *S. spheroides*

Die Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion wurde wie bereits erwähnt schon Mitte der 70er Jahre erstmals durch Kominek und Meyer (1975) beschrieben, allerdings im Rohextrakt des Novobiocin-Produzenten *Streptomyces niveus*. Schon damals wurde die ATP-Abhängigkeit der Reaktion demonstriert und das Enzym hinsichtlich Substratspezifität und pH-Optimum vorläufig charakterisiert. Nachdem das Novobiocinsäure-Synthetase-Gen im Laufe dieser Arbeit identifiziert und das Enzym nach Überexpression in *E.coli* aktiv bis zu annähernder Homogenität gereinigt werden konnte, war eine nähere Charakterisierung des Enzyms vor allem hinsichtlich Substratspezifität und Reaktionsmechanismus von Interesse. Im Hinblick auf die Herstellung neuer Novobiocin-Derivate mit Hilfe der "Kombinatorischen Biosynthese" wäre eine relativ breite Substratspezifität von NovL wünschenswert. Hinweise zum Aktivierungs-Mechanismus dieser ATP-abhängigen Amid-Synthase-Reaktion könnten Aufschluß darüber geben, ob es sich tatsächlich um ein Adenylat-bildendes Enzym handelt, wie die Ergebnisse der Homologievergleichsanalyse vermuten ließen.

4.3.1 Bestimmung der Zeit-, Proteinmengen- und Cofaktor-Abhängigkeit

Die durch die gereinigte Novobiocinsäure-Synthetase katalysierte Produktbildung erwies sich sowohl als Zeit- als auch Proteinmengen-abhängig. Das Vorhandensein von divalenten Cofaktoren wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} während der Inkubation war essentiell für die Enzymaktivität. Ohne Zugabe von divalenten Cofaktoren wurden nur noch 20,3 % Restaktivität gemessen. Optimale Umsatzraten wurden in Gegenwart von jeweils 5 mM des entsprechenden Chloridsalzes erreicht. Die Zugabe von EDTA (0,5 mM) zum Inkubationsansatz bewirkte eine Aktivitätsminderung um 98,6 %. Eine lineare Reaktion wurde bis zu 5 μ g Protein pro Inkubationsansatz und über eine Inkubationsdauer von 10 min festgestellt. Die im weiteren durchgeführten Charakterisierungen sind im Anschluß aufgeführt.

4.3.2 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Das native Molekulargewicht der rekombinanten Novobiocinsäure-Synthetase NovL-(His)₆ wurde durch Gelfiltrations-Chromatographie an einer Superdex 200-Säule bestimmt (s. III 5.4.4). Das Elutionsvolumen des Enzyms betrug 198 ml. Somit konnte ein natives Molekulargewicht von 57-58 kDa bestimmt werden, daß in etwa dem theoretisch berechneten Wert von 58,1 kDa mit C-terminalem His-Tag entsprach.

Unter denaturierenden Bedingungen wurde ein Molekulargewicht von etwa 60,6 kDa festgestellt. Dies bedeutet, daß das Enzym in seiner aktiven Form als Monomer vorliegt.

4.3.3 Bestimmung des pH-Optimums

Das pH-Optimum wurde in 2 Puffersystemen bestimmt. Maximale Aktivitäten wurden in Tris-HCl-Puffer bei pH 8,0, dagegen in KP_i -Puffer um pH 7,0 gefunden (Abb. 30). Damit lag das pH-Optimum um eine pH-Einheit niedriger als in *S. niveus* (Kominek und Meyer, 1975). Dort wurde im Rohextrakt ein pH-Optimum von pH 9,0 detektiert.

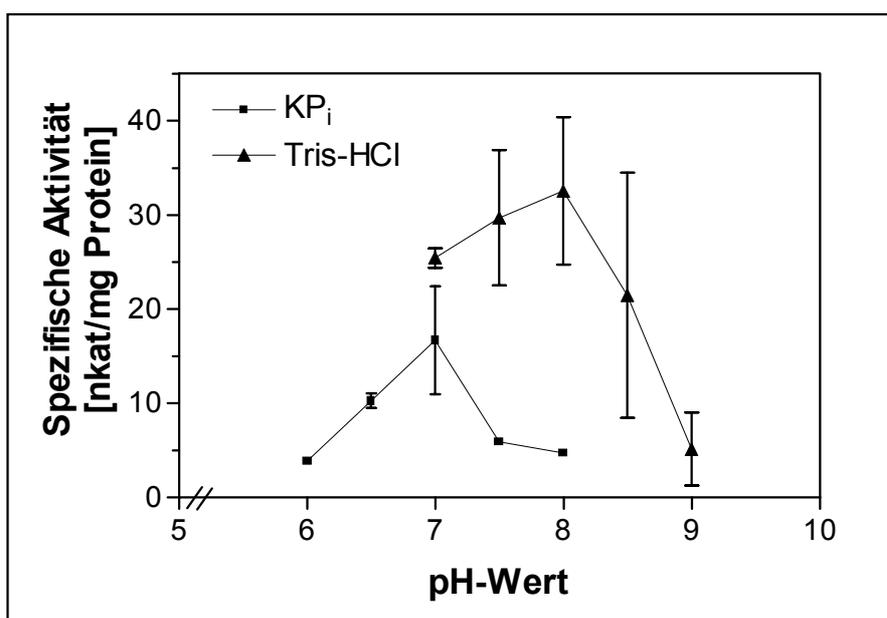


Abb. 30: pH-Abhängigkeit der Novobiocinsäure-Synthetase.

4.3.4 Einfluß der Ionenstärke

Der Einfluß der Ionenstärke auf die Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität wurde in Gegenwart von NaCl in einem Konzentrationsbereich von 0-400 mM bestimmt (Abb. 31). Es konnte eine annähernd lineare Aktivitätszunahme mit steigender Ionenstärke beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 400 mM NaCl wurden im Vergleich zur Kontrolle 2,3-fach höhere Werte registriert.

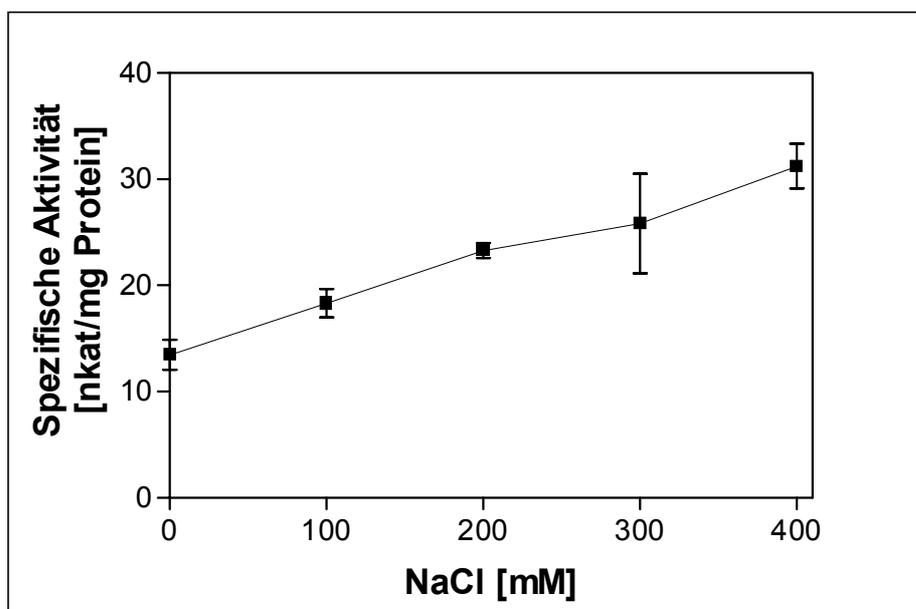


Abb. 31: Einfluß der Ionenstärke auf die Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität.

4.3.5 Substratspezifität des Nukleotidtriphosphates

Nachdem die ATP-Abhängigkeit der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion nachgewiesen worden war, wurde auch die Substratspezifität hinsichtlich der Nukleotide GTP, CTP und TTP überprüft (Tab. 41). Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität konnte nur in Gegenwart von ATP (100 %) und zu einem geringen Maß auch mit GTP (2,4 %) detektiert werden.

Tab. 41: Nukleotid-Abhängigkeit der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion. Der Novobiocinsäure-Synthetase-Assay wurde jeweils in Anwesenheit von 5 mM des entsprechenden Nukleotids, wie in Kapitel III 5.3.3 beschrieben, durchgeführt.

Nukleotid	Spezifische Aktivität [pkat/mg Protein]	Relative Aktivität [%]
ATP	26.126	100
GTP	632	2,4
TTP	< 0,014	< 0,001
CTP	< 0,014	< 0,001

4.3.6 Substratspezifität

Die Substratspezifität der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion wurde mit verschiedenen Ring A-Analoga untersucht, wobei insbesondere eine Substitution der Isoprenoid-Seitenkette an Position C-3 erfolgte (Tab. 42). Zwei der getesteten Ring A-Analoga wurden selbst synthetisiert. 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure (GBA) wurde enzymatisch aus 4HB und GPP durch die 4HB-Polyprenyltransferase aus *E. coli* AN385:pALMU3 hergestellt (III 6.4). Drupanin (3-Dimethylallyl-4-hydroxyzimtsäure) wurde aus Plicatin B durch methanolische Verseifung synthetisiert (s. III 8), und das Molekulargewicht von 232,2 (Summenformel: $C_{14}H_{16}O_3$) wurde durch EI-MS-Analyse (TSQ70-Spektrometer, Finnigan, Bremen) in Methanol verifiziert.

Nach Austausch der Dimethylallyl-Seitenkette durch eine Geranyl-Gruppe konnte im Vergleich zum natürlichen Substrat immerhin eine 26 % ige Produktbildung beobachtet werden. Das geranylierte Reaktionsprodukt wurde präparativ isoliert (III 6.5) und nach Reinigung über HPLC (III 6.1.3) mittels EI-MS identifiziert. Wie erwartet wurde ein Molekulargewicht von 463,3 bestimmt (theoretisch: $C_{27}H_{29}NO_6$, MW 463,53) (Abb. 32).

Geringe Umsatzraten (4,6 %) wurden auch mit 3-Methyl-4-aminobenzoessäure festgestellt. Aufgrund der geringen Produktbildung war jedoch eine Bestätigung der Struktur nicht möglich. Im Gegensatz dazu, wurde prenylierte 4-Hydroxyzimtsäure (Drupanin) nicht als Substrat akzeptiert. Die eher hohe Spezifität für die Carboxyl-Gruppe an C-1 zeigte sich auch für die Positionen C-3 und C-4, zumal 4-Hydroxyzimtsäure-Derivate mit polaren oder unpolaren Substituenten nicht umgesetzt wurden.

Ebenfalls keine Produktbildung wurde nach Inkubation mit 7-Amino-4-methylcumarin oder L-Tyrosin anstelle von Ring B registriert.

Tab. 42: Substratspezifität der rekombinanten Novobiocinsäure-Synthetase mit C-terminalem Hexa-Histidin-Rest. Die Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität wurde mit jeweils 2,5 µg gereinigtem Enzym und Substratkonzentrationen von jeweils 1 mM bestimmt (III 5.3.3). ¹3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure wurde, wie in Kapitel III 6.4 beschrieben, enzymatisch hergestellt. ²Die Synthese von 3-Dimethylallyl-4-hydroxyzimtsäure ist unter III 8 beschrieben.

Substrat	Spezifische Aktivität [pkat/mg Protein]	Relative Aktivität [%]
Ring A und Ring B	26.450	100
Ring B und Ring A-Analoga:		
3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure ¹	6.914	26,1
3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxybenzoesäure	< 0,014	< 0,001
3-(Carboxymethylaminomethyl)- 4-hydroxybenzoesäure	< 0,014	< 0,001
3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure	< 0,014	< 0,001
3,4-Dihydroxybenzoesäure	< 0,014	< 0,001
3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure	< 0,014	< 0,001
3-Methyl-4-aminobenzoessäure	1.229	4,6
3-Cyclohexyl-4-hydroxybenzoesäure	< 0,014	< 0,001
3-Dimethylallyl-4-hydroxyzimtsäure ²	< 0,014	< 0,001
Ring A und Ring B-Analoga:		
7-Amino-4-methylcumarin	< 0,014	< 0,001
L-Tyrosin	< 0,014	< 0,001

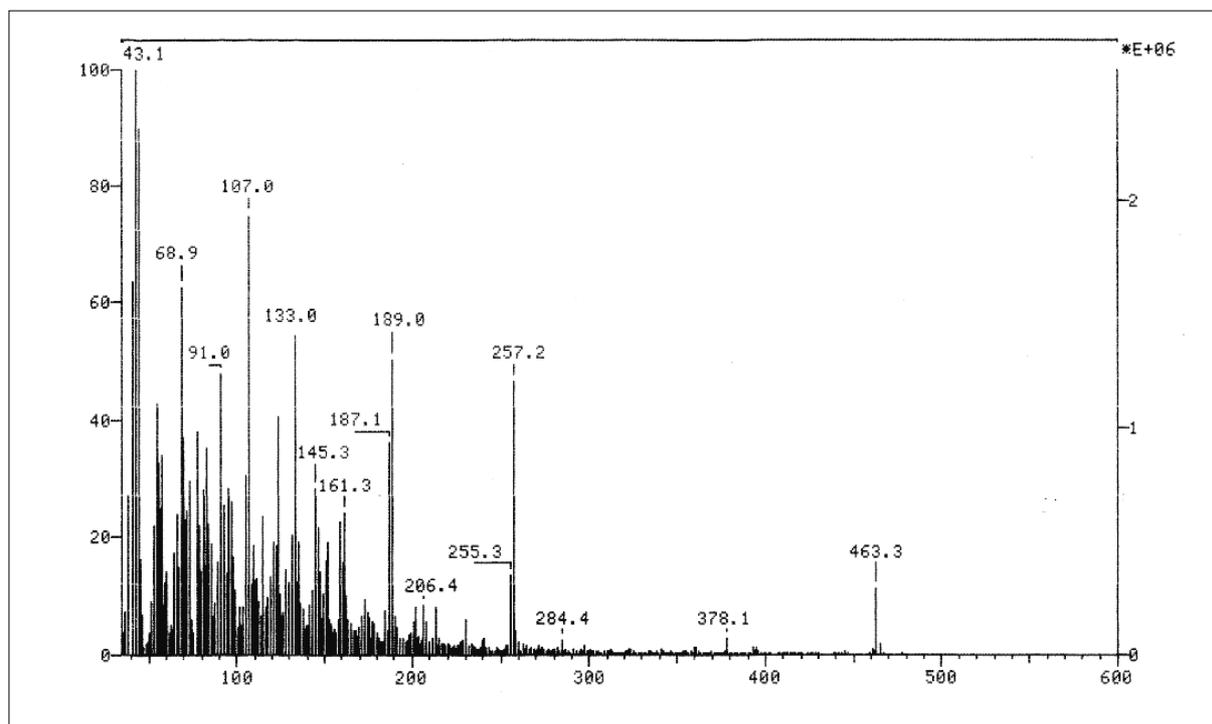


Abb. 32: EI-MS-Analyse des durch die Novobiocinsäure-Synthetase aus Ring B und GBA synthetisierten Reaktionsproduktes.

4.3.7 Michaelis-Menten-Kinetik der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion

Die kinetischen Parameter V_{\max} und K_m wurden für die Substrate Ring A und Ring B in Gegenwart von 5 mM ATP und 5 mM $MnCl_2$ bestimmt. Das jeweils konstant gehaltene Substrat wurde in einer Konzentration von 1 mM im Novobiocinsäure-Synthetase-Assay eingesetzt. Um zu gewährleisten, daß die Produktbildung im niedrigen Substratkonzentrationsbereich stets im linearen Bereich lag, mußten zur Bestimmung von Initialgeschwindigkeiten äußerst geringe Proteinmengen eingesetzt werden. Für die K_m -Wert-Bestimmung von Ring A wurden 4,5 $\mu\text{g/ml}$ Protein in einem Assay-Gesamtvolumen von 100 μl eingesetzt; im Fall von Ring B mußte das Gesamtvolumen bei einer Proteinkonzentration von 1,45 $\mu\text{g/ml}$ Protein auf 1 ml erhöht werden, um eine Produktbildung oberhalb der Nachweisgrenze der HPLC zu erhalten. Die Inkubationsdauer betrug stets 5 min. Die Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion zeigte die typische Michaelis-Menten-Kinetik. Mit Hilfe der entsprechenden Lineweaver-Burk-Methode wurde ein K_m -Wert von etwa 19 μM für Ring A und von 131 μM für Ring B ermittelt (Abb. 33).

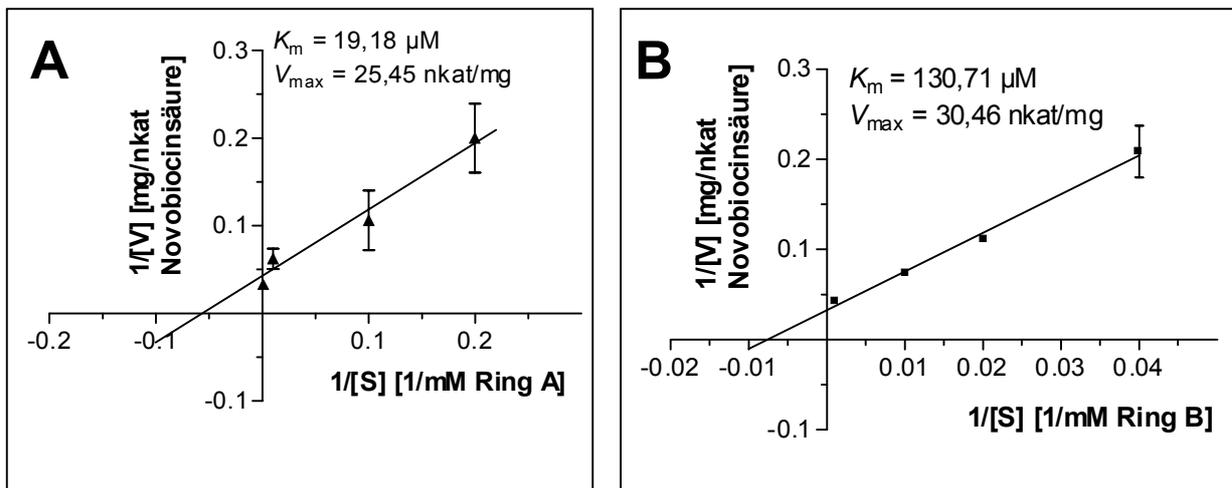


Abb. 33: Lineweaver-Burk-Plots zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für Ring A (A) und Ring B (B).

Mit einer spezifischen Aktivität von 50,6 nkat/mg Protein konnte eine Wechselzahl von $2,9 \text{ s}^{-1}$ für das gereinigte Enzym berechnet werden.

4.3.8 ATP-abhängiger Mechanismus der Aktivierung

Prinzipiell sind 2 Mechanismen für eine ATP-abhängige Aktivierung von Carbonsäuren möglich: zum einen ist die Bildung eines phosphorylierten Intermediates unter ADP-Freigabe denkbar. Diesen Aktivierungsmechanismus findet man sowohl bei Succinyl-CoA-Synthetasen (Walsh et al. 1970) und der O-Succinylbenzoat-CoA-Ligase aus *Galium mollugo* (Sieweke und Leistner, 1992), als auch bei der Glutamin-Synthetase-Reaktion (Midelfort und Rose, 1976). Weit häufiger kommt es zur Bildung eines Acyl-Adenylates. So stellt die Adenylierung den typischen Aktivierungsmechanismus der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen, Luciferasen, Acyl-CoA-Ligasen und 4-Coumarat:CoA-Ligasen dar

(Turgay et al. 1992). Der ATP-PP_i-Austausch-Assay bietet die Möglichkeit zur Bestimmung enzymatischer Adenylierungsaktivitäten. Da die Reaktion ein Gleichgewicht darstellt, kann man nach Zugabe von [³²P]PP_i zum Reaktionsansatz die Bildung von [³²P]ATP beobachten.

Die gereinigte rekombinante Novobiocinsäure-Synthetase wurde bezüglich möglicher Adenylierungsaktivität getestet (III 5.3.4). Wie die Daten in Tab. 43 zeigen, konnte enzymabhängig eine Adenylierungsaktivität nach Inkubation mit Ring A und ATP festgestellt werden. Dagegen konnte keine Adenylatbildung mit dem Substrat Ring B detektiert werden.

Tab. 43: Adenylierungsaktivität der Novobiocinsäure-Synthetase.

Die [³²P]ATP-Bildung wurde im ATP-PP_i-Austausch-Assay wie in Kapitel III 5.3.4 beschrieben mit gereinigter NovL-(His)₆ bestimmt. Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

Assay Bestandteile	Produktbildung
	[Bq]
Ring A, ATP, [³² P]PP _i , NovL	685,2
Ring B, ATP, [³² P]PP _i , NovL	11,8
ATP, [³² P]PP _i , NovL	12,4
Ring A, ATP, [³² P]PP _i , NovL (hitzedenaturiert)	3,2

Die Resultate unterstützen die Vermutung, daß auch im Falle der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion ein Adenylierungsmechanismus unter Bildung eines Ring A-AMP-Intermediates vorliegt (Abb. 34). Im Anschluß daran erfolgt dann der Transfer der 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure-Einheit auf die Aminogruppe von Ring B. Die Novobiocinsäure-Synthetase weist demnach sowohl Aktivierungs- als auch Transferfunktion auf. Die Beteiligung von Coenzym A an der Reaktion, also die Übertragung des aktivierten Intermediates auf CoA, erscheint als unwahrscheinlich, zumal die Zugabe von 0,5 mM CoA zum Novobiocinsäure-Synthetase-Assay die Novobiocinsäure-Bildung nicht erhöhte.

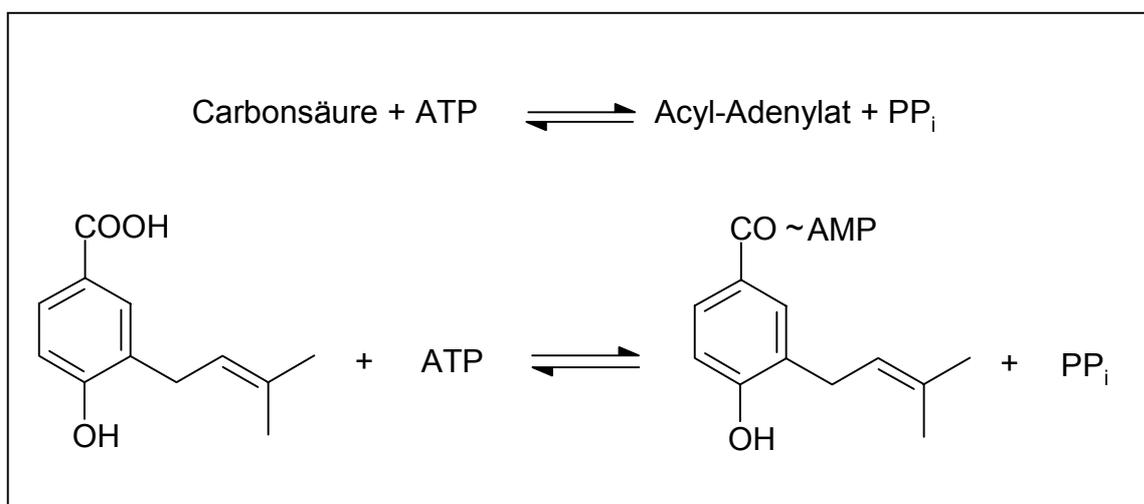


Abb. 34: Novobiocinsäure-Synthetase-vermittelte Aktivierung von Ring A (3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure) als Adenylat.

V Diskussion

1 Klonierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters aus *S. spheroides* NCIMB 11891

Eine mögliche Strategie zur Klonierung von Antibiotika-Biosynthese-Clustern aus Streptomyceten beruht auf der Beobachtung, daß oftmals die gleichen grundlegenden Biosynthesewege für die Produktion einer Vielzahl physiologisch unterschiedlicher Sekundärmetabolite genutzt werden. So kann man sich beispielsweise den sowohl strukturellen, als auch funktionalen und möglicherweise evolutionären Zusammenhang zwischen Antibiotika, welche desoxygenierte Zuckerkomponenten als strukturellen Bestandteil aufweisen, zu Nutze machen, um die entsprechenden Biosynthese-Gene zu identifizieren. 6-Desoxyhexosen werden im allgemeinen aus Nukleosiddiphosphat (dNDP)-aktivierten Hexosen gebildet, die mit Hilfe von dNDP-Hexose-4,6-Dehydratase zu einem zentralen Intermediat, der 4-Keto-6-Desoxyhexose, umgesetzt werden (Piepersberg, 1994; Liu und Thorson, 1994).

Schon Anfang der 90er Jahre gelang es, in 70 % der 43 untersuchten Streptomyceten-Stämme, die Sekundärmetaboliten mit 6-Desoxyhexose-Derivat-Anteil produzierten, durch Hybridisierung mit heterologen DNA-Sonden aus den Dihydrostreptose-Biosynthesegenen (*strDELM*) des Streptomycin-Produzenten *Streptomyces griseus*, darunter unter anderem mit Hilfe einer heterologen Dehydratase-Sonde, Hybridisierungssignale nachzuweisen (Stockmann und Piepersberg, 1992).

Auch mit Hilfe von homologen Dehydratase-Sonden konnten die Biosynthese-Gene der verschiedensten, glykosylierten Antibiotika kloniert werden, zumal alle erforderlichen Biosynthesegene sehr häufig in großen Gen-Clustern lokalisiert sind (Martin und Liras, 1989). dNDP-Hexose-4,6-Dehydratase aus Actinomyceten besitzen untereinander einen vergleichsweise höheren Verwandtschaftsgrad als Dehydratase aus anderen Bakterien-Species. Aus stark konservierten Bereichen der Dehydratase-Gene aus *S. griseus* N2-3-11, *S. violaceoruber* Tü22 und *Saccharopolyspora erythraea* DSM 5908 konnten degenerierte Primer abgeleitet werden, mit denen über PCR aus genomischer DNA Dehydratase-Genfragmente aus 8 verschiedenen Actinomyceten-Species amplifiziert werden konnten (Decker et al. 1996). Damit war die Möglichkeit zur Herstellung homologer Dehydratase-Sonden gegeben, die dann zum Screenen einer DNA-Bank eingesetzt werden können. Mit Hilfe dieser Methode konnte beispielsweise das Biosynthese-Cluster des Orthosomycinantibiotikums Avilamycin aus *S. viridochromogenes* Tü57 (Gaisser et al. 1997) und des Rubradirins aus *S. achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061 (Sohng et al. 1997) identifiziert werden. Auch das Screening genomischer DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit einer homologen Dehydratase-Sonde führte bei der Suche nach dem Acarbose-Biosynthese-Cluster zum Erfolg (Stratmann et al. 1999). Kürzlich wurden in gleicher Weise die Biosynthesegene der zur Familie der kanzerostatisch wirksamen Chromopeptid-Antibiotika gehörenden Substanz C-1027 aus *S. globisporus* isoliert (Liu und Shen, 2000).

Ein 6-Desoxyhexose-Derivat, die Noviose, ist auch in der Struktur des Novobiocins enthalten, womit die Grundlage für eine erfolversprechende Identifizierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters durch Screening mit homologen Dehydratase-Sonden gegeben war. Im Rahmen eines Großprojektes innerhalb der Arbeitsgruppe gelang die PCR-Amplifikation von zwei verschiedenen Fragmenten aus genomischer DNA von *S. spheroides* NCIMB 11891 mit Hilfe der auch durch Decker, Bechthold und Mitarbeiter verwendeten degenerierten dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Primer (Z. Wang, persönliche Mitteilung). Über Homologie-Vergleich konnten beide Fragmente eindeutig als putative dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen identifiziert werden. Tatsächlich führte das Screening der Cosmid-Bank aus *S. spheroides* mit beiden Dehydratase-Sonden zur Detektion von zwei Cosmidgruppen mit jeweils vier überlappenden Cosmiden.

Auch in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, daß das Screening mit homologen Dehydratase-Sonden nicht immer die Identifizierung des gesuchten Biosyntheseclusters mit sich bringt. So wurde im Falle des Daunorubicin-Biosynthese-Clusters aus *S. peuceticus* berichtet, daß die an der Biosynthese der Daunosamin-Komponente des Anthracyclins beteiligte TDP-Glucose-4,6-Dehydratase nicht im Cluster lokalisiert ist (Gallo et al. 1996). Der Versuch, die Biosynthesegene des Nystatin-Produzenten *S. noursei* über dieses Verfahren zu detektieren, schlug fehl (Zotchev et al. 2000). Alle hergestellten Deletionsmutanten bewahrten ihre Fähigkeit zur Bildung dieses Polyen-Antibiotikums. Statt dessen wurde anhand der erhaltenen Sequenzdaten vermutlich ein neues Makrolid-Cluster entdeckt.

Ziel war also im weiteren die Identifizierung derjenigen Cosmidgruppe, welche die Novobiocin-Biosynthese-Gene enthält. Hierbei erwies es sich als zweckdienlich, daß auch das oder die Resistenzgene, deren Genprodukte den jeweiligen Antibiotika-Produzenten vor einer Selbstintoxikation schützen, in enger Kopplung mit den Biosynthese-Genen im Cluster vorliegen und oftmals coreguliert exprimiert werden. (Cundliffe, 1989; Martin und Liras, 1989; Mansouri und Piepersberg, 1991). Ein Novobiocin-Resistenzgen *gyrB^R* wurde schon 1988 aus *S. spheroides* kloniert (Thiara und Cundliffe, 1988) und später auch in seiner Funktion näher charakterisiert (Thiara und Cundliffe, 1989 und 1993). Die Detektion eines Novobiocin-Resistenzgens auf einer der beiden Cosmidgruppen könnte folglich einen weiteren Anhaltspunkt für das Vorliegen des gesuchten Novobiocin-Clusters liefern.

Zur Differenzierung der beiden Cosmidgruppen wurden in der vorliegenden Arbeit Randomsequenzierungen durchgeführt, mit dem Ziel, weitere Gene mit Bezug zur Novobiocin-Biosynthese zu finden. Gleich zu Beginn des Sequenzierprojektes konnte das Novobiocin-Resistenz-Gen *gyrB^R* in Cosmidgruppe 1 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß diese Gruppe die gesuchten Biosynthese-Gene enthält. Durch Southern Hybridisierungen der beiden Cosmidgruppen mit einer homologen *gyrB^R*-Sonde konnte daraufhin eindeutig belegt werden, daß das Resistenzgen lediglich auf Cosmidgruppe 1 lokalisiert ist (Dissertationsschrift A. Mühlenweg, 1999). Ein letztendlicher funktioneller Nachweis des Novobiocin-Clusters mußte dennoch erbracht werden, zumal Biosynthese- und Resistenzgene nicht immer geclustert vorliegen. So wurde zum Beispiel festgestellt, daß das Thiostrepton-Resistenzgen aus *S. laurentii* nicht im Bereich der Thiostrepton-Biosynthesegene lokalisiert ist (Smith et al. 1995).

Die vier Cosmide der Cosmidgruppe 1 wurden daraufhin eingehend durch Restriktions- und Hybridisierungskartierung und weitere Sequenzanalysen charakterisiert. Die Beteiligung des identifizierten DNA-Bereiches an der Biosynthese des Antibiotikums sollte einerseits durch die heterologe Expression eines Schlüsselenzyms der Novobiocin-Biosynthese und zum anderen durch ein Geninaktivierungsexperiment demonstriert werden. Letzteres wurde im Rahmen der Dissertationsarbeit von A. Mühlenweg durchgeführt.

2 Kartierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters

Zur Kartierung der mit der dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Sonde und *gyrB*^R-Sonde hybridisierenden Cosmide fanden die gängige Methode der Restriktionskartierung und die innerhalb dieser Arbeit etablierte Cosmid-Hybridisierungskartierung Verwendung. Diese Cosmid-Kartierungs-Methode basiert im Prinzip auf einem durch Rackwitz etablierten Verfahren, wobei die durch λ -Terminase linearisierten, mit dem zu kartierenden Restriktionsenzym partialverdauten Cosmide nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Southern Hybridisierung mit [³²P]-markierten, cos-site-komplementären Oligosonden detektiert wurden (Rackwitz et al. 1984 und 1985). Die Länge der einzelnen, detektierten DNA-Fragmente repräsentiert den Abstand der spezifischen Restriktionsschnittstellen vom rechten oder linken Ende des Cosmid-Inserts. Die Methode wurde insofern abgewandelt, als auf die Verwendung einer radioaktiv-markierten Sonde verzichtet wurde. Statt dessen wurden Digoxigenin-markierte Sonden aus rechts- beziehungsweise linksseitig des Inserts flankierenden SuperCos 1-Bereichen hergestellt. Die Verwendung der λ -Terminase zur Linearisierung der Cosmide erwies sich in diesem Zusammenhang als nachteilig. Dieses hochspezifisch innerhalb der cos-Stelle schneidende Restriktionsenzym ist zum einen teuer und wies zum anderen in der Praxis vor allem keine zufriedenstellende Aktivität auf. Die Detektion von aufgrund unvollständigen λ -Terminase-Verdaus nicht-linearisierter Cosmid-DNA würde eine Auswertung unmöglich machen. Aus diesem Grund wurde ein anderes, möglichst nicht im Insert schneidendes Restriktionsenzym ausgewählt. Dabei fiel die Wahl auf *Hind*III, das allerdings neben einer Schnittstelle im SuperCos 1-Vektor auch eine weitere Schnittstelle im mittleren Bereich der Inserts aufwies. Aus diesem Grund war eine Kartierung von jeweils beiden Seiten des Inserts erforderlich.

Erste Ergebnisse der Restriktionskartierung ergaben, daß die vier Cosmide aufgrund des zum Teil gemeinsamen Bandenmusters überlappten und wahrscheinlich nativ waren. Dabei umfaßten die Cosmide 9-6G und 10-9C mit etwa 58 kb den gesamten Bereich aller Cosmide. Die Hybridisierungskartierung wurde für diese beiden Cosmide mit *Eco*RI und *Bgl*II durchgeführt und erlaubte die Erstellung einer recht genauen vorläufigen Restriktionskarte (siehe Kapitel IV, Abb. 14). So war mit Hilfe des hier beschriebenen Verfahrens die äußerst zeitsparende Kartierung rekombinanter, in den SuperCos 1-Vektor einklonierter DNA bis zu einer Größe von 40 kb möglich.

Die Effizienz dieses Kartierungsprinzips zeigte sich zum Beispiel auch bei der Charakterisierung des Daptomycin-Biosynthese-Clusters aus *S. roseosporus* (Michenney et al. 1998). Selbst das 350 kb große, lineare Plasmid SCP1 aus *S. coelicolor* konnte unter

Anwendung einer analogen Hybridisierungstechnik bis auf zwei 0,8 kb große Lücken vollständig *EcoRI*-kartiert werden (Redenbach et al. 1998). Dennoch zeigten sich die Grenzen dieser Methode vor allem bei der Kartierung kleiner Fragmente und solcher, deren Größe sich nur in wenigen 100 Basenpaaren unterschied.

3 Sequenzierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Cosmid 9-6G vollständig und Cosmid 10-9C partiell sequenziert. Ein Teilbereich von 6,5 kb des insgesamt 58 kb umfassenden, klonierten Abschnitts der genomischen DNA aus *S. spheroides* wurde von A. Mühlenweg (Dissertationsschrift 1999) sequenziert. Nach Auswertung der Sequenzdaten konnten insgesamt 42 offene Leserahmen detektiert werden. Die Zuordnung möglicher Funktionen dieser Gene erfolgte vorwiegend über Homologievergleiche mit bereits bekannten Genen. Ihre postulierte Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese wird im folgenden diskutiert. Dabei wird zunächst auf die Biosynthese der jeweiligen Ring-Einheiten des Novobiocins (Ring A, B und C) eingegangen und im Anschluß daran die Verknüpfung der einzelnen Struktur-Einheiten und abschließenden Modifikationen innerhalb der letzten Biosyntheseschritte näher erläutert. Schließlich werden regulatorische Elemente und Transport-Funktionen besprochen.

3.1 Biosynthesegene des Desoxyzuckers Novoise (Ring C)

Gerade die in den letzten Jahren auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Biogenese Desoxyzucker-haltiger Antibiotika und einer Vielzahl von Substanzklassen mit den verschiedensten strukturellen Funktionen verdeutlichen die grundlegenden Gemeinsamkeiten einzelner Biosyntheseschritte (Liu und Thorson, 1994) und erlauben die Postulierung eines detaillierten Biosyntheseweges für die Ring C-Einheit des Novobiocins.

Die Bildung des Desoxyzuckers erfolgt direkt aus Glucose. Schon in den 60er Jahren konnte durch Fütterungsexperimente nachgewiesen werden, daß das Hexose-Grundgerüst vollständig im Novobiocin erhalten bleibt (Birch et al. 1962). Die einzelnen postulierten Biosyntheseschritte beinhalten Nukleotidylierung von Glucose-1-phosphat zu dTDP-Glucose über eine dTDP-1-Glucose-Synthase (NovV), Umsetzung zu dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose mittels einer dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (NovT), 3,5-Epimerisierung über eine dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose-3,5-Epimerase (NovW) und die 4-Ketoreduktion unter Beteiligung einer dTDP-4-Keto-6-Desoxyhexose-Reduktase (NovS). Die Methylierung des Desoxyzuckers an Position C-5“ könnte einer der letzten Schritte innerhalb der Novoiose-Biosynthese darstellen und durch die putative C-Methyltransferase NovU katalysiert werden. Der hypothetische Biosyntheseweg für Ring C ist in Abb. 35 (Reaktion I bis V) illustriert.

Die entsprechenden Strukturgene *novSTUVW* konnten 374 bp stromaufwärts des Resistenzgens *ngyrB*^R detektiert werden. Die abgeleiteten Genprodukte dieser auf der Basis

von Homologievergleichen identifizierten Gene stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit Kandidaten für die Katalysierung der Reaktionen I bis V innerhalb des vorgeschlagenen Noviose-Biosynthese-Weges dar. Ihre unmittelbare Kopplung innerhalb des Clusters deutet darauf hin, daß diese Gene gemeinsam mit noch zwei weiteren stromaufwärts befindlichen ORFs, *novR* und *novS*, transkribiert werden: Die intergenischen Bereiche waren mit maximal 62 bp nur sehr klein und bei *novQRS* und *novVW* lag jeweils eine Überlappung von Stop- und Start-Codon vor. Zu erwartende, vor *novR* befindliche Promotor-Elemente konnten nicht eindeutig identifiziert werden.

Die Beteiligung der Gene *novT* und *novU* an der Noviose-Biosynthese konnte eindeutig durch ein Geninaktivierungsexperiment belegt werden (A. Mühlenweg, 1999). Die nach Integration eines Inaktivierungskonstruktes mit Teilbereichen von *novT* und *novU* durch Einfach-Crossover ins Genom von *S. spheroides* erhaltene Mutante war nicht mehr zur Novobiocin-Produktion befähigt. Statt dessen konnte die Bildung des Aglykons des Novobiocins, der Novobiocinsäure, nachgewiesen werden. Da nach Integration des Konstruktes eine Tandem-Duplikation beider Gene *novT* und *novU* mit jeweils einer intakten und einer unvollständigen Kopie vorlag, wurde die Unterbrechung der Biosynthese auf einen polaren Effekt auf die stromabwärts vom Integrationsort lokalisierten Gene *novV* und *novW* zurückgeführt. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls dafür, daß die besagten Zuckerbiosynthese-Gene eine Transkriptionseinheit bilden.

O-Methylierung und O-Carbamoylierung an Position C-4“ beziehungsweise C-3“ des Desoxyzuckers stellen vermutlich abschließende Modifikationen nach Verknüpfung der einzelnen Ring-Einheiten dar und werden in Abschnitt 3.4 diskutiert.

