

**Methyltransfer in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 -  
kleine Veränderung, bedeutender Effekt**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

**Gabriele Weitnauer**

Tag der mündlichen Prüfung:

17.07.2002

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1.Berichtersteller:

Prof. Dr. A. Bechthold

2.Berichtersteller:

Prof. Dr. G. Drews





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegen Antibiotika und die Suche nach neuen Wirkstoffen	1
1.2	Avilamycin - ein Vertreter aus der Gruppe der Orthosomycine	4
1.3	Das Potential der Streptomycetengenetik	7
1.4	Zielsetzung der Arbeit	9
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien, Nährmedien und Puffer</b>	<b>11</b>
2.1.1	Chemikalien und Medienbestandteile	11
2.1.2	Säulenmaterialien	12
2.1.3	Enzyme und Kits	13
2.1.4	Nährmedien	14
2.1.4.1	Medien zur Kultivierung von <i>E.coli</i>	14
2.1.4.2	Medien zur Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.1.4.3	Medien zur Kultivierung von Streptomyceten	15
2.1.4.4	Medien zur Protoplastentransformation von Streptomyceten	16
2.1.5	Antibiotika	17
2.1.6	Puffer und Lösungen	17
2.1.6.1	Puffer zur Enzymreinigung	17
2.1.6.2	Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung von Proteingelen	18
2.1.6.3	Lösungen zur Proteinbestimmung	18
2.1.6.4	Puffer und Lösungen für Methyltransferase-Assays	19
2.1.6.5	Puffer für die Isolierung von 70S Ribosomen bzw. der 30S und 50S Untereinheiten aus Streptomyceten	19
2.1.6.6	Puffer zur in-vitro-Translation	20
2.1.6.7	Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese	21
2.1.6.8	Lösungen zur Transformation und Selektion von <i>E.coli</i>	21
2.1.6.9	Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	21
2.1.6.10	Puffer und Lösungen für den Southern-Blot	22
2.1.6.11	Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten	23
<b>2.2</b>	<b>Bakterienstämme und Plasmide</b>	<b>24</b>
2.2.1	Bakterienstämme	24
2.2.2	Vektoren, Plasmide und Cosmide	25
<b>2.3</b>	<b>Kulturbedingungen</b>	<b>28</b>
2.3.1	Anzucht und Kultivierung von <i>E.coli</i>	28

2.3.2	Anzucht und Kultivierung von Streptomycceten.....	28
2.3.2.1	Anzucht in Fest- und Flüssigmedien.....	28
2.3.2.2	Herstellung von Sporensuspensionen und Glycerindauerkulturen .....	28
<b>2.4</b>	<b>Methoden der Molekularbiologie .....</b>	<b>29</b>
2.4.1	CaCl <sub>2</sub> -vermittelte Transformation von <i>E.coli</i> .....	29
2.4.1.1	Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Zellen .....	29
2.4.1.2	CaCl <sub>2</sub> -vermittelte Transformation von <i>E.coli</i> und Blau-Weiß-Selektion.....	29
2.4.2	Protoplastierung von Streptomycceten .....	30
2.4.3	Transformation von Streptomycceten .....	31
2.4.4	Methoden zur Isolierung von DNA .....	32
2.4.4.1	Plasmidminipräparation aus <i>E.coli</i> (modifiziert nach TENS).....	32
2.4.4.2	Plasmidmaxipräparation aus <i>E.coli</i> .....	33
2.4.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA zur nicht-radioaktiven Sequenzierung.....	33
2.4.4.4	Plasmid-Isolierung aus Streptomycceten .....	33
2.4.4.5	Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten.....	33
2.4.5	Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA.....	34
2.4.5.1	Phenol-/Chloroform-Extraktion .....	34
2.4.5.2	Alkoholfällung .....	34
2.4.5.3	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen .....	34
2.4.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	34
2.4.6.1	Trennbedingungen .....	34
2.4.6.2	Färben von Agarosegelen .....	35
2.4.6.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	35
2.4.7	Enzymatische Modifizierung von DNA .....	35
2.4.7.1	Restriktionsanalyse von DNA .....	35
2.4.7.2	Auffüllreaktion mit Hilfe von Klenow Fragment .....	35
2.4.7.3	Auffüllreaktion mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase.....	35
2.4.7.4	Ligation.....	36
2.4.8	PCR-Methoden .....	36
2.4.8.1	Amplifikation von <i>aviG1</i> .....	36
2.4.8.2	Amplifikation von <i>aviG2</i> .....	37
2.4.8.3	Amplifikation von <i>aviG3</i> .....	38
2.4.8.4	Amplifikation von <i>aviG4</i> .....	39
2.4.8.5	Amplifikation von <i>aviG5</i> .....	40
2.4.8.6	Amplifikation von <i>aviABC1</i> und <i>aviABC2</i> .....	41
2.4.8.7	Amplifikation von <i>aviRb</i> .....	42
2.4.9	Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung.....	43
2.4.9.1	Sequenzierreaktion.....	43
2.4.9.2	PCR-Bedingungen.....	44
2.4.9.3	Zusammensetzung des Sequenziergels und Laufbedingungen .....	44
2.4.9.4	Auswertung der Sequenzdaten .....	44
2.4.10	Southern-Hybridisierung.....	45
2.4.11	In-vitro-Transkription .....	45
<b>2.5</b>	<b>Methoden der Biochemie.....</b>	<b>46</b>
2.5.1	Expression und Reinigung der rRNA-Methyltransferasen <i>AviRa</i> und <i>AviRb</i> .....	46
2.5.2	Proteingehaltsbestimmung.....	46

2.5.3	Bestimmung der rRNA-Methyltransferase-Aktivität .....	46
2.5.4	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	47
2.5.5	Isolierung von 70S Ribosomen aus Streptomyces .....	48
2.5.6	In-vitro-Translation .....	48
<b>2.6</b>	<b>Isolierung und Analytik von Sekundärstoffen .....</b>	<b>49</b>
2.6.1	Isolierung von Urdamycinen und Urdamycin-Derivaten .....	49
2.6.2	Isolierung von Avilamycinen und Avilamycin-Derivaten .....	49
2.6.2.1	Herstellung eines Rohextrakts .....	49
2.6.2.2	Isolierung durch Bindung an RP18-Harz .....	49
2.6.3	Agardiffusionstest .....	50
2.6.4	Dünnschichtchromatographie (DC) .....	50
2.6.5	Säulenchromatographie .....	50
2.6.6	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) .....	51
2.6.6.1	Analytik von Urdamycinen .....	51
2.6.6.2	Analytik von Avilamycinen und Gavibamycinen .....	52
2.6.6.3	Präparative Isolierung von Gavibamycin A3 .....	54
2.6.7	Massenspektrometrische Analysenmethoden .....	55
2.6.7.1	HPLC-ESI-MS .....	55
2.6.7.2	GC-MS .....	55
2.6.7.3	ESI-MS .....	56
2.6.8	Bestimmung von MIC-Werten .....	56
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Sequenzierung des Avilamycin-Biosynthesegenclusters aus <i>S. virido-</i></b>	
	<b><i>chromogenes</i> Tü57 .....</b>	<b>57</b>
3.1.1	Restriktionskartierung und Subklonierung ausgewählter Cosmide .....	58
3.1.1.1	Cosmid P2 .....	58
3.1.1.2	Cosmide 3M5 und 6H18 .....	60
3.1.2	Partielle Sequenzierung der Cosmide P2, 3M5 und 6H18 .....	60
3.1.2.1	Enzyme der Dichloroisoeberninsäure-Biosynthese .....	66
3.1.2.2	Enzyme der Desoxyzuckerbiosynthese .....	66
3.1.2.3	Glykosyltransferasen .....	69
3.1.2.4	Oxygenasen .....	70
3.1.2.5	Gene mit unbekannter Funktion .....	70
<b>3.2</b>	<b>Identifizierung von Methyltransferasegenen im Avilamycin-Biosynthese-</b>	
	<b>gencluster .....</b>	<b>71</b>
<b>3.3</b>	<b>Funktionsnachweis von Methyltransferasegenen in <i>S. viridochromogenes</i></b>	
	<b>Tü57 und Herstellung neuer Avilamycin-Derivate durch Geninaktivierungs-</b>	
	<b>experimente .....</b>	<b>77</b>
3.3.1	Untersuchung des Produktspektrums von <i>S. viridochromogenes</i> Tü57 .....	79
3.3.2	Inaktivierung des Methyltransferasegens <i>aviG1</i> .....	81
3.3.2.1	Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids pMIK1 .....	81
3.3.2.2	Transformation des <i>S. viridochromogenes</i> Tü57 mit pMIK1 .....	82
3.3.2.3	Nachweis und Beschreibung des Integrationsereignisses .....	83

3.3.2.4	Nachweis eines double-crossovers .....	84
3.3.2.5	Analyse der Produkte von <i>S. viridochromogenes</i> GW1 .....	87
3.3.2.6	Komplementierung der Mutante <i>S. viridochromogenes</i> GW1 .....	88
3.3.2.7	Funktionsnachweis des Methyltransferasegens <i>aviG1</i> durch heterologe Expression .....	90
3.3.3	Inaktivierung des Methyltransferasegens <i>aviG4</i> .....	94
3.3.3.1	Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids pMIKG4E3 .....	94
3.3.3.2	Transformation des <i>S. viridochromogenes</i> Tü57 mit pMIKG4E3 .....	95
3.3.3.3	Nachweis eines double-crossovers .....	95
3.3.3.4	Analyse der Produkte von <i>S. viridochromogenes</i> GW4 .....	97
3.3.3.5	Komplementierung der Mutante <i>S. viridochromogenes</i> GW4 .....	101
3.3.4	Herstellung einer Doppelmutante durch Inaktivierung der Methyltransferasegene <i>aviG4</i> und <i>aviG2</i> .....	103
3.3.4.1	Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids pMIKG2 .....	103
3.3.4.2	Transformation der Mutante <i>S. viridochromogenes</i> GW4 mit pMIKG2 ...	103
3.3.4.3	Nachweis und Beschreibung des Integrationsereignisses .....	104
3.3.4.4	Nachweis eines double-crossovers .....	105
3.3.4.5	Analyse der Produkte von <i>S. viridochromogenes</i> GW2 .....	107
3.3.5	Herstellung einer Doppelmutante durch Inaktivierung der Methyltransferasegene <i>aviG4</i> und <i>aviG5</i> .....	111
3.3.5.1	Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids pMIKG5 .....	111
3.3.5.2	Transformation der Mutante <i>S. viridochromogenes</i> GW4 mit pMIKG5 ...	112
3.3.5.3	Nachweis und Beschreibung des Integrationsereignisses .....	112
3.3.5.4	Nachweis eines double-crossovers .....	114
3.3.5.5	Analyse der Produkte von <i>S. viridochromogenes</i> GW5 .....	114
3.3.6	Herstellung einer Doppelmutante durch Inaktivierung des Methyltransferasegens <i>aviG4</i> und des putativen Methyltransferasegens <i>aviG3</i> .....	117
3.3.6.1	Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids pMIKG3 .....	117
3.3.6.2	Transformation der Mutante <i>S. viridochromogenes</i> GW4 mit pMIKG3 ...	117
3.3.6.3	Nachweis und Beschreibung des Integrationsereignisses .....	118
3.3.6.4	Nachweis eines double-crossovers .....	118
3.3.6.5	Analyse der Produkte von <i>S. viridochromogenes</i> GW3 .....	119
3.3.7	Charakterisierung der als Gavibamycine bezeichneten neuen Avilamycin-Derivate .....	122
3.3.7.1	Anzucht der Mutanten und Extraktion der Gavibamycine .....	122
3.3.7.2	Stabilität .....	122
3.3.7.3	Polarität .....	123
3.3.7.4	Antimikrobielle Aktivität .....	124
<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen zu Avilamycinresistenzmechanismen in <i>S. viridochromogenes</i> Tü57 .....</b>	<b>128</b>
3.4.1	Identifizierung der Resistenzgene <i>aviABC1</i> , <i>aviABC2</i> , <i>aviRa</i> und <i>aviRb</i> ...	128
3.4.2	Untersuchung der Bedeutung der einzelnen Resistenzfaktoren .....	129
3.4.2.1	Klonierung und Kombination der einzelnen Resistenzgene .....	129
3.4.2.2	Heterologe Expression in <i>S. lividans</i> TK66 .....	130
3.4.2.3	Bestimmung der Empfindlichkeit der einzelnen Transformanden gegenüber Avilamycin .....	131



---

3.4.2.4	Untersuchung auf Kreuzresistenz zu anderen Antibiotika .....	132
3.4.3	Funktionelle Expression und Reinigung der rRNA-Methyltransferasen AviRa und AviRb .....	133
3.4.3.1	Überexpression von <i>aviRa</i> in <i>E.coli</i> als N-terminales Hexa-Histidin- Fusionsprotein .....	133
3.4.3.2	Überexpression von <i>aviRb</i> in <i>E.coli</i> als N-terminales Hexa-Histidin- Fusionsprotein .....	134
3.4.3.3	Reinigung der rRNA-Methyltransferasen AviRa und AviRb als N- terminale Hexa-Histidin-Fusionsproteine .....	136
3.4.3.4	Nachweis der Funktion der gereinigten, rekombinanten rRNA- Methyltransferasen .....	137
3.4.3.5	Bestimmung des methylierten rRNA-Typs .....	140
3.4.4	Untersuchung der Empfindlichkeit von 70S Ribosomen gegenüber Avilamycin .....	142
3.4.4.1	Isolierung der 70S Ribosomen aus Avilamycinresistenzgen- exprimierenden <i>S. lividans</i> TK66-Transformanden .....	142
3.4.4.2	Durchführung von in-vitro-Translationsexperimenten zur Bestimmung der Avilamycinempfindlichkeit der 70S Ribosomen .....	143
3.4.4.3	Durchführung eines Methylierungsassays .....	144
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>145</b>
<b>4.1</b>	<b>Sequenzierung und Analyse des Avilamycin-Biosyntheseclusters.....</b>	<b>145</b>
<b>4.2</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung von Methyltransferasegenen aus <i>S. virido- chromogenes</i> Tü57 .....</b>	<b>150</b>
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion und Bedeutung von Avilamycinresistenz vermittelnden Genen .....</b>	<b>160</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>164</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>167</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>179</b>

**Es wurden veröffentlicht:**Wissenschaftliche Publikationen:

Weitnauer, G., Gaisser, S., Trefzer, A., Stockert, S., Westrich, L., Quiros, L.M., Mendez, C., Salas, J.A., Bechthold, A. (2001) An ATP-binding cassette transporter and two rRNA methyltransferases are involved in resistance to avilamycin in the producer organism *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 690-695

Weitnauer, G., Mühlenweg, A., Trefzer, A., Hoffmeister, D., Süßmuth, R.D., Jung, G., Welzel, K., Vente, A., Girreser, U., Bechthold, A. (2001) Biosynthesis of the orthosomycin antibiotic avilamycin A: deductions from the molecular analysis of the *avi* biosynthetic gene cluster of *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 and production of new antibiotics. *Chem. Biol.* 8: 569-581

Weitnauer, G., Gaisser, S., Kellenberger, L., Leadlay, P.F., Bechthold, A. (2002) Analysis of a C-methyltransferase gene (*aviG1*) involved in avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 and complementation of a *Saccharopolyspora erythraea* *eryBIII* mutant by *aviG1*. *Microbiology* 148: 373-379

Faust, B., Hoffmeister, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Haag, S., Schneider, P., Decker, H., Künzel, E., Rohr, J., Bechthold, A. (2000) Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tü2717. *Microbiology* 146: 147-154

Künzel, E., Faust, B., Oelkers, C., Weißbach, U., Bearden, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Bechthold, A., Rohr, J. (1999) Inactivation of the *urdGT2* gene, which encodes a glycosyltransferase responsible for the C-glycosyltransfer of activated D-olivose, leads to the formation of three novel urdamycins I, J and K. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 11058-11062

Trefzer, A., Hoffmeister, D., Künzel, E., Stockert, S., Weitnauer, G., Westrich, L., Rix, U., Fuchser, J., Bindseil, K.U., Rohr, J., Bechthold, A. (2000) Function of glycosyltransferase genes involved in urdamycin A biosynthesis. *Chem. Biol.* 7: 133-142

Bechthold, A., Domann, S., Faust, B., Hoffmeister, D., Stockert, S., Trefzer, A., Weitnauer, G., Westrich, L. (1999) Glycosidierte Naturstoffe. Perspektiven für die Kombinatorische Biosynthese. *Chemotherapie Journal* 4: 130-135

Übersichtsartikel:

Mendez, C., Weitnauer, G., Bechthold, A., Salas, J.A. (2000) Structure alteration of polyketides by recombinant DNA technology in producer organisms – prospects for the generation of novel pharmaceutical drugs. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1: 355-395

Weitnauer, G., Bechthold, A. (1999) Antibiotika im Blickpunkt – Verbot des Einsatzes von Spiramycin, Tylosin und Bacitracin als Wachstumsförderer in der Tiermast. *PZ-Prisma* 2: 117-125

---

### Patentanmeldungen:

Deutsche Patentanmeldung (2001) Avilamycin Derivate DE 10109166.4

Weitnauer, G., Mühlenweg, A., Trefzer, A., Bechthold, A.

Anmelderin: Combinature Biopharm AG, Berlin

Internationale Patentanmeldung (2001) Avilamycin Derivatives PCT/EP01/09815

Weitnauer, G., Mühlenweg, A., Trefzer, A., Bechthold, A.

Anmelderin: Combinature Biopharm AG, Berlin

### Tagungsbeiträge:

#### *Vortrag*

Weitnauer, G., Trefzer, A., Stockert, S., Bechthold, A. Methyltransfer in *S. viridochromogenes* Tü57: small structural difference, important biological effect. VAAM-Workshop: Biologie der Actinomyceten, Dresden, September 1999

#### *Poster*

Weitnauer, G., Trefzer, A., Gaisser, S., Stockert, S., Bechthold, A. The avilamycin biosynthetic gene cluster – perspective for the production of new antibiotics. VAAM-Workshop: Biologie der Actinomyceten, Kaiserslautern, Oktober 1998

Weitnauer, G., Trefzer, A., Gaisser, S., Stockert, S., Bechthold, A. Molekularbiologische Charakterisierung von Avilamycin Resistenz- und Biosynthesegenen aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Tübingen, November 1998

Weitnauer, G., Trefzer, A., Gaisser, S., Stockert, S., Westrich, L., Bechthold, A. Characterization of resistance and methyltransferase genes in the avilamycin biosynthetic gene cluster. 2000 Years of Natural Products Research-Past, Present and Future, Joint Meeting of the ASP, AFERP, GA and PSE, Amsterdam, Juli 1999

Weitnauer, G., Gaisser, S., Trefzer, A., Quiros, L.M., Mendez, C., Salas, J.A., Bechthold, A. Cloning and characterization of three different resistance genes from the avilamycin producer *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. VAAM-Workshop: Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten, Bonn, September 2000



# 1 Einleitung

## 1.1 Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegen Antibiotika und die Suche nach neuen Wirkstoffen

Mit der Entdeckung des Penicillins im Jahre 1928 durch Alexander Fleming wurde die Behandlung bakteriell verursachter Erkrankungen revolutioniert. In den darauf folgenden drei bis vier Jahrzehnten vergrößerte sich das Arsenal an therapeutisch anwendbaren, antimikrobiell wirksamen Substanzen als Ergebnis eines intensiv betriebenen Screenings immer weiter, und ein Sieg über die meisten Infektionskrankheiten schien in greifbare Nähe gerückt. Wie sich herausstellen sollte, war dieser Optimismus jedoch weit verfrüht. Große Sorgen bereitet die zunehmende Resistenz der Mikroorganismen gegen die eingesetzten Antibiotika. Vor allem während der vergangenen 10 bis 15 Jahre hat sich die Situation dramatisch verschlechtert. Als wichtige Problemkeime anzusehen sind Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA), Vancomycin-resistente *Enterococcus faecalis*-Stämme (VRE), multiresistente *Streptococcus pneumoniae*-Stämme, multiresistente *Mycobacterium tuberculosis*-Stämme und multiresistente *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme (Jones, 2001) (Tab. 1). Alarmierend sind Berichte über MRSA-Stämme, bei denen auch Vancomycin als Reserveantibiotikum immer häufiger in seiner Wirksamkeit versagt (Hiramatsu et al., 1997). Das Schreckgespenst Multiresistenz ist schon längst Realität geworden und keine Seltenheit mehr. Resistenzen können entweder aufgrund von Mutationen im bakteriellen Genom oder durch die Aufnahme von Resistenzgenen entstehen. Erleichtert wird dies dadurch, dass Bakterien natürliche Gentransfermechanismen (Konjugation, Transformation, Transduktion) besitzen, mit denen sie auch über Artgrenzen hinweg Resistenzeigenschaften an andere Bakterien weitergeben können (Davies, 1994). Resistenzen entwickeln sich dabei bevorzugt überall dort, wo Antibiotika gehäuft zur Anwendung kommen, wie z.B. in Krankenhäusern, und so zur Selektionierung resistenter Keime beitragen können. Häufig beobachtete Resistenzmechanismen beruhen zum einen auf der Inaktivierung des entsprechenden Antibiotikums durch spezielle Enzyme, wie z.B.  $\beta$ -Lactamasen ( $\beta$ -Lactamantibiotika), Acetyltransferasen (Chloramphenicol, Aminoglykoside) oder Phosphotransferasen (Aminoglykoside) (Davies, 1994) und zum anderen auf einer gezielten Veränderung des jeweiligen Targets, wie z.B. Modifikation der Ribosomen (z.B. MLS-Resistenz), Bildung einer veränderten Gyrase (Chinolone) oder Bildung veränderter Zellwandsynthese-

enzyme, kurz PBPs ( $\beta$ -Lactamantibiotika, Vancomycin) (Neu, 1992; Spratt, 1994). Bekannt ist auch die Ausbildung von Transportern, die eine ganze Palette an Substanzen erkennen und aus der Zelle hinaustransportieren können, oder der Aufbau einer Penetrationsbarriere z.B. aufgrund veränderter Zellmembranproteine (Nikaido, 1994).

Tab. 1: Übersicht über die häufigsten Problemkeime

Bakterienfamilie/ Bakterienart	Definition und Bedeutung	wachsende Resistenz gegenüber
<i>Staphylococci</i>	Gram-positive Kokken; die wichtigsten Arten sind <i>S.aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> und <i>S.saprophyticus</i> ; <i>S.aureus</i> gehört mit zu den häufigsten Erregern bakterieller Infekte des Menschen und verursacht häufig nosokomiale Infektionen	$\beta$ -Lactamen, Aminoglykosiden, Makroliden, Lincosamiden, Glykopeptiden
<i>Enterococci</i>	Gram-positive, fakultativ anaerobe Kokken; Vorkommen im Darm von Mensch und Tier; die wichtigsten Spezies sind <i>E.faecalis</i> und <i>E.faecium</i> ; besitzen i.a. nur geringe Pathogenität, v.a. immungeschwächte Personen sind betroffen; die gefürchtetste Infektion durch Enterokokken ist die Endokarditis; Enterokokken weisen häufig Resistenzen gegenüber Antibiotika auf	Glykopeptiden (Vancomycin, Teicoplanin), Penicillinen, Aminoglykosiden
<i>Streptococci</i>	Gram-positive, fakultativ anaerobe Kokken; werden aufgrund ihres Hämolysevermögens ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Hämolyse) sowie Antigenstrukturen (A-, B-, C-, G- und D-Gruppenantigen) eingeteilt; bekannte Arten sind <i>S.pneumoniae</i> (Pneumokokken, Infekte der oberen und tiefen Atemwege, Meningitis), <i>S.pyogenes</i> (A-Streptokokken, Verursacher invasiver Infekte)	$\beta$ -Lactamen, Aminoglykosiden, Makroliden
<i>Mycobacteriaceae</i>	Gram-positive Stäbchen; eine der bekanntesten Arten ist <i>M.tuberculosis</i> , der Erreger der Tuberkulose	Rifampicin, Isoniazid, Streptomycin u.a.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-negatives Stäbchen mit polar angeordneten Geißeln; häufiger Erregernosokomialer Infekte, v.a. bei immungeschwächten Patienten	Penicillinen, Cephalosporinen, Aminoglykosiden

Neben den Krankenhäusern gilt außerdem auch die Tiermast als eine Quelle bevorzugter Antibiotikaresistenzentwicklung, da hier noch immer antibakterielle Wirkstoffe als sogenannte Wachstumsförderer eingesetzt werden (Witte, 1998). Die

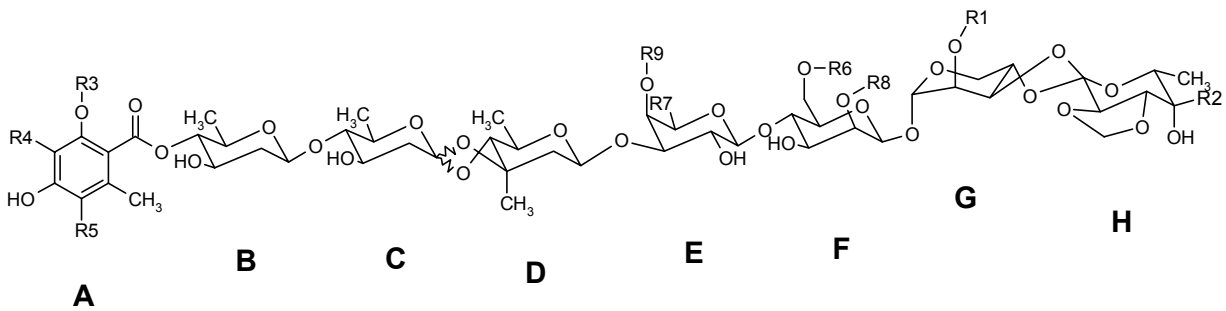
Gattung *Enterococcus*, mit den beiden Hauptarten *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*, beherbergt typische Darmbewohner von Mensch und Tier. Als opportunistisch pathogene Keime können sie bei immungeschwächten Patienten zu schweren Infektionen führen, die jedoch normalerweise gut mit Glykopeptidantibiotika, wie Vancomycin, therapiert werden können. 1996 musste Avoparcin, ein Strukturanalogon zu Vancomycin, in der EU als Wachstumsförderer vom Markt genommen werden, da ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten Vancomycin-resistenter Keime und der Verabreichung von Avoparcin in der Tiermast nachgewiesen worden war (Witte, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass resistente Enterokokken aus Tieren über die Nahrungskette auf den Menschen übertragen werden können (Witte und Klare, 1995), und dass dort ein Transfer des die entsprechenden Resistenzgene tragenden Transposons auf andere Keime stattfindet (Feinman 1995; Arthur et al., 1996). Enterokokken spielen allgemein eine zentrale Rolle bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen, da sie diese mit vielen anderen, auch nicht verwandten Gram-positiven und sogar Gram-negativen Bakterien wie *E.coli* austauschen können (Teuber et al., 1996; Teuber 2001). Außer über Lebensmittel tierischen Ursprungs, wie Fleisch und Milch, können resistente Keime dabei auch über Abwasser und Gemüse in die menschliche Nahrung gelangen (Witte, 1998). Daneben gibt es sicherlich noch eine ganze Reihe weiterer Gründe, die dazu geführt haben, dass Infektionskrankheiten wieder auf dem Vormarsch sind, wie die problematische Situation in den Entwicklungsländern oder die wachsende Armut auch in Industrienationen, und denen mit wissenschaftlichen Erkenntnissen allein nicht begegnet werden kann (Zähner und Fiedler, 1995). Doch eines ist deutlich geworden, um mit den Mikroorganismen Schritt halten zu können, bedarf es einer intensiven Suche nach neuen Wirkstoffen. Bis in die 90er Jahre konzentrierte sich die Forschung dabei vor allem auf die Entwicklung sogenannter "me-too"-Präparate, d.h. bereits bekannte Leitsubstanzen wurden in ihrer Struktur so lange variiert bis sie wieder ein wirksames Agens gegen resistente Keime darstellten (Zähner und Fiedler, 1995; McDevitt und Rosenberg, 2001). Doch mittlerweile gestaltet sich die Umsetzung dieses Ansatzes als immer schwieriger, da viele Bakterien mdr-Transporter (multidrug-resistance) oder ähnliche universell wirksame Resistenzmechanismen entwickelt haben. Mehr Erfolg in der Zukunft dürften andere Strategien wie die Suche nach Verbindungsklassen mit neuartigem Wirkmechanismus und die Suche nach neuen Targets bringen. Die Bemühungen gehen derzeit vor allem in Richtung Gram-positive Problemkeime, da hier der größte Handlungsbedarf besteht. Einige neue erfolgsversprechende Präparate sind bereits auf dem Markt bzw. befinden sich in den letzten Phasen der klinischen Prüfung, wie zum

Beispiel Streptogramin-Kombinationen (Quinupristin/Dalfopristin), Ketolide (Telithromycin), Oxazolidinone (Linezolid) oder Glycylcycline. Um eine weitere sehr attraktive Antibiotikaklasse handelt es sich bei den Orthosomycinen, die sich mit Ziracin (Evernimicin bzw. SCH27899) bereits in Phase III der klinischen Prüfung befand, welche jedoch im Jahr 2000 von der Firma Schering-Plough abgebrochen wurde, da, wie in der Pressemitteilung zu lesen war, das Nutzen/Risiko-Verhältnis bei einer therapeutischen Anwendung keine Weiterentwicklung rechtfertigte.

## 1.2 Avilamycin - ein Vertreter aus der Gruppe der Orthosomycine

Avilamycine wurden 1959 in Kulturfiltraten von *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 entdeckt, einem Stamm, der aus einer in Caracas, Venezuela, gesammelten Bodenprobe isoliert worden war (Gäumann et al., 1960; Buzzetti et al., 1968). Neben Avilamycin A wurden eine Reihe weiterer Avilamycine (Avilamycin B bis K) gefunden, die sich strukturell jedoch nur geringfügig voneinander unterscheiden (Buzzetti et al., 1968; Heilman et al., 1979; Wright, 1979; Mertz et al., 1986) (Abb. 1). Avilamycine sind Oligosaccharidantibiotika und bestehen aus einem terminalen Dichloroisoeberninsäurerest (Ring A), der esterglykosidisch mit einer Heptasaccharidkette bestehend aus D-Olivose (Ring B und C), 2-Desoxy-D-erubiose (Ring D), 4-O-Methyl-D-fucose (Ring E), 2,6-Di-O-methyl-D-mannose (Ring F), L-Lyxose (Ring G) und Methyleurekanat (Ring H) verknüpft ist. An zwei Stellen des Moleküls finden sich Orthoester-Gruppierungen, dem charakteristischen Merkmal der Orthosomycine. Ebenfalls zu dieser Antibiotikaklasse gehören die Curamycine (Galmarini und Deulofeu, 1961; Braun, 1995), die Evernimomycine (Weinstein et al., 1965) und die Flambamycine (Ninet et al., 1974). Orthosomycine besitzen eine hervorragende antibiotische Aktivität, unter anderem auch gegen multiresistente Gram-positive Keime. In Studien, die von der Firma Hoffmann-LaRoche in den 90er Jahren durchgeführt wurden, erwies sich Avilamycin A als sehr gut wirksam gegen multiresistente *Staphylococcus aureus*-, *Enterococcus faecalis*- und *Enterococcus faecium*-Stämme (Zähler, persönliche Mitteilung). Eine dem Avilamycin strukturell sehr ähnliche Substanz ist Evernimicin (SCH27899, Ziracin) (Abb. 2), ein Vertreter der Evernimomycine, die von der Firma Schering-Plough (New Jersey) entwickelt worden war (Loebenberg et al., 1994) und sich, wie gesagt, bereits in Phase III der klinischen Prüfung befand, bevor diese dann abgebrochen wurde.

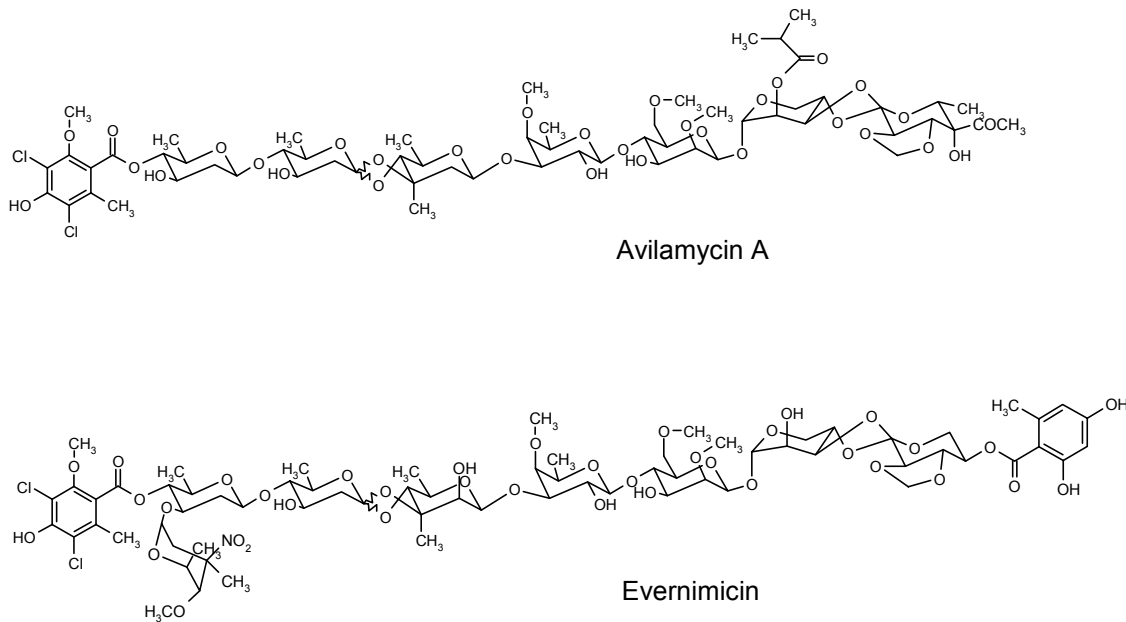




Avilamycine	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
A	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
A'	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
B	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
C	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
D <sub>1</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
D <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
E	H	CH(OH)CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
F	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	H	H	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
G	COC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
H	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
I	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
J	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
K	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
L	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CHO	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
M	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
N	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>

Abb. 1: Strukturen einiger Avilamycine (nach Mertz et al., 1986)

In zahlreichen Untersuchungen zeigte diese Verbindung eine ausgezeichnete Aktivität gegen Glykopeptid-resistente Enterokokken, Methicillin-resistente Staphylokokken und Penicillin-resistente Streptokokken (Nakashio et al., 1995; Jones und Barret, 1995; Foster und Rybak, 1999; Fuchs et al., 1999). Essentiell für diese Wirksamkeit sind der terminale Dichlorisoeverninsäurerest, eine zur Esterbindung sich in para-Stellung befindliche freie Hydroxylgruppe und die Orthoestergruppierungen, bei denen außerdem auch die jeweilige Konfiguration eine entscheidende Rolle spielt (Wright, 1979; Ganguly, 2000).



**Abb. 2: Strukturen der Orthosomycinantibiotika Avilamycin A und Evernimicin (SCH27899, Ziracin)**

Der Wirkungsmechanismus sowohl von Avilamycin als auch von Evernimicin ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Sicher ist jedoch, dass es sich um Inhibitoren der Proteinbiosynthese handelt. Für Avilamycin wurde ursprünglich eine Bindung an die ribosomale 30S Untereinheit postuliert (Wolf, 1973), wobei kürzlich jedoch gezeigt werden konnte, dass Evernimicin an die ribosomale 50S Untereinheit bindet und die Bindungsstellen für Avilamycin und Evernimicin auf dieser Untereinheit überlappen (McNicholas et al., 2000). Beide Verbindungen scheinen jedenfalls einen neuartigen Wirkungsmechanismus aufzuweisen (Belova et al., 2001), und bisher sind noch keine Kreuzresistenzen zu anderen Antibiotika bekannt. Einige Orthosomycine besitzen allerdings eine gewisse Nierentoxizität (Travis, 1994; Nakashio et al., 1995) und weisen eine starke Bindung an Serumproteine auf (Weinstein et al., 1965; Sanders und Sanders, 1974). Desweiteren handelt es sich im allgemeinen um recht lipophile Verbindungen mit schlechter Wasserlöslichkeit, die sich oral nicht applizieren lassen. Doch trotz dieser Einschränkungen avancieren sowohl Evernimicin als auch Avilamycin aufgrund ihrer exzellenten Bioaktivität zu erfolgsversprechenden Kandidaten für die Entwicklung neuer Antibiotika. Ein wichtiger Schritt könnte hierbei die Herstellung von Derivaten mit möglichst unveränderter antimikrobieller Wirksamkeit, aber verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften sein. Leider sind Avilamycine derzeit von der EU noch als Wachstumsförderer in der Tiermast zugelassen, was zu einigen Problemen

beim Einsatz von Orthosomycinderivaten als Humantherapeutika führen könnte (Wegener et al., 1999). Im März 2002 machte die zuständige EU-Kommission jedoch eine schon im Vorfeld gemachte Ankündigung wahr und schlug vor, alle noch zugelassenen antibiotischen Futtermittelzusätze mit Wirkung zum 01.01.2006 zu verbieten. Die Entscheidung von Ministerrat und Europaparlament standen zu diesem Zeitpunkt noch aus.

### 1.3 Das Potential der Streptomycetengenetik

Fast 50% der bekannten Antibiotika werden von Actinomyceten gebildet, die meisten davon von Stämmen der Gattung *Streptomyces*, darunter bekannte Beispiele, wie Erythromycin, Tetracycline oder Aminoglykoside. Streptomyceten sind obligat aerobe Gram-positive Bodenbakterien, die sich unter anderem durch ihre Fähigkeit zur morphologischen und physiologischen Differenzierung auszeichnen. Im Boden bilden sie filamentöse Substratmyzelien aus, aus denen sich bei Nährstoffmangel an der Oberfläche ein Luftmyzel entwickelt. Von diesem werden Sporen abgeschnürt, die als Dauerformen dienen, und aus denen unter geeigneten Lebensbedingungen wieder ein Substratmyzel auskeimen kann (Chater und Merrick, 1979). Ihre DNA ist durch einen hohen Gehalt an Guanin und Cytosin (durchschnittlich um die 70%) charakterisiert (Wright und Bibb, 1992). Das meist lineare Genom ist mit einer Größe von 8000-10000kb fast doppelt so groß wie das von *E.coli* und enthält deutlich mehr Gene als zum Beispiel die eukaryotische Hefe. Einzelne Bereiche zeigen eine hohe Rekombinationsrate mit starker genetischer Instabilität (Cullum et al., 1986). In den letzten Jahren sind Streptomyceten mit Hilfe molekularbiologischer Methoden intensiv erforscht worden. Dabei zeigte sich, dass die Gene, die für die Biosynthese eines bestimmten Naturstoffs benötigt werden, sehr häufig geclustert vorliegen, d.h. zusammen mit den entsprechenden Regulator- und Resistenzgenen auf einem zusammenhängenden Abschnitt des Streptomycetengenoms lokalisiert sind (Martin und Liras, 1989), was eine Identifizierung und Klonierung wesentlich erleichtert.

In den letzten Jahren wurden in klassischen Screeningprogrammen immer weniger neue Substanzen entdeckt (Zähner und Fiedler, 1995; Watve et al., 2001), weshalb heutzutage der Anwendung molekularbiologischer und gentechnologischer Methoden eine zunehmend größere Bedeutung zugemessen wird. Seit der Isolierung der ersten Biosynthesegene aus Streptomyceten (Feitelson und Hopwood, 1983; Gil und Hopwood, 1983) und der Klonierung und Expression ganzer Biosynthesegencluster (Malpartida und Hopwood, 1984; Motamedi und Hutchinson, 1987) wurden auf dem

Gebiet der Streptomycetengenetik große Fortschritte erzielt. Geeignete Vektorsysteme zur Klonierung und Expression von Genen wurden entwickelt und die Funktion zahlreicher Biosynthesegene bestimmt. Daraus entwickelte sich schließlich eine neue als "Kombinatorische Biosynthese" bezeichnete Technologie, durch die "Naturstoffe" mit neuen bzw. neu kombinierten Strukturen hergestellt werden können (Katz und Hutchinson, 1992; Katz und Donadio, 1993; Hutchinson, 1994; Koshla und Zawada, 1996). Anhand einiger Beispiele sollen die Prinzipien kurz erläutert werden.

#### Herstellung neuer Derivate durch Geninaktivierung

Dieses Verfahren gilt als Vorläufer der eigentlichen "Kombinatorischen Biosynthese", stellt jedoch für sich allein genommen auch schon eine sehr effektive Methode zur Gewinnung neuer Verbindungen dar. Durch das gezielte Ausschalten bestimmter Biosynthesegene ist es möglich, Derivate mit verbesserten Eigenschaften zu erhalten. Zum Beispiel konnte durch Inaktivierung des Hydroxylasegens *eryF* im Erythromycinproduzenten *Saccharopolyspora erythraea* eine Mutante hergestellt werden, die anstatt des säurelabilen Erythromycin A das wesentlich stabilere Derivat 6-Desoxyerythromycin A produziert (Weber et al., 1991).

#### Herstellung neuer Derivate durch eine Kombination aus Geninaktivierung und Genexpression

Epirubicin (4'-Epidoxorubicin) und 4'-Epidaunorubicin sind wichtige in der Tumorbehandlung eingesetzte Chemotherapeutika. Sie werden normalerweise semisynthetisch aus Doxorubicin und Daunorubicin, welche durch Fermentation des Produzentenstammes *Streptomyces peucetius* gewonnen werden, hergestellt. Die Ausbeute ist jedoch jeweils relativ gering. 4'-Epidoxorubicin und 4'-Epidaunorubicin unterscheiden sich von Doxorubicin und Daunorubicin lediglich durch die Konfiguration an Position C4 des Zuckerrestes L-Daunosamin. Eine in *dnmV* (dem 4-Ketoreduktasegen) defekte Mutante produziert das entsprechende 4-Keto-Intermediat. Durch Expression von *eryBIV* bzw. *avrE* (4-Ketoreduktasegene aus dem L-Mycarose- bzw. L-Oleandrose-Biosyntheseweg), die beide für Ketoreduktasen mit einer im Vergleich zur Daunosamin-Ketoreduktase an C4 entgegengesetzten Diastereoselektivität codieren, konnten die gewünschten 4'-Epimere in ausreichenden Mengen erhalten werden (Madduri et al., 1998).

## Neukombination von Genen

Die ausführlichsten Arbeiten wurden hierzu bisher mit Polyketidsynthasegenen (PKS-Genen), insbesondere mit der Erythromycin-Polyketidsynthase (6-Desoxyerythronolid B-Synthase, DEBS) aus *Saccharopolyspora erythraea* durchgeführt. Durch Deletion, Substitution oder auch Addition einzelner Domänen oder Module bzw. durch Konstruktion von Hybridmodulen aus verschiedenen PKS gelang es, Makrolactonringe unterschiedlicher Größe, mit unterschiedlicher Konfiguration an einzelnen Positionen oder auch mit unterschiedlichem Oxidationsgrad zu generieren (Katz, 1997; Katz und McDaniel, 1999). Im Zuge dieser grundlegenden Arbeiten entstand schließlich eine ganze Bibliothek an 6-Desoxyerythronolid B-Derivaten mit bis zu drei unterschiedlichen Modifikationen gleichzeitig (McDaniel et al., 1999). In einem weiteren Schritt konnten schließlich durch heterologe Expression einer Zuckerbiosynthesegenkassette (Desosamin) und modifizierten DEBS-Genen in *S.lividans* neue desosaminylierte Makrolide produziert werden (Rodriguez und McDaniel, 2001).

Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der "Kombinatorischen Biosynthese" zur Herstellung neuer Wirkstoffe sind unter anderem Kenntnisse über die benötigten Biosynthesegene, Regulatoren, eventuell notwendige Resistenzfaktoren und die Substratspezifität der entsprechenden Enzyme. Die Klonierung des Avilamycin-Biosynthesegenclusters eröffnet angesichts der strukturellen Vielfältigkeit des Moleküls zahlreiche Möglichkeiten zur Erzeugung neuer Derivate. Die Aufklärung des Biosynthesewegs und des genauen Wirkmechanismus könnte außerdem dazu beitragen, gezielt Modifikationen an bestimmten Positionen einzuführen, zum Beispiel durch Einsatz von Methoden der "Kombinatorischen Biosynthese", um Avilamycine mit verbesserten Eigenschaften zu erhalten. Besonders wertvoll ist dies auch deshalb, da dieses Molekül, wie viele andere Naturstoffe auch, einer chemischen Synthese nur sehr schwer zugänglich ist.

### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von an der Avilamycin-Biosynthese beteiligten Methyltransferasen und die Aufklärung von Avilamycinresistenzmechanismen im Produzenten *S.viridochromogenes* Tü57. Dazu sollten potentielle Methyltransferasegene inaktiviert und die jeweilige Funktion anhand der Struktur der von den entsprechenden Mutanten gebildeten Produkte bestimmt werden. In diesem Zusammenhang war es außerdem auch von Interesse, die neu entstandenen Derivate hinsichtlich

ihres antibiotischen Potentials und bestimmter physikalisch-chemischer Eigenschaften, wie zum Beispiel Löslichkeit und Stabilität, genauer zu untersuchen. Die Analyse der Avilamycinresistenz vermittelnden Gene sollte auf biochemischem Wege erfolgen. Diese Arbeiten knüpften an die von Sibylle Gaisser während ihrer Dissertation bereits durchgeführten Experimente an. Desweiteren sollte die Sequenzierung des gesamten Avilamycin-Biosynthesegenclusters zum Abschluß gebracht und die erhaltenen Daten ausgewertet werden. Diese sollten als Grundlage für die Erstellung eines hypothetischen Biosynthesewegs dienen, der wiederum die Basis für zukünftige Projekte darstellt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Nährmedien und Puffer

#### 2.1.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Die Medienbestandteile stammen von der Firma Difco (Augsburg). Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 2: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

Hersteller	Chemikalie/Medienbestandteil
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	L-[2,3,4,5,6- <sup>3</sup> H]phenylalanin (137 Ci/mmol) S-Adenosyl-L-[methyl- <sup>3</sup> H]methionin (15 Ci/mmol)
Becton-Dickinson	Mueller Hinton II Broth (cation adjusted)
Merck, Darmstadt	Xylen Cyanol
Oxoid	Lab Lemco Powder
Promochem (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA)	L-Methionine-methyl- <sup>13</sup> C ( <sup>13</sup> C, 98%)
Roche Diagnostics, Mannheim	5S rRNA 16S/23S rRNA
Roth, Karlsruhe	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) Diethylpyrocarbonat (DEPC) 1,4-Dithiothreitol (DTT) Ethidiumbromid HEPES Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG) L-Methionin L-Prolin Maleinsäure Mops Phenol/Chloroform (pH 8,0) Polyethylenglycol (PEG 1000) Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid) Rotiszint <sup>®</sup> Eco Plus (Szintillationscocktail) Sodiumdodecylsulfat (SDS) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethan-sulfonsäure (TES) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-maleat (Tris-Maleat) t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)

<b>Hersteller</b>	<b>Chemikalie/Medienbestandteil</b>
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blau G-250 N-Lauroylsarkosin (Na-Salz, 35%)
Walther Schoenenberger Pflanzensaftwerk GmbH & Co. KG, Magstadt	Sojamehl (vollfett)
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	Ammoniumpersulfat (APS) ATP Bromphenolblau Dimethylformamid (DMF) Dimethylsulfoxid (DMSO) GTP Imidazol $\beta$ -Mercaptoethanol Phenylalanin Phosphoenolpyruvat (Na-Salz) Poly(U) S-Adenosyl-L-methionin (SAM, AdoMet) tRNA (phenylalanine specific)
Stratagene Europe, Amsterdam	RNase-Block
Südzucker, Mannheim	Saccharose, feine Raffinade
USB, Cleveland, Ohio, USA	Polyacrylamid für Sequenziergele (5% Mix)

### 2.1.2 Säulenmaterialien

Die Säulenmaterialien wurden als Feststoff, Suspension oder Fertigsäule bezogen und sind in unten stehender Tabelle zusammengefasst.

Tab. 3: Säulenmaterialien

<b>Hersteller</b>	<b>Säulenmaterial</b>
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	Sephadex G-25 (Fertigsäulen PD-10, NAP-5 und HiTrap™- Desalting columns) MonoQ HR5/5 (Fertigsäule) Superose 12 (Suspension) Sephadex LH20 (Feststoff)
Diaion	HP20-Harz (Feststoff)
Merck, Darmstadt	Kieselgel 60 (Korngröße 0,063-0,2)
Serva, Heidelberg	Amberlite® XAD-16 (Feststoff)
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)



Hersteller	Säulenmaterial
Waters, Eschborn	Sep-Pak <sup>®</sup> tC <sub>2</sub> (Fertigsäule) Sep-Pak <sup>®</sup> C <sub>8</sub> (Fertigsäule) Sep-Pak <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (Fertigsäule) OASIS 1cc (Fertigsäule)

### 2.1.3 Enzyme und Kits

Tab. 4: Enzyme und Kits

Hersteller	Enzym/Kit
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	DNase I Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis Restriktionsendonukleasen T4-DNA-Polymerase Texas Red <sup>™</sup> -Labeled T3-17mer Sequencing Primer Texas Red <sup>™</sup> -Labeled T7-17mer Sequencing Primer Texas Red <sup>™</sup> -M13(-21) forward 18mer Sequencing Primer Texas Red <sup>™</sup> -M13(-26) reverse 18mer Sequencing Primer Thermo Sequenase Core Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP (RPN 2440)
Macherey-Nagel, Düren	Nucleobond <sup>®</sup> Kit PC100 Nucleobond <sup>®</sup> Kit CB 20 NucleoSpin <sup>®</sup> Extract
Promega, Mannheim	PCR Nucleotide Mix <i>Pfu</i> DNA-Polymerase Restriktionsendonukleasen Ribomax <sup>™</sup> Large Scale RNA Production System-T7 <i>Taq</i> DNA-Polymerase T4-DNA-Ligase Wizard <sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System 1kb DNA Ladder
Qiagen, Hilden	RNase A
Roche Diagnostics, Mannheim	DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II DNA Längenstandards II, Digoxigenin-markiert Klenow
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	Lysozym Pyruvatkinase (Typ III from rabbit muscle, 5000 Units)
Stratagene Europe, Amsterdam	Restriktionsendonukleasen
USB, Cleveland, Ohio, USA	DNA Sequencing Gel Mix Kit

### 2.1.4 Nährmedien

Die Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, jeweils auf 1l Medium. Für Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2% (w/v) Agar zugesetzt. Antibiotika und andere hitzeempfindliche Substanzen wurden erst nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

#### 2.1.4.1 Medien zur Kultivierung von *E.coli*

Tab. 5: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von *E.coli*

Medium	Zusammensetzung		Herstellung
LB-Medium (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)	Trypton	10,0g	Bestandteile in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, auf pH 7,0 ein- stellen, auf 1l auffüllen und autoklavieren.
	Hefeextrakt	5,0g	
	NaCl	10,0g	
NZCYM (Sambrook et al., 1989)	Bacto Casein	10,0g	Bestandteile in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, auf pH 7,0 ein- stellen, auf 1l auffüllen und autoklavieren
	Bacto Casamino Acids	1,0g	
	Hefeextrakt	5,0g	
	NaCl	5,0g	
	MgSO <sub>4</sub>	0,98g	

#### 2.1.4.2 Medien zur Kultivierung von *Bacillus subtilis*

Tab. 6: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von *Bacillus subtilis*

Medium	Zusammensetzung		Herstellung
NB-Medium	Nutrient Broth	8,0g	Bestandteile in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, auf pH 7,2 ein- stellen, auf 1l auffüllen und autoklavieren
	NaCl	4,97g	
DM-Medium	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0g	Bestandteile in 990ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen und auto- klavieren
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0g	
	NaCl	0,1g	
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,1g	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0g	
	nach dem Autoklavieren steril zusetzen: Glucose [40% (w/v)]	10,0ml	

## 2.1.4.3 Medien zur Kultivierung von Streptomyceten

Tab. 7: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von Streptomyceten

Medium	Zusammensetzung	Herstellung
HA-Medium	Hefeextrakt 4,0g Malzextrakt 10,0g Glucose 4,0g nach dem Autoklavieren steril zusetzen: CaCl <sub>2</sub> (1M) 1,0ml	Bestandteile in Leitungswasser lösen, auf pH 7,3 einstellen, auf 1l auffüllen und autoklavieren
TSB-Medium (Hopwood et al., 1985)	Saccharose 100,0g Tryptic soy broth 30,0g Glycin 4,0g	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 1l auffüllen und autoklavieren
S-Medium (modifiziert nach Okanishi et al., 1974)	<u>Lösung A:</u> Soypeptone 4,0g Hefeextrakt 4,0g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *3H <sub>2</sub> O 4,0g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,0g Glycin für <i>S.vir.</i> Tü57: 7,5g für <i>S.liv.</i> TK66: 7,5g für <i>S.frad.</i> Tü2717 10,0g <u>Lösung B:</u> Glucose 10,0g MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 0,5g	Lösung A: mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 800ml auffüllen und autoklavieren; Lösung B: mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 200ml auffüllen und autoklavieren; nach dem Autoklavieren beide Lösungen vereinigen
CRM-Medium	Saccharose 103,0g Tryptic soy broth 20,0g MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O 10,12g Hefeextrakt 10,0g Glycin 7,5g nach dem Autoklavieren steril zusetzen: CaCl <sub>2</sub> (1M) 10,0ml	Bestandteile in Leitungswasser lösen, auf pH 7,0 einstellen, auf 1l auffüllen und autoklavieren
Minimalmedium (Brawner et al., 1985)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6,0g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 6,0g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,0g MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O 1,06g NaCl 2,0g FeCl <sub>3</sub> *7H <sub>2</sub> O 0,002g Nach dem Autoklavieren steril zusetzen: Glucose [40% (w/v)] 1,25ml CaCl <sub>2</sub> (1M) 180µl	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 1l auffüllen und autoklavieren
NL19+-Medium (Avilamycinproduktionsmedium)	Mannit 20,0g Sojamehl (vollfett) 20,0g L-Valin 20mM	mit Leitungswasser ansetzen, pH7,5 einstellen, auf 1l auffüllen und autoklavieren

Medium	Zusammensetzung		Herstellung
NL111/v-Medium (Urdamycinpro- duktionsmedium)	Lab Lemco Powder	20,0g	mit Leitungswasser an- setzen, pH7,2 ein- stellen, auf 1l auffüllen und autoklavieren
	Malzextrakt	100,0g	
	CaCO <sub>3</sub>	10,0g	
2GT-Medium	Glycerin	20,0ml	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 100ml auffüllen und auto- klavieren
	Tween 80	0,1ml	

#### 2.1.4.4 Medien zur Protoplastentransformation von Streptomycceten

Tab. 8: Zusammensetzung der Medien und Lösungen zur Protoplastentransformation von Streptomycceten

Medium	Zusammensetzung		Herstellung
Spurenelement- lösung (Hopwood et al., 1985)	ZnCl <sub>2</sub>	0,04g	Bestandteile in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, auf 1l auffüllen und autoklavieren
	FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,2g	
	CuCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,01g	
	MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,01g	
	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> *10H <sub>2</sub> O	0,01g	
R2YE-Medium (Hopwood et al., 1985)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,01g	Lösung A: mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 500ml auffüllen und autoklavieren; Lösung B: Bestandteile in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, mit NaOH pH 7,4 ein- stellen, auf 500ml auf- füllen und autokla- vieren; nach dem Autokla- vieren Lösung B ver- vollständigen und an- schließend Lösung B vorsichtig zu Lösung A geben
	<u>Lösung A:</u>		
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25g	
	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	10,12g	
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,95g	
	Glucose	10,0g	
	L-Prolin	3,0g	
	Casaminosäuren	0,1g	
	Agar	22,0g	
	<u>Lösung B:</u>		
	Saccharose	103,0g	
	TES-Puffer	5,73g	
	Hefeextrakt	5,0g	
Nach dem Autoklavieren steril zu Lösung B zugeben:			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [0,5% (w/v)]	10,0ml		
Spurenelementlösung (s.o.)	2,0ml		
R3-Weichagar	Saccharose	171,0g	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 860ml auffüllen und auto- klavieren, anschließend die beiden fehlenden Lösungen zugeben
	Glucose	10,0g	
	Pepton	4,0g	
	KCl	0,5g	
	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	8,1g	
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,2g	
	Agar	8,0g	
	Nach dem Autoklavieren steril zusetzen:		
	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> *3H <sub>2</sub> O [0,5% (w/v)]	40,0ml	
TES (250mM, pH 7,2)	100,0ml		

Medium	Zusammensetzung		Herstellung
Soft Nutrient	Nutrient broth	8,0g	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 1l auffüllen und autoklavieren
Agar (SNA) (Hopwood et al., 1985)	Agar	3,0g	

### 2.1.5 Antibiotika

Von den Antibiotika wurden Stammlösungen mit den angegebenen Konzentrationen hergestellt, die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Wässrige Lösungen wurden durch einen Membranfilter (Porengröße  $0,2\mu\text{m}$ ) sterilfiltriert. Die Antibiotika wurden den Medien nach Abkühlen unter eine Temperatur von  $50^{\circ}\text{C}$  steril in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

Tab. 9: Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration in			Lösungsmittel	Hersteller
	Stammlösung [mg/ml]	Medium [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Weichagar [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
Carbenicillin	50	50	-	H <sub>2</sub> O	Roth
Tetracyclin	5	10	-	Ethanol (70%)	Sigma
Chloramphenicol	34	34	-	Ethanol	Merck
Apramycin	100	100	1000	H <sub>2</sub> O	Fluka
Thiostrepton	50	20-50	500	DMSO	Fluka
Erythromycin	25	50	500	Ethanol	Fluka

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

#### 2.1.6.1 Puffer zur Enzymreinigung

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Tab. 10: Puffer zur Enzymreinigung

Puffer	Zusammensetzung	
Lysepuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50mM (pH 8,0)
	NaCl	300mM
	Imidazol	10mM
Waschpuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50mM (pH 8,0)
	NaCl	300mM
	Imidazol	20mM
Elutionspuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50mM (pH 8,0)
	NaCl	300mM
	Imidazol	250mM

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

Die Angaben gelten für die Verwendung der Mini-PROTEAN®II Elektrophorese-Kammer (BIORAD, Cell) und entsprechen den Angaben des Hersteller-Manuals.

Tab. 11: Puffer und Lösungen für die Protein-Gelelektrophorese

Puffer/Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
Sammelgel (4%)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	6,1ml	vor Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung 10min unter Vakuum entgast
	0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5ml	
	10% (w/v) SDS	0,1ml	
	Rotiphorese®Gel 30	1,33ml	
	10% (w/v) APS	0,05ml	
	TEMED	0,01ml	
Trenngel (12%)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,35ml	vor Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung 10min unter Vakuum entgast
	1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5ml	
	10% (w/v) SDS	0,1ml	
	Rotiphorese®Gel 30	4,0ml	
	10% (w/v) APS	0,05ml	
	TEMED	0,005ml	
Probenpuffer (1x)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,8ml	β-Mercaptoethanol wurde erst kurz vor Verwendung des Probenpuffers zugegeben
	0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	1,0ml	
	Glycerin	0,8ml	
	10% (w/v) SDS	1,6ml	
	β-Mercaptoethanol	0,4ml	
	1% (w/v) Bromphenolblau	0,4ml	
5x Laufpuffer (pH 8,3)	Tris	15,0g	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 1l auffüllen; Lagerung bei 4°C; vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen
	Glycin	72,0g	
	SDS	5,0g	
Fixier- und Entfärberlösung	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	45% (v/v)	
	Methanol	45% (v/v)	
	Essigsäure	10% (v/v)	
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blau G250	0,25% (w/v)	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	45% (v/v)	
	Methanol	45% (v/v)	
	Essigsäure	10% (v/v)	

### 2.1.6.3 Lösungen zur Proteinbestimmung

#### Bradford-Stammlösung (Bradford MM, 1976) (5x):

1. 70mg Brilliant Blau R250 in 50ml Ethanol lösen
2. Zugabe von 100ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> [85% (v/v)]
3. Auffüllen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 200ml

Die Bradford-Stammlösung wurde bei 4°C gelagert, vor Gebrauch 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt und über ein Faltenfilter filtriert. Die gebrauchsfertige Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

#### 2.1.6.4 Puffer und Lösungen für Methyltransferase-Assays

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden unter sterilen und RNase-freien Bedingungen mit DEPC-behandeltem, doppelt autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt und bei 4°C gelagert.

Tab. 12: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den rRNA-Methylierungs-Assay

Puffer/Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
RS-Puffer	Tris-HCl	10mM	auf pH 7,6 einstellen; DTT wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben
	MgSO <sub>4</sub>	10mM	
	NH <sub>4</sub> Cl	50mM	
	DTT	10mM	
RSG-Puffer	RS-Puffer mit 20% (v/v) Glycerin		
Inkubationspuffer (10x)	Hepes	250mM	mit KOH auf pH 7,6 einstellen
	MgCl <sub>2</sub>	50mM	
	NH <sub>4</sub> Cl	250mM	
TE-Puffer pH 7,6	Tris-HCl	10mM	auf pH 7,6 einstellen
	EDTA	1mM	
3M Natrium-acetat-Lösung pH 5,2	Natriumacetat (5M)	60,0ml	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 100ml auffüllen
	Eisessig	11,5ml	
M-Puffer	Mops	10mM	mit KOH auf pH 7,0 einstellen
	KCl	100mM	
	MgSO <sub>4</sub>	5mM	

#### 2.1.6.5 Puffer für die Isolierung von 70S Ribosomen bzw. der 30S und 50S Untereinheiten aus Streptomyces

Tab.13: Puffer zur Isolierung von Ribosomen und Ribosomenuntereinheiten aus Streptomyces. Die Puffer wurden vor Gebrauch frisch mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
R-Puffer	Hepes/KOH pH 7,5	25mM	DTT wurde jeweils erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.
	MgCl <sub>2</sub>	10mM	
	NH <sub>4</sub> Cl	50mM	
	DTT	3mM	
HS-Puffer	Hepes/KOH pH 7,5	25mM	
	MgCl <sub>2</sub>	30mM	
	NH <sub>4</sub> Cl	1M	
	Saccharose	40% (w/v)	
	DTT	3mM	

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
S-Puffer	Hepes/KOH pH 7,5 MgCl <sub>2</sub> KCl DTT	25mM 1mM 100mM 3mM

#### 2.1.6.6 Puffer zur in-vitro-Translation

Tab. 14: Puffer für die in-vitro-Translation. Alle Puffer wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
HRS-Puffer	Hepes/KOH pH 7,5 MgCl <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> Cl DTT	50mM 10mM 60mM 3mM DTT wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.
Hepes/KOH pH 7,5 (1M)	Hepes	59,58g Hepes in 100-200ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, pH 7,5 mit KOH einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 250ml auffüllen
Lösung I	HEPES/KOH pH 7,5 KCl MgCl <sub>2</sub>	200mM 500mM 85mM von den Bestandteilen jeweils Stammlösungen herstellen und erst nach dem Autoklavieren vereinigen
Lösung II	Lösung I (s.o.) ATP (100mM) GTP (10mM) PEP (75mM) Pyruvat-Kinase (4,3U/μl) H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,0μl 0,75μl 1,05μl 3,0μl 0,12μl 2,83μl ATP, GTP und PEP jeweils in 50mM HEPES-KOH pH 7,5 lösen, die Pyruvat-Kinase in 50mM HEPES-KOH pH 7,5 mit 20% (v/v) Glycerin
Lösung III	Poly(U) (10mg/ml) L-[2,3,4,5,6- <sup>3</sup> H]phenylalanin (1mCi/ml) L-Phenylalanin (0,1nM)	1,5μl 0,8μl 1,5μl Poly(U) in 50mM HEPES/KOH pH 7,5 lösen, L-Phenylalanin in HRS-Puffer
Lösung IV	Lösung II Lösung III tRNA <sup>Phe</sup> (20μg/μl)	10,75μl 3,8μl 1,05μl



### 2.1.6.7 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tab. 15: Puffer für die DNA-Gelelektrophorese. Die Puffer wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt und autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
50x TAE	Tris EDTA	2M 0,05M mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen
Ladepuffer	Saccharose Indikatorfarbstoff (Bromphenolblau oder Xylen Cyanol FF)	40% (w/v) 0,25% (w/v) Lagerung bei 4°C
Ethidiumbromid- Färbebad für Agarosegele	Stammlösung Färbebad	10,0 mg/ml 1 µg/ml
TBE-Puffer (für Sequenziergele)	Tris Borsäure EDTA	90mM 90mM 2mM auf pH 8,0 einstellen

### 2.1.6.8 Lösungen zur Transformation und Selektion von *E.coli*

Tab. 16: Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Lösung	Konzentration	Herstellung
IPTG-Lösung	0,2M	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen und sterilfiltrieren (0,2µm Membranfilter); 20µl pro Platte ausplattieren
X-Gal-Lösung	100 mg/ml	in DMF lösen, autosteril; 20µl pro Platte ausplattieren

### 2.1.6.9 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tab. 17: Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden und genomischer DNA aus *E.coli* und Streptomycceten. Die Puffer und Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt und autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
TSE-Puffer	Saccharose Tris-HCl EDTA	10,3% 25mM 25mM Saccharoselösung getrennt autoklavieren; bei Tris/EDTA-Lösung pH 8,0 einstellen; nach dem Autoklavieren beide Lösungen mischen
Natriumacetatlösung (3M, pH 5,2)	Natriumacetat (5M) Eisessig	60,0ml 11,5ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 100ml auffüllen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
Lösung L1	Glucose Tris-HCl EDTA	50mM 25mM 10mM	auf pH 8,0 einstellen
Lösung L2	NaOH SDS	0,4N 2% (w/v)	NaOH- und SDS-Lösung getrennt ansetzen und vor Gebrauch frisch 1:1 mischen; nicht auto-klavieren
Kaliumacetatlösung (3M, pH 5,2)	Kaliumacetat (5M) Eisessig	60,0ml 11,5ml	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 100ml auffüllen
Puffer P1	Tris-HCl EDTA	30mM 3mM	pH 8,0 einstellen
Lösung P2	NaOH SDS	0,3N 1,8%	NaOH- und SDS-Lösung getrennt ansetzen und vor Gebrauch frisch 1:1 mischen; nicht auto-klavieren
Lösung P3	= 3M Natriumacetatlösung pH 5,2		
TE-Puffer	Tris-HCl EDTA	10mM 1mM	für genomische DNA pH 8,0 einstellen, für Plasmide pH 7,6

#### 2.1.6.10 Puffer und Lösungen für den Southern-Blot

Tab. 18: Puffer und Lösungen für den Southern-Blot. Die Puffer und Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt. Die Angaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf 1l.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung		Herstellung
Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure NaCl	11,6g 8,77g	Bestandteile in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, mit NaOH pH 7,5 einstellen, auf 1l auffüllen und auto-klavieren
Blocking-Puffer	Magermilchpulver	3,0g	mit Maleinsäure-Puffer auf 100ml auffüllen
Detektions-Puffer	Tris NaCl (5M)	12,1g 20,0ml	Bestandteile in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, mit HCl pH 9,5 einstellen, auf 1l auffüllen und auto-klavieren
Depurinierungs-lösung	HCl	250mM	

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Herstellung	
Denaturierungs- lösung	NaOH	20,0g	
	NaCl	87,66g	
Neutralisierungs- lösung	Tris	60,55g	Bestandteile in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen, mit HCl pH 7,5 ein- stellen, auf 1l auf- füllen und auto- klavieren
	NaCl	175,32g	
20x SSC	tri-Natrium-Citrat*2H <sub>2</sub> O	88,23g	pH 7,0 einstellen
	NaCl	175,32g	
Prähybridisierungs- Puffer	20x SSC	25,0ml	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 100ml auffüllen; immer frisch an- setzen
	SDS [10% (w/v)]	0,2ml	
	N-Lauroylsarkosin [1% (w/v)]	10,0ml	
	Magermilchpulver	3,0g	
Hybridisierungs- Puffer	20x SSC	25,0ml	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 100ml auffüllen; immer frisch an- setzen
	SDS [10% (w/v)]	0,2ml	
	N-Lauroylsarkosin [1% (w/v)]	10,0ml	
	Magermilchpulver	1,5g	
2x Waschpuffer	20x SSC	10,0ml	frisch ansetzen
	SDS [10% (w/v)]	1,0ml	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	89,0ml	
0,1x Waschpuffer	20x SSC	0,5ml	frisch ansetzen
	SDS [10% (w/v)]	1,0ml	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	98,5ml	
Tween-Waschpuffer	Tween <sup>®</sup> 20	0,6ml	frisch ansetzen
	Maleinsäure-Puffer	199,4ml	
Antikörper-Lösung	Blocking-Puffer	50,0ml	frisch ansetzen
	Anti-DIG-AP-Konjugat	5µl	

#### 2.1.6.11 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomycceten

Die Einzelkomponenten der Puffer wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt, getrennt autoklaviert und steril zusammengegeben. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -20°C.