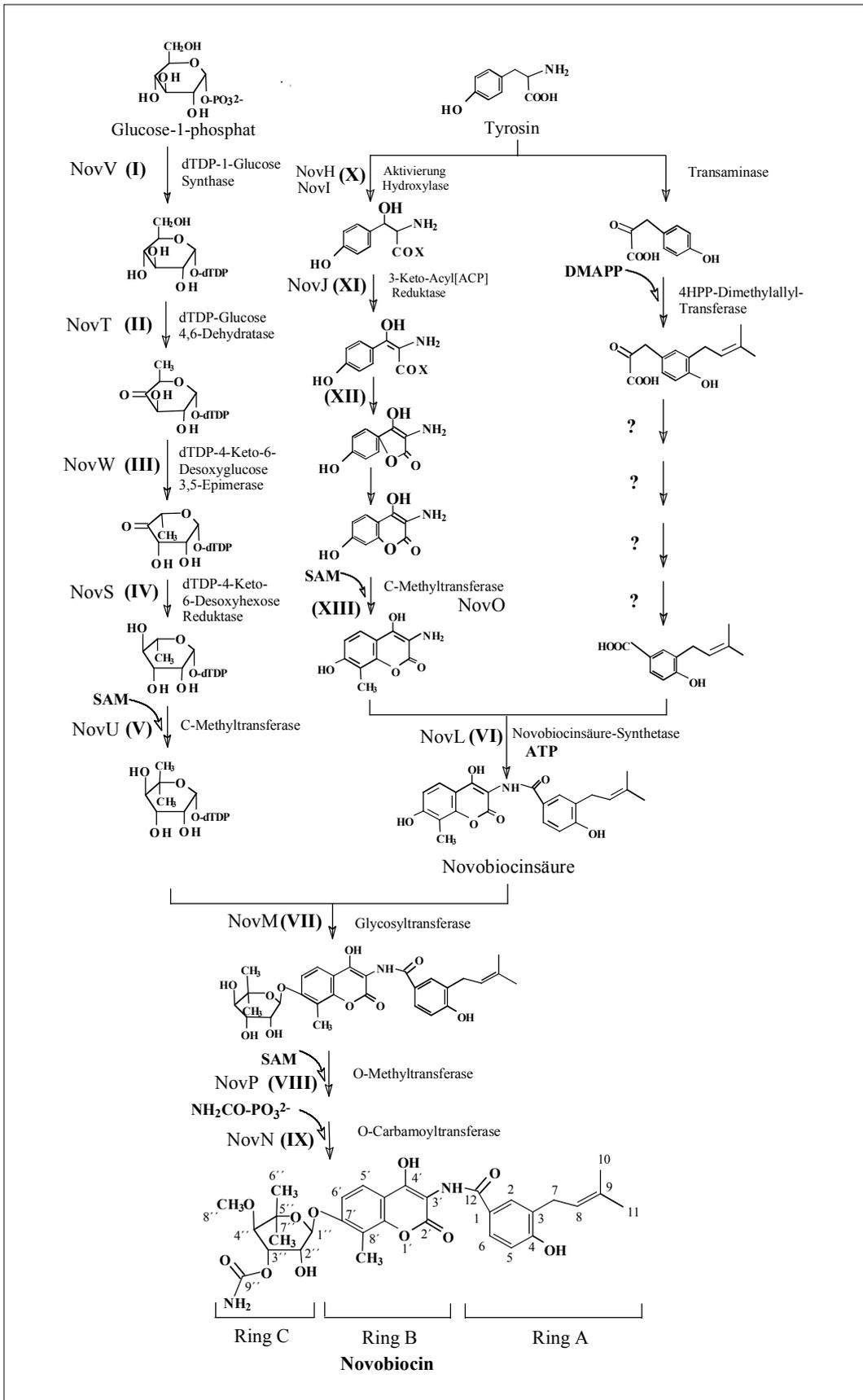


Abb. 35: Hypothetisches Novobiocin-Biosynthese-Schema. Diejenigen Biosynthese-Schritte, denen ein entsprechendes Gen zugeordnet werden konnte, sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet. Eine nähere Erläuterung findet sich im Text. SAM = S-Adenosylmethionin.

3.2 Biosynthese der Aminocumarin-Einheit (Ring B)

Die Vorstellungen hinsichtlich der Biosynthese des Aminocumarin-Rings sind noch recht spekulativer Natur. Ausgangspunkt für die Biosynthese von Ring B stellt (ebenso wie für Ring A) Tyrosin dar. Fütterungsstudien an *S. niveus* mit L-Tyrosin-U-¹⁴C-¹⁵N lieferten den experimentellen Nachweis, daß die Aminogruppe des Cumarins aus Tyrosin stammt (Calvert et al. 1972). Auch pflanzliche 7-Oxycumarine leiten sich vom Tyrosin ab und es stellte sich die Frage, ob die Bildung der Ring B-Einheit des Novobiocins ebenso wie bei Pflanzen durch *ortho*-Hydroxylierung und Lactonisierung der *cis*-Zimtsäure erfolgen könnte. Ebenfalls mit Hilfe von Inkorporationsexperimenten mit Carboxyl-[¹⁸O]-Tyrosin konnte jedoch gezeigt werden, daß das heterocyclische Sauerstoffatom des Aminocumarins aus der Carboxylgruppe des Tyrosins stammt (Bunton et al. 1963). Man schlußfolgerte, daß der Ringschluß eher unter Beteiligung eines oxidativen Cyclisierungs-Mechanismus erfolgt. Ein hypothetisches Biosyntheschema für Ring B ist in Abb. 35 dargestellt (Reaktionen X bis XIII) und könnte die stereospezifische β -Hydroxylierung des Tyrosins mit anschließender Oxidierung und Ringschluß durch oxidative Cyclisierung umfassen.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse lassen vermuten, daß das Genprodukt von *nov1* einen möglichen Kandidaten für die postulierte β -Hydroxylierungsreaktion repräsentieren könnte. Das daraus abgeleitete 407 Aminosäuren lange Protein wies signifikante Homologien zu Enzymen der Cytochrom P450-Superfamilie auf. Zusätzlich zu der mit 40 % hohen Identität zu NikQ aus dem Nikkomycin-Produzenten *Streptomyces tendae*, zeigte Nov1 Ähnlichkeiten zu ORF20 aus dem Chloroeremomycin-Biosynthese-Cluster von *Amycolatopsis orientalis* (38 % Identität) und zu Cytochrom P-450lin aus *Pseudomonas incognita* (36 % Identität). Die Biosynthese der Nukleosid-Einheit der Peptidyl-Nukleosid-Antibiotika Nikkomycin X und I erfolgt aus L-Histidin über 4-Formyl-4-imidazolin-2-on unter Beteiligung von NikQ, wie durch Insertionsinaktivierungs- und anschließende Komplementationsexperimente demonstriert werden konnte. Dabei wurde NikQ eine bifunktionale Rolle zugeschrieben, die sowohl die β -Hydroxylierung des L-Histidins, als auch die nachfolgende Fragmentierung zu 4-Formyl-4-imidazolin-2-on beinhaltet. Der biochemische Nachweis der Monooxygenierung des L-Histidins durch die aktive heterologe Expression von NikQ gelang allerdings nicht. Auch für das Genprodukt von *orf20* wurde eine mögliche Funktion als Hydroxylase diskutiert, denn das Heptapeptid-Grundgerüst des Chloroeremomycins enthält zwei in β -Stellung hydroxylierte Tyrosin-Reste. Im Falle der 8-Methyl-Linalool-Hydroxylase P-450lin konnte der funktionelle Nachweis nach heterologer Expression in *E. coli* erbracht werden.

Nov1 enthält die für Cytochrom P450-Enzyme konservierten, typischen Motive der O₂-Bindungsstelle und den Bereich der Häm-Bindungsdomäne mit dem hochkonservierten Cystein, über welches die kovalente Bindung der Häm-Gruppe erfolgt (Poulos et al. 1987) (Abb. 36).

Enzym	Aminosäure	Sequenz	Aminosäure	Sequenz
NovI	240	NCYGLMIGGDETGRHA	346	KHFTTFAYGSHYCLGHYLGGM
NikQ	227	NCDALVSGGNETTRHA	333	RHLGFIQGNHYCIGSSLAKL
PCZA361.17	229	NCDNVLIGGNETTRHA	335	RHITTFGHGMHCLGSALARI
P-450lin	238	NLTTLTVGGNETTRNS	344	QHVGFSGSQHVCVCSRLAEM
Consensus		Nc--llIGGnEtRha		-H-tF--G-HyClG--larm
Motiv		O ₂ -Bindungsstelle		Häm-Bindungsstelle

Abb. 36: Aminosäurealignment der konservierten Bereiche der putativen O₂- und Häm-Bindungsstelle von NovI mit Cytochrom P450-Monooxygenasen. Hoch konservierte Bereiche sind schwarz hinterlegt, ebenso der hochkonservierte Tyrosin-Rest im Consensus der O₂-Bindungsstelle und der Cystein-Rest innerhalb der Häm-Bindungstasche. NikQ = Cytochrom P450 aus *Streptomyces tendae* (Datenbanknummer: AJ250199), PCZA361.17 = P450-verwandte Oxidase/Hydroxylase aus *Amycolatopsis orientalis* (Datenbanknummer: AJ223998), P-450lin = 8-Methyl-Linalool-Hydroxylase aus *Pseudomonas incognita* (Datenbanknummer: L23310).

Die vorliegenden Sequenzdaten und die Tatsache, daß analog im Coumermycin A1-Biosynthese-Cluster ein entsprechendes Cytochrom P450-Gen (*cumD*) mit mehr als 90 % Identität zu NovI enthalten ist (Z. Wang, persönliche Mitteilung), sprechen dafür, daß NovI im Zusammenhang mit der Biosynthese der Aminocumarin-Einheit eine β -Hydroxylierung katalysieren könnte. Allerdings nutzen bakterielle Cytochrom P450-Enzyme der Klasse I zwei weitere Komponenten für den Elektronentransport während der Monooxygenase-Reaktion: eine FAD-abhängige Ferredoxin-Reduktase, die die Elektronen von NAD(P)H empfängt, und ein Eisen-Schwefel-Ferredoxin, welches als weiterer Elektronenüberträger zwischen der Reduktase und den Substrat-bindenden Cytochrom P450 fungiert (Munro und Lindsay, 1996). Innerhalb des sequenzierten Bereiches (53,1 kb) konnten keine dieser Komponenten über Datenbankrecherchen identifiziert werden. Eine ähnliche Situation zeigt sich auch im Nikkomycin-Biosynthese-Cluster. Allerdings konnte dort ein putatives Ferredoxin-Homologon, *nikG*, in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem weiteren Cytochrom P450-Gen, *nikF*, detektiert werden. Die Frage, ob NikG als Elektronenüberträger für beide Cytochrom P450-Enzyme fungiert, bleibt noch zu klären. Die Beobachtung, daß P450 Monooxygenase-Gene nicht zwangsläufig mit Genen, die für ein Ferredoxin und eine spezifische Reduktase codieren, assoziiert sind, wurde mehrfach für Actinomyceten beschrieben (O'Keefe und Harder, 1991). Daß beide Komponenten möglicherweise durch alternative Redox-Systeme ersetzt werden können, konnte schließlich durch *in vitro*-Rekonstitutionsexperimente gezeigt werden. So war beispielsweise die aktive, heterologe Expression des DoxA Cytochrom P450 ohne die Coexpression eines entsprechenden Ferredoxins und einer Ferredoxin-Reduktase in *S. lividans* möglich (Lomovskaya et al. 1999). Diese Hydroxylase aus *S. peuceticus* katalysiert die Oxidation von 13-Desoxy-Carminomycin und -Daunorubicin zu den entsprechenden 13-Dihydro-Formen. Für das Cytochrom P450105D1 aus *S. griseus* war sogar eine aktive *in vitro*-Expression in *E. coli* unter Nutzung endogener Redox-Partner beschrieben worden (Taylor et al. 1999). Eine Klärung der Frage, ob die Ring B-Biosynthese

tatsächlich eine β -Hydroxylierungsreaktion beinhaltet, und ob diese Reaktion durch *NovI* katalysiert wird, kann nur durch zukünftige Inaktivierungsexperimente und/oder den enzymatischen Nachweis beantwortet werden.

Unmittelbar stromabwärts von *novI* befinden sich zwei weitere Gene, *novJ* und *novK*, die für Enzyme codieren, welche in die im Anschluß an die β -Hydroxylierung postulierte Oxidation und die oxidative Cyclisierung involviert sein könnten. Beide Gene besitzen ausgeprägte Homologien zu 3-Ketoacyl-[Acyl-Carrier-Protein]-Reduktasen der Fettsäure-Biosynthese. Für *NovJ* wurden im Homologievergleich 46 % identische Aminosäuren zu FabG aus *Vibrio harveyi* und für *NovK* eine Identität von 38 % zu einem entsprechenden putativen Enzym aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) gefunden. Das für diese zur Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (Short-Chain-Dehydrogenases/Reductases, SDR) gehörende charakteristische Glycin-reiche Motiv der $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ -Bindungsstelle GxxxGxG (x=variable Aminosäure) konnte in der Sequenz beider Proteine gefunden werden, allerdings im Fall von *NovK* in leicht modifizierter Form. Innerhalb der Fettsäure-Biosynthese katalysieren diese Enzyme die Coenzym-abhängige Reduktion des über einen Phosphopantethein-Cofaktor an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebundenen Ketoacyl-Restes zum entsprechenden Hydroxyacyl-ACP. Vergleichbare Ketoreduktasen findet man auch bei Polyketidsynthasen, die in analoger Weise Acyl-CoA-Einheiten zu den verschiedensten Ringsystemen verknüpfen und gegebenenfalls modifizieren, woraus die breite strukturelle Vielfalt dieser Antibiotika-Klasse resultiert (Bentley and Bennet, 1999). Ob die diskutierte Beteiligung von *NovJ* und *NovK* an der Bildung von Ring B in der Tat zutrifft, kann auch hier nur durch den funktionellen Nachweis geklärt werden.

Wie auch schon für die in Abschnitt 3.1 besprochenen 6-Desoxyzuckergene ist die Kopplung der postulierten Aminocumarin-Biosynthese-Gene innerhalb des Clusters auffällig. *novHIJKLMN* könnten in Anbetracht der beobachteten kurzen intergenischen Sequenzbereiche ebenfalls eine einzige Transkriptionseinheit bilden. Promotor-Elemente stromaufwärts von *novH* konnten allerdings auch hier nicht eindeutig identifiziert werden. In diesem Zusammenhang ist die Rolle des *novH*-Produktes innerhalb der Ring B-Biosynthese interessant. *NovH* weist signifikante Homologien zu den zur Familie der Adenylat-bildenden Enzymen zugehörigen nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen auf (Turgay et al. 1992). Die ursprüngliche Annahme, daß dieses Enzym an der Bildung der Amidbindung zwischen Ring A und Ring B beteiligt sein könnte, konnte in späteren Experimenten widerlegt werden (siehe Abschnitt 4). Während den übrigen eng gekoppelten Genen *novL*, *novM* und *novN* zweifellos andere Funktionen zugeordnet werden konnten, war für *novH* ein Zusammenhang zur Ring B-Biosynthese denkbar, zumal ein entsprechendes Homologon (*cumC*) auch im Coumermycin A1-Cluster zu finden ist.

Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen aktivieren Acyl-Substrate ATP-abhängig in Form eines Acyl-Adenylates und binden dieses in einem zweiten Schritt über eine Thioesterbindung an einen kovalent gebundenen 4'-Phosphopantethein-Cofaktor (Marahiel et al. 1997). Auch innerhalb der Sequenz von *NovH* konnten die katalytisch relevanten Bereiche der Adenylierungsdomäne und die 4'-Phosphopantetheinyl-Bindungsstelle identifiziert werden. Ein ähnlicher Mechanismus bei der Ring B-Biosynthese würde die Aktivierung der Carboxyl-

Gruppe des Tyrosins und die nachfolgende kovalente Bindung über den Phosphopantethein-Cofaktor beinhalten (Abb. 35, Reaktion X). Im Anschluß an die β -Hydroxylierung und Oxidation des an NovH gebundenen Tyrosins, wäre die oxidative Cyclisierung unter Freigabe des Aminocumarin-Rings denkbar. Weitere funktionelle Untersuchungen hinsichtlich dieser Hypothese sind unerlässlich.

Die Einführung der Methylgruppe an Position C-8' des Cumarin-Rings (Abb. 35, Reaktion XIII) könnte durch das Genprodukt von *novO* vermittelt werden. S-Adenosyl-Methionin (SAM) dient dabei als Methylgruppen-Donor, denn nach Fütterung mit L-[¹⁴C]-Methionin fand ein gleichmäßiger Einbau in die in Frage kommenden Positionen in Ring B und C des Novobiocins statt (Birch et al. 1960). NovO zeigte mit 27 % iger Identität Homologien zur möglichen C-Methyltransferase LmbW aus *Streptomyces lincolnensis* und wies einen Bereich mit Ähnlichkeiten zu dem an der SAM-Bindung beteiligten konservierten Motiv [hhD/EhGxGxG, h= hydrophobe Aminosäure, x= beliebige Aminosäure) (Kagan and Clarke, 1994) auf. Auch bei NovU handelt es sich vermutlich um eine C-Methyltransferase, allerdings wird diesem Enzym eher eine Funktion bei der C-Methylierung des Desoxyzuckers zugeschrieben, da das Gen mit den Zuckergenen assoziiert vorliegt und Homologien zu Methyltransferasen der 6-Desoxyzucker-Biosynthese zeigte.

3.3 Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit (Ring A)

3.3.1 Die Prenylierung erfolgt auf der Stufe des 4-Hydroxyphenylpyruvates

Die ersten innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konzentrierten sich auf den biochemischen Nachweis der an der Ring A-Bildung beteiligten Prenylierungsreaktion. Die Bearbeitung aromatischer Prenyltransferasen stellte zu diesem Zeitpunkt ein Schwerpunktgebiet innerhalb der Arbeitsgruppe dar: Die für die Biosynthese des Phytoalexins Shikonin regulatorisch bedeutsame 4-Hydroxybenzoat-3-Geranyltransferase aus Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. konnte partiell gereinigt und biochemisch charakterisiert werden (Mühlenweg et al. 1998). Des weiteren konnte die gleichfalls membranständige 4-Hydroxybenzoat-Polyprenyltransferase, die die Eingangsreaktion der Ubichinon-Biosynthese katalysiert, in *Escherichia coli* identifiziert und das entsprechende Strukturgen kloniert werden (Siebert et al. 1992).

Die zu Anfang dieser Arbeit auf der Basis von Fütterungsexperimenten mit *S. niveus* in den 60er und 70er Jahren verfügbaren Daten zur Biosynthese der Ring A-Einheit des Novobiocins, belegten den Einbau von Tyrosin (Bunton et al. 1963; Calvert et al. 1972). Die weiteren Schritte erfordern eine Verkürzung der C-3-Seitenkette und Prenylierung des aromatischen Ringsystems. Die Stufe der Prenylierung war derzeit noch nicht geklärt und widersprüchliche Ergebnisse gaben Anlaß zu kontroversen Diskussionen. Kominek (1972) postulierte eine Prenylierung auf der Stufe der 4-Hydroxybenzoesäure (4HB) beziehungsweise eines 4-Hydroxybenzoesäure-Derivates, da er nach gleichzeitiger Fütterung von 4HB und Ring B eine gesteigerte Novobiocin-Produktion beobachten konnte.

Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht bei alleiniger Fütterung von entweder 4HB oder Ring B. Die Ergebnisse der Inkorporationsexperimente durch Calvert et al. (1972) sprachen jedoch gegen diese Hypothese. Demnach betrug die spezifische Einbaurate von [³H]-4HB für Novobiocin nach Zufütterung lediglich 0,1 %, während die verhältnismäßig hohe [¹⁴C]-4-Hydroxyphenylpyruvat (4HPP)-Einbaurate von 5,2 % in Ring A die Effizienz dieses Phenylpropan-Derivates als Vorstufe belegte. Unter Berücksichtigung der nur geringen 4-Hydroxymzimtsäure-Inkorporationsrate wurde 4HPP als Substrat der Prenylierungsreaktion vorgeschlagen.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte eine spezifische, lösliche Prenyltransferase in *S. spheroides* identifiziert und partiell gereinigt werden, die die Bildung von 3-Dimethylallyl-4-hydroxyphenylpyruvat (3DMA-4HPP) aus 4HPP und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) katalysiert. Anhand der Substratspezifität dieser Prenyltransferase konnte eine deutliche Abgrenzung zu aromatischen Prenyltransferasen des Primärstoffwechsels aufgezeigt werden. 4HB wurde im Gegensatz zu der an der Ubichinon-Biosynthese beteiligten Polyprenyltransferase nicht als aromatisches Substrat akzeptiert (Ashby et al. 1992; Melzer und Heide, 1994). Während die 4HB-Polyprenyltransferase aus *E. coli* auch länger-kettige Prenyldiphosphat-Substrate, wie Farnesyl- und Solanesyldiphosphat umsetzt (Melzer und Heide, 1994), wurde schon Geranyldiphosphat durch die hier beschriebene Prenyltransferase kaum als Substrat genutzt. Deutliche Unterschiede in der Substratspezifität sind auch zu der 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat-Polyprenyltransferase der Menachinon-Biosynthese zu verzeichnen (Shineberg und Young, 1976). Anders als bei der hier untersuchten Prenyltransferase handelt es sich bei den an der Ubichinon- und Menachinon-Biosynthese beteiligten Enzymen um membranständige Enzyme. Auch in die Tocopherol- und Plastochinon-Biosynthese sind aromatische Prenyltransferasen involviert (Soll et al. 1980; Marshall et al. 1985). Es ist jedoch nicht zu erwarten, daß diese beiden zuletzt genannten isoprenoiden Chinone in Streptomyceten auftreten. Aromatische Prenyltransferasen spielen auch im Sekundärmetabolismus eine bedeutende Rolle. So findet man diese Enzymklasse beispielsweise bei einer Vielzahl Phytoalexin-produzierender Pflanzen (Tahara und Ibrahim, 1995), aber auch in Pilzen, wie zum Beispiel im Echinulin-bildenden Ascomyceten *Aspergillus amstelodami* (Allen, 1972) oder dem Produzenten des gelben Pigmentes Apulvinon, *Aspergillus terreus* (Takahashi et al. 1978). Keine der genannten, in der Literatur beschriebenen Prenyltransferasen ist in ihrer Substratspezifität mit der hier vorgestellten 4HPP Dimethylallyltransferase aus *S. spheroides* vergleichbar, womit die Beteiligung dieses Enzyms an der Novobiocin-Biosynthese plausibel erscheint, zumal diese die Isoprenylierung eines von Tyrosin abgeleiteten Intermediates beinhaltet.

Die hier erhaltenen Resultate sind gut mit den von Calvert et al. (1972) beschriebenen Ergebnissen vereinbar und lassen die Schlußfolgerung zu, daß die Prenylierung auf der Stufe des 4HPPs erfolgt. 4-Hydroxyphenyllactat und 4-Hydroxymzimtsäure wurden nur minimal (5,7 %) beziehungsweise nicht durch die detektierte Prenyltransferase umgesetzt. Die durch Kominek (1972) beobachtete gesteigerte Novobiocin-Bildung nach Fütterung mit 4HB und Ring B war wohl eher auf unspezifische Effekte zurückzuführen.

3.3.2 Die Suche nach dem 4HPP Dimethylallyltransferase-Gen

Der endgültige Beweis dafür, daß die identifizierte 4HPP Dimethylallyltransferase im Zusammenhang mit der Novobiocin-Biosynthese steht, sollte durch die Klonierung des entsprechenden Strukturgens innerhalb des Biosynthese-Clusters erbracht werden.

Die Herstellung von Ring A-Defektmutanten und anschließende Wiederherstellung des Phänotyps nach Komplementation mit Wildtyp-DNA-Bereichen könnte ein mögliches Verfahren zur Identifizierung und Isolierung des gesuchten Gens darstellen. Auf diese Weise wurde auch das *ubiA*-Gen der 4HB-Polyprenyltransferase erfolgreich kloniert (Siebert et al. 1992). Im Rahmen der durch Ritchie durchgeführten Studien zum Novobiocin-Resistenzmechanismus und zur Regulation der Resistenz-Induktion an *S. niveus* wurden zwar Novobiocin-Defektmutanten durch ungerichtete Mutagenese hergestellt, doch wiesen nahezu sämtliche Mutanten einen genetischen Defekt innerhalb der Ring B-Biosynthese auf (Cushing, 1989; Hoggarth et al. 1995). Die Isolierung Ring A-defizienter Stämme, die für die hier vorliegende Fragestellung hätten genutzt werden können, gelang damals allerdings nicht.

Nachdem das Novobiocin-Biosynthese-Cluster in Folgearbeiten identifiziert und charakterisiert werden konnte, bot sich die Wahl einer alternativen Klonierungsstrategie an. Durch Screening der Cosmide mit einer degenerierten Sonde aus konservierten Prenyltransferase-Bereichen sollte geprüft werden, ob das gesuchte Gen auf dem untersuchten genomischen DNA-Bereich lokalisiert ist. Unter diesem Aspekt erwies sich allerdings die Tatsache, daß aromatische Prenyltransferasen sowohl eu- als auch prokaryotischen Ursprungs auf molekularbiologischer Ebene noch weitgehend unerforscht waren, als nachteilig. Eine Vielzahl von Prenyltransferasen, die aromatische Substrate isoprenylieren, wurden bis heute biochemisch untersucht und charakterisiert, hingegen sind für diese Enzyme kaum Sequenzdaten vorhanden. Deutlich vollständiger ist die Datenlage hinsichtlich der Prenyltransferasen der Isoprenoid-Biosynthese, zu denen erheblich mehr Sequenzdaten vorliegen.

Die Funktion zweier hoch konservierter, Asparaginsäure-haltiger Bereiche I und II (DDxxxxD und DDxxD, x = beliebige Aminosäure) als Prenyldiphosphat-Bindungsstellen wurde in den 90er Jahren vielfach diskutiert und konnte auch durch *in vitro*-Mutagenesen verifiziert werden (Ashby und Edwards, 1990; Joley und Edwards, 1993; Koyama et al. 1996). Schließlich konnte durch röntgenstrukturspektroskopische Untersuchungen an einer Farnesyldiphosphat-Synthase die direkte Bindung der Diphosphat-Gruppen des DMAPP über Magnesium-Brücken an die Carboxylgruppen der Aspartat-Reste aus Motiv I nachgewiesen werden (Tarshis et al. 1996).

Aus Motiv I einer Vielzahl pro- und eukaryontischer Prenyltransferasen wurde eine degenerierte 30 bp-Oligonukleotid-Sonde abgeleitet und zum Screening der bereits durch die *ngyrB*^R- und dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Sonde identifizierten Cosmide eingesetzt. Zwar konnten Hybridisierungssignale bei niedriger Stringenz detektiert werden, doch handelte es sich dabei eher um eine unspezifische Sondenbindung mit einem Großteil der geblohteten DNA. Ein 2,8 kb großes *Bam*HI-Fragment aus Cosmid 9-6G, welches ein verhältnismäßig starkes Signal lieferte, wurde kloniert und sequenziert. Die

Sequenzauswertung lieferte allerdings keine Hinweise für das Vorliegen einer Prenyltransferase in diesem DNA-Bereich. Es konnten 3 offene Leserahmen (*orf17*, *orf10* und *orf11*) gefunden werden, wovon Orf10 und Orf11 eindeutig als ABC-Transporter-Komponenten identifiziert werden konnten, während das von *orf17* abgeleitete Genprodukt keine Homologien zu bekannten Proteinen aufwies.

Durch das hier angewandte Screening mit einer aus dem DMAPP-Bindungsmotiv I abgeleiteten degenerierten Sonde konnte das 4HPP Dimethylallyltransferase-Gen nicht auf den untersuchten Cosmiden identifiziert werden. Im Verlauf der Arbeit wurde der durch die Cosmide 9-6G und 10-9C abgedeckte genomische DNA-Bereich von *S. spheroides* fast vollständig sequenziert und nach Sequenzanalyse konnten keinerlei Homologien zu Prenyltransferasen festgestellt werden. Eine gezielte Suche nach beiden Motiven brachte ebenfalls keine aussagekräftigen Ergebnisse. Die motivisch höchst konservierten Bereiche DDxxD und DDxxxxD konnten in 17 % der überprüften Genprodukte, darunter auch in Orf7, NovU und der resistenten Gyrase B-Untereinheit, bei denen es sich offensichtlich nicht um Prenyltransferasen handelt, aufgefunden werden.

Die eingangs erwähnte Tatsache, daß Prenyltransferasen nur geringe Homologien untereinander aufweisen, und daß diese auf äußerst kurze Motive beschränkt sind, läßt zusammen mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen den Schluß zu, daß die Motive nicht für eine eindeutige Identifizierung von Prenyltransferasen geeignet erscheinen. Dabei muß außerdem berücksichtigt werden, daß die Zahl der in der Aminosäure-Sequenz aufgeklärten aromatischen Prenyltransferasen, insbesondere des Sekundärstoffwechsels, äußerst gering ist. Daß das Motiv DDxxD nicht uneingeschränkt in allen Prenyltransferasen vorzufinden ist, konnte zum Beispiel für die Dimethylallyltryptophan-Synthase (DMATS) gezeigt werden. Die DMATS aus *Claviceps* sp. stellt das am besten untersuchte Enzym aus der Mutterkornalkaloid-Biosynthese dieser pflanzen-parasitischen Pyrenomyceten dar und katalysiert die Isoprenylierung von Tryptophan an Position 4 mit DMAPP. Das Enzym konnte erfolgreich aus *Claviceps fusiformis* (bei dem ursprünglich als *C. purpurea* bezeichneten Stamm handelt es sich vermutlich um eine Vertauschung) bis zur Homogenität gereinigt (Gebler und Poulter, 1992) und das codierende Gen (*dmaW*) über reverse Genetik kloniert und aktiv exprimiert werden (Tsai et al. 1995). Unter Verwendung dieses DMATS-Gens als heterologe Sonde, konnte das entsprechende Gen (*cpd1*) auch in *C. purpurea* identifiziert werden (Tudzynski et al. 1999). Beide Gene zeigten in Datenbankrecherchen keine Homologien zu Prenyltransferasen, und das schon in *DmaW* reduziert auftretende putative Motiv DDxxN wurde in *Cpd1* weiter zu xDxxN modifiziert. Die Identität zwischen beiden DMATS-Synthasen auf Aminosäureebene betrug unerwarteterweise nur 68 % Identität. Die strukturelle Variabilität innerhalb der Prenyltransferasen kann auch am Beispiel der Undecaprenyldiphosphat-Synthetasen aufgezeigt werden. Die Primärstruktur dieser Z-Typ-Prenyltransferasen unterscheidet sich außerordentlich von allen anderen Prenyltransferasen und das hochkonservierte Aspartat-Motiv DDxxD ist in dieser Enzymklasse nicht zu finden (Apfel et al. 1999).

Unabhängig vom diskutierten Sachverhalt muß berücksichtigt werden, daß das gesuchte 4HPP Dimethylallyltransferase-Gen möglicherweise nicht auf den bisher untersuchten Cosmiden lokalisiert ist. Auch wenn nicht allen identifizierten offenen Leserahmen eine

Funktion innerhalb des Novobiocin-Biosynthese-Clusters zugeordnet werden konnte, besteht immer noch die Möglichkeit, daß das Cluster nicht vollständig auf den Cosmiden 9-6G und 10-9C vorhanden ist.

Ein weiterer, parallel zum Sonden-Screening in dieser Arbeit verfolgter Ansatz, stellte das Screening der identifizierten Cosmide nach Expression von Prenyltransferase-Aktivität dar. Zu diesem Zweck wurden 10-14 kb große Cosmidbereiche heterolog in *S. lividans* TK24 exprimiert und funktionell auf Aktivität hin untersucht. Eine ähnliche Vorgehensweise fand auch bei der Suche nach dem Undecaprenyldiphosphat-Synthase-Gen aus *Micrococcus luteus* B-P 26 Anwendung und führte zum Erfolg (Shimizu et al. 1998). Bei dem dort durchgeführten Shotguncreening der Genbank auf Prenyltransferase-Aktivität wurde der Assay direkt auf Replikafiltern mit [¹⁴C]-markiertem Prenyldiphosphat-Substrat durchgeführt und positive Kolonien autoradiographisch detektiert. Im Falle des 4HPP Dimethylallyltransferase-Gen-Screenings offenbarte sich die Problematik, daß ungünstigerweise *S. lividans* TK24 nicht als Expressionswirt für die funktionellen Prenyltransferase-Aktivitätsuntersuchungen geeignet erschien. Das Auftreten eines während der HPLC-Analytik auftretenden Substanzsignals im Bereich der Retentionszeit der Prenyltransferase-Reaktionsprodukte machte eine Auswertung unmöglich, da dieses neue Reaktionsprodukt nicht-reproduzierbar nach Inkubation von zellfreiem Rohextrakt mit [1-¹⁴C]-markierten Prenyldiphosphat-Substraten auftrat und nicht-enzymatischer Natur war. Weitere Experimente wurden daraufhin zurückgestellt in der Hoffnung, daß die Erkenntnisse aus den fortlaufenden Sequenzierungsarbeiten nähere Hinweise für eine Identifizierung des gesuchten Gens liefern würden. Wie schon erwähnt lieferte die Sequenzanalyse allerdings keine weiteren Anhaltspunkte.

Die Frage, ob das gesuchte Prenyltransferase-Gen auf den untersuchten Cosmiden lokalisiert ist, und welches der in Frage kommenden offenen Leserahmen für das entsprechende Enzym codiert, konnte schlußendlich nicht beantwortet werden. Einigen der detektierten ORFs konnte noch keine Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese zugeordnet werden. Zukünftige, gezielte Geninaktivierungs-Experimente könnten unter diesem Aspekt zur Aufklärung beitragen. Weiterhin könnten zusätzliche Hinweise durch Vergleich der Sequenzdaten mit denen des Clorobiocin-Biosynthese-Clusters erhalten werden. Das Vorliegen des Prenyltransferase-Gens ist auch in diesem Cluster zu erwarten, da in der Struktur des Clorobiocins lediglich die Methylgruppe der Cumarin-Einheit durch ein Chloratom ersetzt ist.

3.3.3 Seitenkettenverkürzung des Tyrosins zur prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure

Der erste Schritt innerhalb der Ring A-Biosynthese stellt möglicherweise die Transaminierung des Tyrosins zum 4-Hydroxyphenylpyruvat (4HPP) dar (Abb. 35). Dieser Weg wurde schon durch Calvert et al. (1972) vorgeschlagen, zumal es dieser Arbeitsgruppe nicht gelang, ein nicht-oxidatives Deaminierungssystem in *S. niveus* nachzuweisen. Interessanterweise wurde innerhalb des Novobiocin-Biosynthese-Clusters ein Gen (*novF*) mit Ähnlichkeit zu putativen Prephenat-Dehydrogenasen entdeckt (44 % bzw. 43 % Identität zur Prephenat-Dehydrogenasen aus *S. coelicolor* A3(2) und *Amycolatopsis orientalis*). Ob die Funktion von NovF tatsächlich in der Umwandlung von Prephenat zu 4HPP besteht, müsste in Folgeuntersuchungen verifiziert werden.

Nach Isoprenylierung des 4HPP sind nun zwei grundsätzliche Möglichkeiten der Seitenkettenverkürzung denkbar, die analog auch beim Ferulat-Katabolismus von *Pseudomonas fluorescens* diskutiert wurden (Mitra et al. 1999). Zum einen könnte eine Parallele zur Biosynthese der Benzoesäuren in Pflanzen gegeben sein, wobei nach Reduktion des 3-DMA-4HPP zum prenylierten 4-Hydroxyphenyllactat über das entsprechende 4-Hydroxyzimtsäure-Derivat eine Seitenkettenverkürzung über einen β -Oxidationsmechanismus in Analogie zum Abbau von Fettsäuren erfolgen könnte (Abb. 37, Variante A). Die erhaltenen Sequenzdaten lieferten bisher keinen eindeutigen Anhaltspunkt über die Beteiligung dieser Reaktionsschritte innerhalb der Ring A-Biosynthese.

Einen alternativen Weg könnte die direkte Abspaltung der C2-Einheit von einem prenylierten Phenylpropan-Derivat in Form einer Retroaldol-Reaktion zum prenylierten 4-Hydroxybenzaldehyd darstellen (Abb. 37, Variante B). Tatsächlich konnte innerhalb des Novobiocin-Biosynthese-Clusters ein Gen, *novR*, identifiziert werden, das mit 48 % iger Identität Homologie zu einer putativen Aldolase aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) aufwies.

Die Detektion eines *novR*-Homologons innerhalb des Clorobiocin-Biosynthese-Clusters, sowie Inaktivierungsexperimente und weitere Funktionsuntersuchungen könnten diese Hypothese stützen.

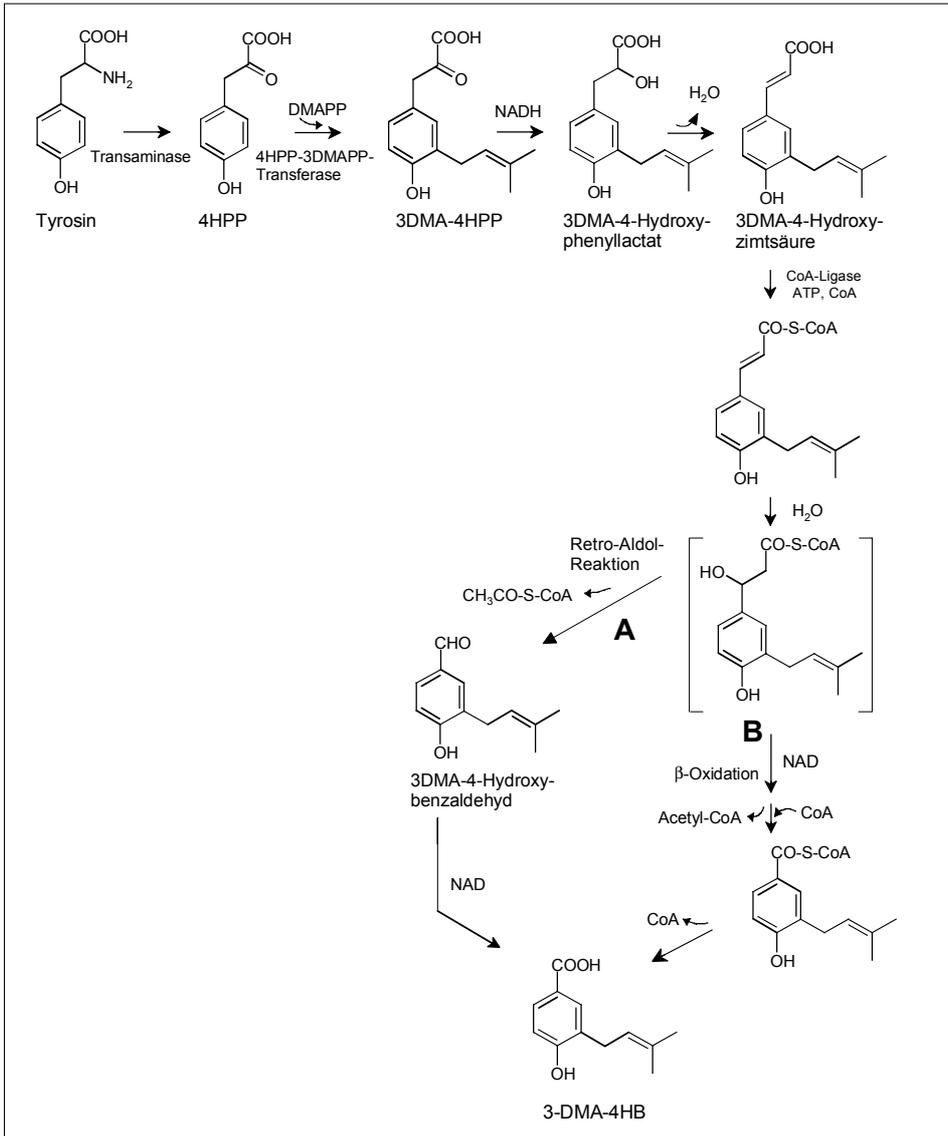


Abb. 37: Hypothetisches Biosyntheschema für die Seitenkettenverkürzung des Tyrosins zur prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure. A: Seitenkettenverkürzung unter C2-Abspaltung in Form einer Retro-Aldol-Reaktion. **B:** Seitenkettenverkürzung in Analogie zur β -Oxidation des Fettsäureabbaus. 3DMA = 3-Dimethylallyl, 3DMAPP = 3-Dimethylallyldiphosphat, 4HB = 4-Hydroxybenzoesäure, 4HPP = 4-Hydroxyphenylpyruvat.