Tab. 19: Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomycceten

Puffer	Zusammensetzung	
Protoplastierungspuffer (P-Puffer) (Thompson et al., 1982)	Saccharoselösung [12% (w/v)]	85,5ml
	Spurenelementlösung (s. Tab. 8)	0,2ml
	TES (0,25M, pH 7,2)	10ml
	MgCl <sub>2</sub> (1M)	1,0ml
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (140mM)	1,0ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (40mM)	1,0ml
	CaCl <sub>2</sub> (250mM)	1,0ml

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

## 2.2 Bakterienstämme und Plasmide

### 2.2.1 Bakterienstämme

Tab. 20: Bakterienstämme

<i>E.coli</i>	relevante Eigenschaften	Referenz
XL1 Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac<sup>f</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene; Bullock et al., 1987
ET 12567	<i>F dam<sup>-</sup>13::Tn9 dcm<sup>-</sup>6 hsdM hsdR zjj 202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara<sup>-</sup>14 lacY1 xyl15 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 his64 tsx78 mtll glnV44</i>	MacNeil et al., 1992
BL21(DE3)pLysS	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>, m<sub>B</sub>-) gal dcm (DE3)pLysS(Cam<sup>R</sup>)</i>	Invitrogen
<b>Bacillus</b>		
<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) COHN ATCC6051	Avilamycin-sensitiver Testkeim	American Type Culture Collection (18th edition, 1992)
<b>Streptomyces</b>		
<i>S. viridochromogenes</i> Tü57	Wildtyp, Avilamycin-Produzent	Hütter, 1962
<i>S. fradiae</i> Tü2717	Wildtyp, Urdamycin-Produzent	Hütter, 1962
<i>S. lividans</i> TK66	Wirtsstamm zur heterologen Expression, Avilamycin-sensitiv	Hopwood et al., 1985
<b>Staphylococcus</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Oxacillin-sensitiv	American Type Culture Collection (18th edition, 1992)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	β-Lactam-sensitiv	American Type Culture Collection (18th edition, 1992)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	Penicillinase-bildend	American Type Culture Collection (18th edition, 1992)
<i>Staphylococcus aureus</i> Q48-1.2.1	Chinolon-resistent	

<b>Enterococcus</b>		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Glycopeptid-sensitiv	American Type Culture Collection (18th edition, 1992)
<i>Enterococcus faecium</i> H-7-6	Klinikisolat: resistent gegen: Chinolone, Nalidixinsäure, Penicillin, Ampicillin, Gentamicin, Cotrimoxazol, Azithromycin, Amoxicillin/Clavulansäure, Clarithromycin und Glykopeptide	
<b>Streptococcus</b>		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Makrolid- und Penicillin-sensitiv	American Type Culture Collection (18th edition, 1992)

## 2.2.2 Vektoren, Plasmide und Cosmide

Tab. 21: Vektoren, Plasmide und Cosmide

Vektor, Plasmid, Cosmid	Beschreibung	Referenz
pBluescript SK-	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>lacZ'</i> ( $\alpha$ -Komplementation), f1(-)-origin, ColE1-origin	Stratagene; Short et al., 1988
pBC SK-	<i>Cam<sup>r</sup></i> , <i>lacZ'</i> ( $\alpha$ -Komplementation), f1(-)-origin, ColE1-origin	Stratagene
Litmus™28/Litmus™38	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>lacZ'</i> ( $\alpha$ -Komplementation), M13-origin, ColE1-origin	New England Biolabs; Evans et al., 1995
pMun2 (=pMunII)	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>lacZ'</i> ( $\alpha$ -Komplementation), f1(-)-origin, ColE1-origin	Trefzer et al., 2000
pBSMunI (=pMunI)	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>lacZ'</i> ( $\alpha$ -Komplementation), f1(-)-origin, ColE1-origin	Trefzer et al., 2000
pSP1	pT7/T3- $\alpha$ 19 mit <i>ermE</i> -Gen; als Inaktivierungsvektor in <i>S.vir</i> .Tü57 einsetzbar	Pelzer et al., 1997
pSET152	<i>Am<sup>R</sup></i> , <i>oriT</i> , <i>int<sup>ΦC31</sup></i> ; als Integrationsvektor in <i>S.vir</i> .Tü57 einsetzbar	Bierman et al., 1992
pSET-1cerm	pSET152 mit <i>ermE*</i> -Promoter; enthält <i>urdGT1c</i>	Hoffmeister et al., 2001
pRSETb	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>E.coli</i> -Überexpressionsvektor, T7-Promoter, f1(-)-origin, ColE1-origin	Invitrogen; Schoepfer, 1993
pUWL201	Streptomyceten- <i>E.coli</i> -Shuttle Vektor, <i>bla<sup>r</sup></i> , <i>tsr<sup>r</sup></i> , konstitutiver <i>ermE</i> up-Promoter, ColE1-origin	U.Wehmeier, persönliche Mitteilung
pOJ446	<i>Am<sup>R</sup></i> , ( <i>cos</i> )3 $\lambda$ , <i>rep<sup>SCP2*</sup></i> ; abgeleitet von pKC505	Bierman et al., 1992
pKC505	shuttle cosmid vector, <i>Am<sup>R</sup></i> , ( <i>cos</i> )3 $\lambda$ , <i>rep<sup>SCP2</sup></i>	Richardson et al., 1987

P2, H4, F4, E1A, P4, P5	Cosmide, hergestellt aus dem Genom von <i>S.viridochromogenes</i> Tü57, kloniert in den Cosmidvektor pOJ446	Gaisser (Dissertationsschrift, 1998)
6H18, 1K16, 2B17, 2H12, 3M5, 3P4, 3J3, 4K10, 5L13, 6P4, 8K4	Cosmide, hergestellt aus dem Genom von <i>S.viridochromogenes</i> Tü57, kloniert in den Cosmidvektor pKC505	vorliegende Arbeit
pCW1	Plasmid, das 23S rDNA enthält; einsetzbar zur in-vitro-Transkription	Weitzmann et al., 1990
pWK1	Plasmid, das 16S rDNA enthält; einsetzbar zur in-vitro-Transkription	Krzyzosiak et al., 1988

Tab. 22: Wichtige eigene Plasmid-Konstrukte

Konstrukt	Beschreibung
pP2S2	3,7kb <i>SacI</i> -Fragment aus Cosmid P2 in pBluescript SK-; enthält <i>aviP</i> , <i>aviQ3</i> und Teile von <i>aviH</i> und <i>aviO2</i>
pP2S5	2,9kb <i>SacI</i> -Fragment aus Cosmid P2 in pBluescript SK-; enthält den zweiten Teil von <i>aviO2</i> , einen Teil von <i>aviB2</i> und <i>aviGT3</i> und <i>aviGT4</i> vollständig
pP2P13	11kb <i>PstI</i> -Fragment aus Cosmid P2 in pBluescript SK-; enthält <i>aviGT3</i> , <i>aviGT4</i> , <i>aviO2</i> , <i>aviP</i> , <i>aviQ3</i> , <i>aviH</i> , <i>aviX13</i> , <i>aviG4</i> und einen Teil von <i>aviE3</i>
pP13ERe	1,9kb Insert in pBluescript SK-; durch <i>SacI</i> -Restriktion und <i>EcoRI</i> -Restriktion mit jeweils anschließender Religation aus pP2P13 hergestellt
pP135K3	2,9kb Insert in pBluescript SK-; durch Restriktion mit <i>SpeI/EcoRV</i> , Behandlung mit Klenow Fragment und anschließende Religation aus pP2P13 hergestellt
pP13B1	2,8kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pP2P13 in pBluescript SK-
pP13B24	2,4kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pP2P13 in pBluescript SK-
pP13B28	0,2kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pP2P13 in pBluescript SK-
pP13B34	3,4kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pP2P13 in pBluescript SK-
pBSK-4E5	5kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus Cosmid 3M5 in pBluescript SK-; enthält Rest von <i>aviE3</i> und außerdem <i>aviS</i> , <i>aviT</i> und einen Teil von <i>aviZ3</i>
p6H18B11	6,5kb <i>BamHI</i> -Fragment aus Cosmid 6H18 in pBluescript SK-
p6H18B28	3kb <i>BamHI</i> -Fragment aus Cosmid 6H18 in pBluescript SK-; enthält Rest von <i>aviZ3</i> und außerdem <i>aviZ2</i> und einen Teil von <i>aviX14</i>
pLit38-aviG1	<i>aviG1</i> als PCR-Produkt über die Restriktionsschnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SphI</i> in den Vektor pLitmus 38 kloniert
pMIK1	Inaktivierungskonstrukt für Inaktivierung von <i>aviG1</i> ; 285bp in-frame Deletion; 2,2kb <i>SacI</i> -Fragment in pSP1
pMIKG2	Inaktivierungskonstrukt für Inaktivierung von <i>aviG2</i> ; Frameshift-Mutation ( <i>SphI</i> ); 1,9kb <i>XbaI/EcoRI</i> -Fragment in pSP1
pMIKG3	Inaktivierungskonstrukt für Inaktivierung von <i>aviG3</i> ; Frameshift-Mutation ( <i>PspAI</i> ); 3kb <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pSP1
pMIKG4E3	Inaktivierungskonstrukt für Inaktivierung von <i>aviG4</i> ; Frameshift-Mutation ( <i>NcoI</i> ); 1,9kb <i>SacI/KpnI</i> -Fragment in pSP1

pMIKG5	Inaktivierungskonstrukt für Inaktivierung von <i>aviG5</i> ; Frameshift-Mutation ( <i>XhoI</i> ) → Deletion eines 50bp großen Fragments; ca. 3,2kb <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment in pSP1
pLit28-Rb	<i>aviRb</i> als PCR-Produkt (973bp) über die Restriktionsschnittstellen <i>BglII</i> und <i>EcoRI</i> in den Vektor pLitmus 38 kloniert; enthält natürliche RBS
pMun2-Rb	<i>aviRb</i> subkloniert aus pLit28-Rb in pMun2 über die Restriktionsschnittstellen <i>BglII</i> und <i>XbaI</i>
pMun2-Ra	<i>aviRa</i> kloniert als <i>BamHI/EcoRI</i> -Fragment (836bp) in <i>BglII</i> und <i>EcoRI</i> des Vektors pMun2
pMunI-ABC	<i>aviABC1+aviABC2</i> als PCR-Produkt (1,8kb) über die Restriktionsschnittstellen <i>MunI</i> und <i>EcoRI</i> in <i>EcoRI</i> des Vektors pMunI kloniert
pMun2-RbRa	<i>aviRa</i> und <i>aviRb</i> in pMun2
pMun2-RbRaABC	<i>aviRa</i> , <i>aviRb</i> und <i>aviABC1+aviABC2</i> in pMun2
pUWL-Ra	<i>aviRa</i> subkloniert aus pMun2-Ra in pUWL201 über die Restriktionsschnittstellen <i>HindIII</i> und <i>XbaI</i>
pUWL-Rb	<i>aviRb</i> subkloniert aus pMun2-Rb in pUWL201 über <i>MunI/XbaI</i> in <i>EcoRI/XbaI</i>
pUWL-ABC	<i>aviABC1+aviABC2</i> subkloniert aus pMunI-ABC in pUWL201 über die Restriktionsschnittstellen <i>HindIII</i> und <i>XbaI</i>
pUWL-RbRa	<i>aviRa+aviRb</i> subkloniert aus pMun2-RbRa in pUWL201 über die Restriktionsschnittstellen <i>HindIII</i> und <i>XbaI</i>
pUWL-RbRaABC	<i>aviRa+aviRb+aviABC1+aviABC2</i> subkloniert aus pMun2-RbRaABC in pUWL201 über die Restriktionsschnittstellen <i>HindIII</i> und <i>XbaI</i>
pRSETb-Ra	Überexpressionskonstrukt für <i>aviRa</i> in <i>E.coli</i> (s. Dissertationsschrift S.Gaisser)
pRSETb-Ra-Histag	pRSETb-Ra nach Entfernung eines ca. 100bp großen <i>NdeI</i> -Fragments, das unter anderem für den 6xHis-Tag codiert; d.h. dieses Konstrukt ermöglicht Überexpression ohne His-Tag
pRSETb-Rb	Überexpressionskonstrukt für <i>aviRb</i> in <i>E.coli</i>
pRSETb-Rb20-Histag	pRSETb-Rb nach Entfernung eines ca. 100bp großen <i>NdeI</i> -Fragments, das unter anderem für den 6xHis-Tag codiert; d.h. dieses Konstrukt ermöglicht Überexpression ohne His-Tag
pSET-1cermA	<i>ermE*</i> -Promotor und <i>urdGT1c</i> im Integrationsvektor pSET152; Orientierung ermöglicht einfachen Austausch von <i>urdGT1c</i> gegen beliebige andere Gene über die Restriktionsschnittstellen <i>MunI</i> und <i>XbaI</i>
pSET-G1erm	Komplementierungskonstrukt für Mutante <i>S.viridochromogenes</i> GW1; <i>aviG1</i> hinter <i>ermE*</i> -Promoter in pSET152
pSET-G4erm	Komplementierungskonstrukt für Mutante <i>S.viridochromogenes</i> GW4; <i>aviG4</i> hinter <i>ermE*</i> -Promoter in pSET152

## 2.3 Kulturbedingungen

### 2.3.1 Anzucht und Kultivierung von *E.coli*

Generell erfolgte die Anzucht von *E.coli* in LB-Medium (s. Tab. 5) in Erlenmeyerkolben mit Schikane über Nacht (16-18h) bei 37°C auf einem Rundschtüttler mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 170rpm. Zur Transformation und zum Erhalt von Einzelkolonien wurde *E.coli* auf festem LB-Medium ausplattiert. Für die Proteinüberexpression wurde *E.coli* in NZCYM-Medium (s. Tab. 5) in Erlenmeyerkolben mit Schikane bei einer Inkubationstemperatur von 37°C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 170rpm angezogen. Zur Selektion wurde den Medien das entsprechende Antibiotikum (s. Tab. 9) zugesetzt.

### 2.3.2 Anzucht und Kultivierung von Streptomyceten

#### 2.3.2.1 Anzucht in Fest- und Flüssigmedien

Zur Stammhaltung wurden *S.viridochromogenes* Tü57, *S.lividans* TK66, *S.fradiae* Tü2717 und alle Mutanten bzw. Transformanden entweder in 100ml HA-Flüssigmedium (s. Tab. 7) im 300ml-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen und Spirale auf dem Rundschtüttler bei 180rpm oder auf HA-Festmedium (s. Tab. 7) kultiviert. Die Inkubationstemperatur betrug 28°C, ausgenommen *S.viridochromogenes* Tü57 und *S.viridochromogenes* Tü57-Mutanten bzw. –Transformanden. In diesen Fällen erfolgte die Kultivierung bei 37°C. Zur Isolierung von DNA und zur Herstellung von Protoplasten wurden *S.viridochromogenes* Tü57 und *S.viridochromogenes*-Mutanten bzw. –Transformanden, *S.lividans* TK66 und *S.lividans* TK66-Transformanden in 100ml S-Medium (s. Tab. 7) im 300ml-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen und Spirale bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 180rpm angezogen. Die Inkubationstemperatur betrug für alle *S.viridochromogenes*-Stämme wiederum 37°C, für alle *S.lividans*-Stämme 28°C. *S.fradiae* Tü2717 und *S.fradiae* Tü2717-Transformanden wurden für diese Zwecke jeweils in 50ml CRM-Medium (s. Tab. 7) im 300ml-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen bei 175rpm und 28°C inkubiert. Zur Produktion von Avilamycin bzw. Avilamycin-Derivaten wurden *S.viridochromogenes* Tü57 bzw. *S.viridochromogenes* Tü57-Mutanten und –Transformanden zunächst in HA-Flüssigmedium wie oben beschrieben kultiviert (HA-Vorkultur), von dieser Kultur ausgehend 100ml NL19+-Medium (s. Tab. 7) im 500ml-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane beimpft (NL19+-Vorkultur), weiterhin bei 37°C und 160rpm ca. 24h inkubiert, und anschließend dann die Hauptkultur (100ml NL19+-Medium im 500ml-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane) mit jeweils 1ml der NL19+-Vorkultur angeimpft. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte bei 28°C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 160rpm. Die Anzucht von *S.fradiae* Tü2717 und *S.fradiae* Tü2717-Transformanden zur Produktion von Urdamycin bzw. Urdamycin-Derivaten erfolgte in 100ml NL111/v-Medium (s. Tab. 7) im 500ml-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane, bei 28°C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 175rpm.

Zur Selektion wurde den Medien jeweils das entsprechende Antibiotikum (s. Tab. 9) zugesetzt.

#### 2.3.2.2 Herstellung von Sporensuspensionen und Glycerindauerkulturen

Zur Konservierung der verschiedenen Stämme und Mutanten über längere Zeit wurden Sporensuspensionen und Glycerindauerkulturen hergestellt. Zum Anlegen einer Sporensuspension wurden unter sterilen Bedingungen 9ml 2GT-Medium (s. Tab. 7) auf eine gut bewachsene und durchsporulierte Platte gegeben, die Sporen mit Hilfe einer



Impföse abgekratzt und in ein steriles Falcontube überführt. Durch einminütiges Vortexen bei höchster Stufe wurden die Sporen vom Myzel gelöst. Eine Trennung von Sporen und Myzelresten wurde durch Filtration durch sterile Watte erreicht. Das Filtrat wurde zentrifugiert (2100 x g, 6min, 4°C) und das entstandene Pellet in 1-3ml 20%iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Für die Herstellung von Glycerindauerkulturen wurde 1ml einer gut gewachsenen Flüssigkultur abzentrifugiert (4300 x g, 10min, 4°C), das Zellpellet zweimal mit 1ml 15%iger Glycerinlösung (v/v) gewaschen, pelletiert und anschließend in 1ml 15%iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

## 2.4 Methoden der Molekularbiologie

### 2.4.1 CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation von *E.coli*

(verändert nach Sambrook et al., 1989)

#### 2.4.1.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen

5ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie *E.coli* beimpft und über Nacht bei 37°C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 170rpm auf dem Rundschüttler angezogen. 2ml dieser Vorkultur dienten als Inokulum für 100ml LB-Medium, das bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 unter den angegebenen Bedingungen weiterinkubiert wurde. Nach Zentrifugation (2750 x g, 10min, 4°C) wurde das Zellpellet in 30ml einer eisgekühlten 0,1M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet vorsichtig in 30ml einer eisgekühlten 0,1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2100 x g, 10min, 4°C) wurden die Zellen vorsichtig in 3-5ml eisgekühlter 0,1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15% Glycerin (w/v) resuspendiert und in Aliquots von 120µl bei -70°C gelagert.

#### 2.4.1.2 CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation von *E.coli* und Blau-Weiß-Selektion

Pro Transformationsansatz wurden 120µl CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E.coli*-Zellen (s. 2.4.1.1) mit 2-12µl der einzubringenden DNA versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einer 2 ½ -minütigen Hitzeschockbehandlung bei 42°C unterworfen und unmittelbar darauf 5min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurde 1ml LB-Medium steril zum Ansatz zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. 100µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Nach kurzer Zentrifugation des verbleibenden Ansatzes (960 x g, 3min, 4°C), wurde das Pellet in einem Tropfen Überstand resuspendiert und auf einer weiteren LB-Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden 14-16h bei 37°C inkubiert.

Bei Transformationen mit Vektoren, die das lacZ'-Gen zur α-Komplementation der β-Galactosidase enthielten, wurde eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide durchgeführt. Während der 60-minütigen Regenerationsphase wurden die antibiotikahaltigen LB-Agarplatten mit einem Gemisch aus 20µl X-Gal-Lösung (s. Tab. 16), 20µl IPTG-Lösung (s. Tab. 16) und 60µl H<sub>2</sub>O (steril) überschichtet und solange offen unter der Sterilbank stehengelassen, bis das DMF verdampft war. Die Transformationsansätze wurden anschließend wie oben beschrieben ausplattiert und bebrütet.

## 2.4.2 Protoplastierung von Streptomyceten

### *S. fradiae* Tü2717:

2x50ml einer ca. 42h alten, in CRM-Medium (s. Tab. 7) gewachsenen Kultur (s. 2.3.2.1) wurden 10min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert, die resultierenden Zellpellets zweimal mit je 20ml 10,3%iger (w/v) Saccharoselösung gewaschen und anschließend in jeweils 10ml Protoplastierungspuffer (P-Puffer) (s. Tab. 19) mit 2mg/ml Lysozym aufgenommen und 30-50min bei 37°C unter sanftem Schütteln inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Verlauf der Protoplastierung in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert. Nach ausreichender Protoplastenbildung wurde die Reaktion durch Abkühlen im Eiswasserbad abgestoppt und die Protoplasten durch Filtration über sterile Quarzwolle vom verbliebenen Myzel abgetrennt. Nach Zentrifugation (500 x g, 10min, 4°C) wurden die Protoplasten vorsichtig in jeweils 1ml eiskaltem P-Puffer resuspendiert und in Aliquots von 100µl in einem Eisbad bei -70°C eingefroren und gelagert oder sofort zur Transformation eingesetzt.

### *S. lividans* TK66:

100ml S-Medium mit 0,75% Glycin (s. Tab. 7) wurden mit 10µl einer dichten Sporensuspension von *S. lividans* TK66 angeimpft und bei 28°C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 170rpm kultiviert (s. 2.3.2.1). Nach ca. 48h wurde die Hauptkultur (100ml S-Medium mit 0,75% Glycin) mit 1ml dieser Vorkultur (homogenisiert mit Hilfe einer Insulinspritze) angeimpft und ebenfalls ca. 48h bei 28°C und 170rpm inkubiert. Für die Protoplastierung wurde die Kultur geteilt und abzentrifugiert (2790 x g, 10min, 4°C). Jedes der beiden erhaltenen Zellpellets wurde in 15ml eiskaltem P-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in jeweils 10ml P-Puffer (s. Tab. 19) mit 2mg/ml Lysozym aufgenommen und bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Protoplastierungsvorgang wurde in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach ca. 45-60min wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 15ml eiskaltem P-Puffer, vorsichtige Durchmischung und kurze Inkubation im Eiswasserbad abgestoppt. Anschließend wurden die beiden Ansätze über sterile Quarzwolle filtriert, um die Protoplasten von den Myzelresten abzutrennen. Nach Zentrifugation des Filtrats (1000 x g, 10min, 4°C) wurden die Protoplasten vorsichtig in jeweils 0,75-1ml eiskaltem P-Puffer resuspendiert und in 100µl Aliquots im Eisbad bei -70°C eingefroren bzw. sofort zur Transformation verwendet.

### *S. viridochromogenes* Tü57 und *S. viridochromogenes* Tü57-Mutanten:

Das folgende Protokoll beruht auf den in der Diplomarbeit von A. Trefzer (Trefzer, 1997) beschriebenen Versuchsergebnissen. Einige Schritte wurden jedoch leicht abgewandelt.

100ml S-Medium mit 0,75% Glycin (s. Tab. 7) wurden mit 10µl einer Sporensuspension (ca.  $2,3 \times 10^8$  Sporen/ml) angeimpft und bei 37°C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 180rpm kultiviert (s. 2.3.2.1). Nach ca. 36h wurde die Kultur in 2x50ml aufgeteilt und abzentrifugiert (2790 x g, 10min, 4°C). Die erhaltenen Pellets wurden in jeweils 15ml eiskaltem P-Puffer (s. Tab. 19) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in jeweils 10-15ml P-Puffer mit 2mg/ml Lysozym aufgenommen und unter sanftem Schütteln bei 29°C inkubiert. Dabei wurde das Fortschreiten der Protoplastierung in gleichmäßigen Abständen unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach etwa 45min waren in der Regel ausreichend viele Protoplasten vorhanden, so dass die Reaktion durch Zugabe von jeweils 15ml eiskaltem P-Puffer und Abkühlen im Eiswasserbad abgestoppt wurde. Zur Abtrennung der Protoplasten vom verbliebenen Myzel wurden die Ansätze über sterile Watte filtriert und der Durchlauf bei 1000 x g und

4°C 10min zentrifugiert. Die resultierenden Pellets wurden vorsichtig in 0,75-1ml eiskaltem P-Puffer resuspendiert und in der Regel sofort zur Transformation eingesetzt.

Um den Erfolg der Protoplastierung zu überprüfen, wurden 2 x 100µl der jeweiligen Protoplastensuspension abzentrifugiert und die Pellets vorsichtig in jeweils 350µl P-Puffer bzw. 350µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert und anschließend auf eine vorgewärmte R2YE-Platte ausgestrichen. Die in Puffer resuspendierten Protoplasten sollten sich regenerieren und auf der R2YE-Platte innerhalb weniger Tage als dichter Rasen sichtbar werden. Die in Wasser resuspendierten Protoplasten zerplatzen aufgrund des im Vergleich zu destilliertem Wasser höheren osmotischen Drucks innerhalb der Zelle, so dass auf dieser R2YE-Platte keine bzw. nur sehr wenige Kolonien wachsen sollten. War dies der Fall, so konnte davon ausgegangen werden, dass es sich in der Suspension tatsächlich um Protoplasten und nicht um Myzelreste handelte.

### 2.4.3 Transformation von Streptomyceten

Es wurde die Methode der Polyethylenglykol-vermittelten Protoplastentransformation nach Hopwood et al. (1985) gewählt. Allerdings wurde das Protokoll abhängig von dem jeweils zu transformierenden Streptomycetenstamm leicht verändert. Sofern möglich wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt.

Bei den Plasmid-Konstrukten zur Transformation von *S.fradiae* Tü2717 und *S.lividans* TK66 wurde der Expressionsvektor pUWL201 (s. Tab. 21) verwendet, wodurch eine Selektion mit Thiostrepton möglich war. Bei der Transformation des *S.viridochromogenes* Tü57 und der *S.viridochromogenes* Tü57-Mutanten war das zur Selektion benötigte Antibiotikum davon abhängig, ob eine Inaktivierung (pSP1 als Vektor (s. Tab. 21) → Erythromycin als Selektionsmarker) oder eine Expression (pSET152 als Vektor (s. Tab. 21) → Apramycin als Selektionsmarker) durchgeführt wurde.

Zur Transformation wurde jeweils eine möglichst konzentrierte Protoplastensuspension eingesetzt. Als Anhaltspunkt diente die Protoplastierungskontrolle (s.o.). Wuchsen die in P-Puffer resuspendierten Protoplasten nach ihrer Regeneration auf der R2YE-Platte in einem dichten Rasen und nicht als Einzelkolonien, so war die Konzentration der Suspension für eine Transformation ausreichend hoch.

#### *S.fradiae* Tü2717:

Es wurde aus *E.coli* ET12567 isolierte DNA verwendet. 100µl Protoplastensuspension wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 100µl eiskaltem P-Puffer verdünnt. Nach Zugabe von 5µg DNA in einem Volumen von maximal 12µl wurde der Ansatz unmittelbar mit 500µl eiskaltem Transformationspuffer (T-Puffer) (s. Tab. 19) versetzt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Der Transformationsansatz wurde je zur Hälfte auf zwei vorgewärmte R2YE-Platten ausplattiert und 14h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden bei Transformationen mit auf pUWL201 basierenden Konstrukten die Platten zur Selektion mit Thiostrepton (30µl Thiostrepton-Stammlösung (50mg/ml) (s. Tab. 9) + 200µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) überschichtet und weitere 3-4 Tage bei 28°C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation wurden die Kolonien gepickt und auf Thiostrepton-haltige HA-Platten (50µg/ml) ausgestrichen.

### *S. lividans* TK66:

100µl frische Protoplastensuspension wurden mit 100µl eiskaltem P-Puffer (s. Tab. 19) verdünnt. Nach Zugabe von 2-5µg DNA in einem Volumen von maximal 12µl wurde der Ansatz mit 500µl eiskaltem Transformationspuffer (T-Puffer) (s. Tab. 19) versetzt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt und 1min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz je zur Hälfte auf zwei vorgewärmte R2YE-Platten ausplattiert und 14h bei 28°C inkubiert. Danach wurden die Platten (bei Transformationen unter Verwendung von pUWL201 als Vektor) mit jeweils 3ml Thiostrepton-haltigem (500µg/ml) Soft Nutrient Agar (SNA) (s. Tab. 8) überschichtet und weitere vier Tage bei 28°C inkubiert. Im Falle einer erfolgreichen Transformation wurden die gewachsenen Klone gepickt und zur Überprüfung auf Thiostrepton-haltige HA-Platten (50µg/ml) ausgestrichen.

### *S. viridochromogenes* Tü57 und *S. viridochromogenes* Tü57-Mutanten:

Die Transformation erfolgte, von ein paar kleinen Änderungen abgesehen, nach dem in der Diplomarbeit von A. Trefzer (Trefzer, 1997) beschriebenen Protokoll.

Für die Transformation wurde ausschließlich aus *E. coli* ET12567 isolierte DNA eingesetzt. Zur Durchführung von Geninaktivierungen wurde die DNA vor der Transformation durch alkalische Denaturierung in eine einzelsträngige Form gebracht, um die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination zu erhöhen. 15-20µg einzel- bzw. doppelsträngige DNA in einem Volumen von maximal 15µl wurden vorgelegt, 200µl frische Protoplastensuspension und 500µl eiskalter Transformationspuffer (T-Puffer) (s. Tab. 19) zugegeben, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und 1min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde gleichmäßig auf drei vorgewärmte R2YE-Platten verteilt, die Protoplasten in jeweils 5ml R3-Weichagar (s. Tab. 8) eingebettet und 12-14h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 5ml antibiotikumhaltigem Soft Nutrient Agar (SNA) (s. Tab. 8) überschichtet und weitere drei Tage bei 37°C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation wurden die gewachsenen Klone gepickt und zur Verifizierung der Resistenz auf antibiotikumhaltige HA-Agarplatten ausgestrichen.

## **2.4.4 Methoden zur Isolierung von DNA**

### *2.4.4.1 Plasmidminipräparation aus E. coli (modifiziert nach TENS)*

Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tab. 17 aufgeführt.

*E. coli*-Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37°C und 170rpm in 2ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Die gesamte Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (2570 x g, 10min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in jeweils 100µl Puffer P1 (mit 0,2mg/ml RNase und 1-2mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 200µl Lösung P2 zugegeben und solange bei Raumtemperatur weiterinkubiert, bis eine klare Lösung entstanden war. Anschließend wurde der Ansatz mit 150µl eiskalter Lösung P3 versetzt, 10min auf Eis inkubiert und mindestens 30min bei 17500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,8 Volumenteilen eiskaltem Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (17500 x g, mindestens 30min, 4°C) wurde der Überstand abdekantiert, die pelletierte Plasmid-DNA mit 500µl eiskaltem 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen (17500 x g, 15min, 4°C), luftgetrocknet und in 50µl TE-Puffer pH7,6 gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die mit dieser Methode isolierte DNA wurde routinemäßig für Restriktionsanalysen und Klonierungsexperimente verwendet.

#### 2.4.4.2 Plasmidmaxipräparation aus *E.coli*

Größere Plasmidmengen mit einem höheren Reinheitsgrad durch Abtrennung von RNA, Proteinen, Kohlenhydraten und anderen Metaboliten wurden durch Aufreinigung der Plasmid-DNA mit Hilfe der Nucleobond AX100-Säulen (s. 2.1.3) nach dem Prinzip der Anionenaustauscherchromatographie erhalten. Eine Einzelkolonie *E.coli* wurde über Nacht in 100ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C und 170rpm kultiviert. Die Lyse der Zellen und die DNA-Isolierung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers Macherey-Nagel. Die erhaltene DNA (die Ausbeute betrug 70-140µg Plasmid-DNA) wurde in insgesamt 200µl TE-Puffer pH7,6 oder sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (zur Sequenzierung) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde sowohl zur Streptomyceten-Transformation als auch für Auftragssequenzierungen bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) verwendet.

#### 2.4.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA zur nicht-radioaktiven Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzierung am Vistra DNA Sequencer 725 (Molecular Dynamics, Krefeld) wurde die Plasmid-DNA aus *E.coli* mit Hilfe des Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps DNA Purification System isoliert. Die Isolierung erfolgte entsprechend den Angaben im Handbuch der Firma Promega. Die DNA wurde in 50µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Ausbeuten lagen bei 5-15µg Plasmid-DNA pro Präparation.

#### 2.4.4.4 Plasmid-Isolierung aus *Streptomyceten*

Die Isolierung von Plasmiden aus *Streptomyceten* war durch eine nach Hopwood et al. (1985) modifizierte Methode möglich. Dabei wird der Mureinsacculus der bakteriellen Zellwand durch Lysozym abgebaut und die Zellen anschließend durch alkalische Lyse in Gegenwart von SDS aufgeschlossen. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tab. 17 aufgeführt. 1,5ml einer gut gewachsenen *Streptomyceten*kultur wurden abzentrifugiert (2700 x g, 10min, 4°C), mit 500µl Lösung L1 gewaschen und in 300µl Lösung L1 mit 4mg/ml Lysozym resuspendiert. Die Suspension wurde 30min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 300µl Lösung L2 mehrmals invertiert und weitere 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300µl eiskalter 3M Kaliumacetatlösung pH 5,2, vorsichtigem Invertieren und 10-minütigem Inkubieren auf Eis wurden Zellfragmente und Proteine durch Zentrifugation (20800 x g, 20min, 4°C) entfernt, und der klare Überstand durch Phenol/Chloroform-Extraktion weiter aufgereinigt. Die in der wässrigen Phase gelöste Plasmid-DNA wurde nach Zugabe von 0,7 Volumenteilen Isopropanol und Invertieren 15min bei Raumtemperatur gefällt. Das nach Zentrifugation (20800 x g, 20min, 4°C) erhaltene DNA-Präzipitat wurde mit 500µl eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl TE-Puffer pH 7,6 gelöst. Eine Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### 2.4.4.5 Isolierung von genomischer DNA aus *Streptomyceten*

Es wurden 10µl Sporen in 50ml S-Medium mit 0,75% Glycin (s. Tab. 7) 24h bei 37°C und 170rpm auf dem Rundschüttler kultiviert. Die Kultur wurde abzentrifugiert (2790 x g, 10min, 4°C), und das Pellet mit 30ml TSE-Puffer (s. Tab. 17) gewaschen. 50mg Zellen wurden abgenommen, in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt, in 500µl TSE-Puffer mit 1mg/ml Lysozym und 100µg/ml RNase resuspendiert und 30min bei 37°C unter gelegentlichem Invertieren (etwa alle 10min) inkubiert. Nach Zugabe von 250µl einer wässrigen 2%igen (w/v) SDS-Lösung wurde der Ansatz 10min bei 60°C erhitzt. Die entstandene klare Lösung wurde mit 700µl Phenol/Chloroform versetzt, 1-2min gevortext und 15min bei 20800 x g und 4°C zentrifugiert (1.Phenolisierungsschritt). Die wässrige Oberphase wurde abgenommen, mit 150µl TE-Puffer pH 8,0 und 250µl Phenol/Chloroform versetzt, 1-2min gevortext und 15min bei 20800 x g und 4°C zentrifugiert (2.Phenolisierungsschritt). Die wässrige Oberphase wurde erneut abge-

nommen, mit 150µl TE-Puffer pH 8,0 und 250µl Phenol/Chloroform versetzt, 1-2min gevortext und wiederum 15min bei 20800 x g und 4°C zentrifugiert (3. Phenolisierungsschritt). Anschließend wurde die wässrige Oberphase abgenommen, und die DNA nach Zugabe von 0,1 Volumenteilen 3M Natriumacetatlösung pH 5,2 und 1 Volumenteil Isopropanol 30min bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation (20800 x g, 30min, 4°C) wurde das DNA-Pellet mit 500µl eiskaltem 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 50µl TE-Puffer pH 8,0 über Nacht gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Qualität und Konzentration der genomischen DNA wurde elektrophoretisch über ein 0,7%iges Agarosegel bestimmt.

## 2.4.5 Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA

### 2.4.5.1 Phenol-/Chloroform-Extraktion

Zur Abtrennung von Proteinen bei DNA-Präparationen wurden die DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform pH 8,0 (s. Tab. 2) versetzt, durch Vortexen gut durchmischt und anschließend zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (20800 x g, 5min, 4°C). Die wässrige, DNA-haltige Oberphase wurde vorsichtig abpipettiert und die DNA mit Ethanol bzw. Isopropanol gefällt (s. 2.4.5.2).

### 2.4.5.2 Alkoholfällung

Sowohl eine Aufkonzentrierung als auch Reinigung der DNA von niedermolekularen Substanzen wird durch Alkoholfällung erreicht. Zur DNA-Lösung wurde das 0,1-fache Volumen 3M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 (bei Ethanol-fällung) bzw. 3M Kaliumacetat-Lösung pH 5,2 (bei Isopropanol-fällung) und das 2-2,5-fache Volumen eiskalter Ethanol bzw. das 0,8-1-fache Volumen eiskalter Isopropanol zugegeben und der Ansatz nach Invertieren 20min bei -70°C inkubiert. Anschließend wurde die ausgefallene DNA durch Zentrifugation (20200 x g, 25min, 4°C) pelletiert, mit 500µl eiskaltem 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst.

### 2.4.5.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen ist durch Messung der Absorption bei 260nm möglich. Dabei wurde ein Aliquot der Lösung so weit mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt, dass die Absorption zwischen 0,1 und 0,8 lag. Der Berechnung des DNA- bzw. RNA-Gehalts wurden folgende Gleichungen zugrundegelegt:

dsDNA: 1 A<sub>260</sub> Unit = 50µg/ml H<sub>2</sub>O

ssRNA: 1 A<sub>260</sub> Unit = 40µg/ml H<sub>2</sub>O

## 2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

### 2.4.6.1 Trennbedingungen

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Molekülgröße wurde eine GNA-100 Apparatur mit einem Spannungsgeber GPS 200/400 der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) eingesetzt. Es wurde Agarose ultrapure (USB, Cleveland, USA) in Konzentrationen von 0,6-2,0% verwendet. Die Herstellung der Agarosegele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach den Angaben von Sambrook et al. (1989). Zu den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen auf das Gel das 0,2-fache Volumen Ladepuffer (s. Tab. 15) zugesetzt. Die Trennung erfolgte bei 70V in 1xTAE-Puffer (s. Tab. 15) bei Raumtemperatur. Zur Größenabschätzung wurden folgende Standardmarker verwendet:

- 1kb DNA-Leiter (Promega, Mannheim): 0,25-10 kb
- DNA Molecular Weight Marker II und VII, DIG-labeled (Roche Diagnostics, Mannheim): 0,564-23,13 kb und 0,359-8,576 kb für den Southern-Blot

#### 2.4.6.2 Färben von Agarosegelen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel in einem wässrigen Ethidiumbromidbad (1 µg/ml Ethidiumbromid) 15-30min gefärbt. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Durchlicht bei 312nm sichtbar gemacht und fotografiert (Image Master VDS, Video-Dokumentations-System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

#### 2.4.6.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel wurde unter UV-Licht das gewünschte Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract Kit (Macherey-Nagel, Düren). Die erhaltene DNA wurde für gezielte Klonierungen oder zur Sondenmarkierung eingesetzt.

### 2.4.7 Enzymatische Modifizierung von DNA

#### 2.4.7.1 Restriktionsanalyse von DNA

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen wurde gemäß der vom Hersteller angegebenen enzymespezifischen Inkubationstemperatur und mit dem jeweils mitgelieferten Puffer über einen Zeitraum von 2-4h in einem Gesamtvolumen von 10-120µl durchgeführt. Der Restriktionsverdau genomischer DNA (für den Southern-Blot) erfolgte über Nacht. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2-1 µg DNA eingesetzt, für präparative Ansätze entsprechend mehr. Die Anzahl der eingesetzten Units wurde jeweils der DNA-Konzentration angepasst. Der Enzymanteil betrug maximal 10% des Gesamtvolumens, um eine Inhibierung der Reaktion durch das im Lagerungspuffer des Enzyms enthaltene Glycerin zu vermeiden. Falls erforderlich wurden die Restriktionsenzyme entweder durch Erhitzen (entsprechend den Herstellerangaben), Alkoholfällung (s. 2.4.5.2) oder Phenol/Chloroform-Behandlung (s. 2.4.5.1) inaktiviert.

#### 2.4.7.2 Auffüllreaktion mit Hilfe von Klenow Fragment

Mit der Durchführung einer Polymerasereaktion unter Verwendung des Klenow Fragments (großes Fragment der DNA Polymerase I) wurden 5'-Überhänge aufgefüllt, um „blunt ends“ zur Ligation zu erhalten oder Frameshift-Mutationen in bestimmte Gene einzuführen. Es wurden DNA (ca. 1µg), Nukleotide (50µM Endkonzentration je dNTP), Filling-Puffer und Klenow (2 Units pro Ansatz) zusammengegeben und für genau 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Polymerase durch 10-minütiges Erhitzen auf 85°C inaktiviert.

#### 2.4.7.3 Auffüllreaktion mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase

Neben Klenow kann auch die T4-DNA-Polymerase für Auffüllreaktionen verwendet werden. 5'-Überhänge wurden aufgefüllt, 3'-Überhänge konnten ebenfalls geglättet werden, da die T4-DNA-Polymerase neben der Polymeraseaktivität auch eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität besitzt (bei Klenow ist diese Aktivität zu gering, um für diesen Zweck eingesetzt werden zu können). Es wurden etwa 1µg DNA mit Nukleotiden (50µM Endkonzentration je dNTP), T4-DNA-Polymerase-Puffer, BSA (0,01% Endkonzentration) und 2-4 Units T4-DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20µl 5min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Phenolisierung (s. 2.4.5.1) gestoppt.

#### 2.4.7.4 Ligation

Als Enzym wurde die T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim) eingesetzt, welche die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA in Gegenwart von ATP katalysiert. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20µl in Ligasepuffer mit 4,5 Units Ligase und 1mM ATP. Das Insert wurde im Verhältnis zum Vektor im 5-100-fachen Überschuß zugesetzt. Der Ansatz wurde 3h bei Raumtemperatur (ca. 22°C) inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren oder direkt zur *E.coli*-Transformation eingesetzt.

#### 2.4.8 PCR-Methoden

Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem GeneAmp PCR System 2400 der Firma Perkin Elmer (Weiterstadt) in einem Reaktionsvolumen von 100µl durchgeführt. Die Primer wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

##### 2.4.8.1 Amplifikation von *aviG1*

*AviG1* wurde zur Expression in der *Saccharopolyspora erythraea eryBIII*-Mutante 335, zur Komplementierung der *aviG1*-Mutante *S.viridochromogenes* GW1 und zum Screenen auf ein erfolgtes double-crossover mittels PCR amplifiziert. Zu diesem Zweck wurden folgende PCR-Methoden entwickelt und folgende Primer aus dem Sequenzbereich von *aviG1* abgeleitet (eingeführte Restriktionsschnittstellen sind jeweils fett hervorgehoben).

a) Amplifikation von *aviG1* zur Expression in der *Saccharopolyspora erythraea eryBIII*-Mutante 335:

HaloF: 5'-GCCGAGCA**AAGCTT**GGAGAATCAT-3'

HaloR: 5'-TGGTGG**GCATGCG**ATGTCACCTCC-3'

Zur Klonierung in den Vektor Litmus 38 (s. Tab. 21) wurden eine *HindIII*- und eine *SphI*-Schnittstelle eingeführt.

Substanz	Endkonzentration
10xPfu-Polymerase-Puffer	1x
Primer	jeweils 0,1 µM
template (Plasmid F4B7)	ca. 200 ng
Glycerin	10% (v/v)
dNTP-Mix	0,2 mM
Pfu-Polymerase	3 Units

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1.Denaturierung	96°C	5:00min	1
2.Denaturierung	95°C	1:30min	35
Annealing	52°C	1:00min	
Elongation	72°C	1:45min	
Endelongation	72°C	10:00min	1
Kühlung auf	4°C		



Die Polymerase wurde erst nach dem ersten Denaturierungsschritt dem Ansatz zugesetzt (Durchführung eines *Hot starts*). Dieselben Primer und dieselbe Methode wurden auch zum Screenen auf ein erfolgreiches double-crossover bei der Inaktivierung von *aviG1* verwendet.

b) Amplifikation von *aviG1* zur Komplementierung der Mutante *S.viridochromogenes* GW1:

AviG1F: 5'-AGATGT**CAATTG**CTGGCTCA-3'

AviGR2: 5'-TGGTGT**CTAGAG**ATGTCACCTCC-3'

Zur Klonierung in die Vektoren pSET-1cermA (s. Tab. 22) und pUWL201 (s. Tab. 21) wurden eine *MunI*- und eine *XbaI*-Schnittstelle eingeführt.

Substanz	Endkonzentration
10xPfu-Polymerase-Puffer	1x
Primer	jeweils 0,1 µM
template (Plasmid pMIK1)	ca. 200 ng
Glycerin	10% (v/v)
dNTP-Mix	0,2 mM
Pfu-Polymerase	6 Units

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1.Denaturierung	96°C	5:00min	1
2.Denaturierung	95°C	1:30min	30
Annealing	58°C	1:00min	
Elongation	72°C	2:00min	
Endelongation	72°C	10:00min	1
Kühlung auf	4°C		

Es wurde ein *Hot start* durchgeführt, d.h. die Polymerase wurde erst im Anschluß an den ersten Denaturierungsschritt zum Ansatz zugegeben.

#### 2.4.8.2 Amplifikation von *aviG2*

Um die Integration des Plasmids zur Inaktivierung von *aviG2* in das Genom der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 zu überprüfen und anschließend auf ein erfolgreiches double-crossover zu screenen, wurden folgende Primer aus dem Sequenzbereich von *aviG2* abgeleitet und folgende PCR-Methode entwickelt:

G2F: 5'-CGCCTGTTCAACTCCTACGGA-3'

G2R: 5'-CAGGTAGAGGTAGACCTCGAA-3'

Substanz	Endkonzentration
10xTaq-Polymerase-Puffer	1x
Primer (G2F, G2R)	jeweils 0,2 µM
template (genomische DNA)	5µl aus einer Präparation (s. 2.4.4.5)
Glycerin	10% (v/v)
dNTP-Mix	0,2 mM
Taq-Polymerase	2,5 Units

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1.Denaturierung	96°C	5:00min	1
2.Denaturierung	95°C	1:30min	35
Annealing	56°C	1:00min	
Elongation	72°C	1:45min	
Endelongation	72°C	10:00min	1
Kühlung auf	4°C		

Um festzustellen, auf welche Art das Inaktivierungskonstrukt ins Chromosom integrierte, wurde eine PCR unter Verwendung des Standard T3 Primers (bindet an Vektor pSP1) in unterschiedlichen Kombinationen mit den Primern G2F und G2R durchgeführt (Methode wie oben).

#### 2.4.8.3 Amplifikation von *aviG3*

Wie im Falle von *aviG2* wurden auch hier Primer abgeleitet, um mittels PCR die Integration des Inaktivierungskonstrukts für das Gen *aviG3* in das Chromosom der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 überprüfen und um nachfolgend auf ein erfolgreiches double-crossover screenen zu können. Die Primersequenzen und die verwendete PCR-Methode sind nachstehend aufgeführt:

G3F: 5'-CTGCACAACATCCTGACACT-3'

G3R: 5'-TTGACCGTTCGGTCCACGGT-3'

Substanz	Endkonzentration
10xTaq-Polymerase-Puffer	1x
Primer (G3F, G3R)	jeweils 0,2 µM
template (genomische DNA)	5µl aus einer Präparation (s. 2.4.4.5)
Glycerin	10% (v/v)
dNTP-Mix	0,2 mM
Taq-Polymerase	5 Units

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1.Denaturierung	96°C	5:00min	1
2.Denaturierung	95°C	1:30min	25
Annealing	58°C	1:00min	
Elongation	72°C	1:45min	
Endelongation	72°C	10:00min	1
Kühlung auf	4°C		

#### 2.4.8.4 Amplifikation von *aviG4*

*AviG4* wurde zur Untersuchung der crossover-Ereignisse nach Transformation des *S.viridochromogenes* Tü57 mit dem entsprechenden Inaktivierungskonstrukt und zur Komplementierung der entstandenen Mutante mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden geeignete Primerpaare im Sequenzbereich von *aviG4* abgeleitet (eingeführte Restriktionsschnittstellen sind jeweils fett hervorgehoben) und die unten aufgeführten PCR-Methoden entwickelt:

a) PCR zur Untersuchung der crossover-Ereignisse:

G4F: 5'-GGACGCCTATCTGTGCCACCCCTTCCTGGT-3'

G4R: 5'-TGAGCGCTCGCCTAGACAGAATCATCTCCC-3'

Substanz	Endkonzentration
10xTaq-Polymerase-Puffer	1x
Primer (G4F, G4R)	jeweils 0,1 µM
template (genomische DNA)	5µl aus einer Präparation (s. 2.4.4.5)
Glycerin	10% (v/v)
dNTP-Mix	0,2 mM
Taq-Polymerase	2,5 Units

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1.Denaturierung	96°C	9:00min	1
2.Denaturierung	95°C	1:30min	35
Annealing	62°C	1:00min	
Elongation	72°C	1:45min	
Endelongation	72°C	10:00min	1
Kühlung auf	4°C		

b) Amplifikation von *aviG4* zur Komplementierung der Mutante *S.viridochromogenes* GW4:

AviG4F: 5'-AAGGACAATTGGCGACGAGA-3'

AviG4R: 5'-GCTCCTCTAGACGGTCAAAT-3'

Zur Klonierung in die Vektoren pSET-1cermA (s. Tab. 22) und pUWL201 (s. Tab. 21) wurden eine *MunI*- und eine *XbaI*-Schnittstelle eingeführt.

Substanz	Endkonzentration
10xPfu-Polymerase-Puffer	1x
Primer (AviG4F, AviG4R)	jeweils 0,1 µM
template (Plasmid pP2P13)	ca. 200 ng
Glycerin	10% (v/v)
dNTP-Mix	0,2 mM
Pfu-Polymerase	4,5 Units

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1.Denaturierung	96°C	5:00min	1
2.Denaturierung	95°C	1:00min	35
Annealing	55°C	1:00min	
Elongation	72°C	2:00min	
Endelongation	72°C	10:00min	1
Kühlung auf	4°C		

Es wurde ein *Hot start* durchgeführt, d.h. die Polymerase wurde erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zum Ansatz zupipettiert.

#### 2.4.8.5 Amplifikation von *aviG5*

Die Amplifikation von *aviG5* mittels PCR diente der Überprüfung einer erfolgreichen Inaktivierung dieses Gens durch Genaustausch nach erfolgreicher Transformation der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 mit dem Inaktivierungskonstrukt pMIKG5. Es wurde folgendes Primerpaar abgeleitet und die nachstehende PCR-Methode erstellt:

G5F: 5'-GTGCGGGCGTTCAGCTACGT-3'

G5R: 5'-TAGAGGCAGTCGGAGACGGA-3'

Substanz	Endkonzentration
10xTaq-Polymerase-Puffer	1x
Primer (G5F, G5R)	jeweils 0,2 µM
template (genomische DNA)	5µl aus einer Präparation (s. 2.4.4.5)
Glycerin	10% (v/v)
dNTP-Mix	0,2 mM
Taq-Polymerase	2,5 Units

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1.Denaturierung	96°C	5:00min	1
2.Denaturierung	95°C	1:30min	35
Annealing	62°C	1:00min	
Elongation	72°C	1:45min	
Endelongation	72°C	10:00min	1
Kühlung auf	4°C		

#### 2.4.8.6 Amplifikation von *aviABC1* und *aviABC2*

Zur Klonierung und anschließenden Kombination mit den anderen Resistenzgenen *aviRa* und *aviRb* wurden die beiden ABC-Transportergene *aviABC1* und *aviABC2* mittels PCR amplifiziert. Über die ausgewählten Primer wurden auf der 5'-Seite der RBS eine *MunI*- und auf der 3'-Seite des Stopcodons eine *EcoRI*-Schnittstelle eingeführt (in der Primersequenz fett dargestellt).

abcF: 5'-CGCTGAGCCA**AATT**GATGAACGCCGCTGACC-3'

ABCR: 5'-GGTCCG**GAATT**CCCGGACGGCACGCGGTTC-3'

Substanz	Endkonzentration
10xPfu-Polymerase-Puffer	1x
Primer (abcF, ABCR)	jeweils 0,1 µM
template (Plasmid P2E8)	ca. 200 ng
Glycerin	10% (v/v)
dNTP-Mix	0,2 mM
Pfu-Polymerase	3 Units

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1.Denaturierung	98°C	5:00min	1
2.Denaturierung	95°C	1:00min	35
Annealing	62°C	1:00min	
Elongation	72°C	1:45min	
Endelongation	72°C	10:00min	1
Kühlung auf	4°C		

Es wurde ein *Hot start* durchgeführt, d.h. die Polymerase wurde erst nach der 1.Denaturierung jeweils zu den Ansätzen zupipettiert.

#### 2.4.8.7 Amplifikation von *aviRb*

*AviRb* wurde sowohl zur Expression in *E.coli* als auch zur Expression in *S.lividans* TK66 per PCR amplifiziert und zunächst in den Vektor pLitmus 28 (s. Tab. 21) ligiert. Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte sequenziert und anschließend in die entsprechenden Expressionsvektoren (pRSETb für die Expression in *E.coli* und pUWL201 für die Expression in *S.lividans* TK66) (s. Tab. 21) umkloniert. Um eine Klonierung zu ermöglichen, wurden über die Primer passende Restriktionsschnittstellen eingeführt (in der Primersequenz jeweils fett hervorgehoben). Im Falle des Fragments für die Expression in *E.coli* wurde zusätzlich eine *NdeI*-Schnittstelle (umfasst das *aviRb*-Startcodon) eingeführt, um gegebenenfalls eine Expression des Gens ohne His-Tag zu ermöglichen.

Primerpaar zur Amplifikation von *aviRb* für die Expression in *E.coli*:

Auf der 5'-Seite des Startcodons wird eine *BglII*-Schnittstelle eingeführt, auf der 3'-Seite des Stopcodons eine *EcoRI*-Schnittstelle:

*aviRbEcF*: 5'-GATAGAGATCTT**CATATG**GCAAGATCACGT-3'  
*BglII* *NdeI*

*aviRbR*: 5'-GGCACGCG**GAATTC**GTGGGGCGGATCCAGG-3'  
*EcoRI*

Primerpaar zur Amplifikation von *aviRb* für die Expression in *S.lividans* TK66:

Auf der 5'-Seite der RBS wird eine *BglII*-Schnittstelle eingeführt, auf der 3'-Seite des Stopcodons eine *EcoRI*-Schnittstelle und hierfür derselbe Primer verwendet wie für die Expression in *E.coli*:

*aviRbSIF*: 5'-CAGTCATTTTGT**AGATCT**CAGGAGCGGAAG-3'

*aviRbR*: 5'-GGCACGCG**GAATTC**GTGGGGCGGATCCAGG-3'

Substanz	Endkonzentration
10xPfu-Polymerase-Puffer	1x
Primer (aviRbEcF + aviRbR bzw. aviRbSIF + aviRbR)	jeweils 0,1 µM
template (Plasmid pF4Bg10)	ca. 200 ng
Glycerin	10% (v/v)
dNTP-Mix	0,2 mM
Pfu-Polymerase	3 Units

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1. Denaturierung	96°C	5:00min	1
2. Denaturierung	95°C	1:30min	35
Annealing	60°C	1:00min	
Elongation	72°C	1:45min	
Endelongation	72°C	10:00min	1
Kühlung auf	4°C		

### 2.4.9 Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Prinzip der Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Hierbei wird in einer PCR-Reaktion („Cycle sequencing“) mit Hilfe einer DNA-Polymerase ausgehend von Starter-Oligonukleotiden (Primern) ein zur Template-DNA komplementärer Strang neu synthetisiert. Die zu sequenzierende DNA und die entsprechenden Primer werden gemischt und auf vier Ansätze verteilt. Als Substrat für das Enzym werden jedem der vier Ansätze die vier in der DNA natürlich vorkommenden dNTPs zugesetzt und außerdem zusätzlich noch jeweils ein unterschiedliches Didesoxynukleotid (ddNTP). Der Einbau eines ddNTP in den wachsenden DNA-Doppelstrang führt zum Abbruch der Synthese, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-OH-Gruppe im ddNTP fehlt. dNTPs und ddNTPs werden in einem bestimmten Verhältnis zugegeben, so dass es statistisch an jeder Position, an der dieses Nukleotid eingebaut wird, zum Kettenabbruch kommt. Dadurch wird in jedem der vier Ansätze ein Gemisch aus teilweise aufsynthetisierten DNA-Molekülen unterschiedlicher Länge erhalten, welches nach Denaturierung in jeweils einer Spur gelelektrophoretisch über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt wird.

Auf diese Art und Weise wurden Subklone aus den Cosmiden P2, 6H18 und 3M5 ansequenziert und die mittels PCR amplifizierte Gene *aviG1* und *aviRb* und das umklonierte Gen *aviRa* einzelsträngig von beiden Seiten sequenziert. Alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzierungen wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und 4base lab (Reutlingen) durchgeführt.

#### 2.4.9.1 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierungen wurden am automatischen Sequenzierer Vistra 725 (Molecular Dynamics, Krefeld) durchgeführt. Als Primer wurden Standardprimer (T3, T7, M13 forward und reverse) eingesetzt, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff TexasRed™ gelabelt waren. Dieser Farbstoff wird vom Helium-Neon-Laser des Sequenziergeräts bei einer Wellenlänge von 594nm angeregt und emittiert bei 615nm, was durch ein Diodenarray-

System detektiert werden kann. Die Sequenzierreaktion wurde nach den Angaben und mit den Bestandteilen des „Thermo Sequenase Core Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP, RPN 2440“ (Amersham, Braunschweig) durchgeführt. Pro Sequenzierreaktion wurden für alle vier Ansätze zusammen ca. 3-5µg template DNA eingesetzt.

#### 2.4.9.2 PCR-Bedingungen

Das Cycle sequencing wurde mit dem GeneAmp PCR System 2400 der Firma Perkin Elmer (Weiterstadt) mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reaktion	Temperatur	Zeit	Cyclenanzahl
1.Denaturierung	98°C	5:00min	1
2.Denaturierung	98°C	0:30min	25
Annealing und Elongation	60°C	0:30min	
Endelongation	60°C	0:30min	1
Kühlung auf	4°C		

Nach Beendigung der PCR wurden jedem Ansatz 2,0µl Loading Dye zugesetzt und das Probenvolumen in einer Vakuumzentrifuge bei 40°C bis auf etwa 2µl reduziert.

#### 2.4.9.3 Zusammensetzung des Sequenziergels und Laufbedingungen

Für die Herstellung des Sequenziergels wurde der DNA Sequencing Gel Mix Kit (USB, Cleveland, Ohio) verwendet. Pro Gel wurden 25ml Gelmix (5,0% Acrylamid, 0,5% Bisacrylamid, 7,0M Harnstoff in TBE) eingesetzt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 175µl 10%iger (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) und 21µl TEMED initiiert. Die Polymerisationszeit betrug 1,5-2h. Mit Hilfe eines Haifischkamms konnten bis zu 10 Templates parallel unter folgenden Bedingungen sequenziert werden:

- Spannung: 1400V
- Temperatur: 45°C
- Laufpuffer: 1xTBE
- Vorlauf: 5min
- Laufzeit: 480min

#### 2.4.9.4 Auswertung der Sequenzdaten

Die computerunterstützte Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des DNASIS-Softwarepakets (Version 2.1, 1995, Hitachi Software Engineering, San Bruno, USA). Homologievergleiche auf DNA- und Proteinebene wurden mittels blastx-Analyse (Altschul et al., 1997) am National Health Institute, USA, über das Internet durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>). Die Identifikation offener Leserahmen erfolgte durch das CODONPREFERENCE-Programm (Devereux et al., 1984) unter Berücksichtigung des für Streptomycceten typischen Codongebrauchs (Wright und Bibb, 1992).



#### 2.4.10 Southern-Hybridisierung

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind unter 2.1.6.10 aufgeführt. Es wurden ca. 0,5µg Cosmid-DNA bzw. 10-20µg genomische DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und auf einem 0,8%igen Agarosegel bei einer angelegten Spannung von 60V aufgetrennt. Als Puffer wurde 1xTAE verwendet. Nach Ethidiumbromidfärbung (s. 2.4.6.2) zur Überprüfung des Restriktionsverdaus wurde das Gel 2-10min in Depurinierungslösung inkubiert. Bei diesem Schritt wird die DNA teilweise depurinert und zerbricht dann in kleinere Fragmente, die leichter geblottet werden können. Danach erfolgt eine 2x 15-minütige Inkubation in Denaturierungslösung, wodurch die DNA denaturiert, d.h. in die beiden Einzelstränge getrennt wird. Nach Neutralisierung durch 2x 15-minütiges Waschen in Neutralisierungslösung wurde die Einzelstrang-DNA mittels Kapillartransfer (Sambrook et al., 1989) mit 20xSSC-Puffer auf eine Hybond-N Nylonmembran (Amersham, Braunschweig) geblottet. Nach 14-16h wurde die DNA unter UV-Licht 1min auf der Vorderseite und 30s auf der Rückseite der Membran fixiert. Es folgten bei 68°C mindestens 4h Prähybridisierung in 20ml Prähybridisierungspuffer und über Nacht die Hybridisierung in 5-10ml Hybridisierungspuffer mit 25ng/ml Sonden-DNA. Die Sonde war zuvor nach Anleitung des DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostics, Mannheim) mit Digoxigenin markiert worden. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Die notwendigen Arbeitsschritte wurden dem Handbuch des oben aufgeführten Kits entnommen. Es wurden Röntgenfilme (Hyperfilm ECL) der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet.

#### 2.4.11 In-vitro-Transkription

Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung zum RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 Kit (Promega, Mannheim). Alle benötigten Puffer und Lösungen wurden RNase-frei hergestellt. Als Template-DNA wurden Plasmide verwendet, in denen das zu transkribierende Gen unmittelbar im Anschluß an den T7-RNA-Polymerasepromoter kloniert worden war. Vor der Transkription wurden die Plasmide durch Restriktion im Bereich des Transkriptionsstops linearisiert, wobei nur solche Restriktionsenzyme ausgewählt wurden, die keinen 3'-Überhang generieren, da diese ebenfalls als Startpunkt für die RNA-Polymerase dienen können (Schenborn und Mierendorf, 1985). Anschließend wurde mit Isopropanol gefällt. Eine weitere Reinigung erfolgte nicht. Pro Transkriptionsansatz wurden 5-10µg linearisierte Template-DNA eingesetzt, als Polymerase die T7-RNA-Polymerase. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Phenolisierung (s. 2.4.5.1) abgestoppt und die wässrige Phase über NAP5-Säulen gereinigt. Die Elution erfolgte mit 800µl TE-Puffer pH7,6. Das Eluat wurde zu je 100µl aliquotiert, zur Fällung der RNA mit 10µl 3M Natriumacetat-Lösung pH5,2 und 500µl eiskaltem Ethanol versetzt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## 2.5 Methoden der Biochemie

### 2.5.1 Expression und Reinigung der rRNA-Methyltransferasen AviRa und AviRb

Die Reinigung der beiden rRNA-Methyltransferasen erfolgte nach heterologer Überexpression in *E.coli* BL21(DE3)pLysS als N-terminale Histidin-Fusionsproteine. Der Stamm *E.coli* BL21(DE3)pLysS wurde jeweils mit den einzelnen Überexpressionskonstrukten, pRSETb-Ra bzw. pRSETb-Rb, und mit dem Vektor pRSETb als Kontrolle transformiert. Transgene Einzelkolonien wurden über Nacht in 70ml NZCYM-Medium mit 50µg/ml Carbenicillin und 34µg/ml Chloramphenicol angezogen. Pro Transformand wurden mit 4x5ml dieser Vorkultur jeweils 4x100ml NZCYM-Medium mit 100µg/ml Carbenicillin und 34µg/ml Chloramphenicol (im 300ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen) angeimpft und bei 37°C und 170rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 kultiviert. War dieser Zustand erreicht, erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (1mM Endkonzentration). 4h nach der Induktion wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation bei 2790 x g, 10min, 4°C), mit Lysepuffer (s. Tab. 10) gewaschen und zur Erleichterung des Zellaufschlusses über Nacht bei -70°C eingefroren. Zur Isolierung der gewünschten Proteine wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 2g Zellen (Feuchtwicht) in 2,5ml Lysepuffer resuspendiert, mit 2,5ml Lysepuffer mit 2mg/ml Lysozym versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Danach wurde 5µg/ml DNaseI (FPLC pure™, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) zugefügt und weitere 10-15min auf Eis inkubiert. Die entstandenen Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (17500 x g, 30min, 4°C) abgetrennt und der klare Überstand durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Harz (Qiagen, Hilden) weiter aufgereinigt. Alle Wasch- und Elutionsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Entfernung des Imidazols wurden die Proteinlösungen nach Elution von den Ni-NTA-Säulen einer Gelfiltration mit Hilfe von Sephadex G-25 Säulen (PD10 Säulen, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unterworfen. Die Elution erfolgte hier mit RS-Puffer (s. Tab. 12). Zur Überprüfung des Reinheitsgrads wurden die Proteinproben mittels SDS-PAGE (s. 2.5.4) analysiert. Die Lagerung erfolgte nach Zusatz von Glycerin (20% (v/v) Endkonzentration) bei -20°C.

### 2.5.2 Proteingehaltsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. 100µl der mit RS-Puffer (ohne Glycerin) bzw. 50mM Tris-HCl (pH 7,5) verdünnten Proteinlösung wurden mit 1ml Bradford-Reagenz (s. 2.1.6.3) versetzt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen. Die Berechnung der jeweiligen Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer mit BSA als Standard erstellten Kalibrierungsgeraden.

### 2.5.3 Bestimmung der rRNA-Methyltransferase-Aktivität

Die rRNA-Methyltransferase-Aktivität der Proteine AviRa und AviRb wurde nach einem von Bechthold und Floss (1994) beschriebenen Assay bestimmt. Jeder Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100µl 42pmol eines equimolaren Gemisches aus 16S und 23S rRNA bzw. 20pmol 16S rRNA oder 20pmol 23S rRNA, 125µM AdoMet, 12,75µCi [*methyl*-<sup>3</sup>H]AdoMet, 25mM HEPES-KOH (pH 7,5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM NH<sub>4</sub>Cl, 5mM DTT, 80U RNase-Block und 1-6µg Protein (gelöst in RSG-Puffer). Aus HEPES, MgCl<sub>2</sub> und NH<sub>4</sub>Cl wurde ein 10-fach konzentrierter sogenannter Inkubationspuffer (s. 2.1.6.4) hergestellt und pro Ansatz 10µl davon eingesetzt. Das Gemisch aus allen Bestandteilen wurde je nach durchgeführtem Experiment 1-60min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 100µl Phenol/Chloroform abgestoppt. Nach

10-minütiger Zentrifugation bei 3800 x g und 4°C wurde die wässrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 3µl 5S rRNA (0,8µg/µl) und 10µl 3M Natriumacetat-lösung pH5,2 versetzt und die rRNA durch Zugabe von 5 Volumenteilen eiskaltem Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Das durch Zentrifugation (20800 x g, 30min, 4°C) erhaltene Pellet wurde mit eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, um den größten Teil an nicht eingebautem [*methyl*-<sup>3</sup>H]AdoMet zu entfernen, und anschließend nach kurzer Lufttrocknung in 1ml TE-Puffer pH7,6 gelöst. 500µl dieser Lösung wurden zur weiteren Reinigung auf eine NAP5-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben und mit 750µl TE-Puffer pH7,6 eluiert. Das Eluat wurde nach Zusatz des Szintillationscocktails im Szintillationszähler analysiert.

Bei der Bestimmung der rRNA-Methyltransferase-Aktivität mit 16S rRNA bzw. 23S rRNA als Substrat musste die entsprechende rRNA vor der Durchführung des Assays zunächst renaturiert werden. Dazu wurden jeweils vier Aliquots der entsprechenden Transkripte (s. 2.4.11) 60min bei 20800 x g und 4°C zentrifugiert, die entstandenen Pellets mit je 500µl eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, ca. 15min bei Raumtemperatur getrocknet und in jeweils 25µl M-Puffer (s. 2.1.6.4) gelöst. Anschließend wurden die Lösungen der jeweiligen Transkripte vereinigt, 15min bei 65°C inkubiert und über einen Zeitraum von 30-60min bei Raumtemperatur wieder abgekühlt. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion einer geeigneten Verdünnung bei 260nm. Dabei gilt folgendes:

$$1 A_{260} \text{ Unit} = 40\mu\text{g/ml}$$

$$\text{pmol ssRNA} = \mu\text{g(ssRNA)} \times 2941 / (\text{Anzahl Nukleotide})$$

23S rRNA: 2904 Nukleotide

16S rRNA: 1541 Nukleotide

Mit einer 20pmol entsprechenden Menge rRNA wurde sofort anschließend die rRNA-Methyltransferase-Aktivitäts-Bestimmung durchgeführt.

#### 2.5.4 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 BIORAD (Cell) über 45min bei 200V. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind unter 2.1.6.2 beschrieben. 5-10µl über Ni-NTA gereinigte Proteinlösung wurden mit 5µl 1xProbenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel 3min bei 100°C denaturiert. Falls noch Imidazol in der Lösung enthalten war, erfolgte die Denaturierung durch 10-minütige Inkubation bei 37°C. Bei der Untersuchung des Expressionsverlaufs nach Induktion durch IPTG wurden aus den jeweiligen Kulturen Proben von 1ml entnommen, zentrifugiert (15300 x g, 1min, 4°C), das erhaltene Zellpellet in jeweils 100µl 1xProbenpuffer resuspendiert, 3min bei 100°C denaturiert, kurz zentrifugiert (15300 x g, 4°C) und 10µl des Überstands auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard dienten 14,4µg Low Molecular Weight-Standard (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) 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 nach Beendigung der Elektrophorese kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gespült, danach 5-10min in Färbelösung gefärbt und anschließend maximal 60min in Fixier- und Entfärbelösung entfärbt. Vor dem Trocknen im Geltrocknungsrahmen wurden die Gele in 3%ige (v/v) Glycerinlösung eingelegt.

### 2.5.5 Isolierung von 70S Ribosomen aus Streptomycceten

Die Methode zur Isolierung von 70S Ribosomen aus Streptomycceten basierte bis auf ein paar kleine Änderungen auf dem von Quiros et al. (1988) beschriebenen Protokoll. Alle benötigten Puffer und Lösungen sind in Tab.13 aufgeführt. Ribosomen wurden aus *S.lividans* TK66 und *S.lividans* TK66-Transformanten isoliert. Die Anzucht erfolgte in jeweils 2x750ml TSB-Medium (im 2l Erlenmeyerkolben, mit Spirale, ohne Schikane) unter Zusatz von Thiostrepton (12µg/ml Endkonzentration) bei 30°C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 250rpm. Nach zwei bis drei Tagen (der Anteil toter Zellen sollte möglichst gering sein) wurden die Zellen abzentrifugiert und das entstandene Pellet mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und eiskaltem R-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Myzel in eiskaltem R-Puffer resuspendiert und zum Zellaufschluß zwei Mal durch die French-Press gegeben. Der resultierende Extrakt wurde 30min bei 30000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand (bezeichnet als S30) vorsichtig abgenommen. Zur Gewinnung der 70S Ribosomen wurden jeweils 6ml HS-Puffer vorsichtig mit 16-18ml S30 überschichtet und über Nacht bei 100000 x g und 4°C unter Vakuum zentrifugiert. Der Überstand (bezeichnet als S100) wurde in ein geeignetes Gefäß überführt und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Das Pellet, bestehend aus Ribosomen, wurde vorsichtig in R-Puffer gelöst, die Lösung 1min bei 20800 x g zentrifugiert, der Überstand anschließend aliquotiert und bei -70°C gelagert. Der S100 wurde zur Entfernung überschüssiger Salze bei 4°C mindestens 5h lang gegen R-Puffer dialysiert (dialysis tubing, benzoylated, exclusion size MW<1200, Sigma-Aldrich, Deisenhofen), ebenfalls aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Ribosomenlösung erfolgte mittels UV-Spektrophotometrie. Vermessen wurde je nach Konzentration 0,5-1µl Ribosomenlösung in 1ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei Wellenlängen von 260nm und 280nm. Allgemein gilt für 70S Ribosomen:

$$1 A_{260} \text{ Unit} = 29 \text{ pmol/ml}$$

Maß für Reinheit:  $A_{260}/A_{280}$  sollte ca. 1,8 sein

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit von S100 und Ribosomen wurde ein Poly(U)-Assay (s. 2.5.6) durchgeführt.

### 2.5.6 In-vitro-Translation

Das von Quiros et al. (1988) beschriebene poly(U)-abhängige in-vitro-Translations-System wurde dazu genutzt, die Empfindlichkeit von Ribosomen gegenüber Avilamycin zu bestimmen. Die Methode wurde neu optimiert und in ein paar Punkten etwas abgewandelt. Zunächst wurde die in Tab. 14 aufgeführte Lösung IV hergestellt. Zu dieser wurden 8µl S100 (aus dem Avilamycin-sensitiven Stamm *S. lividans* TK66-pUWL201 = GW0) und 50pmol der jeweiligen 70S Ribosomen (gelöst in R-Puffer) zugegeben und mit HRS-Puffer auf 30µl aufgefüllt. Der gesamte Ansatz wurde 60min bei 30°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten t=0min und t=60min wurden jeweils 10µl entnommen und zur Fällung des entstandenen Polyphenylalanins zu 1ml eiskalter 5%iger Trichloressigsäure (mit 0,1g/l Phenylalanin) pipettiert und für mindestens 15min auf Eis inkubiert. Die Probe zum Zeitpunkt t=0min diente der Bestimmung des Nullwerts. Das Phenylalanin in der Trichloressigsäurelösung vermindert eine unspezifische Bindung von nicht eingebautem radioaktivem Phenylalanin bei der nachfolgenden Filtration. Um eine Trennung von Phenylalanin und der spezifischen tRNA zu erreichen, wurden die Fällungsansätze 15min bei 90°C erhitzt und anschließend ca. 5min auf Eis abgekühlt. Um gebildetes Polyphenylalanin abzutrennen und zu detektieren, wurden die Lösungen über Glasfaser Mikrofilter (GF/C-Whatman, Ø 25mm) filtriert, die Filter zwei Mal mit je 5ml 5%iger Trichloressigsäure (mit 0,1g/l Phenylalanin) gewaschen, ca. 15-20min bei 100°C getrocknet und im Szintillationszähler vermessen. Die erhaltenen

Werte wurden in Relation zum Nullwert gesetzt. Es wurden Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Um die Empfindlichkeit der Ribosomen gegenüber Avilamycin zu untersuchen, wurden Inkubationen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Antibiotikums durchgeführt. Avilamycin wurde in ethanolischer Lösung zugegeben und die Ribosomen vor dem Start der in-vitro-Translation zunächst 5min bei 30°C mit dem Antibiotikum vorinkubiert.

## 2.6 Isolierung und Analytik von Sekundärstoffen

### 2.6.1 Isolierung von Urdamycinen und Urdamycin-Derivaten

100ml NL111/v-Medium im 500ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane wurden entweder mit etwas Myzel von der Platte oder mit 10-15µl Sporensuspension angeimpft und, wie unter 2.3.2.1 beschrieben, 80-110h bei 28°C auf dem Rundschüttler inkubiert. Urdamycine wurden aus dem Medium bei pH7,0 mit jeweils demselben Volumen Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurde das Ethylacetat unter Vakuum entfernt und der Rückstand zur weiteren Analyse abhängig vom extrahierten Volumen in 50-500µl Methanol aufgenommen.

### 2.6.2 Isolierung von Avilamycinen und Avilamycin-Derivaten

#### 2.6.2.1 Herstellung eines Rohextrakts

*S.viridochromogenes* Tü57 bzw. *S.viridochromogenes* Tü57-Mutanten und Transformanten wurden wie unter 2.3.2.1 beschrieben kultiviert. Bei Aufarbeitung kleiner Volumina (maximal 5ml) wurde die Kultur direkt mit derselben Menge Ethylacetat extrahiert. Bei Aufarbeitung größerer Volumina (bis zu 2l) wurde die Kultur zunächst mit Celite® versetzt und das Myzel durch Filtration über HDC-Membranscheiben (Porendurchmesser 40µm, Pall Gelman Laboratory, Dreieich) abgetrennt. Nach der anschließenden Extraktion des Kulturfiltrats und Trocknung über wasserfreiem Natriumsulfat wurde das Ethylacetat unter Vakuum vollständig entfernt, die Rückstände in Methanol gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.6.2.2 Isolierung durch Bindung an RP18-Harz

Die Anzucht der entsprechenden Stämme erfolgte wie unter 2.3.2.1 beschrieben. Pro 10g Sep-Pak®C<sub>18</sub>-Harz (Waters, Eschborn) wurden 2-3l Kultur eingesetzt. Die Kultur wurde mit Celite® versetzt und zur Abtrennung des Myzels und anderer Feststoffe über HDC-Membranscheiben (Porendurchmesser 40µm, Pall Gelman Laboratory, Dreieich) filtriert. Das erhaltene Kulturfiltrat wurde zusammen mit dem zuvor nach Herstellerangaben äquilibrierten Harz 1h bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer gerührt und anschließend erneut abfiltriert. Das auf dem Filter zurückgebliebene Harz wurde mit 150-200ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und abhängig von den jeweils zu isolierenden Avilamycin-Derivaten mit 150-200ml 5 bzw. 40%igem (v/v) Methanol gewaschen und anschließend in einem schrittweise ansteigenden Gradienten mit Methanol eluiert (pro Stufe 150ml). Das in den verschiedenen Fraktionen enthaltene Methanol wurde unter Vakuum entfernt, die zurückgebliebene wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und unter Vakuum bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde entweder lyophilisiert oder in Methanol gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tab. 23: Übersicht über die bei den einzelnen Stämmen verwendeten Wasch- und Elutionsbedingungen

Stamm	gewaschen mit [%Methanol]		eluiert mit [%Methanol]			
	5	40	60	70	80	100
<i>S.viridochromogenes</i> Tü57	-	200ml	150ml	150ml	150ml	-
<i>S.viridochromogenes</i> GW2	-	200ml	150ml	150ml	-	-
<i>S.viridochromogenes</i> GW3	200ml	-	-	-	150ml	150ml
<i>S.viridochromogenes</i> GW4	-	200ml	150ml	150ml	-	-
<i>S.viridochromogenes</i> GW5	-	200ml	150ml	150ml	-	-

### 2.6.3 Agardiffusionstest

Zur Analyse der biologischen Aktivität der Avilamycin-Derivate wurde ein Agardiffusionstest durchgeführt. Dazu wurden bei einer Temperatur von 40-45°C zu je 100ml DM- bzw. NB-Medium (s. 2.1.4.2)  $10^6$ - $10^7$  Sporen von *Bacillus subtilis* gegeben, gemischt und Platten zu je 20ml mit Hilfe eines Schwannenhalses gegossen. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 20µl der methanolischen Lösung aus 2.6.2.1 bzw. 2.6.2.2 auf eine Filterrondelle (MN 827 ATD, Ø 6mm, Macherey&Nagel, Düren) pipettiert. Als Negativkontrolle diente reines Methanol, als Positivkontrolle 10µl einer methanolischen Avilamycinlösung (1mg/ml). Die Filterrondellen wurden nach vollständigem Trocknen auf die Bioassayplatten aufgelegt und die Platten 24-36h bei 37°C inkubiert.

### 2.6.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie wurde zur qualitativen Analyse sowohl der Urdamycine als auch der Avilamycine und Avilamycin-Derivate eingesetzt. Die in Methanol gelösten Proben wurden mit Hilfe einer Glaskapillare punktförmig auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt) aufgetragen und die Platten anschließend in Dichlormethan/Methanol (9:1, v/v) entwickelt. Urdamycine konnten aufgrund ihrer Eigenfarbe bzw. der Fluoreszenzlöschung bei 254nm durch Vergleich der Rf-Werte mit aus dem Wildtypstamm isolierten Standards identifiziert werden. Zur Detektion der Avilamycine bzw. Avilamycin-Derivate wurden die Platten nach der Entwicklung mit Anisaldehydlösung (1% Anisaldehyd in Methanol/Eisessig/Schwefelsäure (8:1:1)) besprüht und für 5min auf 120°C erhitzt. Avilamycine und Avilamycin-Derivate färben sich aufgrund ihres hohen Zuckeranteils schwarz. Verglichen wurde mit einem Avilamycinstandard der Firma Eli Lilly mit 74,6% Avilamycin A und 11,4% Avilamycin B als Hauptbestandteile (Eli Lilly, persönliche Mitteilung).

### 2.6.5 Säulenchromatographie

Zur Isolierung der von der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 produzierten Hauptderivate (Gavibamycine, A-Reihe) wurde der durch Ethylacetatextraktion des Kulturfiltrats (1,5-2,0l) gewonnene Rohextrakt (vgl. 2.6.2.1) säulenchromatographisch weiter aufgetrennt. Dieser wurde möglichst konzentriert in Methanol gelöst und auf eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60, Korngröße: 0,063-0,2mm, Merck, Darmstadt) mit einem Bettvolumen von 400ml aufgetragen. Eluiert wurde mit einem Dichlormethan/Methanol-Stufengradienten nach folgendem Schema:

Dichlormethan [%]	Methanol [%]	Volumen [ml]
100	0	800
98	2	1000-1500
95	5	1000-1500
90	10	1500
80	20	800

Nachdem 1000ml Dichlormethan/Methanol (98:2) durchgelaufen waren, wurde damit begonnen, das Eluat in Fraktionen von je 20ml aufzufangen. Jeweils 5-10 dieser Fraktionen wurden vereinigt, unter Vakuum auf ca. 10ml eingengt und mit Hilfe des Agardiffusionstests auf antibiotische Aktivität, als charakteristische Eigenschaft der Gavibamycine, getestet (s. 2.6.3). Die antibiotisch aktivsten Fraktionen wurden anschließend mittels DC (s. 2.6.4) und HPLC (s. 2.6.6.2) genauer analysiert. Fraktionen mit einem ähnlichen Substanzspektrum wurden erneut vereinigt und über eine Sephadex LH20-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit Methanol als mobiler Phase weiter aufgereinigt.

## 2.6.6 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

### 2.6.6.1 Analytik von Urdamycinen

Zur qualitativen Analyse der Rohextrakte aus Kulturen des *S.fradiae* Tü2717 und der *S.fradiae*-Transformanten wurde neben der Dünnschichtchromatographie auch die HPLC eingesetzt. Alle Untersuchungen wurden auf einem HP 1090 Liquid Chromatograph der Firma Hewlett Packard (Waldbronn) durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen UV- und Dioden-Array-Detektor bei 254nm und 425nm. Zur Trennung wurde eine HP-ODS-Hypersil-Säule (5µm, 200 x 2mm) eingesetzt, der eine Vorsäule vorgeschaltet war. Die Flussrate betrug 0,3ml/min, das Injektionsvolumen 10µl einer geeigneten Verdünnung. Die Auswertung erfolgte mit der entsprechenden Software mit einem HP9000 Series 300 Computer (Hewlett Packard, Waldbronn). Als Fließmittelkomponenten wurden Acetonitril (Lichrosolv, Merck, Darmstadt), Phosphorsäure (p.a.) und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verwendet. Die Fließmittel wurden vor Gebrauch über einen Membranfilter (Porengröße 0,2µm) filtriert und während des gesamten HPLC-Laufs durch Helium entgast.

Fließmittel A: H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> conc. (99,9 : 0,1)

Fließmittel B: Acetonitril : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> conc. (99,9 : 0,1)

Folgende Elutionsbedingungen wurden gewählt:

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,1	95	5
10,0	90	10
20,0	75	25
30,0	70	30
40,0	60	40
42,0	58	42
43,0	5	95
52,0	5	95
53,0	95	5
60,0	95	5

#### 2.6.6.2 Analytik von Avilamycinen und Gavibamycinen

Zur Analyse der Avilamycine und Gavibamycine wurden mehrere geeignete Methoden entwickelt, abhängig von der jeweils zur Verfügung stehenden HPLC-Anlage.

a) HPLC unter Verwendung des HP 1090 Liquid Chromatograph (Hewlett Packard, Waldbronn):

Die Trennung der jeweiligen Substanzen erfolgte über eine HP-ODS-Hypersil-Säule (5µm, 200 x 2mm) mit Vorsäule, die Detektion über einen Dioden-Array-Detektor bei 210nm und 290nm. Die Flussrate betrug 0,2ml/min, das Injektionsvolumen 10µl einer geeigneten Verdünnung. Die Auswertung erfolgte mit einem HP9000 Series 300 Computer und der entsprechenden Software (Hewlett Packard, Waldbronn). Folgendes Fließmittelsystem und folgender Gradient wurden verwendet:

Fließmittel A: 0,04M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0

Fließmittel B: Methanol 100% (Lichrosolv, Merck, Darmstadt)

Die Fließmittel wurden vor Gebrauch über einen Membranfilter (Porengröße 0,2µm) filtriert und während des gesamten HPLC-Laufs durch Helium entgast.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,01	70	30
5,00	50	50
10,00	45	55
20,00	40	60
25,00	38	62
28,00	38	62
29,00	70	30
35,00	70	30



b) HPLC unter Verwendung einer Anlage vom Typ Alliance HT, Waters 2790 (Waters, Eschborn):

Es wurden Methoden zur Analyse der Produkte des Wildtypstamms *S.viridochromogenes* Tü57 und der verschiedenen Methyltransferasemutanten *S.viridochromogenes* GW1 bis GW5 entwickelt. Die Auftrennung erfolgte jeweils bei einer Flussrate von 1,2ml/min über eine ProC18-Säule (50x4mm, Partikelgröße 3µm, Porendurchmesser 120Å) (Kronlab GmbH, Sinsheim). Detektiert wurde mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors (Waters 996, Waters, Eschborn) bei 220nm. Die Probentemperatur (Temperatur des Autosamplers) wurde konstant auf 4°C gehalten, die der Säule auf 30°C. Als Fließmittelkomponenten wurden Acetonitril (Lichrosolv, Merck, Darmstadt), Eisessig (p.a.) und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verwendet.

Fließmittel A: H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> : Eisessig (99,5 : 0,5)

Fließmittel B: Acetonitril 100%

Das Einspritzvolumen betrug abhängig von der jeweiligen Probe 10-40µl einer geeigneten Verdünnung. Eluiert wurde unter den nachfolgend aufgelisteten Bedingungen.

- Avilamycin-Standard (Eli Lilly), Extrakte aus *S.viridochromogenes* Tü57, *S.viridochromogenes* GW1 und GW4:

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Curve
0,00	100	0	1
2,00	60	40	6
13,00	45	55	6
15,00	0	100	6
16,00	0	100	6
16,50	100	0	6

- Extrakte aus *S.viridochromogenes* GW2 und GW5:

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Curve
0,00	100	0	1
2,00	80	20	6
20,00	45	55	6
22,00	0	100	6
23,00	0	100	6
23,50	100	0	6

- Extrakte aus *S. viridochromogenes* GW3:

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Curve
0,00	100	0	1
2,00	90	10	6
18,00	45	55	6
20,00	0	100	6
21,00	0	100	6
21,50	100	0	6

### 2.6.6.3 Präparative Isolierung von Gavibamycin A3

Um für eine MIC-Wert-Bestimmung ausreichende Mengen an reiner Substanz zu erhalten, wurde Gavibamycin A3, ausgehend von 3l Kultur, durch Bindung an das Sep-Pak<sup>®</sup>C<sub>18</sub>-Harz (Waters, Eschborn) (s. 2.6.2.2) isoliert und durch präparative DC und HPLC gereinigt.

#### a) Präparative Dünnschichtchromatographie:

Das mit 60% Methanol von dem Sep-Pak<sup>®</sup>C<sub>18</sub>-Harz eluierende Substanzgemisch mit Gavibamycin A3 als Hauptbestandteil wurde in 400µl Methanol gelöst und streifenförmig über eine Strecke von ca. 18cm auf eine DC-Platte (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Nach Entwicklung in Dichlormethan/Methanol (9:1) wurde links und rechts jeweils ein schmaler Streifen abgeschnitten und zur Detektion der Gavibamycine mit Anisaldehydlösung besprüht (s. 2.6.4). Anschließend wurde die dem Hauptprodukt Gavibamycin A3 entsprechende Bande aus dem noch unbesprühten Teil des Dünnschichtchromatogramms mit Hilfe eines Skalpells abgekratzt und mit 6ml Methanol extrahiert. Das Methanol wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand bis zur weiteren Verwendung bzw. Analyse bei -20°C gelagert.

#### b) Präparative HPLC:

Zur Trennung von Gavibamycin A3 von den letzten Verunreinigungen wurde eine präparative HPLC durchgeführt. Verwendet wurde eine Waters-Anlage mit zwei Pumpen vom Typ 510 mit semipräparativer Säule (Grom-Sil 120 ODS-4 HE, 11µm, 250x8mm; Fa. Grom, Herrenberg) und UV-Detektor (Typ 486). Die Flussrate betrug 2ml/min, injiziert wurden jeweils 50µl des in 500µl Methanol gelösten Rückstands aus a), detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 220nm. Als Fließmittel wurden 0,04M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,0 und Methanol (Lichrosolv, Merck, Darmstadt) eingesetzt. Eluiert wurde unter folgenden Bedingungen:

Fließmittel A: 0,04M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0

Fließmittel B: Methanol 100%

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Curve
initial	60	40	*
4,00	60	40	6
5,00	50	50	6
12,00	50	50	6
32,00	2	98	6
37,00	2	98	6
41,00	60	40	6

Der Peak mit einer Retentionszeit von 29,76min wurde als Gavibamycin A3 identifiziert, die entsprechenden Fraktionen aufgefangen und anschließend vereinigt. Nach Entfernung des Methanols am Rotationsverdampfer wurde die verbliebene wässrige Phase bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bei  $-40^{\circ}\text{C}$  über Nacht lyophilisiert. Eine Entfernung des  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  mittels Gelfiltration wurde in diesem Fall nicht durchgeführt.

## 2.6.7 Massenspektrometrische Analysemethoden

### 2.6.7.1 HPLC-ESI-MS

Avilamycin-Derivate wurden über eine HPLC (HP1110, Hewlett Packard, Waldbronn) unter Verwendung einer HP-ODS-Hypersil  $\text{C}_{18}$ -Säule (100x2,1mm; 5 $\mu\text{m}$ ) und einer Flussrate von 0,1ml/min mit folgendem Gradienten aufgetrennt, bei 220nm detektiert und anschließend massenspektrometrisch vermessen:

Fließmittel A:  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  : Methanol (Lichrosolv) (60 : 40)

Fließmittel B: Methanol 100% (Lichrosolv, Merck, Darmstadt)

0-5min	linearer Gradient von 0% auf 20% Fließmittel B
5-120min	linearer Gradient von 20% auf 90% Fließmittel B

Die Massenspektren wurden auf einem Bruker Esquire-LC 1.6n Massenspektrometer (Bruker Daltonik) aufgenommen. Als Ionisierungsmethode diente die Electrospray-Ionisation, betrieben im positiven Modus.

Die Messungen wurden von Herrn Dr. U. Girreser am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Kiel durchgeführt.

### 2.6.7.2 GC-MS

Die von der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 produzierten Gavibamycine wurden durch Ethylierung derivatisiert und anschließend mittels GC-MS analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Derivate zunächst in DMSO/Acetonitril (3:40) gelöst und nach Zugabe von Ethyliodid und  $\text{K}_2\text{CO}_3$  über Nacht inkubiert. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und die zurückbleibenden Derivate mit methanolischer HCl 15min bei  $115^{\circ}\text{C}$  hydrolysiert. Nach Entfernung des Methanols wurden die Produkte mit Diazomethan in Ethanol behandelt (30min,  $20^{\circ}\text{C}$ ), das Lösungsmittel erneut unter Vakuum abgezogen und die entstandenen Derivate mit Diethylether extrahiert. Die nachfolgende GC-MS-Analyse wurde auf einer Anlage des Typs Hewlett Packard 5973 MSD (Hewlett Packard, Waldbronn) durchgeführt. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronenstoß (EI). Als Säule wurde eine SE54-Säule (12m x 0,25mm;  $d_f=0,125\mu\text{m}$ )

verwendet, die während eines Laufs folgendermaßen temperiert wurde: 2min 50°C, Temperaturanstieg auf 100°C mit 25°C/min, Temperaturanstieg auf 250°C mit 5°C/min.

Sowohl die Derivatisierung als auch die GC-MS-Analyse wurden von Herrn Dr. R. Süßmuth am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

### 2.6.7.3 ESI-MS

Die Messungen erfolgten auf einem API III TAGA SCIEX (Perkin Elmer, Thornhill, Ontario, Canada), ausgestattet mit einer Electrospray-Ionenquelle und wurden von Herrn Dr. R. Süßmuth am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt. Die aus dem Wildtypstamm *S.viridochromogenes* Tü57 und der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 isolierten Produkte wurden in Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (1:1) + 0,1% Essigsäure verdünnt und über eine Mikrokapillare mit einer Flussrate von 80µl/min (Solvent Delivery System Model S1020, Sycam, Gilching) in 2min-Intervallen der Ionenquelle zugeführt (Gilson Abimed Model131).

### 2.6.8 Bestimmung von MIC-Werten

Es wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK bzw. MIC) neuer Avilamycin-Derivate (=Gavibamycine) gegen verschiedene Gram-positive Bakterienstämme bestimmt. Die Bestimmung erfolgte nach der Mikrodilutions-Methode gemäß NCCLS-Vorschriften (NCCLS, Januar 1997), d.h. in der Mikrotiterplatte (96 well, 100µl Ansatz pro well). Verwendet wurde "Cation adjusted Mueller Hinton Broth with TES" (Sensititre<sup>®</sup>) mit [Ca<sup>2+</sup>]=20-25mg/ml und [Mg<sup>2+</sup>]=10-12mg/ml. Im Falle des *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 wurde dem Medium lysiertes Pferdeblut bis zu einer Endkonzentration von 5% zugesetzt. Von allen zu testenden Substanzen wurde zunächst eine Stammlösung in DMSO mit einer Konzentration von 5mg/ml hergestellt, anschließend 1:100 mit Mueller-Hinton Medium verdünnt (Endkonzentration 50µg/ml) und von dieser Lösung ausgehend eine Verdünnungsreihe (jeweils 1:1-Verdünnungen) angefertigt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Sequenzierung des Avilamycin-Biosynthesegenclusters aus *S. viridochromogenes* Tü57

Das Avilamycin-Biosynthesegencluster konnte von S. Gaisser im Rahmen ihrer Dissertation kloniert werden (Dissertationsschrift S. Gaisser, 1998). Zu diesem Zweck wurde eine Cosmidbank im Vektor pOJ446 hergestellt und mit einer dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen-Sonde gescreent. Insgesamt sechs positive, d.h. mit der Sonde hybridisierende Cosmide konnten identifiziert und isoliert werden, bezeichnet als P5, E1A, P4, H4, F4 und P2. Durch Restriktionskartierung, Southern-Hybridisierungsexperimente und partielle Sequenzierung gelang es, die Anordnung der Cosmide P4, H4, F4 und P2 zu bestimmen. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass auf den genannten Cosmiden Avilamycin-Biosynthesegene enthalten waren. Daraufhin wurden die Cosmide H4 und F4 mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, die entstandenen Fragmente subkloniert und ausgewählte Klone sequenziert (Dissertationsschrift S. Gaisser, 1998; A. Trefzer, persönliche Mitteilung). Auf diese Weise konnten insgesamt 36 offene Leserahmen identifiziert werden. Einem großen Teil dieser offenen Leserahmen konnte aufgrund von Homologievergleichen in der Datenbank eine mögliche Genfunktion zugeordnet werden (s. Tab. 24). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, den noch fehlenden Teil des Biosynthesegenclusters zu sequenzieren und bezüglich möglicher Genfunktionen zu analysieren. Um dies zu erreichen, wurde das Cosmid P2, welches Teile aus dem Bereich stromabwärts des bereits sequenzierten Bereichs enthielt, durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen in kleinere Fragmente gespalten. Ausgewählte Fragmente wurden subkloniert und sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass durch die vorhandenen Cosmide nicht das gesamte Cluster repräsentiert war. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit dem Ressourcenzentrum (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) eine neue Cosmidbank unter Verwendung des Vektors pKC505 angelegt und mit Sonden aus den Randbereichen der bekannten Cosmide F4 und P2 gescreent. Es handelte sich hierbei um ein Fragment, das das Gen *aviRb* enthielt, und ein *SacI*-Fragment aus dem 3'-Endbereich des Cosmids P2 (P2S5). Von A. Trefzer konnte gezeigt werden, dass auf den mit der *aviRb*-Sonde hybridisierenden Cosmiden stromaufwärts des bekannten Bereichs keine Avilamycin-Biosynthesegene mehr lokalisiert sind, und somit das Ende

des Clusters bereits erreicht war (A. Trefzer, persönliche Mitteilung). Alle Untersuchungen zu den mit dem *SacI*-Fragment hybridisierenden Cosmiden sind Teil der vorliegenden Arbeit und werden im Folgenden genauer beschrieben.

### 3.1.1 Restriktionskartierung und Subklonierung ausgewählter Cosmide

#### 3.1.1.1 *Cosmid P2*

Zur Kartierung und Subklonierung des Cosmids P2 wurde dieses mit Restriktionsenzymen (*EcoRI*, *PstI* und *SacI*) gespalten und die entstandenen Fragmente in den Vektor pBluescript SK- shotgun-kloniert. Anschließend wurden die erhaltenen Subklone erneut mit denselben Enzymen behandelt. Durch Vergleich der jeweiligen Fragmentmuster und -größen konnten erste Informationen über die Lage der Restriktionsschnittstellen bzw. der subklonierten Fragmente auf dem Cosmid erhalten werden. Zur genaueren Analyse wurden die einzelnen Fragmente jeweils nach der unter 2.4.9 beschriebenen Methode von beiden Seiten unter Verwendung des T3- und des T7-Primers ansequenziert und die Sequenzdaten mit Hilfe des DNASIS Software-Pakets und BLAST (s. 2.4.9.4) ausgewertet. Dadurch war es möglich, einige Fragmente eindeutig dem bereits sequenzierten Bereich, d.h. dem überlappenden Bereich der beiden Cosmide P2 und F4 zuzuordnen. Insgesamt fünf Subklone enthielten jedoch DNA-Fragmente aus dem bis dahin noch unbekanntem Bereich, bezeichnet als P2S2, P2S2kl, P2S3, P2S5, P2P13 und P2E14. Aus den Ergebnissen der Restriktionskartierung und den Sequenzdaten konnten die Fragmente grob angeordnet werden. Um die exakte Reihenfolge festzustellen und für die Sequenzierung eine lückenlose Anordnung von Subklonen zu erhalten, wurden gezielt überlappende *SacI*- und *BamHI*-Fragmente kloniert (P13S7, P13S8, P13B34, P13B24, P13B1, P13B28; pBluescript SK- als Klonierungsvektor) und ebenfalls von beiden Seiten mit Hilfe des T3- und des T7-Primers ansequenziert. Zusätzlich wurden aus dem Subklon P2P13, der die letzten 9kb des bis dahin klonierten Biosynthesegenclusters enthielt, durch Deletion des Anfangsbereichs verkürzte Konstrukte hergestellt (P13ERe, P13K), so dass auch die letzte Lücke in der Sequenz geschlossen werden konnte. Eine genaue Anordnung der wichtigsten Fragmente ist in REF \_Ref5367160 \h Abb. 3 dargestellt. Die Fragmente aus P2S2, P2S3, P2S5, P13ERe und P13K wurden von den Firmen 4baselab (Reutlingen) bzw. MWG Biotech (Ebersberg) jeweils doppelsträngig sequenziert. Die Ergebnisse sind unter 3.1.2 beschrieben.

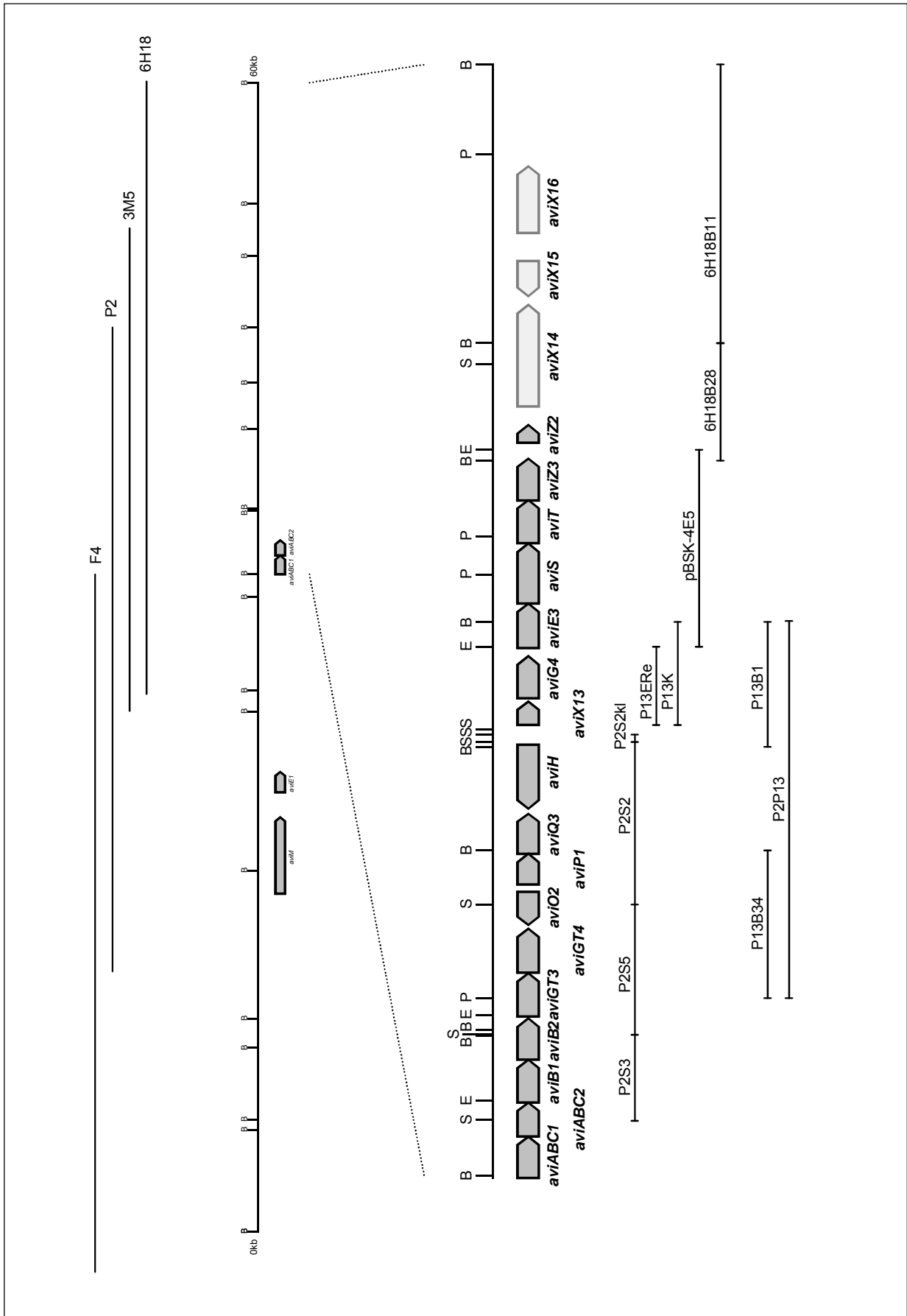


Abb. 3: Übersicht über den im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Bereich des Avilamycin-Biosynthesegenclusters und Anordnung der dafür verwendeten Cosmide und Subklone. Detektierte ORFs sind als Pfeile dargestellt.

### 3.1.1.2 Cosmide 3M5 und 6H18

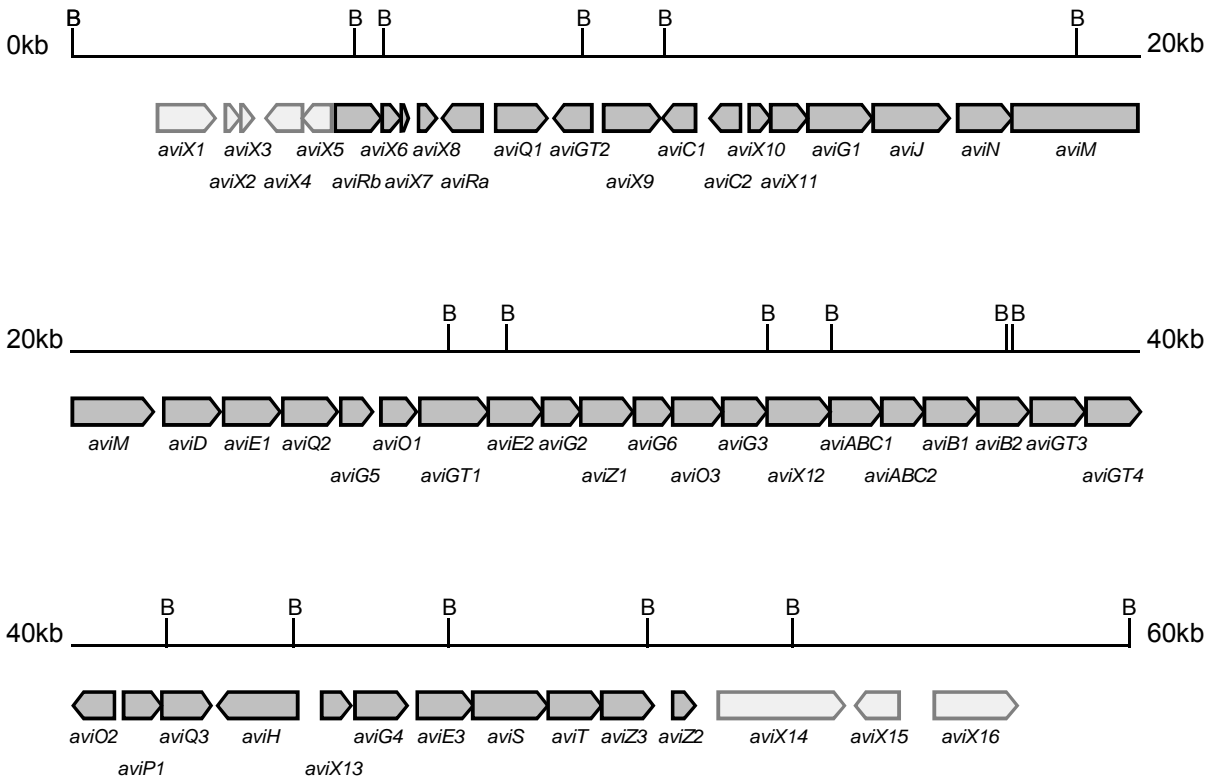
Beim Screenen der zweiten Cosmidbank mit der Sonde aus P2S5 zeigten insgesamt 12 Klone ein positives Signal. Die entsprechenden Cosmide wurden isoliert und durch Restriktionskartierung weiter charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden die Cosmide mit den Enzymen *EcoRI*, *SacI*, und *PstI* gespalten und die resultierenden Fragmente mit den Fragmenten aus dem Cosmid P2 verglichen. Durch Restriktion mit in Streptomyeten-DNA selten schneidenden Enzymen, wie *HindIII*, *SphI*, *XhoI*, *NdeI*, *BglII* und *EcoRV* und durch die erhaltenen Fragmentmuster aus den Doppel-Restriktionsverdauen *XhoI/EcoRV*, *NdeI/SphI* und *NdeI/XbaI* wurden zusätzliche Informationen zur Anordnung der Cosmide erhalten. Mehrere Cosmide erstreckten sich über den gewünschten Sequenzbereich. Zwei wurden ausgewählt (3M5 und 6H18) und weiter bearbeitet (zur Anordnung s. Abb. 3). Aufgrund der Kartierungsergebnisse konnten mögliche Anschlussfragmente stromabwärts von P2P13 identifiziert werden. Gezielt kloniert wurde ein ca. 5kb großes *EcoRI*-Fragment aus dem Cosmid 3M5 (pBSK-4E5), das mit P2P13 überlappt. Weitere Anschlussfragmente wurden durch Restriktion des Cosmids 6H18 mit *BamHI* und anschließende Shotgun-Klonierung der Fragmente in den Vektor pBluescript SK- erhalten. Alle klonierten Fragmente wurden unter Verwendung des T3- und des T7-Primers von beiden Seiten ansequenziert (s. 2.4.9). Neben pBSK-4E5 enthielten noch die beiden *BamHI*-Subklone 6H18B11 und 6H18B28 DNA aus dem bis dahin unbekanntem Bereich des Clusters (zur Anordnung innerhalb des Clusters vgl. Abb. 3). Alle drei Fragmente wurden von der Firma 4baselab (Reutlingen) doppelsträngig sequenziert. Die Ergebnisse der Auswertung der Sequenzdaten sind unter 3.1.2 dargestellt.

### 3.1.2 Partielle Sequenzierung der Cosmide P2, 3M5 und 6H18

Das gesamte Avilamycin-Biosynthesegencluster (vgl. Abb. 4) umfasst 46,8kb. Doppelsträngig sequenziert wurden insgesamt 59,8kb, 21,8kb davon im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Dazu wurden die unter 3.1.1 beschriebenen Subklone P2S2, P2S3, P2S5, P13ERe, P13K, pBSK-4E5, 6H18B11 und 6H18B28 hergestellt und bei den Firmen 4baselab (Reutlingen) und MWG Biotech (Ebersberg) zur doppelsträngigen Sequenzierung in Auftrag gegeben. Es wurden jeweils Universal-Primer (T3, T7, M13-reverse, M13-univers) oder abgeleitete interne Primer eingesetzt. Die erhaltenen Einzelsequenzen wurden mit den unter 2.4.9.4 aufgeführten Softwareprogrammen ausgewertet und anschließend zusammen mit der bereits bekannten Sequenz zur Gesamtsequenz zusammengefügt, welche in der Datenbank GenBank unter der



Datenbanknummer AF333038 hinterlegt ist. In Abb. 4 ist die genetische Organisation des gesamten Avilamycin-Biosynthesegenclusters, in Abb. 3 die Lage der analysierten Cosmide und Subklone dargestellt.



**Abb. 4: Genetische Organisation des Avilamycin-Biosynthesegenclusters. Gene, die zum Cluster gehören, sind als dunkle Pfeile dargestellt (jeweils in der entsprechenden Transkriptionsrichtung), Gene, die vermutlich nicht mehr zum Cluster gehören, sind als helle Pfeile dargestellt (B, *Bam*HI).**

Tab. 24 zeigt eine Auflistung aller sequenzierten Gene und die jeweils nachgewiesene oder lediglich auf Homologievergleichen basierende mögliche Funktion der abgeleiteten Proteine. Die im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten bzw. genauer charakterisierten Gene sind fett dargestellt.

Die DNA wies einen für Streptomyceten typischen hohen GC-Gehalt von 70,4% auf (Wright und Bibb, 1992). Es konnten insgesamt 54 offene Leserahmen (ORF) detektiert werden, von denen 46 innerhalb des Biosynthesegenclusters liegen.

Tab. 24: Zusammenfassung aller identifizierten Gene (vgl. auch Abb. 4) und der möglichen Funktionen der abgeleiteten Genprodukte

Gen	Größe d. Genprodukts [Aminosäuren]	Homologie zu	mögliche Funktion bzgl. d. Avilamycin-Biosynthese	Referenz
<i>aviX1</i>	363	GTP-Bindeprotein aus <i>M.tuberculosis</i>	unbekannt	Cole et al., 1998
<i>aviX2</i>	94	Protein mit unbekannter Funktion aus <i>S.coelicolor</i> A(3)2	unbekannt	Redenbach et al., 1996
<i>aviX3</i>	85	Protein mit unbekannter Funktion aus <i>S.coelicolor</i> A(3)2	unbekannt	Redenbach et al., 1996
<i>aviX4</i>	229	-	unbekannt	
<i>aviX5</i>	182	-	unbekannt	
<b><i>aviRb</i></b>	288	rRNA-Methyltransferase aus <i>Deinococcus radiodurans</i>	Resistenzvermittlung	White et al., 1999
<i>aviX6</i>	117	-	unbekannt	
<i>aviX7</i>	49	-	unbekannt	
<i>aviX8</i>	114	-	unbekannt	
<b><i>aviRa</i></b>	251	-	Resistenzvermittlung	Weitnauer et al., 2001
<i>aviQ1</i>	323	UDP-Glucose 4-Epimerase aus <i>Thermotoga maritima</i>	Zuckerbiosynthese	Nelson et al., 1999
<i>aviGT2</i>	241	Glykosyltransferase (Cps2J) aus <i>Streptococcus suis</i>	Biosynthese der Heptasaccharidkette	Smith et al., 1999
<i>aviX9</i>	356	hypothetisches Protein aus <i>S.coelicolor</i> A(3)2	unbekannt	Redenbach et al., 1996
<i>aviC1</i>	207	putatives Zwei-Komponenten-Regulationssystem aus <i>Staph.aureus</i>	Regulation	Kuroda et al., 2000
<i>aviC2</i>	193	putativer "Response"-Regulator aus <i>S.noursei</i>	Regulation	Summers et al., 1997
<i>aviX10</i>	137	-	unbekannt	
<i>aviX11</i>	232	-	unbekannt	
<b><i>aviG1</i></b>	408	TylCIII aus <i>S.fradiae</i>	C-Methyltransferase; Biosynthese der 2-Desoxy-D-avalose	Bate et al., 2000
<i>aviJ</i>	477	putativer Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter aus <i>Amycolatopsis orientalis</i>	Avilamycin-Export	Kaneko et al., 1996
<i>aviN</i>	344	DpsC aus <i>S.peuceitius</i> ATCC29050	Orsellinsäure-Biosynthese	Gaisser et al., 1997
<i>aviM</i>	1294	6-Methylsalicylsäure-Synthase aus <i>Penicillium patulum</i>	Orsellinsäure-Biosynthese	Gaisser et al., 1997
<i>aviD</i>	356	dTDP-Glucose Synthetase aus <i>S.griseus</i>	Zuckerbiosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy-D-avalose)	Gaisser et al., 1997

Gen	Größe d. Genprodukts [Aminosäuren]	Homologie zu	mögliche Funktion bzgl. d. Avilamycin-Biosynthese	Referenz
<i>aviE1</i>	356	dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase aus <i>S.spectabilis</i>	Zuckerbiosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy-D-avalose)	Gaisser et al., 1997
<i>aviQ2</i>	343	UDP-Glucose 4-Epimerase aus <i>Thermotoga maritima</i>	Zuckerbiosynthese	Nelson et al., 1999
<b><i>aviG5</i></b>	200	putative Methyltransferase aus <i>Aeropyrum pernix</i> K1	Zuckermodifizierung (Methylierung)	Kawarabayasi et al., 1999
<i>aviO1</i>	224	L-Prolin-4-hydroxylase aus <i>Dactylosporangium</i> sp.	Ausbildung der C-O-C-Bindung	Shibasaki et al., 1999
<i>aviGT1</i>	431	Glykosyltransferase aus <i>S.nogalater</i>	Biosynthese der Heptasaccharidkette	Ylihonko et al., 1996
<i>aviE2</i>	338	dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase aus <i>S.coelicolor</i> A(3)2	Zuckerbiosynthese	Redenbach et al., 1996
<b><i>aviG2</i></b>	241	putative Methyltransferase aus <i>Deinococcus radiodurans</i>	Zuckermodifizierung (Methylierung)	White et al., 1999
<i>aviZ1</i>	331	putative Oxidoreduktase aus <i>P.aeruginosa</i> PA01	Zuckerbiosynthese	Stover et al., 2000
<i>aviG6</i>	240	putative Methyltransferase aus <i>S.avermitilis</i>	Zuckermodifizierung (Methylierung)	Omura et al., 2001
<i>aviO3</i>	315	SnoK aus <i>S.nogalater</i>	Ausbildung der C-O-C-Bindung	Torkkell et al., 2000
<b><i>aviG3</i></b>	278	Protein mit unbekannter Funktion aus <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Zuckermodifizierung	Nagy et al., 1999
<i>aviX12</i>	397	EryCV aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	unbekannt	Summers et al., 1997; Gaisser et al., 1997
<b><i>aviABC1</i></b>	324	DrrA aus <i>S.peuceetius</i>	Avilamycin-Export	Weitnauer et al., 2001
<b><i>aviABC2</i></b>	266	DrrB aus <i>S.peuceetius</i>	Avilamycin-Export	Weitnauer et al., 2001
<b><i>aviB1</i></b>	335	Pyruvatdehydrogenase ( $\alpha$ -Untereinheit) aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	Zuckermodifizierung (Methyleurekanat-Biosynthese)	She et al., 2001
<b><i>aviB2</i></b>	321	Pyruvatdehydrogenase ( $\beta$ -Untereinheit) aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	Zuckermodifizierung (Methyleurekanat-Biosynthese)	She et al., 2001
<b><i>aviGT3</i></b>	339	putative Rhamnosyltransferase aus <i>Pyrococcus abyssi</i>	Biosynthese der Heptasaccharidkette	Genoscope ( <i>P.abysssi</i> Genomprojekt), 1999
<b><i>aviGT4</i></b>	343	putative Mannosyltransferase (WbaZ-2) aus <i>A.fulgidus</i>	Biosynthese der Heptasaccharidkette	Klenk et al., 1997

Gen	Größe d. Genprodukts [Aminosäuren]	Homologie zu	mögliche Funktion bzgl. d. Avilamycin-Biosynthese	Referenz
<b>aviO2</b>	259	L-Prolin-4-hydroxylase aus <i>Dactylosporangium</i> sp.	Ausbildung der C-O-C-Bindung	Shibasaki et al., 1999
<b>aviP</b>	241	p-Nitrophenyl-Phosphatase aus <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	Zuckerbiosynthese (L-Lyxose)	Ng et al., 2000
<b>aviQ3</b>	311	Spcl aus <i>S.flavopersicus</i>	Zuckerbiosynthese	Lyutzkanova et al., 1997
<b>aviH</b>	500	ComH aus <i>S.lavendulae</i>	Modifizierung (Halogenierung)	Chiu et al., 2001
<b>aviX13</b>	185	-	unbekannt	
<b>aviG4</b>	329	O-Demethylpuromycin-O-Methyltransferase aus <i>S.alboniger</i>	Modifizierung (Methylierung)	Lacalle et al., 1991
<b>aviE3</b>	349	dGDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus <i>S.noursei</i> ATCC11455	Zuckerbiosynthese (4-O-Methyl-D-fucose)	Brautaset et al., 2000
<b>aviS</b>	469	putative 2,3-Dehydratase aus <i>S.argillaceus</i>	Zuckerbiosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy-D-evalose)	Lombo et al., 1996
<b>aviT</b>	337	putative 3-Ketoreduktase (AknQ) aus <i>S.galilaeus</i>	Zuckerbiosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy-D-evalose)	Raty et al., 2000
<b>aviZ3</b>	317	putative 4-Ketoreduktase (SnoG) aus <i>S.nogalater</i>	Zuckerbiosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy-D-evalose)	Ylihonko et al., 1996
<b>aviZ2</b>	141	kurzkettige Oxidoreduktase aus <i>S.coelicolor</i> A(3)2	Zuckerbiosynthese	Redenbach et al., 1996
<b>aviX14</b>	791	putative Helikase aus <i>S.coelicolor</i> A(3)2	unbekannt	Redenbach et al., 1996
<b>aviX15</b>	276	putatives DNA-Bindeprotein aus <i>S.coelicolor</i> A(3)2	unbekannt	Redenbach et al., 1996
<b>aviX16</b>	520	alkalische Serin-Protease aus <i>Alteromonas</i> sp. Stamm O-7	unbekannt	Tsujibo et al., 1993

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Sequenzdaten (betrifft den Bereich stromabwärts der ABC-Transportergene, d.h. *aviB1* bis *aviX16*) ausführlicher beschrieben. Eine Einteilung der einzelnen Gene bzw. der davon abgeleiteten Proteine erfolgte in Gruppen gemäß ihrer möglichen Funktion. Eine Auswertung der für die Gene *aviRa*, *aviQ1* und *aviN* bis *aviE1* erhaltenen Nukleotidsequenzen findet sich in der Dissertationsschrift von S. Gaiser (1998). Mögliche Funktionen für alle übrigen Gene stromaufwärts der ABC-Transportergene finden sich in Tab. 24 und werden im Zusammenhang mit einzelnen Biosyntheseschritten zum Teil ebenfalls im folgenden Abschnitt aufgeführt. Die im

Cluster gefundenen Resistenzgene und putativen Methyltransferasegene werden schließlich in den entsprechenden Kapiteln der vorliegenden Dissertationsschrift (s. 3.2, 3.3 und 3.4) ausführlich behandelt.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse dieser detaillierten Sequenzanalyse wurde der in Abb. 5 gezeigte mögliche Biosyntheseweg für Avilamycin erstellt.

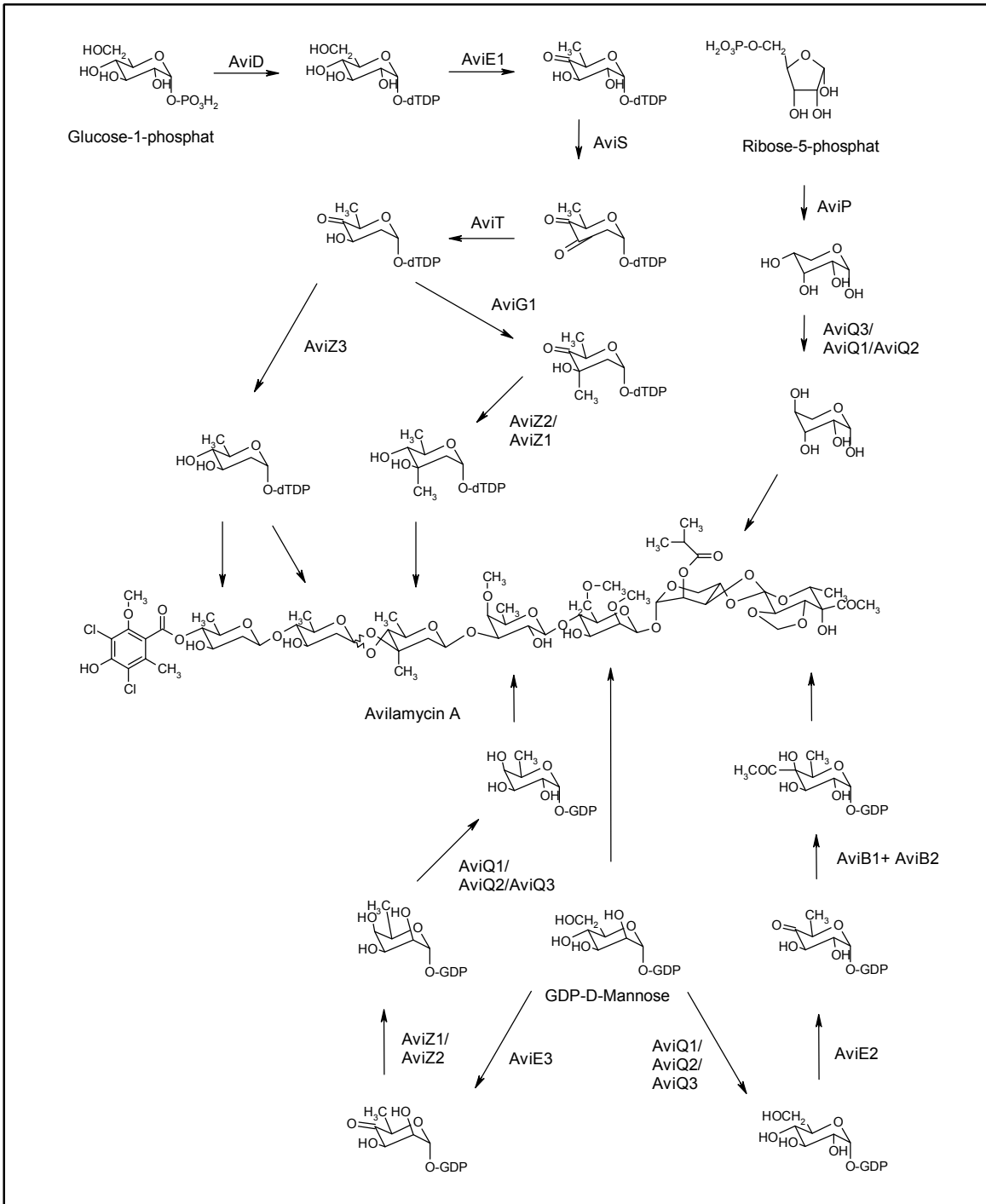


Abb. 5: Hypothetischer Avilamycin-Biosyntheseweg

### 3.1.2.1 Enzyme der Dichloroisoeverninsäure-Biosynthese

Wie bereits von S. Gaisser gezeigt werden konnte, handelt es sich bei AviM um die Orsellinsäuresynthase (Gaisser et al., 1997). Durch zweifache Chlorierung des aromatischen Rings der Orsellinsäure und Methylierung der zur Säuregruppe ortho-ständigen Hydroxylgruppe gelangt man zur Dichloroisoeverninsäure, dem Polyketidanteil der Avilamycine. Im Cluster konnten zwei für die entsprechenden Enzyme codierende Gene detektiert werden. Das von *aviG4* (987bp) abgeleitete Protein (329 Aminosäuren; berechnetes Molekulargewicht 34,3kDa) besitzt hohe Ähnlichkeit zu DmpM, der O-Demethylpuromycin-O-Methyltransferase aus *S.alboniger* (Lacalle et al., 1991) (44% identische Aminosäuren). DmpM ist für die Methylierung der phenolischen Hydroxylgruppe im Nukleosidantibiotikum Puromycin verantwortlich. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur Orsellinsäure wurde für AviG4 eine vergleichbare Funktion angenommen. Durch Inaktivierung des Gens in *S.viridochromogenes* Tü57 und anschließende Strukturanalyse der gebildeten Avilamycin-Derivate konnte dies auch experimentell bestätigt werden (vgl. Kap. 3.3.3 dieser Arbeit).

Die von *aviH* (1500bp) abgeleitete Aminosäuresequenz (500 Aminosäuren; berechnetes Molekulargewicht 54,2kDa) zeigte bei Datenbankvergleichen signifikante Homologie (37% identische Aminosäuren) zu ComH, einer Halogenase aus *S.lavendulae* (Chiu et al., 2001), die vermutlich in die zweifache Chlorierung eines Hydroxyphenylglycinrestes des Complestatin-Peptidrückgrats involviert ist. Die Transkription von *aviH* erfolgt entgegengesetzt zu den meisten anderen Genen des Avilamycin-Biosynthesegenclusters. Wie im Falle von AviG4, wurde auch hier aufgrund gewisser struktureller Ähnlichkeiten zwischen den beiden Resten Hydroxyphenylglycin und Orsellinsäure eine zu ComH analoge Funktion von AviH angenommen, was durch Geninaktivierung bereits nachgewiesen werden konnte (Weitnauer et al., 2001). Dabei zeigte sich, dass AviH für die Einführung beider Chloratome verantwortlich ist.