3.4 Verknüpfung der Ringsysteme und abschließende Modifikationen

Ein recht klares Bild zeichnet sich für die letzten Biosynthese-Schritte ab, und diese stehen in präziser Übereinstimmung mit den identifizierten Genen.

Vor Beginn unserer Arbeiten am Novobiocin-Projekt lagen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Reihenfolge der Verknüpfung der einzelnen Ringsysteme vor. Die Zufütterung von Ring A und Ring B zu *S. niveus*-Zellen resultierte in einer Steigerung der Novobiocinsäure-Bildung *in vivo*, während die Novobiocin-Produktion unbeeinflusst blieb

(Kominek, 1972). Letztere wurde auch nicht nach direkter Novobiocinsäure-Zugabe erhöht. Kominek schlußfolgerte daraus, daß die Verknüpfung von Ring C und B vermutlich die initiale Reaktion darstellt. Dagegen berichtete Hoggarth et al. (1995), daß in Supplementationsanalysen mit Ring A-akkumulierenden *S. niveus*-Mutanten die Fähigkeit zur Novobiocin-Produktion nach Zufütterung von Novobiocinsäure, nicht aber von Novenamin (= Ring C + B), wiederhergestellt werden konnte. Die Ergebnisse des Geninaktivierungsexperimentes (Mühlenweg, 1999) sprechen deutlich zu Gunsten der von Hoggarth et al. erbrachten Resultate, die implizieren, daß die Knüpfung der Amidbindung einer Glykosylierung vorausgeht. Die Integration des Inaktivierungskonstruktes im genomischen Bereich der Zuckerbiosynthesegene von *S. spheroides* brachte die Akkumulation von Novobiocinsäure in der erhaltenen Mutante mit sich.

Die Sequenzdaten liefern deutliche Indizien dafür, daß *novM* für die benötigte Glycosyltransferase codiert (Abb. 35, Reaktion VII). Das 379 Aminosäuren lange Genprodukt zeigte Homologien zu Glycosyltransferasen aus verschiedenen Antibiotika-Clustern und enthielt das charakteristische Motiv HHGGxxT (x=variable Aminosäure) (Fernández et al. 1998) im C-terminalen Bereich.

Die Verknüpfung der Amidbindung zwischen Ring A und Ring B (Abb. 35, Reaktion VI) wird durch die Novobiocinsäure-Synthetase katalysiert (Kominek und Meyer, 1975). Auch das Novobiocinsäure-Synthetase-Gen konnte im Cluster identifiziert werden. Die Ergebnisse hierzu werden in Kapitel 4 besprochen.

Wiederum Untersuchungen zur Sekundärmetabolit-Akkumulation von *S. niveus*-Mutanten mit Defekten innerhalb der Carbamoylierungs- und Methylierungsfunktion zeigten, daß O-Methylierung und O-Carbamoylierung an Position C-4“ beziehungsweise C-3“ des Desoxyzuckers (Abb. 35, Reaktion VIII und IX) wie schon erwähnt wahrscheinlich die letzten Modifikationen innerhalb der Biosynthese repräsentieren (Kominek und Sebek, 1974). Diese Funktionen konnten mit hoher Wahrscheinlichkeit den Genprodukten von *novP* und *novN* zugeordnet werden. Für NovP waren ausgeprägte Homologien zu den O-Methyltransferasen aus den Mycinamicin III- und Tylosin-Biosynthese-Clustern, und zwar zu MycF aus *Micromonospora griseorubida* und zu TylF aus *Streptomyces fradiae* erkennbar (53 beziehungsweise 49 % Identität). Beide Makrolide enthalten den an Position C-3 O-methylierten Zucker Mycinose und für beide Gene liegen Funktionsnachweise vor. Das charakteristische Glycin-reiche SAM-Bindungsstellen-Motiv (VLE/DxGxGxG, X = variable Aminosäure) konnte innerhalb der NovP Sequenz detektiert werden. Die Zuordnung der Carbamoyltransferase-Funktion zum Genprodukt von *novN* beruhte auf dessen Homologie zu O-Carbamoyltransferasen aus symbiontischen Knöllchenbakterien (*Rhizobium* sp. und *Bradyrhizobium japonicum*), die zur Stickstoff-Fixierung befähigt sind. Carbamoylierte Lipoligosaccharid-Nodulations-Faktoren stellen Signalfaktoren dar, die nach Infektion die typische Gewebewucherung bei der Wurzelknöllchenbildung der Leguminosen induzieren. Daneben wurden jedoch auch Homologien zu O-Carbamoyltransferasen aus Antibiotika-Produzenten wie *Streptomyces lavendulae* und *Streptomyces clavuligerus* verzeichnet. Die 3'-Hydroxymethylcephem-O-Carbamoyltransferase CCT aus *S. clavuligerus* ist intensiv erforscht und wurde aktiv heterolog exprimiert (Coque et al. 1995). Dabei konnte belegt werden, daß Carbamoylphosphat als Carbamoylgruppen-Donor dient. Auch für *S. niveus*

konnte erwiesen werden, daß die Carbamoylgruppe der Noviose aus CO₂ stammt (Kominek, 1972). Die Homologie von CCT zu NovN beträgt allerdings nur 29 % Identität. Daß die CCT nur zu Cephamycin C-Produzenten hohe Homologien aufweist, konnte in Southern Hybridisierungen gezeigt werden (Coque et al. 1995): Sonden aus verschiedenen Bereichen der CCT hybridisierten nicht mit genomischer DNA von *S. niveus* oder anderen Produzenten carbamoylierter Antibiotika, eingeschlossen der Cephamycin A oder B-Produzenten.

3.5 Begrenzung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters

Neben den bisher beschriebenen Genen wurden weitere offene Leserahmen im Bereich der untersuchten Cosmide sequenziert, deren Funktion innerhalb der Novobiocin-Biosynthese nicht offensichtlich wird beziehungsweise deren Funktion nicht unmittelbar mit der Novobiocin-Biosynthese in Zusammenhang gebracht werden kann. So wurden stromabwärts des Novobiocin-Resistenzgens *ngyrB^R* Gene mit Homologien zu Primärstoffwechsellenzymen wie zu Zucker- und Peptid-Transportern (*orf1* bis *orf6*) und zu einer Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*orf7*) detektiert. 546 bp stromabwärts von *ngyrB^R* ist ein mögliches Regulator-Gen (*orf13*) lokalisiert, dessen Genprodukt zusammen mit NovG und Nov20 Bestandteil eines Signal-Transduktions-Systems sein könnte, denn für NovG und Orf13 konnten Homologien zu StrG beziehungsweise AdpA festgestellt werden. Beide stellen Komponenten einer A-Faktor-abhängigen, regulatorischen Signaltransduktions-Kaskade aus *Streptomyces griseus* (Retzlaff und Distler, 1995; Ohnishi et al. 1999) dar, welche die Induktion der Streptomycin-Biosynthese auslöst. Dabei bindet der A-Faktor (2-Isocapryloyl-3R-hydroxymethyl- γ -butyrolacton) an den Repressor ArpA, wodurch dessen Bindung an die Promotor-Region des Transkriptions-Aktivators AdpA verhindert wird. AdpA wiederum dient als Aktivator für die Transkription von StrR, der als letzter Aktivator innerhalb der Kaskade die Expression verschiedener Streptomycin-Biosynthese-Gene initiiert. Analog zur Funktion von ArpA könnte das Genprodukt von *nov20* als Repressor fungieren. Das direkt an der DNA-Bindung beteiligte Helix-Turn-Helix-Motiv (Ax₃Gx₅V/I, x = beliebige Aminosäure) (Pabo und Sauer, 1984) konnte in allen Regulatorproteinen detektiert werden. Neben der Induktion der Streptomycin-Bildung hat dieses beschriebene A-Faktor-abhängige Signal-Transduktions-System auch eine Kontrollfunktion für Streptomycin-Resistenz- und Luftmycel-Bildung in *S. griseus* inne (Vujaklija et al. 1993). Eine analoge Funktion wäre auch in *S. spheroides* vorstellbar, zumal Thiara und Cundliffe (1989) die Induzierbarkeit des *gyrB^R*-Promotors durch Novobiocin und Fluorochinolone belegen konnten. Allerdings reagiert der *gyrB^R*-Promotor auf topologische DNA-Veränderungen: die Novobiocin-Produktion bewirkt die Hemmung der konstitutiv exprimierten sensitiven Gyrase, was eine Reduktion der negativ superspiralisierten DNA zur Folge hat. Die Beteiligung möglicher weiterer regulatorischer Komponenten wurde bisher nicht in *S. spheroides* untersucht.

ngyrB^R beziehungsweise *orf13* repräsentieren möglicherweise das rechte Ende des Novobiocin-Biosynthese-Clusters. Weit weniger deutliche Aussagen lassen sich hinsichtlich der linken Begrenzung des Clusters machen. Es wurden eine Reihe von offenen Leserahmen identifiziert, die keine auffälligen Homologien zu bekannten Proteinen in

Datenbanken aufwiesen (*orf15*, *orf17*, *orf18* und *novD*), oder deren Rolle innerhalb der Novobiocin-Biosynthese aufgrund des Homologievergleiches nicht eindeutig ableitbar war, wobei eine klare Zuordnung zu Primärstoffwechsellenzymen allerdings ebenfalls nicht möglich war (*orf16*, *orf14*, *nov21*, *novB*, *novC* und *novE*). Lediglich das durch *orf9* codierte Enzym, eine möglicherweise Subtilisin-ähnliche Protease, steht vermutlich nicht mit der Novobiocin-Bildung im Zusammenhang, sondern ist wohl eher an morphologischen Differenzierungsprozessen beteiligt. Ferner wurden zwei ABC-Transporter-Systeme kloniert: *novA* und *orf10/orf11*. Für NovA wurden Ähnlichkeiten zu multidrug-resistance (MDR)-Transportern festgestellt, die implizieren, daß dieses Protein an einem durch aktiven Novobiocin-Export vermittelten Resistenzmechanismus beteiligt sein könnte. Orf10 und Orf11 zeigen leichte Homologien zu einem als Heterodimer vorliegenden Transporter aus dem 5'-Hydroxy-Streptomycin-Biosynthese-Cluster aus *S. glaucescens* und *S. griseus*. Die Funktion dieses Transporters wurde im Export Streptomycin-ähnlicher Aminoglykoside vermutet, wobei Resistenz-vermittelnde Eigenschaften nicht nachgewiesen werden konnten (Beyer et al. 1996). Aus genomischer DNA von *S. niveus* konnten zusätzlich zum *gyrB^R*-Gen, zwei weitere Resistenz-vermittelnde Bereiche isoliert werden (Mitchel et al. 1990; Hoggarth und Ritchie, 1995), deren Resistenzmechanismus jedoch nicht näher charakterisiert werden konnte. Das Vorhandensein multipler Resistenzmechanismen in Antibiotika-Produzenten ist nicht ungewöhnlich (Cundliffe, 1992). Eine Novobiocin-spezifische Export-Funktion unter gegebenenfalls Resistenz-vermittelnden Gesichtspunkten müßte für die beiden detektierten Transporter-Systeme experimentell belegt werden.

Konkrete Angaben darüber, welche der 42 sequenzierten Gene essentiell für die Novobiocin-Biosynthese sind, können letztendlich nur durch heterologe Expression des Clusters mit Nachweis der Aminocumarin-Produktion oder - langfristig gesehen - durch Funktionsnachweise der einzelnen beteiligten Gene gemacht werden.

3.6 Homologien zum Coumermycin A1-Biosynthese-Cluster

Die Verwendung der gleichen Klonierungsstrategie, das Screening einer Cosmidbank mit einer homologen dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Sonde, erlaubte auch die Identifizierung und Klonierung des Coumermycin A1-Biosynthese-Clusters aus *S. rishiriensis* DSM 40489 innerhalb unserer Arbeitsgruppe (Z. Wang, mündliche Mitteilung). Bemerkenswerterweise konnten hohe Übereinstimmungen für 16 Gene hinsichtlich Homologie und Organisation der offenen Leserahmen innerhalb beider Cluster beobachtet werden (Abb. 38). Dabei zeigte sich mehrfach eine über 90 % ige Identität selbst auf DNA-Ebene. Diese Übereinstimmung liegt vermutlich in den strukturellen Gemeinsamkeiten beider Aminocumarine begründet. So konnten die für die 5-Methyl-Rhamnose-Biosynthese des Desoxyzuckers benötigten Gene in gleicher Anordnung auch im Coumermycin A1-Cluster stromaufwärts von *gyrB^R* gefunden werden. Eine analoge Situation ist für die Biosynthese-Gene des Aminocumarin-Rings zu erwarten, der im Coumermycin A1 identisch vorliegt. Die hypothetische Rolle der in Abschnitt 3.2 diskutierten Funktion der Genprodukte NovEGHIJKO innerhalb der Ring B-Biosynthese beziehungsweise Regulation wird unter diesem Aspekt gestützt. Die Funktion von *novE*

(bzw. dem Homologen *cum28*) ist dabei unklar. Das abgeleitete Genprodukt wies lediglich Homologien zu LmbU aus *Streptomyces lincolnensis* 78-11 auf (34 % Identität), dessen Funktion bisher ebenso ungeklärt ist. Erwähnenswert ist jedoch, daß die Bildung der Propylprolin-Einheit des Lincomycins ebenfalls aus L-Tyrosin erfolgt.

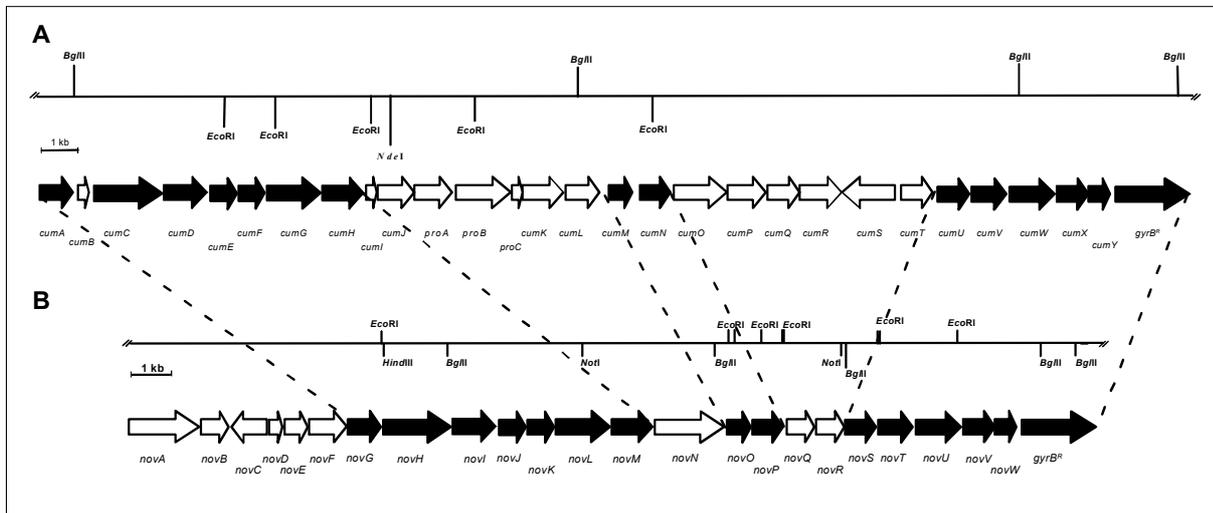


Abb. 38: Homologien zwischen Coumermycin A1- (A) und Novobiocin-Biosynthese-Cluster (B). Die schwarz unterlegten Pfeile kennzeichnen Gene, die in beiden Clustern mit hoher Homologie auftreten. Ihre jeweilige Anordnung ist in beiden Clustern identisch.

4 Funktionelle Untersuchungen zur Novobiocinsäure-Synthetase

4.1 *novL* codiert für die Amidsynthetase

Obwohl nach Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten hinreichend Indizien für die Identifizierung des Novobiocin-Biosynthese-Clusters vorlagen, war dennoch ein funktioneller Nachweis der Beteiligung der Gene an der Novobiocin-Biosynthese unentbehrlich. Neben der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 4HPP Dimethylallyltransferase, deren Strukturgen jedoch nicht identifiziert werden konnte, wurde bisher lediglich ein weiteres in die Novobiocin-Biosynthese involviertes Enzym, die Novobiocinsäure-Synthetase, enzymatisch nachgewiesen (Kominek und Meyer, 1975). Durch die heterologe Expression dieser Amidsynthetase, die ATP-abhängig die Verknüpfung von Ring A und B katalysiert, konnte erstmals der geforderte funktionale Zusammenhang erbracht werden: Novobiocinsäure-Synthetase (NBSS)-Aktivität konnte nach Expression eines 9,7 kb großen *EcoRI*-Fragmentes (p9-6GE9) in *S. lividans* TK24 demonstriert werden. Mit der weiteren Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung des oder der Novobiocinsäure-Synthetase-Gene ständen neue Informationen hinsichtlich des Amidbindungs-Mechanismus zur Verfügung. Kenntnisse über die Substratspezifität könnten neue Perspektiven im Hinblick auf die molekularbiologischen Erzeugung Ring A-modifizierter Novobiocin-Derivate eröffnen.

Die Sequenzanalyse ergab, daß dieser 9,7 kb große Bereich zwei Gene, *novH* und *novL*, enthielt, die anhand ihrer Homologien eindeutig zur Familie der adenylierenden Enzyme zugeordnet werden konnten und insofern für eine Beteiligung an der NBSS-Reaktion in Betracht kamen. Tatsächlich war nach Expression eines Fragmentes, das beide Gene enthielt (Konstrukt pMS73), die Bildung von Novobiocinsäure zu beobachten.

Die Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme wird in zwei Subgruppen unterteilt (Turgay et al. 1992): Enzyme der Gruppe I, zu denen auch die nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen gehören, enthalten eine hochkonservierte 4'-Phosphopantetheinyl-Bindungsstelle. Nach Aktivierung des Acyl-Substrates in Form eines Acyladenylates, wird dieses kovalent über eine Thioesterbindung an den enzymgebundenen 4'-Phosphopantethein-Cofaktor gebunden. Im Gegensatz dazu enthalten Enzyme der Gruppe II, zu der 4-Coumarat:CoA-Ligasen, Luciferasen, Acetyl-CoA Synthetasen und die CoA-Synthetasen der längerkettigen Fettsäure-Biosynthese gehören, keine 4'-Phosphopantetheinyl-Bindungsstelle. Folglich aktivieren sie ihr Acyl-Substrat als Acyladenylat, jedoch findet keine kovalente Substratbindung an das Enzym statt.

Die nicht-ribosomale Proteinbiosynthese war Gegenstand intensiver Untersuchungen der letzten Jahrzehnte, zumal eine Vielzahl von Peptid-Antibiotika und anderer Substanzen mit einem breiten Wirkungsspektrum bakteriellen und fungalen Ursprungs mit Hilfe von multifunktionellen Enzymkomplexen, den Peptidsynthetasen, gebildet werden (Kleinkauf und Döhren, 1996; Marahiel et al. 1997). Die nicht-ribosomale Proteinbiosynthese erfolgt nach dem Prinzip des Thiotemplate-Mechanismus (Stachelhaus und Marahiel, 1995), wonach die Transpeptidierung durch Übertragung der aktivierten Aminosäure (oder des Aminosäure-Derivates) vom 4'-Phosphopantethein-Cofaktor auf die Aminogruppe der nächsten 4'-Phosphopantethein-gebundenen aktivierten Aminosäure erfolgte. Die Aminosäure-Reihenfolge der entstehenden Peptidkette wird dabei durch die sequentielle Anordnung der für Aktivierung und Thioesterbindung verantwortlichen Domänen festgelegt. Nach dem ursprünglichen Modell sind die Funktionen für die Aktivierung und Thioesterbindung eines jeden Substrates auf unterschiedlichen Peptidsynthetase-Modulen zusammengefaßt. Die Substratspezifität der Peptidsynthetasen beschränkt sich nicht auf die proteinogenen Aminosäuren, sondern erfährt eine Ausweitung auf nicht-proteinogene Aminosäuren bis hin zu Carbonsäuren und Aminen. In Analogie zur nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese würde ein hypothetisches Modell der Novobiocinsäure-Biosynthese die Aktivierung und kovalente enzymatische Bindung sowohl von Ring A als auch von Ring B (oder einer Ring B-Vorstufe) durch zwei separate Peptidsynthetase-Module und den Transfer der Acylgruppe von Ring A auf die Aminogruppe einer aktivierten Ring B-Einheit beinhalten.

Die Anwesenheit einer hochkonservierten 4'-Phosphopantethein-Bindungsstelle innerhalb der Sequenz von NovH legte eine Klassifizierung des Enzyms in Gruppe I der Adenylat-bildenden Enzyme nahe. Hingegen wurde NovL aufgrund des Fehlens dieses Motives in Gruppe II eingeordnet. Die beschriebene strukturelle Organisation der Peptidsynthetasen ist jedoch nicht ausschließlich bei allen Peptidsynthetasen zu finden und Abweichungen vom ursprünglichen Modell wurden in den letzten Jahren vermehrt beschrieben. So ist beispielsweise innerhalb der Actinomycin-Biosynthese (Schauwecker et al. 1998; Pfennig et al. 1999) und der Enterobactin-Biosynthese (Gehring et al. 1997) eine größere strukturelle

Ähnlichkeit zur Polyketid- und Fettsäure-Biosynthese erkennbar. Im Falle des Actinomycins erfolgt die Bildung des 4-Methyl-3-hydroxyanthranilsäure (4-MHA)-Pentapeptidlactons durch drei Actinomycin-Synthetasen (ACMS I, II und III), wobei ACMS II und III typische Peptidsynthetasen darstellen und je zwei beziehungsweise drei Aktivierungsdomänen und 4'-Phosphopantethein-Bindungsstellen enthalten. ACMS I hingegen stellt eine 4-MHA-AMP-Ligase dar und besitzt ähnlich wie NovL keinen 4'-Phosphopantethein-Cofaktor. Diese fehlende prosthetische Gruppe wird jedoch durch ein weiteres Gen, *acmD*, das für ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) codiert, bereitgestellt. Ähnliche Verhältnisse findet man bei der Biosynthese des Eisen-Siderophors Enterobactin (Gehring et al. 1997): Hier wird die Adenylierung von 2,3-Dihydroxybenzoat durch das Genprodukt von EntE, eine Dihydroxybenzoesäure-AMP-Ligase, katalysiert. EntB enthält im C-terminalen Teil ebenfalls eine ACP-Domäne, dessen 4'-Phosphopantethein-Cofaktor unter Katalyse von EntE mit 2,3-Dihydroxybenzoat acyliert wird.

Die Knüpfung der Amidbindung zur Novobiocinsäure gestaltet sich jedoch nach einem andersartigen Mechanismus. Innerhalb des untersuchten Sequenzbereiches konnten keine Hinweise für das Vorliegen eines Acyl-Carrier-Protein-Gens gefunden werden. Ferner zeigte sich, daß ausschließlich NovL in die Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion involviert ist, d.h. daß ein einziges Enzym beide Schritte, die Aktivierung von Ring A als Acyladenylat und den anschließenden Transfer auf die Aminogruppe von Ring B, katalysiert. Es wurden keinerlei Hinweise dafür gefunden, daß das Peptidsynthetase-Homologon NovH an der Reaktion beteiligt ist. Nach Coexpression von *novH* und *novL* konnte keine Aktivitätssteigerung beobachtet werden; ebenso brachte die gemeinsame Inkubation der einzeln exprimierten Gene im NBSS-Assay keine Erhöhung der Aktivität mit sich. Die Überexpression und homogene Reinigung der enzymatisch aktiven Novobiocinsäure-Synthetase NovL schloß schließlich die Beteiligung weiterer Enzyme aus. Die experimentellen Daten belegten also, daß der Mechanismus der Novobiocinsäure-Bildung sich von dem der nicht-ribosomalen Proteinbiosynthese unterscheidet.

4.2 Überexpression und Reinigung der Novobiocinsäure-Synthetase als C-terminales Hexahistidin-Fusionsprotein

Zur weiteren Charakterisierung der Novobiocinsäure-Synthetase wurde NovL nach Überexpression als rekombinantes Hexahistidinfusionsprotein in *E. coli* bis zur Homogenität gereinigt. Zwar konnte nach Fusion des His-Tags an den N-Terminus von NovL die Expression eines etwa 62,5 kDa großen Proteins beobachtet werden, doch lag die gemessene NBSS-Aktivität bei nur 1,4 % im Vergleich zu der im Wildtyp (s. Kapitel IV 4.2.1). Dies war zumindest teilweise darin begründet, daß ein Großteil des gebildeten Enzyms in Form von unlöslichen „Inclusion Bodies“ vorlag. Nach Verwendung eines anderen Expressionssystems, das die C-terminale (His)₆-Fusion erlaubte, konnten immerhin 7-fach höhere NBSS-Aktivitäten registriert werden. Allerdings lag auch in diesem Fall ein Großteil des gebildeten Proteins in unlöslicher Form vor (s. Kapitel IV 4.2.2). Da die NBSS-Aktivität nachweislich nicht durch die Fusion des Histidin-Schwanzes beeinflusst wurde, wurden zwei Ansätze verfolgt, um eine effektive Reinigung des rekombinanten Enzyms über Nickel-

Affinitäts-Chromatographie zu ermöglichen. Beim Auftreten unlöslicher Inclusion Bodies ist eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen angezeigt, sofern eine anschließende Rückfaltung durch Entfernung des Denaturans zum aktiven Enzym möglich ist. Mit der in dieser Arbeit angewandten Methode der Behandlung mit 8 M Harnstoff konnte zwar ein geringer Teil des Enzyms wieder in Lösung gebracht werden, allerdings ging dies nicht mit der gewünschten Wiederherstellung der NBSS-Aktivität einher (s. IV 4.2.2.1). Auf die empirische Etablierung eines adäquaten Rückfaltungsverfahrens wurde jedoch verzichtet und statt dessen alternativ der Einfluß der Erniedrigung der Expressionsrate auf die Löslichkeit untersucht. Mit den in Kapitel IV 4.2.2.2 beschriebenen Maßnahmen konnte der Anteil korrekt gefalteter, nativer NovL-(His)₆ signifikant erhöht werden, was sich in einer 90-fachen Erhöhung der spezifischen Aktivität äußerte. In ähnlicher Weise wurde auch bei der heterologen Überexpression der Yersiniabactin Synthetase HMWP2 verfahren (Keating et al. 2000) was ebenfalls in einer verbesserten Löslichkeit dieser nicht-ribosomalen Peptidsynthetase resultierte.

Mit Hilfe eines Zwei-Schritt-Reinigungsverfahrens unter Verwendung von Nickel-Affinitäts- und Gelfiltrations-Chromatographie war die Reinigung des C-terminalen NovL-Hexa-Histidin-Fusionsproteins bis zur annähernden Homogenität möglich. Ausgehend von 4 g Biomasse konnten mit einer Ausbeute von 55 % 1,4 mg homogenes Enzym mit einer Gesamtaktivität von 70,8 nkat erhalten werden (s. IV 4.2.3). Hiermit war der Nachweis für die ausschließliche Beteiligung von NovL an der Katalyse der Amid-Bindung zwischen Ring A und Ring B erbracht worden.

4.3 Biochemischer Nachweis der Adenylierungsfunktion von NovL

In Einklang mit der im Homologievergleich erkennbaren Ähnlichkeit von NovL zur Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme, konnte die Adenylierungsaktivität der Novobiocinsäure-Synthetase mit Hilfe des ATP-PP_i-Austausch-Assay dokumentiert werden (Kapitel IV, Tab. 43). Wie erwartet konnte eine enzymabhängige Adenylierung von Ring A, nicht jedoch von Ring B, nachgewiesen werden. Nach Bildung des Ring A-AMP-Intermediates erfolgt der Transfer der Acyl-Gruppe auf die Aminogruppe von Ring B. Die Aminocumarin-Einheit wird offenbar nicht aktiviert.

Die Adenylierungsfunktion von NovL spiegelte sich auch in der Proteinsequenz wider. Die Novobiocinsäure-Synthetase zeigte insbesondere Homologien zu 4-Coumarat:CoA-Ligasen (4CL) und Acyl-CoA-Ligasen. Die für 4-Coumarat:CoA-Ligasen charakteristischen, konservierten Motive Box I und Box II (Stuible et al. 2000) und die Motive A8 und A10 (Marahiel et al. 1997), die am Adenylierungsmechanismus beteiligt sind, konnten in NovL detektiert werden (Kapitel IV, Abb. 17). Durch Mutationsanalysen an der 4CL aus *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, daß der konservierte Lysin-Rest in Motiv Box I und der Arginin-Rest in Motiv A8 in Kooperation die PP_i-Freigabe während der Adenylat-Bildung koordinieren (Stuible et al. 2000). Das konservierte Lysin aus Motiv A10 interagiert sowohl mit der Carboxylgruppe des zu adenylierenden Substrates, als auch mit den 4'- und 5'-Sauerstoffatomen der Ribose des Nukleotids (Marahiel et al. 1997) und fungiert als aktives

Zentrum der Adenylat-Bildung. Für den zentralen Cystein-Rest in Motiv Box II wurde längere Zeit eine Beteiligung an der Thiolester-Bildung bei 4CLs spekuliert, da Experimente mit Sulfhydryl-modifizierenden Agenzien eine 4CL-Aktivitäts-Hemmung bewirkten (Knobloch und Hahlbrock, 1977; Becker-André et al. 1991). Die direkte Beteiligung dieses Restes am katalytischen Mechanismus konnte jedoch durch weitere Mutationsanalysen widerlegt werden (Stuible et al. 2000). Eine Unterscheidung zwischen CoA-Ligasen und Enzymen, die nur eine Adenylierungsfunktion aufweisen, ist anhand der Sequenzdaten nicht möglich. Daß Coenzym A an der Novobiocinsäure-Synthetase-Reaktion beteiligt ist, erscheint unwahrscheinlich, zumal die Anwesenheit des Cofaktors im Assay keine Aktivitätssteigernde Wirkung zeigte. Das Fehlen der hochkonservierten 4'-Phosphopantethein-Bindungsstelle in NovL deutet darauf hin, daß auch dieses enzym-gebundene CoA-Derivat nicht im Mechanismus involviert ist.

Die Kondensation der als Thioester gebundenen Intermediate wird bei nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen bewiesenermaßen durch eine Kondensations-Domäne (C3-Core) mit dem hochkonservierten Motiv HHxxxDG (x = variable Aminosäure) katalysiert (Stachelhaus et al. 1998; Konz und Marahiel, 1999). Dieses Histidin-Motiv ist auch bei der Familie der gut untersuchten Acyl-Transferasen zu finden und am Mechanismus des Acyl-Transfers beteiligt. In NovL konnte das Motiv der C-Domäne unterdessen nicht identifiziert werden. Kürzlich wurde durch *in vitro*-Mutagenesen an der nicht-ribosomalen Yersiniabactin-Synthetase HMWP2 herausgefunden, daß ein weiteres, in der Nähe des C3-Cores lokalisiertes konserviertes Motiv, Dx₄Dx₂S (x = beliebige Aminosäure) eine entscheidende Funktion beim katalytischen Mechanismus inne hat. Die beiden Asparaginsäure-Reste sind von entscheidender Bedeutung für die Bildung der Amidbindung (Keating et al. 2000). Dieses Motiv konnte zweimal im zentralen Bereich der NovL-Sequenz gefunden werden. Ob gewisse Analogien im Kondensations-Mechanismus der Novobiocinsäure-Synthetase vorliegen, muß schlußendlich durch Mutationsanalysen geklärt werden.

4.4 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Novobiocinsäure-Synthetase

Die Novobiocinsäure-Synthetase aus *S. spheroides* liegt in ihrer aktiven Form als Monomer vor. Durch Gelfiltrations-Chromatographie konnte ein natives Molekulargewicht von 57-58 kDa für das rekombinante Enzym ermittelt werden, was dem theoretisch berechneten Wert von 58,1 kDa mit C-terminalem His-Tag entsprach. Unter denaturierenden Bedingungen wurde ein Wert von etwa 60,6 kDa bestimmt.

Das pH-Optimum der Novobiocinsäure-Synthetase liegt in Tris-HCl-Puffer bei pH 8,0. Für das Enzym aus *S. niveus* wurden optimale Aktivitäten bei pH 9,0 gemessen.

NovL(His)₆ zeigte die für Adenylat-bildende Enzyme typische Abhängigkeit von divalenten Kationen wie Mg²⁺ oder Mn²⁺.

Die biochemischen Eigenschaften des rekombinanten Enzyms lagen innerhalb des Bereichs der für andere in der Literatur beschriebenen Daten von adenylierenden Enzymen der

Gruppe II. In Tab. 44 ist ein Vergleich von NovL-(His)₆ zu vorhandenen Daten aus Acyl-CoA-Synthetasen und 4-Coumarat:CoA-Ligasen dargestellt.

Tab. 44: Vergleich von Molekulargewicht und Wechselzahl der rekombinanten Novobiocinsäure-Synthetase mit verschiedenen Acyl-CoA-Synthetasen und 4-Coumarat:CoA-Ligasen.

Enzym	Organismus	Molekulargewicht [kDa]	Wechselzahl [min ⁻¹]	Referenz
NovL-(His) ₆	<i>S. spheroides</i>	57-58	174	diese Arbeit
Acyl-CoA-Synthetasen:				
MF7	<i>Brassica napus</i>	74,4	1,71	Fulda et al. 1997
VLACS	<i>Rattus</i>	70,7	2,76 (Palmitat) 4,08 (Lignocerat)	Uchiyama et al. 1996
4-Coumarat:CoA-Ligasen:				
Nt4CL1	<i>Nicotiana tabacum</i>	60	82,5	Lee und
Nt4CL2		60	90,36	Douglas, 1996
Pt4CL1	<i>Populus tremuloides</i>	60	41,34	Hu et al. 1998
Pt4CL2		63	7,08	

In unseren Untersuchungen zeigte NovL-(His)₆ eine strikte Spezifität für das Nukleotid ATP (Kapitel IV, Tab. 41). Im Gegensatz dazu konnte eine etwas höhere Flexibilität hinsichtlich der Struktur des Acyl-Substrates (Ring A) verzeichnet werden. Das Ring A-Analogon 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure (GBA) wurde mit immerhin 26 % iger Produktbildung als Substrat akzeptiert (Kapitel IV, Tab. 42). Eine relativ breite Substratspezifität der Novobiocinsäure-Synthetase wäre unter dem Gesichtspunkt der Herstellung neuer Novobiocin-Derivate von Interesse. Die Inaktivierung der für die Biosynthese von Ring A verantwortlichen Gene und Zufütterung der entsprechenden Ring A-Analoga zu den erhaltenen Mutanten könnte den leichten und effizienten Zugang zur Gewinnung neuer Substanzen eröffnen. Gleichermäßen interessant wäre die Identifizierung der für die Substratspezifität verantwortlichen Bereiche. Die Veränderung der Substratspezifität durch Mutation einzelner Aminosäuren könnte weitere Ansatzpunkte zur Produktion neuer Aminocumarin-Antibiotika liefern.