### 3.1.2.2 Enzyme der Desoxyzuckerbiosynthese

Die Heptasaccharidkette der Avilamycine setzt sich zusammen aus den Zuckern D-Olivose, 2-Desoxy-D-avalose, D-Fucose, D-Mannose, L-Lyxose und Methyleurekanat, die unterschiedliche Modifizierungen aufweisen können. Mit Ausnahme der D-Mannose handelt es sich bei allen Zuckern um Desoxyzucker. Im Cluster konnten diverse Gene identifiziert werden, die für die Desoxyzuckerbiosynthese eine Rolle spielen könnten. So konnte im Sequenzbereich stromabwärts der ABC-Transportergene zusätzlich zu *aviE1* und *aviE2* ein drittes Dehydratasegen, bezeichnet als *aviE3* (1047bp), detektiert werden.

Basierend auf den Ergebnissen von Homologievergleichen des abgeleiteten 349 Aminosäuren großen Genprodukts ( $M_r$  38,4kDa) handelt es sich bei *aviE3* um eine dGDP-Mannose-4,6-Dehydratase (61% identische Aminosäuren mit *NysDIII*, einer dGDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *S.noursei* (Brautaset et al., 2000), und 51% identische Aminosäuren mit einer dGDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Stover et al., 2000)). Ca. 4,8kb stromaufwärts von *aviE3* wurde ein putatives Epimerasegen, das dritte im Avilamycin-Biosynthesegencluster, gefunden, bezeichnet als *aviQ3* (969bp). Das durch dieses Gen codierte Protein (323 Aminosäuren;  $M_r$  33,3kDa) weist starke Ähnlichkeit zu einer putativen Epimerase (*Spcl*) aus *S.flavopersicus* auf (Lyutskanova et al., 1997) (44% identische Aminosäuren), während die Genprodukte der beiden anderen möglichen Epimerasegene, *aviQ1* und *aviQ2*, homolog zu einer UDP-Glucose-4-Epimerase aus *Thermotoga maritima* sind (Nelson et al., 1999) (*aviQ1*: 43% identische Aminosäuren; *aviQ2*: 38% identische Aminosäuren). Weitere für die Desoxyzuckerbiosynthese charakteristische Gene liegen am 3'-Ende des Clusters. Es sind dies die Gene *aviS*, *aviT*, *aviZ3* und *aviZ2*. *aviS* liegt stromabwärts von *aviE3*. Das Startcodon liegt vier Basen vor dessen Stopcodon. *aviS* (1407bp) codiert für ein 469 Aminosäuren großes Protein ( $M_r$  51,9kDa). Auf Proteinebene wurden Homologien zu NDP-Hexose-2,3-Dehydratasen aus verschiedenen Species gefunden. Die höchste Homologie bestand mit 53% identischen Aminosäuren zu einer putativen NDP-Hexose-2,3-Dehydratase aus *S.argillaceus* (Lombo et al., 1996). Direkt im Anschluß an *aviS* (5bp stromabwärts) ist ein als *aviT* bezeichnetes Gen lokalisiert mit einer Größe von 1011bp. Sequenzvergleiche des davon abgeleiteten 337 Aminosäuren langen Genprodukts ( $M_r$  35,9kDa) in der Datenbank deuteten darauf hin, dass es sich hierbei um eine Oxidoreduktase handelt. Signifikante Homologien wurden unter anderem zu *LanT*, einer Oxidoreduktase aus *S.cyanogenus* (Westrich et al., 1998) (52% identische Aminosäuren), *Gra-orf26* aus *S.violaceoruber* (Ichinose et al., 1998) (50% identische Aminosäuren) und einer putativen 3-Ketoreduktase (*AknQ*) aus *S.galliaeus* (Raty et al., 2000) (54% identische Aminosäuren) gefunden. 17bp hinter *aviT* beginnt *aviZ3*, ein Gen, das für ein 317 Aminosäuren langes Protein codiert, das eindeutige Ähnlichkeit zu diversen NDP-Hexose-4-Ketoreduktasen aufweist. Am stärksten war diese im Vergleich zu *SnoG*, einer putativen NDP-Hexose-4-Ketoreduktase aus *S.nogalater* (Ylihonko et al., 1996) (44% identische Aminosäuren). Aufgrund der bestehenden Homologien wurde eine Beteiligung der drei Enzyme *aviS*, *aviT* und *aviZ3* an der Umwandlung von dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose zu dTDP-D-Olivose postuliert. dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose entsteht aus Glucose-1-phosphat in einer zweistufigen Reaktion. Diese umfasst Nukleotidylierung von Glucose-1-

phosphat durch eine dTDP-Glucose-Synthase und anschließende Umsetzung zu dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose, katalysiert durch eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase. Als entsprechend zuständige Enzyme im Avilamycin-Biosyntheseweg kommen AviD und AviE1 in Frage. AviD stimmt, bezogen auf die Aminosäuresequenz, zu 62% mit einer dTDP-Glucose-Synthase aus *S.griseus* überein (Distler et al., 1997), und AviE1 zu 59% mit einer dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase aus *S.spectabilis* (Hyun et al., 2000), wobei für AviE1 die entsprechende Enzymaktivität in-vitro bereits nachgewiesen werden konnte (A. Mühlenweg, persönliche Mitteilung). Unter Berücksichtigung der gefundenen Sequenzhomologien könnte AviS anschließend für die Dehydroxylierung an Position C2, AviT für die Reduktion der während der C2-Dehydroxylierung entstandenen Ketogruppe an C3 und AviZ3 für die Reduktion der Ketogruppe an Position C4 verantwortlich sein, um zum Endprodukt dTDP-D-Olivose zu gelangen. 360bp stromabwärts von *aviZ3* liegt *aviZ2*, ein weiteres mögliches Oxidoreduktasegen. Von diesem Gen lässt sich ein 141 Aminosäuren langes Protein ableiten ( $M_r$  14,6kDa), das bei Sequenzvergleichen Ähnlichkeiten zu verschiedenen Oxidoreduktasen aufweist (70% identische Aminosäuren mit einer kurzkettigen Oxidoreduktase aus *S.coelicolor* A3(2) (Redenbach et al., 1996)). *AviZ2* könnte ebenso wie das im Bereich stromaufwärts der ABC-Transportergene lokalisierte *aviZ1*, einem dritten Gen, dessen Genprodukt Homologien zu Oxidoreduktasen zeigt (38% identische Aminosäuren zu einer putativen Oxidoreduktase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Stover et al., 2000)), eine Funktion bei der Biosynthese von 2-Desoxy-D-evalose ausüben. 2-Desoxy-D-evalose unterscheidet sich von D-Olivose lediglich durch eine Methylgruppe an Position C3. dTDP-4-Keto-2,6-didesoxy-D-glucose, entstanden aus dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose nach Umsetzung mit AviS und AviT, stellt vermutlich ein wichtiges Intermediat der Biosynthese dieses Zuckers dar. Methylierung an C3, katalysiert durch AviG1 (zu 54% identisch mit TylCIII, einer C-Methyltransferase aus *S.fradiae* (Bate et al., 2000)) und Reduktion der Ketogruppe an Position C4 durch AviZ1 oder AviZ2 führen schließlich zum Endprodukt dTDP-2-Desoxy-D-evalose. Die Biosynthese des D-Fucose-Restes der Avilamycin-Heptasaccharidkette erfordert ebenfalls eine Desoxygenierung an Position C6 und zusätzlich noch eine Epimerisierung an C2. Vorstellbar ist, dass ausgehend von GDP-D-Mannose unter Einwirkung von AviE3 GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose gebildet und durch Reduktion der 4-Ketogruppe durch AviZ1 oder AviZ2 und Epimerisierung durch AviQ1, AviQ2 oder AviQ3 weiter umgesetzt wird. Neben Glucose-1-phosphat und nukleotidaktivierter D-Mannose wird für die Synthese der Heptasaccharidkette der Avilamycine vermutlich noch ein dritter "Zuckerpool" des Primärstoffwechsels benötigt. Stromaufwärts von *aviQ3* liegt ein 723bp großes Gen,



bezeichnet als *aviP*, dessen Genprodukt (241 Aminosäuren;  $M_r$  25,7kDa) homolog zu Pho2, einer p-Nitrophenyl-Phosphatase aus *Halobacterium* sp. NRC-1 (Ng et al., 2000) (34% identische Aminosäuren), und zu einer putativen Hydrolase aus *S.coelicolor* A(3)2 (Redenbach et al., 1996) (28% identische Aminosäuren) ist. Dies führte zu der Hypothese, dass die Biosynthese der L-Lyxose möglicherweise mit D-Ribose-5-phosphat, einem Produkt des Pentosephosphatwegs, startet und, katalysiert durch AviP, zunächst dephosphoryliert und anschließend zur L-Lyxose epimerisiert wird, wobei wiederum entweder AviQ1, AviQ2 oder AviQ3 beteiligt sein könnten. Methyleurekanat schließlich kann als ein D-Fucose-Derivat angesehen werden. D.h. die Biosynthese würde wie oben bereits beschrieben mit GDP-D-Mannose beginnen. Nach Epimerisierung an Position C2, was entweder von AviQ1, AviQ2 oder AviQ3 übernommen werden könnte, und 4,6-Dehydratisierung durch AviE2 entsteht GDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose, welche im letzten Schritt durch AviB1+AviB2 weiter zum Methyleurekanat umgesetzt werden kann. Die beiden Gene *aviB1* und *aviB2* liegen stromabwärts der ABC-Transportergene, wobei sich das Stopcodon von *aviABC2* und das Startcodon von *aviB1* überlappen. *AviB1* besteht aus 1005 Nukleotiden, *aviB2* aus 963. Das von *aviB1* abgeleitete Genprodukt (335 Aminosäuren;  $M_r$  35,1 kDa) weist 50% identische Aminosäuren mit der  $\alpha$ -Untereinheit einer Pyruvatdehydrogenase aus *Sulfolobus solfataricus* auf (She et al., 2001), das von *aviB2* abgeleitete Genprodukt (321 Aminosäuren;  $M_r$  33,9 kDa) 46% identische Aminosäuren mit der entsprechenden  $\beta$ -Untereinheit (She et al., 2001). Aufgrund dieser bestehenden Homologie wird angenommen, dass AviB1 und AviB2 die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat katalysieren, aus der Acetat hervorgeht, welches dann, möglicherweise ebenfalls bedingt durch AviB1 und AviB2, im letzten Schritt der Methyleurekanatsynthese auf den Zucker übertragen wird.

### 3.1.2.3 Glykosyltransferasen

Im Avilamycin-Biosyntheseegencluster wurden insgesamt vier putative Glykosyltransferasegene detektiert (*aviGT1*, *aviGT2*, *aviGT3* und *aviGT4*), zwei davon in dem im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Bereich stromabwärts der ABC-Transportergene (*aviGT3* und *aviGT4*). *AviGT3* besitzt eine Größe von 1017bp und beginnt 39bp stromabwärts von *aviB2*. Das abgeleitete Protein (339 Aminosäuren;  $M_r$  37,7 kDa) zeigt signifikante Homologien zu verschiedenen Rhamnosyltransferasen. Die höchste Ähnlichkeit bestand zu einer Rhamnosyltransferase aus *Pyrococcus abyssi* (31% identische Aminosäuren) und zu einer Rhamnosyltransferase aus *Streptococcus pneumoniae* Typ 19B (Morona et al., 1997) (29% identische Aminosäuren). Von dem als

*aviGT4* bezeichneten ORF (1029bp), welcher unmittelbar im Anschluß an *aviGT3* liegt, lässt sich ein aus 343 Aminosäuren bestehendes Produkt ableiten ( $M_r$  36,1kDa), das bei Homologievergleichen in der Datenbank Ähnlichkeiten zu putativen Mannosyltransferasen aus unterschiedlichen Arten zeigt. Am deutlichsten war diese zu WbaZ-2 aus *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997) mit 29% identischen Aminosäuren. Bei den zu *AviGT3* und *AviGT4* homologen Glykosyltransferasen handelt es sich im allgemeinen um solche, die dafür bekannt sind, bei der Biosynthese der antigen wirkenden Oligosaccharide auf der Zelloberfläche mitzuwirken. In dieselbe Gruppe lässt sich auch *AviGT2* einordnen, das zu 25% identisch mit einer putativen Glykosyltransferase (*Cps2J*) aus *Streptococcus suis* Serotyp 2 (Smith et al., 1999) ist. Eine Ausnahme bildet das von *aviGT1* abgeleitete Produkt. *AviGT1* weist Ähnlichkeiten zu an der Biosynthese verschiedener Antibiotika beteiligten Glykosyltransferasen auf. Am größten war diese mit 41% identischen Aminosäuren zu *SnoZ*, einer Glykosyltransferase aus *S.nogalater*, dem Nogalamycin-Produzenten (Ylihonko et al., 1996).

#### 3.1.2.4 Oxygenasen

Drei Gene des Avilamycin-Biosynthesegenclusters, bezeichnet als *aviO1*, *aviO2* und *aviO3*, codieren für Proteine, die Homologien zu einer  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen L-Prolin-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. (Shibasaki et al., 1999), zu *HtxA*, einer  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Hypophosphit-Dioxygenase aus *Pseudomonas stutzeri* WM88 (Metcalf und Wolfe, 1998) und zu *SnoK* aus *S.nogalater* (Torkkell et al., 2000) zeigen. *AviO1* und *AviO2*, die untereinander bereits zu 36% identisch sind, sind der L-Prolin-Oxygenase am ähnlichsten (*AviO1*: 31% identische Aminosäuren; *AviO2*: 29% identische Aminosäuren), während *AviO3* die meisten identischen Aminosäuren (30%) mit *SnoK* teilt. *AviO1* und *aviO3* liegen stromaufwärts der ABC-Transportergene, *aviO2* folgt auf *aviGT4*, wird jedoch in die Gegenrichtung transkribiert. In allen drei Enzymen findet sich das in  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Enzymen stark konservierte Motiv HxD. Im Avilamycinmolekül gibt es zwei sogenannte "Orthoester-Bindungen" und eine -O-CH<sub>2</sub>-O-Gruppe, bei deren Bildung oxidative Prozesse ablaufen. Die gefundenen Homologien weisen darauf hin, dass die drei putativen Oxygenasen *AviO1*, *AviO2* und *AviO3* an diesen Reaktionen beteiligt sein könnten.

#### 3.1.2.5 Gene mit unbekannter Funktion

Bei *aviX13* handelt es sich um einen kleinen ORF 459bp stromabwärts von *aviH*. Er besteht aus 554 Nukleotiden. Das abgeleitete Genprodukt zeigte keinerlei signifikante Homologien zu anderen Proteinen in der Datenbank. Die drei ORFs *aviX14*, *aviX15* und

*aviX16* am 3'-Ende des Clusters sind mit größter Wahrscheinlichkeit nicht mehr Bestandteil des Biosynthesegenclusters. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *aviX14*, bestehend aus 2372 Nukleotiden, weist 32% identische Aminosäuren mit einer putativen Helikase aus *S.coelicolor* auf (Redenbach et al., 1996), das 827bp große Gen *aviX15* codiert für ein Protein, welches zu 52% einem putativen DNA-Bindeprotein aus *S.coelicolor* (Redenbach et al., 1996) gleicht und von *aviX16*, einem 1559bp großen Gen, lässt sich ein Genprodukt ableiten mit 43% identischen Aminosäuren zu einer Protease aus dem marinen Bakterium *Alteromonas* sp. Stamm O-7 (Tsujiyo et al., 1993).

### 3.2 Identifizierung von Methyltransferasegenen im Avilamycin-Biosynthesegencluster

Vom Stamm *S.viridochromogenes* Tü57 wird neben einem kleineren Anteil Avilamycin A hauptsächlich Avilamycin C gebildet (s. 3.3.1). Charakteristisch für beide Moleküle ist die Methylierung zahlreicher Hydroxylgruppen (s. Abb. 1). Ziel war es deshalb, die für die Übertragung dieser Methylgruppen verantwortlichen Enzyme, sogenannte Methyltransferasen, bzw. die entsprechenden Gene im Avilamycin-Biosynthesegencluster zu identifizieren und anschließend zu inaktivieren. Dadurch sollte erreicht werden, dass von den in den jeweiligen Methyltransferasegenen defekten *S.viridochromogenes*-Mutanten Avilamycin-Derivate produziert werden, denen jeweils die entsprechende Methylgruppe fehlt, um so zum einen durch Strukturanalyse der erhaltenen Produkte die jeweilige Gen- bzw. Enzym-Funktion aufzuklären und zum anderen aber auch um zu untersuchen, inwieweit durch das Fehlen von Methylgruppen die Eigenschaften der Avilamycine, wie Löslichkeit, Stabilität oder antibakterielle Aktivität, beeinflusst werden.

Methylierungsreaktionen spielen sowohl im Primärstoffwechsel von Eukaryoten und Prokaryoten (Adrenalinbiosynthese, Proteinmethylierung, DNA-Methylierung etc.) als auch bei der Biosynthese von Sekundärstoffen (Erythromycin, Tylosin, Tetracenomycin, Mithramycin, Biosynthese vieler Alkaloide etc.) eine Rolle. Dabei handelt es sich bei den Substraten, auf die die Methylgruppe jeweils transferiert wird, um Verbindungen ganz unterschiedlicher Struktur, was sich unter anderem in einer nur geringen Homologie dieser Enzyme widerspiegelt und somit eine Identifizierung durch Sequenzvergleiche erschwert. Als Methylgruppendonator fungiert jedoch in fast allen Fällen S-Adenosyl-

methionin. Durch Vergleich der Aminosäuresequenz einer Vielzahl bekannter, sowohl pro- als auch eukaryotischer Methyltransferasen konnten im wesentlichen drei kurze Sequenzmotive identifiziert werden (Kagan und Clarke, 1994), die stets in einem bestimmten Abstand zueinander auftreten, und für die eine Bedeutung bei der Bindung von S-Adenosylmethionin diskutiert wird. Allerdings konnte dies bisher lediglich für Motiv I durch Röntgenstruktur-Untersuchungen an kristallisierten Methyltransferasen auch eindeutig gezeigt werden (Cheng et al., 1993; Schluckebier et al., 1995).

Das Methyltransferasemotiv I ist das konservierteste der drei Motive und wird definiert durch die Abfolge der neun Aminosäuren (V/I/L)(L/V)(D/E)(V/I)G(G/C)G(T/P)G bzw. in allgemeinerer Form als hh(D/E)hGxGxG, wobei h für eine hydrophobe Aminosäure und x für eine beliebige Aminosäure steht. Charakteristisch ist weiterhin ein Glutamat (E) oder Aspartat (D) 17-19 Aminosäuren C-terminal zu diesem Motiv. Die Motive II und III sind weniger einheitlich und treten auch etwas seltener auf. Das Methyltransferasemotiv II folgt in einem Abstand von 36-90 Aminosäuren auf Motiv I und umfasst einen aus acht Aminosäuren bestehenden konservierten Bereich. Die Consensus-Sequenz lautet (P/G)(Q/T)(F/Y/A)DA(I/V/Y)(F/I)(C/V/L). Das zentrale Aspartat ist hochkonserviert und häufig von aromatischen Aminosäuren umgeben, wie z.B. Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) oder gelegentlich auch Tryptophan (W; in einem Abstand von 8 Aminosäuren vor dem Aspartat). Das Methyltransferasemotiv III schließlich ist 12-38 Aminosäuren hinter Motiv II zu finden und lautet LL(R/K)PGG(R/I/L)(L/I)(L/F/I/V)(I/L). Kennzeichnend für dieses Motiv sind die beiden zentralen Glycinmoleküle, obgleich es auch Beispiele gibt, bei denen eines dieser Moleküle durch eine andere Aminosäure ersetzt ist (Kagan und Clarke, 1994).

Zur Identifizierung möglicher Methyltransferasegene im Avilamycin-Biosynthesegencluster wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt:

- Identifizierung durch Hybridisierung mit einer möglichst homologen Sonde
- Identifizierung durch Auswertung von Sequenzdaten

Begonnen wurde mit Hybridisierungsexperimenten, da zu Beginn noch keine ausreichenden Sequenzdaten vorlagen. Die Idee war, die vorhandenen Cosmide (vgl. Kap. 3.1) mit geeigneten Sonden zu screenen und aufgrund von positiven Hybridisierungssignalen auf Bereiche einzuschränken, in denen Methyltransferasegene vermutet werden konnten, um diese dann gezielt zu klonieren und zu sequenzieren. Als Sonden wurden die Gene *oleY* und *mtmC* eingesetzt, die von Prof. Salas (Oviedo, Spanien) zur Verfügung gestellt worden waren. *OleY* codiert für eine 3-O-Methyltransferase, die in

*S. antibioticus* an der Biosynthese des Makrolidantibiotikums Oleandomycin beteiligt ist. Katalysiert wird hier die Methylierung der L-Olivose zur L-Oleandrose bzw. die Methylierung des Oleandomycin-Precursors L-Olivosyl-Oleandolid zu L-Oleandrosyl-Oleandolid (Rodriguez et al., 2001). Bei *MtmC* handelt es sich dagegen um eine 3-C-Methyltransferase aus dem Mithramycinproduzenten *S. argillaceus*, für die eine Beteiligung an der Biosynthese der D-Mycarose nachgewiesen werden konnte (Gonzalez et al., 2001). Beide Methyltransferasen zeigen damit eine Aktivität, die in gewisser Weise auch auf die Avilamycinbiosynthese übertragen werden kann. Denn auch hier spielen C-Methylierungen (2-Desoxy-D-eravulose-Biosynthese) und O-Methylierungen von Zuckern (4-O-Methyl-D-fucose, 2,6-Di-O-methyl-D-mannose und Methylurekanat) eine Rolle. Somit erschienen die Gene geeignet, um als Sonde zum Screenen der Cosmide eingesetzt werden zu können.

DNA-Fragmente, die *oleY* bzw. *mtmC* enthielten, wurden wie unter 2.4.6.3 und 2.4.10 beschrieben mittels präparativer Gelelektrophorese gereinigt, DIG-markiert und anschließend zur Southern-Hybridisierung mit den Cosmiden P2, H4, F4, P4, P5 und E1A (s. 3.1), die zuvor mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *BamHI*, *PstI* bzw. *SacI* gespalten worden waren, eingesetzt. Mit *oleY* wurden Hybridisierungssignale vorwiegend bei großen Fragmenten (8-12kb) erhalten, die jedoch eher auf einer unspezifischen Bindung zu beruhen schienen. Mit *mtmC* als Sonde wurden Signale auch bei kleineren Fragmenten erhalten, und zwar bei zwei *EcoRI*-Fragmenten (ca. 5,4kb und 3,5kb), zwei *PstI*-Fragmenten (ca. 3,5kb und 4,8kb) und drei *SacI*-Fragmenten (ca. 3,5kb, 4,9kb und 5,7kb) aus dem Cosmid P2. Dieses Cosmid lieferte damit die meisten Hinweise auf Methyltransferasegene und sollte deshalb einer genauen Sequenzanalyse unterworfen werden. Als hilfreich erwies sich dabei, dass Fragmente aus dem Cosmid P2 parallel zu den Hybridisierungsexperimenten im Zuge der Sequenzierung des gesamten *avi*-Clusters bereits subkloniert worden waren (vgl. Kap. 3.1.1), so dass direkt auf die dort erhaltenen Sequenzdaten zugegriffen und auf eine gezielte Klonierung der hybridisierenden Fragmente verzichtet werden konnte.

Die in Kap. 3.1 beschriebene ausführliche Sequenzanalyse führte schließlich zur Detektion von insgesamt sechs putativen Methyltransferasegenen, bezeichnet als *aviG1*, *aviG2*, *aviG3*, *aviG4*, *aviG5* und *aviG6*, was auch exakt der Anzahl an O- und C-Methylierungen in den Molekülen Avilamycin A und C entsprach (vgl. Abb. 1 und Abb. 45). Die Annahme, dass es sich bei diesen Genen um Methyltransferasegene handeln könnte, beruhte zunächst allein auf den gefundenen Sequenzhomologien (s. Tab. 25).

Tab. 25: Zusammenfassung aller Gene, die für putative, an der Avilamycinbiosynthese beteiligte Methyltransferasen codieren

Gen	Größe d. Genprodukts [Aminosäuren]	mögliche RBS	Homologie zu	Referenz
<i>aviG1</i>	408	CTGGAGAATCATG	TylCIII aus <i>S.fradiae</i>	Bate et al., 2000
<i>aviG2</i>	241	GTGGAGCGGCATG	putative Methyltransferase aus <i>Deinococcus radiodurans</i>	White et al., 1999
<i>aviG3</i>	278	CACGAGGAGTAC-TGGCGGTGGTG	Sterol-C-Methyltransferase aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Kaneko et al., 1996
<i>aviG4</i>	329		O-Demethylpuromycin-O-Methyltransferase aus <i>S.alboniger</i>	Lacalle et al., 1991
<i>aviG5</i>	200	TGGAGGTAAGGC-AACAGTG	putative Methyltransferase aus <i>Aeropyrum pernix</i> K1	Kawarabayasi et al., 1999
<i>aviG6</i>	240	CTGAGGTGGCCAC-GGAGATG	putative Methyltransferase aus <i>S.avermitilis</i>	Omura et al., 2001

Das von *aviG1* abgeleitete 408 Aminosäuren große Genprodukt zeigte bei Datenbankrecherchen deutliche Ähnlichkeit zu verschiedenen, in die Biosynthese von Sekundärmetaboliten involvierten C-Methyltransferasen, unter anderem zu TylCIII aus *S.fradiae* (54% identische Aminosäuren) (Bate et al., 2000) und EryBIII aus *Saccharopolyspora erythraea* (53% identische Aminosäuren) (Haydock et al., 1991; Gaisser et al., 1998). Für EryBIII konnte die Funktion einer 3-C-Methyltransferase innerhalb der L-Mycarose-Biosynthese experimentell nachgewiesen werden. Für TylCIII wurde aufgrund der hohen Homologie zu EryBIII (70% Identität) dieselbe Funktion propagiert. Von *aviG2* läßt sich ein aus 241 Aminosäuren zusammengesetztes Protein ableiten, welches die größte Ähnlichkeit mit einer putativen Methyltransferase aus *Deinococcus radiodurans* aufweist (31% identische Aminosäuren) (White et al., 1999). Für das durch *aviG3* codierte Protein, bestehend aus 278 Aminosäuren, wurde beim Vergleich mit Sequenzen aus der Datenbank Homologie zu einer Sterol-C-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 gefunden (29% identische Aminosäuren) (Kaneko et al., 1996), die jedoch im Wesentlichen nur auf einen relativ kurzen Bereich zurückzuführen war. Wie bereits in Kap. 3.1.2.1 beschrieben, sind das von *aviG4* abgeleitete Genprodukt und die O-Demethylpuromycin-O-Methyltransferase aus *S.alboniger* (Lacalle et al., 1991) auf Proteinebene zu 44% identisch. Weitere

signifikante Homologien bestanden zur Carminomycin O-Methyltransferase aus *S.peuceetius* (38% identische Aminosäuren) (Madduri et al., 1993) und zu TcmN, der Tetracenomycin 3-O-Methyltransferase aus *S.glaucescens* (32% identische Aminosäuren) (Summers et al., 1992). Allen drei genannten homologen Methyltransferasen wurde jeweils eine Funktion bei der Methylierung einer phenolischen Hydroxylgruppe zugeschrieben. Eine ähnliche Reaktion ist auch für die Avilamycinbiosynthese (Synthese des Dichloroisoeverninsäurerestes) zu erwarten. Von *aviG5* lässt sich ein aus 200 Aminosäuren bestehendes Protein ableiten, mit signifikanter Homologie zu einer hypothetischen beta-Aspartat Methyltransferase aus *Aeropyrum pernix* (32% identische Aminosäuren) (Kawarabayasi et al., 1999). Und im Falle von *aviG6* zeigt das entsprechende Genprodukt (240 Aminosäuren) 33% Übereinstimmung mit einer putativen Methyltransferase aus *S.vermitilis* (Omura et al., 2001). Geringere Homologien bestanden hier außerdem noch zu FkbM, der 31-O-Demethyl-FK506 Methyltransferase aus *Streptomyces* sp. MA6858 und MA6548 (30% identische Aminosäuren) (Motamedi et al., 1996), und zu einer Protein-L-Isoaspartat O-Methyltransferase aus *Schizosaccharomyces pombe* (28% identische Aminosäuren) (Hunt et al., Schizosaccharomyces Genomprojekt, 1999).

Der in den meisten Fällen relativ geringe Prozentanteil identischer Aminosäuren entsprach der oben bereits beschriebenen allgemein beobachteten geringen Homologie der Methyltransferasen untereinander. Deshalb wurden die Sequenzen einer weiteren genauen Untersuchung unterzogen und gezielt nach den drei oben genannten Methyltransferasemotiven gesucht. Das Ergebnis ist in Abb. 6 zusammengefasst. Beispielhaft ist außerdem das Sequenzalignment des Genprodukts von *aviG4* dargestellt. Mögliche Methyltransferasemotive sind grau unterlegt (Abb. 7).

Motiv I: (V/I/L) (L/V) (**D/E**) (V/I) **G** (G/C) **G** (T/P) **G**  
 Motiv II: (P/G) (Q/T) (F/Y/A) **D** A (I/V/Y) (F/I) (C/V/L)  
 Motiv III: L L (R/K) P **G G** (R/I/L) (L/I) (L/F/I/V) (I/L)

Genprodukt	Motiv I	Motiv II	Motiv III
AviG1	+	+	+
AviG2	+	+	+
AviG3	+	-	-
AviG4	+	+	+
AviG5	+	+	-
AviG6	+	-	-

**Abb. 6: Methyltransferasemotive (Motiv I, II und III nach Kagan und Clarke, 1994) in den sechs möglichen, an der Avilamycin-Biosynthese beteiligten Methyltransferasen AviG1, AviG2, AviG3, AviG4, AviG5 und AviG6**

Das charakteristischste Motiv I konnte in allen vermuteten Methyltransferasen gefunden werden, Motiv II und/oder Motiv III zusätzlich noch in AviG1, AviG2, AviG4 und AviG5. Somit sprachen mehrere Indizien dafür, dass es sich bei den aufgeführten Genen tatsächlich um die gesuchten Methyltransferasegene handelte. Ein endgültiger Funktionsnachweis sollte, wie schon erwähnt, durch Inaktivierung der einzelnen Gene erbracht werden. Die hierzu durchgeführten Arbeiten werden ausführlich im folgenden Kapitel beschrieben.



		10	20	30	40	50
AVIG4 .AMI	1	MA-----	-----	-----	-----	-----
DMPM .AMI	1	MAPTEATRGG	PADPAPAPEA	HRGGHTEHAD	PAEHAAQFGA	QERILTLVWG
		60	70	80	90	100
AVIG4 .AMI	51	---TQVVGLA	VRLRLPDAIG	EGERTADGLA	ADFESEPAAM	NRLLRGLAAL
DMPM .AMI	51	YISSEILDLA	TRLDLPLMCG	TEERAFAELA	ASLDTDPVAT	LRLLRFAAAL
		110	120	130	140	150
AVIG4 .AMI	101	GVLRESKPCV	FALTFVCELK	RADRSPSFHS	LARMLTDPAV	ATAWQHLDHS
DMPM .AMI	101	GLAEETGACR	FRLTPAGHRL	RIDVPSLHA	FVRQ-GMGVF	RQAWSHFDHS
		160	170	180	190	200
AVIG4 .AMI	151	VRTGCPAFDH	VFCRDFPAYL	ADDPDLWLY	NAAMSQGTGG	IAGLVAAHQ-
DMPM .AMI	151	IRTGCPAFDQ	VFGTDFFSYL	SERPELSGTF	TSSMREATRT	MSTALAKEEE
		210	220	230	240	250
AVIG4 .AMI	201	-DFS <sup>gr</sup> GVRTVV	DVGGGDG <sup>gr</sup> TLL	AAVLR <sup>gr</sup> AHPSL	RGVLY <sup>gr</sup> DSAAG	VAQA <sup>gr</sup> GEVLAA
DMPM .AMI	201	YDFS <sup>gr</sup> SYGTVV	DIGGADG <sup>gr</sup> SLL	AAVLS <sup>gr</sup> AHPGV	EGVVF <sup>gr</sup> DSPEG	ARDA <sup>gr</sup> AATLDA
		Motiv I				
		260	270	280	290	300
AVIG4 .AMI	251	AGVADRA- <sup>gr</sup> VE	AGDFFAAV <sup>gr</sup> PE	GGDLYL <sup>gr</sup> LKSV	VHGWE <sup>gr</sup> DERAA	RILAH <sup>gr</sup> CRRAL
DMPM .AMI	251	AGVGR <sup>gr</sup> GRVE	TGDFFTRV <sup>gr</sup> PG	GGDLYV <sup>gr</sup> LKSI	LHDW <sup>gr</sup> SARSA	DILRTV <sup>gr</sup> RAAM
		Motiv II				
		310	320	330	340	350
AVIG4 .AMI	301	PAHGRIV <sup>gr</sup> VE	HLLPDTV <sup>gr</sup> PAD	AVPTTYL <sup>gr</sup> NDL	NLLV <sup>gr</sup> NGN <sup>gr</sup> GLE	RTRGD <sup>gr</sup> FEQLC
DMPM .AMI	301	PAHARLLV <sup>gr</sup> VE	VLLPDTV <sup>gr</sup> DSS	AHPLGYL <sup>gr</sup> SDL	YMLVN <sup>gr</sup> MGG <sup>gr</sup> RE	RSERD <sup>gr</sup> LRSL <sup>gr</sup> L
		Motiv III				
		360	370	380	390	400
AVIG4 .AMI	351	AAACL <sup>gr</sup> TVEAV	-T <sup>gr</sup> PLAG <sup>gr</sup> TDLW	LIEAV <sup>gr</sup> PASAD	PL.....	.....
DMPM .AMI	351	SDT <sup>gr</sup> CFR <sup>gr</sup> TRV	RTP <sup>gr</sup> PGL <sup>gr</sup> TPFS	LIEAAP <sup>gr</sup> ----	---V.....	.....

Abb. 7: Vergleich des abgeleiteten Genprodukts von *aviG4* mit der bekannten O-Demethylpuromycin O-Methyltransferase DmpM aus *S.alboniger*. Die Methyltransferasemotive sind grau unterlegt.

### 3.3 Funktionsnachweis von Methyltransferasengen in *S. viridochromogenes* Tü57 und Herstellung neuer Avilamycin-Derivate durch Geninaktivierungsexperimente

Ein Funktionsnachweis der identifizierten putativen Methyltransferasene sollte durch Geninaktivierungsexperimente erfolgen. Die Überlegung dabei war, dass mit der Inaktivierung eines Gens auch eine Inaktivierung des entsprechenden Proteins bzw. Enzyms einhergeht, was sich, im Falle der Inaktivierung von Biosynthesegenen, häufig in der Bildung entsprechend veränderter Sekundärmetabolite niederschlägt. Durch

Strukturanalyse der von den Mutanten produzierten Derivate kann dann in den meisten Fällen auf die Gen- bzw. Enzymfunktion zurückgeschlossen werden. Von der Inaktivierung putativer Methyltransferasegene in *S. viridochromogenes* Tü57 wurde also erwartet, dass sie zur Produktion demethylierter Avilamycine führt, deren Strukturaufklärung schließlich eine genaue Zuordnung der jeweiligen Genfunktion ermöglichen sollte. Ein weiterer Aspekt bestand jedoch auch darin, dass durch die genannten Geninaktivierungen eine Möglichkeit geboten wurde, neue Avilamycin-Derivate herzustellen, mit unter Umständen verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Löslichkeit und antibiotischer Aktivität.

Allgemein existieren zur Durchführung einer Geninaktivierung verschiedene Strategien. Die Inaktivierung der Methyltransferasegene sollte durch Einführung einer Frameshift-Mutation oder einer in-frame-Deletion erfolgen. Dazu wird das die Mutation bzw. Deletion tragende jeweilige Gen in einen nicht-replikativen Vektor mit einem geeigneten Selektionsmarker, wie zum Beispiel einem Resistenzgen, kloniert und in den Wildtypstamm eingebracht. Über homologe Rekombination findet hier zunächst durch ein einfaches Crossover eine Integration des gesamten Konstrukts in das Genom des Wirts statt. Durch ein zweites Crossover kann es dann entweder zum Austausch des Wildtypgens gegen das mutierte Gen oder aber auch zur Rückentwicklung zum Wildtyp kommen. Durch den auf dem Vektor befindlichen Selektionsmarker ist es möglich, gezielt auf das Vorliegen eines einfachen Crossovers (single-crossover) (Vektor ins Genom integriert) oder eines zweifachen Crossovers (double-crossover) (Verlust des Vektors) zu screenen. Eine genaue Charakterisierung des jeweiligen Ereignisses bzw. der entsprechenden Mutanten erfolgt mit Hilfe der PCR und durch Southern-Hybridisierung.

Zur Herstellung der Geninaktivierungskonstrukte für die Gene *aviG1*, *aviG2*, *aviG3*, *aviG4* und *aviG5* wurde der in Streptomyceten nicht-replikative Vektor pSP1 verwendet, der zur Selektionierung in *E.coli* ein Ampicillinresistenzgen und zur Selektionierung in *Streptomyces viridochromogenes* ein Erythromycinresistenzgen trägt (Pelzer et al., 1997).

Zur Verbesserung des Protoplastierungs- und Transformationserfolgs bei *S.viridochromogenes* Tü57 wurde das von A.Trefzer beschriebene Protokoll (Trefzer, 1997) entsprechend modifiziert. Positiv wirkten sich folgende Änderungen aus:

- Anzucht: Animpfen der Kultur mit 10µl einer Sporensuspension mit einer Konzentration von etwa  $2 \times 10^8$  Sporen/ml

- Protoplastierung: Teilen der Kultur und Lysozymbehandlung jedes Zellpellets in einem Flüssigkeitsvolumen von 10-15ml → die Resuspension der Zellen in einem größeren Volumen verhindert ein Zusammenkleben der Zellen nach dem Einsetzen des Zellwandabbaus durch Lysozym
- Transformation: Einsatz einer möglichst konzentrierten DNA-Lösung (pro Ansatz 15-20µg DNA in einem Volumen von maximal 15µl); Verwendung von DNA, die aus dem Methylase-negativen *E.coli*-Stamm *E.coli* ET12567 isoliert wurde → in *S.viridochromogenes* eingebrachte Fremd-DNA wird nicht sofort durch das wirtseigene Restriktionssystem abgebaut
- Einbettung der Protoplasten in 5ml R3-Weichagar pro Platte
- Überschichten des Transformationsansatzes mit antibiotikumhaltigem SNA möglichst schon nach 12h

Die optimierten Protokolle sind in Kapitel 2 unter 2.4.2 und 2.4.3 aufgeführt.

### 3.3.1 Untersuchung des Produktspektrums von *S. viridochromogenes* Tü57

Voraussetzung für die Strukturanalyse und Charakterisierung der von den Mutanten produzierten Derivate und die anschließende Zuordnung der jeweiligen Genfunktion war eine genaue Kenntnis des als Referenz dienenden Produktspektrums des verwendeten Wildtypstamms *S. viridochromogenes* Tü57. Da zu Beginn der Arbeiten nur wenige Informationen über das Produktionsverhalten des Stammes vorlagen, wurde zunächst ein Produktionsprofil erstellt. Hierzu wurden parallel zwei 100ml Hauptkulturen wie unter 2.3.2.1 beschrieben angezogen und die Avilamycinproduktion über einen Zeitraum von 106h beobachtet. Nach 24h, 34h, 48h, 58h, 72h, 82h, 96h und 106h wurde jeweils 1ml Probe entnommen und nach Ethylacetatextraktion mittels Dünnschichtchromatographie (2.6.4) und Agardiffusionstest (2.6.3) auf die Anwesenheit von Avilamycinen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Avilamycinproduktion in *S.viridochromogenes* Tü57 nach etwa 48h einsetzt und von da an relativ konstant bleibt. Das Ergebnis war für beide Kulturen identisch. Auch konnte ausgeschlossen werden, dass die Produkte in der Zelle akkumulieren, da nach Aufschluß des Zellpellets mit Aceton keine Avilamycine im Extrakt nachweisbar waren. Basierend auf dieser Beobachtung wurden die Hauptkulturen bei allen weiteren Anzuchten jeweils nach ungefähr 72h geerntet. Das abgetrennte Myzel wurde jeweils verworfen und das Kulturfiltrat weiterverarbeitet. Zur Identifizierung der von *S.viridochromogenes* Tü57 gebildeten Avilamycine wurden diese nach der in Kapitel 2 unter 2.6.2.2 beschriebenen Methode aus insgesamt 100ml

Hauptkultur durch Bindung an das RP18-Harz isoliert. Gewaschen wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  und 40%igem Methanol, eluiert stufenweise mit 60%, 70%, 80% und 100% Methanol. Die DC-Analyse der einzelnen Fraktionen ergab, dass die gesuchten Produkte vor allem mit 60% und 70% Methanol eluiert worden waren. Es handelte sich dabei um zwei Hauptderivate, die nach HPLC- und MS-Analyse als Avilamycin C und Avilamycin A identifiziert werden konnten. Aus dem HPLC-Chromatogramm (s. Abb. 8) ging außerdem hervor, dass Avilamycin C eindeutig die dominierende Komponente war. Die HPLC-Analyse wurde unter Anwendung der unter 2.6.6.2 a) aufgeführten Methode durchgeführt, die Zuordnung der Peaks erfolgte aufgrund des für Avilamycine charakteristischen UV-Spektrums und der jeweiligen Retentionszeiten (vgl. Tab. 26 und Abb. 8). Verglichen wurde mit den Reinsubstanzen Avilamycin A, Avilamycin B und Avilamycin C, welche von der AG Prof. Fiedler (Tübingen) zur Verfügung gestellt worden waren.

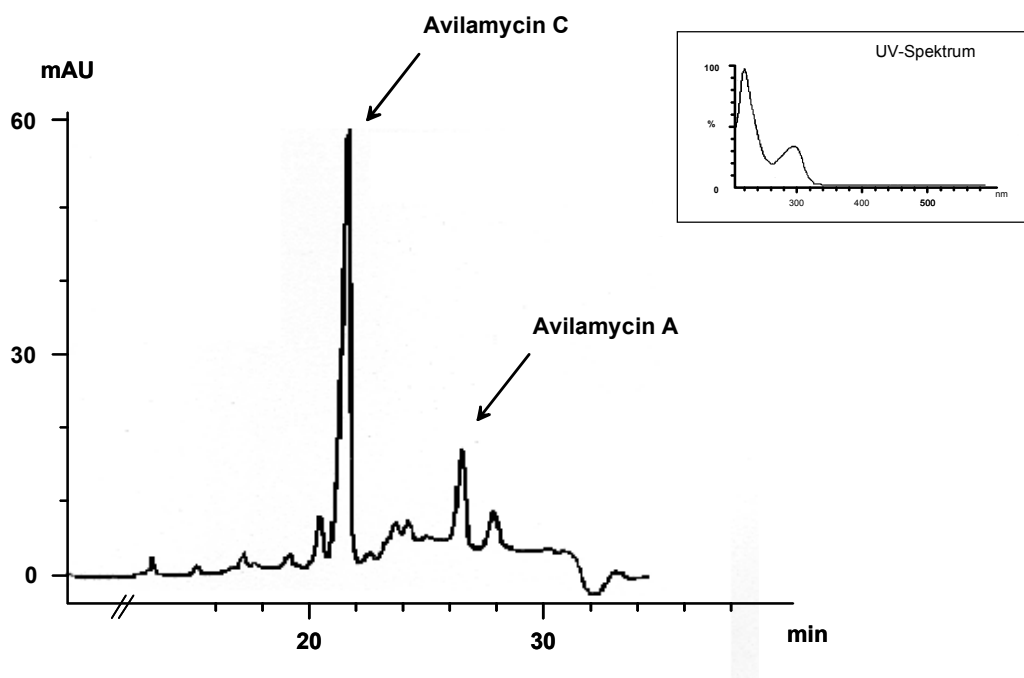


Abb. 8: HPLC-Chromatogramm eines angereinigten Extrakts aus dem Wildtypstamm *S. viridochromogenes* Tü57 mit den charakteristischen Peaks für die beiden Hauptderivate Avilamycin C und Avilamycin A und dem für Avilamycine typischen UV-Spektrum.

Tab. 26: Retentionszeiten einiger Avilamycine und der Hauptprodukte des Wildtyps *S.viridochromogenes* Tü57 im HPLC-Chromatogramm

Probe	Retentionszeit [min]
Avilamycin A	26,3
Avilamycin B	20,4
Avilamycin C	21,3
Wildtyp	21,3 26,3

Tab. 27: Zuordnung der Avilamycine zu den bei der ESI-MS-Analyse der Wildtyp-Produkte detektierten Massen

gefundene Masse	Substanz
1404	Avilamycin C
1402	Avilamycin A

Die Zuordnung wurde schließlich durch die massenspektrometrische Analyse bestätigt (s. 2.6.7.3 und Tab. 27). D.h. der Wildtypstamm *S.viridochromogenes* Tü57 produziert unter den genannten Anzuchtbedingungen hauptsächlich Avilamycin C. Avilamycin A stellt dagegen nur ein Nebenprodukt dar.

### 3.3.2 Inaktivierung des Methyltransferasegens *aviG1*

#### 3.3.2.1 Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids *pMIK1*

Ziel war es, durch Entfernung eines 285bp großen internen *NcoI*-Fragments eine in-frame-Deletion in das Gen *aviG1* einzuführen. Der erste Schritt bestand in der Klonierung eines 7,7kb großen *BamHI*-Fragments in den Vektor pBluescript SK-, auf dem *aviG1* enthalten war. Das daraus entstandene Plasmid B7 wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *BglII* gespalten, zum Auffüllen der überhängenden 5'-Enden mit dem Klenow-Fragment behandelt (2.4.7.2) und anschließend religiert. Auf diese Weise gelang eine Verkürzung des 7,7kb großen Fragments auf 5,4kb. Aus diesem *pMIK1a* genannten Plasmid wurde im nächsten Schritt ein 2,5kb großes *SacI*-Fragment, welches *aviG1* enthielt, ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *SacI* restringierten Inaktivierungsvektor *pSP1* ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde als *pSP-MIK* bezeichnet (s. Abb. 9A), mit *NcoI* gespalten und anschließend religiert, was zur Deletion eines *aviG1*-internen 285bp großen Fragments führte. Das auf diese Weise generierte Inaktivierungsplasmid *pMIK1* (s. Abb. 9B) wurde nach Isolierung aus dem *E.coli*-Stamm *E.coli* ET12567 zur Transformation eingesetzt. Außerdem wurde das Vorliegen der in-frame-Deletion durch Sequenzierung überprüft. Zur Rekombination in

*Streptomyces viridochromogenes* Tü57 standen in pMIK1 stromaufwärts der Deletion etwa 1,6kb und stromabwärts 0,6kb zur Verfügung.

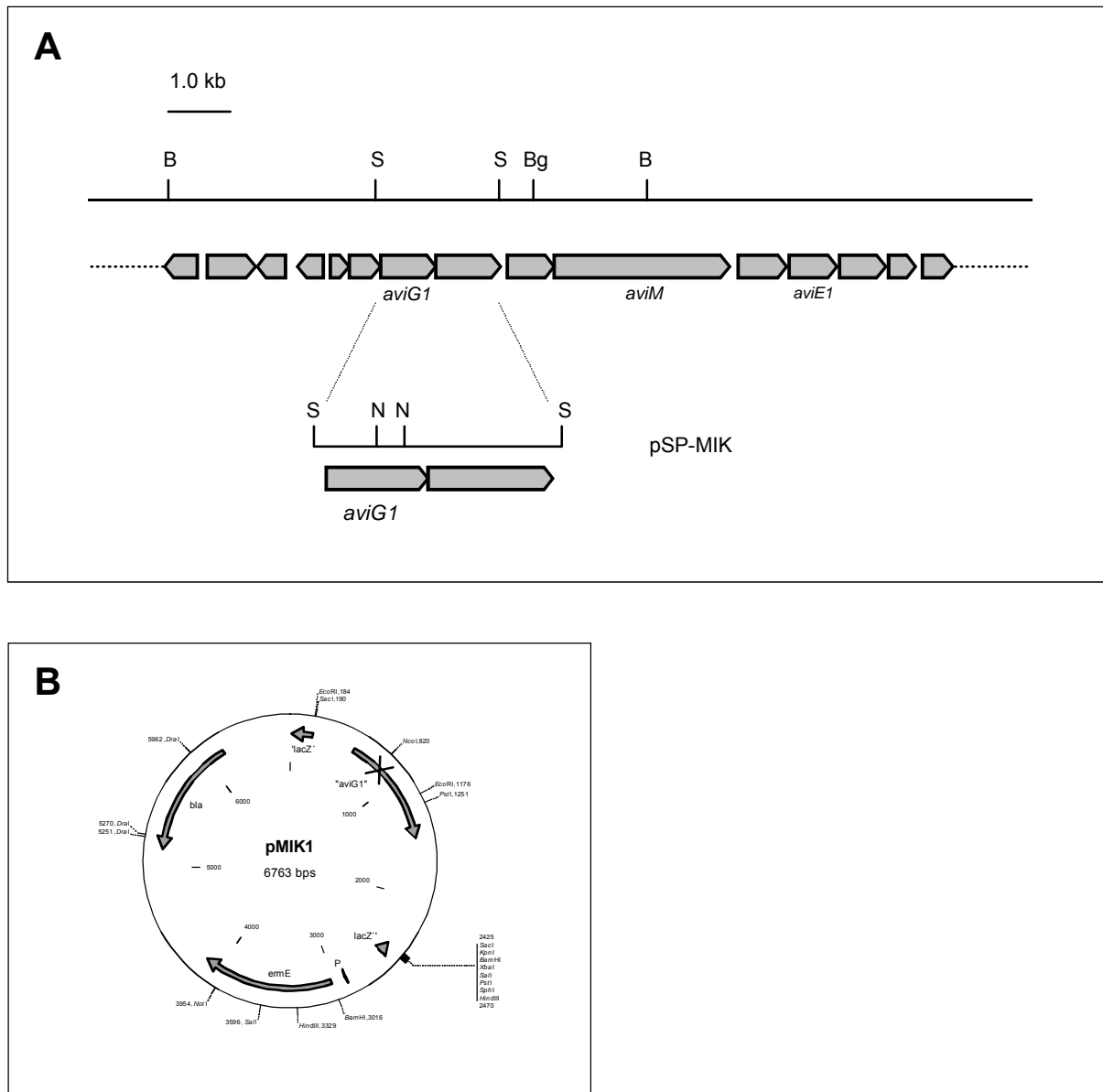


Abb. 9: A: Schema zur Herstellung des Inaktivierungskonstrukts pMIK1 (B, *Bam*HI; Bg, *Bg*II; S, *Sac*I; N, *Nco*I); B: Plasmidkarte des Inaktivierungskonstrukts pMIK1. In den Vektor pSP1 (Pelzer et al., 1997) wurde das 2,5kb große *Sac*I-Fragment, welches *aviG1* enthält, ligiert, und anschließend durch Deletion eines 285bp großen *Nco*I-Fragments die Mutation eingeführt.

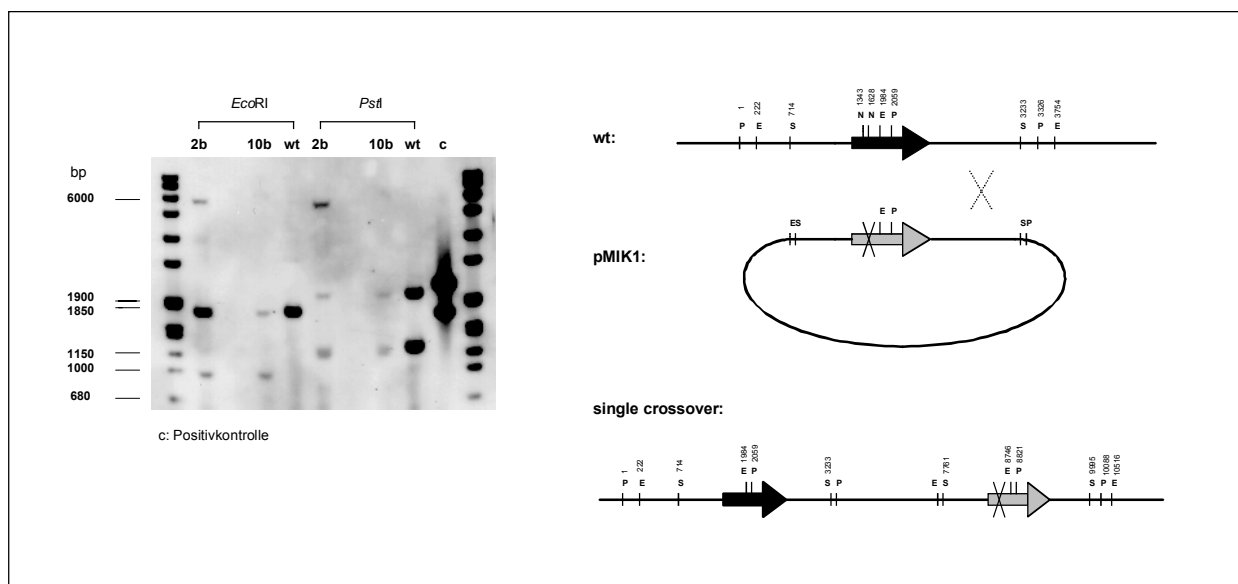
### 3.3.2.2 Transformation des *S. viridochromogenes* Tü57 mit pMIK1

Protoplastierung und Transformation erfolgten nach den unter 2.4.2 und 2.4.3 beschriebenen Methoden. Zur Isolierung des Inaktivierungskonstrukts pMIK1 aus dem *E.coli*-Stamm ET12567 wurde eine Plasmidmaxipräparation durchgeführt. Nach Transformation des *S. viridochromogenes* Tü57 mit pMIK1 wurden auf jeder der drei mit erythromycinhaltigem SNA überschichteten Platten ungefähr 100 Kolonien erhalten, von

denen insgesamt 18 gepickt und zur Überprüfung der Erythromycinresistenz auf erythromycinhaltige HA-Platten ausgestrichen wurden. Zwei der erythromycinresistenten Transformanten, bezeichnet als 2b und 10b, wurden schließlich ausgewählt und zum Nachweis der Integration des Inaktivierungskonstrukts in das Genom des *S. viridochromogenes* Tü57 mittels Southern-Hybridisierung genauer untersucht.

### 3.3.2.3 Nachweis und Beschreibung des Integrationsereignisses

Berücksichtigt man die vorhandenen homologen Bereiche, so war eine Integration von pMIK1 sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts von *aviG1* möglich. Zur Unterscheidung wurde die aus den Transformanten isolierte genomische DNA mit *EcoRI* bzw. *PstI* restringiert, geblottet und mit dem Insert aus pMIK1 (2,5kb *SacI*-Fragment) als Sonde inkubiert. Als Vergleich diente die auf die gleiche Weise behandelte genomische DNA aus dem Wildtyp. Die Größen der erwarteten hybridisierenden Banden im Falle einer Integration stromaufwärts bzw. stromabwärts von *aviG1* und für den Wildtyp *S. viridochromogenes* Tü57 sind in Tab. 28 aufgelistet. Abb. 10 zeigt den zugehörigen Southern-Blot. Die beiden Klone 2b und 10b und der Wildtyp zeigten Signale bei den in Tab. 29 aufgeführten Fragmentgrößen.



**Abb. 10:** Single crossover-Ereignis bei der Integration von pMIK1 in das Genom von *S. viridochromogenes* Tü57 mit zugehörigem Southern-Blot. Die chromosomale DNA aus zwei Integrationsmutanten (2b, 10b) sowie des Wildtyps *S. viridochromogenes* Tü57 (wt) wurde mit *EcoRI* bzw. *PstI* restringiert, hybridisiert wurde mit dem 2,5kb *SacI*-Fragment aus pMIK1 (E, *EcoRI*; P, *PstI*; S, *SacI*; N, *NcoI*).

Tab. 28: Berechnete Hybridisierungssignalgrößen bei Integration des Inaktivierungskonstrukts pMIK1 stromaufwärts bzw. stromabwärts der Mutationsstelle im Vergleich zum Wildtyp (2,5kb *SacI*-Fragment aus pMIK1 als Sonde)

Restriktionsenzym	Fragmentgröße [bp]		
	Integration (stromaufwärts)	Integration (stromabwärts)	Wildtyp
<i>EcoRI</i>	1270	985	1762
	1477	1762	1770
	1770	1770	
	5777	5777	
<i>PstI</i>	1174	1174	1267
	1267	1267	2059
	1774	2059	
	5873	5588	

Tab. 29: Bandenmuster der chromosomalen DNA der Transformanden 2b und 10b und des Wildtyps *S.viridochromogenes* Tü57 im Southern-Experiment. Hybridisiert wurde mit dem 2,5kb *SacI*-Fragment aus pMIK1.

Stamm/Klon	<i>EcoRI</i> -Restriktionsverdau	<i>PstI</i> -Restriktionsverdau
Wildtyp	1770bp 1762bp	2059bp 1267bp
2b	985bp 1762bp 1770bp 5777bp	1174bp 1267bp 2059bp 5588bp
10b	985bp 1762bp 1770bp 5777bp	1174bp 1267bp 2059bp 5588bp

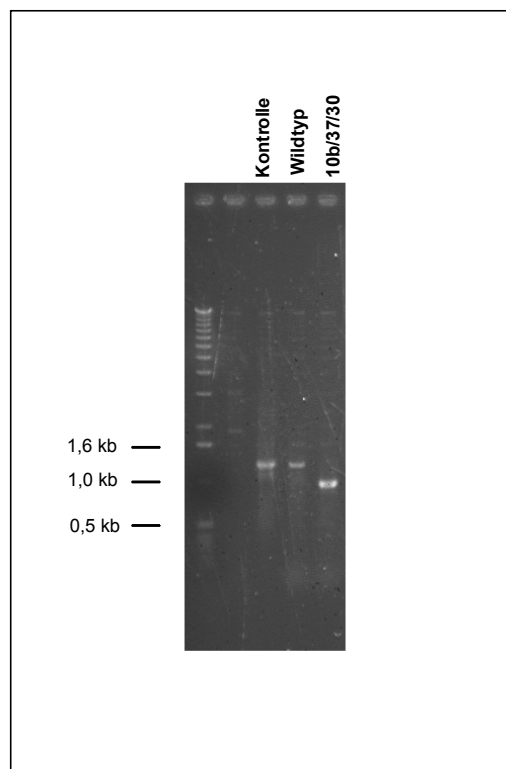
Beim Wildtyp entsprachen die erhaltenen Banden den erwarteten. Für die beiden Klone 2b und 10b konnte aufgrund des erhaltenen Bandenmusters gezeigt werden, dass eine Integration von pMIK1 stromabwärts von *aviG1* stattgefunden hatte (s. Tab. 28). Somit lagen zwei geeignete Klone vor, um im nächsten Schritt durch ein zweites Crossover den Genaustausch herbeizuführen.

#### 3.3.2.4 Nachweis eines double-crossovers

Um das zweite Crossover zu erreichen, wurden die beiden Klone 2b und 10b jeweils über mehrere Flüssigkulturpassagen in Abwesenheit von Erythromycin angezogen. Findet das zweite Crossover statt, so führt dies zum Verlust des Vektoranteils aus dem Genom und damit auch zum Verlust der Erythromycinresistenz. Nach drei Passagen



wurde deshalb jeweils ein Aliquot der entsprechenden Flüssigkultur vergleichend auf HA-Festmedium mit und ohne Erythromycin ausgestrichen und über zwei bis drei Tage bei 37°C inkubiert. Ein deutlicher Unterschied im Wachstum deutete darauf hin, dass sich das zweite Crossover bereits bei einem großen Anteil der Zellen vollzogen hatte. Daraufhin wurden insgesamt 250 Einzelkolonien gepickt und erneut jeweils auf HA-Festmedium mit und ohne Antibiotikum ausgestrichen. 62 Klone waren erythromycin-sensitiv, hatten also den Vektor verloren. Um zu untersuchen, ob dieses zweite Crossover zum Genaustausch oder zur Rückmutation zum Wildtyp geführt hatte, wurde aus den erythromycinsensitiven Klonen genomische DNA isoliert und diese zur Amplifikation des Gens *aviG1* als template in einer PCR eingesetzt (Bedingungen s. 2.4.8.1). Für den Wildtyp wurde ein 1280bp großes PCR-Fragment erwartet (entspricht der Größe von *aviG1*), für die Mutante aufgrund der Deletion ein um 285bp kleineres, d.h. 995bp großes Fragment. Insgesamt wurden 12 Klone getestet. 11 Klone zeigten das für das Wildtypgen typische, ein Klon, bezeichnet als 10b/37/30, jedoch das für die Mutante charakteristische verkürzte Fragment (Abb. 11).



**Abb. 11:** Ergebnis der PCR-Analyse genomischer DNA aus *S.viridochromogenes* Tü57 (Wildtyp) und der double-crossover-Mutante 10b/37/30. Amplifiziert wurde das Methyltransferasegen *aviG1*, das in 10b/37/30 aufgrund der Deletion eines *NcoI*-Fragmentes um 285bp kleiner ist als im Wildtyp.

Um dieses Ergebnis weiter abzusichern, wurde wiederum eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Es wurde dieselbe Sonde verwendet wie schon bei der Analyse des einfachen Crossovers, die chromosomale DNA wurde mit *EcoRI* gespalten. Als Vergleich diente die auf dieselbe Weise behandelte Gesamt-DNA aus dem Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57 und der Integrationsmutante 10b. Die Größen der erwarteten und erhaltenen Signale sind in Tab. 30 zusammengefasst, der zugehörige Southern-Blot ist in Abb. 12 dargestellt.

Tab. 30: Berechnetes und erhaltenes Bandenmuster der chromosomalen DNA des Wildtyps *S.viridochromogenes* Tü57, der Integrationsmutante 10b und der double-crossover-Mutante 10b/37/30 im Southern-Experiment (2,5kb *SacI*-Fragment aus pMIK1 als Sonde).

Stamm/Klon	erwartete Fragmentgrößen [bp]	erhaltene Fragmentgrößen [bp]
Wildtyp	1762	1762
	1770	1770
10b	985	985
	1762	1762
	1770	1770
	5777	5777
10b/37/30	1477	1477
	1770	1770

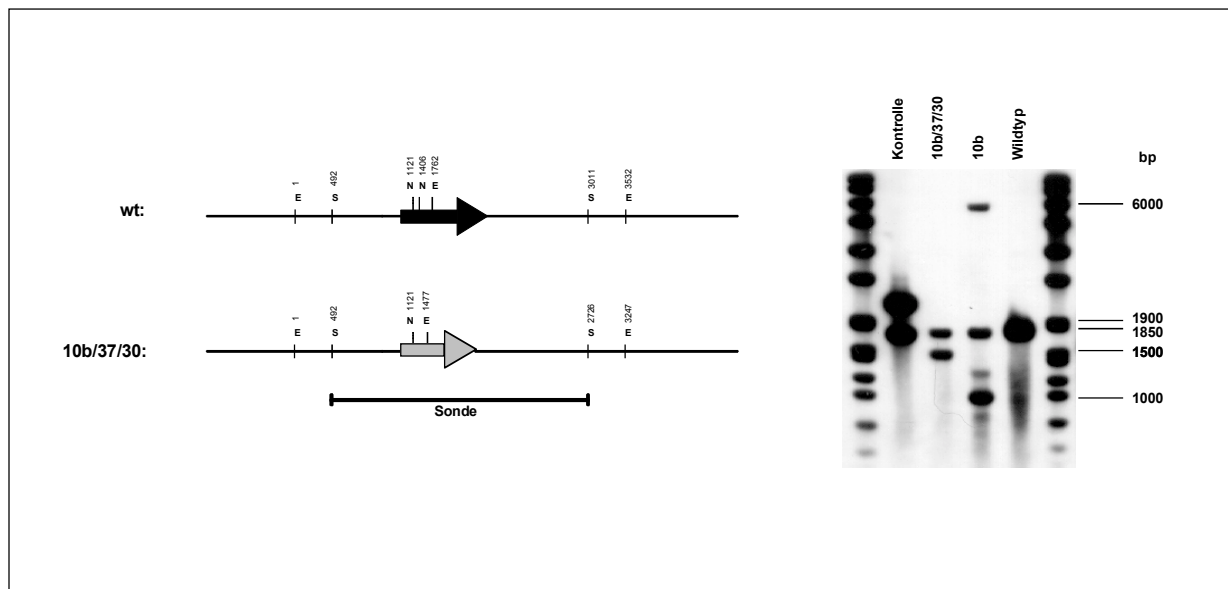


Abb. 12: Southern-Analyse genomischer DNA aus der double-crossover-Mutante 10b/37/30 im Vergleich zum Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57 und der single-crossover-Mutante 10b. Die genomische DNA wurde jeweils mit *EcoRI* restringiert, hybridisiert wurde mit dem 2,5kb *SacI*-Fragment aus dem Inaktivierungs-konstrukt pMIK1 (E, *EcoRI*; S, *SacI*; N, *NcoI*).