VI Literatur

- Abouhamad, W.N., Manson, M. (1994) The dipeptide permease of *Escherichia coli* closely resembles other bacterial transport systems and shows growth-phase-dependent expression. *Mol. Microbiol.* **14**: 1077-1092
- Ahmad, S., Jensen, R. (1988) The phylogenetic origin of the bifunctional tyrosine-pathway protein in the enteric linkage of bacteria. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 282-297
- Allen, C.M. (1972) Biosynthesis of echinulin. Isoprenylation of *cyclo*-L-alanyl-L-tryptophanyl. *Biochemistry* **11**: 2154-2160
- Alloing, G., Trombe, M.-C., Claverys, J.-P. (1990) The *ami* locus of the Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is similar to binding protein-dependent transport operons of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **4**: 633-644
- Althaus, I.W., Dolak, L., Reusser, F. (1988) Coumarins as inhibitors of bacterial DNA gyrase. *J. Antibiotics* **41**: 373-376
- Altschuh, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410
- Apfel, C.M., Takás, B., Fountoulakis, M., Stieger, M., Keck, W. (1999) Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression and characterization of the essential *uppS* gene. *J. Bacteriol.* **181**: 483-492
- Arathoon, E.G., Hamilton, J.R., Hench, C.E., Stevens, D.A. (1990) Efficacy of short courses of oral novobiocin-rifampin in eradicating carrier state of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *in vitro* killing studies of clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1655-1659
- Ashby, M.N., Edwards, P.A. (1990) Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. *J. Biol. Chem.* **265**: 13157-13164
- Ashby, M.N., Kutsunai, S.Y., Ackermann, S., Tzagoloff, A., Edwards, P.A. (1992) COQ2 is a candidate for the structural gene encoding *para*-hydroxybenzoate:poly-prenyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 4128-4136
- Baltz, R.H. (1998) Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol.* **6**: 76-83
- Bao, W., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, R. (1998) Reconstitution of the iterative type II polyketides synthase for Tetracenomycin F2 biosynthesis. *Biochemistry* **37**: 8132-8138
- Bate, N., Butler, A.R., Smith, I.P., Cundliffe, E. (2000) The mycarose-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin. *Microbiology* **146**: 139-146
- Bates, R. W., Gabel, C. J., Ji, J., Rama-Devi, T. (1995) Synthesis of phenolic products using palladium catalyzed coupling reactions. *Tetrahedron* **51**: 8199-8212
- Becker-Anrdre, M., Schulze-Lefert, P., Hahlbrock, K. (1991) Structural comparison, modes of expression, and putative *cis*-acting elements of the two 4-coumarate:CoA ligase genes in potato. *J. Biol. Chem.* **266**: 8551-8559

- Bentley, R., Bennet, J.W. (1999) Constructing polyketides: from Collie to combinatorial biosynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 411-446
- Bergeys' manual of systematic bacteriology. Baltimore / London (Williams and Wilkins) 1984
- Beyer, S., Distler, J., Piepersberg, W. (1996) The *str* gene cluster for the biosynthesis of 5'-hydroxystreptomycin in *Streptomyces glaucescens* GLA.0 (ETH 22794): new operons and evidence for pathway-specific regulation by StrR. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 775-784
- Bibb, M.J., Cohen, S.N. (1982) Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **187**: 265-277
- Bibb, M.J., Findlay, P.R., Johnson, M.W. (1984) The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30**: 157-166
- Bibb, M.J., Jansen, G.R., Ward, J.M. (1985) Cloning and analysis of the promoter region of erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* **38**: 215-226
- Birch A.J., Cameron, D.W., Holloway, P.W., Rickards, R.W. (1960) Further examples of biological C-methylation: novobiocin and actinomycin. *Tetrahedron Lett.* **25**: 26-31
- Birch, A.J., Holloway, P.W., Rickards, R.W. (1962) The biosynthesis of noviose, a branched-chain monosaccharide. *Biochim. Biophys. Acta* **57**: 143-145
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Büchner, T., Kirberger, E. (1952) Über die Enol-Keto-Tautomerie der *p*-Oxyphenylbrenztraubensäure. *Biochim. Biophys. Acta* **8**: 401-406
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T., Dobberstein, B. (1987) A T5 promoter based transcription-translation system for analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.* **155**: 416-433
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-378
- Bunton, C.A., Kenner, G.W., Robinson, M.J.T., Webster, B.R. (1963) Experiments related to the biosynthesis of novobiocin and other coumarins. *Tetrahedron* **19**: 1001-1010
- Buttner, M.J. (1989) RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **3**: 1653-1659
- Calvert, R.T., Spring, M.S., Stoker, J.R. (1972) Investigations of the biosynthesis of novobiocin. *J. Pharm. Pharmac.* **24**: 972-978
- Casey, P.J., Seabra, M.C (1996) Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **271**: 5289-5292
- Cassidei, L., Dell' Atti, A., Sciacovelli, O. (1980) A spectroscopic study on *p*-hydroxyphenylpyruvic acid. Keto-enol tautomerism and stability of its complex with Fe³⁺ ions. *Z. Naturforsch.* **35**: 1-5

- Chater, K.F. (1992) Genetic regulation of secondary metabolic pathways in *Streptomyces*. Ciba Found. Symp. **171**: 144-156
- Chater, K.F. (1998) Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. Microbiology **144**: 1465-1478
- Cohen, S.P., Hächler, H., Levy, S.B. (1993) Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**: 1484-1492
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, S., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature **393**: 537-544
- Contreras A., Maxwell, A. (1992) *gyrB* mutations which confer coumarin also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. Mol. Microbiol. **6**: 1617-1624
- Coque, J.J.R., Pérez-Llarena, F.J., Enguita, F.J., Fuente, J.L., Martín, J.F., Liras, P. (1995) Characterization of the *cmcH* genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 3'-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis. Gene **162**: 21-27
- Cundliffe, E. (1989) How antibiotic-producing organisms avoid suicide. Annu. Rev. Microbiol. **43**: 207-233
- Cundliffe E. (1992) In: Secondary metabolites: their function and evolution. Ciba Foundation Symposium. Wiley, Chichester **171**: 199-214
- Cushing, K.E. (1989) Genetic and biochemical studies of the regulation of novobiocin biosynthesis in *Streptomyces niveus*. PhD Thesis, Universität Liverpool, United Kingdom
- Decker, H., S. Gaisser, S. Pelzer, P. Schneider, L. Westrich, W. Wohlleben, Bechthold A. (1996) A general approach for cloning and characterizing dNDP-glucose dehydratase genes from actinomycetes. FEMS Microbiol. Lett. **141**: 195-201
- De-Crécy-Lagard, V., Blanc, V., Gil, P., Naudin, L., Lorenzon, S., Famechon, A., Bamas-Jaques, N., Crouzet, J., Thibaut, D. (1997a) Pristinamicin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: Molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes. J. Bacteriol. **179**: 705-713
- De-Crécy-Lagard, V., Saurin, W., Thibaut, D., Gil, P., Naudin, L., Crouzet, J., Blanc, V. (1997b) Streptogramin B biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* and *Streptomyces virginiae*: molecular characterization of the last structural peptide synthetase gene. Antimicrob. Agents Chemother. **41**: 1904-1909
- Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic. Acids Res. **12**: 387-395

- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M., Piepersberg, W. (1987) Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8041-8056
- Draeger, G., Park, S.H., Floss, H.G. (1999) Mechanism of the 2-deoxygenation step in the biosynthesis of the deoxyhexose moieties of the antibiotics granaticin and olenadomycin. *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 2611-2612
- Ehltling, J., Buettner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E., Kombrink, E. (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionary divergent classes in angiosperms. *Plant J.* **19**: 9-20
- Evans, P.D., Cook, S.N., Riggs, P.D., Noren, C.J. (1995) Litmus: multipurpose cloning vectors with a novel system for bidirectional *in vitro* transcription. *Biotechniques* **19**: 130-135
- Fernández, E., Weißbach, U., Reillo, C.S., Braña, A.F., Méndez, C., Rohr, J., Salas, J. A. (1998) Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J. Bacteriol.* **180**: 4929-4937
- Ferroud, D., Collard, J., Klich, M., Dupuis-Hamelin, C., Mauvais, P., Lassaigue, P., Bonnefoy, A., Musicki, B. (1999) Synthesis and biological evaluation of coumarincarboxylic acids as inhibitors of gyrase B. L-Rhamnose as an effective substitute for L-noviose. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**: 2881-2886
- Fouces, R., Mellado, E., Díez, B., Barredo, J.L. (1999) The tylosin biosynthetic cluster from *Streptomyces fradiae*: genetic organization of the left region. *Microbiology* **145**: 855-868
- Freeman, C., Robinson, A., Cooper, B., Mazens-Sullivan, M., Quintiliani, R., Nightingale, C. (1995) *In vitro* antimicrobial susceptibility of glycopeptide-resistant enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **21**: 47-50
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., Perret, X. (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394-401
- French, P., Venuti, E., Fraimow, H.S. (1993) *In vitro* activity of novobiocin against multiresistant strains of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2736-2739
- Fulda, M., Heinz, E., Wolter, F.P. (1997) *Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. *Plant Mol. Biol.* **33**: 911-922
- Gaisser, S., Böhm, G.A., Doumith, M., Raynal, M.-C., Dhillon, N., Cortés, J., Leadlay, P.F. (1998) Analysis of *eryBI*, *eryBIII* and *eryBVII* from the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 77-88
- Gaisser, S., Trefzer, A., Stockert, S., Kirschning, A., Bechthold, A. (1997) Cloning of an Avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. *J. Bacteriol.* **179**: 6271-6278

- Gallo, M.A., Ward, J., Hutchinson, C.R. (1996) The *dnrM* gene in *Streptomyces peuceticus* contains a naturally occurring frameshift mutation that is suppressed by another locus outside of the daunorubicin-production gene cluster. *Microbiology* **142**: 269-275
- Gebler, J.C., Poulter, C.D. (1992) Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**: 308-313
- Gehring, A.M., Bradley, K.A., Walsh, C.T. (1997) Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: Isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-Dihydroxybenzoate. *Biochemistry* **36**: 8495-8503
- Gevers, S.K., Kleinkauf, H., Lipmann, F. (1969) Peptidyl transfers in gramicidin S biosynthesis from enzyme-bound thioester intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**: 1335-1342
- Gish, W., States, D.J. (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* **3**: 266-272
- Gladek, A., Zakrzewska, J. (1984) Genome size of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**: 73-76
- Gräfe, U. (1992) *Biochemie der Antibiotika*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-New York
- Haydock, S.F., Dowson, J.A., Dhillon, N., Roberts, G.A., Cortes, J., Leadlay, P.F. (1991) Cloning and sequence analysis of genes involved in erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: sequence similarities between EryG and a family of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 120-128
- Heide, L., Berger, U. (1989) Partial purification and properties of geranyl pyrophosphate synthase from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* **273**: 331-338
- Hoffman, B.J., Broadwater, J.A., Johnson, P., Harper, J., Fox, B.G., Kenealy W.R. (1995) Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21(DE3): Process control yielding high levels of metal-incorporated, soluble protein. *Prot. Expression Purification* **6**: 646-654
- Hoggarth, J.H., Cusing, K.E., Ritchie, D.A. (1995) Genetic and functional analysis of novobiocin non-producing mutants of *Streptomyces niveus*. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 625-630
- Hoggarth, J.H., Ritchie, D.A. (1995) Expression of novobiocin resistance genes in the novobiocin-producing organism *Streptomyces niveus*. *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 543-547
- Holmes, D.S., Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrepf, H (1985) *Genetic manipulation of Streptomyces - a laboratory manual*, The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom

- Hu, W.-J., Kawaoka, A., Tsai, C.-J., Lung, J., Osakabe, K., Ebinuma, H., Chiang, V.L. (1998) Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**: 5407-5412
- Hussain, H.A., Ritchie, D.A. (1991) High frequency transformation of *Streptomyces niveus* protoplasts by plasmid DNA. J. Appl. Bacteriol. **71**: 422-427
- Hutchinson, C.R. (1998) Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. Curr. Opin. Microbiol. **1**: 319-329
- Hutchinson, C.R. (1999) Microbial polyketide synthases: more and more prolific. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 3336-3338
- Ingham, C.J., Hunter, I.S., Smith, M.C.M. (1996) Isolation and sequencing of the *rho* gene from *Streptomyces lividans* ZX7 and characterization of the RNA-dependent NTPase activity of the overexpressed protein. J. Biol. Chem. **271**: 21803-21807
- Inouye, M., Suzuki, H., Takada, Y., Muto, N., Horinouchi, S., Beppu, T. (1994) A gene encoding mycinamicin III O-methyltransferase from *Micromonospora griseorubida*. Gene **141**: 121-124
- Jackson, A.P., Maxwell, A., Wigley, D.B. (1991) Preliminary cristallographic analysis of the ATP-hydrolyzing domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase B protein. J. Mol. Biol. **217**: 15-17
- Joly, A., Edwards, P.A. (1993) Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity. J. Biol. Chem. **268**: 26983-26989
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffrey, J., Ghosh, D. (1995) Short-chain-dehydrogenases/reductases (SDR) Biochemistry **34**: 6003-6013
- Kagan, R.M., Clarke, S. (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. Arch. Biochem. Biophys. **310**: 417-427
- Kampranis, S.C., Gormley, N.A., Tranter, R., Orphanides, G., Maxwell, A. (1999) Probing the binding of coumarins and cyclothialidines to DNA gyrase. Biochemistry **38**: 1967-1976
- Katz, L., Hutchinson, R. (1992) Genetic engineering of antibiotic producing organisms. Annual reports in medicinal chemistry **27**: 129-138
- Keating, T.A., Miller, D.A., Walsh, C.T. (2000) Expression, purification, and characterization of HMWP2, a 229 kDa, six domain protein subunit of Yersiniabactin synthetase. Biochemistry **39**: 4729-4739
- Kieser, T. Hopwood, D.A., Wright, H.M., Thompson, C.J. (1982) pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. Mol. Gen. Genet. **185**: 223-238
- Kleinkauf, H., von Döhren, H. (1996) A nonribosomal system of peptide biosynthesis. Eur. J. Biochem. **236**: 335-351

- Knobloch, K.-H., Hahlbrock, K. (1977) 4-Coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm. Partial purification, substrate specificity, and further properties. Arch. Biochem. Biophys. **184**: 237-248
- Kominek, L.A. (1972) Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. Antimicrob. Agents Chemother. **1**: 123-134
- Kominek, L.A., Meyer, H.F. (1975) Novobiocin acid synthetase. Meth. Enzymol. **43**: 502-508
- Kominek, L.A., Sebek, O.K. (1974) Biosynthesis of novobiocin and related coumarin antibiotics. Develop. Ind. Microbiol. **15**: 60-69
- Konz, D., Marahiel, M.A. (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? Chem. Biol. **6**: 39-48
- Kormanec, J., Lempeloá, A., Farkasovský, M., Homerová D. (1995) Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a *Streptomyces aureofaciens* gene encoding glyeraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Gene **165**: 77-80
- Koyama, T., Tajima, M., Sano, H., Doi, T., Koike-Takeshita, A., Obata, S., Nishino, T., Ogura, K. (1996) Identification of significant residues in the substrate binding site of *Bacillus stearothermophilus* farnesyl diphosphate synthase. Biochemistry **35**: 9533-9538
- Krätzschar, J., Krause, M., Marahiel, M.A. (1989) Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. J. Bacteriol. **171**: 5422-5429
- Künzel, E., Wohler, S.E., Beninga, C., Haag, S., Decker, H., Hutchinson, C.R., Blanco, G., Mendez, G., Salas, J.A., Rohr, J. (1997) Tetracenomycin M, a novel genetically engineered tetracenomycin resulting from a combination of mithramycin and tetracenomycin biosynthesis genes. Chem. Eur. J. **3**: 1675-1678
- Labesse, G., Vidal-Cros, A., Chomilier, J., Gaudry, M., Mornon, J.-P. (1994) Structural comparisons lead to the definition of a new superfamily of NAD(P)(H)-accepting oxidoreductases: the single-domain reductases/epimerases/dehydrogenases (the 'RED' family). Biochem. J. **304**: 95-99
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685
- Landman, D., Mobarakai, N.K., Quale, J.M. (1993) Novel antibiotic regimens against *Enterococcus faecium* resistant to ampicillin, vancomycin, and gentamicin. Antimicrob. Agents Chemother. **37**: 1904-1908
- Lauer B., Russwurm, R., Bormann, C. (2000) Molecular characterization of two genes from *Streptomyces tendae* Tü901 required for the formation of the 4-formyl-4-imidazolin-2-one-containing nucleoside moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. Eur. J. Biochem. **267**: 1698-1706
- Laurin, P., Ferroud, D., Kilch, M., Dupuis-Hamelin, C., Mauvais, P., Lassaigue, P., Bonnefoy, A., Musicki, B. (1999a) Synthesis and *in vitro* evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. Bioorg. Med. Chem. Lett. **9**: 2079-2084

- Laurin, P., Ferroud, D., Schio, L., Klich, M., Dupuis-Hamelin, C., Mauvais, P., Lassaigne, P., Bonnefoy, A., Musicki, B. (1999b) Structure-activity relationship in two series of aminoalkyl substituted coumarin inhibitors of gyrase B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**: 2875-2880
- Lee, D., Douglas, C.J. (1996) Two divergent members of a tobacco 4-coumarate:coenzyme A ligase (*4CL*) gene family. *Plant Physiol.* **112**: 193-205
- Lee, Y.H., Tzecheng, Z.Y., Wang, S.C., Cheng, W.L., Chen, C. W. (1986) Structural stability of heterologous genes cloned in *Streptomyces* plasmid pIJ702. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**: 372-378
- Lewis, R.J., Singh, O.M.P., Smith, C.V., Skarzynski, T., Maxwell, A., Wonacott, A.J., Wigley, D.B. (1996) The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarines and the cyclothialidines revealed by X-ray cristallography. *EMBO J.* **15**: 1412-1420
- Li, S.-M., Hennig, S., Heide, L. (1998) Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of novobiocin *via* a non-mevalonat pathway. *Tetrahedron Lett.* **39**: 2717-2720
- Linton, K.J., Jarvis, B.W., Hutchinson, R.C. (1995) Cloning of the genes encoding thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydratase and thymidine diphospho-4-keto-6-deoxyglucose 3,5-epimerase from the erythromycin-producing *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* **153**: 33-40
- Liu, H.-W., Thorson, J.S. (1994) Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 223-256
- Liu, W., Shen, B. (2000) Genes for production of the enediyne antitumor antibiotic C-1027 in *Streptomyces globisporus* are clustered with the *cagA* gene that encodes the C-1027 apoprotein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 382-392
- Lomovskaya, N., Otten, S.L., Koi-Katayama, Y., Fonstein, L., Liu, X.-C., Takatsu, T., Iventi-Solari, A., Filippini, S., Torti, F., Colombo, A. L., Hutchinson, C.R. (1999) Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. *J. Bacteriol.* **181**: 305-318
- Lorico, A., G. Rappe, Sartorelli, A.C. (1992) Novobiocin-induced accumulation of etoposide (VP-16) in WEHI-3B D⁺ leukemia cells. *Int. J. Cancer* **52**: 903-909
- Lührmann, A., Thölke, J., Behn, I., Schumann, J., Tiegs, G., Hauschildt, S. (1998) Immunomodulating properties of the antibiotic novobiocin in human monocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1911-1916
- Luka, S., Sanjuan, J., Carlson, R. W., Stacey, G. (1993) *noIMNO* genes of *Bradyrhizobium japonicum* are co-transcribed with *nodYABCSUIJ*, and *noIO* is involved in the synthesis of the lipo-oligosaccharide nodulation signals. *J. Biol. Chem.* **268**: 27053-27059
- Ma, Y., Mills, J.A., Belisle, J.T., Vissa, V., Howell, M., Bowlin, K., Scherman, M.S., McNeil, M. (1997) Determination of the pathway for rhamnose biosynthesis in mycobacteria: cloning, sequencing and expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding alpha-D-glucose-1-phosphate thymidyltransferase. *Microbiology* **143**: 937-945

- Madduri, K., Kennedy, J., Rivola, G., Inveni-Solari, A. Filippini, S., Zanusa, G., Colombo, A.L., Gewain, K.M., Occi, J.L., MacNeil, D.J., Hutchinson, C.R. (1998) Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*. *Nat. Biotechnol.* **16**: 69-74
- Mansouri, K., Piepersberg, W. (1991) Genetics of Streptomycin production in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of five genes, *strFGHIJK*, including a phosphatase gene. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 459-469
- Mao, Y.Q., Varoglu, M., Sherman, D.H. (1999) Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL2564. *Chem. Biol.* **6**: 251-263
- Maplestone, R.A., Stone, M.J., Williams, D.H. (1992) The evolutionary role of secondary metabolites – a review. *Gene* **115**: 151-157
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., Mootz, H.D. (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**: 2651-2673
- Marcu, M.G., Schulte, T.W., Neckers, L. (2000) Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. *J. Nat. Cancer Institute* **3**: 242-248
- Marshall, P.S., Morris, S.R., Threlfall, D.R. (1985) Biosynthesis of tocopherols: A re-examination of the biosynthesis and metabolism of 2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol. *Phytochemistry* **24**: 1705-1711
- Martin, J.F., Liras, P. (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**: 173-206
- Martin, M.A. (1994) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the persistent resistant nosocomial pathogen. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* **14**:170-191
- Maxwell, A. (1997) DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* **5**: 102-109
- Melzer, M., Heide, L. (1994) Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**: 93-102
- Michenney, M.A., Hosted, T.J., Dehoff, B.S., Rosteck, P.R., Rosteck, Baltz, R.H. (1998) Molecular cloning and physical mapping of the daptomycin gene cluster from *Streptomyces roseosporus*. *J. Bacteriol.* **180**: 143-151
- Midelfort, C.F., Rose, I.A. (1976) A stereochemical method for detection of ATP terminal phosphate transfer in enzymatic reactions. *J. Biol. Chem.* **251**: 5881-5887
- Mitchell, J.I., Logan, P.G., Cusing, K.E., Ritchie, D.A. (1990) Novobiocin-resistance sequences from the novobiocin-producing strain *Streptomyces niveus*. *Mol. Microbiol.* **4**: 845-849
- Mitra, A., Kitamura, Y., Gasson, M.J., Narbad, A., Parr, A.J., Payne, J., Rhodes, M.J.C., Sewter, C., Walton, N.J. (1999) 4-Hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase (HCHL) – An enzyme of phenylpropanoid chain cleavage from *Pseudomonas*. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**: 10-16

- Montecalvo, M.A., Horowitz, H., Wormser, G.P., Seiter, K., Carbonaro, D.A. (1995) Effect of novobiocin-containing antimicrobial regimens on infection and colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 794
- Moore, J.A., Poulter, C.D. (1997) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate:tRNA dimethylallyltransferase: a binding mechanism for recombinant enzyme. *Biochemistry* **36**: 604-614
- Mootz, H. D., Marahiel, M.A. (1997) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* **179**: 6843-6850
- Mootz, H.D., Marahiel, M.A. (1999) Design and application of multimodular peptide synthetase. *Curr. Opin. Biotechnology* **10**: 341-348
- Mootz, H.D., Schwarzer, D., Marahiel, M.A. (2000) Construction of hybrid peptide synthetases by modular and domain fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5848-5853
- Mühlenweg, A. (1999) Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von Shikonin in Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. und von Novobiocin in *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Mühlenweg, A., Melzer M., Li, S.-M., Heide, L. (1998) 4-Hydroxybenzoate 3-geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*: purification of a plant membrane-bound prenyltransferase. *Planta* **205**: 407-413
- Munro, A.W., Lindsay J. G. (1996) Bacterial cytochromes P-450. *Mol. Microbiol.* **20**: 1115-1125
- Nakatsu, C.H., Providenti, M., Wyndham, R.C. (1997) The cis-diol dehydrogenase *cbac* gene of Tn5271 is required for growth on 3-chlorobenzoate but not on 3,4-chlorobenzoate. *Gene* **196**: 209-218
- Nomura, Y., Nakagawa, M, Ogawa, N., Harashima, S., Oshima, Y. (1992) Genes in PHT plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in *Pseudomonas putida*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 333-344
- Nordenberg, J., Albukrek, D., Hadar, T., Fux, A. Wasserman, L., Novogrodsky, A., Sidi, Y. (1992) Novobiocin-induced anti-proliferative and differentiating effects in melanoma B16. *Br. J. Cancer* **65**: 183-188
- O'Keefe, D.P., Harder, P.A. (1991) Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes. *Mol. Microbiol.* **5**: 2099-2105
- Ogura, K., Koyama, T. (1998) Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem. Rev.* **98**: 1263-1276
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H., Horinouchi, S. (1999) The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* **34**: 102-111

- Orihara, N., Kuzuyama, T., Takahashi, S., Furihata, K., Seto, H.J. (1998) Studies on the biosynthesis of terpenoid compounds produced by actinomycetes. 3. Biosynthesis of the isoprenoid side chain of novobiocin via the non-mevalonate pathway in *Streptomyces niveus*. J. Antibiot. **51**: 676-678
- Pabo, O.P., Sauer, R.T. (1984) Protein-DNA recognition. Annu. Rev. Biochem. **53**: 293-321
- Parry, R.J., Li, W. (1997) An NADPH:FAD oxidoreductase from the valamycin producer, *Streptomyces viridifaciens*. J. Biol. Chem. **272**: 23303-23311
- Peixoto, C., Laurin, P., Klich, M., Dupuis-Hamelin, C., Mauvais, P., Lassaigne, P., Bonnefoy, A., Musicki, B. (2000) Synthesis of isothiochroman 2,2-dioxide and 1,2-benzooxathiin 2,2-dioxide gyrase B inhibitors. Tetrahedron Lett. **41**: 1741-1745
- Perego, M., Higgins, C.F., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Hoch, J.A. (1991) The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. Mol. Microbiol. **5**: 173-185
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.-Z., Piepersberg, W. (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. Mol. Microbiol. **16**: 1137-1156
- Pfennig, F., Schauwecker, F., Keller, U. (1999) Molecular characterization of the genes of actinomycin synthetase I and of a 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid carrier protein involved in the assembly of the acylpeptide chain of actinomycin in *Streptomyces*. J. Biol. Chem. **274**: 12508-12516
- Piepersberg, W. (1994) Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. Crit. Rev. Biotechnol. **14**: 251-285
- Pigac, J., Vujaklija, D., Toman, Z., Gamulin, V., Schrempf, H. (1988) Structural instability of a bifunctional plasmid pZG1 and single-stranded DNA formation in *Streptomyces*. Plasmid **19**: 222-230
- Pissowatzki, K., Mansouri, K., Piepersberg, W. (1991) Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes *strELMB2N*. Mol. Gen. Genet. **231**: 113-123
- Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J. (1987) High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. J. Mol. Biol. **195**: 687-700
- Proctor, R.A., Wick, P., Hamill, R.J., Horstmeier, P., Gullings-Handley, J., Weisensel, M., Brandt, G. (1987) *In-vitro* studies of antibiotic combinations for multiply-resistant coagulase-negative staphylococci. J. Antimicrob. Chemother. **20**: 223-231
- Quirós, L.M., Aguirrezabalaga, I., Olano, C., Méndez, C., Salas, J.A. (1998) Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. Mol. Microbiol. **28**: 1177-1185
- Raad, I.I., Hachem, R.Y., Abi-Said, D., Rolston, K.V., Whimbey, E., Buzaid, A.C., Legha, S. (1998) A prospective crossover randomized trial of novobiocin and rifampin prophylaxis for the prevention of intravascular catheter infections in cancer patients treated with interleukin-2. Cancer **82**: 403-411

- Rackwitz, H.-R., Zehetner, G., Frischauf, A.-M., Lehrach, H. (1984) Rapid restriction mapping of DNA cloned in lambda phage vectors. *Gene* **30**: 195-200
- Rackwitz, H.R., Zehetner, G., Murioaldo, H., Delius, H., Chai, J.H., Poustka, A., Frischauf, A., Lehrach, H. (1985) Analysis of cosmids using linearization by phage lambda terminase. *Gene* **40**: 259-266
- Raiboud, A., Zalacain, M., Holt, T.G., Tizard, R., Thompson, C.J. (1991) Nucleotide sequence analysis reveals linked *N*-acetyl hydrolase, thioesterase, transport, and regulatory genes encoded by the bialaphos biosynthetic gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Bacteriol.* **173**: 4454-4463
- Rappa, G., Lorico, A., Sartorelli, A.C. (1992) Potentiation by novobiocin of the cytotoxic activity of etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26). *Int. J. Cancer.* **51**: 780-787
- Redenbach, M., Ikeda, K., Yamasaki, M., Kinashi, H. (1998) Cloning and physical mapping of the *EcoRI* fragments of the giant linear plasmid SCP1. *J. Bacteriol.* **180**: 2796-2799
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., Hopwood, D.A. (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**: 77-96
- Reece, R.J., Maxwell, A. (1991) DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**: 335-375
- Retzlaff, L., Distler, J. (1995) The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol. Microbiol.* **18**: 151-162
- Reusser, F., Dolak, L.A. (1986) Novenaminate is the active moiety in novobiocin. *J. Antibiotics* **39**: 272-274
- Ropp, J.D., Gunsalus, I.C., Sligar, S.G. (1993) Cloning and expression of a member of a new cytochrome P-450 family: cytochrome P-450lin (CYP111) from *Pseudomonas incognita*. *J. Bacteriol.* **175**: 6028 – 6037
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Brändén, C.-L., Banaszak, L.J. (1975) In: *The enzymes*, 3rd Edition (Boyer, P.D., Ed.) Vol. **11**: 61-102, Academic Press, New York
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Scannell, J., Kong, Y.L. (1969) Biosynthesis of coumermycin A1: incorporation of L-proline into the pyrrole group. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1969) 139-143
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Schröder, W., Keller, U. (1998) Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from *Streptomyces chrysomallus* and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II. *J. Bacteriol.* **180**: 2468-2474
- Schlösser, A., Jantos, J., Hackmann, K., Schrempf, H. (1999) Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and celotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2636-2643

- Schneider, E., Hunke, S. (1998) ATP-binding-casette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 1-20
- Schoepfer, R. (1993) The pRSet family of T7 promotor expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* **124**: 83-85
- Schwarz, G.N., Teicher, B.A., Eder, J.P. Jr., Korbut, T., Holden, S.A., Ara, G., Herman, T.S. (1993) Modulation of antitumor alkylating agents by novobiocin, topotecan, and lonidamine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **32**: 455-462
- Schwarz, K. (1961) Separation of enol and keto tautomers of aromatic pyruvic acids by paper chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* **92**: 168-175
- Sekiguchi, J., Shuman, S. (1997) Novobiocin inhibits vaccinia virus replication by blocking virus assembly. *Virology* **235**: 129-137
- Shen, Z., Beyers, D. (1996) Isolation of *Vibrio havereyi* acyl carrier protein and the *fabG*, *acpP*, and *fabF* genes involved in fatty acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 571-573
- Shimizu, N., Koyama, T., Ogura, K. (1998) Molecular cloning, expression, and purification of undecaprenyl diphosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **273**: 19476-19481
- Shineberg, B., Young, I.G. (1976) Biosynthesis of bacterial menaquinones: the membran-associated 1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*: **15**: 2754-2758
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988) Lambda ZAP: A bacteriophage expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7583-7600
- Siebert, M., Bechthold, A., Melzer, M., May, U., Berger, U., Schröder, G., Schröder, J., Severin, K., Heide, L. (1992) Cloning of the genes coding for chorismate pyruvate-lyase and 4-hydroxybenzoate octaprenyl transferase from *Escherichia coli*. *FEBS* **307**: 347-350
- Sieweke, H.-J., Leistner, E. (1992) O-Succinylbenzoate:coenzyme A ligase from anthraquinone producing cell suspension cultures of *galium mollugo*. *Phytochemistry* **31**: 2329-2335
- Smith, T.M., Jiang, Y.-F., Shipley, P., Floss, H.G. (1995) The thiostrepton-resistance-encoding gene in *Streptomyces laurentii* is located within a cluster of ribosomal protein operons. *Gene* **164**: 137-142
- Soballe, B., Poole, R.K. (1999) Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology*. **145**: 1817-1830
- Sohng, J.-K., Oh, T.-J., Lee, J.-J., Kim, C.-G. (1997) Identification of a gene cluster of biosynthetic genes of rubradirin substructures in *S. achromogenes* var. *rubradiris* NRRI3061. *Mol. Cells* **7**: 674-681
- Soll, J., Kemmerling, M., Schultz, G. (1980) Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplasts subfractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**: 544-550
- Song, L., Poulter, D. (1994) Yeast farnesyl-diphosphate synthase: Site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3044-3048

- Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. (1995) Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 3-14
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V., Marahiel, M.A. (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **273**: 22773-22781
- Stockmann, M., Piepersberg, W. (1992) Gene probes for the detection of 6-deoxyhexose metabolism in secondary metabolite-producing *streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**: 185-189
- Stoll, V.S., Blanchard J.S. (1990) Buffers: principles and practice. *Methods Enzymol.* **182**: 24-38
- Stott, K., Keeler, J., Van, Q.N., Shaka., A.J. (1997) One-Dimensional NOE Experiments Using Pulsed Field Gradients. *J. Magn. Reson.* **125**: 302-324
- Stratmann, A., Mahmud, T., Lee, S., Distler, J., Floss, H.G., Piepersberg, W. (1999) The AcbC protein from *Actinoplanes* species is a C₇-cyclitol synthase related to 3-dehydroquinase synthases and is involved in the biosynthesis of the α -glucosidase inhibitor acarbose. *J. Biol. Chem.* **274**: 10889-10896
- Strohl, W. R. (1992) Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* **20**: 961-974
- Stuible, H.-P., Büttner, D., Ehling, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E. (2000) Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. *FEBS Lett.* **467**: 117-122
- Suzuki, M., Taguchi, S., Yamada, S., Kojima, S., Miura, K.I., Momose, H. (1997) A novel member of the subtilisin-like protease family from *Streptomyces albogriseolus*. *J. Bacteriol.* **179**: 430-438
- Symmank, H., Saenger, W., Bernhard, F. (1999) Analysis of engineered multifunctional peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* **274**: 21581-21588
- Tahara, S., Ibrahim, R.K. (1995) Prenylated isoflavonoids – an update. *Phytochemistry* **38**: 1073-1094
- Takahashi, I., Ojima N., Ogura, K., Seto, S. (1978) Purification and characterization of dimethylallyl pyrophosphate: aspulvinone dimethylallyltransferase from *Aspergillus terreus*. *Biochemistry* **17**: 2696-2702
- Tang, L., Grimm, A., Zhang, Y.-X., Hutchinson, R. (1996) Purification and characterization of the DNA-binding protein Dnrl, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peuceitius*. *Mol. Microbiol.* **22**: 801-813
- Tarshis, L.C., Proteau, P.J., Kellog, B.A., Sacchettini, J.C., Poulter, C.D. (1996) Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15018-15023
- Taylor, M., Lamb, D.C., Cannell, R., Dawson, M., Kelly, S.L. (1999) Cytochrome P450105D1 (CYP105D1) from *Streptomyces griseus*: heterologous expression, activity, and activation effects of multiple xenobiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 838-842

- The QIAexpressionist – A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 3. Edition, März 1999.
- Thiara, A.S., Cundliffe, E. (1988) Cloning and characterization of a DNA gyrase B gene from *Streptomyces sphaeroides* that confers resistance to novobiocin. The EMBO J. **7**: 2255-2259
- Thiara, A.S., Cundliffe, E. (1989) Interaction of novobiocin-resistant and –sensitive DNA gyrase activities in self-protection of the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. Gene **81**: 65-72
- Thiara, A.S., Cundliffe, E. (1993) Expression and analysis of two gyrB genes from the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. Mol. Microbiol. **8**: 495-506
- Thompson, C.J., Ward, J.M., Hopwood, D.A. (1982) Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. J. Bacteriol. **151**: 668-677
- Thornsberry, C., Burton, P.J., Yee, Y.C., Watts, J.L., Yancey, R.J. Jr. (1997) The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test. J. Dairy Sci. **80**: 413-421
- Tomb J.-F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J.M., Cotton, M.D., Weidmann, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M., Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature **388**: 539-547
- Trauger, J.W., Walsh, C.T. (2000) Heterologous expression in *Escherichia coli* of the first module of the nonribosomal peptide synthetase for chloroeremomycin, a vancomycin-type glycopeptide antibiotic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**: 3112-3117
- Tsai, H.-F., Wang, H., Gebler, J.C., Poulter, C.D., Schardl, C.L. (1995) The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm. **216**: 119-125
- Tsai, T.F., Singh, O.M.P., Skarzynski, T., Wonacott, A.J., Weston, S., Tucker, A., Pauptit, R.A., Breeze, A.L., Poyser, J. P., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Wigley, D.B. (1997) The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, Clorobiocin. Proteins: Struc. Func. Genet. **28**: 41-52
- Tudzynski, P., Hölter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N., Keller, U. (1999) Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. Mol. Gen. Genet. **261**: 133-141
- Turgay, K., Krause, M., Marahiel, M.A. (1992) Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. Mol. Microbiol. **6**: 529-546

- Uchiyama, A., Aoyama, T., Kamijo, K., Uchida, Y., Kondo, N., Orii, T., Hashimoto, T. (1996) Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* **271**: 30360-30365
- van Wageningen, A.M.A., Kirkpatrick, P.N., Williams, D.H., Harris, B.R., Kershaw, J.K., Lennard, N.J., Jones, M., Jones, S.J., Solenberg, P.J. (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* **5**: 155-162
- Vara, J., Lewandowska-Skarbek, M., Wang, Y.-G., Donadio, S., Hutchinson, R. (1989) Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J. Bacteriol.* **171**: 5872-5881
- Volff, J.-N., Altenbuchner, J. (1998) Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol. Microbiol.* **27**: 239-246
- Vujaklija, D., Horinouchi, S., Beppu, T. (1993) Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *strR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **175**: 2652-2661
- Walsh, C.T., Hildebrand, J.G., Spector, L.B. (1970) Succinyl phosphate. *J. Biol. Chem.* **245**: 5699-5708
- Walsh, T.J., Hansen, S.L., Tatem, B.A., Auger, F., Standiford, H.C. (1985) Activity of novobiocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **15**: 435-440
- Walsh, T.J., Standiford, H.C., Reboli, A.C., John, J.F., Mulligan, M.E., Ribner, B.S., Montgomerie, J.Z., Goetz, M.B., Mayhall, C.G., Rimland, D., et al (1993) Randomized double-blinded trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: prevention of antimicrobial resistance and effect of host factors on outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1334-1342
- Westrich, L., Domann, S., Bechthold, A. (1999) Cloning and characterization of a gene cluster from *Streptomyces cyanogenus* S136 probably involved in landomycin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 381-387
- White, O., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Dodson, R.J., Haft, D.H., Gwinn, M.L., Nelson, W.C., Richardson, D.L., Moffat, K.S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J.J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K.S., Aravind, L., Daly, M.J., Minton, K.W., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Nelson, K.E., Salzberg, S., Smith, H.O., Venter, J.C. Fraser, C.M. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**: 1571-1577
- Wierenga, R.K., De Maeyer, M.C.H., Hol, W.G.J. (1985) Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* **24**: 1346-1357
- Wigley, D.B., Davies, G.J., Dodson, E.J., Maxwell, A., Dodson, G. (1991) Cristal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* **351**: 624-629
- Woese, C. R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271

-
- Wright, B., Bibb, M.J. (1992) Codon usage in the G+C rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55-65
- Zhao, Y., Kung, S.D., Dube, S.K. (1990) Nucleotide sequence of rice 4-coumarate:CoA ligase gene, 4-CL.1. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6411
- Zotchev, S., Haugan, K., Sekurova, O. Sletta, H., Ellingsen, T.E. Valla, S. (2000) Identification of a gene cluster for antibacterial polyketide-derived antibiotic biosynthesis in the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Microbiology* **146**: 611-619

VII Anhang

1 DNA-Sequenz der bei der Cosmid-Kartierungsmethode verwendeten Sonden SuperCos 1-T3 und SuperCos 1-T7

Restriktionsschnittstellen sind fett hinterlegt.

SuperCos 1-T3 (512 bp *ScaI*-*EcoRI*-Fragment):

ScaI

```

1  agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg
61  cgtcaacacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa
121 aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt
181 aaccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt
241 gagcaaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaaat aagggcgaca cggaaatggt
301 gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca
361 tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat
421 ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata
481 aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc ttcaagaatt c
                                     EcoRI

```

SuperCos 1-T7 (813 bp *BamHI*-*SspI*-Fragment):

BamHI

```

1  ggatccctat agtgagtcgt attatgcggc cgcgaattct catgtttgac cgcttatcat
61  cgataagctc tgctttttgt tgacttccat tgttcattcc acggacaaaa acagagaaag
121 gaaacgacag aggccaaaaa gctcgccttc agcacctgct gtttcctttc ttttcagagg
181 gtattttaaa taaaaacatt aagttatgac gaagaagaac ggaaacgcct taaaccggaa
241 aattttcata aatagcgaaa acccgcgagg tcgcccggcc gtaacaaggc ggatcgccgg
301 aaaggaccgg caaatgataa taattatcaa ttgcatacta tcgacggcac tgctgccaga
361 taacaccacc ggggaaacat tccatcatga tggccgtgcg gacataggaa gccagttcat
421 ccategcttt cttgtctgct gccatttgct ttgtgacatc cagcgcggca cattcagcag
481 cgtttttcag cgcgttttcg atcaacgttt caatgttggt atcaacacca ggtttaactt
541 tgaacttata ggcactgacg gttaccttgt tctgcgctgg ctcatcacgc aggataccaa
601 ggctgatggt gtagatattg gtcaccggct gagggttttc gattgccgct gcgtggatag
661 caccatttgc gatcaggcgt ccttgatgaa tgacactcca ttgcgaataa gttcgaagga
721 gacggtgtca cgaatgcgct ggtccagctc ggtcgattgc cttttgtgca gcagaggtat
781 caatctcaac gccaaaggctc atcgaagcgc aatatt
                                     SspI

```

2 Sequenzierung eines 53,1 kb Abschnitts (Cosmide 9-6G und 10-9C) aus dem Novobiocin-Biosynthesecluster aus *S. spheroides* NCIMB 11891

Aufgeführt ist die Nukleotidsequenz des jeweils codierenden DNA-Stranges und die entsprechende Übersetzung in die Aminosäuresequenz der 42 identifizierten ORFs aus Kapitel IV 2.2.2 Startcodons sind fett gedruckt, Stopcodons sind mit einem * gekennzeichnet. Mögliche ribosomale Bindungsstellen sind unterstrichen. Bereiche, aus denen Primer abgeleitet wurden, sind punktiert hervorgehoben.

Der Bereich von *novT* bis *ngyrB*^R wurde durch A. Mühlenweg sequenziert (Dissertationsschrift 1999) und ist hier zur Vervollständigung mit aufgeführt.