Die erhaltenen Bandenmuster entsprachen jeweils den erwarteten. Damit war der Nachweis erbracht, dass es sich bei Klon 10b/37/30 um eine double-crossover-Mutante mit dem inaktivierten Gen *aviG1* handelte. Zur Erleichterung der Nomenklatur wurde diese Mutante fortan als *S. viridochromogenes* GW1 bezeichnet.

#### 3.3.2.5 Analyse der Produkte von *S. viridochromogenes* GW1

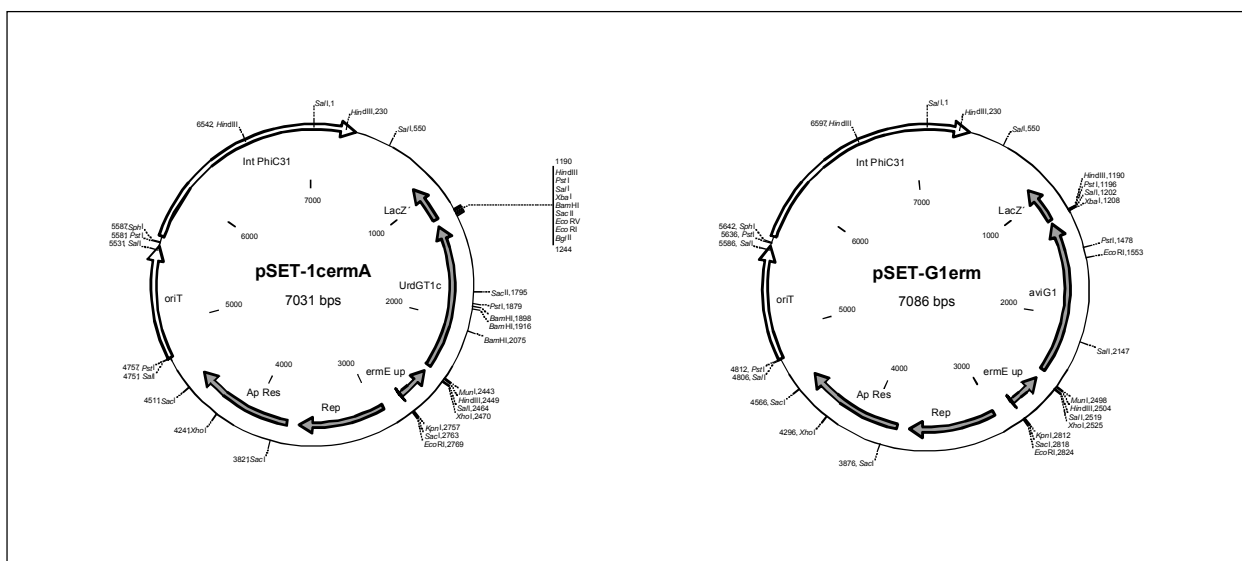
Nachdem eine erfolgreiche Inaktivierung des Gens *aviG1* auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen worden war, sollte deren Einfluß auf die Avilamycinbiosynthese untersucht werden. Dazu wurde die Mutante und als Vergleich der Wildtyp *S. viridochromogenes* Tü57 wie unter 3.3.1 beschrieben angezogen und die Sekundärstoffproduktion über einen Zeitraum von 106h beobachtet. Der Wildtyp zeigte das gewohnte Bild, d.h. Avilamycinproduktion fand im Zeitraum von 48h-106h nach Inokulation der Hauptkultur statt. Im Falle der Mutante *S. viridochromogenes* GW1 konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt, auch nicht nach Aufschluß der Zellen mit Aceton, ein Hemmhof bzw. ein Spot auf der DC-Platte detektiert werden, wofür zwei mögliche Erklärungen in Betracht kamen. Entweder führte die Inaktivierung zum Abbruch der gesamten Avilamycinbiosynthese, oder aber die Produktion war so schwach, dass die durch Extraktion von 1ml Kultur erhaltene Substanzmenge unterhalb der Nachweisgrenze lag. Um dies auszuschließen, wurden im nächsten Schritt insgesamt 500ml einer 72h alten Hauptkultur nach der unter 2.6.2.1 beschriebenen Methode mit Ethylacetat extrahiert und analysiert. Als Vergleich diente ein entsprechend hergestellter Extrakt des Wildtyps. Dünnschichtchromatographisch konnten für die Mutante wiederum keine Avilamycin-ähnlichen Verbindungen detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde jedoch im Agardiffusionstest geringe antibiotische Aktivität festgestellt. Dies deutete darauf hin, dass die Mutante die Fähigkeit zur "Avilamycin"-Biosynthese nicht vollständig verloren hatte, oder aber dass der Stamm noch ein zweites Gencluster zur Biosynthese eines anderen Antibiotikums besitzt. Um eine genauere Charakterisierung zu ermöglichen, wurden die Derivate aus insgesamt 3l Hauptkultur durch Bindung an das Sep Pak<sup>®</sup>-C<sub>18</sub> Harz isoliert und vorgereinigt (2.6.2.2). Gewaschen wurde in diesem Fall mit 100ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, eluiert stufenweise mit jeweils 100ml 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% und 100% Methanol. Aus allen Fraktionen, einschließlich der Waschfraktion wurde 1ml Probe entnommen, aus dem "Durchlauf" 6ml, Methanol unter Vakuum entfernt, die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, der nach Abdampfen des Lösungsmittels zurückgebliebene Rückstand in 25µl Methanol gelöst und im Agardiffusionstest untersucht. Die mit 50%, 60% und 70% Methanol eluierten Fraktionen zeigten eine geringe biologische Aktivität. Um die darin enthaltenen Derivate zu konzentrieren, wurde

jeweils die gesamte Fraktion wie in Kapitel 2 unter 2.6.2.2 beschrieben aufgearbeitet. Die anschließende Analyse erfolgte mittels HPLC (s. 2.6.6.2 a)). Im Chromatogramm konnte bei einer Retentionszeit von 23.012min ein Peak identifiziert werden, der das für Avilamycine typische, auf den Dichloroisoeverninsäurerest zurückzuführende UV-Spektrum aufwies und möglicherweise auf ein verändertes Derivat zurückzuführen war (Retentionszeiten von Avilamycin A und Avilamycin C s. Tab. 26). Dieser Peak war jedoch sehr klein und von anderen Substanzen nicht klar abgrenzbar. Aufgrund der geringen Menge wurde auf eine weitere Aufreinigung und Charakterisierung der Substanz verzichtet und zur Aufklärung der Genfunktion eine andere Methode gewählt (s. 3.3.2.7). Angesichts der bis dahin vorliegenden Ergebnisse wurde aber deutlich, dass durch die Inaktivierung der Methyltransferase *aviG1* die Avilamycinbiosynthese so stark beeinträchtigt worden war, dass diese fast vollständig zum Erliegen kam. Zwar konnte eine antimikrobiell wirksame Verbindung mit einem Avilamycin-typischen UV-Spektrum isoliert werden, jedoch aufgrund der in der Kultur vorliegenden geringen Konzentration in einer für weitere Untersuchungen nicht ausreichenden Menge und Reinheit.

#### 3.3.2.6 Komplementierung der Mutante *S. viridochromogenes* GW1

Um auszuschließen, dass von der Einführung der Mutation in *aviG1* noch weitere Gene betroffen waren, sollte durch Expression von *aviG1* in der Mutante geprüft werden, ob sich auf diese Weise der Wildtypzustand, d.h. vollständige Avilamycinbiosynthese wiederherstellen ließ. Dazu wurde *aviG1* mittels PCR amplifiziert, in den integrativen Vektor pSET152 im Anschluß an den konstitutiven *ermE\**-Promoter des Erythromycin-Resistenzgens aus *Saccharopolyspora erythraea* (Bibb et al., 1985) kloniert und durch Protoplastentransformation in die Mutante *S. viridochromogenes* GW1 eingebracht. Die Amplifikation von *aviG1* erfolgte nach der unter 2.4.8.1 beschriebenen Methode. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass die natürliche Ribosomenbindestelle erhalten blieb. Über den forward-Primer wurde eine *MunI*-, über den reverse-Primer eine *XbaI*-Schnittstelle eingeführt. Um eine Klonierung im Anschluß an den *ermE\**-Promoter in entsprechender Transkriptionsrichtung zu ermöglichen, wurde das Plasmid pSET-1cerm (Hoffmeister et al., 2001) als Ausgangskonstrukt verwendet. Dieses Plasmid setzt sich zusammen aus dem Vektor pSET152 und dem hinter den *ermE\**-Promoter klonierten Gen *urdGT1c*. Aus pSET-1cerm wurde das Plasmid pSET-1cermA hergestellt, welches das aus *ermE\**-Promoter und *urdGT1c* bestehende *EcoRI*-Fragment in umgekehrter Orientierung enthält (vgl. Abb. 13). Durch Spaltung von pSET-1cermA mit den Restriktionsenzymen *MunI* und *XbaI* wurde *urdGT1c* entfernt. Das *aviG1* PCR-Produkt wurde mit denselben Enzymen behandelt und anschließend

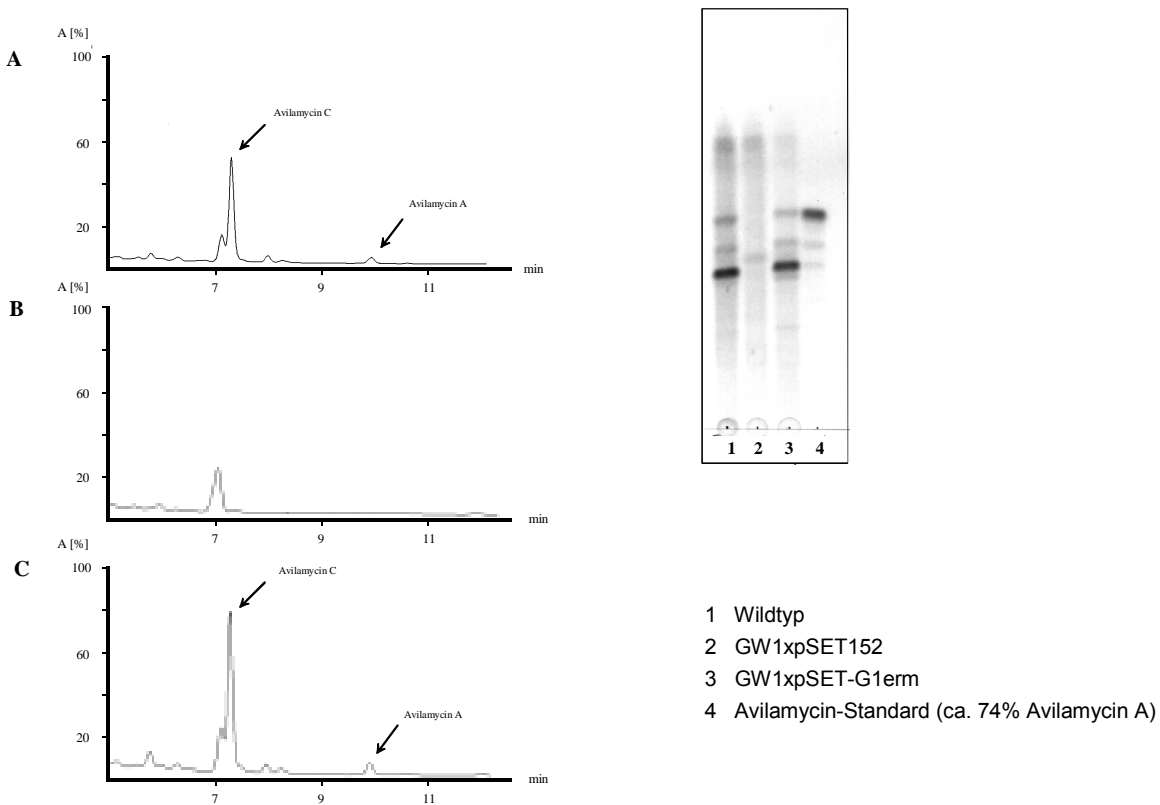
anstelle von *urdGT1c* hinter den *ermE*\*-Promoter ligiert. Das daraus resultierende Konstrukt wurde mit pSET-G1erm bezeichnet (s. Abb. 13). Sowohl pSET-G1erm als auch der leere Vektor pSET152 wurden aus dem *E.coli*-Stamm *E.coli* ET12567 isoliert und jeweils wie unter 2.4.3 beschrieben in die Mutante *S.viridochromogenes* GW1 transferiert. Da es sich bei pSET152 um einen ortsspezifisch integrierenden Vektor handelt, wurde die DNA vor der Transformation nicht denaturiert. Transformanden, die das Plasmid bzw. den leeren Vektor in das Chromosom eingebaut hatten, konnten aufgrund der dadurch erworbenen Apramycinresistenz selektioniert werden.



**Abb. 13: Plasmidkarten von pSET-1cermA, das eine Klonierung von Genen im Anschluß an den *ermE*\*-Promoter ermöglicht, und des daraus generierten Komplementierungskonstrukts pSET-G1erm.**

Die Transformationseffizienz lag für pSET-G1erm bei ungefähr 30 Kolonien pro  $\mu\text{g}$  DNA, für den leeren Vektor pSET152 bei mehr als 50 Kolonien pro  $\mu\text{g}$  DNA. Jeweils ein Klon, bezeichnet als GW1xpSET152 bzw. GW1xpSET-G1erm, wurde ausgewählt und in NL19+-Medium zur Produktion angezogen (2.3.2.1). Dabei wurden der HA- und der NL19+-Vorkultur jeweils 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Apramycin zugesetzt. Die Anzucht der Hauptkulturen erfolgte ohne Apramycin. Je 1ml des Überstands der einzelnen Kulturen wurde mit Ethylacetat extrahiert und mittels DC (2.6.4) und HPLC (2.6.6.2 b)) analysiert. Als Vergleich diente ein auf dieselbe Weise gewonnener Extrakt des Wildtyps *S.viridochromogenes* Tü57. Die Auswertung der DC- und HPLC-Profile ergab eindeutig, dass die Mutante *S.viridochromogenes* GW1 durch Expression von *aviG1* komplementiert werden konnte. Die Chromatogramme (s. Abb. 14) sind quasi identisch und zeigen die für Avilamycin C und Avilamycin A charakteristischen Signale. Der Klon

GW1xpSET152 entspricht bezüglich des Produktspektrums nach wie vor der Mutante *S. viridochromogenes* GW1. Damit konnte eine Beeinträchtigung der stromabwärts und stromaufwärts von *aviG1* liegenden Gene ausgeschlossen werden. Dies bedeutet auch, dass die in der Mutante *S. viridochromogenes* GW1 beobachtete Störung der Avilamycinbiosynthese allein auf die fehlende Funktionalität von AviG1 zurückzuführen ist.



**Abb. 14:** HPLC-Chromatogramme der Extrakte aus dem Wildtyp *S. viridochromogenes* Tü57 (A), der Mutante *S. viridochromogenes* GW1 (B) und der komplementierten Mutante *S. viridochromogenes* GW1 (C) mit charakteristischen Peaks für Avilamycin C und Avilamycin A. Im Extrakt der Mutante *S. viridochromogenes* GW1 konnte kein auf Avilamycine zurückzuführender Peak detektiert werden. Daneben abgebildet ist ein entsprechendes Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel 60; Dichlormethan/Methanol (9:1)).

### 3.3.2.7 Funktionsnachweis des Methyltransferasegens *aviG1* durch heterologe Expression

Da die Inaktivierung des Gens *aviG1* keinen Aufschluß über dessen Funktion gebracht hatte, wurde nach einer alternativen Methode gesucht. In Betracht kam, die postulierte Methyltransferaseaktivität durch heterologe Expression des Gens und anschließende Analyse der Reaktionsprodukte nachzuweisen. Um dieses Experiment durchführen zu können, musste zunächst ein geeignetes System entwickelt, insbesondere aber ein geeigneter Wirtstamm gefunden werden. Wie schon in Kapitel 3.2 erwähnt, handelt es

sich bei Methyltransferasen um eine sehr heterogene Enzymgruppe mit unterschiedlichster Substratspezifität. Deshalb war davon auszugehen, dass sie bezüglich des Akzeptormoleküls keine besonders große Flexibilität zeigen würden. Ein erster Test wurde in dem Stamm *Streptomyces fradiae* Tü2717 durchgeführt. Exprimiert wurde das Gen *oleY*, das für eine 3-O-Methyltransferase aus *S. antibioticus* codiert (vgl. 3.2) und die Methylierung der L-Olivose im Oleandomycin katalysiert (Rodriguez et al., 2001). Von der AG Prof. Salas (Oviedo, Spanien) wurde ein Expressionskonstrukt erhalten, das das klonierte Gen *oleY* enthielt. Als Vektor wurde der Multi-Copy *E. coli*-Streptomyceten-Shuttle-Vektor pUWL201 (Dr. U. Wehmeier, Wuppertal) verwendet, mit dem konstitutiven *ermE*\*-Promoter des Erythromycin-Resistenzgens aus *Saccharopolyspora erythraea* (Bibb et al., 1985). Das von *S. fradiae* Tü2717 produzierte Urdamycin A (s. Abb. 15) enthält in der Zuckerseitenkette ebenfalls zwei Olivosemoleküle, wobei es sich in diesem Fall allerdings um D-Olivose und nicht um L-Olivose handelt. Dennoch erschien es möglich, dass OleY auch hier eine Methylgruppe einführt. Als Produkte denkbar waren die in Abb. 15 dargestellten Verbindungen.

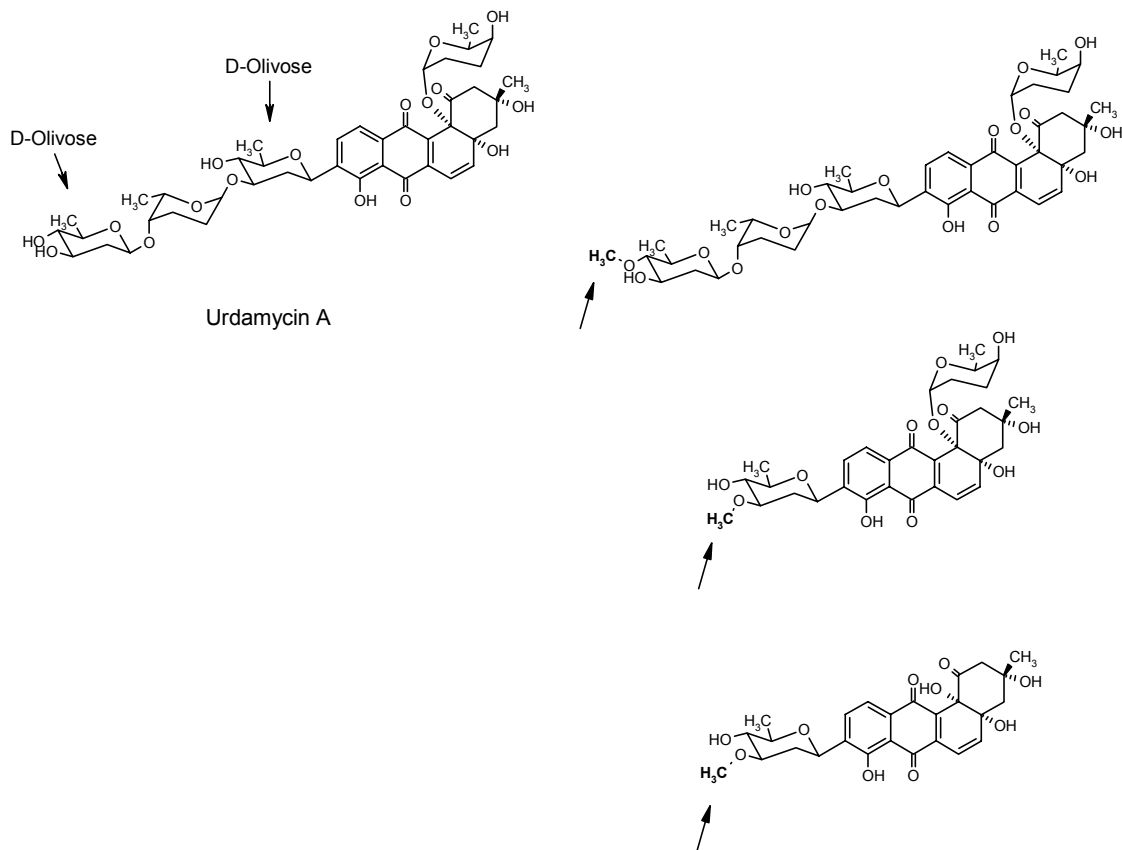


Abb. 15: Strukturen von Urdamycin A (produziert von *S. fradiae* Tü2717) und möglichen Derivaten, die bei der Expression des Methyltransferasengens *oleY* in *S. fradiae* Tü2717 entstehen könnten.

Nach Isolierung des Expressionskonstrukts pUWL-oleY aus dem *E.coli*-Stamm *E.coli* ET12567, wurde der Stamm *S.fradiae* Tü2717 nach dem unter 2.4.3 aufgeführten Protokoll transformiert. Zur Kontrolle wurde parallel dazu eine Transformation mit dem leeren Vektor pUWL201 durchgeführt. Die Selektion erfolgte durch Überschichten mit Thiostrepton. Je zwei Klone, bezeichnet als *S.fradiae* x pUWL/8, *S.fradiae* x pUWL/11, *S.fradiae* x OleY/1 und *S.fradiae* x OleY/2, wurden ausgewählt und unter Thiostrepton-Selektionsdruck nach der in Kapitel 2 unter 2.3.2.1 aufgeführten Methode in NL111/v-Medium angezogen. Nach 60h, 84h und 108h wurden pro Kolben 5ml Probe entnommen, mit Ethylacetat extrahiert und mit Hilfe von DC (2.6.4) und HPLC (2.6.6.1) analysiert. Als Vergleich wurde ein entsprechend gewonnener Extrakt des Wildtyps *S.fradiae* Tü2717 eingesetzt. Die erhaltenen Chromatogramme zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Transformanden und dem Wildtyp. Um sicherzugehen, dass keine methylierten Urdamycine gebildet wurden, die unter Umständen in ihren Rf-Werten nur leicht von den natürlich vorkommenden Urdamycinen abweichen, wurde zusätzlich eine HPLC-MS-Analyse bei der Firma Analytik (Berlin) in Auftrag gegeben. Diese brachte jedoch ebenfalls keinen Hinweis auf neue Produkte, so dass davon ausgegangen werden musste, dass die Expression des Methyltransferasegens *oleY* in *S.fradiae* Tü2717 nicht zu einer Methylierung der Urdamycine geführt hatte. Die Möglichkeit, dass die Plasmide in *S.fradiae* nicht stabil replizieren, konnte ausgeschlossen werden, da auch aus den 108h alten Kulturen sowohl der Vektor pUWL201 als auch das Expressionskonstrukt pUWL-oleY unverändert reisolieren konnten. Damit war deutlich, dass zum Nachweis von Methyltransferaseaktivität ein System gefunden werden musste, das bezogen auf das zu methylierende Substrat den natürlichen Verhältnissen möglichst nahe kommt. Wie in Abschnitt 3.2 dargelegt, wies das von *aviG1* abgeleitete Protein eine relativ hohe Homologie zu den beiden, an der L-Mycarose-Biosynthese beteiligten C-Methyltransferasen TyICIII und EryBIII auf. Der einzige Zucker innerhalb des Avilamycinmoleküls, bei dem eine C-Methylgruppe vorliegt, ist die 2-Desoxy-D-avalose. L-Mycarose und 2-Desoxy-D-avalose sind sich sehr ähnlich (s. Abb. 16). Der Hauptunterschied, bezogen auf das zu methylierende Substrat, besteht in der Konfiguration an Position C5. Da bekannt war, dass eine in *eryBIII* defekte Mutante des Erythromycinproduzenten *Saccharopolyspora erythraea* existiert (Gaisser et al., 1998), sollte versucht werden, diese Mutante durch die Expression von *aviG1* zu komplementieren und auf diese Weise eine C-Methyltransferaseaktivität nachzuweisen. *AviG1* wurde mittels PCR amplifiziert (s. 2.4.8.1) und über die eingeführten Schnittstellen *HindIII* und *SphI* in den Vektor pLitmus 38 ligiert. Umklonierung in das Expressionsplasmid pSG142 (Gaisser et al., 2000), Komplementation der Mutante



*Saccharopolyspora erythraea eryBIII* 335 und Analyse der gebildeten Produkte wurden von Sabine Gaisser in der Arbeitsgruppe von Prof. Leadlay (Cambridge, UK) durchgeführt (Weitnauer et al., 2002).

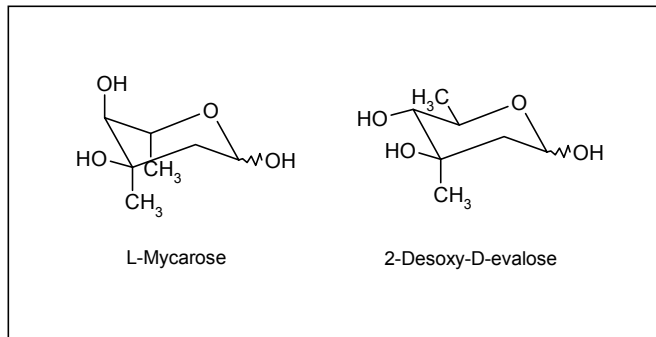


Abb. 16: Vergleich der Strukturen der beiden Desoxyzucker L-Mycarose und 2-Desoxy-D-evalose.

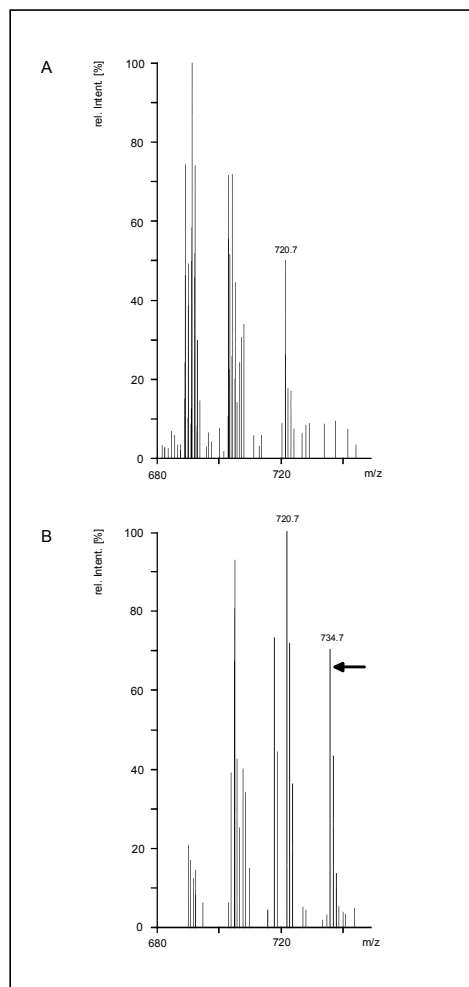


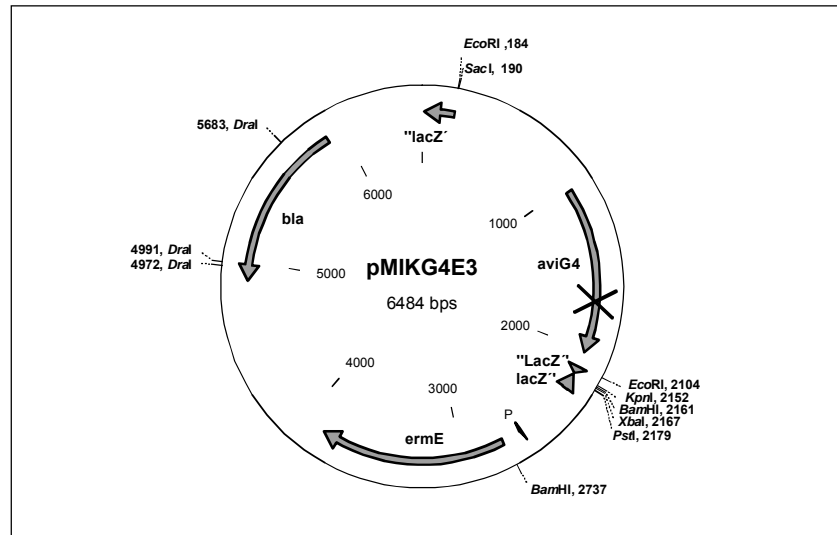
Abb. 17: ESI-MS-Spektren der Extrakte aus der Mutante *Saccharopolyspora erythraea eryBIII* 335 (A) und der mit *aviG1* komplementierten Mutante *Saccharopolyspora erythraea eryBIII* 335 (B) mit den charakteristischen Signalen für 3'-C-Demethyl-erythromycin A (m/z 720.7) und Erythromycin A (m/z 734.7).

Extrakte der Kulturüberstände des Wildtyps *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338, der *eryBIII*-Mutante 335 und der mit *aviG1* komplementierten *eryBIII*-Mutante 335 wurden mittels ESI-MS analysiert. Die Probe des Wildtyps zeigte das für Erythromycin A erwartete Signal bei  $m/z$  734.7, die Mutante 335 das Signal für 3''-C-Demethyl-Erythromycin A bei  $m/z$  720.7. Im Massenspektrum der komplementierten Mutante konnten zwei Peaks bei  $m/z$  720.7 und 734.7 detektiert werden, was darauf hinwies, dass sowohl Erythromycin A als auch 3''-C-Demethyl-Erythromycin A gebildet worden waren (s. Abb. 17). Dass die Methylierung spezifisch an der L-Mycarose stattgefunden hatte, konnte durch eine MS/MS-Analyse bestätigt werden. Damit war gezeigt, dass die *eryBIII*-Mutante 335 durch Expression von *aviG1* komplementiert werden konnte, und *AviG1* dazu in der Lage ist, die Rolle von *EryBIII* während der L-Mycarose-Biosynthese zu übernehmen. Das bedeutet in Bezug auf die Avilamycin-Biosynthese, dass es sich bei *AviG1* um eine C-Methyltransferase handelt, die die Methylierung an Position C3 eines aktivierten Zuckers katalysiert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur L-Mycarose kommt hierfür nur die 2-Desoxy-D-avalose in Frage, bei deren Biosynthese *AviG1* somit analog zur Mycarose-Biosynthese für die Methylierung an Position C3 verantwortlich gemacht werden kann.

### 3.3.3 Inaktivierung des Methyltransferasegens *aviG4*

#### 3.3.3.1 Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids *pMIKG4E3*

Die Inaktivierung des Gens sollte durch Einführung einer Frameshift-Mutation erfolgen. Dazu stand eine singularär in *aviG4* vorkommende *NcoI*-Restriktionsschnittstelle zur Verfügung. Das bei der Subklonierung des Cosmids P2 hergestellte Plasmid P13ERe (s. 3.1.1.1), auf dem *aviG4* vollständig enthalten ist, wurde mit den beiden Enzymen *SacI* und *KpnI* gespalten und das entstandene ca. 1,9kb große Insert in den Inaktivierungsvektor pSP1 ligiert. Das resultierende Plasmid pSP1-IKG4E wurde anschließend mit *NcoI* geöffnet, zum Auffüllen der 5'-Überhänge mit der T4-DNA-Polymerase behandelt (2.4.7.3) und religiert. Aufgrund der bei dieser Reaktion eingeführten Nukleotide kam es zu einer Verschiebung des Leserasters um vier Basen und damit zu der beabsichtigten Frameshift-Mutation, was durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Das auf diese Weise hergestellte Inaktivierungskonstrukt (vgl. Abb. 18) wurde als pMIKG4E3 bezeichnet und zur Transformation von *S. viridochromogenes* Tü57 eingesetzt.



**Abb. 18:** Plasmidkarte des Inaktivierungskonstrukts pMIKG4E3. Die singular in *aviG4* vorkommende *NcoI*-Schnittstelle wurde zur Einführung einer Frameshift-Mutation verwendet.

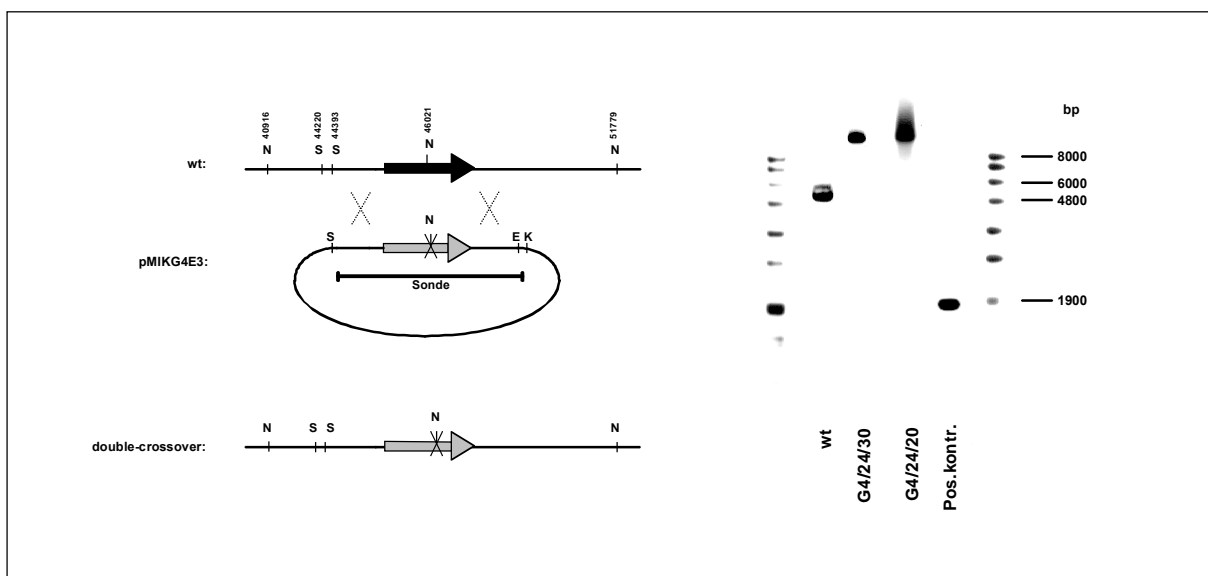
### 3.3.3.2 Transformation des *S. viridochromogenes* Tü57 mit pMIKG4E3

Die Transformation des *S. viridochromogenes* Tü57 mit dem Inaktivierungskonstrukt pMIKG4E3 erfolgte nach dem in Kapitel 2 unter 2.4.3 aufgeführten Protokoll. Zur Selektionierung wurde mit erythromycinhaltigem SNA überschichtet. Es wurden 50-100 Kolonien pro Platte erhalten, von denen vier ausgewählt und nach Verifizierung der Erythromycinresistenz direkt über mehrere Flüssigkulturpassagen ohne Zusatz von Erythromycin angezogen wurden, um das zweite Crossover zu erzielen. Da die vier Klone, bezeichnet als G4/16, G4/17, G4/22 und G4/24, eindeutig erythromycinresistent waren, wurde davon ausgegangen, dass eine korrekte Integration des Inaktivierungskonstrukts stattgefunden hatte und somit auf eine detaillierte Analyse der Transformanden mittels PCR oder Southern-Hybridisierung verzichtet werden konnte.

### 3.3.3.3 Nachweis eines double-crossovers

Es wurden insgesamt drei Flüssigkulturpassagen durchgeführt und von jeder Passage eine Sporensuspension hergestellt. Die Sporensuspension der dritten Passage des Klons G4/24 wurde in einer geeigneten Verdünnung vergleichend auf HA-Festmedium mit und ohne Zusatz von Erythromycin ausgestrichen und drei Tage bei 37°C inkubiert. Es war ein deutlicher Unterschied im Wachstum zwischen den Platten erkennbar, d.h. ein großer Anteil der Sporen war infolge des zweiten Crossovers, welches zum Verlust des Vektors führt, erythromycinsensitiv geworden. 36 Klone wurden gepickt und erneut sowohl auf HA-Festmedium mit Antibiotikum als auch auf HA-Festmedium ohne

Antibiotikum angezogen. Von diesen 36 Klonen erwiesen sich 32 als eindeutig sensitiv. Insgesamt vier erythromycinsensitive Klone, genannt G4/24/8, G4/24/10, G4/24/20 und G4/24/30, wurden ausgewählt und nach Isolierung der Gesamt-DNA mit Hilfe der PCR nach der unter 2.4.8.4 aufgeführten Methode analysiert. Erwartet wurde ein 1,5kb großes Amplifikat. Als Vergleich diente die aus dem Wildtyp isolierte DNA bzw. das entsprechend gewonnene PCR-Fragment. Im Falle einer Reversion zum Wildtyp läßt sich das von *aviG4* erhaltene Amplifikat mit *NcoI* spalten, im Falle eines Austausches von *aviG4* gegen das mutierte Allel aufgrund der zerstörten Schnittstelle nicht mehr. Bei den PCR-Produkten aus Wildtyp, G4/24/8 und G4/24/10 wurden nach Restriktionsverdau mit *NcoI* zwei Fragmente der für das Wildtypgen erwarteten Größen von 1kb und 0,5kb erhalten. Die beiden Klone G4/24/20 und G4/24/30 hingegen zeigten das für eine double-crossover-Mutante charakteristische Bild des ungespaltenen PCR-Fragments. Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden diese beiden positiven Klone mit Hilfe der Southern-Hybridisierung genauer untersucht. Als Sonde wurde das 1,9kb große Insert aus dem Inaktivierungskonstrukt pMIKG4E3 verwendet, die chromosomale DNA wurde mit *NcoI* gespalten. Als Vergleich wurde die gleichermaßen behandelte Gesamt-DNA des Wildtyps *S.viridochromogenes* Tü57 eingesetzt. Die Größen der erwarteten und erhaltenen Signale sind in Tab. 31 zusammengefasst, das Integrationsereignis und der zugehörige Southern-Blot sind in Abb. 19 dargestellt.



**Abb. 19:** Southern-Analyse genomischer DNA aus den double-crossover-Mutanten G4/24/20 und G4/24/30 im Vergleich zum Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57. Die genomische DNA wurde jeweils mit *NcoI* restringiert, hybridisiert wurde mit dem 1,9kb großen Insert aus dem Inaktivierungskonstrukt pMIKG4E3 (E, *EcoRI*; S, *SacI*; N, *NcoI*; K, *KpnI*).

Tab. 31: Erwartetes und erhaltenes Bandenmuster der chromosomalen DNA des Wildtyps *S. viridochromogenes* Tü57 und der double-crossover-Mutanten G4/24/20 und G4/24/30 im Southern-Experiment (1,9kb *SacI/KpnI*-Fragment aus pMIKG4E3 als Sonde)

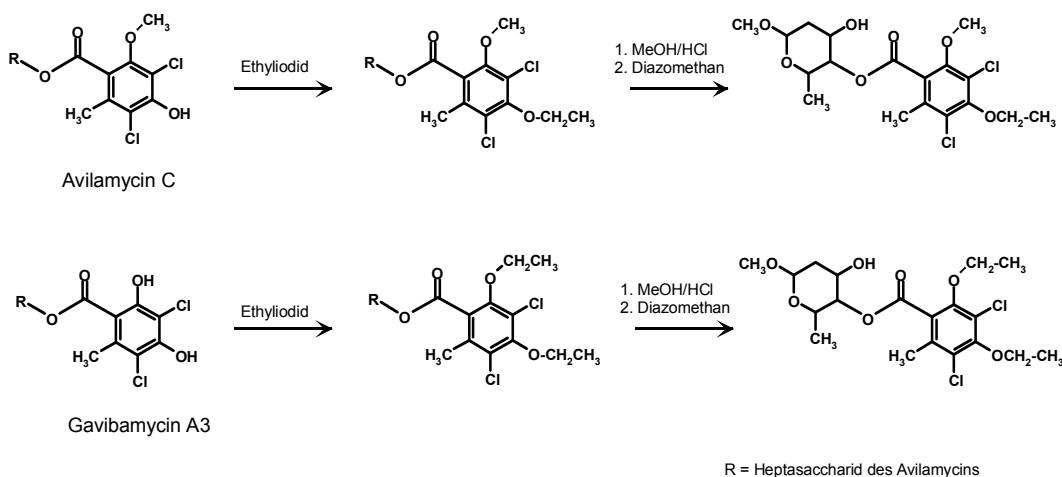
Stamm/Klon	erwartete Fragmentgrößen [bp]	erhaltene Fragmentgrößen [bp]
Wildtyp	5105 5758	5105 5758
G4/24/20	10863	>8000 (10863)
G4/24/30	10863	>8000 (10863)

In allen Fällen entsprachen die erhaltenen Signale den erwarteten. D.h. beim Wildtyp waren zwei Signale der Größe 5,1kb und 5,7kb erkennbar und bei den beiden Klonen G4/24/20 und G4/24/30 aufgrund des Verlustes der *NcoI*-Schnittstelle nur ein Signal bei einer der Summe der Wildtypsignale entsprechenden Größe von 10,8kb. Damit war also nachgewiesen, dass es sich sowohl bei G4/24/20 als auch bei G4/24/30 um eine double-crossover-Mutante handelte. Mit G4/24/30 wurde schließlich weitergearbeitet, unter der Bezeichnung *S. viridochromogenes* GW4.

#### 3.3.3.4 Analyse der Produkte von *S. viridochromogenes* GW4

Zunächst wurden von Mutante und Wildtyp, wie in Kapitel 2 unter 2.6.2.1 beschrieben, jeweils Rohextrakte aus 200ml Kulturüberstand hergestellt und mit Hilfe der DC und des Agardiffusionstests analysiert. Dünnschichtchromatographisch konnten im Extrakt der Mutante Avilamycinderivate bei einem im Vergleich zu den im Wildtypextrakt enthaltenen Avilamycinen A und C geringeren Rf-Wert detektiert werden. Im Agardiffusionstest zeigten beide Extrakte eine vergleichbare antibiotische Aktivität. Da diese ersten Ergebnisse eindeutige Hinweise lieferten, dass die Mutante *S. viridochromogenes* GW4 neue antimikrobiell wirksame Avilamycinderivate produziert, sollte im nächsten Schritt eine für eine Strukturaufklärung ausreichende Menge Substanz isoliert werden. Dazu wurden insgesamt 2l Hauptkultur mit Ethylacetat extrahiert und der dabei gewonnene Rohextrakt wie in Kapitel 2 unter 2.6.5 beschrieben über eine Kieselgelsäule aufgetrennt. Unterstützt durch DC und Agardiffusionstest konnten sechs Fraktionen (Fraktion 4 bis 9) identifiziert werden, in denen Avilamycinderivate enthalten waren. In den Fraktionen 5 und 6 lag das aus dem ersten Experiment bekannte Hauptderivat mit dem gegenüber Avilamycin A und C geringeren Rf-Wert in der höchsten Konzentration vor. Um einen weiteren Reinigungseffekt zu erzielen, wurden diese beiden Fraktionen vereinigt und, wie in Kapitel 2 2.6.5 erwähnt, auf eine LH20-Säule aufgetragen. Nach Elution mit 100% Methanol wurden insgesamt sieben Fraktionen erhalten, die antibiotische Aktivität besaßen (Fraktion 6 bis 12). Dem dünnschichtchromatographischen Ergebnis zufolge befand sich das gesuchte

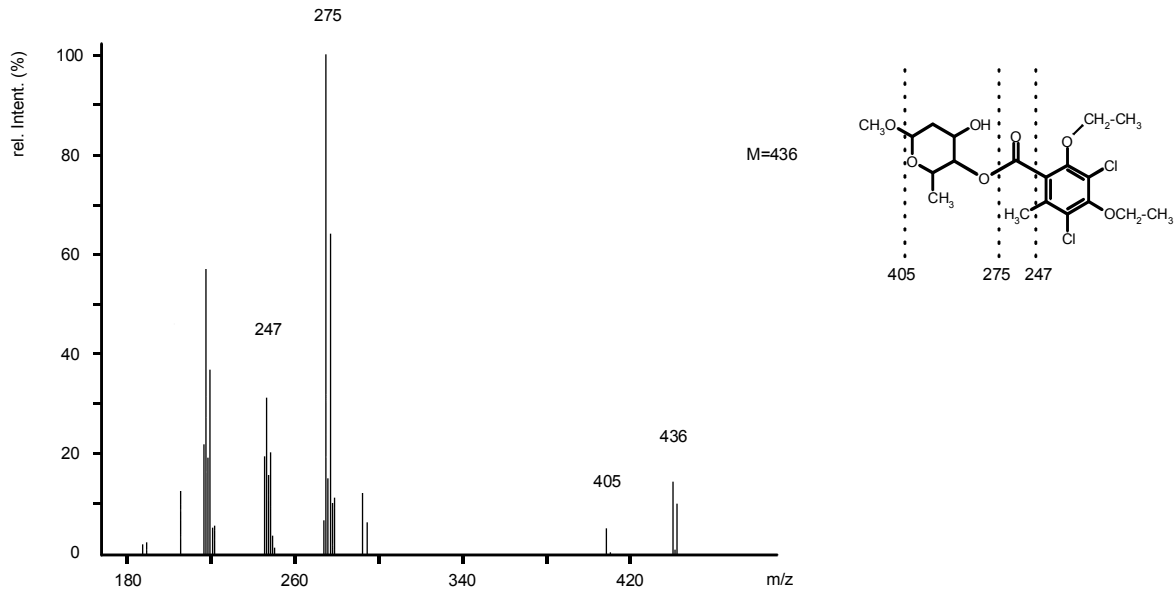
Hauptderivat der Mutante fast vollständig in Fraktion 8. Alle weiteren Untersuchungen wurden deshalb mit dieser als LH20F8 bezeichneten Fraktion durchgeführt. Die durch ESI-MS-Analyse (2.6.7.3) ermittelte Gesamtmasse dieser Verbindung lag bei 1390. Dies entspricht der Masse von Avilamycin C ( $m/z$  1404; vgl. 3.3.1) abzüglich einer Methylgruppe und war damit ein eindeutiges Indiz dafür, dass es sich bei AviG4 in der Tat um eine Methyltransferase handelte. Basierend auf der in Abschnitt 3.1.2.1 aufgestellten Hypothese, dass AviG4 für die Methylierung der Orsellinsäure verantwortlich ist, konzentrierten sich alle weiteren Arbeiten auf die Strukturanalyse dieses Restes. Die Fraktion LH20F8 mit dem Hauptprodukt der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 und parallel dazu ein nach 2.6.2.2 hergestellter und aufgereinigter Extrakt des Wildtyps *S.viridochromogenes* Tü57 wurden, wie in Kapitel 2 unter 2.6.7.2 beschrieben, zunächst durch Behandlung mit Ethyliodid derivatisiert, dann hydrolysiert und die Reaktionsprodukte anschließend mittels GC-MS analysiert. Die einzelnen Reaktionsschritte sind in Abb. 20 dargestellt. Fehlt die Methylgruppe im Dichloroisoverminsäurerest, so endet die Reaktion in einem diethylierten Produkt, ist sie wie z.B. in den vom Wildtyp produzierten Avilamycinen C und A vorhanden, endet sie in einem monoethylierten Produkt (vgl. Abb. 20).



**Abb. 20:** Reaktionsablauf der Derivatisierung der Avilamycine und Gavibamycine zur Vorbereitung der GC-MS-Analyse

Die Massendifferenz zwischen diesen beiden möglichen Reaktionsprodukten beträgt 14. Im Massenspektrum der Mutante konnten Peaks bei  $m/z$  247,  $m/z$  275,  $m/z$  405 und  $m/z$  436 detektiert werden (s. Abb. 21), die auf die entsprechenden, in der Abbildung markierten Fragmente des diethylierten Produktes zurückzuführen sind. Der Peak bei  $m/z$  436 entspricht dem Molekülpeak und gibt die Gesamtmasse des

Reaktionsproduktes wieder. Im Massenspektrum des Wildtyps lag der Molekülpeak wie erwartet bei  $m/z$  422, d.h. korrespondierend zur Differenz zwischen der Ethyl- und der Methylgruppe um 14 Masseneinheiten tiefer als bei der Mutante.



**Abb. 21: EI-MS-Spektrum des D-Olivosyl-Esters der Dichloro-di-O-ethyl-orsellinsäure (bei der Derivatisierung der Gavibamycine entstandenes Produkt).**

Damit war gezeigt, dass das von der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 produzierte Hauptderivat am Orsellinsäurerest zwei freie Hydroxylgruppen trägt, was wiederum bedeutet, dass *aviG4* für die Methyltransferase codiert, die während der Avilamycin-Biosynthese die Methylierung der zur Esterbindung ortho-ständigen Hydroxylgruppe katalysiert. Kombiniert man die Ergebnisse aus ESI-MS-Analyse und GC-MS-Analyse, so lässt sich für das Hauptprodukt der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 die in Abb. 22 dargestellte Struktur eines am Dichloroisoeverninsäurerest demethylierten Avilamycin C ableiten, bezeichnet als Gavibamycin A3. Spätere HPLC-ESI-MS-Analysen (2.6.7.1) eines mit Hilfe der Sep-Pak<sup>®</sup>C<sub>18</sub>-Kartuschen aufgereinigten Extrakts der Mutante ergaben, dass neben Gavibamycin A3 als Hauptprodukt auch kleinere Mengen des zu Avilamycin A analogen demethylierten Derivats, bezeichnet als Gavibamycin A1, gebildet werden. Die Struktur ist in Abb. 22 dargestellt, die jeweiligen Massen der als Na<sup>+</sup>-Addukte erscheinenden Derivate sind in Tab. 32 zusammengefasst.

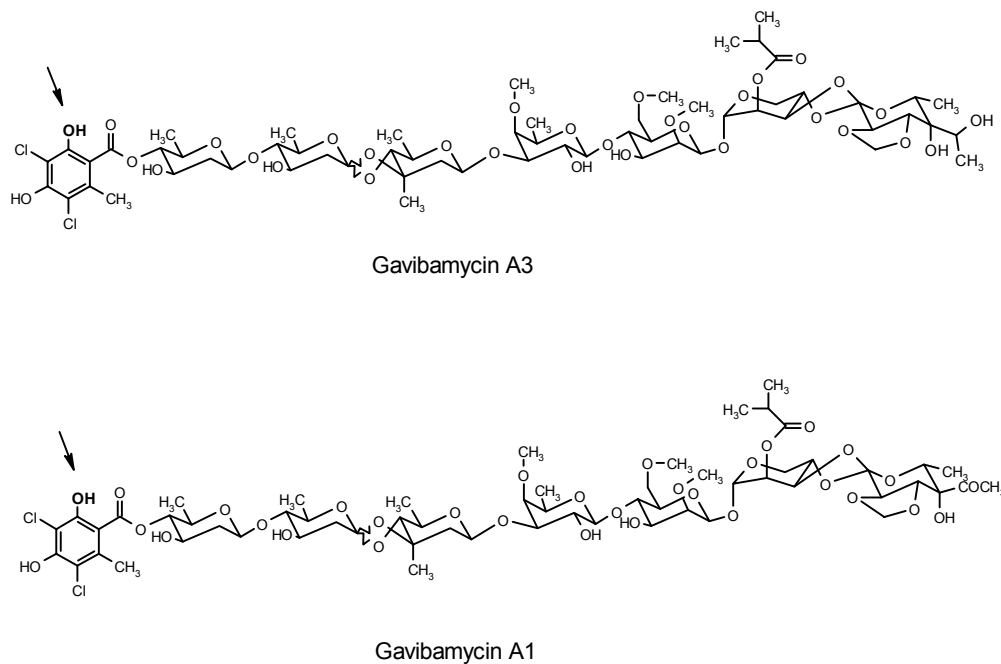


Abb. 22: Strukturen der Hauptprodukte aus der Mutante *S. viridochromogenes* GW4

Tab. 32: Molekülmassen (M) der Hauptprodukte aus der Mutante *S. viridochromogenes* GW4 und dem Wildtyp *S. viridochromogenes* Tü57

Derivat/Stamm	analog zu	M	M+Na
Gavibamycin A1 ( <i>S. viridochromogenes</i> GW4)	Avilamycin A	1388	1411
Gavibamycin A3 ( <i>S. viridochromogenes</i> GW4)	Avilamycin C	1390	1413
Avilamycin A ( <i>S. viridochromogenes</i> Tü57)	-	1402	1425
Avilamycin C ( <i>S. viridochromogenes</i> Tü57)	-	1404	1427

Die Ergebnisse des hier beschriebenen Verfahrens zur Strukturaufklärung der Gavibamycine A1 und A3 konnten außerdem auch im Rahmen der Funktionsbestimmung von *aviG2* und *aviG5* durch die dort durchgeführten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analysen eindeutig bestätigt werden (vgl. 3.3.4.5 und 3.3.5.5). Bei mit LH20F8 und bei mit dem über die Sep-Pak<sup>®</sup>C<sub>18</sub>-Kartusche aufgereinigten Extrakt der Mutante durchgeführten HPLC-Analysen fiel auf, dass keiner der auftretenden Peaks ein für Avilamycine charakteristisches UV-Spektrum aufwies. Dies wurde auf das veränderte Substitutionsmuster des Orsellinsäurerestes, d.h. auf den Einfluss der zusätzlichen



freien Hydroxylgruppe zurückgeführt. Um jedoch eine Identifizierung der Gavibamycine im HPLC-Chromatogramm zu ermöglichen, wurde deren UV-Spektrum bestimmt. Dazu wurde Gavibamycin A3 mit Hilfe einer Sep-Pak<sup>®</sup>C<sub>18</sub>-Kartusche und anschließender präparativer Dünnschichtchromatographie (2.6.6.3) aus 100ml Hauptkultur möglichst rein isoliert und nach der in Kapitel 2 unter 2.6.6.2 a) beschriebenen Methode zur HPLC-Analyse eingesetzt. Das zugehörige HPLC-Profil ist in Abb. 23 dargestellt. Gavibamycin A3 erscheint bei einer Retentionszeit von 22,7 min. Das mit Hilfe des Dioden-Array-Detektors aufgenommene UV-Spektrum zeigt deutliche Unterschiede zum Avilamycinspektrum (Abb. 23). Es treten insgesamt drei Absorptionsmaxima bei Wellenlängen von 220nm, 250nm und 320nm auf.

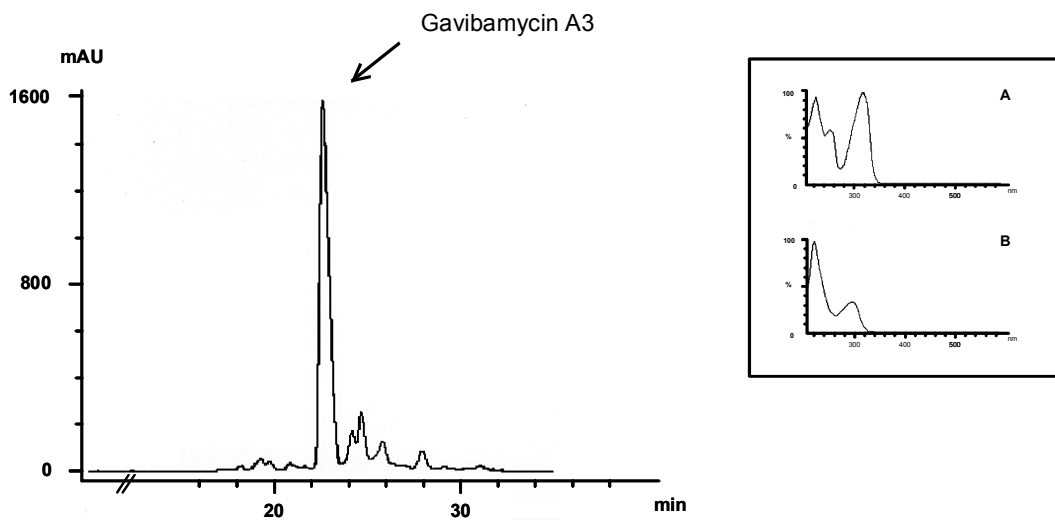


Abb. 23: HPLC-Profil von Gavibamycin A3 mit entsprechendem UV-Spektrum (A) im Vergleich zum Spektrum der Avilamycine (B).

### 3.3.3.5 Komplementierung der Mutante *S. viridochromogenes* GW4

Genauso wie bei der Herstellung der Mutante *S. viridochromogenes* GW1 (s. 3.3.2.6) sollte auch hier durch Komplementierung ausgeschlossen werden, dass neben *aviG4* noch weitere Gene von der eingeführten Mutation betroffen waren. Die Konstruktion des Komplementierungsplasmids erfolgte nach derselben Strategie wie bei pSET-G1erm (s. 3.3.2.6). *AviG4* wurde nach der in Kapitel 2 unter 2.4.8.4 aufgeführten Methode mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass die natürliche Ribosomenbindestelle erhalten blieb. Über den forward-Primer AviG4F wurde eine *MunI*-Schnittstelle eingeführt, über den reverse-Primer AviG4R eine *XbaI*-Schnittstelle. Nach

Restriktion von pSET-1cermA (s. 3.3.2.6, Abb. 13) mit *MunI* und *XbaI* zur Entfernung von *urdGT1c* wurde das ebenfalls mit diesen beiden Enzymen gespaltene *aviG4*-PCR-Fragment hinter den *ermE\**-Promoter ligiert. Das dadurch erhaltene Plasmid pSET-G4erm (s. Abb. 24) wurde nach Passage durch den *E.coli*-Stamm *E.coli* ET12567 nach der in Kapitel 2 unter 2.4.3 beschriebenen Methode in die Mutante *S.viridochromogenes* GW4 eingebracht. Als Vergleich diente ein Ansatz, in dem der leere Vektor pSET152 zur Transformation eingesetzt wurde. Die Selektionierung erfolgte durch Überschichten mit Apramycin.

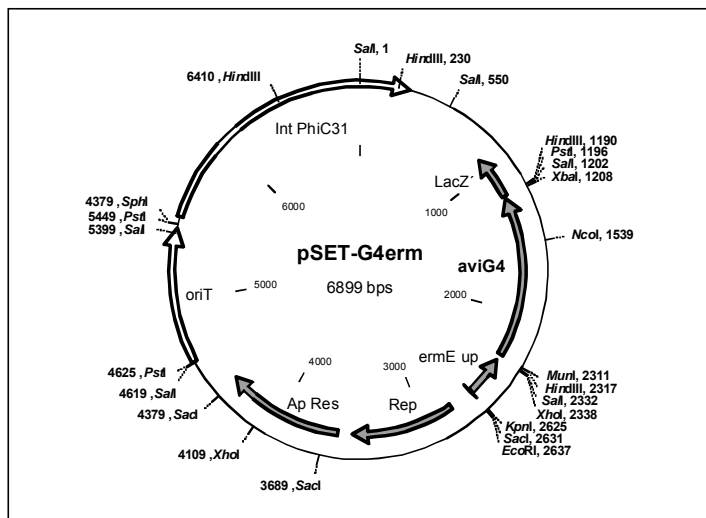


Abb. 24: Plasmidkarte des Komplementierungskonstrukts pSET-G4erm

Bei der Transformation mit pSET-G4erm wurden 50-100 apramycinresistente Klone pro Platte erhalten, bei der Transformation mit pSET152 mehr als 500 Klone pro Platte. Jeweils ein Klon, bezeichnet als GW4xpSET152/17 bzw. GW4xpSET-G4erm/4, wurde ausgewählt und in Produktionsmedium angezogen (2.3.2.1). Der HA- und der NL19+-Vorkultur wurde jeweils 25µg/ml Apramycin zugesetzt. Die Anzucht der Hauptkulturen erfolgte ohne Apramycin. Je 1ml des Überstands der einzelnen Kulturen wurde mit Ethylacetat extrahiert und anschließend dünnschichtchromatographisch untersucht (2.6.4). Als Vergleich diente ein auf dieselbe Weise gewonnener Extrakt des Wildtyps *S.viridochromogenes* Tü57. Das erhaltene Chromatogramm ließ erkennen, dass die Mutante *S.viridochromogenes* GW4 durch Expression von *aviG4* komplementiert werden konnte. Bezüglich des Produktspektrums entsprach GW4xpSET-G4erm/4 wieder dem Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57, während GW4xpSET152/17 nach wie vor die Merkmale der Mutante zeigte.

### 3.3.4 Herstellung einer Doppelmutante durch Inaktivierung der Methyltransferasegene *aviG4* und *aviG2*

#### 3.3.4.1 Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids *pMIKG2*

Wie bei der Inaktivierung von *aviG4* sollte auch bei *aviG2* eine Frameshift-Mutation in das Gen eingeführt werden. Herangezogen wurde hierfür eine singuläre *SphI*-Restriktionsschnittstelle. Ein 1,8kb *EcoRI/BamHI*-Fragment, welches *aviG2* enthält, wurde zunächst in den Vektor pBC SK- kloniert. Das daraus resultierende Plasmid pE621 wurde durch Restriktion mit *SphI* geöffnet, zum Glätten der 3'-Überhänge mit T4-DNA-Polymerase behandelt (2.4.7.3) und religiert. Zur Überprüfung der Reaktion wurde der Bereich um die modifizierte Schnittstelle sequenziert. Es wurde bestätigt, dass aufgrund der 3'-5'-Exonucleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase wie erwartet vier Basen entfernt worden waren, was zum erwünschten Frameshift führte. Zur Fertigstellung des Inaktivierungskonstrukts wurde das 1,8kb große Insert durch Spaltung mit *EcoRI* und *XbaI* aus dem bei der Religation entstandenen Plasmid pE621T4Re10 herausgeschnitten und in den mit denselben Enzymen geöffneten Vektor pSP1 umklont. Eine Karte des dadurch erhaltenen Inaktivierungskonstrukts *pMIKG2* ist in Abb. 25 dargestellt.

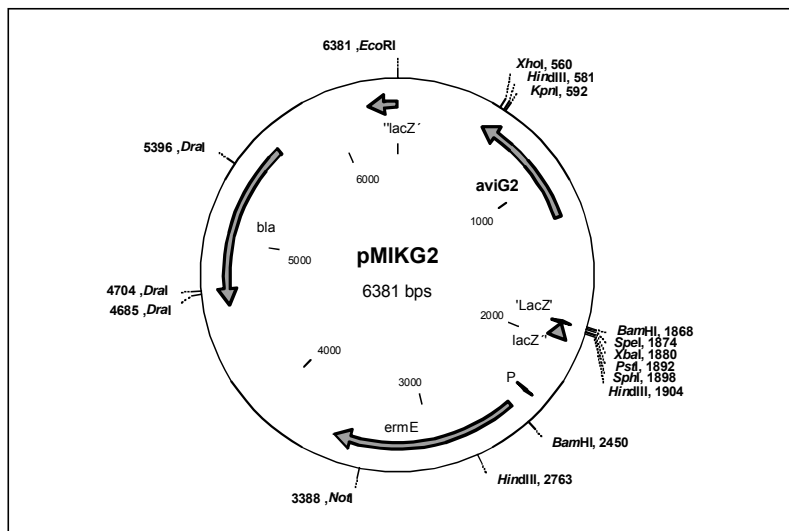


Abb. 25: Plasmidkarte des Inaktivierungskonstrukts *pMIKG2*. Die singulär in *aviG2* vorkommende *SphI*-Schnittstelle wurde zur Einführung einer Frameshift-Mutation verwendet.

#### 3.3.4.2 Transformation der Mutante *S. viridochromogenes* GW4 mit *pMIKG2*

Um eine Doppelmutante zu erhalten, wurde die Mutante *S. viridochromogenes* GW4, die bereits das defekte Gen *aviG4* trägt (s. 3.3.3.3), mit dem Inaktivierungskonstrukt

pMIKG2 nach dem in Kapitel 2 2.4.3 aufgeführten Protokoll transformiert. Die Selektionierung erfolgte durch Überschichten mit erythromycinhaltigem SNA. Es wurden insgesamt 19 Klone erhalten. Drei eindeutig erythromycinresistente Klone, bezeichnet als bG2/2, bG2/6 und bG2/10, wurden ausgewählt und zum Nachweis der Integration des Inaktivierungskonstrukts mittels PCR und Southern-Hybridisierung genauer analysiert.

#### 3.3.4.3 Nachweis und Beschreibung des Integrationsereignisses

Zum Nachweis der erfolgreichen Integration des Inaktivierungskonstrukts in das Chromosom von *S.viridochromogenes* GW4 mittels PCR wurde die unter 2.4.8.2 aufgeführte Methode angewendet. Es wurde ein PCR-Produkt mit einer Größe von 930bp erwartet, das im Falle des Wildtyps durch Restriktion mit *SphI* in zwei Fragmente der Größen 570bp und 360bp gespalten wird. Bei erfolgtem single-crossover, liegen auf dem Chromosom sowohl das ursprüngliche Gen *aviG2* als auch die mutierte Kopie vor, so dass nach PCR und Restriktionsverdau des erhaltenen Produkts mit *SphI* drei Fragmente erhalten werden müssten. Ein Fragment der Größe 930bp korrespondierend zum mutierten Allel, welches sich aufgrund der zerstörten Schnittstelle nicht mehr spalten lässt, und die beiden Fragmente der Größe 570bp und 360bp aus dem Amplifikat des nicht mutierten Allels. Bei Einsatz chromosomaler DNA aus *S.viridochromogenes* GW4 (entspricht Wildtyp) wurden die beiden erwarteten Fragmente (570bp und 360bp) erhalten. Im Falle der vermuteten Integrationsmutanten zeigte nur bG2/2 die für ein single-crossover Ereignis typischen drei Fragmente, bG2/6 sah aus wie der Wildtyp und bG2/10 zeigte nur das ungespaltene, auf das mutierte Allel hinweisende Fragment der Größe 930bp. Da aufgrund dieses Ergebnisses keine sichere Aussage über die Art der Integration getroffen werden konnte, wurden Wildtyp und die beiden Klone bG2/2 und bG2/10 mit Hilfe der Southern-Hybridisierung genauer untersucht. Als Sonde wurde das 1,8kb große Insert aus dem Inaktivierungskonstrukt pMIKG2 verwendet, die chromosomale DNA wurde mit *EcoRI* und *SphI* gespalten. Prinzipiell ist eine Integration durch homologe Rekombination sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts der Mutation möglich. Die für das jeweilige Ereignis erwarteten und die erhaltenen Größen der Hybridisierungssignale sind in Tab. 33 zusammengefasst. Demnach fand bei bG2/2 die Integration stromabwärts statt, bei bG2/10 wurden Signale bei Fragmentgrößen erhalten, die sich zunächst keinem der beiden Ereignisse zuordnen ließen, jedoch durch das in Abb. 26 dargestellte ungewöhnliche Integrationsereignis erklärt werden können. Bei *S.viridochromogenes* GW4 entsprachen die erhaltenen Signale den erwarteten. Zur Herbeiführung des zweiten Crossovers wurde sowohl mit

bG2/2 als auch mit bG2/10 weitergearbeitet, wobei bG2/10 erfolgsversprechender zu sein schien, da hier keine Reversion zum Wildtyp mehr möglich war.