Bereich: *orf15* bis *orf5*

```

1 CTAGGAGGAGCTATGGCTCGTTGAAGCCCGGCGCGCAGCCCTGGCCACGGGTCGAGGA
  D E E I G L L K P G R A D P G T G L E
61 GCATGAGCAGGGTCATGGGCAGGTAGCGGAGCGGGTCCGCAGGCGCAGGGTCGGGCTGA
  E Y E D W Y G D M A E G W A D A D W G S
121 GCCGCAGGTCGAGCGGGTCAAGCATGCAGAACAGGTTCGCGGCGTTTCGAGGTGGGACGCCT
  E A D L E G L E Y T K D L A A L E V R R
181 TGTAGCGCAACGCGTGGTTCGTGGGCCTTCCGTGCGGGCAAGCGCCACTGGCCGAACTGGA
  F M A N R V L V R F A R G N A T V P K V
241 CCAGCCGGAAGAGGACCCGGACGAGCCGAGAGCTAGAGGCCCAACCGGTCGACGAGGG
  Q D A K E Q A Q E A T E I E P N A L Q E
301 TGAGCAGGTCGTCCGACCTCAGCTGGACGGCGTGGTAGAGCGGCTCGGTCCGCTAGTCTA
  W E D L L S S D V Q R V M E G L W A I L
361 GGAGGTCTAGGAGGCTGAAGTCTAGCAGCCCCTACCACACGAGCTTGCGGAACATCCGCG
  D E L D E S K L D D P I T H E F A K Y A
421 AGCGCTCTATGGCGTTCGTGCTACGGGAGCCACGCGCGGTCGAGCATCACGCTCCACTTGA
  S A L Y R L V I G E T R A L E Y H S T F
481 GGCACCTCCAGTACCGGGCAAGCTTGTACAGTGCCACTACTGCCTGAAGCCGCTGTGGCCTA
  E T F T M A R E F M D R I V S K P S V P
541 CCAGCGGCTGGGTGCCTACCGACCACGCCATGTGGAGCATGCGCACGGTGTTCGTCGAGGA
  H D G V W P H S T R Y V E Y A H W L L E
601 GGTCGCCGAAGCCCATGCACCTTGAGGACCTCGGCGAGGTAGGCAAGGAGCATGAGCTGTG
  E L P K P Y T F E Q L R E M R E E Y E V
661 GCAGCCGGAAGTAGACTGGCTAGCGGAGCGGCGCGGGAACAAGACGACGCGCCGCTCCT
  G D A K M Q G I A E G R A K N Q Q A A L
721 AGACGGCCCCTAGCAGCTCACAGCTGAGGTGCTGCCTCTGGTACAGGTTCGCGCATGCTCC
  I Q R P D D L T S E V V S V M D L A Y S
781 CGCTCGGGCCGAGGTCGTCAAGCTTGCGCCGGTTCGCGCTTGCAGCTGTTCGCCGACCAACT
  P S G P E L L E F A A L A F T S L P Q N
841 CGCGCTTCAAGACGACCTCCAGCTGCCACTCGGCCTACTAGGCCGGGAGGAGCAGGCCGC
  L A F N Q Q L D V T L R I I R G E E D P
901 AGAGTTCCGCGAGGTGGTGGGGCGGCGAGGTTCGTGCTGGCCATCTACCGCTAGCGCGCGG
  T E L R E V V G G D L L S R Y I A I A R
961 ACTACACGGCGTTGACGACGAACGCGCCGAGCACCAACAGGAGGTCTCTACCGCGTAGC
  R I H R L Q Q K R P E H N D E L L H R M
1021 GCAGCTTCCGCAACGGGCGGCGGCGCTACTGTCTGTGCTGCTACACACCCACTGGGCCCT
  A D F A N G P R A I V S L L M T H T V R
1081 TCGCCCTCCAGTTGCCGAGCTCTAGCCTCGGCTAGTTCGAACAGCTTGCAGCAGAGGCTGG
  F R S T L P E L D S G I L K D F T T E S
1141 TCCGGTGCTTCGGGAGCCCGCGGAAGAAGCCTGGTGGAAACCGCGGAAGAAGCCAGCA
  W A V F G E P A K K R V V K R R K K P D
1201 GCGGGCGGAACCGCTCGCGGAAGAGCAAGAGGTGCTGTACGAGGCCGCGGACGCGCTGCT
  D G A K A L A K E N E V

```

orf15

1261 GCTTCGGGCGGCACAGCTTTGGCCGGGCGGGCCGGGCGGGCGCTAGACCACCTTGAGTG
*

1321 CCCGCGCGTCACGCGTGTGCGCAGGGCAGCATGAACCACTCTCGGCACTTGTTCGTGGCAT
P R A T R V R T G D Y K T L A T F L V T

1381 GCCTACCCCTGCAACTGCGGCTGCGGCTCCCACAGGCATGGCGTCTAGTGGAAGTTGTCT
R I P V N V G V G L T D T G C I V K L L

1441 GGACGGACGCGGTGCGAAAAGCTGGTCCGCCCATGAAGCCGTGTAAGGGCGCACCACG
G A Q A L K E V L R R Y K P L M G A H H

1501 TGGGGCTACGGCACCGCATGCATTGCCCTCTCTAACGCCGGCTTGAACCACCTTTCGCC
V G I G H R V Y R S L N R G F K T T F R

1561 TTCAACGGCTAGTCTAGCCGCTAGGCCAGGAAGAGGAGCGCGCACGTGTACAACCTACGAG
F N G I L D A I R D K E E R T C M N I S

1621 TAGTCGCTGACGCGCGAGCTGCCGGCGGGACCCACTTCACGTGCTACATCTGGGCC
M L S Q A R E V A A A Q T F H V I Y V P

1681 CGGACTCCCCAGAGGTCGTCAAGGCAGTCGCAGAGCCACTAGCCGCACTCCGCCATGAGC
A Q P T E L L E T L T E T I P T L R Y E

1741 ATTGAGTCGCCGTGGCCCCGCCAGCGGCTGGCATGCTGCCTCCAGCCGGCCGGGCATGCC
Y S L P V P R T A S R V V S T P R G T R

1801 GCCCAGTCTAGGAGGAGCTTGGCGCTGTACAGTGGCTCGCAGCGGCTGTAGTCTCTGCTTG
R T L D E E F R S M D G L T A S M L V F

1861 ACGCGGACGCCGTGAGGTCGTCCCCCTAGACGGTCCGGGTCCGGCGCCAGGCCGAGGCCG
Q A Q P L E L L P I Q W A W G R D P E A

1921 ATCTTCACCTGAGCAGGTAGTGTGGACCGGCTACAGCCGCACGAACGGCAGCGCGTCCG
Y F H V R G D R G P R H R R A Q R R A A

1981 TACCTGCGGTGCTGGAGGCGGCACGTGCTCTACTGGCCGCGCAGCCGCAAGTGCCTGCGC
I S A L V E A T C C I V P A D A N V S A

2041 AGCGGCCAGTCGTACGGCTGCAAGAGACTGGCTTCTCGAACGTGTCCAGTCTCTTGAAG
D G T L M G V N E T G F L K C L D F F K

2101 AGGCTGTGGTTCGCGGAACTAGCCCCGCCACATCTTCCACTGGAACAGGACCCGGTTCGCGG
E S V L A K I P A T Y F T V K D Q A L A

2161 CACTTCACGCGTGGGCGGCGCTAGTCCGAGAAGGGCCTCGGCCAGCCCCAGCTCTGCTAG
T F H A G A A I L S K G S G T P T S V I

2221 TGCAACCGGGGCTCTGGTGGAGCTAGTCCGCGGAGGAGGACTCGGCCTATCTCGCACTAC
V N A G S V V E I L A E E Q A P Y L T I

2281 GGGAGCGGGAGCCGGTACTGCTCTTCCGGAGCTTCTCCCGTAGCCCCAGCCGAAGGCCG
G E G E A W S S F A E F L A D P D A E P

5' CCCCGATGAGGGGA

2341 CCGTCGACTAGTTATTCCCAGTGCGGGGGGTAGAACGGAGCGAAGCCGGGGCT 5'
P L Q D I L T V G G M

orf16

2401 ACCGGACGACCGGCCGAAGATCACTGACGATACGCTGATCCGTCAACTGGGCCCCGCCAC

2461 AACGGCGGTGAGCCTTCGTACGTGTACCACGGCGACGACGGGGCGGGGAACGATCATG

orf17

2521 CGGGGACGACGATGATGGGACCGGCGCACTCCCTGTTCGGGCGGGCGGCCTGGCTGGGGG
M G P A H S L S G A A A W L G V

2581 TCGGAGCAGCGGCGGGCGGCCGATCGGCCATGCCCTGGCCGGTGTGGTTCGTTCGGCG
G A A A A A A D R A M P W P V L V V G A

2641 CGCTGATCTGCGCGGGGGCGGCGCTCGCGCCGACCTGGACCACAAGTCCGGCGACGATCT
L I C A G A A L A P D L D H K S A T I S

2701 CGCGGGCGTTTCGGGCCGGTGTCCAAGGCGCTGTGCGAGATCGTCGACAAGCTGTTCGTACG
R A F G P V S K A L C E I V D K L S Y A

2761 CCGTCTACAAGGCGACGAAGAAACCCGGTACCCGCGCAGGACCGGGCGGCCACCGCACCC
V Y K A T K K P G D P R R T G G H R T L

2821 TCACCCACACCTGGCTCTGGGCCGTATGATCGGGCGGGCGCCTCGGGCGCTCGCGATAC
T H T W L W A V M I G G G A S A L A I L

2881 TCGGCGGCCGGTGGGCGGTGCTCGCGCTGCTTTCATCCATATGGTGTCTCGCCGTCGAGG
G G R W A V L A L L F I H M V L A V E G

2941 GGCTGCTCTGGCGGGCGGCCGGATGTGAGCGACATCCTCGTCTGGCTGCTCGGCGCGA
L L W R A A R M S S D I L V W L L G A T

3001 CGAGCGGTGGATCCTGGCGGGTGTGCTGGACAAGCCGGGCAACGGCTCGGACTGGCTCT
S A W I L A G V L D K P G N G S D W L F

3061 TCTCGGCGCCCGGCCAGGAGTACCTGTGGCTGGGACTCCCGATCCTCCTGGGCGCGCTGG
S A P G Q E Y L W L G L P I L L G A L V
3121 TGCACGACATCGGCGACGCGCTCACTGTGTGGGGTGCCTGATCCTGTGGCCCATCCCGG
H D I G D A L T V S G C P I L W P I P V
3181 TGGGGCGCAAGCGCTGGTACCCGATCGGGCCGCCGAAGCGATCCGGTTCAGGGCCGGGAG
G R K R W Y P I G P P K R S G S G P G A
3241 CTGGGTGGAGCTGA 3'
3' CCTCGACTTCCAGACTACGGCCACAAGTACAACGAGCCGCCCCACCCGCCGCG
G W S *
3301 CCGCCGCGACTTGCAGTACTGAGTGGCCACCCCGCCGCGAGCCGCTGCATGCACAGCAGCA
3361 TGCAGCGGGTGGTGGGTACTGCGCAGGCCCGCTCGGGGGGCGCGGGCGGGCCTGCGGCGAG
3421 TGTCGTGCCGGGGCTGGCGAGGAGTCGGCACGGTCCTGGCGGTGTGCGGGCGCATGCGCG
* G H W S R W L A A Y A
3481 GCAGGCGTGGTGGTTCGAGCAGTACTGACGGTTCGAGCGACTAGGCCGGGAGGAGGTGGT
G D A A V L E D H S G L E S I R G E E V
3541 GCCGCTAGTGTAGGCGCAGCACGCGSCACACGTGCGCCACGCGCTACCGGTGCTGGCATG
V A I V D A D H A T H L R H A I A V V T
3601 CCGGCAGGTTCGTGGAAGCGGTTCGCTGGCGAGGTCTACGGCCCGCGTGCAGCCAGCTCGT
R G D L V K A L S R E L H R A A R P D L
3661 CGCTGCAGCGGAGCAGGTTCCTGGTTCGACACGCCCCAGCCGGTTCCTGGTTCGGCGGGTTCGG
L S T A E D L V L T H P D A L V L R A L
3721 CTAGACGACGCGGACGCGCCCGCACTCCGGCATGGCGGCCTCGGCTGGAGGCACAGCTCG
R D A A G A R A H P R V A P A S R R T S
3781 GGCAGCAGGTTCGCGCGCCCGGGTTCGGCAGGCGCAGCTGGCGCGGCTCCGGCGGGTGTGCA
G T T W R A P G A T R T S R A S A A W L
3841 GCCGCAGGTGGCGCAGGCGCGCCCGCTCGGCGTCTAACAGCGCGTAGTGGGGTGCTTCT
E A D V A D A R A L R L N D R M S G V F
3901 GCACCACGAGGTCCAAGTGGTTCAGCTGTACCGGCGCGTGGGCGAGCCCGCCGTAGGCGC
V H H E L N V L A V H G R V R E A P M R
3961 TGTCGAGCCGGAGCGGCTGCCACTAGGCCCGCCACGCGCCCGCATCTAGGGCCGCTCGT
S L E A E G V T I R G T R P A Y I G A L
4021 CGGCGGGGTCTCACCTGAACGGGCGCGCCTGCCAGGCTGGTTCGCGCTGCGCCACGGCC
L R G L T S K G A G S P G V L A V R T G
4081 CTCGCTGGAGGTTCGAGTGGAGCACCTCCTGCAGCTACGGGAGCGCCATTGGCTTCAACT
P A V E L T V E H L V D I G E R Y G F N
4141 GGGCCAGCCGTACCTGCAGGGCCGGCAGGCCGCTGCTGGAAGAGCAGTGGCAGCAGGCCGA
V R D A H V D R G D P V V K E D G D D P
4201 GCTAGAGCGCATGCGGCTGGTTCGGCCCGCTCCCTGTGGACACGGTGGACGTTGAGCAGCA
E I E R V G V L R A L S V Q A V Q L E D
4261 TGGTTCGCGTCTACTCTGGGTGGCCTAGCTGGTTCGTAGACGCGCTTGTGCGCGGGCCAGC
Y W R L I L G V P D V L M Q A F L A G T
4321 AGTCGACGGGCTGCCACTAGGTTCGGGACCTCCTGCTTCTGTGGCGGGGTTGGTTCGACG
T L Q G V T I W G Q L V F V G G V L T
4381 GGTCCCTTCTAGCACTGCACCCACTCCAACTACTGGCCCTTCTCGTGGCTGGCGTTCGCTCT
A L F I T V H T L N I V P F L V S R L W
4441 CCAACATGGCGAGGGTTCGGCAGGTGAGGAACTACGCGGCCAGCCTGTGCGGGTGGGCCG
L N Y R E W A T W E K I R R D S L A V R
4501 CCGCCGGCTCCGCCACGCGGAGCTGGCAGGCCGGGCGCAGCTAGCAGAGGCGCTCATGCC
R R G L R H A E V T R G A D I T E A L V
4561 GCCGCTGGCGCCGATGGGCCGCGGAGGCTCGCCATGCGCCGGCCGCGGGCGGCCTTCA
A A V A A Y G A A E S R Y A A P A R R F
4621 TGGTTCGCGTTCGGGTGCTAGTTCGTCGCGGTCACGGTGGTGGTGGCGCTCACGGTTCGCGC
Y W R C G V I L L P L A V V V A L A L P
4681 CGCGCCAGTGGCGGTCGCGCGGCTAGTTCGTCGCGGGCGGGTGTGCTGCGGCTAGCGGTGCA
P A T V A L A G I L L G A W V V G I A L
4741 CGCCGTGACGGAGGGCGTAGCGCAACCGGTCCGCCAGCTACAGCCACCACTAGGCCCTGT
Q P V A E R M A N A L R D I D T T I R S
4801 CGTCTAGCGGCCATGGCCGCGGAGGTCTGTGGCCCGCCGTCGGCATGGCTGGCATGCT
L L D G T G A R E L V G P P L R V S R V
4861 CTTTCAGGAGGGCGTCCAGCCGGTTCGTAGAGGAGCGGCTCGTAGCGCCGCGGCTCGGCGT
L F D E R L D A L M E E G L M A A R L R
4921 AGTAGGCCCACTTCTGCCAGACCTACTGGTTCGCGCGGGCGCTTCTGCTGCCCCACGCGCA
M M R T F V T Q I V L A G A F V V A T R

4981 GGTCTACCTCGAGGAAGTGGGGGAAGCGCGGCAGCCTGTCCAGGAGCTGCTGCGGCGGCT
 E L H L E K V G K A G D S L D E V V G G
 5041 CGTCCATGCCGGGGCGGTACCTCCGCTAGTGGCGCTGGCGCAAGTGGCGCTACTCGTCCC
 L L Y P G A M S A I V A V A N V A I L L
 5101 GCTTGGCGCATGCCACGGCAGCGTTGTGCGAGGTGCTGTATCCGGGCATGCCAGCGGCCCG
 A F A T R H R R L L E V V Y A R V T A P
 5161 CCCGCTGCCCCTCCAGCACCGGCTGAGGCCACGGCGGCCAGCATGAGGCCACCACGGT
 R A V P L T T A S E P A A P D Y E P P A
 orf11
 5221 GCGGCTAGTACGCCTAAGGAGCTAGAGAAGGTTCGACAAGGGCACGCCGCTCTCCCCAGCC
 V G I M
 * A S E E I E E L Q E R A A L P T P
 5281 GAAGTCGCACGGCGGCAGCGAGCACTAGAGCTAGAGACAGGGGCATGGACAGGGACAGGG
 K L T G G D S T I E I E T G T G T G T G
 5341 CCGGAGCCGCGAGGCAGGCCGCGCACTGCTGCAGGACTATCGCGCTCAGGAGGGCGTCGTC
 A E A D T R R T V V D Q Y R S D E R L L
 5401 GAGGGCCACGCTGGGCCACCGGCGCTGGAAGGGGAGCACCTGCTTGTGGTGCCACAGGCG
 E R H S G T A A V K G E H V F V V T D A
 5461 GACCAGCTCGTCGTCGCCCGCTGCTGCGCTTGTGCTGGCAGCATGCCGGCGGCGCGTCAGC
 Q D L L L P S S A F V V T T R G G R L R
 5521 GGCATGCGGAAGGCGCTAGGCGCGGAGCCACACACTCAGGTGCCGCTGCACCCGAGCAG
 R V G E A I R A E T H S D V A S T P E D
 5581 CTCCTGGTCATGGAGTCCCAGCCGCTGGTTCGCTCGCCCGGTTCGCGCTCGGGCAGCCGCGAC
 L V L V E P D A V L S R A L A L R Q R Q
 5641 GGGCGGCCTCTCGCTGGCCGGCGGAGCCACTACGCGCTCGCGTCGCCAGCGGCGACGG
 G G S L S R G R E T T I R S R L P D G S G
 5701 CAGGTGGTTCGCGACCTGCTCGCGCCGCTGTCAGCAGCGTGACGCGCCGAGCGCTCGCG
 D V S A Q V L A A L V D D C Q A A D L A
 5761 CCGCAAGCCGACGTGCCCGGCGCTGCGCCCGTGCAGGTTCGTCGAGCCACTCCCACGGCCT
 G N P Q V A G S A P V D L L E T L T G S
 5821 GTCGTCGTTGGCCTAGGAACAGGACATGCTCCTGCCTCCGCGCGCGGCGCAGGTTCGCTTC
 L L V P D K D Q V L V S A R A A D L P L
 5881 CAGCAGCTCGCGGTGGCCTGGGTTCGTCATGCCTGCCCTCGAAGAGGAGCAGCCGGCGCAC
 D D L A V P G L L V S P L K E E D A A H
 5941 AGGCGGGTTCGGCGAGCCGGTTCGGCAGGCCGGCGCAGCCCCAGCGGCGTGTGCTGCCGCA
 G G L R E A L R G A A D P D G C V V A T
 6001 CTCGACGGGCCGCCCGCTCGTACGGCCAGCGGCCAGCATCTCCAGTGGCCACCCGGC
 L Q G A P A L M G T A P D Y L D G T P R
 6061 CCACAGCAGCTCAGGCGGCGGAGCAGGAGCATGCTCCAGGCGAGGTTCGGCGTTCGTGTGC
 T D D L G G R E D E Y S T R E L R L V R
 6121 CCGGCGCGCGCAGCGGCTCCCTGCGCTCTTCTCATCCGGTACCGCTAGAGGAGCTTCAC
 A A R T A S P R S F S Y A M A I E E F H
 6181 TGCCTCTCCCTTCTCGTTCGTCGTCGCGGACATGTGGCACTGGTCAAGCGGCTGGCT
 R L L P F L L L T V A S Y V T V L V S
 6241 CTAGGCCGGCAGCGGGCGCTCCTCGCGCGCATGGTCTGGTGGCACTAGTCGTCCTTGGCG
 I R G D G A L L A G Y W V V T I L L V G
 6301 GCCGTCCTTGTGGACTTACCGGCTCTAGTCGCGGGTGTATGCCCGGAAGCCTGCCGGCG
 P L F V Q I A S I L A W M R A S R V A A
 6361 GAGCGCCTGGAGGACGCTGCGGCGGGCCATGGCGCACTCCTTCTCGAGGAGCGGCGGCTA
 E R V E Q S A A R Y R T L F L E E G G I
 6421 TGGCGGTCGTTGGCGTTCAGGCCGGTGGCACAGCCCGGTCGAGCCACCGGGCCGGGCG
 G R L V R L G A V T D A A L E T A R G A
 6481 GAACAGCGCGACCTACAGCCGCGGACCCACCGCGCCCCCTCGTCGCCGTCGTGCCGGTC
 K D R Q I D A R Q T A R P L L P L V A L
 6541 CCGCTCATGGCCGTGCGGCTACCGGTGCTGGCGCGGCTAGCTGCCGCTATGTCTGTGCTC
 A L V P V G I A V V A G I S P L Y L V L
 6601 CGGCTGCGTCTGGTGTGCTGCGCGCTACCGCCGCGGTCCTTTCGCGCTGTGCGAGCTGCTT
 G V C V V V V A I A A A L F R S L E V F
 6661 GGTCGGCTAGAAGAGCTGCAGCGGGCAGCTGTGCCGCTGGTGGAGTGGCCGCCGCTGGGC
 W G I K E V D G T S V A V V E G A A V R
 6721 CGCCCAGTCCGGGCTCGGGTCGAGCCGCAAGCCCTCTCGTCGACGACCTACGCCCT
 R T L G S G L E A T K R S L L Q Q I R S

6781 CCGCCGCCACTAGGTCAACCCTGGCGGCGGCCACGTCGTAGCACAGCGGCTGCCACTA
 A A T I W N T V A A R H L M T D G V T I
 6841 GCGCCGCGGCTTCTCCCGCTACTGCTGTGGCCGGTTCGCGGTCGGCGGGCGGGCTTGCCAG
 A A G F L A I V V G A L A L R G G S R D
 6901 GTGCTGCCGGACGTGCCGCTCGGGCCGCGGGTTCGCGGCTGCGGGTCAACCAC
 V V A Q V A L G A G L P L G A V G L Q H
 6961 GTCGTCCGGGGTCTCTCGCTAAACTCGACCGGTGCGTTCGACTAACGCCGGCTCGGTCAT
 L L G W S L S K L Q G R L Q N R G L W Y
 7021 GTCCTTTGCGCCAGGACTGGCCCGTAGCCACAGGGCCCTAGCCCTATGCCTTCTAGCGC
 L F R P G S R A D P T G P D P Y P L D R
 5' TGACGTCCCAGTGAGTCGTGGATGGCCCAAACCGTGCAAGGTTGTCTTCGGG
 7081 TTAGAC**GT**ACTGCAGGGTCACTCAGCA 5'
 I Q M
 7141 AACGGCCGGGGCAATCGATTATTTCGCTTCTCGGCCACACGGCGAACGGCCCGGGCTCGA
 7201 CGTGATCACCCAATTGCGCCACCGTCTCGCGGAGTTGCTCGCGCGCGTTCGTAGCCTCG
 7261 GTGGGCACCGGCCGTCCCCTGCATGCGGACAGCGGCGTTCGCGGTACCCGTGATGGGAC
orf18
 7321 GTCC**GTG**TCTGTACGTTGAGTTCAACAAAGACTCGCGCCGCGCTGCGTACCTCGGCCCG
 V S V T L S S T K T R A A L R T S A R
 7381 AGCTTCCGTCGAAATGCTGGTCATCCTCGTCATGGCGGGGGTACTCTGTGGCTTCTGGG
 A S V E M L V I L V M A G V T L W L L G
 7441 GCGGATGTGGTCCGTCGTGTGGCCGCTGATAGTCGGCCTGCTCCTGACCACGCTGACCTG
 R M W S V V W P L I V G L L L T T L T W
 7501 GCCGCTGGCCCGGTTCTCGTTCGGCACGGGTGGCCGCGCGCCCTGGCCGCTCCGTGGT
 P L A R F L R R H G W P P A L A A S V V
 7561 GATGGTGTGTTCTTGGCGGCCGCTGTGGGCGTTCGCGCGCTGATCGCGGTGCCGGTGGC
 M V L F L A A A V G V A L I A V P V A
 7621 GTCACAGTCGGGTGAGCTGGCGACGGGGTTCGCGGACGGCATCGACAAGGTGCGGGAGTG
 S Q S G E L A T G V A D G I D K V R E W
 7681 GGCGCCCGGGCCCGCGCTGAACATCGACGACGAGATCACCGGCGCGCTGGACTCCGG
 A A G P P L N I D D D E I T G A L D S G
 7741 GATGGCGCGTCTTCAGGACAGTGTGGCAGCATGGTCACCACCGTTCGTACGGGCGTCAG
 M A R L Q D S V G S M V T T V V T G V S
 7801 CACCGTGGTCAACGGAGTCGTGACCGCTGTCTCGCGCTCTTCTGATGTTCTTCTTCT
 T V V N G V V T A V L A L F L M F F F L
 7861 CAAGGACGGGCCGAAGTTCTGCGGTGGCTGGCCCGTTCAGCTGCCCGGCCGACTCGCCAC
 K D G P K F L P W L A R Q L P G R L A T
 7921 CGACATCCCGGTGGTGGCCCGCCGAGCTGGGACACGCTCGGGCGGTTTCGTACGGTCCCA
 D I P V V A A R S W D T L G A F V R S Q
 7981 GGCGTTCGTCGGTCTGCTCGACGCGGTGTTTCATCGGGCTCGGCCTGTGGATCGTGACGT
 A F V G L L D A V F I G L G L W I V D V
 8041 ACCGCTCGTACTCCCGCTGGCGGTGCTGACGTTTCGTCTCCGCGTTCGTGCCCGTTCGTCGG
 P L V L P L A V L T F V S A F V P V V G
 8101 TGCCCTGTTCGCGGTTCTGGTTCGCGGCTCATCGCGCTGGTCTCGAACGCGCCCGGGA
 A L F A G L A V A V L I A L V S N G P T D
 8161 CGCGCTGATCGTGTGGCGGTATCATCGTTCGTCAGCAGCTGGAGGGCAATGTGTTCCA
 A L I V L A V I I V V Q Q L E G N V F Q
 8221 GCCCATGATCCAGAGCCGGGGCTGGGTCTGCACGCGCGGTGGTCTGCTGGCGGTGAC
 P M I Q S R G L G L H A A V V L L A V T
 8281 GCTCGGGGCGAGCCTGGCGGGCATCGTGGGACGCTGCTCGCCGTACCGATGCGCCGCGC
 L G A S L A G I V G S L L A V P M R R A
 8341 TGATCGCGGTGGTCTGGAACACTACGTACGCGAACAGCTCACCGACCCGGAGCCGGAACCGA
 D R G G L E L R T R T A H R P G A G T E
 8401 GCCAGACCCTGCGCCGACGAGGACCCCGCGCCGACCCGGCACCCGCCACCCCGCCCGG
 P D P A P D E D P A P D P A P A T A P A
 8461 CTCGTAG 3'
 3' CATCTTGGGGGGCCAGTGTTCGGTTCGGCGCGGCGCCCGGGACGGTCCGCTCGACGTA
 S * * L W G R R A A Q W A L Q M
 8521 GGCCCACCAGCGAGGCGCTCTAGGTAGTACACGACCTACACCGCGACGTGCCACGCGGC
 R T T A G A L D M M H Q I H R Q V T R R
 8581 CGAGTCAGGGTGGACCCACCGCTAGCGGAACAGCCGCTGGGGGCGCTGCTCGTCACTGTC
 S L G V Q T A I A K D A V G A V L L S L

8641 CTCGGAAGACAGCTACCTGCTGTGCGCCGAGCCCCGCGGGGCCGGGGCAGCCAAGGCTGCTG
L R R D I S S L P E P A G A G D T G V V
8701 GCGCGNGNCNTCCAGCRSTGCCCCGGGCCAGGCCVSVGVGGAGCTCCAGCTGGAGGTC
A G ? ? T ? V P A R D P ? ? E L D V E L
8761 GCCCTGCCGAGGAGGGTTCATGGCAAGCTTGTCCCGCTACTCGCGCCGGTCTGCTGACGA
P V A D E W Y R E F L A I L A A L L S S
8821 CAGGGCGTGGTTCGCGGCACCCAGCCAAGCAGGCCCGACGGCACGCCGGGGCCCTTGGTC
D R V L A T T P E D P S G H P G G P V L
8881 GCCCGTCTACCGCTAGCGCGCCAGCCGTTGCCGGTCCCGGTTGCCGTCTACGCCGTGGCT
P C I A I A R D A V A L R L P L H P V S
8941 GGCCCGGTTCGAGGGGCCGCGCATGCGGGAGGTGCTGCAACAGGTGGCGCGGGAGCAGCAG
R A L E G A R V G E V V N D V A G E D D
9001 CTTCTTTCGGAAGAGCATCTCGTGGGCCATCCAGTGGGGTGCCGGGTTCGCGAAGCTTGAG
F F A K E Y L V R Y T V G R G L A E F E
9061 GCGCAACAACGACGGGCTCCCGTAGCGGTGCATGACGCGGAACGTCTTGGTCTCGTAGAG
A N N S G S P M A V Y Q A K C F W L M E
9121 CAGCGCGCGGAGCGGACCTAGACGGCGTCTACGACCGCGTCGCGGAGCGGCGGCCACTA
D R A S A Q I Q R L H Q R L A E G G T I
9181 CTGGAGCTAGTCGGGGCGGGCCAGTACGGCCGCGCCGCGAGGGCCATGCAGAGGTCTTC
V E I L G G P D H R R A A D R Y T E L L
9241 TGACCACTGGAGCTATGCCCGCTCCAGGTTGCGCAGCCGCAACGCGAAGTCTACCCCTCA
S T V E I R A L D L A D A N R K L H P T
9301 CTCGCGGTGCAGGCCCCCTCAGCCGGCCATGGCCGCGCCGTCTGGCAGCCACACCGACCG
L A V D P P T P R Y R R P L G D T H S A
9361 GTACGGGAACCGCCACTCTGGCCAGTTCGTGCAGTGCCTCGGAGGCGNTGCAGGCGGGGCTC
M G K A T L G T L V D R A E A V D A G L
9421 GGCCAGCCGCTGGAGTTGCCCGCCACTCGCCCGGGCAGCAATAGTCGTCGGCCATGTGCCG
R D A V E V A T L P G T T I L L R Y V A

orf14

9481 AAGGAGCTGACGCCAATGGGGCCCGGAGGTGCGCGTGCCCGGGGAGGACTCTGGAACC
E E V A T V G A A E L A V
9541 GGGGTACGCGAGTGTAAGTGCCTGGAAGATTACTAAGTATGGCATGACGTAGCCACATC
* H N M G Y Q M P T
9601 TCGTGTGGCCACCCGCCCACGAGCGGCGTTGGGCGGGTGGCCACGAGCCTTTGTCTTGGG
S C V P P R T S A A V R G G T S P F L V
9661 GAGAGGGCGATAGGCGCCACGTCCATCCGCGCAAGCTGGCAGACGGCCTGTGCCAACGGG
G R G S D A T C T P A N S R R G S V T A
9721 CTCCTCAGGAGCCGGCACTGCGCGTCAGTATGCGCAGCGGGGCGACGGCCAGGCCGGCCA
R P T R P R S A C D Y A D G R Q R D P R
9781 GCTAGGCGCGGCTCTTCGGCAGCCTTGGTGCCTGAACTGGCAGCGGGCGAGGGTTCGAGG
D I R A S F G D S G R S K V T A R E W S
9841 AGGGCAGCAACATCGACCGGAGCTGGAAGTGCCTGAGGCGCGCCGGAGCCGTTCGGGCA
R G D N Y S A E V K V T V G R P R P L G
9901 GGACCCGCGCCTGCCACTCGGGCTGGCACACGCTCGCCGGTGCCTGGCGCAACACGC
D Q A R V T L G V T H S R G R G V A N H
9961 GCAGGTGGCCATGCAGCATCAGCTCAACCTCGTCGCCGTCCCAGCAGCGGGGCGGCCGGC
A D V P V D Y D L Q L L P L T T A G G A
10021 GCGGCCTCGCCTTGCTGGTGTGTCACAGCCACCGCCAGCGCATGCGGGTGGAGCCCGCTGA
A G S R F S W S T D T A T A Y A W E P S
10081 AGGCGCTGCAGCAGTCCAGGTCCGCCATCAGCCGGCGCGCCTGCCGTGGCCCTTCAGCC
K R S T T L D L R Y D A A G S P V P F D
10141 AGGGTCCGCGACAGGCGGAGCCGCCGAAGAAGGGCAGCGCCATCTCGTCCGGCGGCGG
T G P A T R R P P R R G T A T S C P R R
10201 CACAGTGGGAAGAGCGGCAGCAGCCGGCATGGGCTGTGCGGCTAGGGCAGTGGGTGGTGG
R T V R R A T T P R V R C A S G T V W W
10261 TCGGCGCTGCCACGGGCCGTCAGCTCAGCCACTTGAGGCCATAGGCGTCCGTGTCATGCA
W G R R H G A T S D T F E P I R L S L V
10321 AGGGGAGGGCCTGGCTGCCGACGGCGACGGTGCCCTTACCTGCCGGCCTGGTGCCGTG
N G E R V S P T R T G R P I S P R V V A
10381 GGACGGTCCAGAGCCGGTGCAGCGAGCCGGCCATCCAGGCCGGCACAGCGGGTACG
G Q W T E A V R E G P R Y T R A T D G M
10441 GGTGTAGTCGCCGTACAGGTACAGCTTCCACCAGACACCACGTGGTACACGGCGGTCA
G V I L P M D M D F T T E H H V M H R W

10501 GCCACAGGGGCCGCGACTGCATGAGCCACGCAAGCTACGGCCAGCGGTGTACCGCCCACA
D T D G A S V Y E T R E I G T A V H R T
10561 TGACCAAGGTGCTCCGACAGGACCATGCCCCGCGGCCGCTTCGCGACGAGGCTACGGGTGC
Y Q N W S A D Q Y P R R A F R Q E S A W
10621 CGCTCGGCGGCAACAGGCGCATTACAGAGGCATGCTAGCGCGACAACGCGAGGCTGTGGC
P S G G N D A Y T S R V I A S N R E S V
10681 ACACGTGGTGGGCGGCGCCTTAGGGGACGCTCCTCTGGACGTAAGTGCAGCATCTCCATGC
T H V V R R P I G Q S S V Q M V D Y L Y
10741 CCGACGCGGCCACGGCGGCTTGGCGTGGCACCACCGCGCGGACAGCTAGGCGAAGTCGT
P S R A T G G F R V T T A R R D I R K L
10801 CGAGGCGCGGGCGGAGCGCGGCTAGGCGTGCCACCCGTCGCGGTGCGCAAGCGGCAGCC
L E A G A S A G I R V T P L A L R E G D
10861 CGGCGGTGCGCCAGGTCCGCTACAGCCTCAGCACCTGCTCGTAGTGCGGTGCCCGCGGCC
P R W R T W A I D S D H V L M V G R A G
10921 GCCGACGGCGGAAGCGCTGCTCCAGGGCAAGCGAGAGCGGAAGGAACAACAGTGCTGCC
A A A A K A V L D R E S E G E K N T V V
10981 GCTCGAAGGGCGCATGGAAGGGCTTGAAGCCCCGGAAGCGCAGCGGGCGCAGCTGGAGCT
A L K G R V K G F K P A K A D G A D V E
11041 CACCCCCGGGCCATGGGGCGAGCAGCTTCTCCCGGCTCCTGCCGTACATCATCCGCGGC
L P P G P V G S T S S P R P R C T T P A
11101 TCCAGCTATAGCACGGCCCCGTGCCGGCAAAGCTCCTCTCCGCGCCACTCGACGGTCCGCC
S T S I T G P V A T E L L P A T L Q W R
11161 TCCGCTTGAGCTTGCACGGGAGGCACTGCCAGCTTACCCCCGACTGTATGTCCGCGAACC
S A F E F T G E T V T S T P S V Y L R K
11221 GCTGCAGCTTTCATGTAGCACGGGACCTAGTCCGGGAAAGGCAGCTAGAAGGCCATGCAGA
A V D F Y M T G Q I L G K G D I K R Y T
11281 CCATCGACTCCTAGGGCGCGAGCCCGCCCCGCGCCCTACAGCTGGTCCCACC
Q Y S L I G R Q E A P R P T R I D V L T
11341 ACGCCGCACGCAGCTCGCACTGCCAGTACAGGAACCACTGGAAGTGGAGCCCGTCCCTGCT
T R R A D L T V T M D K T V K V E P L V
11401 GTACCGCGTCAAGGAGCGGCAGGCTGCGGTACAGGTCCCTCCTCCACAACCTGGACCATGC
V H R L E E G D S A M D L S S T N V Q Y
11461 ACGGGAGGAGCTGGAGCCGCTGCCGGCCCAGGCACGGGCACATGGGCTGCTTAGGGAACC
T G E E V E A V A P D T G T Y G V F G K
11521 GCGGGTCTAGCAGCCGTCGCGGACCTGGGCCAACGGGAACACCAGCTGCCACAACCTGCC
A G W I T P L A Q V R N G K H D V T N V
11581 AGTCGAACACCCACCCCGGGACCTGCTAGTCCGAGTCGCACCACACGTGCCCCCGGCTTG
T L K H T P G Q V I L S L T T H V P A S
11641 GCAGGCTGCCCCAGCGCCAGTGCATTGGCATCATCAGTGGGACGCGGCGTGCAGCGCCGA
G D S P T A T V Y G Y Y D G Q A A R A P
11701 GGTGCCGCTCCCCGTGGACGCGGCAGCTCGGGCGGCCCTGCGCATGCCTCAGGCTCGGGC
E V A L P V Q A T S G A P V R V S D S G
11761 CGGCTGGCGCGGACCCGGCCAAGTCCCGCGGCGGCCACCGGTGCAAGTCCCGGCTCA
P R V A G D A P E R G G G T A L K V A S
11821 CGGTGCACTGGAGGAACAGGCTCCATAACCACATCGCGTCGCAGCGCCACGCGCAGACT
H W R S R R T R P I P T A C R R P A R R
11881 GGCAGGGGGCGGAGCTTCCCCGGCTCCCGCTGCCACGGCCACCGCCAAGTGGCGCGGCTC
V T G R R S P A S P S P A P P P E G R R
11941 GCCCGCGGCGCGGTCCAGCTATGCGGGCGGCGGACAAGCCACTGGACGACCGGCCGCT
A A A A A L D I R G G G Q E T V Q Q G A
12001 AGCATGCCCCACGACTGGTCCGCGAGGAACTCGACGCGGCGGCTGGTACGCCCTACGG
I T R A T S V L A D K L Q A A S W D P H
12061 CGACCCGCTCGTCGCGGCGGCGAGGGCGCTGTACCCCTCACCGGTAGCTGCACGGGCTGC
R Q A L L A A A G A V H P T A M S T G S
12121 GCCGGCACATCGGCAGCAGGTGGCCAGTGGGTACGGCCACGGGCAGCGCGCCCGGCGCT
A A T Y G D D V P D G M G T G T A R A A
12181 GCTAGGGCTGAGGGCCTCGGCAGTGCAGCCCGAACTGACGGAGCAGCGGCTGGCCCCCG
V I G V G P A T V D P K V A E D G S R P
12241 GTGCCGACCTCTTGAGCCGGTCCGCTCAGCAGGGCCAGGTGGCGAGGCTGGCAGTCCGCGC
G R S S F E A L S D D R D V A G V T L A
12301 GTAGGCGCCGCGGCCCTCGGCTACCAGGGCGAGGGCCCCGGCGACAACGGGCGGCGGT
A D A A G P S G I T G S G P G S N G A A