Tab. 33: Berechnete und erhaltene Hybridisierungssignalgrößen bei Integration des Inaktivierungskonstrukts pMIKG2 im Vergleich zum Wildtyp (1,8kb *EcoRI/XbaI*-Fragment aus pMIKG2 als Sonde)

Bezeichnung des Klons	erwartete Fragmentgrößen bei			erhaltene Signale
	ungewöhnlichem Crossover	Integration stromaufwärts	Integration stromabwärts	
<i>S. viridochromogenes</i> GW4	erwartete Fragmentgrößen: 1,1kb, 5kb			5kb 1,1kb
bG2/2	6,1kb 1,8kb	6,1kb 1,1kb 0,7kb	5kb 1,8kb 1,1kb	5kb 1,8kb 1,1kb
bG2/10	s. bG2/2	s. bG2/2	s. bG2/2	6,1kb 1,8kb

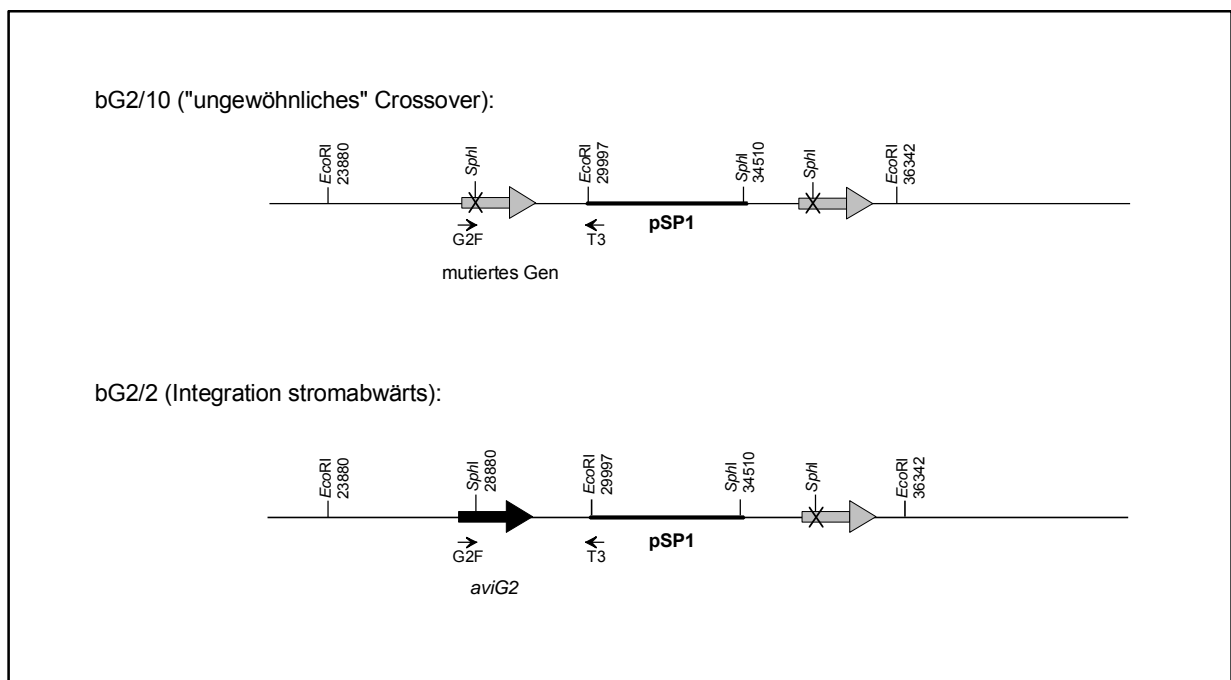


Abb. 26: Crossover-Ereignisse bei der Integration von pMIKG2 in das Genom von *S. viridochromogenes* GW4

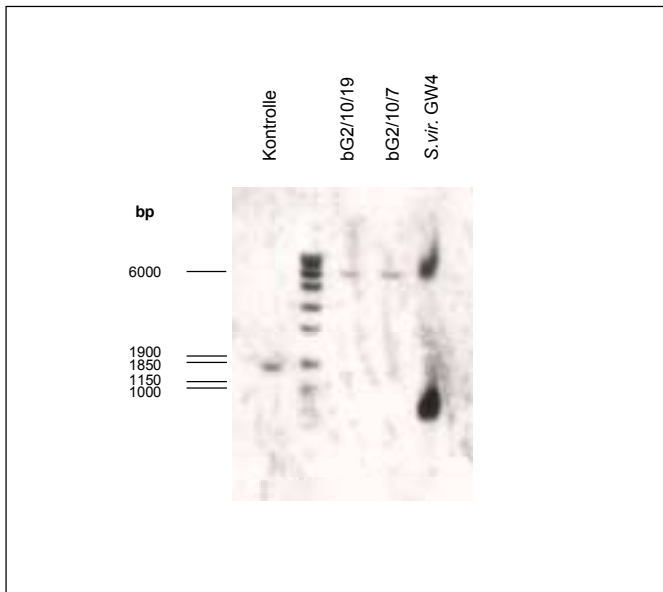
#### 3.3.4.4 Nachweis eines double-crossovers

Die Vorgehensweise entsprach der bei den Inaktivierungen der beiden Gene *aviG1* und *aviG4* jeweils beschriebenen (vgl. 3.3.2.4 und 3.3.3.3), d.h. es wurde wiederum auf Verlust der Erythromycinresistenz gescreent. Nach drei Flüssigkulturpassagen wurden mehrere erythromycinsensitive Klone erhalten, von denen fünf, bezeichnet als bG2/2/1,

bG2/2/4, bG2/2/7, bG2/10/7 und bG2/10/19, ausgewählt und einer genaueren Analyse mittels PCR unterzogen wurden. Es wurde dieselbe Methode und dieselben Primer eingesetzt wie auch schon bei der Untersuchung des single-crossovers (s. 3.3.4.3). Dabei zeigte sich, dass sich die Klone bG2/2/1, bG2/2/4 und bG2/2/7 zum Wildtyp (*S.viridochromogenes* GW4) zurückentwickelt hatten. Bei den beiden anderen Klonen ließ sich das erhaltene PCR-Amplifikat wie erwartet nicht mit *SphI* spalten. Um den Verlust des Vektors sicherzustellen, wurde in der PCR eine Kombination aus T3-Primer (bindet am Vektor) und G2F eingesetzt. Beim Vorliegen eines ungewöhnlichen single-crossovers führt dies zur Amplifikation eines ca. 1,6kb großen Fragments, bei erfolgtem double-crossover wird aufgrund des Vektorverlusts kein PCR-Produkt erhalten (vgl. Abb. 26). Als Positivkontrolle diente chromosomale DNA aus der Integrationsmutante bG2/10. Im Gegensatz zu bG2/10 konnte bei den beiden Klonen bG2/10/7 und bG2/10/19 kein PCR-Produkt erhalten werden, was zeigte, dass es sich hierbei um positive double-crossover-Mutanten handelte. Um dieses Ergebnis abzusichern, wurde zusätzlich noch eine Analyse mittels Southern-Hybridisierung durchgeführt. Als Sonde wurde wiederum das 1,8kb große Insert aus pMIKG2 eingesetzt, die chromosomale DNA genauso wie bei der Untersuchung des single-crossovers mit *EcoRI* und *SphI* gespalten. Verglichen wurde mit dem Wildtyp, d.h. in diesem Fall mit *S.viridochromogenes* GW4. Die Größen der erwarteten und erhaltenen Signale sind in Tab. 34 aufgelistet, der zugehörige Blot in Abb. 27 gezeigt. Sowohl bei bG2/10/7 als auch bei bG2/10/19 ist das für ein erfolgreiches double-crossover, d.h. für den Austausch des intakten gegen das mutierte Gen charakteristische Hybridisierungssignal bei 6,1kb deutlich zu erkennen. Damit war die erfolgreiche Inaktivierung auf genetischer Ebene nachgewiesen. Mit dem Klon bG2/10/7 wurde schließlich unter der neuen Bezeichnung *S.viridochromogenes* GW2 weitergearbeitet.

**Tab. 34: Berechnete und erhaltene Hybridisierungssignalgrößen im Southern-Experiment mit den beiden Klonen bG2/10/7 und bG2/10/19 im Vergleich zum Wildtyp (1,8kb *EcoRI/XbaI*-Fragment aus pMIKG2 als Sonde)**

<b>Bezeichnung des Klons</b>	<b>erwartete Fragmentgrößen</b>	<b>erhaltene Signale</b>
<i>S.viridochromogenes</i> GW4	5kb 1,1kb	5kb 1,1kb
bG2/10/7	6,1kb	6,1kb
bG2/10/19	6,1kb	6,1kb



**Abb. 27:** Southern-Analyse genomischer DNA aus den double-crossover-Mutanten bG2/10/19 und bG2/10/7 im Vergleich zum "Wildtyp" *S. viridochromogenes* GW4. Die genomische DNA wurde jeweils mit *EcoRI* und *SphI* restringiert, hybridisiert wurde mit dem 1,8kb großen Insert aus dem Inaktivierungskonstrukt pMIKG2

#### 3.3.4.5 Analyse der Produkte von *S. viridochromogenes* GW2

Die Mutante wurde wie unter 2.3.2.1 beschrieben zur Produktion angezogen. 200ml Hauptkultur wurden mit Hilfe der Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen aufgearbeitet (2.6.2.2). Gewaschen wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, eluiert mit 20% bis 100% Methanol (jeweils Stufen von 10%). Alle erhaltenen Fraktionen wurden im Agardiffusionstest (2.6.3) und mittels Dünnschichtchromatographie (2.6.4) analysiert. Die von *S. viridochromogenes* GW2 produzierten Derivate eluierten mit 50% bzw. 60% Methanol und zeigten eine gute antibiotische Aktivität gegen den Testkeim *B. subtilis*. Im Dünnschichtchromatogramm konnten zwei auf Avilamycin-Derivate hinweisende Banden detektiert werden, die einen geringeren Rf-Wert aufwiesen als die auf dieselbe Weise aus der Mutante *S. viridochromogenes* GW4 isolierten Hauptderivate. Für HPLC-ESI-MS-Analysen (2.6.7.1) wurde aus 20ml Hauptkultur ein Rohextrakt hergestellt (2.6.2.1) und im Vergleich zu einem entsprechend hergestellten Extrakt aus *S. viridochromogenes* GW4 vermessen. Bei *S. viridochromogenes* GW4 konnten die den Hauptprodukten Gavibamycin A3 und Gavibamycin A1 zuzuordnenden Massen detektiert werden (s. Tab. 35). Bei *S. viridochromogenes* GW2 konnten ebenfalls zwei Hauptderivate identifiziert werden, mit Massen, die sich um jeweils 14 Masseneinheiten von denen der Gavibamycine A3 und A1 unterschieden (s. Tab. 35). Dies war ein deutlicher Hinweis

darauf, dass in den von *S.viridochromogenes* GW2 produzierten Verbindungen eine weitere Methylgruppe fehlte und es sich bei AviG2 in der Tat um eine Methyltransferase handelte. Die Hauptprodukte aus *S.viridochromogenes* GW2 wurden als Gavibamycin C1 und Gavibamycin C3 bezeichnet.

Tab. 35: Molekülmassen (M) der Hauptprodukte aus den Mutanten *S.viridochromogenes* GW4 und *S.viridochromogenes* GW2

Derivat / Mutante	analog zu	M	M+Na
Gavibamycin A1 ( <i>S.viridochromogenes</i> GW4)	Avilamycin A	1388	1411
Gavibamycin A3 ( <i>S.viridochromogenes</i> GW4)	Avilamycin C	1390	1413
Gavibamycin C1 ( <i>S.viridochromogenes</i> GW2)	Avilamycin A	1374	1397
Gavibamycin C3 ( <i>S.viridochromogenes</i> GW2)	Avilamycin C	1376	1399

Um genau zu analysieren, welche zusätzliche Methylgruppe in den Produkten der Mutante *S.viridochromogenes* GW2 fehlte, wurde ein Fütterungsexperiment durchgeführt. Durch Füttern von  $^{13}\text{C}$ -markiertem L-Methionin wird eine Anreicherung des Isotops in den Methylgruppen, die durch AdoMet-abhängige Methyltransferasen übertragen werden, erreicht. Ein Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Produkte aus den Mutanten *S.viridochromogenes* GW2 und *S.viridochromogenes* GW4 und dem Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57 sollte dann eine Zuordnung ermöglichen. Die NMR-Analytik erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. S. Glaser und seinem Mitarbeiter Gerd Hauser vom "Institut für Organische Chemie und Biochemie II" der TU München. Zur Vorbereitung des Experiments wurde zunächst der Zeitpunkt bestimmt, zu dem die Stämme mit der Produktion beginnen. Dazu wurden jeweils 2x100ml Hauptkultur (2.3.2.1) angezogen und nach 24h, 36h, 45h und 60h jeweils eine 1ml Probe entnommen. Alle Proben wurden nach Ethylacetatextraktion mittels Dünnschichtchromatographie (2.6.4) und Agardiffusionstest (2.6.3) analysiert. Die erhaltenen Werte zeigten, dass die Produktion bei allen drei Stämmen nach etwa 24h einsetzt, bis 48h stetig zunimmt und von diesem Zeitpunkt an relativ konstant bleibt. Des weiteren wurde untersucht, ob die Zugabe von L-Methionin zu den Kulturen irgendeinen Einfluß auf das Wachstums- und Produktionsverhalten ausübt. Verwendet wurde ungelabeltes L-Methionin (als Stocklösung mit einer Konzentration von 50mg/ml). Es wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. In einem Versuch erfolgte eine erste L-Methionin-Zugabe (10mg L-Methionin pro 100ml Kultur) 24h nach Beimpfen der Hauptkultur und eine zweite (wiederum 10mg pro 100ml Kultur) nach weiteren 12h. Im anderen Versuch wurde die Hauptkultur



zunächst für 36h bei 37°C inkubiert (schnelleres Wachstum, verminderte Produktionsleistung) und anschließend mit 20mg L-Methionin pro 100ml Kultur gefüttert. 1ml-Proben wurden jeweils nach 36h, 44h, 60h, 68h und 80h entnommen, mit Ethylacetat extrahiert und analysiert. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ließ keinen Einfluß der L-Methionin-Zugabe auf das Produktionsverhalten erkennen. Beide Strategien zeigten dasselbe Ergebnis. Durch die aus dem Agardiffusionstest erhaltenen Werte wurde dies bestätigt. Auch im Wachstumsverhalten wurde keine Hemmung beobachtet. Basierend auf diesen Ergebnissen ergab sich für die Fütterung mit markiertem L-Methionin folgende Vorgehensweise: Fütterung in zwei Portionen, und zwar jeweils 10mg <sup>13</sup>C-markiertes L-Methionin 24h und 36h nach Beimpfen der Hauptkultur. Angezogen wurden pro Stamm insgesamt 500ml Hauptkultur nach dem unter 2.3.2.1 beschriebenen Verfahren. Nach 72h wurden die Kulturen geerntet und mit Hilfe des Sep-Pak<sup>®</sup>C<sub>18</sub>-Harzes (2.6.2.2) aufgearbeitet. Die Avilamycin- bzw. Gavibamycin-haltigen Fraktionen wurden jeweils vereinigt, nach Entfernung des Methanols mit Ethylacetat extrahiert, unter Vakuum zur Trockene eingedampft und zur NMR-Analyse übergeben. Es wurden verschiedene Spektren aufgenommen, wie HMQC-, HMBC-, NOESY-, COSY- und TOCSY-Spektren. Begonnen wurde mit der Auswertung der für Avilamycin A erhaltenen Daten und der Zuordnung aller Signale. Es konnten so auch Signale für die einzelnen Methylgruppen detektiert und eindeutig zugeordnet werden (G. Hauser, persönliche Mitteilung). In Abb. 28 ist ein Ausschnitt aus einem HMQC-Spektrum von Avilamycin A dargestellt, der ausschließlich die Signale für die als Gruppe 1 bis 4 bezeichneten Methylgruppen zeigt. Ebenfalls abgebildet sind die entsprechenden Ausschnitte aus HMQC-Spektren der Produkte der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 und der Doppelmutante *S.viridochromogenes* GW2. Deutlich zu erkennen ist das Fehlen des Signals der "Gruppe 1" im Spektrum der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 im Vergleich zum HMQC-Spektrum des Avilamycin A, wodurch frühere Ergebnisse nochmals bestätigt wurden, und das Fehlen der Signale von "Gruppe 1" und "Gruppe 4" im Spektrum der Doppelmutante *S.viridochromogenes* GW2. D.h. die Produkte der jeweiligen Mutanten weisen an den genannten Positionen keine Methylgruppen mehr auf. Diese ausführlichen NMR-Analysen zeigten damit eindeutig, dass es sich bei AviG2 um eine Methyltransferase handelt, und dass diese Methyltransferase für die Übertragung der Methylgruppe an Position 6 der Mannose verantwortlich ist.

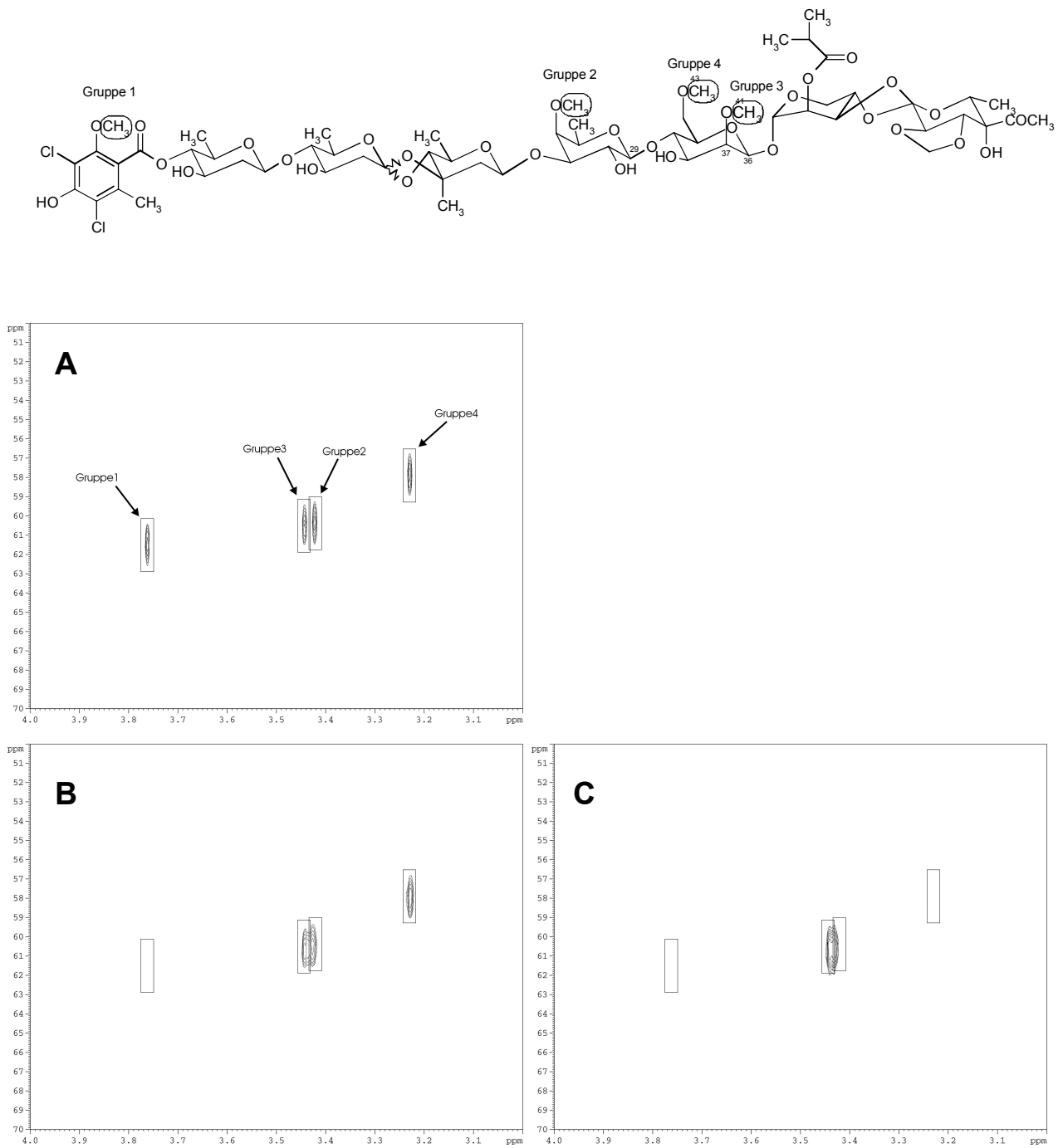
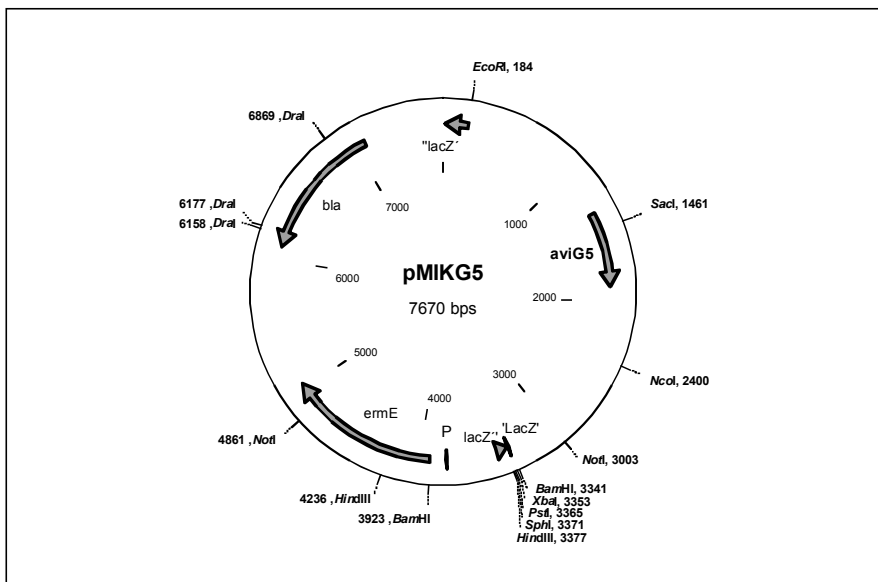


Abb. 28: Ausschnitte aus den HMQC-Spektren von Avilamycin A (A) und den Produkten aus den Mutanten *S. viridochromogenes* GW4 (B) und *S. viridochromogenes* GW2 (C).

### 3.3.5 Herstellung einer Doppelmutante durch Inaktivierung der Methyltransferasegene *aviG4* und *aviG5*

#### 3.3.5.1 Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids *pMIKG5*

Ziel war es, durch die Zerstörung der singular in *aviG5* vorkommenden *XhoI*-Schnittstelle eine Frameshift-Mutation einzuführen. Zur Herstellung des entsprechenden Inaktivierungskonstrukts wurde zunächst ein 3,2kb großes *EcoRI/BamHI*-Fragment, auf dem *aviG5* enthalten war, in den Klonierungsvektor pBC SK- ligiert. Aus dem dabei erhaltenen Plasmid pE624 wurde das Insert durch Restriktion mit den beiden Enzymen *EcoRI* und *XbaI* wieder herausgeschnitten und über die entsprechenden Schnittstellen in den Inaktivierungsvektor pSP1 umkloniert. Das daraus resultierende Plasmid pSP1-E624/7 wurde durch Spaltung mit *XhoI* geöffnet, zum Auffüllen der 5'-Überhänge mit T4-DNA-Polymerase behandelt (2.4.7.3) und anschließend religiert. Zur Überprüfung der Reaktion wurde der Bereich um die auf diese Weise veränderte *XhoI*-Stelle sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass insgesamt 50bp deletiert worden waren. Da dies jedoch ebenso wie das Auffüllen der Schnittstelle zu einem Frameshift führte und damit denselben Zweck erfüllte, wurde dieses als *pMIKG5* bezeichnete Konstrukt (s. Abb. 29) für das Inaktivierungsexperiment eingesetzt.



**Abb. 29:** Plasmidkarte des Inaktivierungskonstrukts *pMIKG5*. Durch Deletion eines 50bp großen Fragments wurde eine Frameshift-Mutation in das Gen *aviG5* eingeführt.

### 3.3.5.2 Transformation der Mutante *S. viridochromogenes* GW4 mit pMIKG5

Zur Herstellung der Doppelmutante sollte das Gen *aviG5* in der Mutante *S. viridochromogenes* GW4, in der, wie unter 3.3.3 beschrieben, bereits das Gen *aviG4* ausgeschaltet worden war, inaktiviert werden. Die Transformation von *S. viridochromogenes* GW4 mit dem Inaktivierungskonstrukt pMIKG5 erfolgte nach dem in Kapitel 2 2.4.3 aufgeführten Protokoll. Selektioniert wurde durch Überschichten mit erythromycinhaltigem SNA. Insgesamt wurden 25 erythromycinresistente Klone erhalten, von denen drei zur weiteren Analyse ausgewählt wurden.

### 3.3.5.3 Nachweis und Beschreibung des Integrationsereignisses

Zum Nachweis der Integration von pMIKG5 in das Chromosom wurde zunächst eine PCR-Analyse durchgeführt (Methode s. 2.4.8.5). Amplifiziert wurde ein Fragment aus dem Bereich um *aviG5*. Bei Verwendung der Primer G5F und G5R wurde ein 930bp großes Fragment erwartet, das im Falle des Wildtyp-Allels mit *XhoI* in zwei Fragmente der Größen 510bp und 420bp gespalten werden konnte, im Falle des mutierten Allels ungespalten blieb und zudem, um 50bp verkürzt, bei einer Größe von 880bp lag. Als Kontrolle diente Gesamt-DNA aus der Mutante *S. viridochromogenes* GW4. Wie erwartet, wurden mit dem Amplifikat aus *S. viridochromogenes* GW4 die beiden 510bp und 420bp großen Fragmente erhalten. Der erythromycinresistente Klon bG5/26 zeigte hingegen nach *XhoI*-Restriktionsverdau des entsprechenden PCR-Amplifikats nur die ungespaltene Bande bei 880bp, was darauf hindeutete, dass hier, genauso wie bei der in Abschnitt 3.3.4.3 beschriebenen Integrationsmutante bG2/10, eine Integration über ein ungewöhnliches Crossover stattgefunden hatte (vgl. Abb. 30). Eine genauere Untersuchung erfolgte mittels Southern-Hybridisierung. Als Sonde wurde das 3,2kb große Insert aus pMIKG5 verwendet. Die isolierte Gesamt-DNA aus bG5/26 und *S. viridochromogenes* GW4 wurde mit den beiden Enzymen *EcoRI* und *XhoI* gespalten. Die für die möglichen Integrationsereignisse erwarteten Größen der Hybridisierungssignale und die im Experiment erhaltenen sind in Tab. 36 dargestellt.

Tab. 36: Berechnete und erhaltene Hybridisierungssignalgrößen bei Integration des Inaktivierungskonstrukts pMIKG5 im Vergleich zum Wildtyp (3,2kb *EcoRI/XbaI*-Fragment aus pMIKG5 als Sonde)

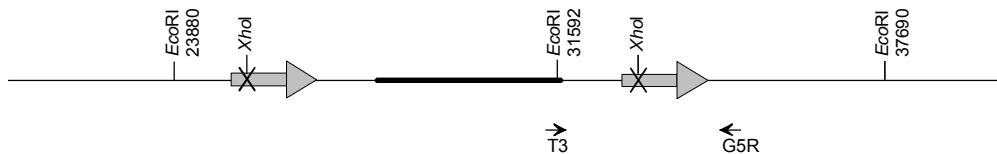
Bezeichnung des Klons	erwartete Fragmentgrößen bei			erhaltene Signale
	ungewöhnlichem Crossover	Integration stromaufwärts	Integration stromabwärts	
<i>S.viridochromogenes</i> GW4	erwartete Fragmentgrößen: 1,2kb, 4,9kb			4,9kb 1,2kb
bG5/26	7,7kb 6,1kb	7,7kb 4,9kb 1,1kb	6,5kb 6,1kb 1,2kb	7,7kb 6,1kb

Bei bG5/26 konnten zwei Signale mit den für das Vorliegen eines ungewöhnlichen Crossovers sprechenden Größen von ungefähr 6kb und etwas weniger als 8kb detektiert werden. Damit war gezeigt, dass es sich bei bG5/26 um eine positive Integrationsmutante handelte, die eingesetzt werden konnte, um im Folgenden auf den Verlust der Erythromycinresistenz, d.h. auf das erwünschte zweite Crossover zu screenen.

"Wildtyp" (*S.viridochromogenes* GW4)



bG5/26 ("ungewöhnliches" Crossover):



G5-Mutante (double-crossover)

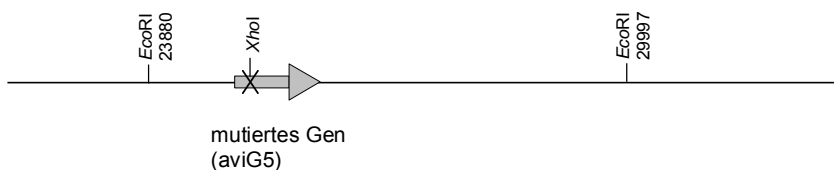


Abb. 30: Crossover-Ereignisse bei der Integration von pMIKG5 in das Genom von *S.viridochromogenes* GW4

#### 3.3.5.4 Nachweis eines double-crossovers

Nach vier Flüssigkulturpassagen wurden mehrere erythromycinsensitiv gewordene Klone erhalten, von denen drei intensiver untersucht wurden. Eine erste Analyse erfolgte mittels PCR nach derselben Methode wie beim Nachweis der Integration (s. 3.3.5.3). Bei den drei ausgewählten Klonen bG5/26/2, bG5/26/5 und bG5/26/8 ließ sich das erhaltene PCR-Produkt mit einer Größe von 880bp erwartungsgemäß nicht mit *XhoI* spalten, während das Amplifikat aus *S.viridochromogenes* GW4 nach dem Restriktionsverdau die erwarteten Fragmente der Größen 510bp und 420bp zeigte. Mit der Primerkombination aus G5R und T3-Primer wurde für die Integrationsmutante bG5/26 das erwartete 1,5kb große Fragment erhalten (s. Abb. 30), im Falle der drei möglichen double-crossover Mutanten wurde kein Fragment amplifiziert, was den Verlust des Vektors anzeigte. Den endgültigen Nachweis, dass es sich bei bG5/26/2, bG5/26/5 und bG5/26/8 um die gesuchten Doppelmутanten handelte, brachte der mit den drei Klonen und *S.viridochromogenes* GW4 als Vergleich durchgeführte Southern-Blot. Es wurde dieselbe Sonde eingesetzt wie bei der Untersuchung des Integrationsereignisses. Die chromosomale DNA wurde wiederum mit *EcoRI* und *XhoI* gespalten. *S.viridochromogenes* GW4 zeigte die bei Vorliegen eines intakten *aviG5*-Gens erwarteten Signale der Größen 4,9kb und 1,2kb. bG5/26/2, bG5/26/5 und bG5/26/8 wiesen nur ein Signal bei einer Größe von 6,1kb auf, was durch die in *aviG5* eingeführte Mutation erklärt werden konnte, d.h. bei allen drei Klonen handelte es sich um positive double-crossover Mutanten. bG5/26/8 wurde in *S.viridochromogenes* GW5 umbenannt und für alle weiteren Experimente eingesetzt.

#### 3.3.5.5 Analyse der Produkte von *S. viridochromogenes* GW5

Es wurde genauso vorgegangen wie bei der Analyse der Mutante *S.viridochromogenes* GW2 (vgl. 3.3.4.5). Nach Aufarbeitung von 200ml Hauptkultur mit Hilfe des Sep-Pak<sup>®</sup>C<sub>18</sub>-Harzes (die Derivate eluierten mit 50% und 60% Methanol) konnten Substanzen isoliert werden, die im Agardiffusionstest antibiotische Aktivität zeigten und im Dünnschichtchromatogramm einen geringeren R<sub>f</sub>-Wert aufwiesen als die Derivate der Mutante *S.viridochromogenes* GW4, jedoch einen höheren als die der Mutante *S.viridochromogenes* GW2. Eine mit einem nach 2.6.2.1 hergestellten Rohextrakt durchgeführte HPLC-ESI-MS-Analyse (2.6.7.1) lieferte einen deutlichen Hinweis, dass es sich auch bei *AviG5* um eine Methyltransferase handelte. Die detektierten Massen der beiden im Extrakt gefundenen Hauptprodukte lagen jeweils um 14 Masseneinheiten tiefer als die von der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 produzierten Derivate

(s. Tab. 37). Die neuen von *S.viridochromogenes* GW5 synthetisierten Avilamycin-Derivate wurden als Gavibamycin E1 und Gavibamycin E3 bezeichnet.

Tab. 37: Molekülmassen (M) der Hauptprodukte aus den Mutanten *S.viridochromogenes* GW4 und *S.viridochromogenes* GW5

Derivat / Mutante	analog zu	M	M+Na
Gavibamycin A1 ( <i>S.viridochromogenes</i> GW4)	Avilamycin A	1388	1411
Gavibamycin A3 ( <i>S.viridochromogenes</i> GW4)	Avilamycin C	1390	1413
Gavibamycin E1 ( <i>S.viridochromogenes</i> GW5)	Avilamycin A	1374	1397
Gavibamycin E3 ( <i>S.viridochromogenes</i> GW5)	Avilamycin C	1376	1399

Ebenso wie bei der Analyse der Mutante *S.viridochromogenes* GW2 wurde zur genauen Strukturaufklärung der Produkte aus *S.viridochromogenes* GW5 ein Fütterungsexperiment durchgeführt. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Auswertung wurde wiederum von Gerd Hauser aus der Arbeitsgruppe Prof. Glaser (TU München) übernommen. Nachdem vorbereitend festgestellt worden war, dass sich die Mutante *S.viridochromogenes* GW5 hinsichtlich ihres Produktionsprofils genauso verhielt wie *S.viridochromogenes* GW4, *S.viridochromogenes* GW2 und Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57, wurde für die Fütterung dieselbe Strategie gewählt (vgl. 3.3.4.5). Angezogen wurden wiederum insgesamt 500ml Hauptkultur, Ernte und Isolierung der Produkte erfolgten analog zu dem in Abschnitt 3.3.4.5 beschriebenen Verfahren. Abb. 31 zeigt einen Ausschnitt aus dem HMQC-Spektrum des Produkts der Doppelmutante *S.viridochromogenes* GW5 im Vergleich zum Produkt der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 und zu Avilamycin A. Gezeigt sind die Signale für die als Gruppe 1 bis 4 bezeichneten Methylgruppen. Anders als im Fall der Doppelmutante *S.viridochromogenes* GW2 kann hier allerdings nicht eindeutig entschieden werden, welche Gruppe zusätzlich zu "Gruppe 1" fehlt, da die Signale von "Gruppe 2" und "Gruppe 3" sehr nah beieinander liegen. Bei HMQC-Messungen werden lediglich  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen über eine einzige Bindung hinweg detektiert. Aus diesem Grund wurden zusätzliche  $^{13}\text{C}$ -Filter-NOESY-Spektren aufgenommen, in denen auch Kopplungen zwischen Protonen durch den Raum sichtbar werden, wodurch Informationen über deren Abstände und räumliche Umgebung erhalten werden. Die ausführliche Analyse der Spektren ermöglichte schließlich eine eindeutige Zuordnung. Es konnte gezeigt werden, dass in den Produkten der Mutante *S.viridochromogenes* GW5 zusätzlich zu "Gruppe 1" die Methylgruppe an Position 4 der D-Fucose, d.h.

"Gruppe 2", fehlt. Bei AviG5 handelt es sich also um diejenige Methyltransferase, die die Methylgruppe auf Position 4 der D-Fucose überträgt.

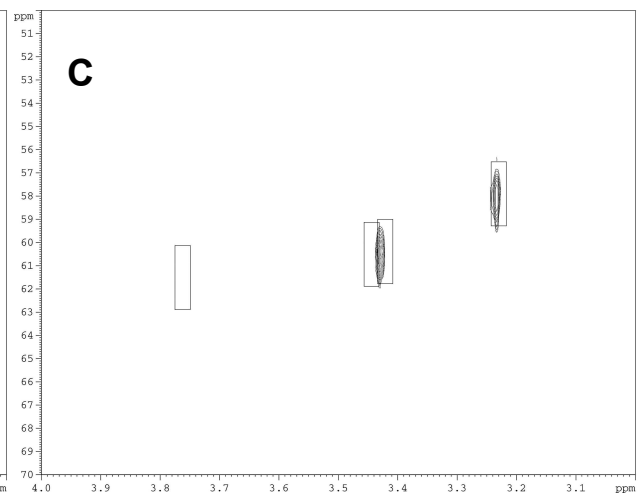
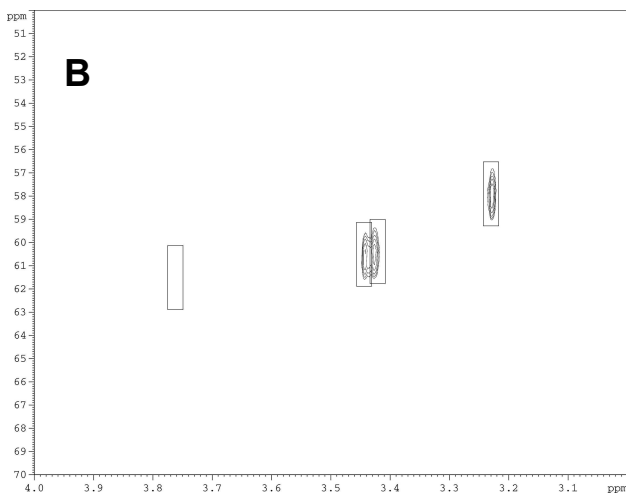
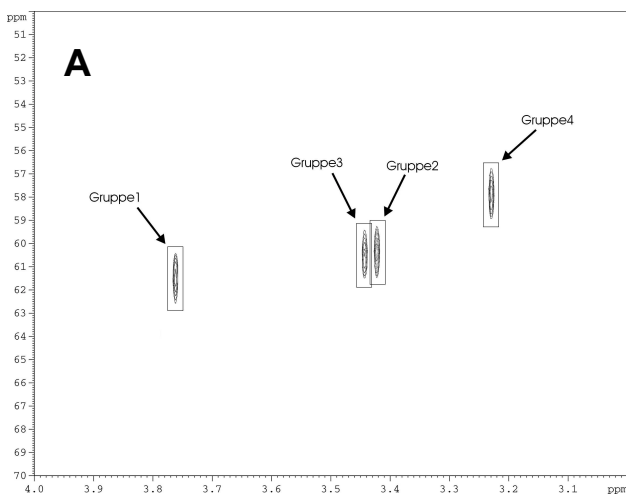
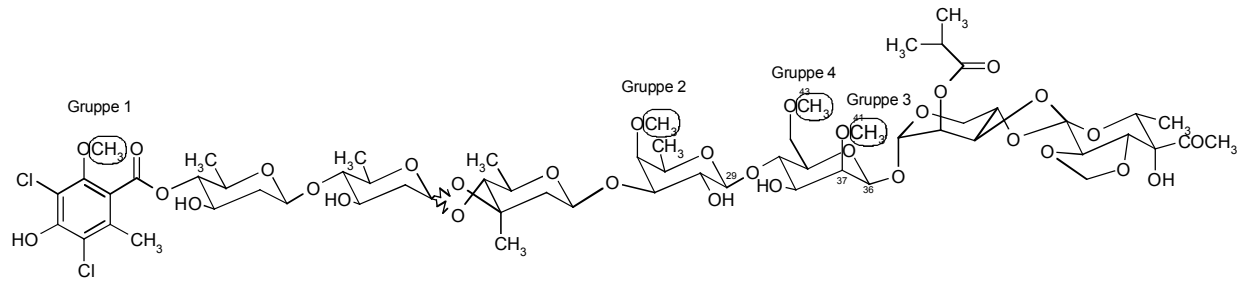


Abb. 31: Ausschnitte aus den HMQC-Spektren von Avilamycin A (A) und den Produkten aus den Mutanten *S. viridochromogenes* GW4 (B) und *S. viridochromogenes* GW5 (C).



### 3.3.6 Herstellung einer Doppelmutante durch Inaktivierung des Methyltransferasegens *aviG4* und des putativen Methyltransferasegens *aviG3*

#### 3.3.6.1 Konstruktion des Geninaktivierungsplasmids *pMIKG3*

Die Inaktivierung des putativen Methyltransferasegens *aviG3* sollte ebenso wie bei *aviG2*, *aviG4* und *aviG5* durch Einführung einer Frameshift-Mutation erfolgen. Erreicht werden konnte dies durch Zerstörung einer singulären *PspAI*-Schnittstelle. Das Gen *aviG3* war auf einem 3050bp großen *EcoRI/BamHI*-Fragment enthalten, welches in den Vektor pBluescript SK- kloniert wurde. Das resultierende Plasmid pABCRe wurde durch Restriktion mit *PspAI* geöffnet, die 5'-Überhänge mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase geglättet (2.4.7.3) und anschließend religiert. Durch Sequenzierung wurde der Erfolg dieser Reaktion überprüft und die Einführung des gewünschten Frameshifts bestätigt. Durch Umklonierung des Inserts aus dem nach der Religation erhaltenen Plasmid pABCRePT4Re/24 in den Vektor pSP1 über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XbaI* wurde schließlich das Inaktivierungskonstrukt pMIKG3 erhalten (s. Abb. 32).

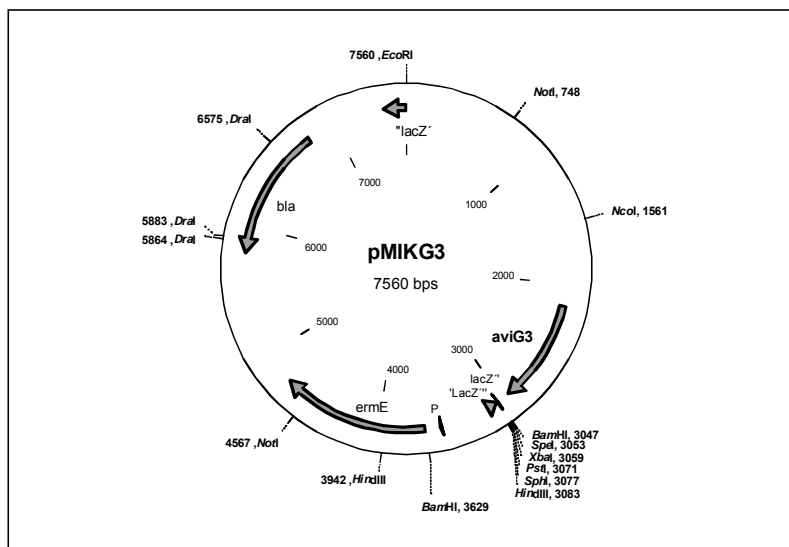


Abb. 32: Plasmidkarte des Inaktivierungskonstrukts pMIKG3. Die singular in *aviG3* vorkommende *PspAI*-Schnittstelle wurde zur Einführung einer Frameshift-Mutation verwendet.

#### 3.3.6.2 Transformation der Mutante *S. viridochromogenes* GW4 mit *pMIKG3*

Protoplastierung und Transformation erfolgten nach dem in Kapitel 2 2.4.3 beschriebenen Protokoll. Pro Platte wurden etwa 50-100 transgene Kolonien erhalten, von denen 36 gepickt und nach Anzucht auf erythromycinhaltigem HA-Festmedium als eindeutig erythromycinresistent identifiziert werden konnten. Fünf Klone, bezeichnet als G3/1-8, G3/1-9, G3/2-5, G3/3-8 und G3/3-9, wurden ausgewählt und hinsichtlich des

stattgefundenen Integrationsereignisses untersucht. Ziel war es, einen Klon zu finden, bei dem die Integration über ein ungewöhnliches Crossover (s. 3.3.4.3 und 3.3.5.3) abgelaufen war, da dadurch eine Reversion zum Wildtyp beim zweiten Crossover ausgeschlossen werden konnte und damit eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit bestand, die gewünschte Mutante innerhalb kurzer Zeit zu erhalten.

#### 3.3.6.3 Nachweis und Beschreibung des Integrationsereignisses

Aus den fünf ausgewählten Transformanten und *S.viridochromogenes* GW4 wurde chromosomale DNA isoliert und als template in einer PCR-Analyse (Methode s. 2.4.8.3) eingesetzt. Die Primer G3F und G3R wurden so gewählt, dass die zur Einführung der Mutation verwendete *PspAI*-Restriktionsschnittstelle ungefähr in der Mitte des zu amplifizierenden Fragments lag, das eine Größe von 850bp aufwies. Nach Restriktion der jeweils erhaltenen PCR-Produkte mit *SmaI*, welches dieselbe Erkennungssequenz wie *PspAI* besitzt, wurden mit *S.viridochromogenes* GW4 zwei Fragmente der erwarteten Größen 350bp und 500bp erhalten und mit G3/3-8 nur das ungespaltene 850bp große Fragment. Alle anderen untersuchten Klone zeigten die Merkmale eines normalen single-crossovers, d.h. drei Fragmente der Größen 350bp, 500bp und 850bp. Da G3/3-8 eindeutig erythromycinresistent war, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Integrationsmutante mit ungewöhnlichem Crossover handelte. Dieser Klon wurde deshalb dazu verwendet, um auf das zweite Crossover mit Verlust des Vektors zu selektionieren. Auf eine Analyse mittels Southern-Hybridisierung wurde verzichtet.

#### 3.3.6.4 Nachweis eines double-crossovers

Nach insgesamt fünf Flüssigkulturpassagen ohne Zusatz von Antibiotikum wurden zwei erythromycinsensitive Klone, bezeichnet als G3/3-8/1 und G3/3-8/8, erhalten, die nach PCR-Analyse unter Anwendung derselben Methode wie beim Nachweis der Integration ein mit *SmaI* nicht spaltbares 850bp großes Fragment zeigten. Zur genauen Beurteilung dieses Ergebnisses wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Als Sonde wurde ein 3kb großes *EcoRI/PstI*-Fragment aus pMIKG3, welches *aviG3* enthält, eingesetzt. Untersucht wurde chromosomale DNA aus *S.viridochromogenes* GW4 und den beiden Klonen G3/3-8/1 und G3/3-8/8. Der Restriktionsverdau der DNA wurde anstatt mit *PspAI* mit dem an derselben Sequenz spaltenden Enzym *SmaI* durchgeführt. Bei *S.viridochromogenes* GW4 wurden Signale bei den Fragmentgrößen 2,8kb und 3,0kb erhalten, wie es auch erwartet worden war. Bei G3/3-8/1 und G3/3-8/8 wurde nur ein Hybridisierungssignal sichtbar, und zwar bei einer Größe von 5,8kb, was der im Falle

einer positiven double-crossover Mutante erwarteten Größe entsprach. Mit G3/3-8/1 und G3/3-8/8 standen somit zwei Mutanten zur Verfügung, bei denen sowohl *aviG4* als auch *aviG3* inaktiviert worden war. Mit G3/3-8/1 wurde unter der Bezeichnung *S. viridochromogenes* GW3 weitergearbeitet.

#### 3.3.6.5 Analyse der Produkte von *S. viridochromogenes* GW3

Um einen ersten Eindruck vom Charakter der gebildeten Substanzen zu erhalten, wurde aus 4ml einer 72h alten Kultur ein Rohextrakt hergestellt (2.6.2.1) und mit Hilfe von DC (2.6.4) und Agardiffusionstest (2.6.3) untersucht. Im Agardiffusionstest konnte ein deutlicher Hemmhof (25mm) detektiert werden, im Dünnschichtchromatogramm jedoch keine auf Avilamycinderivate hinweisende Zonen. Daraufhin wurden verschiedene andere Fließmittelsysteme getestet, die jedoch im Hinblick auf die von der Mutante produzierten Derivate keine Verbesserung brachten. Da sich die Isolierung von Avilamycinderivaten über eine Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartusche bis zu diesem Zeitpunkt sehr gut bewährt hatte, sollte dieses Verfahren auch bei der vorliegenden Mutante angewendet werden. Es wurden 200ml Hauptkultur und eine Kartusche mit 200mg Harz eingesetzt. Gewaschen wurde mit 5% Methanol, eluiert mit einem Stufengradient aus jeweils 10ml 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% und 100% Methanol. Alle Fraktionen wurden im Agardiffusionstest auf antibiotische Aktivität getestet. Dabei stellte sich heraus, dass in allen Proben aktive Derivate enthalten waren. Um festzustellen, in welchem Rf-Bereich die Derivate ungefähr liegen und ob es sich möglicherweise um unterschiedliche Substanzen handelt, wurden die Proben dünnschichtchromatographisch nach der üblichen Methode (2.6.4) aufgetrennt, der Bereich zwischen Startlinie und Fließmittelfront in zwölf Zonen unterteilt, die einzelnen Zonen ausgekratzt, mit Methanol extrahiert und die Lösungen wiederum im Agardiffusionstest analysiert. Dabei ergab sich folgendes Bild: keine der untersuchten Zonen wies eine besonders hervorstechende Aktivität auf, sowohl im kleinen als auch im größeren Rf-Bereich konnten antimikrobiell wirksame Verbindungen nachgewiesen werden. Außerdem bestand zwischen den einzelnen aus der Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartusche eluierten Fraktionen kein Unterschied. Dieses Ergebnis zeigte, dass das Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>-Harz zwar geeignet war, die von *S. viridochromogenes* GW3 gebildeten Derivate zu binden, jedoch nicht, um sie aufzutrennen. Es konnte keine Aussage getroffen werden, ob unterschiedliche Substanzen mit unterschiedlicher Polarität, oder ob ein Hauptderivat mit amphiphilen Eigenschaften vorlagen. Neben dem Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>-Harz wurden noch verschiedene andere Materialien (s. Tab. 38) zur Festphasenextraktion getestet. Doch mit keinem konnte eine Trennung

erzielt werden. Das XAD16-Harz zeigte in Bezug auf das Bindungsvermögen dieselben Eigenschaften wie das Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>-Harz.

Tab. 38: Zur Festphasenextraktion eingesetzte Materialien

Hersteller	Material
Diaion (Japan)	HP20-Harz (Feststoff)
Serva, Heidelberg	Amberlite <sup>®</sup> XAD-16 (Feststoff)
Waters, Eschborn	Sep-Pak <sup>®</sup> tC <sub>2</sub> (geringe Hydrophobizität) Sep-Pak <sup>®</sup> C <sub>8</sub> (mäßig hydrophob) OASIS 1cc (bindet sowohl hydrophile, als auch hydrophobe Substanzen)

Um zu klären, ob es sich bei den von der Mutante produzierten Verbindungen überhaupt um modifizierte Avilamycine handelt, sollte eine HPLC-ESI-MS-Analyse durchgeführt werden. Dazu wurde zunächst, wie bereits in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, der Zeitraum maximaler Produktion bestimmt. Die Auswertung erfolgte anhand der im Agardiffusionstest gemessenen Hemmhofdurchmesser. Große Hemmhöfe wurden als Zeichen einer optimalen Produktionsleistung angesehen. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass bei *S.viridochromogenes* GW3, im Gegensatz zu Wildtyp und allen anderen hergestellten Mutanten, die Produktion ihr Maximum bereits nach 36-48h erreicht und anschließend deutlich abfällt. Basierend auf dieser Beobachtung wurden bei allen weiteren Anzuchten die Hauptkulturen bereits nach 48h geerntet und weiterverarbeitet. Für die HPLC-ESI-MS-Analyse wurden insgesamt 200ml Kulturfiltrat zur Festphasenextraktion unter Verwendung des XAD16-Harzes eingesetzt. Gewaschen wurde, analog zur Extraktion mit dem Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>-Harz (2.6.2.2), mit 5% Methanol, eluiert mit 80% und 100% Methanol. Das Methanol wurde unter Vakuum entfernt, die im Falle der 80%-Fraktion verbleibende wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, die jeweiligen Rückstände in einem geeigneten Volumen Methanol gelöst und zur HPLC-ESI-MS-Analyse (2.6.7.1) eingesetzt. Die im MS-Spektrum auf Avilamycine zurückzuführenden Signale besitzen das charakteristische Chlorisotopenmuster und sind deshalb gut zu identifizieren. Im Spektrum der Mutante *S.viridochromogenes* GW3 (100% Methanol-Fraktion) konnten zwei Signale, bei m/z 1343 und m/z 1365, detektiert werden, die dieses Muster aufwiesen. Vergleicht man mit den für Avilamycin A und Avilamycin C bzw. den entsprechenden Derivaten aus *S.viridochromogenes* GW4 erhaltenen Massen (s. Tab. 39), so lässt dies den Schluß zu, dass in den von *S.viridochromogenes* GW3 produzierten Derivaten der Isobutyrylrest (M<sub>r</sub> 70) an der L-Lyxose fehlt und AviG3 somit an der Biosynthese oder der Verknüpfung dieses Restes

beteiligt sein könnte, also keine Methyltransferase darstellt. In der 80% Methanol-Fraktion konnten keine relevanten Signale identifiziert werden.

Tab. 39: Molekülmassen (M) der Hauptprodukte aus den Mutanten *S. viridochromogenes* GW3, *S. viridochromogenes* GW4 und dem Wildtyp *S. viridochromogenes* Tü57

Derivat/Mutante	analog zu	M	M+Na	M-H+2Na
Avilamycin A	-	1402	1425	1447
Avilamycin C	-	1404	1427	1449
Gavibamycin A1	Avilamycin A	1388	1411	1433
Gavibamycin A3	Avilamycin C	1390	1413	1435
<i>S. viridochromogenes</i> GW3	Avilamycin C	1320	1343	1365

Nach HPLC-Analyse (Methode s. 2.6.6.2 b)) konnten im Chromatogramm zwei Peaks, bei einer Retentionszeit von 3,2min und 7,4min, detektiert werden, die das für Gavibamycine typische UV-Spektrum zeigten. Dies führte zu der Annahme, dass *S. viridochromogenes* GW3 die von Gavibamycin A3 und Gavibamycin A1 abgeleiteten Derivate ohne Isobutyrylrest bildet, bezeichnet als Gavibamycin G3 und Gavibamycin G1 (s. Abb. 33). Eine genauere Strukturanalyse wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

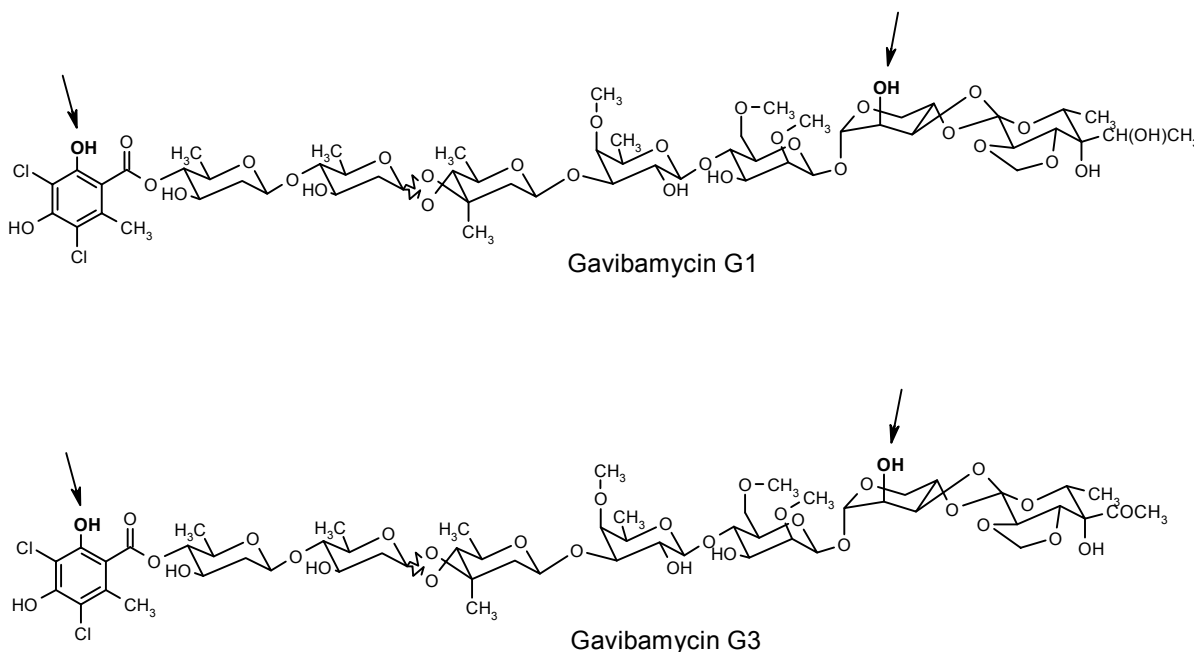


Abb. 33: Strukturen der vermutlich von der Mutante *S. viridochromogenes* GW3 gebildeten Hauptderivate Gavibamycin G1 und Gavibamycin G3

### 3.3.7 Charakterisierung der als Gavibamycine bezeichneten neuen Avilamycin-Derivate

Wie bereits in den einzelnen Abschnitten zur Inaktivierung der Methyltransferasegene erwähnt, wurden die von den Mutanten produzierten Avilamycinderivate als Gavibamycine bezeichnet. Eine Übersicht ist in Tab. 40 dargestellt. Da in der Mutante *S.viridochromogenes* GW1 die Avilamycinbiosynthese fast vollständig zum Erliegen gekommen war, wurde diese Mutante bei den folgenden Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt.

Tab. 40: Übersicht über die hergestellten Mutanten und die jeweils produzierten Derivate

Stamm/Mutante	inaktivierte Gene	Bezeichnung der Produkte
<i>S.viridochromogenes</i> Tü57 (Wildtyp)	-	Avilamycine
<i>S.viridochromogenes</i> GW1	<i>aviG1</i>	-
<i>S.viridochromogenes</i> GW2	<i>aviG2, aviG4</i>	Gavibamycine (C-Reihe)
<i>S.viridochromogenes</i> GW3	<i>aviG3, aviG4</i>	Gavibamycine (G-Reihe)
<i>S.viridochromogenes</i> GW4	<i>aviG4</i>	Gavibamycine (A-Reihe)
<i>S.viridochromogenes</i> GW5	<i>aviG5, aviG4</i>	Gavibamycine (E-Reihe)

#### 3.3.7.1 Anzucht der Mutanten und Extraktion der Gavibamycine

Die Anzucht erfolgte wie in Kapitel 2 unter 2.3.2.1 beschrieben. Pro Stamm wurden insgesamt zwei Liter, im Falle der Mutante *S.viridochromogenes* GW3 drei Liter Hauptkultur aufgearbeitet. Unter Berücksichtigung der im Zusammenhang mit der Strukturanalyse bereits bestimmten Zeiträume maximaler Produktionsleistung wurden die Hauptkulturen von Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57 und den Mutanten *S.viridochromogenes* GW2, GW4 und GW5 nach 72h geerntet, die der Mutante *S.viridochromogenes* GW3 nach 48h. Die Isolierung der jeweiligen Derivate wurde nach der in Kapitel 2 2.6.2.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Eine Kontrolle des gesamten Vorgangs erfolgte mit Hilfe von DC und Agardiffusionstest. Gavibamycinhaltige Fraktionen wurden jeweils vereinigt, getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Proben für die Untersuchung der Stabilität wurden vor der Trocknung entnommen und getrennt behandelt.

#### 3.3.7.2 Stabilität

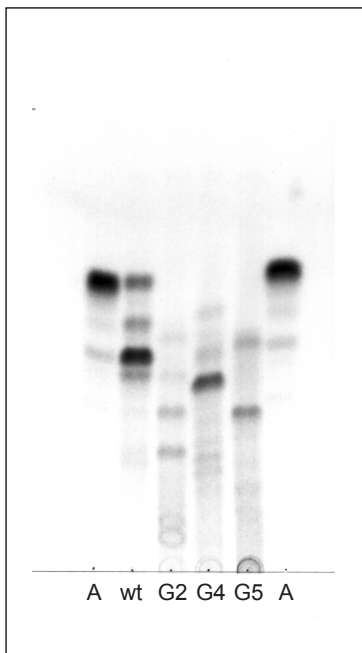
Beobachtet wurde die Stabilität der Gavibamycine A (aus *S.viridochromogenes* GW4) und die der Gavibamycine G (aus *S.viridochromogenes* GW3) in getrockneter Form bzw. in verschiedenen Lösungsmitteln (60% Methanol, 70% Methanol, 100% Methanol)

bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, -20°C und -70°C). Dazu wurden die Substanzen nach ihrer Isolierung (s. 3.3.7.1) entweder in getrockneter oder gelöster Form vier Monate lang bei den genannten Temperaturen gelagert. Nach 7 Tagen, 20 Tagen und nach 4 Monaten wurden Aliquots im Agardiffusionstest (2.6.3) auf ihre antibiotische Aktivität getestet. Es wurde festgestellt, dass auch nach viermonatiger Lagerung unabhängig von Lagerungstemperatur und Lösungsmittel kein signifikanter Wirkungsverlust eingetreten war. Die Hemmhofdurchmesser waren jeweils zu allen drei Zeitpunkten gleich groß. Als Ergebnis konnte also festgehalten werden, dass die untersuchten Substanzen, zumindest was ihre antimikrobielle Wirksamkeit anbelangt, mindestens vier Monate lang bei den genannten Temperaturen stabil gelagert werden können.

### 3.3.7.3 Polarität

Einen Eindruck von der unterschiedlichen Polarität der Derivate konnte man anhand der Ergebnisse aus DC- und HPLC-Analysen gewinnen. Für die DC-Analysen wurde mit Kieselgel 60 eine hydrophile stationäre Phase und mit Dichlormethan/Methanol (9:1) eine relativ lipophile mobile Phase verwendet. D.h. im Chromatogramm befinden sich lipophile Verbindungen eher im oberen, hydrophile Verbindungen eher im unteren Rf-Bereich. In Abb. 34 ist das mit den verschiedenen Gavibamycinen (Extrakte aus 3.3.7.1) erhaltene Dünnschichtchromatogramm dargestellt. Als Vergleich wurde der Extrakt aus dem Wildtyp *S. viridochromogenes* Tü57 und der aus ca. 75% Avilamycin A bestehende Standard der Firma Eli Lilly aufgetragen. Avilamycin A weist den größten Rf-Wert auf. Avilamycin C ist das Hauptprodukt des Wildtyps, unterscheidet sich von Avilamycin A nur in R2 (Abb. 1) und besitzt bereits einen deutlich geringeren Rf-Wert. Betrachtet man die aus den einzelnen "Methyltransferase"-Mutanten isolierten Gavibamycine, so fällt auf, dass der Rf-Wert mit zunehmender Anzahl freier Hydroxylgruppen abnimmt, d.h. die Hydrophilie, oder allgemeiner formuliert, die Polarität zunimmt. So lassen sich die Hauptprodukte der Mutanten in folgender Reihenfolge (abnehmender Rf-Wert) anordnen:

Gavibamycin A3 > Gavibamycin E3 > Gavibamycin C3



A : Avilamycin-Standard (ca. 75% Avilamycin A)  
 wt: Produkt aus *S. viridochromogenes* Tü57  
 G2: Produkt aus *S. viridochromogenes* GW2  
 G4: Produkt aus *S. viridochromogenes* GW4  
 G5: Produkt aus *S. viridochromogenes* GW5

**Abb. 34:** Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel 60; Dichlormethan/Methanol (9:1)) der von den verschiedenen Methyltransferasemutanten produzierten Gavibamycine im Vergleich zu Avilamycin A und den vom Wildtyp *S. viridochromogenes* Tü57 produzierten Avilamycinen (Avilamycin C und Avilamycin A); G2: Gavibamycine der C-Reihe (*S. viridochromogenes* GW2), G4: Gavibamycine der A-Reihe (*S. viridochromogenes* GW4), G5: Gavibamycine der E-Reihe (*S. viridochromogenes* GW5).

Dasselbe Phänomen wurde auch bei der HPLC-Analyse (reversed phase) beobachtet. Die Durchführung erfolgte nach den unter 2.6.6.2 b) aufgeführten Methoden. Die Gavibamycine aus den Mutanten *S. viridochromogenes* GW2 und *S. viridochromogenes* GW5 konnten aufgrund ihrer höheren Hydrophilie nicht mit derselben Methode vermessen werden wie der Wildtyp oder die Mutante *S. viridochromogenes* GW4. Erst nach Anpassung des Gradienten konnte eine akzeptable Trennung erzielt werden.

#### 3.3.7.4 Antimikrobielle Aktivität

Eine wesentliche Eigenschaft der Avilamycine ist ihre gute antibiotische Aktivität gegen viele Gram-positive, auch multiresistente Problemkeime. Aus diesem Grund sollten die hergestellten neuen Avilamycinderivate (Gavibamycine) diesbezüglich genauer untersucht werden. Getestet wurde Gavibamycin A3 als Einzelsubstanz und die aus den einzelnen Mutanten hergestellten aufgereinigten Extrakte (3.3.7.1).



a) Bestimmung von MIC-Werten mit Gavibamycin A3 als Testsubstanz

Gavibamycin A3 wurde mit Hilfe der Sep-Pak®-Kartuschen aus dem Kulturfiltrat isoliert und mittels präparativer DC aufgereinigt (s. 2.6.6.3). Dabei wurde ein Substanzgemisch aus vier Derivaten erhalten, die alle das für Gavibamycine charakteristische UV-Spektrum aufwiesen. Dieses Substanzgemisch wurde als "Gavibamycin A3, ungereinigt" bezeichnet. Die vier unterschiedlichen Derivate wurden anschließend wie in Kapitel 2 2.6.6.3 beschrieben mittels präparativer HPLC isoliert. Als Gavibamycin A3 wurde die Substanz mit einer Retentionszeit von 29,76min identifiziert und die entsprechende Fraktion für die MIC-Wert-Bestimmung eingesetzt. Die Bestimmung wurde unter Anleitung von Prof. P. Heisig und Mitarbeitern in Bonn im Institut für Pharmazeutische Mikrobiologie gemäß NCCLS-Vorschriften (NCCLS, Januar 1997; Wayne, P.) nach der Mikrodilutionsmethode durchgeführt (2.6.8). Die verwendeten Bakterienstämme sind in unten stehender Tabelle aufgelistet.

Tab. 41: Die zur MIC-Wert-Bestimmung eingesetzten Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	β-Lactam-empfindlich
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	Penicillinase-bildend
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Oxacillin-empfindlich
<i>Staphylococcus aureus</i> Q48-1.2.1	Chinolon-resistent
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	empfindlich gegenüber Vancomycin
<i>Enterococcus faecium</i> H-7-6	Klinikisolat: multiresistent; resistent gegenüber Chinolonen, Nalidixinsäure, Penicillin, Ampicillin, Gentamicin, Cotrimoxazol, Azithromycin, Amoxicillin/Clavulansäure, Clarithromycin und Glykopeptide
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	empfindlich

Als Antibiotika wurden neben Gavibamycin A3 auch "Gavibamycin A3, ungereinigt" und Avilamycin A eingesetzt, und zur methodischen Kontrolle Sparfloxacin, von dem die einzelnen MIC-Werte bereits bekannt waren. Die Herstellung der Antibiotika-Verdünnungsreihen erfolgte wie in Kapitel 2 2.6.8 beschrieben. Das Ergebnis ist in Tab. 42 zusammengefasst. Mit Sparfloxacin konnten die bekannten Werte reproduziert werden. "Gavibamycin A3, ungereinigt" zeigte etwas bessere Werte als das gereinigte Gavibamycin A3. Gegen die *Staphylococcus aureus*-Stämme wiesen beide eine höhere Aktivität auf als Avilamycin A, gegen die *Enterococce*n und gegen *Staphylococcus pneumoniae* eine geringere.

Tab. 42: MIC-Werte von Gavibamycin A3 im Vergleich zu Avilamycin A (Mikrodilutionsmethode, NCCLS 1997)

Stamm	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
	Gavibamycin A3	Gavibamycin A3 (ungereinigt)	Avilamycin A
<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538	0,8-1,6	0,8	1,6
<i>Staph. aureus</i> ATCC6538P	3,1-6,25	3,1	12,5
<i>Staph. aureus</i> ATCC 29213	3,1-6,25	3,1	12,5
<i>Staph. aureus</i> Q48-1.2.1	1,6-3,1	0,8-1,6	12,5
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	12,5	3,1-6,25	0,8-1,6
<i>E. faecium</i> H-7-6	3,1-6,25	3,1-6,25	1,6-3,1
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	1,6	0,8	0,1-0,2

Zusätzlich wurden für Gavibamycin A3 und "Gavibamycin A3, ungereinigt" MBK-Werte (Konzentration, bei der 99,9% der Bakterien abgetötet werden) bestimmt. Hierzu wurden jeweils 50 $\mu\text{l}$  aus den Vertiefungen der zur MIC-Wert-Bestimmung verwendeten Mikrotiterplatte, in denen nichts gewachsen war, auf eine Blutagarplatte ausgestrichen, 24h lang bebrütet und anschließend ausgezählt. Dabei stellte sich heraus, dass die Substanz im gewählten Konzentrationsbereich (0,025-25 $\mu\text{g/ml}$ ) nur gegen *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 bakterizid wirkte und zwar ab einer Konzentration von 1,6-3,1 $\mu\text{g/ml}$ . Bezüglich der anderen Stämme konnte im genannten Konzentrationsbereich lediglich eine bakteriostatische Wirkung beobachtet werden.

#### b) Bestimmung von MIC-Werten mit Gavibamycinen der A-, C- und E-Reihe

Zur Bestimmung wurden die nach 3.3.7.1 hergestellten angereinigten Extrakte aus dem Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57 und den Mutanten *S.viridochromogenes* GW2, *S.viridochromogenes* GW4 und *S.viridochromogenes* GW5 eingesetzt. Ziel war es, einen unmittelbaren Vergleich der einzelnen Extrakte hinsichtlich ihres antibiotischen Potentials zu erhalten, und herauszufinden, welche Bedeutung die Methylgruppen hierfür besitzen. Um den Gesamtgehalt an Gavibamycinen in den einzelnen Extrakten zu bestimmen, wurde zunächst eine Avilamycin A-Verdünnungsreihe hergestellt, mittels HPLC analysiert (2.6.6.2 b)) und anhand der erhaltenen Peakflächen eine Regressionsgerade berechnet. Mit den Extrakten wurde ebenfalls eine HPLC-Analyse durchgeführt (2.6.6.2 b)), die Peakflächen der in den Proben enthaltenen Avilamycine bzw. Gavibamycine bestimmt und mit Hilfe der Regressionsgerade die jeweilige Konzentration bzw. die insgesamt im Extrakt vorliegende Substanzmenge berechnet. Das Ergebnis der Gehaltsbestimmung ist in Tab. 43 dargestellt. Dabei wurde deutlich,

dass die Sekundärstoffproduktion mit zunehmender Anzahl eingeführter Mutationen stark abnimmt.

Tab. 43: Gesamtgehalt an Avilamycinen bzw. Gavibamycinen in den einzelnen Extrakten (isoliert aus 21 Hauptkultur)

Probe	Gesamtgehalt [mg]
<i>S. viridochromogenes</i> Tü57	12
<i>S. viridochromogenes</i> GW4	10,5
<i>S. viridochromogenes</i> GW5	6,5
<i>S. viridochromogenes</i> GW2	2,8

Die MIC-Wert-Bestimmung erfolgte wiederum nach der Mikrodilutions-Methode gemäß NCCLS-Vorschriften (NCCLS, Januar 1997; Wayne, P.) (2.6.8). Als Testkeim wurde der Stamm *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 verwendet. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die ermittelten Werte (s. Tab. 44) zeigen, dass der Verlust von Methylgruppen nicht zum Verlust der antibiotischen Aktivität führt, allerdings auch nicht zu einer Verbesserung. Die Werte beziehen sich jeweils auf den Gesamtgehalt an Gavibamycinen bzw. Avilamycinen, d.h. auf ein Gemisch aus unterschiedlich stark wirksamen Verbindungen. Berücksichtigt man dabei die Möglichkeit, dass unter Umständen nicht alle Avilamycine bzw. Gavibamycine in diesen Gemischen antibiotische Aktivität besitzen, so können sich im Einzelfall auch geringere MIC-Werte ergeben.

Tab. 44: MIC-Werte der angereinigten Extrakte im Vergleich zur Avilamycin-Standard-Substanz (Eli Lilly) (Mikrodilutionsmethode, NCCLS 1997)

Probe	MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Avilamycin-Standard (enth. 74,56% Avilamycin A und 11,4% Avilamycin B)	3,1
<i>S. viridochromogenes</i> Tü57 (enth. 60% Avilamycin C und 24% Avilamycin A)	6,25
<i>S. viridochromogenes</i> GW4	<b>6,25-12,5</b> (MIC liegt vermutl. näher bei 6,25)
<i>S. viridochromogenes</i> GW5	25
<i>S. viridochromogenes</i> GW2	25

Bei einem Vergleich mit dem in Abschnitt a) beschriebenen Ergebnis ist zu berücksichtigen, dass dort die eingesetzte Keimzahl nur ca.  $4 \times 10^4/\text{ml}$  betrug, hier jedoch ca.  $5 \times 10^5/\text{ml}$ .

### 3.4 Untersuchungen zu Avilamycinresistenzmechanismen in *S. viridochromogenes* Tü57

In Antibiotika-Biosynthesegenclustern sind häufig auch Resistenzgene lokalisiert, durch deren Genprodukte der jeweilige Produzent vor der Wirkung des eigenen Antibiotikums geschützt wird. Die Aufklärung des Resistenzmechanismus kann somit unter Umständen einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung des jeweiligen Wirkorts bzw. Wirkmechanismus leisten. Da über Avilamycin diesbezüglich zu Beginn der Arbeiten nur sehr wenig bekannt war, sollten alle im Cluster existierenden Avilamycin-Resistenzgene identifiziert, hinsichtlich ihrer Bedeutung untersucht und schließlich funktionell charakterisiert werden.

#### 3.4.1 Identifizierung der Resistenzgene *aviABC1*, *aviABC2*, *aviRa* und *aviRb*

Die Gene *aviABC1*, *aviABC2* und *aviRa* konnten von S. Gaisser im Rahmen ihrer Dissertation bereits als Avilamycin-Resistenzgene identifiziert werden (Dissertationsschrift S. Gaisser, 1998). Bei *aviABC1* und *aviABC2* handelt es sich um ABC-Transporter-Gene. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *aviABC1* zeigt hohe Homologie zu verschiedenen ATP-Bindeproteinen, während das Genprodukt von *aviABC2* starke Ähnlichkeit zu Transmembranproteinen aufweist, die, so wird angenommen, mit den ATP-Bindedomänen interagieren. Beide Proteine zusammen bilden ein Transportsystem, durch das Avilamycin in einem ATP-abhängigen Prozess aus der Zelle ausgeschleust wird. *AviRa* codiert für ein 251 Aminosäuren großes Protein, das bei Datenbankvergleichen keine besonderen Homologien zeigte. Von S. Gaisser wurde eine mögliche Funktion als DNA- oder RNA-Methyltransferase diskutiert (Dissertationsschrift S. Gaisser, 1998). *AviRb* schließlich wurde bei der Auswertung der bei der Sequenzierung des *avi*-Clusters (s. 3.1) erhaltenen Sequenzdaten als potentiell Resistenzgen identifiziert. Es liegt etwa 3kb stromaufwärts von *aviRa*. Das abgeleitete 288 Aminosäuren große Protein zeigte bei Datenbankvergleichen Ähnlichkeit zu verschiedenen rRNA-Methyltransferasen. Am höchsten war diese zu einer rRNA-Methyltransferase aus *Deinococcus radiodurans* (38% identische Aminosäuren) (White et al., 1999). *AviRb* wurde in dem Avilamycin-sensitiven Stamm *S.lividans* TK66 heterolog exprimiert (s. 3.4.2.2). Durch Kultivierung des transgenen Stammes in Gegenwart von Avilamycin konnte eine resistenzvermittelnde Eigenschaft von *AviRb* nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Untersuchung der Bedeutung der einzelnen Resistenzfaktoren

Die im Cluster detektierten Resistenzgene wurden sowohl einzeln als auch in Kombination in dem Avilamycin-sensitiven Stamm *S.lividans* TK66 unter der Kontrolle des *ermE\**-Promoters überexprimiert. Durch Bestimmung der Empfindlichkeit der erhaltenen *S.lividans*-Transformanden gegenüber Avilamycin konnte die Bedeutung der einzelnen Resistenzfaktoren ermittelt werden.

#### 3.4.2.1 Klonierung und Kombination der einzelnen Resistenzgene

Für die Klonierung der einzelnen Resistenzgene wurde das von A.Trefzer entwickelte pMun-Vektorsystem verwendet (Trefzer et al., 2000). Die beiden Klonierungsvektoren pMunI und pMunII bieten aufgrund der Kompatibilität der beiden Restriktionsschnittstellen *MunI* und *EcoRI* die Möglichkeit, Gene auf unkomplizierte Weise miteinander zu kombinieren. *AviRb* und *aviABC1+aviABC2* wurden mittels PCR amplifiziert (s. 2.4.8.6 und 2.4.8.7). Über die ausgewählten Primer wurden jeweils auf der 5'-Seite der Ribosomenbindestelle und auf der 3'-Seite des Stopcodons für die Klonierung geeignete Restriktionsschnittstellen eingeführt (*aviRb*: *BglII* und *EcoRI*; *aviABC1+aviABC2*: *MunI* und *EcoRI*). Das von *aviRb* erhaltene PCR-Produkt wurde nach Behandlung mit den beiden Restriktionsenzymen *BglII* und *EcoRI* in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pLitmus28 ligiert, zur Kontrolle sequenziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *BglII* und *XbaI* in den Vektor pMunII umklont. Das von *aviABC1+aviABC2* erhaltene Amplifikat wurde mit den Enzymen *MunI* und *EcoRI* behandelt, anschließend in den mit *EcoRI* geöffneten Vektor pMunI inseriert, die korrekte Orientierung durch Restriktionsspaltung mit *SacI* und *SacII* überprüft und ebenfalls durch Sequenzierung kontrolliert. *AviRa* lag bereits kloniert in dem Vektor pBluescript SK- vor (Dissertationsschrift S. Gaisser, 1998) und wurde als *BamHI/EcoRI*-Fragment in den *BglII/EcoRI* gespaltenen Vektor pMunII umklont. Die resultierenden Plasmide wurden mit pMunII-Rb, pMunI-ABC bzw. pMunII-Ra bezeichnet. Zur heterologen Expression in *S.lividans* TK66 wurden die einzelnen Resistenzgene jeweils als *HindIII/XbaI*-Fragmente aus den genannten Plasmiden isoliert und in den Expressionsvektor pUWL201 hinter den konstitutiven *ermE\**-Promoter ligiert. Daraus entstanden die Expressionskonstrukte pUWL201-Ra, pUWL201-Rb und pUWL201-ABC. Zur Coexpression der beiden Gene *aviRa* und *aviRb* wurde das Plasmid pMunII-Ra mit den beiden Enzymen *MunI* und *XbaI* gespalten und das Fragment, welches *aviRa* enthält, in das mit *EcoRI* und *XbaI* restringierte Konstrukt

pMunII-Rb hinter *aviRb* kloniert. Nach *HindIII/XbaI*-Restriktion des resultierenden Plasmids pMunII-Rb+Ra wurden beide Gene im Anschluß an den *ermE\**-Promoter in den Vektor pUWL201 umkloniert. Das entstandene Expressionskonstrukt wurde mit pUWL201-Rb+Ra bezeichnet. Bei der Konstruktion des zur Coexpression aller Resistenzgene benötigten Plasmids wurde ähnlich vorgegangen. Nach Inkubation von pMunI-ABC mit den beiden Restriktionsenzymen *MunI* und *XbaI* wurde das dabei entstandene Fragment, das *aviABC1+aviABC2* enthielt, in das *EcoRI/XbaI* gespaltene Plasmid pMunII-Rb+Ra ligiert. In dem dadurch erhaltenen Konstrukt pMunII-Rb+Ra+ABC lagen nun alle Resistenzgene auf einem *HindIII/XbaI*-Fragment vor, das schließlich hinter den *ermE\**-Promoter in den Vektor pUWL201 umkloniert werden konnte. Das resultierende Expressionsplasmid trug die Bezeichnung pUWL201-Rb+Ra+ABC. Eine Übersicht über alle hergestellten Expressionskonstrukte zeigt Tab. 45.

**Tab. 45: Übersicht über die zur heterologen Expression der Resistenzgene in *S.lividans* TK66 hergestellten Konstrukte**

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>
pUWL201-Ra	Expressionsplasmid mit dem klonierten Resistenzgen <i>aviRa</i>
pUWL201-Rb	Expressionsplasmid mit dem klonierten Resistenzgen <i>aviRb</i>
pUWL201-ABC	Expressionsplasmid mit den klonierten Resistenzgenen <i>aviABC1+aviABC2</i>
pUWL201-Rb+Ra	Expressionsplasmid mit den klonierten Resistenzgenen <i>aviRa</i> und <i>aviRb</i>
pUWL201-Rb+Ra+ABC	Expressionsplasmid mit den klonierten Resistenzgenen <i>aviRa</i> , <i>aviRb</i> und <i>aviABC1+aviABC2</i>

#### 3.4.2.2 Heterologe Expression in *S. lividans* TK66

Die hergestellten Expressionskonstrukte und als Vergleich der leere Vektor pUWL201 wurden nach der unter 2.4.3 beschriebenen Methode in den Stamm *S.lividans* TK66 eingebracht. Selektioniert wurde durch Überschichten mit Thiostrepton-haltigem SNA. Es wurden mehrere resistente Klone erhalten. Jeweils zwei wurden ausgewählt, nach Anzucht auf Thiostrepton-haltigem HA-Festmedium eine Sporensuspension angefertigt (2.3.2.2) und der jeweilige Titer (Anzahl Sporen pro  $\mu$ l) bestimmt. Durch Reisolierung der Plasmide und anschließende Restriktionsanalyse wurde geprüft, ob die Plasmide stabil replizierten und die Transformanden somit geeignet für den nachfolgenden Empfindlichkeitstest waren. Eine Zusammenfassung der für die Empfindlichkeitsbestimmung eingesetzten Transformanden und der jeweiligen Sporentiter ist in nachfolgender Tabelle (Tab. 46) dargestellt.

Tab. 46: Übersicht über die zur Empfindlichkeitsbestimmung eingesetzten Klone

Bezeichnung des Klons	Beschreibung	Sporentiter [Anzahl Sporen/ $\mu$ l]
GW0	<i>S.lividans</i> TK66, transformiert mit dem leeren Vektor pUWL201	710
GWRa	<i>S.lividans</i> TK66, transformiert mit dem Expressionskonstrukt pUWL201-Ra	760
GWRb	<i>S.lividans</i> TK66, transformiert mit dem Expressionskonstrukt pUWL201-Rb	640
GWABC	<i>S.lividans</i> TK66, transformiert mit dem Expressionskonstrukt pUWL201-ABC	40
GWRbRa	<i>S.lividans</i> TK66, transformiert mit dem Expressionskonstrukt pUWL201-Rb+Ra	3300
GWRbRaABC	<i>S.lividans</i> TK66, transformiert mit dem Expressionskonstrukt pUWL201-Rb+Ra+ABC	390

### 3.4.2.3 Bestimmung der Empfindlichkeit der einzelnen Transformanden gegenüber Avilamycin

Die nach Transformation mit den Expressionskonstrukten erhaltenen Klone (s. Tab. 46) wurden auf Festmedium in Gegenwart unterschiedlicher Avilamycinkonzentrationen kultiviert, und nach einer festgelegten Zeit anhand der Anzahl gewachsener Kolonien die Empfindlichkeit gegenüber Avilamycin bestimmt. Als Medium wurde ein Minimalmedium für Streptomyceten (Tab. 7) gewählt. Die Antibiotikakonzentrationen betragen 25 $\mu$ g/ml Thiostrepton plus zusätzlich 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 bzw. 250 $\mu$ g/ml Avilamycin-Standardsubstanz (Eli Lilly). Eine höhere Avilamycinkonzentration konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht erzielt werden. Die ausplattierte Menge an Sporensuspension (mit Wasser ad 100 $\mu$ l verdünnt) entsprach etwa 3000 Sporen pro Platte, berechnet aus dem jeweiligen Sporentiter. Die Platten wurden jeweils frisch hergestellt, um einen Abbau der Antibiotika auszuschließen. Die beimpften Platten wurden vier Tage bei 28°C im Brutschrank inkubiert und anschließend die Kolonienzahl bestimmt. Pro Resistenzgenkonstrukt bzw. Klon und pro Avilamycinkonzentration wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Tab. 47 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 47: Wachstum der mit den Avilamycinresistenzgenen transformierten *S.lividans* TK66-Zellen auf Avilamycin-haltigem Festmedium

Gen/Genkombination	Avilamycinkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]							
	0	5	10	20	50	100	150	250
	Wachstum auf Avilamycin-haltigen Platten [%]							
pUWL201	100 $\pm$ 12	0	0	0	0	0	0	0
<i>aviABC1+</i> <i>aviABC2</i>	100 $\pm$ 10	17 $\pm$ 2	0	0	0	0	0	0
<i>aviRa</i>	100 $\pm$ 15	21 $\pm$ 0.5	10 $\pm$ 1	0	0	0	0	0
<i>aviRb</i>	100 $\pm$ 15	78 $\pm$ 4	68 $\pm$ 5	47 $\pm$ 7	44 $\pm$ 5	39 $\pm$ 4	32 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1.5
<i>aviRa+</i> <i>aviRb</i>	100 $\pm$ 15	100 $\pm$ 15	100 $\pm$ 12	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 15	100 $\pm$ 13	100 $\pm$ 9	51 $\pm$ 11
<i>aviRa+</i> <i>aviRb+</i> <i>aviABC1/2</i>	100 $\pm$ 1	100 $\pm$ 16	100 $\pm$ 16	100 $\pm$ 12	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 13	100 $\pm$ 8	68 $\pm$ 13

Die Kontrolle, d.h. der Klon GW0, der kein Avilamycinresistenzgen exprimiert, wurde bereits bei niedrigen Avilamycinkonzentrationen (5 $\mu\text{g/ml}$ ) im Wachstum gehemmt. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Avilamycin gegen GWABC betrug 10 $\mu\text{g/ml}$ , gegen GWRa 20 $\mu\text{g/ml}$  und gegen GWRb >250 $\mu\text{g/ml}$ . Die Klone, die entweder *aviRa+aviRb* oder alle vier Resistenzgene enthielten, zeigten sogar eine noch höhere Resistenz gegenüber Avilamycin als GWRb. *AviRb* erwies sich damit als das stärkste der vier Resistenzgene, dessen Wirkung durch die gleichzeitige Anwesenheit von *aviRa* noch deutlich gesteigert werden konnte. Der ABC-Transporter scheint eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

#### 3.4.2.4 Untersuchung auf Kreuzresistenz zu anderen Antibiotika

Es wurde getestet, ob die gefundenen Avilamycin-Resistenzgene außer gegen Avilamycin auch gegen andere Antibiotika Resistenz verleihen können. Als Antibiotika wurden ausgewählt: das Glykopeptid Vancomycin, das Aminoglykosid Kanamycin, das Polyketid Tetracyclin, das Makrolid Erythromycin und mit Ziracin eine dem Avilamycin sehr ähnliche Substanz. Es wurden Platten (Minimalmedium, s. Tab. 7) mit 25 $\mu\text{g/ml}$  Thiostrepton und 10 $\mu\text{g/ml}$  des jeweiligen Antibiotikums hergestellt. Ausplattiert wurden Sporen der Klone GW0 und GWRbRaABC (s. Tab. 46) in derselben Menge wie bereits unter 3.4.2.3 beschrieben. Als Vergleich diente jeweils eine Platte, die nur Thiostrepton enthielt. Außer gegen Ziracin konnte keine Kreuzresistenz beobachtet werden. Gegen Vancomycin scheint der Wildtyp-Stamm *S.lividans* TK66 eine gewisse natürliche Resistenz zu besitzen, so dass in diesem Fall eine Beurteilung unmöglich war. Aus den Ergebnissen insgesamt war jedoch ersichtlich, dass Avilamycin bzw. die



Avilamycinresistenzfaktoren an einer anderen Stelle angreifen als die getesteten Antibiotika, ausgenommen Ziracin.

### 3.4.3 Funktionelle Expression und Reinigung der rRNA-Methyltransferasen AviRa und AviRb

Wie schon erwähnt, wurde sowohl für AviRa als auch für AviRb die Funktion einer resistenzvermittelnden rRNA-Methyltransferase diskutiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die beiden Gene *aviRa* und *aviRb* in *E.coli* überexprimiert, die entsprechenden Proteine gereinigt und in einem rRNA-Methyltransferase-Aktivitätstest eingesetzt. Als Expressionsvektor wurde der Vektor pRSETb der Firma Invitrogen verwendet. Die zu exprimierenden Gene wurden in-frame zu einer Sequenz kloniert, die für ein N-terminales Fusionspeptid codiert. Sie enthält u.a. (5' → 3', N-terminal → C-terminal) ein ATG-Startcodon, sechs für Histidin codierende Triplets (CAT) und die Enterokinase-Erkennungssequenz. Bei der Expression in *E.coli* wurden die entsprechenden Proteine somit als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-Tag gebildet, der eine anschließende Reinigung mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA erlaubte.

#### 3.4.3.1 Überexpression von *aviRa* in *E.coli* als N-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein

Für die Überexpression von *aviRa* stand bereits ein geeignetes Konstrukt (bezeichnet als pRSETb-Ra) aus früheren Arbeiten zur Verfügung (Dissertationsschrift S. Gaisser, 1998). *AviRa* war mittels PCR amplifiziert worden. Durch die verwendeten Primer waren am 5'-Ende eine *Bam*HI- und zusätzlich eine *Nde*I-Schnittstelle eingeführt worden und am 3'-Ende eine *Eco*RI-Schnittstelle. Die *Nde*I-Schnittstelle brachte eine Änderung des *aviRa*-Startcodons von GTG nach ATG mit sich und erlaubte durch *Nde*I-Restriktionsverdau und anschließende Religation eine Entfernung des His-Tags, für den Fall, dass das Protein mit His-Tag inaktiv sein sollte. *Bam*HI und *Eco*RI ermöglichten die in-frame-Klonierung in den Vektor pRSETb. Zur Expression wurde der *E.coli*-Stamm *E.coli* BL21(DE3)xpLysS mit pRSETb-Ra und parallel dazu zur Kontrolle mit dem leeren Vektor pRSETb transformiert. Anzucht und Induktion erfolgten wie unter 2.5.1 beschrieben. Direkt vor IPTG-Zugabe und 30min, 1h, 2h, 3h und 4h danach wurde jeweils eine 1ml Probe entnommen, nach der in Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode aufgearbeitet und mittels SDS-PAGE (2.5.4) analysiert. Der Stamm *E.coli* BL21(DE3)xpLysS enthält auf dem Chromosom das T7 RNA-Polymerasegen, dessen

Transkription durch den mit IPTG induzierbaren lacUV5-Promoter kontrolliert wird (Tabor und Richardson, 1985). Außerdem ist auf dem Plasmid pLysS das T7 Lysozymgen enthalten (Moffat und Studier, 1987; Studier, 1991). T7 Lysozym ist ein T7 RNA-Polymerase-Inhibitor. Nach Induktion mit IPTG wird jedoch so viel T7 RNA-Polymerase gebildet, dass die Menge an T7 Lysozym nicht mehr für eine Inhibierung ausreicht. Es stehen somit ausreichende Mengen an T7 RNA-Polymerase zur Verfügung, um die Expression der in pRSETb klonierten Gene, die durch einen T7 RNA-Polymerase abhängigen Promoter gesteuert wird, zu bewirken. Im Falle von *aviRa* konnte über den gewählten Zeitraum von 4h die zunehmende Synthese eines etwa 30kDa großen Proteins beobachtet werden, was der theoretisch erwarteten Größe von AviRa+His-Tag (30,6kDa) entsprach. Im Lysat der Kontrolle trat diese Bande nicht auf.

#### 3.4.3.2 Überexpression von *aviRb* in *E.coli* als N-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein

Für dieses Experiment wurde *aviRb*, genauso wie auch schon *aviRa*, in den Überexpressionsvektor pRSETb unter die Kontrolle des T7 RNA-Polymerase Promoters kloniert. Die Amplifikation des Gens mittels PCR erfolgte nach der unter 2.4.8.7 beschriebenen Methode. Über die ausgewählten Primer wurden auf der 5'-Seite eine *Bgl*II- und zusätzlich eine *Nde*I-Schnittstelle und auf der 3'-Seite eine *Eco*RI-Schnittstelle eingefügt. Die *Nde*I-Schnittstelle sollte denselben Zweck erfüllen wie bereits bei *aviRa* erwähnt (3.4.3.1), nämlich die Möglichkeit, gegebenenfalls das Gen auch ohne His-Tag zu exprimieren. Nach Restriktion des *aviRb* PCR-Fragments mit *Bgl*II und *Eco*RI wurde dieses zunächst in den Vektor pLitmus 28 ligiert, zur Kontrolle sequenziert und anschließend in den *Bam*HI/*Eco*RI gespaltenen Vektor pRSETb umklont. Das resultierende Expressionskonstrukt, in Abb. 35 schematisch dargestellt und als pRSETb-Rb bezeichnet, wurde in den Stamm *E.coli* BL21(DE3)xpLysS eingebracht. Nach Anzucht der transgenen Zellen und Induktion mit IPTG in der exponentiellen Wachstumsphase (vgl. 2.5.1 und 3.4.3.1) wurde die zeitabhängige Synthese eines ca. 35kDa großen Proteins (berechnete Größe von AviRb+His-Tag: 35,1kDa) beobachtet. Probenaufarbeitung und Analyse mittels SDS-PAGE wurden entsprechend den von Sambrook et al. (1989) gemachten Angaben bzw. wie unter 2.5.4 beschrieben durchgeführt. Abb. 36 zeigt den Zeitverlauf der Expression über einen Zeitraum von 4h im Vergleich zu einem entsprechend gewonnenen Lysat aus *E.coli* BL21(DE3)xpLysS-Zellen, die nur mit dem leeren Vektor pRSETb transformiert worden waren.

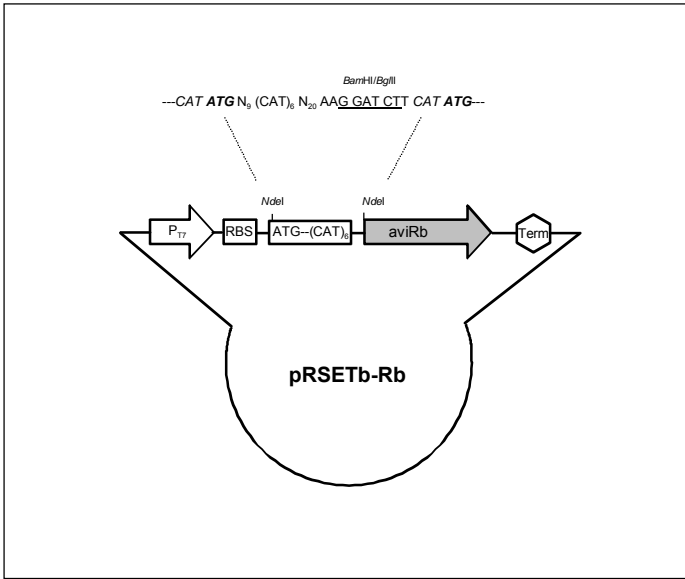


Abb. 35: Überexpressionskonstrukt pRSETb-Rb zur Expression von *aviRb* als N-terminales Hexa-Histidin-Fusionsprotein. Das mit Hilfe der Primer *aviRbEcF* und *aviRbR* amplifizierte Gen wurde über die Restriktionschnittstellen *BglII* und *EcoRI* in den Vektor pRSETb ligiert. Ein entsprechendes Konstrukt ohne His-Tag wurde nach *NdeI*-Restriktion und anschließender Religation erhalten. P<sub>T7</sub> = T7-Promoter; RBS = ribosomale Bindungsstelle; Term = Terminator.

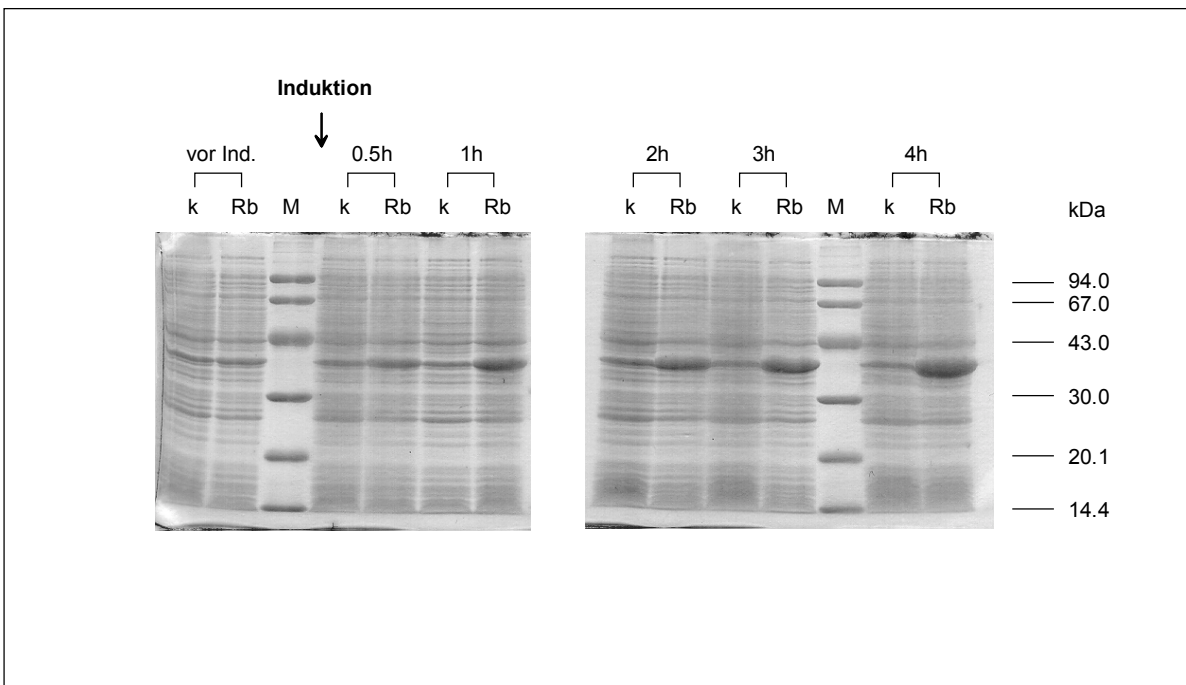
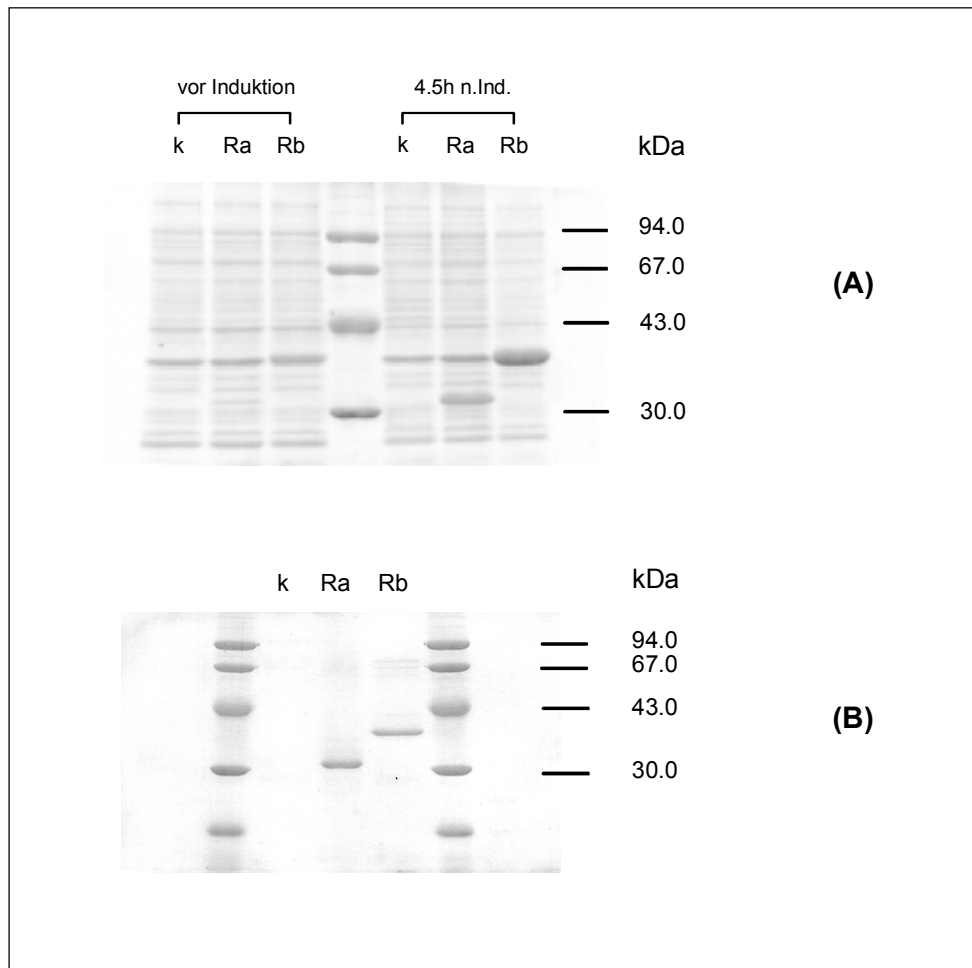


Abb. 36: SDS-PAGE (12% Polyacrylamid) des zeitlichen Verlaufs der Expression des N-terminalen Hexa-Histidin-AviRb-Fusionsproteins ( $M_r$  35,1 kDa) in *E.coli* BL21(DE3)xpLysS. M: Molekulargewichtsstandard; Rb: Gesamtzellprotein aus *E.coli* BL21(DE3)xpLysS transformiert mit pRSETb-Rb; k: Kontrolle, d.h. Gesamtzellprotein aus *E.coli* BL21(DE3)xpLysS transformiert mit dem leeren Vektor pRSETb.

### 3.4.3.3 Reinigung der rRNA-Methyltransferasen *AviRa* und *AviRb* als N-terminale Hexa-Histidin-Fusionsproteine

Bei den unter 3.4.3.1 und 3.4.3.2 beschriebenen Experimenten zur Überexpression der beiden Gene *aviRa* und *aviRb* erfolgte der Zellaufschluß jeweils unter denaturierenden Bedingungen. Beim Aufschluß unter nativen Bedingungen musste in beiden Fällen festgestellt werden, dass der überwiegende Anteil des gewünschten Proteins in unlöslicher Form als sogenannte "inclusion bodies" im Pellet vorlag und nur ein vergleichsmäßig geringer Anteil im löslichen Überstand. Dennoch wurde versucht, das in löslicher Form vorliegende Protein durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA zu reinigen und gleichzeitig zu konzentrieren.



**Abb. 37:** SDS-PAGE-Analyse der Reinigung der rRNA-Methyltransferasen *AviRa* ( $M_r$  30,6 kDa) und *AviRb* ( $M_r$  35,1 kDa) als N-terminale Hexa-Histidin-Fusionsproteine. Gel A zeigt das Ausmaß der Expression, Gel B zeigt die an Ni-NTA gereinigten Proteine nach Gelfiltration über Sephadex G25. Rb: Gesamtzellprotein aus *E.coli* BL21(DE3)xpLysS transformiert mit pRSETb-Rb (Gel A) bzw. gereinigtes *AviRb* (Gel B); Ra: Gesamtzellprotein aus *E.coli* BL21(DE3)xpLysS transformiert mit pRSETb-Ra (Gel A) bzw. gereinigtes *AviRa* (Gel B); k: Kontrolle, d.h. Gesamtzellprotein aus *E.coli* BL21(DE3)xpLysS transformiert mit dem leeren Vektor pRSETb (Gel A) bzw. über Ni-NTA und Sephadex G25 gereinigtes Gesamtzellprotein (Gel B).

Dabei wurde wie unter 2.5.1 beschrieben vorgegangen. Es stellte sich heraus, dass bei Aufschluß von mindestens 2g Zellen (Feuchtgewicht) eine ausreichend große Menge lösliches Protein gewonnen, an das Ni-NTA-Harz gebunden und anschließend in annähernd homogener Form eluiert werden konnte. Um das in den Eluatn enthaltene Imidazol zu entfernen, wurden die Proteinlösungen einer Gelfiltration über Sephadex G25 unterworfen. In Abb. 37 sind die zugehörigen Polyacrylamidgele dargestellt. Gel A zeigt das Ausmaß der Expression. Es wurde je 1ml Probe aus der entsprechenden Kultur unter denaturierenden Bedingungen (Sambrook et al., 1989) aufgearbeitet. Gel B zeigt die gereinigten Proteine nach Gelfiltration. Aus 2g Zellen konnten ungefähr 1,7mg AviRa und 0,3mg AviRb isoliert werden (Gehaltsbestimmung mit Hilfe der Methode nach Bradford, s. 2.5.2). Beide Enzyme können bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in RSG-Puffer (Tab. 12) stabil gelagert werden.

#### 3.4.3.4 Nachweis der Funktion der gereinigten, rekombinanten rRNA-Methyltransferasen

Zum Nachweis der rRNA-Methyltransferaseaktivität der beiden Proteine AviRa und AviRb wurde der in Kapitel 2 im Abschnitt 2.5.3 beschriebene Assay durchgeführt. Es wurden  $1\mu\text{g}$  AviRb bzw.  $2,5\mu\text{g}$  AviRa eingesetzt und eine Inkubationsdauer von 10min gewählt. Als Vergleich diente ein ebenfalls über Ni-NTA und Sephadex G25 aufgearbeiteter Extrakt aus mit dem leeren Vektor pRSETb transformierten *E.coli* BL21(DE3)xpLysS-Zellen (= "pRSETb"). Es konnte sowohl für AviRa als auch für AviRb rRNA-Methyltransferaseaktivität nachgewiesen werden. Wurden die Enzymproben vor der Inkubation mit 16S/23S rRNA und [*methyl*- $^3\text{H}$ ]AdoMet/AdoMet durch 10minütiges Erhitzen auf  $100^{\circ}\text{C}$  denaturiert, verschwand diese Aktivität, und die im Szintillationszähler gemessenen Werte waren genauso gering wie die für die Negativkontrolle "pRSETb". Dies war ein erster Hinweis darauf, dass die beobachtete Aktivität tatsächlich auf einer enzymatischen Umsetzung beruhte. Zur genaueren Untersuchung wurde im nächsten Schritt jeweils die Abhängigkeit der Reaktion von Proteinmenge und Inkubationsdauer bestimmt. Zur Bestimmung der Proteinmengenabhängigkeit wurde eine Inkubationsdauer von 10min gewählt und jeweils  $1\mu\text{g}$ ,  $3\mu\text{g}$  bzw.  $6\mu\text{g}$  Protein eingesetzt, zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit wurden jeweils  $3\mu\text{g}$  Protein eingesetzt und die Reaktion nach 0min, 10min, 30min bzw. 60min abgestoppt. Abb. 38 und Abb. 39 geben die Resultate in Diagrammform wieder. In beiden Fällen verläuft die Methylierung der rRNA proteinmengen- und zeitabhängig, d.h. die Menge an methylierter rRNA steigt mit zunehmender Enzymmenge und Inkubationszeit. Bei AviRa wäre für die

Bestimmung der Proteinmengenabhängigkeit allerdings eine kürzere Inkubationszeit (z.B. 5min) günstiger gewesen, da nach 10min bereits fast Sättigung erreicht worden war. Trotzdem zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass es sich in beiden Fällen um enzymatische Reaktionen und damit sowohl bei AviRa als auch bei AviRb um AdoMet-abhängige rRNA-Methyltransferasen handelt.

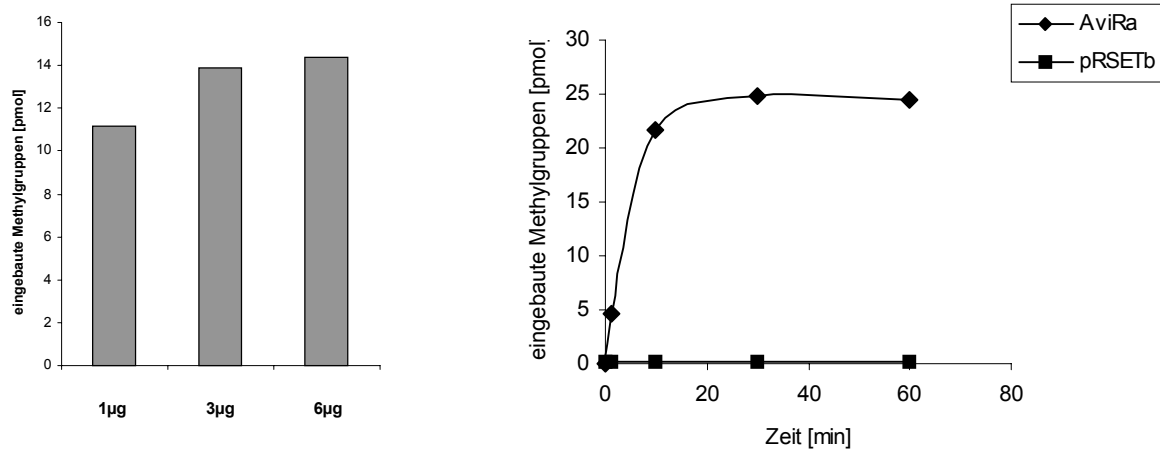


Abb. 38: Proteinmengen- und Zeitabhängigkeit der Methylierung der 16S/23S rRNA durch die rRNA-Methyltransferase AviRa. Als Negativkontrolle wurde anstatt des Enzyms eine entsprechende Menge über Ni-NTA und Sephadex G25 gereinigtes Gesamtzellprotein aus mit pRSETb transformiertem *E.coli* BL21(DE3)xpLysS eingesetzt (=pRSETb).

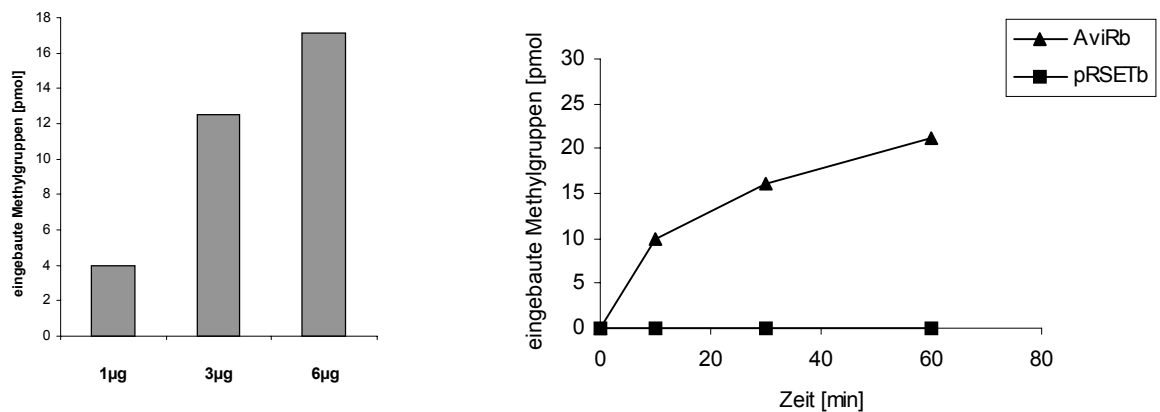
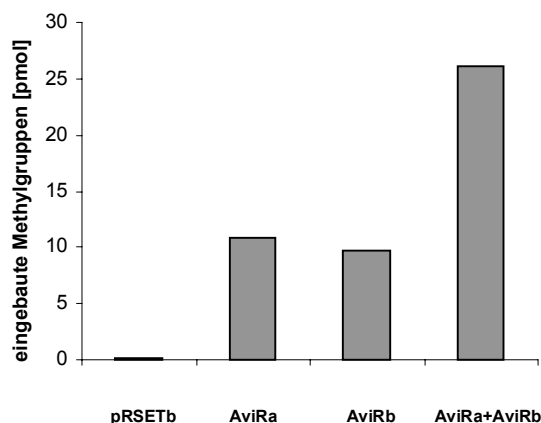


Abb. 39: Proteinmengen- und Zeitabhängigkeit der Methylierung der 16S/23S rRNA durch die rRNA-Methyltransferase AviRb. Als Negativkontrolle wurde anstatt des Enzyms eine entsprechende Menge über Ni-NTA und Sephadex G25 gereinigtes Gesamtzellprotein aus mit pRSETb transformiertem *E.coli* BL21(DE3)xpLysS eingesetzt (=pRSETb).

Aus der bei vollständiger Methylierung (Sättigungszustand) gemessenen Radioaktivität konnte abgeleitet werden, dass von beiden Enzymen jeweils nur eine Methylgruppe übertragen wird. In einem weiteren Experiment wurden Inkubationen mit Kombinationen aus beiden Enzymen durchgeführt. Zunächst wurden 2,5µg AviRa und 2,8µg AviRb jeweils einzeln und parallel dazu auch gemeinsam in dem Assay eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 20min. Dabei stellte sich heraus (s. Abb. 40), dass die Aktivität der einzelnen Enzyme ungefähr gleich groß ist, die der Kombination etwa doppelt so hoch.



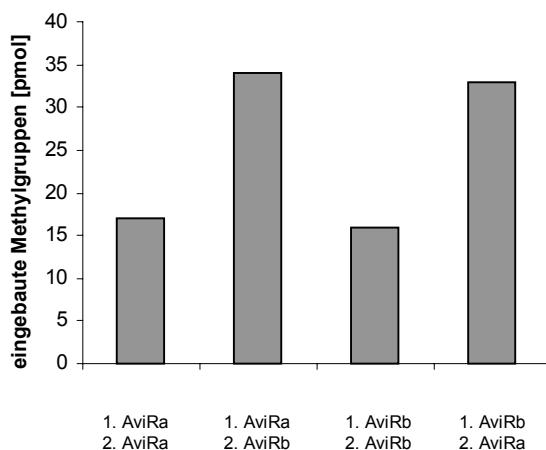
**Abb. 40: rRNA-Methyltransferase-Aktivität der gereinigten Enzyme AviRa und AviRb.**  
(pRSETb = Negativkontrolle, d.h. über Ni-NTA und Sephadex G25 aufgearbeitetes Gesamtzellprotein aus mit pRSETb transformiertem *E.coli* BL21(DE3)xpLysS)

Dafür gab es zwei mögliche Erklärungen: entweder summierte sich die Aktivität, weil in dem entsprechenden Ansatz insgesamt die doppelte Enzymmenge vorlag, oder aber, weil beide Enzyme die rRNA unabhängig voneinander an verschiedenen Stellen methylierten. Um dies genauer zu untersuchen, wurden weitere Reaktionen mit Kombinationen aus AviRa und AviRb durchgeführt. Als erstes wurde mit 2µg AviRa bzw. mit 2µg AviRb 60min lang allein inkubiert, um jeweils vollständige Methylierung zu erreichen. Anschließend wurden zu den einzelnen Ansätzen entweder erneut 2µg desselben oder aber des entsprechenden anderen Enzyms zugegeben und weitere 60min inkubiert, so dass am Ende in allen Ansätzen die gleiche Proteinmenge vorlag. Als Negativkontrolle diente "pRSETb" bei einer Inkubationsdauer von 2x60min. Das in Abb. 41 und Tab. 48 veranschaulichte Ergebnis zeigt, dass bei den Kombinationen aus AviRa und AviRb die Aktivität wiederum jeweils ungefähr doppelt so hoch ist wie bei den jeweiligen Enzymen alleine, ganz unabhängig davon, in welcher Reihenfolge die Enzyme zugegeben wurden. Das bedeutet, dass die zuvor durch AviRa methylierte

rRNA von AviRb als Substrat akzeptiert wird und umgekehrt, und beide Enzyme damit unabhängig voneinander die Methylgruppe auf unterschiedliche Positionen innerhalb der rRNA (16S bzw. 23S rRNA) transferieren.

**Tab. 48: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Inkubationen mit Kombinationen aus AviRa und AviRb** (Der mit der Negativkontrolle pRSETb gemessene Durchschnittswert wurde als "Hintergrund" bei Nichtmethylierung angesehen (verursacht durch nicht umgesetztes und nicht abgetrenntes [*methyl*-<sup>3</sup>H]AdoMet), jeweils von den mit den Enzymproben gemessenen Werten subtrahiert und daraus die Anzahl übertragener Methylgruppen berechnet.)

Ansatz	Øcpm	Anzahl übertragener Methylgruppen [pmol]
AviRa + AviRa	3365	17
AviRa + AviRb	6388	34
AviRb + AviRb	3226	16
AviRb + AviRa	6254	33
pRSETb	348	0



**Abb. 41: Methylierung der 16S/23S rRNA durch AviRa und AviRb.** Im ersten Schritt wurde die rRNA mit AviRa oder AviRb alleine inkubiert. Im zweiten Schritt wurde den Ansätzen jeweils entweder AviRa oder AviRb zugesetzt und erneut inkubiert.

#### 3.4.3.5 Bestimmung des methylierten rRNA-Typs

Um herauszufinden, ob entweder die 16S oder die 23S rRNA das Substrat für die rRNA-Methyltransferasen AviRa bzw. AviRb darstellt, wurden von beiden rRNA-Typen Transkripte hergestellt und im rRNA-Methyltransferase-Assay (2.5.3) eingesetzt. Die in-vitro-Transkription erfolgte nach dem unter 2.4.11 beschriebenen Verfahren. Es standen zwei Plasmide aus der Arbeitsgruppe um J. Ofengand (Miami, USA) zur Verfügung, die das Gen für die 16S rRNA bzw. die 23S rRNA aus *E.coli* enthielten. Es handelte sich um

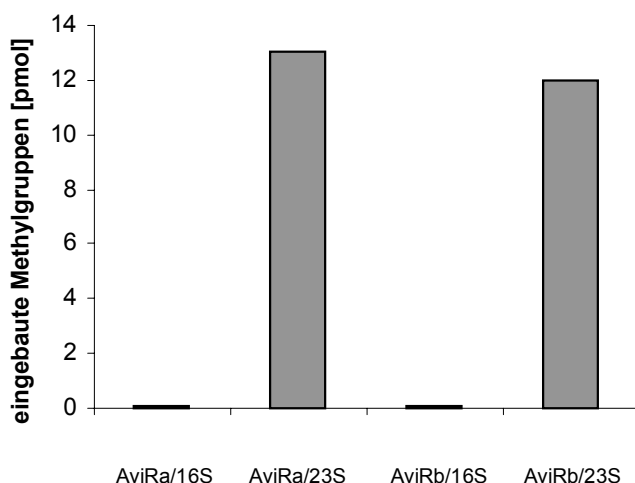


die Plasmide pCW1 für die 23S rRNA (Weitzmann et al., 1990) und pWK1 für die 16S rRNA (Krzyszosiak et al., 1988). Zur Konstruktion der Plasmide war das entsprechende Gen jeweils zusammen mit dem T7 RNA-Polymerase-Promoter in den Vektor pUC19 kloniert worden. Vor der Transkription wurde pCW1 durch Restriktion mit *Afl*I linearisiert, pWK1 durch Restriktion mit *Bsu*36I. In beiden Fällen konnte eine ausreichende Menge Transkript erhalten werden (ca. 1,4mg, resp. 1,4nmol 23S rRNA und 2,7nmol 16S rRNA). Im rRNA-Methyltransferase-Assay wurden pro Ansatz jeweils 20pmol des jeweiligen renaturierten (2.5.3) Transkripts eingesetzt. Die verwendete Enzymmenge betrug 2µg AviRa bzw. 2µg AviRb, die Inkubationsdauer 20min. Das Ergebnis ist in Tab. 49 und Abb. 42 dargestellt und demonstriert eindeutig, dass für beide Enzyme die 23S rRNA das entsprechende Substrat darstellt.

**Tab. 49: Ergebnisse der enzymatischen Umsetzung von 16S bzw. 23S rRNA mit AviRa und AviRb**

(Die Werte, die bei der Umsetzung mit 16S rRNA erhalten wurden, wurden als "Hintergrund" bei Nichtmethylierung angesehen (verursacht durch nicht umgesetztes und nicht abgetrenntes [*methyl*-<sup>3</sup>H]AdoMet), von den Werten bei Einsatz von 23S rRNA subtrahiert und daraus die Anzahl transferierter Methylgruppen berechnet.)

Enzym	rRNA-Typ	Øcpm	entspr. pmol CH <sub>3</sub>
AviRa	16S	489	-
AviRa	23S	2901	13
AviRb	16S	503	-
AviRb	23S	2826	12



**Abb. 42: Methylierung der 16S rRNA bzw. 23S rRNA durch AviRa und AviRb.**

### 3.4.4 Untersuchung der Empfindlichkeit von 70S Ribosomen gegenüber Avilamycin

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass es sich bei AviRa und AviRb um AdoMet-abhängige rRNA-Methyltransferasen handelt, stellte sich die Frage, ob diese Methylierungen den Ribosomen auch tatsächlich Avilamycinresistenz verleihen. Dies wurde mit Hilfe von in-vitro-Translationsexperimenten (Poly(U)-abhängige Proteinbiosynthese) untersucht, die in Oviedo (Spanien) in der Arbeitsgruppe von Prof. Salas unter der Anleitung von Herrn Dr. Luis Quirós durchgeführt wurden.

#### 3.4.4.1 Isolierung der 70S Ribosomen aus Avilamycinresistenzgen-exprimierenden *S. lividans* TK66-Transformanten

Aus den in Tab. 46 aufgeführten transgenen *S.lividans* TK66-Stämmen GW0, GWRa, GWRb und GWRbRa wurden nach der unter 2.5.5 beschriebenen Methode jeweils 70S Ribosomen isoliert. Eingesetzt wurden pro Klon insgesamt 1,5l Kultur. Konzentration und Reinheit der erhaltenen Ribosomenlösungen wurden mittels UV-Spektrophotometrie bestimmt. Es ergaben sich die in nachfolgender Tabelle (Tab. 50) aufgeführten Werte. Dabei tragen die Ribosomen aus GW0 die Bezeichnung "pUWL201", die aus GWRa "Ra", die aus GWRb "Rb" und die aus GWRbRa "RbRa". Als Maß für die Reinheit dient der Quotient  $A_{260}/A_{280}$ , welcher ca. 1,8 sein sollte.

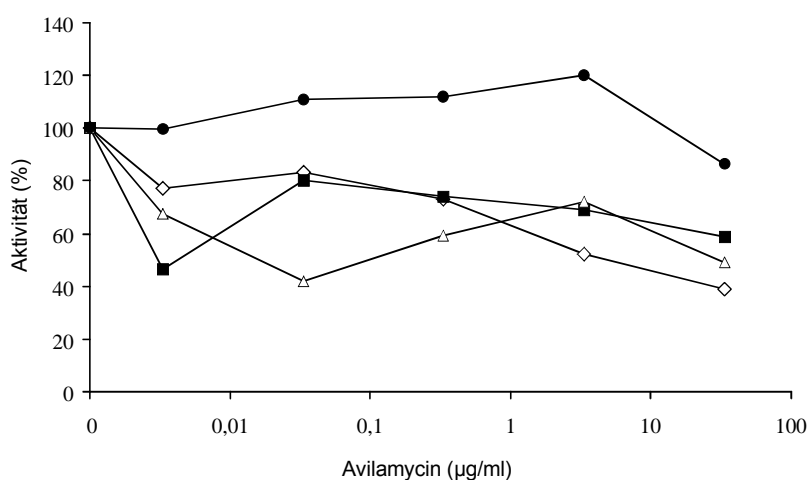
Tab. 50: Konzentration und Reinheit der aus den transgenen *S.lividans* TK66-Stämmen GW0, GWRa, GWRb und GWRbRa isolierten 70S Ribosomen

Bezeichnung der 70S Ribosomen	Konzentration [pmol/μl]	Reinheit ( $A_{260}/A_{280}$ )
Ra	28,5	2,0
Rb	33,1	1,98
RbRa	20,6	2,0
pUWL201	40,7	1,98

Aus allen Klonen konnten 70S Ribosomen in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden, deren Funktionstüchtigkeit ebenso wie die des jeweiligen S100 in einem Poly(U)-Assay (2.5.6) überprüft wurde. Sowohl die Ribosomenlösungen als auch der entsprechende S100 konnten bei  $-70^{\circ}\text{C}$  über vier bis sechs Wochen ohne gravierenden Aktivitätsverlust gelagert werden. Es empfahl sich jedoch, alle Lösungen zu aliquotieren, um ein zu häufiges Auftauen und erneutes Einfrieren zu vermeiden.

### 3.4.4.2 Durchführung von *in-vitro*-Translationsexperimenten zur Bestimmung der Avilamycinempfindlichkeit der 70S Ribosomen

Es wurde untersucht, inwieweit die aus den Stämmen GW0, GWRa, GWRb und GWRbRa isolierten Ribosomen durch Avilamycin in ihrer Funktion während der Proteinbiosynthese beeinträchtigt werden. Dazu wurden die Ribosomen in dem unter 2.5.6 beschriebenen poly(U)-abhängigen *in-vitro*-Translations-System eingesetzt. Als S100 wurde der aus dem Avilamycin-sensitiven Stamm GW0 gewonnene S100 verwendet, um die Anwesenheit anderer eventuell im S100 enthaltener Avilamycinresistenz-vermittelnder Faktoren (z.B. Avilamycin-inaktivierende Enzyme) auszuschließen. Die Inkubationen wurden mit Avilamycinkonzentrationen im Bereich 0 µg/ml bis 33,3 µg/ml durchgeführt. Die Aktivität bei einer Konzentration von 0 µg/ml Avilamycin wurde für alle Ribosomen jeweils gleich 100% gesetzt. Alle anderen Werte wurden dann darauf bezogen. Wie in Abb. 43 erkennbar, hemmt Avilamycin die poly(U)-abhängige Polyphenylalanin-Biosynthese bei Verwendung von 70S Ribosomen aus GW0. Es wird eine maximale Hemmung von etwa 62% erreicht. Die Ribosomen aus GWRbRa erwiesen sich als hochresistent. Eine Inhibierung der Translation kann außerdem auch bei Einsatz der Ribosomen aus GWRa und GWRb beobachtet werden. Dies zeigt deutlich, dass eine Methylierung, katalysiert durch beide rRNA-Methyltransferasen, AviRa und AviRb, notwendig ist, um den Ribosomen Resistenz gegenüber Avilamycin zu verleihen.



**Abb. 43:** Einfluß verschiedener Avilamycinkonzentrationen auf die poly(U)-abhängige Polyphenylalanin-Synthese. Die Aktivität wurde als Prozentanteil der Aktivität bei Abwesenheit von Avilamycin berechnet. Die Reaktionsansätze enthielten S100\* aus dem Stamm GW0 und 70S Ribosomen aus verschiedenen anderen Stämmen. ◇, GW0; ■, GWRa; △, GWRb; ●, GWRaRb.

#### 3.4.4.3 Durchführung eines Methylierungsassays

Um die Frage zu klären, ob die Methylierung auf der Stufe der freien rRNA oder aber erst auf der Stufe der Ribosomenuntereinheiten bzw. der vollständigen 70S Ribosomen stattfindet, wurde ein Methylierungsassay in Anlehnung an eine von Skeggs et al. (1985) beschriebene Methode durchgeführt. Ein Ansatz mit einem Endvolumen von 50µl enthielt 25pmol 70S Ribosomen (aus GW0), 50mM Hepes-KOH pH7.5, 37,5mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM DTT, 25µM AdoMet, 250nM (2,5µCi) [*methyl*-<sup>3</sup>H]AdoMet und 0,5µg AviRa bzw. AviRb. Inkubiert wurde für 60min bei 37°C. Zu den Zeitpunkten t=0min (Nullwert) und t=60min wurden jeweils 10µl entnommen und zur Fällung der ribosomalen Bestandteile zu 1ml eiskalter 5%iger Trichloressigsäure (mit 0,1g/l AdoMet) pipettiert und für mindestens 15min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben über Glasfaser Mikrofilter (GF/C-Whatman, Ø 25mm) filtriert, die Filter zwei Mal mit je 5ml 5%iger Trichloressigsäure (mit 0,1g/l AdoMet) gewaschen, bei 100°C getrocknet und im Szintillationszähler vermessen. Die erhaltenen Werte wurden in Relation zum Nullwert gesetzt. Da keine getrennten 30S und 50S Untereinheiten zur Verfügung standen, wurde der Methylierungsassay zusätzlich anstatt mit 10mM MgCl<sub>2</sub> mit 1mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Unter diesen Bedingungen dissoziieren die 70S Ribosomen in ihre Untereinheiten, die dann getrennt im Reaktionsgemisch vorliegen. Außerdem wurden auch Ansätze mit einer Kombination aus AviRa und AviRb durchgeführt, für den Fall, dass die beiden Enzyme bei der Methylierung der Ribosomen bzw. Ribosomenuntereinheiten doch voneinander abhängig sein sollten. In keinem der Experimente konnte jedoch eine Methylierung detektiert werden, d.h. die Methylierung findet bereits auf der Stufe der freien rRNA statt, wie sie auch schon beim Funktionsnachweis von AviRa und AviRb (3.4.3.4 und 3.4.3.5) mit freier rRNA aus *E.coli* erreicht werden konnte.