12361 GCTGCTTCTCGCGCGGCGACGAGAGCGAGTCGAGCAAGTGGCGCTCCGAGTACCCAGCC
 V V F L A G S S E S L E N V A L S M P D
 12421 ACGGCAGCGAGCCCCGAGGCTCGGGTCCGAGTACAACTGCTGGAGCCGAGGGAAGCGGC
 T G D S P A D S G L S M N V V E A G K A
 12481 GCCGGGTGAGGTAGGGCCGCTAGTGGACGCTGAGCCTCGGCTTCGGCAGCAGCGGCTCCT
 A A W E M G A I V Q S E S G F G D D G L
 12541 GGAACGGCTAGTAGTTGAGCCGGCGCCCGCTGAGGAACTGCCACGGCGGGCTGCGGA
 V K G I M L E A A P A V G Q R T G G S A
 12601 AGGGCAGCGGCGGCTGCTACCTCCGGTGTACGCATGGCACCGGCTTCGGCAGGCGGCAAG
 K G S G G V I S A V H T G H G F G D A T
 12661 GCCTCGACGGCCTCTTCAGGAGCCGCGGCTACGCCGGGCGCTCCAGCCCCACCCAGA
 G S S G S F D E A A A I R G A L D P H T
 12721 CCAGCCGCGGCCACAGCTCTTGCCGCTGGAAGTGCAGGAGTGGCGCTTGGCCTGAAGG
 Q D A G T D L V A V K V R E G R L G S K
 12781 TATGCAGCCCGCGGCTAGACCCGCCACGACGCCAGGTGCTGCGGACTGGGCGGGA
 W V D P A G I Q A T S R D L S A S V R G
 12841 GCTCGGTGTGGAACCCCTGCCGAGCTCCCGCCGACAACTACCTGCCGGCCGCCCGC
 D L W V K P V A D L A A S N I S P G A P
 12901 GGTTGACAAAGGTCTTGCGCGGCTCCAGCCGCCCCCTCTGGGCATGGCGGGCAGCAGCT
 A L Q K W F A G L D A P S V R V A R A D
 12961 ACGAGAGGTCCGCGGCTGCCGGCTTGGCAGCAGCCGGTCCCGGCACTCCGAGCGTGGC
 I S E L R R V A S G D D A L A T L R R V
 13021 ACCGAAGCCGGAAGAAGCGCCTGAGCGAGTGCTAGTCGCCCTCGCGCCTCCACACGCGGA
 T A E A K K G S E S V I L P L A S T H A
 Primer MS1 (5' → 3')
 13081 GCAGCATGGCGACCCGCTGCTCGCTCCAGTGCAGCTTGTGCGAACGCCAGGTTCGGCCGGCC
 E D Y R Q A V L S T V D F L K R D L R G
 13141 GCCTCTGGTTTAGGGGCCGAGGCTCCCGTCTTGCCACTCGGCCGGCAGGACAAGCTCTC
 A S V L D G A D S P L V T L R G D Q E L L
 13201 AGACCTTCTACTACGGCGGCGCCGGGCCGGCCGAGCTGGCTCTGCTAGCCCGTGGCC
 T Q F I I G G R G P G P E V S V I P G G
 13261 GCAGCAGGAACGGCTCTCACTGGGCCAGTGGCCACTAGTCCGCATGTCTCCGCCGCGAAA
 A D D K G L T V R D G T I L R V S A A S
 13321 GGCCCCGCGGCTCGGCGAACGGCTACCGACAGGACACGGCGGCCCCCTCCTCCGGC
 E P A A S G S A S P R D Q A G G P S S A
 13381 TGTGCCCGCGGTGCCGCGGCCCGGTCCAGTCAGGGTGGCTATGGCGGCGGTGCTCCC
 S V P A V A G A A L T L G V S V A A V L
ORF9
 13441 CCTAGGCAGAGTAGACCAGGGTACGGAAGGCAACACGCTTCGCTCTTTAAGTGCACGACG
 P I R R M
 13501 TGTCTTTAGGCAACCGCCGCTGCCACAGTGACTTAAGGCCACCGTGTCCACCCTGTAC
 13561 AGGGTTGCTGCTGTCCGCGCCCTGGTCCCTTACACGGCCTAGCGCTGGCTCGGGCCGCGC
 13621 AGTCCCTGCGTGGCCGAGCCCCCTTGAGGCTTCTGTGCCGATGCCAAGCCTGCCGAAG
 * P E S P K
 13681 AGGCTCAGGCATGGCCCCGGCCCTGAAGAAGGTGAGCGGTGCCCACTTCAGGCCCTAGACG
 E S D T G P R S K K W E G R T F D P I Q
 13741 ACGCCGAACGGCAAGCGGAACCTACCTGCGCACCGAGTCGCCATGCCCCCGCAGGTCCAG
 Q P K G N A K I S A H S L P V P A T W T
 13801 CGGCGCAGCATGTGCAGCTTCAGGCCGTGCTCCGGCTCCGCTGCGTAACGTAGTCCGCC
 A A D Y V D F D P V L G L R V C Q M L R
 13861 TTCTGGTACTACATCAGGTAGGGCGGCACGGCGGGCCGCCCCAAGCGCACGAGGAAGGTG
 F V M I Y D M G G H G G P P N A H E K W
 13921 TCGGTACCAGGGTCAGCCGCATGCGCCGCTTACGCGGGGTGAGCAGCAAGCGCACCCAGG
 L W H D W D A Y A A F D G W E D N A H D
 Primer MS2 (3' ← 5')
 13981 CCGAGCTACATCTACGCGAGGCCTATCAGGAGCTTCTGCGGGGACCATGGCGGCTCTGAC
 P E I Y I R E P Y D E F V G R T G G L S
 14041 AACTATGCCGACATGCCACGCCGAGCTCTGCAGCACGAGGTCCGCCTGCTGGGCCGGG
 N I R S Y P H P T S V D H E L R V V R G
 14101 AACCAGCAGACCTGGTCTGACTAGCAGGCCAGCGACGACTGCATGCAGAGGAAGGTTGAC
 K A T Q V L S I T R D S S V Y T E K W S

14161 CGCAGCGGGCCGCCGTACAAGAGGAGCGCCATGACCCGCTCCGGCTCGCGCCCGCACGGG
 A D G P P M N E E R Y Q A L G L A P T G
 14221 TACGACCACTACGACTGCCGCGCCAGTGGCGCCAACACTACAGGTCCATCAACCGCTGCCCC
 M S T I S V A R D G R N I D L Y N A V P
 14281 GGCTTCGGCACCAAGCCCATCTCCAGCGGGCGGTCCGGCCACACGGTGTCCGGCCGCGGT
 G F G H N P Y L D G R L R T H W L R R W
 14341 CCCGGAAGCATCATCAGGCCAGCTTGTAGTCCGGCGCGTCCAGCACCAACATGCGCGGC
 P G E Y Y D P D F M L G R L D H N Y A G
 14401 CGCGGCACGTCTAGCGGCTTGTCCGGGCGCACGCGGTAGGCGTCTGCGCGTAGAGC
 A G H L L D G F L G A H A M R L V R M E
 14461 AAGAACGGCATGCGCGTCAAGAGGTCAACGTACGTCACTGCGGCCACGCGAGCCTCTCC
 N K G Y A C N E L Q M C H R R T R E S L
 14521 AGCTGGTTCGAAGGTGTGAGCAGCTCGGCGTAGCGCTGGCCTGTGAGGTGCGGCTGCACA
 D V L K W L E D L R M A V P C E V G V H
 14581 AACGGCAAGTCGTAGCGGCAGAACCGGTAGAGCTTACCTTCAGGGTGCCTCACCGGTGT
 K G N L M A T K A M E F H F D W P T A V
 14641 ATGTGCTTCAGCTGCAGCGGCGCGCGTCTCGACAAGCATCAGCACGAGCAGGAAGCAC
 Y V F D V D G R A C L Q E Y D H E D K T
 14701 ATCTGCCGCCCGCGCCGACGGGCGGAACTGCTGGAACCGCCCGCGAGCGCCGGAAC
 Y V A P A P Q G A K V V K A A A S A A K
 14761 AGGGCGTGGCACAGCGTGTCCCGCTGCTGGGCTGCGGCCCGTGGCGCTCCTTGTCCAGC
 D R V T D C L A V V R V G P V A L F L D
 14821 TAGTACGACGGCGGCGCAACGGCTCCGGCTACTACGGCTGCGCCTGGCACCTCGCAGAA
 I M S G G R N G L G I I G V R V T S R R
 14881 AGCTTCCCGTGGCGCCGGTAGCACCGCGGACCGGAAGCCACGCCCTGAGCAGCCTG
 E F P V G A M T R R G Q R K P A A S E D S
 14941 AGCCGCCGCCCTGCCGCCAGCGCGCGGAGGCCCTGCCCTCCGCCCTCCGCCAGCCAG
 E A A P V A T Q A A E P V S A S A T G T
 15001 GGCTCCCGCCTCTCAGGCTCGGGCCGCGCCGCTGAGGGCGGCAGCATGCCTCTCGCCTT
 G L A S L G L G A G A V G A T T R L A S
 15061 GCGCCCGAGTAGCTCGGCGGCAACAGGAAGAGGGGCCACGGGAAGCGGAGCAGGACCGGC
 R P S M S G G N D K E G T G K A E D Q G
nov21
 15121 CCCAAGACGCCACGACGCAGCAAGTA^{ACTTTCGGAGGTCTCCTCGACTGCACGCGCCGCTT}
 P N Q P A A D N M
 15181 AACTTGGAGCCCTTCTGGAACCATCAACCTGGCCACTACGCGTTCCCCGGGCAAACCT
 15241 GAGAAGCTAGCCCAGGAACCTGAGAAGCGGCGGTCCAGCCGCGCCACCGGCTTGGGCG
 15301 AGTCGTGCGGCCAGCCCGTGCGGCAGCTGGCCGGGGGGTGTCTCGGGCTGTCTCGGG
 * C R R D P V G D V P G G V L A S L L G
 15361 CGGCTCGTGCAGCGCACCAGGCGGCAGTCGCCCCGGTCTACAGGAGCCGCCGGCTGGA
 G L V D R Q D A T L P A L I D E A A S R
 15421 CGCGCGCAGCGCGTCCGGGGCGTGTGCGGGGCGGGGAGAGCCAGTCGAGCTAGGCCTA
 R A D R L A R L A R L V G R G T E T L E I R I
 15481 GTGGGCGGCAACAGCCAGCCCGCGCGCCTGCGTCCGGCAGCTGAGGTCCGGCAG
 V R R N T P D P A R R V C G S S E L G D
 15541 CTGGTCCGAGCAGTGGCGGCCCCCTGGTGAAGCTCCGCGAGGCGCTCTAGGCGGTAGGC
 V L S T V A R P V V E L R E A L D A M R
 15601 GCCGCCTGACAGCATCTTCCGCTGGCACGCGTCTGACGCGTCCGCGCCCCACTAGGG
 P P S D Y F A V T R L L R S Q A P T I G
 15661 CTAGCCGAGGTCTATCGGAAGACCTGCGCCACCTCAGCCGCCAGTCGGAGTCTCTGAC
 I P E L Y R K Q V R H L R R T L R L L Q
nov20
 15721 AAGCCGGTCTCCGGCAGCCGTAGCCCGCACGGCCGAGCCCCACCAGTACC^{CGCTTAT}
 E A L L G D A D P T G A D P T T M
 15781 5' ATTGTGAGGATAGGTAACAGTGAGCTATGCTCCTCCACGTGTT
 TATTGTCCTGATGCATGTAACACT 5'
novA
 15841 TTCCTACCCCCTGAAGCCCTCTCGAAGGAGCCCCATGAAGTCCGCACTCTCGACCTGGAA
 M K S A L S T W K
 15901 GCCCTCGGACCGGCGCCGGATCCGACACTGCCCGAGCCCGGCCAGCTGCGCCGCAT
 P S D R P P D P T L P E P P A Q L R R I
 15961 CTTCCGGCTCTTCCGCCGTACCGCGGAGGCTCGCCGTCGTCGGCCTGCTCGTCCGGCGC
 F R L F R P Y R G R L A V V G L L V G A

16021 CTCGTCGCTGGTGGCCGTCGCCTCGCCGTTTCATGCTGCGCGAGATCCTCGACACCGCGAT
S S L V A V A S P F M L R E I L D T A I
16081 CCCGCAGGGCCGCACCGGGCTGCTCAGCCTGCTCGCCCTCGGCATGATCCTGACCGCCGT
P Q G R T G L L S L L A L G M I L T A V
16141 CCTCAGCAGCGTCTTCGGCGTCGTCCAGACCCTCATCTCCACGACGGTTCGGCCAGCGCGT
L S S V F G V V Q T L I S T T V G Q R V
16201 CATGCACGACCTGCGCACCGCCGTCTACGCGCAGCTCCAGCGCATGCCCTCGCGTTCTT
M H D L R T A V Y A Q L Q R M P L A F F
16261 CACCCGCACCCGCACCGGTGAGGTCCAGTCCCGGATAGCCAACGACATCGGCGGATGCA
T R T R T G E V Q S R I A N D I G G M Q
16321 GGCGACCGTCACTCAACCGCCACGTGCGTGGTCTCCAACCTCACCGCCGTCATCGCCAC
A T V T S T A T S L V S N L T A V I A T
16381 CGTCGTCGCGATGCTCGCGCTGGACTGGCGGCTGACCGTCTGCTGCTCCTGCTGCC
V V A M L A L D W R L T V V S L L L L P
16441 GGTGTTTCGTCTGGATCAGCCGCCGCGTTCGGCCGTGAGCGCAAACGGATCACCTGCAACG
V F V W I S R R V G R E R K R I T L Q R
16501 GCAGAAGCAGATGGCCACGATGGCCGCCACGGTACGGAGTCGCTGTCGGTTCAGCGGCAT
Q K Q M A T M A A T V T E S L S V S G I
16561 CCTCCTCGGCCGCACGATGGGGCGCGCCGACTCGCTCACCGATCCTTCGCCGAGGAGTC
L L G R T M G R A D S L T R S F A E E S
16621 CGAGCGACTCGTCGACCTGGAGGTCCGCTCCAACATGGCCGGGCGGTGGCGGATGTCCGT
E R L V D L E V R S N M A G R W R M S V
16681 CATCGGCATCGTCATGGCCGCCATGCCCGCGTCTACTGGGCGGCCGGCTTCGTCTCT
I G I V M A A M P A V I Y W A A G F V L
16741 CCAGTCCGGCGGCACGGTTCGTCTCCATCGGCACACTCGTCGCCTTCGTCTCCCTCCAGCA
Q S G G T V V S I G T L V A F V S L Q Q
16801 GGGCCTCTTCCGCCCGGCCGTGAGCTGCTCCCCACCGCGTGCAGATGCAGACGTCCT
G L F R P A V S L L P T G V Q M Q T S L
16861 CGCGCTCTTCCAGCGCATCTTCAATATCTCGACCTGCCCGTTCGACATCACCGAACCCGA
A L F Q R I F E Y L D L P V D I T E P E
16921 GCGTCCGGTGGCCCTCGACAAGGTCCGGGGCGAAGTTCGCGCTTCGACGGCGTTCGACTTCAG
R P V A L D K V R G E V R F D G V D F S
16981 TTACGAGGAGAAGGACGGCAACACCCTCCACGGCCTGGATCTGACCGTCCCGGCCGGCGG
Y E E K D G N T L H G L D L T V P A G G
17041 CAGCCTCGCCGTCGTTCGGTCCACCGGATCGGGCAAGTCGACCCTGAGCTATCTCGTGCC
S L A V V G P T G S G K S T L S Y L V P
17101 GCGTCTGTACGACGTGACGGGCGGCCGGTCTGCTCGACGGCGTTCGACGTACCGACCT
R L Y D V T G G R V L L D G V D V R D L
17161 GGCCTTCGACACCCTCGCCCGCGGGTGGGCGTTCGTGTCGACGAGACGTATCTCTTCCA
A F D T L A R A V G V V S Q E T Y L F H
17221 CGCCTCCGTGCGCCGACAACCTCCGCTTCGCCAAACCGGACGCGACGGACGAGGAGATCGA
A S V A D N L R F A K P D A T D E E I E
17281 GAAGGCGGCCAGGGCCCGCCAGATCCACGACACATCGTCACCCTGCCCGACGGGTACGA
K A A Q I H E H I V T L P D G Y D
17341 CAACTGGTTCGCGAGCGCGATAACCGTTCTCCGGCGGCGAGAAACAGCGCTCGCGAT
T L V G E R G Y R F S G G E K Q R L A I
17401 CGCCCGCACCATCCTGCGCGACCCGCCCCGCTCCTCGTGCTGGACGAGGCGACGAGCGCGCT
A R T I L R D P P V L V L D E A T S A L
17461 CGACACCCGTACCGAACACGGGTCCAGCAGGCCATCGACTCCCTCTCCGAGGGCCGTAC
D T R T E H A V Q Q A I D S L S E G R T
17521 GACCATCACCATCGCCACCGGCTCTCCACGGTTCGCGACGCGGACGACGATCGTCTCTCT
T I T I A H R L S T V R D A D Q I V V L
17581 CGACGCGGTCGCATAGCCGAGCGCGGCACGCACGAGGAGCTGATCGACCGGGACGGCAG
D A G R I A E R G T H E E L I D R D G R
17641 GTACGCGGCGCTCGTCCGCCGGGACGGCGCGCCGGCGCCCGTTCGCCCGCCGGGA
Y A A L V R R D G A P A P A P V P A R D
17701 CGGGAAGCGACGGCGCGGTGGTTCGGGTGTGTGTCAGACGAGCCAGCCGACGAAAGTGGACG
G K R R R R W C G C V R R A S R R S G R
17761 AGACGGCGAGCAGGTTTCGTGATGACGTTTCATGTGGGGCGTTCTCCTTGTGAAGATGTAC
D R R A G S *
17821 AGCTGGGACAGCGCGGTTCGCGCCGTCGCTTTCGCGACCGTAAGCATCTGTTG
17881 TCGCAGGGGAGTTGTGCCAGGAATCCCGTTTCGATCACACGTTCCAGCGAACACCCGCTC
17941 CCACGTTTCGTGTGTTTCGTGTCGTTCGGTGAACGCTTGGCGTCGCCCTGATGCGGGCTGCCG

19861 GCTCCCACTGCTTCAGGGGCCAGCCCGTGTCTCGGGCCTCGCGGCGTCTACCATCCGCGA
 S P S S T G P D P V L G S R R L H Y A S

novC

19921 GCTGTCTGGCCGGACGGGGCGCGGCTACTGGTGTGCAG**GTAC**CAGGACATAAGGGGGCGCG
 S L G A Q G A G I V V V D M

19981 GCGACGGCGGGGCTTCAGCAAGTGGAAAGATGATTGTGCGCTCCCCCGCGCCTAGTAGGG
novD
 5' AACCCGCCGCCGGGACGCGCAGG**ATG**GACCTCATGTCCGACGCCTTACCACCA

20041 CCTGCGCTT 5' M D L M S D A F T T T

20101 CGATCGTGAGCCTCACCACCGGCACCGACGAGACCGTACCGATCTGACTCGCGTGTGCG
 I V S L T T G T D E T V T D L T R V C E

20161 AACAGTTCCTCCACGAGAGCGCTGCCGGCCGGGACGGCCTCCTCAACATCTTCGTCCCCG
 Q F L H E S A A G R D G L L N I F V P H

20221 ACGCGACAGCCGGCGTTCGCGGTTCATCGAGACGGGCGGGCAGCGACGACGACCTGCTCG
 A T A G V A V I E T G A G S D D D L L A

20281 CCGCGCTGCGCACCCCTGCTCCCGGGGACAACCGCTGGCGACACCGCCACGGTCCCCGG
 A L R T L L P A D N R W R H R H G S P G

20341 GCCACGGCCGCGACCATGTCTGCGGGCCCTGGTCCCCCCCCACGCGACCCCTCCGGTGA
 H G R D H V L P A L V P P H A T L P V I

20401 TCGCCGGCCGACTGGAACCTGGGCACCTGGCAGTCGGTCTGCCTGGTTCGACACCAACACCG
 A G R L E L G T W Q S V C L V D T N T D

20461 ACAACCCGGACCGGTACGTACGGCTGAGCTTCTCGGCTGAGCCGGGACCGTCCCCGGCGA
 N P D R Y V R L S F L G *

20521 CGGCAGCCGCGCATTCCAGCCAGATCGCTCACACACCGTCAACAAGTGAACCCAAAGCGT

20581 TTCGAATCGCGAGTAATCTGATGATCGGTTGATCGAAGCGGCGTGTCTGCGATGGACCGA
novE

20641 GGGCACGCCGCTCCGCTTGTCCCGAGGGGAAGAGAGGCATC**GTG**GTCGCGTCTGGTTCGGA
 V V A S G R T

20701 CAGCTTCGAAAGGGCGGGGAAACGGCGCCACTCCGGTGAGGCCGACGGCAGGGGACGCGA
 A S K G R G N G A T P V R P T A G D A T

20761 CCCCCGTTGACAGCGGACAACCGAGCGACACCACGTATGGCGGCCTGGAAGTCTCGGCCG
 P V D S G Q P S D T T Y G G L E V S A E

20821 AGAGGACCAGACTTCGGATCCCGCGGGACCTCTCCTTGGAGGCCTGGTGCCTCTCGGCCG
 R T R L R I P R D L S L E A W C R L G G

20881 GAAGGATCCTCGCGGTGTGCGATTTCATCGGTGTGGTGGATCGGCGACTGGCTGGTGTTCG
 R I L A V C D S S V W W I G D W L V F G

20941 GACAGAACCAATACGGTGACCGATAACCGCCGGGCGATGAAAGAGACCAAGCTCGACTACC
 Q N Q Y G D R Y R R A M K E T K L D Y Q

21001 AGACACTGCGCAATTACGCCTGGGTGGCGAGAAAATTCGAGCCGTCTCGCCGGCGAGACA
 T L R N Y A W V A R K F E P S R R R D S

21061 GCCTCACGTTCCAACATCACATGGAAGTGGCGGCTCTCTCGGAAGCCGAACAGGACCACT
 L T F Q H H M E V A A L S E A E Q D H W

21121 GGCTCGATTTTCGCGGTCCGACTGAATTGGTTCGAGGAACGAGCTGCGCAAACAGATCCGGG
 L D F A V R L N W S R N E L R K Q I R A

21181 CCAGCTTGTGCGGGCGAAGAAGACGACTCCCGGTGCGAGGTCCAACCTCAACTCCAGTTGG
 S L S G E E D D L R C E V Q L N L Q L D

21241 ACGAGTTACGTCTCGAACGGTGGAGGGAGGCGGCGGGGGAGCAATCTGACTCTGACGG
 E L R L E R W R E A A R G S N L T L T D

21301 ACTGGATCCTGTCCGTGCTGGACGGGGCCGTTTGACCGGACGCACTCCGATCCATTTTCG
 W I L S V V D G A V * **novF**

21361 GGCCTCACGGCTTCGCGCGTGACGGTCTCGAAGGGATTGCGGGAGATCA**ATG**CGCACGGC
 M R T A

21421 CGTGATAATCGGGACCGGAATGATCGGCACATCCATCGGTCTGGCGCTGCGGAAGCAAGG
 V I I G T G M I G T S I G L A L R K Q G

21481 CGTCGACTCCTACCTCATGGACACCAGTCCCCTGCGCACTGCGCATCGCCGAAGCAGTCCG
 V D S Y L M D T S P V A L R I A E A V G

21541 CGCCGGGACGGCCGAGGAACCGCCGAAACGGTGGACCTGGCGGTGGTTCGCGGTACCACC
 A G T A E E P P E T V D L A V V A V P P

21601 GGTCCACGTGGCACCGGTGATCGCCTCCCACAGTCGAGGGGAACCGCCGCTTCTACGT
 V H V A P V I A S H Q S R G T A R F Y V

21661 CGACGTGGCCGGTGTGAAGGTCTCCACCCGGCGTGAAGTGGACGCACTGGGCTGTGACCT
 D V A G V K V S T R R E L D A L G C D L

21721 TGCCACGGTGGTGGGCGGTTCATCCGCTGGTGGGACGGCCGGGGTTCGGGCCCCCTGGCGGC
 A T V V G G H P L V G R P G S G P L A A
 21781 GCGGGGCGACCTGTTCGACGGACGGCCGTGGGCGCTCGTCCCCGCGGTGGGAACAGACGC
 R G D L F D G R P W A L V P A V G T D A
 21841 CGCCGCACTGAACCGCGCTCTCGAACTGGTTCGCGCCCTGCGGCGCGATACCGGTTCGTCT
 A A L N R A L E L V A A C G A I P V V L
 21901 GGACGCCGAGGCGCACGACAGGGCGATCGCTCTCGGCACACTCGTCCCCAGATCGCCCT
 D A E A H D R A I A L G T L V P Q I A L
 21961 CACTCTCGTCCCGCTCGCCTCACGGAGGCGGACAGTGGCGCGTTACGGTTGCTGGGCAG
 T L V A A R L T E A D S G A L R L L G S
 22021 CGTGTGGTTCGGAGATACCTCAGCTCGTTCGGGTCGACTCCGCCACCTCGTGGACACAGGT
 V W S E I P Q L V G V D S A T S W T Q V
 22081 CCTCGCCGCGAACCGGGCTCCGGTTCGTGGGTGAACTGGAGAAGCTGAGCCGGGACTTGGC
 L A A N A A P V V G E L E K L S R D L A
 22141 GAGCCTGTTGGAGACGCTCAGAGGTGTCCGCGACGGGACGGCTCGTTCGCGGAGCCCGA
 S L L E T L R G V A D G D G S L A E P D
 22201 CGGGCGACTGCTGGAGTTCATCCAGCGTGGCATCGACGGCTCCAACCGGTTCGCGGAA
 G R L L E F I Q R G I D G S N R V P G R
 22261 GTACGGGATCCCCACGGAGACCGCGCTCGCGGACGTTCGACGTGTCGGTGGACGACCGGCC
 Y G I P T E T A L A D V D V S V D D R P
 22321 GGCCGAGCTGGCCCGCTTTCGACGACGTGGCCGGCGCCGGGGTGGTGTATGCGCGGCAT
 A E L A R L F D D V A G A G V V M R G I
 22381 CGACATCTCGCAGCGGCCCGACAGCCCCGACCGTACGGTACCATTTCGGTCACCCCGCG
 D I S Q R P D S P D R T V T I S V T P R
 22441 CGACGCCGAGAACCTCCTGCACGAACTGCGCCGAGGAAGTGGCCGGCGAACTCCTGACG
 D A E N L L H E L R R R R K W P A N S *
 22501 TCGGGAAGGGCGTTGCCGCCGGCGGTGGATGGGCGATGAACGTGCTTTGATGCTGATGA
novG
 22561 GCGTGCCGATCCGGACCAGACCATTAAGTCTATGGGGGTTAC**ATG**ACCAACAGCGGCGA
 M T N S G D
 22621 TGAGGAGATAACGCCGGCTTCGCTCAAGGCAACCAGAAAGGGGGAACGGGTCTCGATCGG
 E E I T P A S L K A T R K G E R V S I G
 22681 TTCACTATTACCGCGTCCGAACTGGTACGGTCCGGCGAAAGCACCGAACACATTCGAGT
 S L L P P S E L V R S G E S T E H I R V
 22741 GCTCGCCGAAACGGACGAGGATCTGCCACCCATTGTCGTGCACCGTGGGACCCGGCGGGT
 L A E T D E D L P P I V V H R G T R R V
 22801 CGTCGACGGAATGCACCGGCTGTGGGCGGCTCGTTTCCGAGGCGACGAATCGATCGAGGT
 V D G M H R L W A A R F R G D E S I E V
 22861 CGTATTTCGTGACGGCTCCCCGGCCGATGTGTTTCGTTCTCGCGGTTCGAGTTGAACCGTGC
 V F V D G S P A D V F V L A V E L N R A
 22921 GCACGGCCTGCCGCTCACGCTGGACGAGCGCAAATCCGCCGCCCGCCAGATCATGGATTC
 H G L P L T L D E R K S A A A Q I M D S
 22981 ACACCCGACTGGTCCGACCGCAAGATCGCACGGACCACCGACTGGCGGCCAGCACCGT
 H P H W S D R K I A R T T G L A A S T V
 23041 CGCGTTCGCTGAGGTCGTTCGTCACCGCCGGCACGGTTCGGGCGCAGGACCGCCAGGACCG
 A S L R S S S T A G T V G R R T G Q D G
 23101 CCGGAGCCGGCCCAACGACGGTACGGACGGACGGCAGCGCGCCGCCCTGCTGGCCCC
 R S R P N D G T D G R Q R A A A L L A R
 23161 GAATCCGAACCGTTCGCTTCGCGAGGTGACCAGAGCCGGGGATCTCGGTTCGGCACCGC
 N P N A S L R E V T R A A G I S V G T A
 23221 CAGCGATGTGCGGCCAGACTGCGGCGGGGGAGCCGGCGCTCACCGCCGGCAGCAGGC
 S D V R A R L R R G E P A L T A R Q Q A
 23281 CGTGTGAACTGCGCCCCGCGGGCTCAGCGGAGCGGCCCCGACTACGGCCGCTACT
 V M K L R P A A A Q R S G P D Y G R V L
 23341 GGAAAACCTGCGCAAGGACCCGTTCGCTGCGCTTACCCGACCTCGGCCGGCGCTGCTCCG
 E N L R K D P S L R F T D L G R R L L R
 23401 CCTGCTCGACGGTCCGTCCCCGGCAGTGTGAGCAGATCGCCAGATCGCGGACGGCGT
 L L D G S V P G S V E Q I A Q I A D G V
 23461 GCCGGAACACTGCCGGACCGTGGTGGTTCGACATGGCCCGGAGTGCGCCCGCCCTGGCA
 P E H C R T V V V D M A R E C A A A W Q
 23521 GCATCTCGCCGACCGCTCGCCGACCGGGACCCGCTGACGTTCAACTGCTCGAATCAT
 H L A D Q L A D R D T A *

Primer MS3 (5' → 3')

23581 TCGGTTGAACACCACCGCATGGCATTTCCTTGAACCGTCCCGGTGCGATGCGGAGGA
 23641 TGTTTTCCGGGGCGGTTGTCCGTGCGAGCTGTCCCGGGAGTCGCCTTTTCGCGCAGAATTC

novH

23701 CCCTTCGGTCATCCGGGGAGTACGTTCCAATGTCATGGAGACTTAAGGGGGAAGT**TTGTT**
 L F
 23761 CAACACACGTGCGAACAAAGCTTCTGATCAGTCGCCGACAATACCGACGGAATCGGCCAC
 N T R A N K A S D Q S P T I P T E S A T
 23821 CCTGGCCGAACCTCTGGGAGCGGACGGTACGAAGTCGGCCGAGCAGCCCGCAATTGTAC
 L A E L W E R T V R S R P S S P A I V T
 23881 CAACGGCAGACCCTGTCTACGACGAGGTCAACGCCAGGGCGAACCGGCTGGCACGACT
 N G E T L S Y D E V N A R A N R L A R L
 23941 GCTGCTCGACGAGGGGGCGGGCCCGGGCCGTCTGGTGGCACTGGCGCTGCCCGCTCCAG
 L L D E G A G P G R L V A L A L P R S S
 24001 TCATCTGGTGATCAGCGTGCTTGCCGTGGCCAAGGCCGGCGCGGTGTTCTCGCCGCTGGA
 H L V I S V L A V A K A G A V F L P L D
 24061 CGTCAACCACCCGCGGGAGCGGCTCTCGTACCAACTCGCCGATGCCCGGCCCGGCTTGCT
 V N H P R E R L S Y Q L A D A R P A L L
 24121 GTGCACCGTCCGAAGCGCCCGCGAGACTGCCGGACGGCATCGAGATGCCCGGGTGCT
 C T V R S A A A R L P D G I E M P R V L

Primer MS4 (3' ← 5')

24181 GCTGGACTCGCCCGAGCGCACCGCCGTA~~CTCGACGCACTGCCCGACACCGACTGACCGA~~
 L D S P E R T A V L D A L P D T D L T D
 24241 CGACGAACCGCGGACCGCTCGCCGCGACGGACCTGGCCTACGTGATCTACACCTCCGG
 D E R G G P L A A T D L A Y V I Y T S G
 24301 CTCGACAGGCCCGCCGAAAGGCGTCCGCGTACCGGGCGCCGGGTTGCCGGCCCTGGCAGC
 S T G R P K G V A L T G A G L P A L A A
 24361 GGCCAAGGTCGCCGCGATGCGGGTACCGGGGACAGCCGGGTGCTCCAGTTCGCGTCCGC
 A K V A A M R V T G D S R V L Q F A S P
 24421 GGGCTTCGACGCCTACCTGACCGA~~ACTGCTGGCCGCGTTCACCGCCGGTGCCACTCTCGT~~
 G F L T E L L A A F T A G A T L V
 24481 GGTGCCGGGAACGGACACGCTCGCCGGTACCCGCTGCGAAGGGCCTTGCGGGACGGCCG
 V P G T D T L A G D P L R R A L R D G R
 24541 GGTGAGCCACGCTGTGCTGCGCCCGCGCGGTCCGCGACCATGTCCCCGGACGCGGTGCC
 V S H A V L R P R R S A T M S P D A V P
 24601 CGACCTGCGCGTGCTGGTGGTGGCGGGCGAGGCGTCCCCGGCCGGCCTGGTCAACGGTG
 D L R V L V V A G E A C P A G L V E R W
 24661 GGCGCCCGGCCGCTTCTGATCAACGCCTACGGTCCGACCGAGTGCACGGTGTGCGCGAC
 A P G R L L I N A Y G P T E C T V C A T
 24721 CATGACCGGCCCGCTCACCCCGACGGACGAGGTACCATCGGCCGGCCGATTCCCGCGCT
 M T G P L T P T D E V T I G R P I P G V
 24781 GTCCGTGTACATCCTCGACGCCGAACGACGCCCGGCCGCGCCCGGAGAGATCGGGCAGTT
 S V Y I L D A E R R P A A P G E I G E L
 24841 GTACCTCAGCGGTGCCGGGCTGGCCAGGGCTACCTCAACAGCCCCGACCTGACGGCCCCA
 Y L S G A G L A Q G Y L N S P D L T A Q
 24901 GATGTTTCGTACCCAACCCGTTCCGCCCGACGGCGAACGGATGTACCGCACGGGCGATCT
 M F V P N P F A A D G E R M Y R T G D L
 24961 GGCCTCCAGGCGGGCCGACGGCGACACTCTTCCACGGCCGGATCGATGATCAGGTGCA
 A S R R A D G D I L F H G R I D D Q V E
 25021 ACTGCGCGGATTCCGCGTCCGAGTTGGGAGAGGTGGAGTCCGTA~~CTCAGCCAACATCCGGA~~
 L R G F R V E L G E V E S V L S Q H P D
 25081 CGTGGCACAGGCGGTGGCCGCGTGTGGACCGATCCGGCCGAGGGGCCGAGTTGGTGAC
 V A Q A V A A L W T D P A E G P Q L V T
 25141 GTACGTGCTCCCGGCACCCGGCACACCGTCCGGCGGGCGAACTGCGTGAGCACGCCGG
 Y V V P A P G T T P S A G E L R E H A G
 25201 CCGCTTCCCTGCCCGACTTCATGGTGCCGTCCGCATTCACGACCATCGACCCGTTCCCTT
 R F L P D F M V P S A F T T I D A V P L
 25261 GACTCCCGGCGAAAGACGGACCGGGCCGGGCTGCCGGATCCGGTGAAAGCCACCCAGCC
 T P G G K T D R A G L P D P V K A T Q P
 25321 TGCCGGACTTGGCCCGCTACTCCTGCCGAGAAGGTCTCTGTGACATATTCCGGGACCT
 A G L G P R T P A E K V L C D I F R D L

25381 GTTCGACCTTGTTGAGATCGACGTGCGCAGTAATTTCTTCGAAATGGGCGGGAACAGCAT
 F D L V E I D V R S N F F E M G G N S I
 25441 TCTGGCTGTGACCTCATTTCAGCGAGCGCAAGAAGCCGGCTTGACGCTCATGCCGAGGAC
 L A V D L I Q R A Q E A G L T L M P R T
 25501 CGTGATCGACCACCCACCATCGAGCAACTGGCCGCGATAGCGACCTCGAGGAGTGAGA
 V I D H P T I E Q L A A I A T L E E *
novI
 25561 **GATGAG**CACCCGTCCCACGGTGTCCCCAGCGAACTCGAACAGATCGACCTGGCATCACC
 M S T R P T V S P S E L E Q I D L A S P
 25621 GGTCCCTGCACGCCGAGTACGAAGTGGACGAGATCTTCCGCCACCTGCGCGCCGATGAGCC
 V L H A E Y E L D E I F R H L R A D E P
 25681 GGTGTACTGGCAGCAGCCACGGAACGAGCAGCCCGCTTCTGGGTGATCAGTCGCCACGC
 V Y W Q Q P R N E Q P G F W V I S R H A
 25741 CGACGTGAACGAGGTGTACAAGGACAAGGAGCACTTCACGACGGAGCACGGCAACGCGCT
 D V N E V Y K D K E H F T T E H G N A L
 25801 GGCCACTTTGCTGACCGGCGGTGACTCTGCCTCGGGCGCCATGCTCGCCGTCACCGACGG
 A T L L T G G D S A S G A M L A V T D G
 25861 AGTGCGCCACCATCAGGTGCGCAACGTGTTGTCCAGGGGCTTCTCGGCGCGGATGCTCGA
 V R H H Q V R N V L S R G F S A R M L D
 25921 CCTCATCGCCACACGCTGCAGGAAACCGTGGACGGTCTGCTGCTGGCGGCACTGGAGCG
 L I A H T L Q E T V D G L L L A A L E R
 25981 AGGCGAATGCGACGCCGCGCAGGACATCGCGCGGACGTGCCACTCGGGGCGATCTGCGA
 G E C D A A Q D I A A D V P L G A I C D
 26041 CCTGCTGGAGATTCCCCACGCGGACCGGAAGTACCTGCTCGGTCTGACCTCGCACGCGTG
 L L E I P H A D R K Y L L G L T S H A W
 26101 GAGCACGGACTACGCGGACGACCTCCCCAGGAGAGCTGGGTGCGCAAGAACGAGATCCT
 S T D Y A D E P P E E S W V A K N E I L
 26161 GCTGTACTTCAGCAAGCTGCTCAAGGAGCGTCGCGGTGGAGTCCGGGAGGACATGGTCAG
 L Y F S K L L K E R R G G V R E D M V S
 26221 CCTGCTGGCGAACTGCCGGATCGACGGCGATCCGCTCAAGGCGGCCGAGCAGATGGCCAA
 L L A N C R I D G D P L K A A E Q M A N
 26281 CTGCTACGGGCTGATGATCGGCGGCGACGAGACCGGCAGGCACGCCATCACCGGCACGAT
 C Y G L M I G G D E T G R H A I T G T I
 26341 CCTCGCGTTGATCCAGAACCCCGACCGAGTGGCGTGCCTGAAGAACGGCGACGTCGATCT
 L A L I Q N P D Q W R A L K N G D V D L
 26401 GAACACGGCGACCGGAGGAGGCCCTGCGCTGGACCGTGCCTGCGCTGCACGGAGCCGGAA
 N T A T E E A L R W T V P S L H G G R K
 26461 GGCGACCGGAGACGTCGTGATCAACGGCCGGCGGATCAACGCCGGCGATGTGGTCAGTGT
 A T G D V V I N G R R I N A G D V V S V
 26521 GTGGATCTCCTCGGCCAACCGTGACGAGACCGTCTTTCGACGCGCCGGACGAGTTCAACCT
 W I S S A N R D E T V F D A P D E F N L
 26581 CGCCCGCACCCGAACAAGCACTTACCTTCGCGTACGGCTCGCACTACTGCCTCGGCCA
 A R T P N K H F T F A Y G S H Y C L G H
 26641 CTACCTCGGCGGATGGAGGTCTACGCGTGCCTCGACGGGCTGCGCCGGTGGTGGCGA
 Y L G R M E V Y A V L D G L R R L V G D
 26701 CCTGGAGCAGATCGGCGAGGAGCGATGGATCTACTCCAGCATCCTGCACGGGATGAGCTC
 L E Q I G E E R W I Y S S I L H G M S S
novJ
 26761 ACTGCCGATCAGGATCACGGGCTGAGGGGCGGGGAGGCGTGCGG**ATG**ACGAGCCCGGCC
 L P I R I T G * M T S P A D
 26821 ATGCGACCACCGAAGTCGCTGTGTCTCAGGAGTCGGTCGCCATGGTCACCGGAGCCGGCC
 A T T E V A V S Q E S V A M V T G A G R
 26881 GGGGCATCGGCGCGGCCACGGCCGAGCGCCTCGCCGCGAGGGCATGGCGGTGATCGTCG
 G I G A A T A E R L A A E G M A V I V V
 26941 TGGACCGCACCGAACAGGACACCCGGGCCACGGTTCGCGGCCATTTCGCACGGCCGGCGGAC
 D R T E Q D T R A T V A A I R T A G G R
 27001 GGGCCCGCGGGATCGGCTGTGACGTGCGCGTGGCCAGGCCGTCGACGGCCGGTTCGCCA
 A R G I G C D V A V A Q A V T A A V A T
 27061 CGGCCGTGAGGAGTTCCGGCCGATCGACGTACTGGTGAAGTGCGCCGGGATCAACCGGG
 A V E E F G R I D V L V N C A G I N R D
 27121 ACCGGCTGCTCACCATGGGCGATCAGGAGTGGGACACGGTCTTGGACGTCAACCTCG
 R L L L T M G D Q E W D T V L D V N L G

27181 GCGGCACCATGCGATGTTTCGTTTCGCCGTCGGCCGGCACATGCGCCGGCAGGGGCACGGCC
 G T M R C S F A V G R H M R R Q G H G R
 27241 GGATCATCAACTTCAGCTCCGTGGCCGCGCGGCAATGCCGGCCAGACCAACTACGCGA
 I I N F S S V A A R G N A G Q T N Y A T
 27301 CCGCCAAAGGCGCGATCGCCGGGTTACCCGTACGCTCGCGGCCGAACTGGGCCCCGACG
 A K G A I A G F T R T L A A E L G P H G
 27361 GCGTGACGGTCAACGCCATCGCACCGGGCTTCGTGGCCACGCCGATGGTGGACGAGCTGG
 V T V N A I A P G F V A T P M V D E L A
 27421 CCGAACGGCTCGGCGGGGACCGGGACTCGGTTCATGTCGGAGGCGGCGAAGTCTTCGGCAG
 E R L G G D R D S V M S E A A K S S A V
 27481 TGGGCCGGATCGGGACGCCCGAGGAAATCGCCGCGACCGTGGTCTTCGTGCCCCGGCCGG
 G R I G T P E E I A A T V V F V A R P E
novK
 27541 AATCGGGCTACCTCACCGGCGAGACCGTTACGTGCGACGGCGGTTCGGCCATGACACGAGT
 S G Y L T G E T V H V D G R P *
 M T R V
 27601 GCGGTCGTGGCCGGCGGGCGGCGAGCACACGGGGCCCCGGTTCGCGCTCAGGCTGGCGGC
 A V V A G G G E H T G P A V A L R L A A
 27661 GGGGGCTTCGACGTGCGCCCTGCTGGGCTCCGAGTTCACGTGCGCCGACAAGACGGTTCAG
 G G F D V A L L G S E F T S A D K T V R
 27721 GCGCGTCGAGGAGTACGGCAGGCAATGCGTCACCGTGCGGGCCGAGTTGAGCGACGCCAG
 R V E E Y G R Q C V T V R A E L S D A R
 27781 ATCCGTGCGGGTGCCTTCGGCCGGGTACGTACGGCGTTGAGCGGCCCGGCCGTTACTGGT
 S V A V A F G R V R T A L S G P A V L V
 27841 CACCTGCGTCGGACCGCAGCCGCTGCCGGACGGGTTGCCCGAGGACGAGAGCGCGGACGA
 T C V G P Q P L P D G L P E D E S A D E
 27901 ACAGCGCTACCGCGGTACCGCGGGGCTGCGCCCGGTGTTTCGTGTGCTGCCAGGCCGG
 Q R Y T A V R R A L R P V F V C C Q A G
 27961 GGCCGGCCAGCTGCTGCGCCACCGGTGGGGACGGATCATCATCGTACCGGAGCCGGCCGA
 A G Q L L R H R W G R I I I V T E P A D
 28021 CGCCGACGGGAACACCTGGCGCACACCGCCGGCCGGTTCGACGGGCTGATCGGTTTTCAC
 A D G N T W R T S R P V L D G L I G F T
 28081 CCGGTCCGCGGGCGCTGGAGCTGGCGAGGTCCGGGACCACCGTGAACCTCGTTCGCTCCGGC
 R S A A L E L A R S G T T V N L V A P A
 28141 CGACCGCGCCGCCGACAGCCGGGCCCCGGCCACCGGGCGGGCGGCGACGACAGCGCGGG
 D R A A D S R A P A H R A A G D D S A G
 28201 CTCCTACGCGGACGGGGTCCGCGCACGTGACGGAGTTCTTGGTTCGACGAGCGAGCCGTCGG
 S Y A D G V A H V T E F L V D E R A V G
 28261 AATCACCGGGCAGGCGATCCGTGTGCGCCCGCCGGGCGGACGTACCTCTACTTTCGCGAAAAG
 I T G Q A I R V A A R A D V P L L R E R
novL
 28321 GTAGCCACTG**GTG**GCGAACAAGGATCACGCACCGGAGCACTACGTACCCGCATCCTCGC
 * V A N K D H A P E H Y V T R I L A
 28381 CGAGGCGACCTTGACGGCGCGCGACCGGTTCGTCCGGTGGCGGGACCGGTTCATCAGG
 E A T L D G A R P V V R W R D T V I T G
 28441 CACCCAACTCGACCGATCGGTACGGCGCGTTCGTGACGGCACTGCGCGAGGACGGTGTGGC
 T Q L D R S V R R V V T A L R E A G V A
 28501 ACGCGATCACGCGGTGGCCGCTCTGACCCAGGTCAACAGTCCATGGATGCTGATCGTCCG
 R D H A V A V L T Q V N S P W M L I V R
 28561 CTACGCCGCGCACCTGGTGGGCGCGTCCGTTCGTGTACATCACCGGCGCAACCACGGCAT
 Y A A H L V G A S V V Y I T G A N H G I
 28621 CGTGACGCACGAACTGCCGGTGGCCACCGGGTCCGGATGCTGCGTGAAGCGGGCGCGTC
 V T H E L P V A T R V R M L R E A G A S
 28681 GGTGCTGGTGTTCGACGAGAGCAACGCCCAACTCGCCGAGACCGTTCGACGAGACGGTGGC
 V L V F D E S N A Q L A E T V D E T V R
 28741 GGACAAGCTGGTGTGTCGGCCCTCGGTTCATCCGGCGTCCGGCACGGTGGAGCGTTCGACGG
 D K L V L C G L G H P A S G T V S V D G
 28801 CCGGCCTGTGATGACGTCTCGGTGGACTTCACGCCCGAGGCGCCCGAGCTGGCCATGGT
 R P V D D V S V D F T P E A P E L A M V
 28861 GCTCTACACCAGCGGCACCACCGGTCAACCCAAAGGGCGTGTGCCGGTTCGTTCCGGTTCGTCG
 L Y T T G T G Q P K G V C R S F G S W
 28921 GAACGCGGCGCGCTCCGCGGGGCGGCTATCCCCGGCCGGTCTTCTGACAATGACCGC
 N A A A L R G A A Y P R P V F L T M T A

28981 GGTGAGCCAGACAGTCGCGATGATCGTTCGACACGGTGCTGGCCCGCCGGCGGGAGCGTGCT
 V S Q T V A M I V D T V L A A G G S V L
 29041 GCTGCGCGAGAGGTTTCGATCCCGCCGACTTCTGCGGGATGTTCGGAGAGCACCCGCGTAC
 L R E R F D P A D F L R D V G E H R V T
 29101 CGAGACGTTTCATGGGCGTGGCGCAGCTCTACGCGATCCTCGGGCACCCGGACGCTCGTAC
 E T F M G V A Q L Y A I L G H P D A R T
 29161 CGCGGACCTGTCTCTGTTGCGCCACGTGTTGTATCTCGGCTGCCCCGCGTCACCGGAACG
 A D L S S L R H V L Y L G C P A S P E R
 29221 CCTGCGGGAGGCGGCGCACTGCTGCCCCGGCTACTGGCCCAGTCGTACGGCTCCACCGA
 L R E A A A L L P G V L A Q S Y G S T E
 29281 GGCCGGCCGGATCACGGTGCTCCGCGCGGCCGACCACGAACGTCCGGAACCTGCTGGCCAC
 A G R I T V L R A A D H E R P E L L A T
 29341 CGTGGGCGGGCGGGTCCCGGGGTCACCATCGCCATCCGCGACCCGGAACAGGACACGA
 V G R A V P G V T I A I R D P E T G H D
 29401 CCTGCCGGTTCGGCGAGATCGGCGAGGTTCGTGGTGCACGGCCCGGAGGTCATGGCCGGCTA
 L P V G E I G E V V V H G P E V M A G Y
 29461 TGTCGCGGATCCCGAGCACACCGCGCGGGTTCGCGGGACGGCTGGGTGCACACCGGCGA
 V A D P E H T A R V I R D G W V H T G D
 29521 CTTCCGGTTCGTCGACGAACCGCGGGTACGTGCGGCTGTTCCGGCCGGATGCGCGAGGTGGT
 F G S V D E R G Y V R L F G R M R E V V
 29581 CAAGGTGCAGGACACGCGGGTTCAGTCCGACCGAGGTGGAGAAGGTGCTCGTCCGGCTGTCC
 K V Q D T R V S P T E V E K V L V G C P
 29641 CGGTGTGGTTCGACGCGTTCGTGTACGGCCACCGCGGGCCGGACCTCATCGAGGAACTGCA
 G V V D A C V Y G H R G P D L I E E L H
 29701 CGCCCGCGTTCGACTGGGCACCGAGGCGCTCCGAGCTTTGACACTCTGCGCGACCACGT
 A A V V L G T E G A P S F D T L R D H V
 29761 CGCCCGGGCCATGACCCCGACACACGCCCCGATCCGGTTCGTACGGTGGCGGGGTTCCC
 A R A M T P T H A P I R F V R W R R F P
 29821 GATCAACAACACCGGCAAGGTGAATCGGCTGCGGGTCCGAGAGGTGAGCGCCGAGGCCCG
 I N N T G K V N R L R V R E V S A E A R

novM

 29881 CGGTGACAGCCCGGACGTCCTGGTGGACAGGTGAGGTGGGTCAATTCGATGAGAGTGCTGT
 G D S P D V L V D R * M R V L L
 29941 TGACGAGTCTGCCCCGCATCGGCCACCTGTTTCCCATGGTGCCGCTGGGCTGGGCGCTCC
 T S L P G I G H L F P M V P L G W A L Q
 30001 AGGCGGCCGGGCACACCGTCTGGTTCGCCACGGACCGGGAGTTCCTCCCGGTGGTGACCG
 A A G H T V L V A T D R E F L P V V T G
 30061 GGGCGGGACTGTCCGCCACGGCCGACTGGACCCGGTTCGACCCGGTTCGAGCTGTTCAAAC
 A G L S A T A V L D P V D P V E L F K P
 30121 CGGTGCAACCGTTCGGCGATCCGCTGAGCCCCGGCCGAGCGGACCGGGCACCCGGTTCGCGCC
 V E P F G D P L S P A E R T G H R C A E
 30181 AGCCCGGTGTCCGGGCGCTGCCCCCATGCGCGCACTCGTGGACGTGTGGCACCCGGACC
 A G V R A L P A M R A L V D V W H P D L
 30241 TGGTGATCGCCGAGCCCATGGAGCTGGCCGGGCCCCCGCGGGCAGCAATCCGGGGTGC
 V I A E P M E L A G P A A A T N A G V P
 30301 CCTGGGTACGGCACTCCTACGGGCTGATCCCGCCGGGGCCGCTGCTGAGCGTTCGCGGCCG
 W V R H S Y G L I P P G P L L S V A A E
 30361 AGGTTCTGGACGCCGAACTGGCGGTACTGGGGCTCTCCGCGCTGGCGAAACCGGCGAGGA
 V L D A E L A V L G L S A L A K P A R T
 30421 CGATCGACGTGTGCCCCGACAGCCTCCGGCCTTCGGACGGAGTGGCGACCGTGCCATGC
 I D V C P D S L R P S D G V A T V P M R
 30481 GGTACGTCCCCTACAACGGCCCCGGCCGGCTACCCGACTGGCTGTTGGCCGGGCCCCCTG
 Y V P Y N G P A G V P D W L L A G P P A
 30541 CCCGGCCCCGGGTCTGCCTGACGCTGGGCACGTCCCTGCCCCGGCGTGATCCGCACGTGG
 R P R V C L T L G T S L P R R D P H V A
 30601 CACCGCTGTGGCGGCTGCTGCTGGATGAACTGGTGGCCCTGGGCAAGAGGTGGTTCATCG
 P L W R L L L D E L V A L G Q E V V I A
 30661 CCATCGACGAGAGCCACCGGCCCTGCTGGGCCACCTGCCCCGACGGCGTTCGCGCCGCC
 I D E S H R P L L G H L P D G V R A A R
 30721 GGATCCCGCTCTGCGACCTGCTGCCGACGTGCACCGGATCGTGCACCGGTGGCTCGG
 I P L C D L L P T C T A I V H H G G S G

30781 GGAGCACCATGGCGGGCGGCCTCCTTCGGTGTGCCGAGCTGGTGGTTCCGCACTTCGCGG
 S T M A A A S F G V P Q L V V P H F A D
 30841 ACCACTTCACCAACGCGGAGCGACTCACCGCCGTGGCGCGGGTCTGAGCCTGCCGCACG
 H F T N A E R L T A V G A G L S L P H D
 30901 ACACCGACGACCTGGCACGGATCAGCGCGGCCTGCGAGCTGATCACCGGAGACGGCCCGC
 T D D L A R I S A A C E L I T G D G P H
 30961 ACCGCGGATCTCACGCCGTCTCGCCGACGAGAACGCCCGCCGACCGACCCCGGCCGTGG
 R A I S R R L A D E N A R R P T P A V V
 31021 TGGCCGAGGGCCTGGCGGCCGAACAACGGTCAATGACTCCCGCGTGAAAGCGCCGTGCTC
 A E G L A A E Q R S M T P A *
novN
 31081 GCAGATTGGAACGACATGCTCATTCTTGGCCTGAACGGGAATGTGTCCGACGCGGGCGCC
 M L I L G L N G N V S A A G A
 31141 GATGTGGTGCCGAACCTCAACGAGCTCTACATGCACGACGCCGCCACACTGGTCCGC
 D V V P N L N E L Y M H D A A A T L V R
 31201 GACGGAGTTCTCGTGGCGGGCGGTGGAGGAGGAGCGGCTCAACCGGATCAAGAAGACGACG
 D G V L V A A V E E E R L N R I K K T T
 31261 AAATTCGCCAGCAACGCGATCCGGAATGCCTCGCCGCCGCGGGTGCAGAAACGGCGGAC
 K F P S N A I R E C L A A A G A K P A D
 31321 GTCGACGCGATCGCCTACTACTTCCCCGAAGACTTCTTCGACGACATATTCCAGCAGCTC
 V D A I A Y Y F P E D F F D D I F Q Q L
 31381 TACACCGAGCATCCGAGCGTGCCGACGCGGTACTCGCGCGAGATGATCCTGGAGCGTCTT
 Y T E H P S V P T R Y S R E M I L E R L
 31441 CGCGTCGACCTCGGCTGGGCGCTCCGCCGAACATCCTCCACTACGTGCCGCACCACCTG
 R V D L G W A L R R N I L H Y V P H H L
 31501 GCCACGCGATGTGACGTACTACCGGTGGGCATGCGCGAGGCACTGGTGTGTCGTCATG
 A H A M S T Y Y R S G M R E A L V V M
 31561 GACGGGGCGGGTGAGCGCAACTGCACCACGATCTACCGGTCCGACGGGCCGAGTGTTC
 D G A G E R N C T T I Y R S D G A E L F
 31621 GAGATCGCGTTCGACCCGGTGCCGAAGTCGCTCGGCATGTTCTACCTGTACGGGACCAGA
 E I A S Y P V P K S L G M F Y L Y G T R
 31681 CACCTCGGCTACGGCTTCGGCGACGAGTACAAGGTGATGGGCTCGCCCCGTACGGCGAC
 H L G Y G F G D E Y K V M G L A P Y G D
 31741 CCGTCCACCTACCGCGACGTCTTCTCGACCCTGTACTCGCTCGGTCCGAACGGCACCTAC
 P S T Y R D V F S T L Y S L G P N G T Y
 31801 GAGTTGATCCCGCGCGGGGGAGTGGTCTTCAGGATGACCACGATCCTGCGGGAGCACGGT
 E L I P R G G V V F R M T T I L R E H G
 31861 CTCCAACCCCGCGTTCGCGGTGAGCCGTTACCCAGGCGCACATGGACTTTCGCGGGCAGT
 L Q P R R R G E P F T Q A H M D F A A S
 31921 GTGCAGGAGACCACCGAGCAGATCGCGATGCACGTGATCGGCTACTGGGCACGCTCCACG
 V Q E T T E Q I A M H V I G Y W A R S T
 31981 GGCCTGCGGAACCTGGCCTTCGGTGGCGGGCGTCCGCCACAACCTCGACGCTCAACGGCCG
 G L A R N L A F G G G V A H N S T L N G R
 32041 ATCCTCACCTCCGGCCTGTTTCGACGAGGTGTTTCGTCATCCGGCGTCGACGACCGCGGA
 I L T S G L F D E V F V H P A S H D A G
 32101 TCCAGCGAGGGCGCCGCACTCGTGGTTCGCGCGGGAACCGGGCAACCGGTATGGCCGCTG
 S S E G A A L V V A R E R G E R V W P L
 32161 CCCCAGTTGACGAACGCGAGCCTCGGCCCGGATCTGGGCGACGTGACTCGCTGGAGCGG
 P R L T N A S L G P D L G D V D S L E R
 32221 ACGCTCAAGTCGTGGAGCCCGCTCGTCGACGTGAGCGTCCCGACGACATCGTCGAGGCC
 T L K S W S P L V D V E R P D D I V E A
 32281 ACCGCGCACCTGCTCGCTGCCGGCGAGGCGATCGGCTGGGCGCACGGCCGCTCGGAGTTC
 T A H L L A A G E A I G W A H G R S E F
 32341 GGGCCGCGCGCTGGGCAACCGCAGCATCCTCGCCGACGCGCGCCCCAAGGAGAACCAG
 G P R A L G N R S I L A D A R P K E N Q
 32401 ACGCGCATCAACGCCATGGTGAAGAAGCGCGAGAGCTTCCGCCCGTTCGCCCGGGTTCGTG
 T R I N A M V K K R E S F R P F A P V V
 32461 ACCGCGGAGGCGGGCGGTGACTACTTTCGATCTGCCGGAGACCGTGGGACACCACGACTTC
 T A E A A G D Y F D L P E T V G H H D F
 32521 ATGTCGTTTCGTGTCAGGTGCGGGCGGACCCGCCGGAGTTGCTCGGCGCGGTGACCCAT
 M S V Q V R A D R R E L L G A V T H
 32581 GTCGACGGCAGCGCGCGTCCAGGTGCTCACCGAGGAGACGAACCCGCGATTCCACCCG
 V D G S A R V Q V V T E E T N P R F H R

32641 CTCGTCACGCGCTTCGGTGAGTTGACCGGGCACCCCCGTGCTGCTCAACACCTCGTTCAAC
 L V T R F G E L T G T P V L L N T S F N
 32701 AACCACGCCGAGCCGATCGTGCAGTCCGTCGATGACGTCCTCACGAGCTATCTCACGACC
 N H A E P I V Q S V D D V L T S Y L T T
 32761 AGCCTCGACGTGCTCGTGATCGAGGACTTCGTGGTTTCGCAGGCGGACCGAACTGCCGCTG
 S L D V L V I E D F V V R R R T E L P L
 32821 GCGCTGGAGGACTTCACCATCGGCTTTTCGCCCCGGTGACCAGGCTCGTCCGCCGGCTCGCC
 A L E D F T I G F R P V T R L V R R L A
 32881 GACGTGTCCGGCGGGCAGGCCGGCGCTCCCCAGGTTCTCGCACGAGATCTACCTCGACCAC
 D V S A G R P G A P E V S H E I Y L D H
 32941 ACCTCCGGACCGCGTGCGACGATCTCGGCCGCCATGTACGAGCTGCTCACCCACGCCGAC
 T S G P R A T I S A A M Y E L L T H A D
 33001 GGTGTACCCCCGCTGGGCAGCCTCGGCATCGAGCTGACCGGAGAGCTCCTGACAGAGCTG
 G V T P L G S L G I E L T G E L L T E L
 33061 TACGACCTGTGGCAGGGGCGCTTCGTCACCGTCGCCCCGTGGGGACGGTGCCGGATCC
 Y D L W Q G R F V T V A P V G D G A G S
 33121 GCACCGTGAATGGTGCGGATCCGGGCCGGGAATGGGCCGTGCGGGCCGTACAACCTGCCCT
 A P *
 33181 TTCATTTTCGGAATACACCGGCCCTGTGTCCGTGTAGGCTCAATTCAGGATTTATCGGCGG
 33241 CGGTCCGAGGAAGTCGGCGAGTGTGGAATGTAGCCACCGCCGACCTCAATTTCCCCAC
 Primer MS5 (5' → 3') *novO*
 33301 CGTGATCTACGCCAATCATGTTTCAGATCAGCTCACTGACCCAACACGAGGGGCATCGAGA
 M
 33361 **TGA**AAGATTGAAGCGATTACGGGATCCGAGGCCGAAGCATTTCACCGGATGGGGTCCCAGG
 K I E A I T G S E A E A F H R M G S Q A
 33421 CGTCCCACAGGTACGACGAATTCGTGGATCTGCTTGTTCGGGGCCGGCATCGCCGACGGCC
 S H R Y D E F V D L L V G A G I A D G Q
 33481 AGACCGTGGTTCGACCTGTGCTGTGGCTCGGGCGAGCTGGAAGTCATCCTCAGCTCCCGGT
 T V V D L C C G S G E L E V I L S S R F
 33541 TCCCCTCGTGAATCTGGTTCGGTGTGACCTCTCGGAGGACATGGTCCGTATCGCCCGGG
 P S L N L V G V D L S E D M V R I A R E
 33601 AGTACGCGGCCGAGCAGGGCAAGGCGCTCGAATTCCGGCACGGCGACCGCAACTCCTGG
 Y A A E Q G K A L E F R H G D A Q L L A
 33661 CCGGTATGGAGGATCTGGCCGGGAAAGCGGACCTGGTGGTCTCGCGGAACCGGTTCCACC
 G M E D L A G K A D L V V S R N A F H R
 33721 GGCTACCCCGGCTGCCGGCGGGCTTCGACACCATGCTGCGCCTGGCCAAGCCGGGAGGGG
 L T R L P A A F D T M L R L A K P G G A
 33781 CCGTCCCTCAACTGCTCCTTCATACACCCGAGCGACTTCGACGAGTCCGGGTTCGGGCGT
 V L N C S F I H P S D F D E S G F R A W
 33841 GGGTCACGTTCTCAACCAGCGGCCCTGGGACTCGGAGATGCAGATCGTCTGGGGCGCTGG
 V T F L N Q R P W D S E M Q I V W A L A
 33901 CTCACCATTACGCGCCCCGGCTCGACGACTACCGCGAGGCCCTGGCCCAGGCGGCCCGT
 H H Y A P R L D D Y R E A L A Q A A R E
 33961 AGACGCCGGTGTCCGAGCAGCGCGTCTGGATCGACGACCAGGGATACGGCGTTCCACGG
 T P V S E Q R V W I D D Q G Y G V P T V
 34021 TCAAATCGTTTCGCCCGCCGGCCCGCCCTGAGCGCGGAATTGTCCCGAACAGAGCGCC
 K S F A R R A A A *
novP
 34081 TGGACCCGAGTGAGGG**GTG**GCACCTATCGTGAAACC CGGAAGGAAACGAACAGCGACTC
 V A P I V E T A K E T N S D S
 34141 ATCGCTGTATCTGGACCTCATGATCAAAGTGCTGGCCGGGACGGTGTACGAGGATCCCCG
 S L Y L D L M I K V L A G T V Y E D P A
 34201 GCACCGGGGAGAACTTCTCGCACCGCGATTTCGACGTACCGGGAAGAAGTCCGCAACGAGGG
 H R E N F S H R D S T Y R E E V R N E G
 34261 ACGCGACTGGCCCCGGAACGCACACACGATGATCGGAATCAAACGCCCTCGAGAACATCCG
 R D W P A N A H T M I G I K R L E N I R
 34321 GCAATGTGTGAGGACGTCATCGGCAACAACGTACCCGGCGACCTCGTGGAAACC GGCGT
 Q C V E D V I G N N V P G D L V E T G V
 34381 ATGGCGTGGGGGAGCCTGCATCCTCATGCGGGGAATTCTGCGCGCCCATGACGTGCGGGG
 W R G G A C I L M R G I L R A H D V R D
 34441 CCGCACAGTCTGGGTGCGCGACTCCTTCCAGGGCATTCCCGACGTCCGGTGGAGACGGCTA
 R T V W V A D S F Q G I P D V G E D G Y

34501 CGCCGGCGACCCGGAAGATGGCGCTGCACCCGGCGAAACTCGGTGCTCGCGGTCTCCGAGGA
 A G D R K M A L H R R N S V L A V S E E
 34561 AGAGGTCCGGCGCAACTTCCGCAACTACGACCTGCTGGACGAACAGGTCCGGTTCCCTTC
 E V R R N F R N Y D L L D E Q V R F L P
 34621 CGGCTGGTTCAAGGACACGCTGCCACCCGCGCCGATCGACACGCTCGCCGTGCTGCGGAT
 G W F K D T L P T A P I D T L A V L R M
 34681 GGACGGGGACCTGTACGAATCCACCTGGGACACCCTGACCAATCTCTACCCGAAGGTGTC
 D G D L Y E S T W D T L T N L Y P K V S
 34741 CGTCGGTGGCTATGTCATCGTCGACGACTACATGATGTGCCCCCGGTGCAAGGACGCGGT
 V G G Y V I V D D Y M M C P P C K D A V
 34801 CGACGAATACCGCGCAAGTTCGACATCGCCGACGAACTGATCACGATCGACCCGCGACGG
 D E Y R A K F D I A D E L I T I D R D G
 34861 TGTCTACTGGCAACGCACCCGGTAATTCCTGAGATTGATCACGGAGGAATTCATGCC
 V Y W Q R T R *

Primer MS6 (3' ← 5')

34921 GCACTCCCGATGAATCAAGAATTCGACCCGGAACGCTTTTCGCGTCCGATTTACGCGCCACC
 34981 GCCCGCGGATCGGCGCGCCCGTCAACCCCGTGTCAACCGACACGGTCTTCGAGACCTTC

novQ

35041 CGTGACAACCTTCGCCCAGGGCGCCACCCT**GTGGA**AGACCACCAGCCAGCCCGGGGACCAG
 V E D H Q P A R G P A
 35101 CTGTCGTACCGTTCTTCTCCCGTCTCAAGATGGACACCGTCCGCCGGGCGCGTCCGACGCC
 V V P V L L P S Q D G H R R P G R R R R
 35161 GGGCTGCTCGACGGCACACATCCGACCGTGCCCATCGTCGAGGACTGGAGCGACCTCTAC
 A A R R H T S D R A H R R G L E R P L R
 35221 GGCGGCACGCCGTGCAGTCGGCCGACTTCGACGCCGGGGCGGGGAATGGCCAAGACCTGGC
 R H A V Q S A D F D A G R G M A K T W L
 35281 TGTACTTCGGCGGCCTGCGGCCGGCCGAGGACATCCTCTCCGTCCCCGACTGCCGGCGC
 Y F G G L R P A E D I L S V P A L P A P
 35341 CGGTACAGCCCCTGAAGGACTTCCTCGGACTGGCCCTGGCACATGTCGGTTCCGCGG
 V Q A R L K D F L G L A H V R F A A
 35401 CGGTGGACTGGCGCCACCGGAGTGCGAACGTCTACTTCCCGGGTCAAGGCCCCCTGGACA
 V D W R H R S A N V Y F R G Q G P L D T
 35461 CCGCTCAGTTCGCCCCTCCACGCCCTGTCCGGCGGCACACCACCCGCGCGGATGTCG
 A Q F A R V H A L S G G T P P A A D V V
 35521 TGGCGGAGGTCTCGCGTACGTGCCCGAGGACTACTGCGTCCCATCACCTCGACCTGC
 A E V L A Y V P E D Y C V A I T L D L H
 35581 ACACCGGCGCCATCGACCCGGTGTGCTTCTACGCCCTGAAGGTCCCAAGGACGCGCGGC
 T G A I D R V C F Y A L K V P K D A R P
 35641 CACGCGTCCCCGCGCATCGCCACGTTCCCTCGAGGTCCGCGCCAGCCACGACCCGGAGG
 R V P A R I A T F L E V A P S H D P E E
 35701 AGTGCAACGTCATCGGCTGGTTCGTCGCGCCGAGCGGCGACTACGTCAAGGCCGAACGCA
 C N V I G W S F G R S G D Y V K A E R S
 35761 GCTACACCGGGAACATGACGGAGATCCTGTCCGGCTGGAAGTCTTCCACGGCGAGG
 Y T G N M T E I L S G W N C F F H G E E
 35821 AAGGCCGCGACCACGACCTGCGCGCGCTTCAAGACACCCGGATCGATCACCCGAGGTGCC
 G R D H D L R A L Q D T G S I T G G A R

novR

35881 **GATG**AGCGAGGCTCTGGCGAACATGCCCGGAGACGACTACTTCCGTCAGCCCGGGTGT
 *

M S E A L A N M P G D D Y F R Q P P V F
 35941 CGACACCTACGCCGAGCACCAGCGCCTATCTCAAGTTCCGGCACGCCGTCCGCTGCGGCA
 D T Y A E H R A Y L K F R H A V A L R H
 36001 CTTCCGCCGCTCGGCTTCGACCAGGACGGCCTCGCCGACTGATCACCGTCCGCCACCC
 F A R L G F D Q D G L A G L I T V A D P
 36061 GGAACACGCCGACACCTACTGGGCCAATCCGCTGGCCACCCCTTCTCCACCATCACACC
 E H A D T Y W A N P L A H P F S T I T P
 36121 GGCGGACCTGATCCGCGTCCGCGGACAGCGCCGAGACCGTCCGAAGGCCAACCCGGGT
 A D L I R V D G D S A E T V E G Q R R V
 36181 CAACATCGCCGCTTCAACATCCACGCCGAGATCCACCGCGCACGCCCGGACGTCACAGG
 N I A A F N I H A E I H R A R P D V Q A
 36241 CGTCATCCACCTGCACACCGTCTACGGCCGAGCCTTCTCCGCTTCGCCCAGGCTCCC
 V I H L H T V Y G R A F S A F A R K L P

36301 TCCGCTGACCCAGGACGCGTGCCCGTTCTTCGAGGACCACGAGGTGTTTCGACGACTTCAC
 P L T Q D A C P F F E D H E V F D D F T
 36361 GGGTCTGGTGTCTGCCAAGGACGACGGGCGCAGGATCGCGAAACAGCTGCGCGGGCACAA
 G L V L A K D D G R R I A K Q L R G H K
 36421 GGCGATCCTGTGAAGAACCACGGTCTGGTCACCGTCCGGGGAGACACTCGACGCGGCCCG
 A I L L K N H G L V T V G E T L D A A A
 36481 CTGGTGGTTTACGCTCCTGGACACCTGCTGCCATGTCCAGCTGCTGGCGGACGCGGCCGG
 W W F T L L D T C C H V Q L L A D A A G
 36541 GAAGCCGGAGGAGATCCCCGCGGAGGTCGCACGCCTGACGGGCCGAGCTCGGCTCGCA
 K P E E I P A E V A R R L T G R Q L G S H
 36601 CCTGCTGGGCTGGAACAGCTACCAGCCCCTGCACGAGGCAGCCCTGGCCCCGTGACCCCGA
 L L G W N S Y Q P L H E A A L A R D P D
novS
 36661 CCTGGCGACCATGGAGCCCCGCGCTCCCCTCATGACGGATCGCTGGCTGGTCACCGGTGCG
 L A T M E P A L P S *
 M T D R W L V T G A
 36721 GCGGAATGCTCGGGCGAGATCTGGTGGCGCTCCTGCGAGGGCTGAACGAACCGGTGGTC
 A G M L G R D L V A L L R G L N E P V V
 36781 GCCATCACCCGGCAGATCTCGACATCACCGACCGCTCCTCGGTCCGGGCCGTTCGTGAC
 A I T R H D L D I T D R L S V R A V V D
 36841 AGGCACCGGCCGACGACCATCGTCAACTGCGCCGCTGGACACGATTCCGGCGAGGCGGAG
 R H R P T T I V N C A A W T R F G E A E
 36901 GCCGGCGAATCGGGCGGCCCTTCTCGTCAACGGAGGAGGGGCCCGGGGAGCTGGCCGCGGTA
 A G E S A A L L V N G G G A R E L A A V
 36961 TGCCGTGATCGATCGATACGGCTGGTCCACCTCTCCACCGATTACGTCTTCGACGGCAGC
 C R D R S I R L V H L S T D Y V F D G T
 37021 AGCCGDCGCCCTACGCCGAAAGCGGCTCAGGACCCGATCAACGCGTACGGCCGGACG
 S R R P Y A E S A V T S P I N A Y G R T
 37081 AAGCAGGCCGGCGAACAGGCGGTGCTCGACCTGCTGCCGGACGACGGCACGATCGTACGA
 K Q A G E Q A V L D L L P D D G T I V R
 37141 ACCGCCTGGCTGTACGGGCGGCACGGCATGAACTTCATCCGCAAGATGGTCCGGCTGGAG
 T A W L Y G R H G M N F I R K M V R L E
 37201 CAGCTGCGCGAGACCGTGGACGTGGTGGACGACAGTGGGGCCAGCCGACCTGGACCGTG
 Q L R E T V D V V D D Q W G Q P T W T V
 37261 GATCTGGCACAGCAGATCGTGGCACTCGTCCGGCACGGTGGTCCGGCGTGTTCACGGA
 D L A Q Q I V A L V R H G A S G V F H G
 37321 ACGAGCGCGGGCGAGGCCACCTGGTACGACCTCGCCCGCATGACCTTCCGGCTGCTCGGC
 T S A G E A T W Y D L A R M T F R L L G
 37381 GCGGACCCCGGACGAGTGGCCCCGGTGGCCAGCGACCCGGATCGCCGGCGGTGAACTGCGG
 A D P G R V R P V P S D R I A G G E L R
 Primer MS7 (5' → 3')
 37441 CCCCAGTACACGGTGTGGGGCATGACGCCTGGCGGGAGGCCGGGCTGACACCGATCCGG
 P R Y T V L G H D A W R E A G L T P I R
 37501 CACTGGACCACCGCTCTGACGCAGGCGTTCCCCTGCTGAACGCCGATGAATCGTAGTAG
 H W T T A L T Q A F P L L N A D E S *
novT
 37561 TCCTCGACCGAGAGAAAGGAGGGGCCGCGAGATGCGAATTCTGGTGACGGGCGGCGCCGGC
 M R I L V T G G A G
 37621 TTCATCGGCTCGGAATTCGTCCGGGCCACCTTGCGCGGAACTCTGCCGGGCTCATCGGGA
 F I G S E F V R A T L R G T L P G S S G
 37681 ACTCAGGTACCGTTCTGGACAAGTTGACGTACTCCGGCAACGTGCTGAACCTCGCGCCG
 T Q V T V L D K L T Y S G N V L N L A P
 37741 ATCGCGGACCTGCGCAACTACCGTTTCGTGCGGGGCGACATCTGTGATCAGGACCTGGTG
 I A D L R N Y R F V R G D I C D Q D L V
 37801 GACGACGTGGTTCGCCGGTACGACGCGATCGTGCACCTTCGCCGCCGAGACACATGTGGAC
 D D V V A G H D A I V H F A A E T H V D
 37861 CGCTCGATCGGCAGCGCCGCTCGTTTCGTCCGCACGAACCGGATGGGCACCCAGGTA
 R S I G S A A S F V R T N A M G T Q V L
 37921 CTCGAAGCGGCCTCCCGCCACCGGCTGGGACGGTTCGTTACATCTCGACCCGACGAGGTG
 L E A A S R H R L G R F V H I S T D E V
 37981 TACGGATCGATCCCCGAGGGCGCCTGGGACGAGGAGTCCCCGGTGGCCCCGAACGCCCGG
 Y G S I P E G A W D E E S P V A P N A P

38041 TACGCGGCGGCCAAGGCGGGGAGACCTGCTGGCGCTGGCCTGGCACCCGACCCACGGG
 Y A A A K A A G D L L A L A W H R T H G
 38101 CTCGACGTCGTGGTCACCAGGTGCACCAACAACCTACGGGCCGTACCAGTATCCGGAGAAG
 L D V V V T R C T N N Y G P Y Q Y P E K
 38161 CTGATCCCGCTGTTACGACCAACGTGATGGACGGTCAGCAGGTCCCGGTGTACGGCGAG
 L I P L F T T N V M D G Q Q V P V Y G E
 Primer MS8 (3' ← 5')
 38221 GGCCACAACCGCCGGCAGTGGCTGCACGTCTCGGACCACTGCCGCGCCATCCAGCTGGTG
 G H N R R Q W L H V S D H C R A I Q L V
 38281 CTCCTCGGTGGCCGGGCGGGGAGGTCTACCACATCGGCGGTGGCACCGAGTTGACCAAT
 L L G G R A G E V Y H I G G G T E L T N
 38341 CTCGAACGGCCGAACAGATCCTGAAGTCTGCGGTGCCGGCTGGGACATGGTCCGGCAC
 L E L A E Q I L K S C G A G W D M V R H
 38401 GTGCCGACAGGCCGGGGCACGATTTCCGCTACTCCCTGGACACCACCAAGATCCGTACA
 V P D R P G H D F R Y S L D T T K I R T
 38461 GAACTCGGTTTTCTCGCCCCGGTTCGCGTTCGCGGACGGGCTGGTGGAGACCGTGGAGTGG
 E L G F S P R V A F A D G L V E T V E W
 38521 TATCGCGACAACCGGCCTGGTGGGAACCGCTCAAGAGTCCCGACGAAGCCACGGTTCA
 Y R D N R A W W E P L K S P D E A T G S
 38581 CCCGGCGACCCGGCAGATGACGGCGTGACCGGGAAAGCCGGCGGGTTTCGTCCATGAG
 P G D A G R *
novU
 38641 GGGAAAGGAAGAAATGCAGGACATAGTGCGGCCCATCGACGAGTGCCGGGTGTGCGGACAC
 M Q D I V R P I D E C R V C G H
 38701 GACGATTGGCTCGATGTCGTCTCGTTCCGGTTCGACGCCACTGGCCGGAAACCTGCTCGGC
 D D W L D V V S F G S T P L A G N L L G
 38761 GACGAAGACGACCGGGGGGCGAGACCCTGTTCCCGCTGGACGTCGTGGTGTGCCGGCGA
 D E D A G G E T L F P L D V V V C R R
 38821 TGCTGGCTGATGACCGCCATGTCATCGAACCAGGACGTCCTCTTCGGTCACTACCGT
 C W L M T V R H V I E P D V L F G H Y R
 38881 TACGTCGCCTCGGACCGGGCTCGATCATCCAGCACATGCGGAAGCTCGTCGACCTGTGT
 Y V A S D A G S I I Q H M R K L V D L C
 38941 GTCGAGCGGATCGGACTGACCGACGGAGACCTCGTTCGTGGAGTTCCGGCAGCAACACCGGC
 V E R I G L T D G D L V V E F G S N T G
 39001 GCGCATCTGGAGCTGTTCCGGCAGGCCCGGCCCGGGTGGTTCGGCGTCGATCCCGCGCGC
 A H L E L F R Q A G P R V V G V D P A R
 39061 AATCTCGCGGGTGTGCGCAACGACCGCGGGCGTGGAAACGATCCCGCCGGTTTCACCGCC
 N L A G V A N D R G V E T I P A G F T A
 39121 GAAGTCGGTGAGGAGATCGCGACCAGGCACGGCCTGGCACGACTGGTGTACGGGCGCCAG
 E V G E E I A T R H G L A R L V Y G R Q
 39181 TGCTTCGCCCATATCCCGGACATCCACGAAGTCTCAACGGGGTATCGGCCCTGCTGGCT
 C F A H I P D I H E V L N G V S A L L A
 39241 CCAGACGGTCTGTTCTTCGTGGAAGTTCCTATCTGGTGGAACTGCTCAAGAACAATCAG
 P D G L F F V E V P Y L V E L L K N N Q
 39301 TTCGACACCATCTTCCACGAACACTTCTCCTACTTTTCGCTCGGCTCCCTGTGCACGCTG
 F D T I F H E H F S Y F S L G S L C T L
 39361 TTCGAGTCGCACGGCCTGCGCGTTCGTGGACGTCATACGGCCGATGTGCACGGCGGCTCG
 F E S H G L R V V D V H T A D V H G G S
 39421 ATCGTGGTCTTCGCCCGCCCGCCCGGACCACGAGGTGCGGCCGGCCGCTCGCCGAG
 I V V F A A P A A A D H E V R P A V A E
 39481 ATGCTCGCGGAAGAGCGGAGCCAGGGCATCGCGGAGGAGCGGACCTACCGGGAGTTTCGCC
 M L A E E R S Q G I A E E R T Y R E F A
 Primer MS9 (5' → 3')
 39541 GATCGTACGGAACGGGTGCGCGCACAGATCCGGAACTGGTACCGGGCGTGGTGGCGGAC
 D R T E R V R A Q I R E L V R G V V A D
 39601 GGCAAGACCGTGGCGGGATACGGCGCACCGACCAAGGGCAGCGCACTGCTGGCCGCTCG
 G K T V A G Y G A P T K G S A L L A A C
 39661 GGGCTCGGACATCAGGAGATCCGGTTCTGCAGCGACACAACCGTTCTCAAGCAGGGGAAA
 G L G H Q E I R F C S D T T V L K Q G K
 39721 ATACTTCGGGGTCCAGAATTCCGATCTGGTACCCGGAACAGGGCGGCCGGCCATGTACCG
 I L P G S R I P I W S P E Q A A G H V P

39781 GACTACTACCTGCTGTTGGCCTGGAACCTACGCACCCGGAGATCATCGACAACGAGAAGGAA
 D Y Y L L L A W N Y A P E I I D N E K E
 39841 TTCCTGGAGAACGGCGGCCGATTTCATCGTTCCCATACCCGAACCGCGGGTGATATCGGCC
 F L E N G G R F I V P I P E P R V I S A
 39901 GAGTCGACGCTGTGACATCGAAGGCCGCGCCGACGGCGAGGTTTCAGATGGTGCCGGATCG
 E S T L * **novV**
 39961 CCGAGGGGGTTCGCTGGTTGAGGGGAATCCTGCTCGCGGGCGGTACCGGCTCCAGGCTGTG
 L R G I L L A G G T G S R L W
 40021 GCCGGTCACCCGCGCCATCTCCAAGCAGCTGATACCGGTCTTCGACAAGCCGATGATCTA
 P V T R A I S K Q L I P V F D K P M I Y
 40081 CTACCCGCTGACCACGCTGATGATGGCCGGCGTACGCGAGATACTCGTGATCACGCGCC
 Y P L T T L M M A G V R E I L V I T R P
 40141 CGACGACCAGCGCCAGTTCCGTCATCTCCTCGGCGACGGCTCGCAACTGGGCTGCGCCT
 D D Q R Q F R H L L G D G S Q L G L R L
 40201 CGAGTACGCCGTCCAGGAGCGGCCGAGGGCATCGCGCAGGCGTTCGTCTCGGGCGCCGA
 E Y A V Q E R P E G I A Q A F V L G A E
 40261 GTTCATCGGCGACCGAGTCCGGTGGCCCTGGTCTCGGGACAACATCTTCCACGGCGCGGG
 F I G D Q S V A L V L G D N I F H G A G
 40321 CCTGGGAACCCGGCTGCGGCAGTACAACGACCCCGCCGGGGCCCGGATCTTCGCTACGT
 L G T R L R Q Y N D P A G A R I F A Y V
 40381 CGTGGCCGACCCCAAGGCGTACGGGGTGGTGGAGTTTCGACGAGGCCGGAAGGGCCGTCTC
 V A D P K A Y G V V E F D E A G R A V S
 40441 CATAGAGGAGAAGCCGGCGCGTCCCAAGTCGCGGTACGCCGTACCGGGGTTGTACTTCTA
 I E E K P A R P K S R Y A V P G L Y F Y
 40501 CGACAACCGGGTGTGGATGTTCGTCACGGCCTGGTGGCCGAGCCGGCGCGGCGAACTGGA
 D N R V L D V V H G L V P S R R G E L E
 40561 GATCACCGCCGTCAACGAAACGTATCTGAAGTGGGGCCAGTTGCGGGTCACCACGCTCGA
 I T A V N E T Y L K W G Q L R V T T L D
 40561 CCGGGCACCGCCTGGCTGGACACGGGAACGTTTCGCTCCTTGGTCCAGGCATCGGAGTA
 R G T A W L D T G T F A S L V Q A S E Y
 40681 CGTACGAGTCGTGGAGGAACGGCAGGGCCTCAAGATCGGCTGCGTGGAGGAGGTGCGCCTG
 V R V V E E R Q G L K I G C V E E V A W
 40741 GCGCTGCGGCTTCATCGGGAACGACCGAGTTGCGGGATCTCAGCCGCCGCTGCTCAAGAG
 R C G F I G N D Q L R D L S R P L L K S
 40801 CGGCTACGGCCGGTACCTCCTCGATCTGCTCGCCGATCACGAGGAGTTGAAGGAGGTGAA
 G Y G R Y L L D L L A D H E E L K E V K
novW
 40861 GCCGTCTGAGACTTCGCCCCGCTCGGTATCGAGGGTGTCTGGGAGATCACCCCCGAGCAG
 P S *
 V R L R P L G I E G V W E I T P E Q
 40921 CGCGCCGATCCGCGGGGGTCTTCTGGACTGGTATCACGTGACCGGTTCCCGGAGGCG
 R A D P R G V F L D W Y H V D R F A E A
 40981 ATCGGCCGCCCTGCGGCTGGCCAGGCCAATCTGTCCGTGTCCGTCCGCGGGGTGGTG
 I G R P L R L A Q A N L S V R G G V V
 41041 CGCGGCATCCACTTCGTGATGTGCCCGCCGGGCGAGGCCAAGTACGTGACGTGTGTGCGC
 R G I H F V D V P P G Q A K Y V T C V R
 41101 GGCGCGGTGTTTCGACGTGGTGGTGGACCTGCGCGTCCGCTCGCCGACGTACGGGTGCTGG
 G A V F D V V V D L R V G S P T Y G C W
 41161 GAAGGCACCCGGCTCGACGATGTGACCGTCTGTCGGTCTACCTCTCGGAGGGCATCGGG
 E G T R L D D V S R R A V Y L S E G I G
 41221 CACGGCTTCTGCGGATCTCGGACGAGGCCACGCTGTGCTATCTGTCTTCGGGGACCTAC
 H G F C A I S D E A T L C Y L S S G T Y
 41281 GACCCGGCGACCGAGCACGGTGTGCACCCGCTCGATCCCGAAGTGGCCATCGACTGGCCC
 D P A T E H G V H P L D P E L A I D W P
 41341 ACCGGGACGCCGCTGCTGTCCCCCGCGACCCAGGACGCGCTCCTGCTCGCCGAAGCCCGG
 T G T P L L S P R D Q D A L L L A E A R
 41401 GACGCCGGCCTGTTGCCGACCTACGCGACCTGTGAGGCGGTACGGTGCCTTACCGGCG
 D A G L L P T Y A T C Q A V T V P S P A
 41461 CCGGGTTCGGTTCGGAGACCCGGGCGCGTATCTGACGCGAGGCCACTGGCGACTGCGGAG
 P G S V G P G *
 41521 GGTTCATGTGCGAATAGTGTCCGGACGCTGTCCGGCAAGGCGTCAGGGAACCCCTTCAGG
 41581 CGGCCCTCTCCCGTCTTTTCGACAGGGGAAGGCAGGGGGGATCGACTTATGTGGTGGCGG
 41641 AGCCGCACGGCGCGCAGAGGTGCTCTCGTTCGGCGGCAAGGGGTGGCGTCCGTATT

41701 GTCTTCAGCGTCCCGATGGTTCGGCGGGCCGGCCGGCGTCCCGAGGGTTTCGCGAGCCCCGGG
41761 GCCCAGGTTCGGGCTGCCGTGCCGCGCCTCTCCCCCCCAGTTCTCCGGTCTCTCCCGCAC
ngyxB^R
41821 GTGGTTCGGGAGCCGGGTCTGCCATGCCCCGAAAGAGAGTTTCC**GTGACTT**CTTACGACAC
V T S Y D T
41881 CCGCACCGCCACCGACACCCCCGGACCCCAACTGCCCCGGCCAGGTGGGGACGGCGTTCGTA
R T A T D T P G P Q L P G Q V G T A S Y
41941 CGACGCCGACGCGATCACCGTGTGGACGGCCTGGACGCCGTACGCAAGCGGCCCGGGAT
D A D A I T V L D G L D A V R K R P G M
42001 GTACATCGGCTCCACGGGGGAGCGGGGGTCCATCACCTGGTGCAGGAACCTCGTGACAA
Y I G S T G E R G L H H L V Q E L V D N
42061 CTCGGTGGACGAGGCACTCGCGGGGGTGGCCGACCGGATCGACGTGACGGTCTTGCCGA
S V D E A L A G V A D R I D V T V L A D
42121 CGGCGGGGTTCGGGTGGTTCGACAACGGCCGCGGCATCCCGGTGGGGATGCACCCGGTGA
G G V R V V D N G R G I P V G M H P V E
42181 GAAGCGGCCGGCCGTTCGAGGTCTACTGACCGTGTGCACGCGGGCGGGAAGTTTCGGGGG
K R P A V E V V L T V L H A G G K F G G
42241 CGGCGGGTACACGGTCTCCGGCGGACTGCACGGCGTGGGTCTGTCCGGTGGTCAACGCCCT
G G Y T V S G G L H G V G L S V V N A L
42301 GTCGGCCAGGCTGTTCGGCGGAGATCTGGACGGACGGCCACCGCTGGACGCAGGACTACCG
S A R L S A E I W T D G H R W T Q D Y R
42361 GGACGGCGCTCCCACCGCCCCACTGGTCCCGCGGGAGGCCACCTCCCGCACGGGCACCTC
D G A P T A P L V R R E A T S R T G T S
42421 ACTGACCTTCTGGGCGGACGGTCCATCTTCGAGACCACCGACTACTCCTTCGAGACGCT
L T F W A D G S I F E T T D Y S F E T L
42481 GGCCAGGCGTTTCCAGGAGATGGCCTTCCTCAACCGTGGGCTCACGCTGACCTCACCGA
A R R F Q E M A F L N R G L T L T C D
42541 CGAACGGGCCTCCGCGCGCCACGGCCGCGACCGACGAGGTCCACCCGGACCCGGCGGC
E R A S A R A T A A T D E V H P D P A A
42601 GAAGACGGTCTCCTACCGCTACGACGGCGGCATCACCGACTTCGTTCGCGTATCTCAACTC
K T V S Y R Y D G G I T D F V A Y L N S
42661 CCGCAAGGGCGAACCGGTCCATCCCTCGGTTCGTACCATCGCCCGACGACACGGAGCG
R K G E P V H P S V V T I A A D D T E R
42721 GCTGCTGTTCGGCCGAGATCGCGCTCCAGTGAACGGCCAGTACACCGACAGCGTGTACTC
L L S A E I A L Q W N G Q Y T D S V Y S
42781 GTACGCCAACGCGATCCACACCCACGAGGGCGGCACCCACGAGGAGGGCTTCCGTACGGC
Y A N A I H T H E G G T H E E G F R T A
42841 CCTGACCACCGTGGTCAACCGCTACGCGCGGGACAAGAAGCTGCTGCGGGGAGAAGGACGC
L T T V V N R Y A R D K K L L R E K D A
42901 GAACCTCGCCGGCGAGGACATCCGTGAGGGGCTGACCGCGATCATCTCGGTCAAGCTCAG
N L A G E D I R E G L T A I I S V K L R
42961 AGAACCAGGTTTCGAGGGCCAGACCAAGACCAAACTCGGCAACACGGAGGTGCGCACCTT
E P Q F E G Q T K T K L G N T E V R T F
43021 CGTCCAGAAGGTCGTCCACGAGCATCTGACCGACTGGTTCGACCGCAACCCGAACGAGGC
V Q K V V H E H L T D W F D R N P N E A
43081 CGCGACATCGTTCGCAAGGCCGTTTCAGGCCGCCACGGCCCGGGTTCGCGGCCCGTAAGGC
A D I V R K A V Q A A T A R V A A R K A
43141 GCGGGATCTGACCCGCCGTAAGGGCCTGCTGGAGACGGCGTTCGCTGCGGGGCAAGCTGTC
R D L T R R K G L L E T A S L P G K L S
43201 GGACTGTTCAGTTCGAACGACCCGGCGATGTTCGAGATCTTCATCGTTCGAGGGAGACTCCGC
D C Q S N D P A M S E I F I V E G D S A
43261 CGGCGGCTCGGCCAAATCCGGCCGCAATCCGCGATACCAGGCGATCTCCCGATCCGGGG
G G S A K S G R N P Q Y Q A I L P I R G
43321 GAAGATCCTCAATGTTCGAGAAGGCGCGGATCGACAGGATTTTGCAGAACCAGGAGATCCA
K I L N V E K A R I D R I L Q N Q E I Q
43381 GGCGCTCATCTCCGCGTTTCGGCACGGGTATGCACGAGGACTTCGACATCGCCAAGCTCCG
A L I S A F G T G M H E D F D I A K L R
43441 CTACCACAAGGTCATCTTGATGGCGGACGCCGACGTTCGACGGCCAGCACATCAACACCTT
Y H K V I L M A D A D V D G Q H I N T L
Primer MS11 (5' → 3')
43501 GCTGCTGACCGTCTCTGTTCCGCTTCATGCGGCCACTGATCGAGGAGGGGCACGTCTACCT
L L T V L F R F M R P L I E E G H V Y L

43561 CTCGCGCCCGCGCTCTACAAGATCAAGTGGAGCCGGGACCACGTCGAGTACGCCTACTC
 S R P P L Y K I K W S R D H V E Y A Y S
 43621 CGACCGCGAACCGGACACGCTGCTGGAAGTGGGCGCTCGGGACGGCCGAGGGTCAGGGA
 D R E R D T L L E L G R R D G R R V R D
 43681 CGACTCCATCCAGCGCTTCAAGGGCCTCGGCGAGATGAACGCCGAGGAACTGCGCGTAC
 D S I Q R F K G L G E M N A E E L R V T
 43741 CACCATGGACCCCGACCACCGGGTGTGGGGCGGGTCGCCCTCGACGACGCGGCCGTCGC
 T M D P D H R V L G R V A L D D A A V A
 43801 CGACGACCTCTTCTCGGTTCTGATGGGTGAGGACGTGGAAGCCCGCCCACTTCATCCA
 D D L F S V L M G E D V E A R R H F I Q
 43861 GCGCAACGCCAAGGACGTCCGCTTCTCGACATCTGACCCCGGGCGGCGCTCCGCGGGAT
 R N A K D V R F L D I *
 43921 CAGCGGGTGGCCGGCGCCGGTTCCCTCCAGCGTGGCCACGACCATGACCCGGGAGGTGCGGTG
 43981 TCCTGCTGGATCACACCGGGCGCTCAGCACCCCGCCGCTCCTGCAGCCACTTCCGTACGGCG
 44041 ATGAATTCCCTCCTCGTCCGCCCGCGTACGCCCGCCCTCCGCGAGGTGGCCGGCGAGCGG
 44101 GGAGTCTCGATCTCGGGGAGGAACCGGGCCAGCACCCGCTCGCCCTCGTCTAGAGCGC
 44161 CTCCAGGTGCTCGAAGTAACCCGACGCGTTCGACATCGCGGATCCAGACGGTGAACGAGAC
 PrimerMS12 (3' ← 5')
 44221 CCGGACCTCCCCGTGCGCGAACACCTGGGTCCAGCCGTGGACGCCGTCCTTGTCCAGGA
 44281 CGTCTCCACACCCTCGCCGGGCGTCCCCCGGGCGACACCCAGGGCCGGAACCTCGC
 44341 CGCCGCTCCCTCGCGGGTCAGTGGGACCAGACCCGTCAGTTCTTCGAGCATCGCGCTCAC
orf13
 44401 CGCTGTCATGGACGCACACCCTTCCACGCGTACGCTGGCACC**GTG**CCAGCCCCCGCCCCG
 V P A P R P
 44461 CAGCGCGTCGCCGTCCTGGTGCTGGAGGGCGGAAACCGCTCGACGTCGGCATCCCCGCG
 Q R V A V L V L E G A K P L D V G I P A
 44521 CAGGTGTTACGACCCGCGAGAGCATGCCGTACGAGGTACGGGTCTGCGGTGCGGCACCC
 Q V F T T R E E S M P Y E V R V C G G A A P
 44581 GGTCTGGTGACCGGGGACGGGCTCTCGTACCACGTCGCCACGGGCTCGACGCGCTC
 G L V T G G D G L S Y H V A H G L D A A L
 44641 GTCTGGGCCGACCTCGTCTTCATCCCCGGCTACCGGTTCCCGGACCGCGACGACCCGCGC
 V W A D L V F I P G Y R F P D R D D P R
 44701 CAGGAGATCATCGACGCGCTGATCGCCGACACGAGCGGGGCGCGCGGCTCGCCGCCATC
 Q E I I D A L I A A H E R G A R L A A I
 44761 TCGACGGGTGCCTTCGCGCTCGCCGCCATAGGTCTGCTCGACGGCAGGTGCGCCATGACG
 S T G A F A L A A I G L L D G R C A M T
 44821 CACTGGCACTACACGCGGGCGCTCGCGGCGAAGCATCCGCTCGTGGGGTCGACGAGAAC
 H W H Y T R A L A A K H P L V R V D E N
 44881 GTGCTGTTGCTCGACGAGGGCAGCGTGTGCTGACGTCGGCCGGCGCCGCTCGGGCATCGAC
 V L F V D E G S V L T S A G A A S G I D
 44941 CTGTGCCTGCACATCCTGCGCGCCGACCTCGGGCTGGCCGCATCGAACACACCCGCCCGA
 L C L H I L R A D L G V A A S N H T A R
 45001 CGGCTGGTGCGGCCCGGTACCGCAGCGGGCGGGCAGGCGCAGTACGTACCGCGCCGGGTG
 R L V A A P Y R S G G Q A Q Y V P R R V
 45061 CCCGAGNNGCTCGGCGAGCGGTTCCGCCACCCCGGAATGGGCGCTGCGCCGCTCGGC
 P E ? A R R A V R R H P R M G A A P L G
 45121 GAGCCCTGACCCTCACGGCGCTCGCCCGCACGCGGCGGTGTCGCCCCGACCTTCTCG
 E P L T L T A L A R H A A V S P R T F S
 45181 CGGCGCTTCGTCGAGGACACCGGGTACACGCCGATGCAGTGGGTTCATGCGCGCCNGCGTC
 R R F V E D T G Y T P M Q W V M R A ? V
 45241 GACGCGGCCCGCGAGTTGCTGGAGCGTTCCGAGCTGAGCATCGAGCAGATCGCCACGGAT
 D A A R E L L E R S E L S I E Q I A T D
 45301 GTCGGCCTCGGCACGGGGACGAACCTGCGCCTGCACTTCCAGTCGACACTCGGCACCACC
 V G L G T G T N L R L H F Q S T L G T T
 45361 CCCAGCGCATAACGGCGCACCTTACCCAGGGCGAGTAGCGCGCCCCGGCCCGCACGGCG
 P S A Y R R T F T Q G E *
 45421 CGGCACGCGCGTCCGCCACGTTTGGCGTGATCCTTTTGAACCATGGCGTTTCGCGCCGCCG
 45481 TCGTCCGGCGGGCGCCGCTTTCGAGCATGGGCGAGACCCGAAACCGCAAAGGACAACCC
orf7
 45541 TC**ATG**ACTCGTGTGCCATCAACGGATTTCGGCCGCATCGGACGCAACGCGCTGCGCGTCC
 M T R V A I N G F G R I G R N A L R V L

45601 TGCTCGAACGCGACAGGCACCTGGAGGTCGTGCGCCGTCAACGACCTCACGGAACCCGCCT
L E R D R H L E V V A V N D L T E P A S
45661 CCCTCGCGCGGCTGCTCGCCTTCGACACGACGGCCGGCCGGCTCGGCCGCCGGTTCGACG
L A R L L A F D T T A G R L G R P V D V
45721 TCGACGGCGACACCCTCGTCGTGACGCGCCGGCGTGTACCGTGTCTCGCCGAGCGCGAGC
D G D T L V V D G R R V T V L A E R E P
45781 CGGCGCGGCTGCCGTGGGCCGAACCTCGGCGTCGACATCGTGCTGGAGTCGACCGGCCGCT
A R L P W A E L G V D I V L E S T G R F
45841 TCACCTCGGCCGACCGCCCGCCCATCTCACGGCAGGCGCCAGGAAGGTCCTGGTCA
T S A D A A R A H L T A G A R K V L V S
45901 GCGCCCCGTGCGCCGGCGCGGACGCCACCGTTCGCGTTTCGGGGTCAACACCGAGGCGTACG
A P S A G A D A T V A F G V N T E A Y D
45961 ACCCGGCCACGCACACGATCATCTCGAACGCCTCCTGCACGACCAACGCCCTCGCACCCG
P A T H T I I S N A S C T T N A L A P L
46021 TGGCCAAGGTCCTCGACGACCTCGCCGACATCGAGCACGGCTTCATGACGACGGTGCACG
A K V L D D L A D I E H G F M T T V H A
46081 CCTACACCCAGGAGCAGAACCTCCAGGACGCCCCGACCGCGACGCCCCGCCGCGCCCGC
Y T Q E Q N L Q D A P H R D A R R A R A
46141 CCGCCCGCTCAACATCGTCCCGACACGACGGGCGCCGCAAGGCGATCGGCCTCGTCC
A A V N I V P T T T G A A K A I G L V L
46201 TGCCGAACCTCGACGGCAAACCTGTCCGGCGACTCGATCCCGGTACCGGTACCGGTGGGCT
P N L D G K L S G D S I R V P V P V G S
46261 CGATCGTCGAGCTCAACACCACCGTTCGCCCCGACGTCGACGCGGACGACGTCCTGGCGG
I V E L N T T V A R D V T R D D V L A A
46321 CCTACCGCGCCGCGGGCGGACGGGCGCTCGCCGGCATCATCGAGTACTCCGACGACGCGC
Y R A A A D G P L A G I I E Y S D D A L
46381 TCGTGTGTCGTCGACATCACCGCAACCCGCACTCGGCGATCTTCGACTCGGCCCTACCC
V S S D I T G N P H S A I F D S A L T R
46441 GGGTCGACGGCCGGCACATCAAGGTCGTGCGCTGGTACGACAACGAGTGGGGCTTCTCGA
V D G R H I K V V A W Y D N E W G F S N
46501 ACCGGCTGATCGACACGCTCGAACTGCTCGCCGCGCGCTGACCAGTTCA 3'
R L I D T L E L L A A R * 3' AAGTCGGCACTGGCG
46561 AGTCGGCAGCACGAAGAGGTCCGCTCGCGGCTGTGTCGTCGCGCCGTGTGAGCGCTAGTC
* G D H K E L R L A S L L R P V S A I L
46621 GGCCCCCACATGCCCACCCTGCCGCGGGTTCGTGGAGCGCCACAGCGGGACGAGGTG
R A T Y P H S P A G L V E R T D G Q E V
46681 CTGGGCCGGCGAGAGGTCGTGGCGGCACACGAGTGTGTCGCGGCGGTGGTGGCTGTCCAG
V R G S E L V A T H E C L A A V V S L D
46741 CACCCTCTGGTACCGCTACCAGTCTGGGGAGCTGAGGAAGTCGAGTGGCTCTTCTAGCTG
H S V M A I T L G R S E K L E G L L D V
46801 CTATGCGTGCGCCACCACTGCAGTCCCAGGACTGGCCAAGCAGGCGGTGCTGTCGCGC
I R V R T T V D L A S V P E D A L L V R
46861 GCCCAGCTCTGGCACCGGGCGTCTCCGCTAGGCGACGGCGACTGGCGGCCTCTTGAG
P D C V T A R V L A I R Q R Q G G S F E
46921 CACGCCCATCGCCAGGGGCGCAGGCGGCCGTGCGGGTGGGGCGGTTCGCGCCCGGTTG
H P Y R D G A D A P L G V G A L A A A V
46981 GGCCGGCAGCCACAGGCCAGGGCGCTCGGGTTCGCTCGCGTCGCCGAGCCTCTGCTAGGC
R G D T D P G A L G L S R L P E S V I R
47041 CGCGTGGGCGACGGCCCCTAGGACCTTCTGCGAGACGTGTGACGCGGCCTTCCGGGCGTA
R V R Q R P D Q F V S Q V S R R F A R M
47101 GGCGCGGGCCAAGGCGTCAGNCTCGCCGACAGGCGCTTCTCGTGGAGCGGCGGCCACC
R A R N R L ? L P Q G D F L V E G G T P
orf6
47161 GGCCAACCTCTGGCTCCTCGTCGGCGTGTGCGCAGCAGAACGGGCGGGCCTGAGCGGGT
R N L G L L L R L L T T K G A G S E G V
47221 CTAGCGCTGTGACGCCGGCCCGGCTAGAGGTCTGACTGCGGCACGTCTCTGCCCCGCCG
47281 CGGGGGCCATGCGCTTTGGGCGCAGGGCATGCCGCTCATGGCCACTTGTAGTACGCACTA
* R T I
47341 GGCAAGGTCACGCAAGAGCTTCCATGCCCGGAGAGGTGGTCCGAGGCGCATGCCGAC
R E L A N E F T R A S E V L S R T Y P Q
47401 GGCCCCGCGCACGTCCTCCAGCCGCCACGCGGGCTGAGGTGGCGGGCCGCGAGAACTC
R P A H L L D A T R G S E V A R G D K L

1261 CGCGGCTCCCCGCGGCCCGCTGCCCTCCCTGTACGCCTGAGCTAAGCCGTTCCACTCTA
 R A S P A G P S P L S M R V R N P L T L
 1321 CACACGAAGCTGTGTGTGCAGAGCGTTCACCATGCCCTACTCTTTTCCGGGGACAGGT
 H T S R C V R R A L H Y P S S F L G R D
 1381 GCCGGGCCGATGCCCGCCTGTTCCCACCGGCCGTGCAGGTGCTACACCCTTTACCAAGGC
 V A R S R A S L P P R C T W S T P F P E
orf4
 1441 CGAC**GTG**TTCTGCCGGGAGGACC GGCCACATGCCGCCTCCCCGGGTGCCGTGGCGAGTCT
 P Q V
 1501 GCCGCCTCCCCGATGTCTCGCGCGAGCGCTGCGCCTGTTCTAGGTGCACACGCGCCGGAT
 1561 GCTCCACGTCTCTGACCTTGTGCCGCGTTCCTAAGCGTGTGCGAAAGGGCCCCAGTTTGT
 1621 TTGATTTGGCCTGCCAAGCAGTCTACAGCCTACGCGGGCGGCGCGCTGCCCGCGGACG
 1681 AGGAGCCGCGCCAGGCGCCGGGTGCCACTGGCGCGGGCCGGAGAGCCGCCACTGGGCCGG
 1741 CAGCGCCAGCTGCGCCCCAGCA 5'

Bereich: orf1 bis orf3

1 CCCGAAGCCTCGGCGCGCTCGCCGTGGAACAGGCCGGGCGGCTGCTGACCGGCGGCGAGC
 61 CACTCGGCCCGACGAGCTGGTGGTTTCGCGCGGAGTTGAGACTGCGCGAGTCCGGCTGAG
 121 CGGTCCGGCCGGGCATGCTGTGAGCGGCCATGAGCCTTCACGCGTACGGGGTCCGGAGG
 181 GCGTGCCGCCGTACGCGCGCCCAACGCACCCCGTACGTACACCTCTTGACACATCGCGT
 241 CGCCCGGTTCAGAGACTTCCCGGCAATTCGTGAACGTTACGGGAGCGTTCACGGGCCCTTG
 301 GAAGGGTCTCAATGACGCTGACTCGACGAAGGCTCCTGGCAGGCGCGACCGCTCTCGGC
 361 GCCGCCGCGTTCGGAGCCGGCGGATGTGCGAGCCCGATGACCGCGAACCCCGGTTCATCTC
 421 ACCTTCTGGTACACGTACAACGGCTTCTCCGAGAATGTGCTGAAGGCCGCCCGCAAGCGT
 481 TCGCCGCCGACAAGTTTCGTCCCTCGCAGGTGAGCGGTGACCTGACGCAGCGGCTGCTCG
 541 CCGCGCTCGCCGGTGGTGCCTATCTGCCCGACATCACGATGATCGGCGACAACATCTCGC
 601 GGTACTTCGGCGACAGCGACCGCTTCGTGAACATGAACGACCACGGCGCGCGGGAGCTGG
orf1
 661 CGGGGGGATACCTGCC**GTG**GAAAGTGGCATGCGGGCGCCACCCCGACGGCTTCCAGCTCG
 V E V A C G R H P R R L P A R
 721 GCTTCCCCATCGACATCGGCCCGCGGCCCTCTACTACCGGCACGACATCTTCGAGAAGG
 L P H R H R P R G P L L P A R H L R E G
 781 CAGGCCTGCCAGCGAACCGGACGACGTGCGGGCGGCCGTACCCACCTGGGAGAAAGTACT
 R P A Q R T G R R R G G R T H L G E V L
 841 TCACTTCGGCGAACGGATCCGCGACAACTCCCGGCCGCTATCTGATCACCGACACCAA
 H F G E R I R D K L P G R Y L I T D T K
 901 GACGGTGTTCACGTACTCGATGGCCCAGGAGCGGCGGAAGTACTTCACGCCGAGAACAC
 T V F T Y S M A Q E R R K Y F T P E N T
 961 CTACCTCGACGACCAGTCCCATGTCCGCTCGCCTGGGACCGCGCGGTTCGAGGCGTTCGG
 Y L D D Q S H V R L A W D R A V E A F G
 1021 CCGCCGCCTCACCGCGGGATTCGGCGGCTCGCAGACCGCCGGCGGCGAGTCCGTGGACCAG
 R R L T A G F G G S Q T A G G S P W T R
 1081 ACACGCGGCCTGGAACACCGGCCAGGAGGTGAGCCTCGTCAACGCCTCCTGGATCACCGG
 H A A W N T G Q E V S L V N A S W I T G
 1141 CGAGATCAAGCAGTCCGCCCCCGCACCGCCGGCAAGTGGCGGGTCTGCGCACCGCCCGG
 E I K Q S A P G T A G K W R V C A P P G
 1201 CGGCCCCGGCAACCAGGGCGGTTTCGTTCTCGCCATCACCGCCGCTGCCCGACCCGCA
 G P G N Q G G S F L A I T A A C P D P Q
 1261 GGCGGCCTTCGACATCATCAGCTGGCTCCAGAACC CGGCAACCAGGCCGCAACTACGC
 A A F D I I S W L Q N P A N Q A A N Y A
 1321 CGAGATCGGCCTCTTCCCGTCCGGTCCGGCCCGGCGGCGGACGACGAACGGATCACCGCCCC
 E I G L F P S G P A A A D D E R I T A P
 1381 GGACCCGTTCTTCGGCGGCCAGTCCGCCGTGCGGGTCTTCGCCGACATCGCCGACCAGGT
 D P F F G G Q S A V R V F A D I A D Q V
 1441 GAAGTACGCCTACTTCAGTCCCTGGGACATCACTCTCAGCGACACCTACACCGACGAGCT
 K Y A Y F S P W D I T L S D T Y T D E L
 1501 GACCAACGTGGAACCTCGGCGGCAAGGACCCGGAGCGCGCCTGGCGGGACCCSGGAACCG
 T N V E L G G K D P E R A W R D A ? N R
 1561 GATCGAACGGCTTCTGCGCCGGCAGGGGTGCTCTCATGACCGCGACGTCCGACCTCGAC
 I E R L L R R Q G V L S *

1621 ACCCCGGCGACCGCCGTCCCGCGCCACCGGCCGAGGACGCCGCCCGGCGCACGCAGGCG
orf2
1681 ATGGCGCCATCTGCCGCAGTACGTAGCCGTCGTCCTTCATCCTCTTCGCCGTCTT
V S P F F I L F A V F
1741 CGGCCTCTACCCGGTCTTCTACTCGCTCTATCTCTCGCTCCAACGCTGGGACGGCGTGGG
G L Y P V F Y S L Y L S L Q R W D G V G
1801 CCCGATGAAGTTCGTCCGCCTGGAGAATTCCGCTATYTGCTCACCGACAGCCAGTTCTG
P M K F V G L E N F R Y L L T D S Q F W
1861 GGACTCCATAGCCAACACCCTGATCATCTGGGTCATGTGACGGTCCCGATGACCGTCTCT
D S I A N T L I I W V M S T V P M T V L
1921 CGCCCTGCTCATCGCCCTCGGCCTGAACTCCTCCGTGCGCTTCAAGGGCGCTGGCGTCGC
A L L I A L G L N S S V R F K G A G V A
1981 GTACTTCATGCCAACGTGACATCGATCGTGGCCATGTGCTGGTCTTTCGGCTCGATCTT
Y F M P N V T S I V A M S L V F G S I F
2041 CAGCGGCGAGTTCGGCATCCTCAACTGGATCCGGTGCGCCATCGCCATCATGATCATCTG
S G E F G I L N W I R C A I A I M I I W
2101 GCGGTGGACCGGCTACAACGCCATCATCTTCTCGCCGGACTCCAGGCCCTGCCACCGA
R W T G Y N A I I F L A G L Q A L P T D
2161 CGTCTACGAGGCGGCGCCCGTTCGACGGCGGAGCCCCGTACAGACCTTCTTCCGGATCAC
V Y E A A P V D G A S P V Q T F F R I T
2221 GCTGCCCTGCTGCGGCCGGTCTGCTGTTCTCCCTGGTGATGTGCGGCCATCGGCCGGCT
L P L L R P V L L F S L V M S A I G G L
2281 CCAGATCTTACCGAGTCACAGGTGCTGCTCGGCGACCGCGCGGTCCCGGCGGGGCCGG
Q I F T E S Q V L L G D R G G P G G A G
2341 ACTGACGATGGTCTTACTTCTACGGAACCGCCTTTCGCGGACAACGACTTCGGCTACGG
L T M V L Y F Y G T A F A D N D F G Y G
2401 AGCCGCCATCGCCTGGGGCATCTTCGTGCTGCTGCTGTTCTCCATCCTCAACTGGCG
A A I A W G I F V V V V L F S I L N W R
orf3
2461 CCTCGTGCAACGCCCCGAGCGCGGCCGGTACGACCAAGGAGGACGCCCGATGAGCAGC
L V Q R P E R G R V T T K E D A R *
M S T
2521 CGCGGCCGTTTTCTGACGTACGCCGCGCTTCTCGTCCGGCCGCGATCACCTCTTCCCC
R G R F L T Y A A L L V G A A I T L F P
2581 TACTACTGGCTCGCCGTATGGCGTCCAACACCACCCCGACATCTACTCTCCCGCCC
Y Y W L A V M A S N T T P D I Y S S P P
2641 AAGCTCGTCTTCGCGGACAGCTGTTCCACAACATCGGGGAGGTGTTCTCCCGGATCGAC
K L V F G D Q L F H N I G E V F S R I D
2701 TTCTTCGGGTGCTGCTCAACACACTGGTTCGTCGCGGTCGTCGACGACCGTCCCGTGCTG
F F G S L L N T L V V A V V T T V A V L
2761 TTCTTCGACTCACTCGCGGCCTTACCTTCGCCAAGTACACGTTCCCGGCAGCAAGATC
F F D S L A A F T F A K Y T F P G S K I
2821 CTCTTCGGGACTGCTGGCCACCTTCGTGCTGCCCACCCAGCTCGCCGCCATCCCCAG
L F G I L L A T F V V P T Q L A A I P Q
2881 TTCTCCCTGATGGCCGACCTCGGCTGGGTGCGGTAGTCTGAAGGCGCTGATCGTCCCGCC
F S L M A D L G W V G S L K A L I V P A
2941 GCCGCCAACGCCTTCGGCATCTTCTGGATGCGCCAGTACGCCGCCGGCGCCCTGCCGGAC
A A N A F G I F W M R Q Y A A G A L P D
3001 GAACTGCTGGACGCCGCCGATCGACGGCTGCGGCTTCTTCCGTACGTATCTGCACGTC
E L L D A A R I D G C G F F R T Y L H V
3061 GGACTGCCGGTGTGCGACCGGCGCTCGGTTCTCGGCATCTTACGTTCTGTC AACGTG
G L P V L R P A L A F L G I F T F V N V
3121 TGGAACGACTTCTGTGGCCGCTGGTTCGTCCTCATCGACTCCCGCCACATCACGCTCCAG
W N D F L W P L V V L I D S R H I T L Q
3181 CTCGCGCTCGCCAGCTCAACGGCCTTACGTCACCGACTACAGCGTGGTTCATGGCGGGC
L A L A Q L N G L Y V T D Y S V V M A G
3241 ACGTGGTGGCCATCGTCCCGCTGATCATCATCTTCTGTTTCGGCGCCCGGCACTTTCATC
T L V A I V P L I I I F L F G A R H F I
3301 CGCAACATGCCGAGGCGCCCTCAAGGGTGAAGGGAATCCATTGCCTTCTCGCACGCC
R N M P Q A P S R A E G N P L P S S H A
3361 GACTTCTCGTACGTGGACGATCCCTTTAGTGAGGGTT 3'
D F S Y V D D P F S E G

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutische Institut der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Heide durchgeführt. Ihm besonders danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Unterstützung und anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. W. Wohlleben und Herrn Prof. Dr. E. Leistner danke ich für die Übernahme der Koreferate.

Im besonderen bedanke ich mich bei Dr. S. Li für die fachliche Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft, zahlreichen hilfreichen Tips und nicht zuletzt für seine Hilfe bei der Auswertung von NMR-Spektren.

Herrn Dr. B. Vogler der Universität Hohenheim danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren zur Identifizierung der 4HPP-Dimethylallyltransferase.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Lörcher für die vielen netten Gespräche und ihre stete Hilfsbereitschaft bei verwaltungstechnischen Fragen.

Ich bedanke mich bei allen meinen ehemaligen und jetzigen Kollegen und Freunden Agnes, Andreas, Anne, Axel, Bernhard, Bettina, Claudia, Dirk, Elisabeth, Emmanuel, Florence, Gabriele, Irmela, Lucy, Robert, Sibylle, Silvie, Shuming, Siegrid, Susanne H., Susanne S. Thomas, Ute und Zhaoxin für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse außerhalb des Institutes.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern und Andreas, die mich während der vergangenen Jahre begleitet und unterstützt haben.

Ich danke meinen akademischen Lehrern:

Prof. Dr. Giffhorn, Prof. Dr. Heide, Prof. Dr. Kaltwasser, Prof. Dr. Kreibitz, Prof. Dr. Kroeger,
Prof. Dr. Leibenguth, Prof. Dr. Mosbacher, Prof. Dr. Mues, Prof. Dr. Nachtigall, Prof. Dr.
Unruh, Prof. Dr. Veith, Prof. Dr. Zeppezauer, Prof. Dr. Zinsmeister

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Marion Steffensky
Geburtsdatum: 27.11.1969
Geburtsort: Saarlouis
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1976 - 1980 Grundschule in Neuforweiler
1980 - 1989 Staatliches Max-Planck-Gymnasium in Saarlouis
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung und Praktika:

10/89 – 10/95 Studium an der Universität des Saarlandes
Fachrichtung: Biologie
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Genetik, Biochemie
Abschluß: Diplom-Biologin, Note: sehr gut
Thema der Diplomarbeit: Reinigung und Charakterisierung der F-Typ-ATPase aus *Bacillus pasteurii* DSM 33

10/95 – 12/95 Tätigkeit als geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Allgemeine Mikrobiologie an der Universität des Saarlandes

01/96 – 03/96 Praktikum im Paul-Ehrlich-Institut in Langen, Fachbereich Immunchemie
Thema: Einsatz der Kapillarelektrophorese zur Reinheitskontrolle von Immunglobulin-Präparaten

05/96 – 08/96 Tätigkeit als geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Physiologisch-Chemischen Institut, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

08/96 – 09/00 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. L. Heide