## 4 Diskussion

### 4.1 Sequenzierung und Analyse des Avilamycin-Biosynthesegenclusters

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierung des Avilamycin-Biosynthesegenclusters (*avi*-Cluster) vollständig abgeschlossen. Neben den bereits bekannten 36 offenen Leserahmen konnten im Abschnitt stromabwärts der ABC-Transportergene 18 weitere detektiert werden. Über Homologievergleiche in der Datenbank konnte den meisten dieser Gene eine mögliche Funktion zugeordnet und das Gencluster auf einen 46,8kb großen Bereich eingegrenzt werden. Es wird flankiert von einem Resistenzgen (*aviRb*), wie es häufig bei Biosynthesegenclustern von Antibiotika beobachtet wird (Chater und Bruton, 1983; Fernandez-Moreno et al., 1991), und einem Desoxyzuckerbiosynthesegen (*aviZ2*). Basierend auf den bei der Sequenzanalyse erhaltenen Ergebnissen wurde ein hypothetischer Biosyntheseweg für Avilamycin erstellt (Abb. 44). Erleichtert wurde dies dadurch, dass bei der Aufklärung der Desoxyzuckerbiosynthese sowohl auf molekularbiologischer als auch auf biochemischer Ebene während der letzten Jahre große Fortschritte erzielt und grundlegende Gemeinsamkeiten einzelner Biosyntheseschritte festgestellt werden konnten (Liu und Thorson, 1994; Kirschning et al., 1997; Trefzer et al., 1999; Chen et al., 2000). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen einiger im *avi*-Cluster gefundenen Gene ähneln sehr stark einzelnen Enzymen, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle bei der D-Olivose-Biosynthese in anderen Organismen spielen. Wie unter anderem für den Mithramycin-Produzenten *S.argillaceus* (Lombo et al., 1997; Gonzalez et al., 2001) und den Urdamycin-Produzenten *S.fradiae* (Hoffmeister et al., 2000) beschrieben, so könnte auch im Avilamycin-Produzenten *S.viridochromogenes* Tü57 die D-Olivose-Biosynthese mit Glucose-1-phosphat beginnen, die nach Nukleotidylierung (*AviD*) und Dehydratisierung (*AviE1*) zunächst zu dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose, einem zentralen Intermediat der Desoxyzuckerbiosynthese, und anschließend weiter durch C2-Dehydroxylierung (*AviS* und *AviT*) und Ketoreduktion (*AviZ3*) zu dTDP-D-Olivose umgesetzt wird. Da sich 2-Desoxy-D-avalose und D-Olivose lediglich durch eine Methylgruppe an Position C3 unterscheiden, wird postuliert, dass die Biosynthese dieses Zuckers ebenfalls von Glucose-1-phosphat ausgeht, bis zur Stufe der dTDP-4-Keto-2,6-didesoxy-D-glucose identisch zur D-Olivose-Biosynthese verläuft und schließlich durch Methylierung (*AviG1*) und Ketoreduktion (*AviZ1* oder *AviZ2*) zum

Endprodukt dTDP-2-Desoxy-D-avalose führt. Eine ähnliche Reaktionsabfolge wird auch für die dTDP-D-Mycarose-Biosynthese im Mithramycin-Produzenten *S. argillaceus* vorgeschlagen (Gonzalez et al., 2001). Einziger Unterschied zur 2-Desoxy-D-avalose ist hier die Konfiguration an Position C3 des Zuckers nach Methylierung.

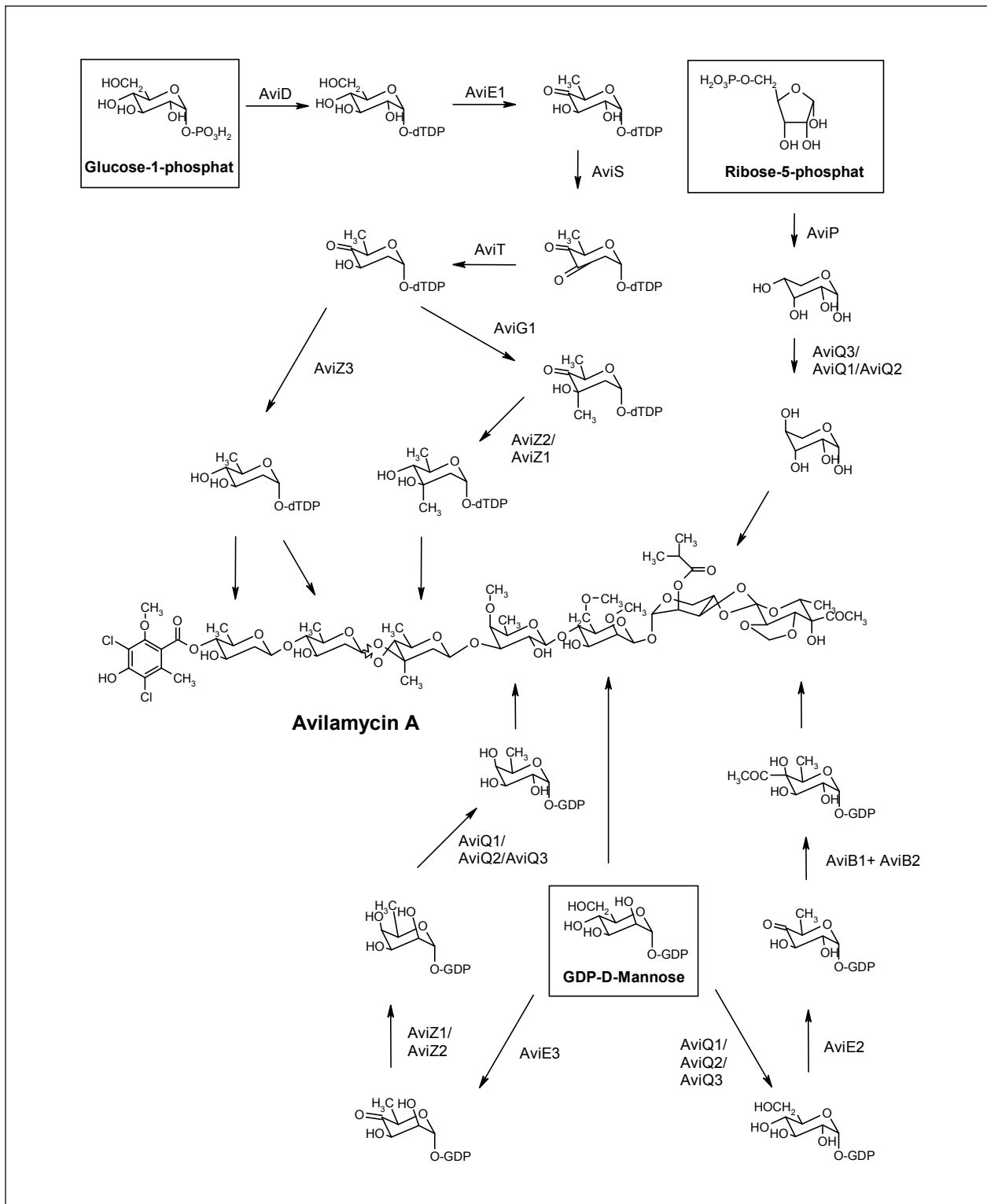


Abb. 44: Modell für den Avilamycin-Biosyntheseweg. Mögliche Vorstufen bzw. Ausgangspunkte sind eingerahmt.

Die C-Methylierung wird durch die 4-Ketogruppe in der dTDP-4-Keto-2,6-didesoxy-D-glucose erleichtert, da diese zur Bildung eines C3 Carbanions/Enolats führt, was einen nukleophilen Angriff auf die elektrophile Methylgruppe in AdoMet ermöglicht (Chen et al., 2000). Dass Glucose ein Vorläufermolekül für die Biogenese der Heptasaccharidkette des Avilamycins darstellt, konnte bereits 1970 durch Fütterungsexperimente gezeigt werden (Sattler und Schaffner, 1970). Eine Besonderheit des Avilamycin-Biosynthesegenclusters ist jedoch die Präsenz von drei verschiedenen NDP-Hexose 4,6-Dehydratasegenen (*aviE1*, *aviE2* und *aviE3*). Unter Berücksichtigung der gefundenen Sequenzhomologien handelt es sich bei *AviE1* um eine dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase, wie bereits bei der D-Olivose-Biosynthese diskutiert, und deren Aktivität außerdem auch biochemisch nachgewiesen werden konnte (A. Mühlenweg, persönliche Mitteilung), und bei *AviE3* um eine GDP-Mannose 4,6-Dehydratase. Dies weist darauf hin, dass bei der Biosynthese der einzelnen Zuckerbausteine des Avilamycins nicht nur Glucose, sondern auch noch andere "Zuckerpools" eine Rolle spielen. So können Methyleurekanat und 4-O-Methyl-D-fucose jeweils von GDP-D-Mannose abgeleitet werden. Zur GDP-4-O-Methyl-D-fucose gelangt man durch Dehydratisierung (*AviE3*), 4-Ketoreduktion (*AviZ1* oder *AviZ2*) und C2-Epimerisierung (*AviQ1*, *AviQ2* oder *AviQ3*) der GDP-D-Mannose. Wobei allerdings auch ein natürlich vorkommendes Avilamycin existiert, bezeichnet als Avilamycin F (Mertz et al., 1986), in dem aufgrund fehlender Dehydratisierung anstatt der D-Fucose eine D-Galaktose in die Kette eingebaut wurde. Die Methyleurekanat-Einheit wurde ursprünglich als ein von 2,3-Di-O-methylen-4,5-dihydroxyhexansäure abgeleitetes Produkt angesehen (Wright et al., 1979). Doch nach durchgeführter detaillierter Sequenzanalyse liegt die Vermutung nahe, dass auch dieser Baustein der Heptasaccharidkette über einen Desoxyzuckerbiosyntheseweg entsteht. Dieser beinhaltet unter anderem Epimerisierung an Position C2 (*AviQ1*, *AviQ2* oder *AviQ3*), Dehydratisierung (*AviE2*) und die Einführung des Acetylrestes an Position C4 (*AviB1* und *AviB2*). Als Ausgangspunkt für die Biosynthese der L-Lyxose wird vermutlich sogar noch ein dritter "Zuckerpool" des Primärstoffwechsels genutzt. Vorstellbar ist eine zweistufige Reaktion, in der Ribose-5-phosphat, ein Produkt des Pentosephosphatwegs, zunächst dephosphoryliert (*AviP*) und anschließend an Position C4 epimerisiert (*AviQ1*, *AviQ2* oder *AviQ3*) wird. Damit konnte also den meisten Genen innerhalb des *avi*-Clusters eine Funktion zugewiesen und diese mit einem für die Biosynthese der einzelnen Zuckerbausteine entworfenen Modell in Einklang gebracht werden. Zukünftige Aufgabe wird es nun sein, die einzelnen Schritte experimentell nachzuweisen und deren exakte Abfolge zu untersuchen.

Angesichts der Tatsache, dass Avilamycin eine Oligosaccharidkette bestehend aus

sieben Zuckern enthält, wurde erwartet, im Biosynthesegencluster entsprechend sechs für Glykosyltransferasen codierende Gene zu finden. Interessanterweise konnten jedoch nur vier detektiert werden, die dafür in Frage kamen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass ein und dieselbe Glykosyltransferase mehrere Verknüpfungen katalysiert oder aber Glykosyltransferasen, die durch Gene außerhalb des *avi*-Clusters codiert werden, in den Aufbau der Zuckerkette involviert sind. Auffällig ist, dass drei der gefundenen Glykosyltransferasen vor allem solchen Glykosyltransferasen gleichen, die an der Lipopolysaccharidbiosynthese bzw. an der Bildung von O-Antigenen beteiligt sind, was in guter Übereinstimmung mit der Polysaccharid-ähnlichen Struktur des Avilamycins steht.

Weitere charakteristische und interessante Merkmale des Avilamycinmoleküls sind die beiden Orthoesterbindungen und die Methylenbrücke im Methyleurekanatrest, für deren Ausbildung eine Oxidierung erforderlich ist. Mit *aviO1*, *aviO2* und *aviO3* kommen drei Gene im Cluster vor, deren abgeleiteten Genprodukte homolog zu  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen sind. Als mögliches Prinzip der Katalyse wird vorgeschlagen, dass molekularer Sauerstoff dem jeweiligen Enzym als direkter Elektronenakzeptor und  $\alpha$ -Ketoglutarat als Cosubstrat dient, aus denen nach erfolgter Ausbildung der oben genannten Bindungen  $\text{CO}_2$  und Succinat entstehen. Ob diese Enzyme ihre katalytische Aktivität bereits während des Aufbaus der Zuckerkette oder aber erst nach Fertigstellung des gesamten Moleküls entfalten, ist bisher noch unbekannt. Hypothese ist jedoch, dass die Avilamycin-Biosynthese mit den beiden Zuckern D-Mannose und L-Lyxose beginnt, die über ihre jeweilige C1 Position miteinander verknüpft werden, und anschließend durch sukzessives Anhängen weiterer Zuckermoleküle in beide Richtungen fortgesetzt wird. Dies würde auch die fehlende dNTP-Aktivierung der L-Lyxose erklären, die sich erübrigt, falls L-Lyxose das Startermolekül darstellt. Am Ende steht die Übertragung des Orsellinsäurerestes auf die freie Hydroxylgruppe an Position C4 der terminalen D-Olivose. Es folgen weitere Modifizierungen, wie zum Beispiel Methylierung freier Hydroxylgruppen und Transfer eines Isobutyryl- und eines Acetatrestes. Im Cluster konnten insgesamt sechs Gene lokalisiert werden, die möglicherweise für Methyltransferasen codieren, was als eine für die Avilamycinbiosynthese angemessene Anzahl erschien. Im Zusammenhang mit der Übertragung der anderen beiden Reste konnten dagegen bisher noch keine entsprechenden Gene detektiert werden. Interessant sind jedoch die beiden bereits bei der Biosynthese des Methyleurekanatrestes erwähnten Gene *aviB1* und *aviB2*, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen große Ähnlichkeit zur  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheit der Komponente I des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aufweisen. Dieser Enzymkomplex besteht



normalerweise aus drei Komponenten, die die Funktion einer TPP-abhängigen Dehydrogenase (Heterotetramer der Zusammensetzung  $\alpha_2\beta_2$ ), einer Lipoat-transacetylase (Homomultimer) und einer Dihydrolipoatdehydrogenase (Homodimer) besitzen (Kruger et al., 1994). ORFs, die für die beiden letztgenannten Komponenten codieren, sind im Falle des Avilamycins entweder außerhalb des Clusters lokalisiert oder haben für die Avilamycin-Biosynthese keine Bedeutung. Eine Möglichkeit, die Funktion dieser beiden Gene zu untersuchen, wäre die jeweilige Inaktivierung und anschließende Strukturanalyse der von der entsprechenden Mutante produzierten Derivate.

AviM ist, wie bereits von Sibylle Gaisser ausführlich diskutiert (S. Gaisser, Dissertationsschrift 1998), das für die Bildung der Orsellinsäure verantwortliche Enzym, welche durch Chlorierung (AviH) und Methylierung (AviG4) weiter zur Dichloroisoeverninsäure umgesetzt wird. Von Agnes Mühlenweg konnte mit Hilfe eines Inaktivierungsexperimentes gezeigt werden, dass die Halogenase AviH die Einführung beider Chloratome katalysiert (Weitnauer et al., 2001). Eine sehr ähnliche Reaktion wurde bereits im Zusammenhang mit der Complestatin-Biosynthese in *S.lavendulae* beschrieben (Chiu et al., 2001). Die dort involvierte Halogenase ComH und AviH sind zu 37% identisch. Insgesamt wurden bisher in der Literatur drei verschiedene Halogenasegruppen beschrieben: Häm-haltige, Vanadium-haltige und metallfreie Halogenasen. ComH und AviH besitzen jeweils zu den metallfreien Halogenasen die höchste Homologie. Allerdings fehlt beiden, analog zu den Chloroperoxidasen, das für diese Gruppe typische, katalytisch wirkende Sequenzmotiv Asp-His-Ser, weshalb für ComH ein neuer Mechanismus diskutiert wurde. Da ComH außerdem auch Ähnlichkeiten zu bekannten Epoxidasen, Oxygenasen und Hydroxylasen zeigte, wurde für die durch dieses Enzym katalysierte Reaktion ein ähnlicher Ablauf vorgeschlagen wie er auch bei Epoxidasen gefunden wird (Tuynman et al., 2000). Auch bei AviH traten bei Sequenzvergleichen in der Datenbank Homologien zu Hydroxylasen auf, neben dem fehlenden Motiv Asp-His-Ser ein weiterer Hinweis dafür, dass AviH möglicherweise ebenfalls diesem neuartigen Mechanismus folgt.

## 4.2 Funktionelle Charakterisierung von Methyltransferasegenen aus *S. viridochromogenes* Tü57

Das von *S. viridochromogenes* Tü57 produzierte Hauptderivat Avilamycin C weist insgesamt fünf O-Methylierungen und eine C-Methylierung auf (vgl. Abb. 45).

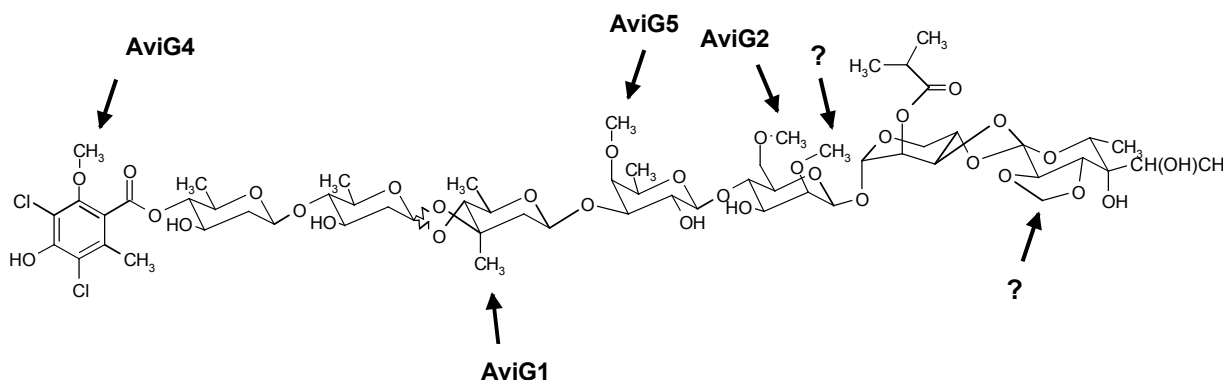


Abb. 45: Struktur von Avilamycin C. Durch Methyltransferasen eingeführte Methylgruppen sind mit Pfeilen markiert.

Entsprechend konnten nach eingehender Sequenzanalyse und Homologievergleichen in der Datenbank auch sechs mögliche Methyltransferasegene im Biosynthesegencluster detektiert werden, bezeichnet als *aviG1*, *aviG2*, *aviG3*, *aviG4*, *aviG5* und *aviG6*. Die Homologien waren zum Teil nur sehr gering, was vor allem auf die unterschiedliche Struktur der zu methylierenden Substrate zurückzuführen ist. Den meisten Methyltransferasen gemeinsam ist jedoch AdoMet als Methylgruppendonor. Dies führte bereits früher zu der Annahme, dass in diesen Enzymen konservierte Sequenzbereiche auftreten, die eine Art AdoMet-Bindetasche formen bzw. die Bindung oder Fixierung von AdoMet im katalytischen Zentrum vermitteln (Kagan und Clarke, 1994; Joshi und Chiang, 1998). In der Literatur werden im Wesentlichen drei verschiedene, durch definierte Intervalle voneinander getrennte Motive beschrieben (Ingrosso et al., 1989; Kagan und Clarke, 1994). Motiv I (hh(D/E)hGxGxG) ist das charakteristischste von allen und kann in den meisten bisher bekannten Methyltransferasen und zusätzlich in einigen anderen, AdoMet-umsetzenden Enzymen, wie z.B. AdoMet-Synthetasen und AdoMet-Decarboxylasen identifiziert werden. Durch Aufklärung der Kristallstruktur der *Hhal* DNA m<sup>5</sup>C Methyltransferase konnte die Beteiligung von Motiv I an der Bindung des Cofaktors AdoMet bestätigt werden (Cheng et al., 1993). Die beiden anderen Motive, Motiv II ((P/G)(Q/T)(F/Y/A)DA(I/V/Y)(F/I)(C/V/L)) und Motiv III (LL(R/K)PGG(R/I/L)(L/I)(L/F/I/V)-

(I/L)), kommen seltener vor und sind in ihrer Sequenz auch etwas variabler als Motiv I. Motiv II weist allgemein einen hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren auf. Es konnte gezeigt werden, dass ein aromatisches Molekül den Transfer der Methylgruppe einer Aryldimethylsulfonium-Verbindung auf Thiocyanat katalysieren kann (McCurdy et al., 1992), weshalb von den Autoren diskutiert wird, dass das positiv geladene Sulfoniumatom des AdoMet auf eine vergleichbare Weise gebunden und stabilisiert wird und das aktive Zentrum von Methyltransferasen deshalb reich an aromatischen Aminosäuren ist. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass nicht alle Methyltransferasen diese drei Motive aufweisen, wie z. B. FkbM, die 31-O-Demethyl-FK506-Methyltransferase, oder die in die Tetracenomycin C-Biosynthese involvierte Methyltransferase TcmP (Motamedi et al., 1996). Während der Evolution wurden also offensichtlich verschiedene Strategien zur AdoMet-abhängigen Methylierung entwickelt, was die Identifizierung von Methyltransferasegenen aufgrund reiner Sequenzdaten zusätzlich erschwert. Durch einen intensiven Vergleich der Sekundär- und Tertiärstrukturen konnte jedoch festgestellt werden, dass sich einzelne Methyltransferasen, auch wenn es die Aminosäuresequenz nicht unbedingt erwarten lässt, dennoch strukturell und funktionell recht ähnlich sind, d.h. dass sie ein konserviertes katalytisches Zentrum bestehend aus Aminosäuren mit vergleichbaren funktionellen Eigenschaften besitzen (Schluckebier et al., 1995). Bei den im *avi*-Cluster lokalisierten Methyltransferasegenen konnte Motiv I in allen sechs Fällen eindeutig identifiziert werden (Abb. 46). AviG1, AviG2 und AviG4 weisen alle drei Motive auf, AviG5 Motiv I und II und AviG3 und AviG6 nur Motiv I. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass alle für die Methylierungen während der Avilamycin-Biosynthese notwendigen Enzyme gefunden worden waren und einer weiteren funktionellen Charakterisierung zur Verfügung standen.

AVIG1.AMI	----GLVDLGPDDL	VVDIGSNDGT	LLAAYPADGP----
AVIG2.AMI	----AALSLTPDTD	LFEIGSGEIV	MARELAPRVG----
AVIG3.AMI	----AEQLAGASGR	WLDIFAGTSP	YRDLLPGARL----
AVIG4.AMI	----AHQDFSGVRT	VVDVGGDGT	LLAAVLR AHP----
AVIG5.AMI	----FFAAFPGAKR	VLELCALEGA	DTLAMSGQPG----
AVIG6.AMI	----IERVCAPDSG	CLDTCACGE	ILLTHMRR AAP----
consensus		hhDhGxGxG	
		E	

**Abb. 46:** Motiv I in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der sechs im *avi*-Cluster detektierten potentiellen Methyltransferasegenen *aviG1*, *aviG2*, *aviG3*, *aviG4*, *aviG5* und *aviG6*.

Als Methode zur Aufklärung der jeweiligen Funktion wurde die Geninaktivierung mit anschließender Strukturanalyse der von den entsprechenden Mutanten erzeugten Produkte gewählt. Da aus dem von *S.viridochromogenes* Tü57 synthetisierten Avilamycin-Komplex auch ein paar wenige Vertreter mit geringerem Methylierungsgrad bekannt waren (vgl. Abb. 1 nach Mertz et al., 1986), wurde vermutet, dass die Methylierungen an den Resten R3, R6, R8 und R9 erst nach Fertigstellung des gesamten Avilamycin-Grundgerüsts durchgeführt werden, und damit eine Ausschaltung der entsprechenden Enzyme nicht zu einem Ausfall der Biosynthese führen würde. Um nach erfolgter Inaktivierung entscheiden zu können, welche Methylgruppe jeweils im Molekül fehlt, wurde zunächst das Produktspektrum des Wildtyps *S.viridochromogenes* Tü57 untersucht. Es stellte sich heraus, dass unter den gewählten Bedingungen, wie zu Beginn bereits erwähnt, Avilamycin C das Hauptprodukt und Avilamycin A nur ein Nebenprodukt war. Dies stimmte mit der schon früher gemachten Beobachtung überein, dass sich mit zunehmender Inkubationsdauer (>48h) überwiegend Avilamycin C bildet, während nach 24-stündiger Inkubation das Verhältnis eher auf Seite des Avilamycin A liegt (Heilman et al., 1979). Dies erscheint nicht ungewöhnlich, da Avilamycin A quasi ein Vorläufermolekül des Avilamycin C darstellt, welches durch Reduktion des Acetatrestes (R2 an Ring H, vgl. Abb. 1) entsteht.

Zur Herstellung der Geninaktivierungskonstrukte wurde der in Streptomycceten nicht-replikative Vektor pSP1 (Pelzer et al., 1997) verwendet, der zur Selektion in *S.viridochromogenes* Tü57 das Erythromycinresistenzgen trägt. Die einzige Möglichkeit, den Vektor bzw. das daraus generierte Inaktivierungskonstrukt nach der Transformation in der Zelle stabil zu halten und den Vorteil der Erythromycinresistenz auszunutzen, besteht in einer Integration in das Streptomycceten-Genom. Dies wird durch die in den Vektor ligierten DNA-Fragmente erreicht, die homolog zu entsprechenden Abschnitten (abhängig von dem jeweils zu inaktivierenden Gen) auf dem Streptomycceten-Chromosom sind. Nur Zellen, die das Plasmid durch homologe Rekombination in ihr Genom eingebaut haben, exprimieren das Erythromycinresistenzgen und besitzen damit die Fähigkeit, auf Erythromycin-haltigem Medium zu überleben.

### Inaktivierung des Methyltransferasegens *aviG1*

Die von *aviG1* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte starke Ähnlichkeit zu den beiden in die L-Mycarose-Biosynthese involvierten C-Methyltransferasen TylCIII aus *S.fradiae* (Bate et al., 2000) und EryBIII aus *Saccharopolyspora erythraea* (Haydock et al., 1991; Gaisser et al., 1998), was zu der Annahme führte, dass es sich bei *AviG1* ebenfalls um

eine C-Methyltransferase, verantwortlich für die C-Methylierung während der 2-Desoxy-D-avalose-Biosynthese, handeln könnte. Die Inaktivierung dieses Gens erfolgte durch Einführung einer in-frame-Deletion. Eine Strukturanalyse der von der entsprechenden Mutante *S.viridochromogenes* GW1 produzierten Substanzen war aufgrund der nur sehr geringen Konzentration im Kulturmedium nicht durchführbar. Als Alternative kam die heterologe Expression von *aviG1* mit anschließender Analyse der dabei entstandenen Reaktionsprodukte in Frage. Vorversuche mit *oleY* und *S.fradiae* Tü2717 als Modellstamm zeigten deutlich, dass zum Nachweis von Methyltransferaseaktivität das im Expressionssystem zur Verfügung stehende Akzeptormolekül dem natürlichen Substrat möglichst ähnlich sein sollte. *OleY* besitzt zwar, wie kürzlich beschrieben wurde, eine gewisse Flexibilität, allerdings nur bezüglich kleineren strukturellen Veränderungen (Rodriguez et al., 2001). In *S.fradiae* erfolgreicher wäre in diesem Fall eventuell die Expression der entsprechenden an der L-Oleandrose-Biosynthese beteiligten Methyltransferase aus dem Avermectin-Produzenten *S.avermitilis* gewesen, da diese im Gegensatz zu *OleY*, die die Methylgruppe auf das monoglykosylierte Intermediat L-Olivosyl-oleandolid B transferiert, die Methylgruppe direkt auf die noch nicht mit dem Aglykon verknüpfte L-Olivose überträgt (Wohlert et al., 2001). Einziger Unterschied in *S.fradiae* Tü2717 wäre dann die Konfiguration der Olivose gewesen, die in diesem Stamm als D-Olivose und nicht als L-Olivose synthetisiert wird. Für den Aktivitätsnachweis von *AviG1* wurde schließlich die in der Arbeitsgruppe von Prof. Leadlay (Cambridge, UK) generierte *eryBIII*-Mutante des Erythromycin-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* als Expressionssystem ausgewählt. Die Expression von *aviG1* in dieser Mutante führte zur Wiederherstellung der Erythromycin A-Produktion, d.h. *AviG1* war dazu in der Lage, die Funktion der C-Methyltransferase *EryBIII* im Rahmen der L-Mycarose-Biosynthese zu übernehmen. Methylierung durch *EryBIII* findet hier normalerweise auf Stufe der dTDP-4-Keto-2,6-didesoxy-L-glucose statt (Salah-Bey et al., 1998). Mit 2-Desoxy-D-avalose enthält Avilamycin einen der L-Mycarose sehr ähnlichen Zucker, für den auch ein ähnlicher Biosyntheseweg vorgeschlagen wird. Wichtigster Unterschied, die Methylierung betreffend, ist die Konfiguration des jeweiligen Intermediats an Position C5, d.h. im Falle von *EryBIII* liegt das entsprechende natürliche Substrat in der L-Konfiguration vor, im Falle von *AviG1* jedoch in der D-Konfiguration. Dies dürfte auch eine Erklärung dafür sein, dass in der mit *AviG1* komplementierten Mutante Erythromycin A eher als Nebenprodukt und 3''-C-Demethyl-Erythromycin A immer noch als Hauptprodukt gebildet wurde, d.h. die Erythromycin A-Produktion nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte. Geht man davon aus, dass die Methyltransferase *AviG1* in *S.viridochromogenes* Tü57 für den Methylierungsschritt auf

dem Weg zur 2-Desoxy-D-erlose verantwortlich ist, so führt deren Inaktivierung dazu, dass ausgehend von dTDP-4-Keto-2,6-didesoxy-D-glucose, dem zentralen Intermediat der D-Olucose- bzw. 2-Desoxy-D-erlose-Biosynthese, die Biosynthese nur noch in Richtung D-Olucose verläuft (vgl. Abb. 44). Der fast vollständige Ausfall der "Avilamycin"-Biosynthese in der Mutante *S.viridochromogenes* GW1 ist deshalb darauf zurückzuführen, dass D-Olucose von der entsprechenden Glykosyltransferase nur zu einem geringen Grad als Substrat akzeptiert und anstelle der 2-Desoxy-D-erlose in die Heptasaccharidkette eingebaut wird. Die Methylgruppe besitzt also offensichtlich eine gewisse Bedeutung, und die Glykosyltransferasen bzw. die für die Orthoesterbildung verantwortliche Oxygenase agieren hier sehr spezifisch, denn es sind auch keine natürlich vorkommenden Avilamycine bekannt, die an dieser Position eine D-Olucose tragen, was aufgrund des Angebots in der Zelle durchaus denkbar wäre.

#### Inaktivierung der Methyltransferasegene *aviG4*, *aviG2* und *aviG5*

Das von *aviG4* abgeleitete Protein zeigte hohe Homologien zur O-Demethylpuromycin-O-Methyltransferase aus *S.alboniger* (Lacalle et al., 1991), zur Carminomycin-O-Methyltransferase aus *S.peuceetius* (Madduri et al., 1993) und zur Tetracenomycin 3-O-Methyltransferase aus *S.glaucescens* (Summers et al., 1992), die alle drei die Methylierung einer phenolischen Hydroxylgruppe katalysieren. Der terminale Dichloroisoeberninsäurerest des Avilamycins enthält ebenfalls eine methylierte Hydroxylgruppe am aromatischen Ring, so dass für *AviG4* eine analoge Funktion postuliert wurde. Für die von *aviG2* und *aviG5* abgeleiteten Genprodukte bestanden Ähnlichkeiten vorwiegend zu hypothetischen Methyltransferasen aus anderen Organismen (zu einer putativen Methyltransferase aus *Deinococcus radiodurans* (White et al., 1999) im Falle von *aviG2* und zu einer hypothetischen beta-Aspartat-Methyltransferase aus *Aeropyrum pernix* (Kawarabayasi et al., 1999) im Falle von *aviG5*), so dass sich hier kein genauere Anhaltspunkt für eine mögliche Funktion ergab, d.h. nicht auf die möglicherweise methylierte Position zurückgeschlossen werden konnte.

Begonnen wurde mit der Inaktivierung des Gens *aviG4*, in das eine Frameshift-Mutation eingeführt wurde. Die auf diese Weise entstandene Mutante *S.viridochromogenes* GW4 produzierte neue Derivate (Gavibamycine der A-Reihe), die bei Durchführung einer Reversed Phase-Chromatographie einen im Vergleich zu den aus den Wildtypkulturen isolierten Avilamycinen C und A geringeren Rf-Wert aufwiesen. Die mittels GC-MS-Analyse durchgeführte Strukturaufklärung bestätigte das Vorliegen einer zweiten freien

phenolischen Hydroxylgruppe am terminalen Orsellinsäurerest und erbrachte damit den Nachweis für die schon vermutete Funktion von AviG4. Die strukturelle Veränderung des aromatischen Restes, dem einzigen Chromophor im Avilamycinmolekül, machte sich auch in einer Veränderung des UV-Spektrums bemerkbar. Avilamycine besitzen in Methanol/0.04M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  pH7.0 (60:40) Absorptionsmaxima bei 220nm und 300nm, die von der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 produzierten Derivate bei 220nm, 250nm und 320nm. Dadurch dass in den neuen Derivaten zwei freie phenolische Hydroxylgruppen vorliegen, befinden sich insgesamt mehr freie n-Elektronen in Konjugation zum aromatischen System, was einen Einfluß auf mögliche Elektronenübergänge und damit auch auf das Absorptionsverhalten des Moleküls ausübt. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang auch die Verschiebung der Maxima bei Messung in Acetonitril. Diese liegen für Avilamycine dann bei 222nm und 280nm, für die von der Mutante produzierten Derivate bei 227nm, 267nm und 315nm. Charakteristisch ist hier außerdem ein im Vergleich zu dem in Methanol/Puffer aufgenommenen Spektrum deutlich zu beobachtender hypochromer Effekt, der im Falle der Avilamycine für die Absorption bei 280nm und im Falle der Gavibamycine für die Absorption bei 315nm auftritt. Hauptverantwortlich hierfür dürften die freien Hydroxylgruppen sein, die je nach verwendetem Lösungsmittel in protonierter oder deprotonierter Form vorliegen.

Die beiden Gene *aviG2* und *aviG5* wurden jeweils einzeln in der bereits vorliegenden Mutante *S.viridochromogenes* GW4 ebenfalls durch Einführung einer Frameshift-Mutation inaktiviert. Die dabei entstandenen Doppelmutanten produzierten neue Gavibamycine, allerdings mit einer im Vergleich zur Einfachmutante *S.viridochromogenes* GW4 deutlich verminderten allgemeinen Produktionsleistung. Ein Grund hierfür könnte in der Spezifität des für die Beförderung des Antibiotikums aus der Zelle hinaus verantwortlichen Transporters liegen, wobei jedoch auch in den Zellen keine Derivate akkumuliert wurden. Dass es sich sowohl bei AviG2 als auch bei AviG5 um eine Methyltransferase handelt, konnte mittels HPLC-ESI-MS-Analyse nachgewiesen werden. Zur genauen Strukturaufklärung der von den beiden Mutanten synthetisierten Produkte wurde ein Fütterungsexperiment mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem L-Methionin durchgeführt. L-Methionin wird von den Zellen aufgenommen und von der S-Adenosyl-Synthetase (L-Methionin-Adenosyl-Transferase) zu S-Adosylmethionin (AdoMet) umgesetzt, das den meisten Methyltransferasen als Methylgruppendonor dient. Bei Fütterungsversuchen mit dem Ziracin-Produzenten *Micromonospora carbonacea* (einer dem Avilamycin sehr ähnlichen Substanz; vgl. Abb. 2) wurde festgestellt, dass mit Ausnahme der Methylgruppe an Position 2 der D-Mannose alle

anderen Methylgruppen aus L-Methionin bzw. AdoMet stammen (Hesk et al., 1999), d.h. von AdoMet-abhängigen Methyltransferasen übertragen werden. In eigenen Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass zumindest im Avilamycin alle in Abb. 45 markierten Methylgruppen, eingeschlossen die an Position 2 der D-Mannose auf L-Methionin bzw. AdoMet zurückzuführen sind. D.h. für den Wirkungsort von AviG2 und AviG5 gab es, nachdem die Funktion von AviG1 und AviG4 geklärt war, mehrere Möglichkeiten. So konnten sie sowohl bei der Übertragung der Methylgruppen auf die Fucose oder Mannose, oder aber auch bei der Biosynthese des Methyleurekanats eine Rolle spielen. Die Auswertung der erhaltenen NMR-Daten ermöglichte schließlich eine eindeutige Zuordnung. Danach katalysiert AviG2 die Methylierung an Position 6 der D-Mannose und AviG5 die Methylierung an Position 4 der D-Fucose. AviG6 eine weitere potentielle und bisher noch nicht genauer charakterisierte Methyltransferase könnte nun also für die Übertragung einer der beiden verbleibenden Methylgruppen (Position 2 der Mannose bzw. Methylenbrücke im Methyleurekanat) zuständig sein. Da AviG3 als sechste mögliche Methyltransferase ausscheidet, ist nicht auszuschließen, dass sich unter den mit *aviX* bezeichneten ORFs, denen bisher noch keine mögliche Funktion zugewiesen werden konnte, noch ein weiteres Methyltransferasegen verbirgt.

Da für die Rapamycin-Biosynthese in *S.hygroscopicus* eine starke Hemmung der Methylierungsreaktion durch die Zugabe von L-Methionin (in einer Konzentration von 2-10g pro 1l Kultur) beschrieben wurde, die auf eine Hemmung der Demethylrapamycin-Methyltransferase und der S-Adenosyl-Synthetase zurückzuführen ist (Kim et al., 2000), wurde für das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Fütterungsexperiment das <sup>13</sup>C-markierte L-Methionin in geringerer Konzentration (0,1g pro 1l Kultur) und außerdem in zwei Portionen den Kulturen zugesetzt. Es konnte kein negativer Einfluss auf Zellvermehrung und Avilamycin- bzw. Gavibamycin-Produktion festgestellt werden.

Da durch die Inaktivierung der Methyltransferasen AviG4, AviG2 und AviG5 neue, demethylierte Avilamycinderivate erhalten wurden, und da auch natürlich vorkommende Avilamycine bekannt sind, bei denen an einzelnen Positionen die jeweilige Methylgruppe fehlt, wird angenommen, dass diese modifizierenden Enzyme erst am Ende der Biosynthese am vollständigen Molekül angreifen. Um dies zu bestätigen, wäre ein Biotransformationsexperiment denkbar, in dem die einzelnen Methyltransferasen in einem nicht-produzierenden Stamm, wie zum Beispiel *S.lividans*, heterolog exprimiert werden, diesem dann das jeweils aufgereinigte demethylierte Derivat zugefüttert wird und anschließend die Reaktionsprodukte analysiert werden. Voraussetzung in diesem Falle wäre außerdem, dass der verwendete Stamm zusätzlich Avilamycinresistenzgene, wie zum Beispiel *aviRb*, exprimiert, falls er keine natürliche Resistenz aufweist, und die



ABC-Transportergene, um eine Sekretion des Produkts zu gewährleisten. Alternativ könnte auch in-vitro in einem zellfreien System ein Methylierungsassay durchgeführt werden, mit der jeweiligen Methyltransferase, entweder gereinigt oder im Rohextrakt, dem entsprechenden demethylierten Avilamycinderivat und AdoMet als Hauptbestandteile. Ähnliche Versuche wurden zum Beispiel für die L-Oleandrosyl 3-O-Methyltransferase aus dem Oleandomycinproduzenten *S.antibioticus* (Rodriguez et al., 2001), die 31-O-Demethyl-FK506 Methyltransferase aus *S.hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* (Motamedi et al., 1996; Shafiee et al., 1994) und die Macrocin-O-Methyltransferase aus *S.fradiae* (Bauer et al., 1988) beschrieben.

### Inaktivierung des putativen Methyltransferasegens *aviG3*

*AviG3* wies die schwächsten Hinweise auf ein mögliches Methyltransferasegen auf. In der Datenbank wurde als einzige homologe Methyltransferase eine Sterol-C-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 gefunden (Kaneko et al., 1996), wobei die Ähnlichkeit auch nur äußerst gering ausgeprägt war. Von den drei für AdoMet-abhängige Methyltransferasen relativ charakteristischen Motiven konnte lediglich Motiv I detektiert werden. Da es sich bei Methyltransferasen jedoch, wie bereits ausführlich diskutiert, um eine sehr heterogene Enzymgruppe handelt, und für *AviG3* außerdem auch keine anderen signifikanten Homologien gefunden wurden, schien es nicht unmöglich zu sein, dass *aviG3* ein weiteres Methyltransferasegen darstellt. Die Inaktivierung erfolgte in der bereits vorliegenden Mutante *S.viridochromogenes* GW4, wiederum durch Einführung einer Frameshift-Mutation. Dabei wurde eine Doppelmutante (*S.viridochromogenes* GW3) erhalten, deren Hauptprodukt in einer durchgeführten HPLC-ESI-MS-Analyse eine gegenüber Gavibamycin A3 um 70 Einheiten verminderte Masse aufwies. Erklärt werden konnte dies mit dem Fehlen des Isobutyrylrestes an der L-Lyxose und dem Zurückbleiben einer freien Hydroxylgruppe. *AviG3* könnte also entweder an der Synthese oder vielmehr an dem Transfer dieses Restes beteiligt sein. In den natürlich vorkommenden Avilamycinen findet man an dieser Position neben dem Isobutyryl- in einigen Fällen auch einen Propionyl- oder Acetylrest. Diese Reste liegen in der Zelle ursprünglich als CoA-Thioester vor und stammen unter anderem aus dem Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren (Zhang et al., 1999; Kaneda, 1991). Isobutyryl-CoA entsteht zum Beispiel aus L-Valin durch Transaminierung und anschließende oxidative Decarboxylierung. So konnte im Rahmen von Arbeiten zur Produktionsoptimierung des Curamycinproduzenten *S.curacoi* DSM 40107 (Curamycin ist identisch mit Avilamycin B; vgl. Abb. 1) durch Zugabe von L-Valin zu den Kulturen ein

Produktionsschritt nach Avilamycin A erzielt werden (C. Braun, Diplomarbeit 1995), was die Herkunft des Isobutyrylrestes eindeutig belegt. Im Avilamycinproduzenten verhält es sich genauso, wobei AviG3 vermutlich als entsprechende Transferase fungiert, da basierend auf den MS-Daten in der in *aviG3* defekten Mutante anstelle des Isobutyrylrestes weder ein Propionyl- noch ein Acetylrest eingebaut werden, die einem funktionellen Enzym in der Zelle als Substrat zur Verfügung stehen würden. Um das Fehlen des Isobutyrylrestes in den Produkten der Mutante *S.viridochromogenes* GW3 eindeutig nachzuweisen, wäre, in Anlehnung an die Strukturaufklärung der Produkte aus den beiden Doppelmutanten *S.viridochromogenes* GW2 und GW5, ein Fütterungsexperiment mit gelabeltem L-Valin und der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 als Vergleich denkbar.

#### Charakterisierung der von den Mutanten gebildeten und als Gavibamycine bezeichneten neuen Derivate

Die Funktionsbestimmung einiger Avilamycin-Biosynthesegene durch Inaktivierung bot gleichzeitig auch die Möglichkeit, neue Avilamycin-Derivate herzustellen. Avilamycine zeigen, wie auch einige andere Vertreter der Orthosomycingruppe, eine sehr gute antibiotische Aktivität gegen viele Gram-positive pathogene Keime, wie Glykopeptid-resistente Enterokokken, Methicillin-resistente Staphylokokken und Penicillin-resistente Streptokokken. Dennoch wurden sie bisher, mit Ausnahme des Ziracins, nicht als Humantherapeutika zur Behandlung von Infektionen weiterentwickelt. Die Gründe hierfür liegen vor allem in den ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Substanzen. Ein großes Problem stellt ihre überaus schlechte Wasserlöslichkeit dar. Betrachtet man das Avilamycin-Molekül, so fällt auf, dass die meisten Hydroxylgruppen in methylierter Form vorliegen und dadurch für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen nicht mehr zur Verfügung stehen, wodurch der insgesamt lipophile Charakter der Verbindung zustande kommt. Durch die Inaktivierung der Methyltransferasen wurden neue Derivate erhalten, die aufgrund des Fehlens einzelner Methylgruppen eine erhöhte Hydrophilie zeigten. Die Substanz Gavibamycin A3 wurde gegen einige Gram-positive Keime getestet und MIC-Werte bestimmt. Die erhaltenen Werte zeigten, dass der Verlust der Methylgruppe am Dichloroisoeberninsäurerest nicht zu einer Einbuße der antibiotischen Aktivität geführt hatte. Verglichen mit Avilamycin A wies das neue Derivat sogar eine verbesserte Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*-Stämme auf. Da Gavibamycin A3 demethyliertes Avilamycin C darstellt, wäre ein Vergleich mit Avilamycin C aussagekräftiger gewesen, um die Bedeutung der Methylgruppe für die

biologische Aktivität exakt beurteilen zu können. Literaturwerte für die untersuchten Stämme sind nicht bekannt. Es sind jedoch bei Verwendung anderer Teststämme MIC-Werte beschrieben, die für Avilamycin C jeweils höher lagen als für Avilamycin A (Heilman et al., 1979), so dass vermutet wird, dass Avilamycin C allgemein eine schwächere Aktivität besitzt als Avilamycin A, und das Fehlen der Methylgruppe in Gavibamycin A3 damit in der Tat diesbezüglich keine negativen Auswirkungen hatte. Ein Vergleich der Gavibamycine aus den Mutanten *S.viridochromogenes* GW4, *S.viridochromogenes* GW2 und *S.viridochromogenes* GW5 mit den Avilamycinen aus dem Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57 ergab, dass mit zunehmender Anzahl freier Hydroxylgruppen die antibiotische Aktivität, zumindest gegenüber *Staphylococcus aureus*, nachlässt. Zu berücksichtigen ist dabei unter anderem, dass mit steigender Hydrophilie einer Substanz ihre Fähigkeit, die Zellwand bzw. Zellmembran zu passieren, in der Regel abnimmt. Dies würde im Falle der Avilamycine zu einer verminderten Konzentration am Wirkort und damit zu den beobachteten höheren MIC-Werten führen. Zur Durchführung der MIC-Wert-Bestimmung mit den angereinigten Extrakten muß angemerkt werden, dass es sich hier jeweils um Gemische aus Einzelsubstanzen mit unter Umständen sehr unterschiedlicher Aktivität handelte, und dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, welches jeweils das am stärksten wirksame Derivat darstellte und in welcher Konzentration es jeweils vorlag. Es ist also nicht auszuschließen, dass zum Beispiel eines der von den Doppelmutanten produzierten Derivate stärker wirksam ist als diejenigen aus der Mutante *S.viridochromogenes* GW4 oder dem Wildtyp *S.viridochromogenes* Tü57, oder dass einzelne Derivate überhaupt nicht wirksam sind. Desweiteren ist die bei den angereinigten Extrakten durchgeführte Gehaltsbestimmung mit einer Ungenauigkeit behaftet, da die Gavibamycine aufgrund des veränderten Chromophors sicherlich eine andere spezifische Absorption besitzen als Avilamycin A, das jedoch zur Erstellung der Kalibriergeraden eingesetzt worden war. Eine Berechnung der Konzentration der einzelnen Gavibamycine aus den jeweiligen Peakflächen mit Hilfe dieser Kalibriergeraden ist also eigentlich nicht korrekt, wurde jedoch angewendet, da zum entsprechenden Zeitpunkt kein gereinigtes Gavibamycin als Standard zur Verfügung stand. Die MIC-Werte sind demnach nicht als Absolutwerte zu betrachten, sondern geben eher eine Tendenz wieder und erlauben zumindest einen Vergleich der einzelnen Extrakte untereinander hinsichtlich ihres antibiotischen Potentials.

### 4.3 Untersuchungen zur Funktion und Bedeutung von Avilamycin-resistenz vermittelnden Genen

Antibiotikaproduzenten schützen sich vor ihren eigenen Substanzen jeweils durch speziell entwickelte Resistenzmechanismen (Cundliffe, 1989). Betreffen diese das jeweilige Target des Antibiotikums, so können durch deren Aufklärung auch Informationen bezüglich des Wirkmechanismus erhalten werden. Die entsprechenden Resistenzgene sind häufig in den jeweiligen Biosynthesegenclustern lokalisiert. So konnten im *avi*-Cluster insgesamt vier Gene identifiziert werden, die bei Expression in *S.lividans* Avilamycinresistenz verliehen. *AviABC1* und *aviABC2* codieren für ein ABC-Transporter-System wie es in vielen anderen Antibiotika produzierenden Actinomyceten ebenfalls gefunden wird (Dissertationsschrift S.Gaisser, 1998). Werden beide Gene gemeinsam in *S.lividans* TK66 exprimiert, führt dies allerdings nur zu einer relativ schwach ausgeprägten Avilamycinresistenz (MIC 5µg/ml). Daraus wurde geschlossen, dass noch weitere Resistenzgene in *S.viridochromogenes* Tü57, vorzugsweise innerhalb des Avilamycin-Biosynthesegenclusters existieren müssen, um dem Organismus den notwendigen Schutz zu bieten. Von S. Gaisser konnte im Rahmen ihrer Dissertation mit *aviRa* ein drittes Gen detektiert werden (Dissertationsschrift S.Gaisser, 1998), das jedoch in *S.lividans* TK66 wiederum nur geringfügig Avilamycinresistenz vermittelte (MIC 10µg/ml). Bei der Auswertung der bei der Sequenzierung des *avi*-Clusters erhaltenen Daten wurde schließlich *aviRb* als viertes Resistenzgen entdeckt, welches signifikante Homologien zu verschiedenen rRNA-Methyltransferasen aufwies und bei Expression in *S.lividans* TK66 eine starke Resistenz gegenüber Avilamycin verlieh (MIC 250µg/ml). *S.lividans* TK66-Stämme, die *aviRa* und *aviRb* bzw. alle vier Resistenzgene auf einem Expressionsplasmid enthielten, zeigten sogar eine noch höhere Avilamycintoleranz als der nur mit *aviRb* transformierte *S.lividans* TK66, was auf einen additiven bzw. synergistischen Effekt der einzelnen Resistenzfaktoren schließen ließ. Obwohl für *AviRa* zu keinem Protein in der Datenbank eine bedeutende Ähnlichkeit gefunden werden konnte, stellte sich heraus, dass es sich genauso wie bei *AviRb* um eine rRNA-Methyltransferase handelte. Wie gezeigt werden konnte, katalysieren beide Enzyme die Methylierung der 23S rRNA, und zwar völlig unabhängig voneinander, d.h. beide Enzyme akzeptieren neben der nicht-methylierten auch die jeweils durch das andere Enzym bereits methylierte rRNA als Substrat, weshalb angenommen werden kann, dass jeweils unterschiedliche Positionen innerhalb der rRNA modifiziert werden. In in-vitro-Translationsexperimenten konnte bestätigt werden, dass die Methylierung der für die Resistenzvermittlung verantwortliche Faktor ist, wobei den Ribosomen jedoch nur durch die Einführung beider Methylgruppen Avilamycinresistenz verliehen wird, da nur

bei Einsatz der aus GWRaRb isolierten 70S Ribosomen die poly(U)-abhängige Proteinbiosynthese auch in Gegenwart von Avilamycin A ungestört ablief. Die aus GW0, GWRa bzw. GWRb isolierten 70S Ribosomen erwiesen sich dagegen als sensitiv. Eine einzelne Methylierung reicht also offensichtlich nicht aus, um die Bindung von Avilamycin zu verhindern. Dies stand im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den in-vivo-Untersuchungen, in denen die alleinige Expression von *aviRb* ebenfalls zu einer starken Resistenzentwicklung geführt hatte. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass in den in-vivo-Untersuchungen keine Aussagen zu den an den Ribosomen tatsächlich vorherrschenden Avilamycinkonzentrationen gemacht werden können, die sich je nach Penetrationsfähigkeit des Avilamycins durch die Zellwand unter Umständen erheblich von den Konzentrationen im Medium unterscheiden können.

Da keine Kreuzresistenz zu Erythromycin besteht, kann davon ausgegangen werden, dass die 23S rRNA an anderen Positionen methyliert wird als denjenigen, die zur sogenannten MLS-Resistenz führen. Die ausführlichen Untersuchungen zum Resistenz- und Wirkungsmechanismus des strukturell eng mit Avilamycin verwandten Ziracin (Evernimicin) geben jedoch einige Hinweise auf die möglicherweise von der Methylierung durch AviRa und AviRb betroffenen Nukleotide. Die Vermutung, dass Avilamycin und Ziracin denselben bzw. einen sehr ähnlichen Wirkmechanismus besitzen, ist nicht nur strukturell begründet, sondern wird auch durch die nur zwischen diesen beiden Substanzen auftretende Kreuzresistenz unterstützt (diese Arbeit und Aarestrup 1998). Hinzu kommt, dass Avilamycin als einzige Verbindung unter den bekannten Translationsinhibitoren dazu in der Lage ist, die Bindung von Evernimicin an die 70S Ribosomen bzw. die ribosomale 50S Untereinheit zu blockieren, also offensichtlich dieselbe hochspezifische Bindungsstelle besitzt (McNicholas et al., 2000). Auf den ersten Blick widerspricht dies der Aussage von Wolf (Wolf, 1973), der eine Bindung von Avilamycin an die ribosomale 30S Untereinheit postulierte. Doch andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass Avilamycin, abhängig vom Zustand der Ribosomen, mit beiden Untereinheiten interagieren kann, wie es zum Beispiel auch für die Oxazolidinone beschrieben wird (Zhou et al., 2002). In einer kürzlich erschienenen Publikation wird beschrieben, dass offensichtlich zwei Abschnitte der 23S rRNA, nämlich die beiden hairpins 89 und 91 der Domäne V, an der Evernimicinbindung beteiligt sind, wobei hairpin 89 die größere Bedeutung besitzt (Belova et al., 2001). Hier befindet sich auch das Nukleotid G2470 (*E.coli*-Nummerierung), das durch die aus einem Avilamycin- und Evernimicin-resistenten *Enterococcus faecium*-Stamm isolierte rRNA-Methyltransferase EmtA methyliert wird, was zu einem starken Rückgang der Evernimicinbindung führt (Mann et al., 2001). EmtA

ist Teil eines Transposons, zeigt allerdings weder zu AviRa noch zu AviRb signifikante Homologien. An der Evernimicinbindung ebenfalls beteiligt ist das ribosomale Protein L16. Punktmutationen führten zu einer geringeren Empfindlichkeit der entsprechenden Stämme gegenüber Evernimicin (Adrian et al., 2000; McNicholas et al., 2001) und, wie in einer anderen Studie festgestellt wurde, auch gegenüber Avilamycin (Aarestrup und Jensen, 2000). Das Protein L16 ist Bestandteil der 50S Untereinheit und interagiert mit hairpin 89 (Muralikrishna und Cooperman, 1995). Beide Komponenten sind Teil der Aminoacyl-tRNA-Bindungsstelle der Ribosomen (A-Stelle), wobei das Protein L16 in die Fixierung des 3'-Endes der tRNA involviert zu sein scheint (Maimets et al., 1984). Allerdings konnte bisher noch keine spezifische Bindung von Evernimicin an das Protein L16 nachgewiesen werden, weshalb angenommen wird, dass Evernimicin in erster Linie an die rRNA bindet, und diese Bindung durch eine zusätzliche Interaktion mit dem Protein L16 verstärkt wird (Adrian et al., 2000). Dies stimmt mit der allgemeinen Beobachtung überein, dass ribosomale Proteine zwar Bindung und Wirkung von an Ribosomen angreifenden Antibiotika beeinflussen können, das primäre Target jedoch immer die rRNA darstellt (Cundliffe, 1990). Angesichts der Tatsache, dass Ribosomen zu über 60% aus rRNA bestehen, welche zudem für die wichtigsten Funktionen zuständig ist, wie Entschlüsselung der genetischen Information und Ausbildung der Peptidbindung, erscheint dies auch nicht überraschend. Zusätzlich zu den Bindungsstellen in hairpin 89 existiert noch eine weitere Bindungsstelle für Evernimicin in hairpin 91 (Belova et al., 2001). Röntgenstrukturdaten zeigen, dass die beiden hairpins in der Tertiärstruktur der ribosomalen 50S Untereinheit eng benachbart liegen und sozusagen eine Bindungstasche für Evernimicin bilden (Belova et al., 2001). Da im *avi*-Cluster insgesamt zwei rRNA-Methyltransferasen identifiziert wurden, die durch Methylierung zweier unterschiedlicher Positionen innerhalb der 23S rRNA den Ribosomen Resistenz gegenüber Avilamycin verleihen, wird spekuliert, dass diese innerhalb der hairpins 89 und 91 liegen. Zukünftige Experimente werden darauf ausgelegt sein, dies genauer zu untersuchen. Vorstellbar wäre das gezielte Einführen von Punktmutationen in die 23S rDNA und anschließende Analyse der entsprechenden, in-vitro gewonnenen Transkripte im Methylierungs-Assay oder aber, nach zuvor erfolgter Methylierung der 23S rRNA durch AviRa und AviRb, die Herstellung von cDNA aus den genannten Bereichen mit Hilfe der reversen Transkriptase und anschließende Sequenzanalyse der erhaltenen DNA-Fragmente (reverse transcriptase pausing assay). Da alle bisher angesprochenen Abschnitte Teil der A-Stelle sind, wird als möglicher Mechanismus diskutiert, dass Evernimicin und ebenso Avilamycin die Proteinbiosynthese entweder dadurch inhibieren, dass sie eine Konformationsänderung

innerhalb der A-Stelle hervorrufen und als Folge die korrekte Positionierung der tRNA verhindern, oder aber dass sie direkt mit den Aminoacyl-tRNA-Molekülen um die Bindungsstelle konkurrieren. Diese Theorie wird durch Versuchsergebnisse aus früheren Arbeiten zum Avilamycin-Wirkungsmechanismus unterstützt, die zeigen, dass stöchiometrische Mengen an Avilamycin dazu in der Lage sind, die Bindung von Phe-tRNA an 70S Ribosomen in Gegenwart von poly(U) zu 50% zu inhibieren (Wolf, 1973). Durch Modifizierung einzelner Nukleotide der 23S rRNA durch die beiden rRNA-Methyltransferasen AviRa und AviRb würde die Konformation der A-Stelle jedoch so verändert, dass Avilamycin und Evernimicin nicht mehr binden könnten, der Ablauf der Proteinbiosynthese jedoch unbeeinflusst bliebe und der Organismus somit resistent gegenüber den beiden Substanzen wäre.

Alle bisher dargestellten Ergebnisse, insbesondere auch die Ergebnisse aus den in-vitro-Translationsexperimenten mit poly(U) als synthetischem Template, belegen, dass es sich sowohl bei Avilamycin als auch bei Evernimicin um Inhibitoren der Elongation handelt. Zusätzlich konnte für Evernimicin in einem Translations-Initiations-Assay festgestellt werden, dass es außerdem auch die IF2-abhängige Bildung des 70S Initiationskomplexes hemmt, vermutlich indem es die Wechselwirkung zwischen IF2 und der 50S Untereinheit bzw. die richtige Platzierung der Startereinheit fMet-tRNA innerhalb des Komplexes stört (Belova et al., 2001). Auch für die Wirkungsweise von Avilamycin wurde bereits eine Beeinflussung der Ausbildung des Initiationskomplexes diskutiert (Wolf, 1973). Die durch verschiedene Footprint-Analysen erhaltenen Daten weisen darauf hin, dass die Bindungsstelle für IF2 auf der 50S Untereinheit und die Bindungsstelle für Evernimicin in hairpin 89 überlappen (Belova et al., 2001). Es ist bekannt, dass einige Antibiotika in niedrigen Konzentrationen die Initiation der Translation hemmen können und in höheren Konzentrationen die Elongation (Cundliffe, 1981), so dass die unterschiedlichen Theorien bezüglich des Wirkungsmechanismus von Avilamycin und Evernimicin keinen Widerspruch zueinander darstellen. Außerdem könnte dies unter anderem auch eine Ursache dafür sein, dass die Aktivität von AviRb in-vivo zu einer starken Resistenzentwicklung führt, die Ribosomen in-vitro jedoch sensitiv gegenüber Avilamycin bleiben, da in diesem System unter den gewählten Bedingungen die eigentliche Translationsinitiation, so wie sie in lebenden Zellen vorkommt, fehlt.

Festzuhalten bleibt, dass Avilamycin einen im Vergleich zu allen bisher bekannten Translationsinhibitoren, mit Ausnahme des Evernimicins, völlig neuen Angriffspunkt besitzt, was diese Verbindung zu einem interessanten Kandidaten für die Entwicklung neuer Antibiotika macht.

## 5 Zusammenfassung

Avilamycine, gebildet von *Streptomyces viridochromogenes* Tü57, gehören zu den Orthosomycin-Antibiotika. Sie sind aufgebaut aus einem terminalen Dichloroisoeberninsäurerest, der esterglykosidisch mit einer Heptasaccharidkette, bestehend aus zwei Molekülen D-Olivose, 2-Desoxy-D-evalose, 4-O-Methyl-D-fucose, 2,6-Di-O-methyl-D-mannose, L-Lyxose und Methyleurekanat, verknüpft ist. Die meisten der im Avilamycin-Molekül enthaltenen Hydroxylgruppen liegen in methylierter Form vor. Avilamycine besitzen eine ausgezeichnete antibiotische Aktivität gegen Gram-positive, auch multiresistente Keime, und gehören damit zu einer für die Entwicklung neuer Antibiotika interessanten Substanzgruppe. Die Wirkung beruht auf einer Hemmung der Proteinbiosynthese. Der genaue Angriffspunkt ist jedoch noch unbekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierung des Avilamycin-Biosynthesegenclusters vollständig abgeschlossen und nach Auswertung der erhaltenen Daten ein hypothetischer Biosyntheseweg erstellt. Im Mittelpunkt stand jedoch die funktionelle Charakterisierung der an der Biosynthese des Avilamycins bzw. an der Modifizierung des Moleküls beteiligten Methyltransferasen. Im Cluster konnten sechs mögliche Methyltransferasegene detektiert werden, was auch der Anzahl an Methylgruppen im Avilamycin A, dem Derivat mit dem höchsten Methylierungsgrad, entsprach. Durch Geninaktivierungsexperimente konnten vier dieser Gene (*aviG1*, *aviG2*, *aviG4*, *aviG5*) eindeutig als Methyltransferasegene identifiziert werden und eines (*aviG3*) als mögliche Isobutryltransferase. *AviG1* ist danach an der Biosynthese der 2-Desoxy-D-evalose beteiligt, *AviG4* ist für die Methylierung der Hydroxylgruppe in der Dichloroisoeberninsäure verantwortlich, *AviG2* für die Methylierung der Hydroxylgruppe an Position 6 der D-Mannose und *AviG5* für die Methylierung der Hydroxylgruppe an Position 4 der D-Fucose. Die durch die Inaktivierung der Methyltransferasegene erhaltenen neuen Avilamycin-Derivate wurden als Gavibamycine bezeichnet. In verschiedenen Untersuchungen stellte sich heraus, dass diese neuen Derivate nach wie vor eine sehr gute antibiotische Aktivität gegen Gram-positive Keime, wie z.B. *Staphylococcus aureus* oder *Enterococcus faecalis*, aufweisen und zugleich eine im Vergleich zu den ursprünglichen Avilamycinen erhöhte Hydrophilie.

Auch bei der Avilamycinresistenzvermittlung im Produzenten *S. viridochromogenes* Tü57 spielen Methyltransferasen eine wichtige Rolle. Neben den bereits von Sibylle Gaiser identifizierten Resistenzgenen *aviABC1+aviABC2* und *aviRa* konnte mit *aviRb* ein weiteres Resistenzgen im Cluster detektiert werden, welches sich nach heterologer



Expression in dem Avilamycin-sensitiven Stamm *S.lividans* TK66 als das wirksamste der vier Gene erwies. Sowohl *aviRa* als auch *aviRb* wurden in *E.coli* als N-terminale Hexa-Histidin-Fusionsproteine überexprimiert, über Ni-NTA gereinigt und in einem rRNA-Methylierungs-Assay eingesetzt. Dabei konnte für beide Enzyme rRNA-Methyltransferaseaktivität nachgewiesen werden. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass *AviRa* und *AviRb* völlig unabhängig voneinander die 23S rRNA jeweils an verschiedenen Positionen methylieren. In in-vitro-Translations-Experimenten stellte sich allerdings heraus, dass den Ribosomen nur durch Methylierung beider Positionen Resistenz gegenüber Avilamycin verliehen wird, d.h. dass beide Methylierungen notwendig sind, um eine Bindung des Avilamycins an die rRNA bzw. die Ribosomen zu verhindern. Da keine Kreuzresistenz zu anderen, die Proteinbiosynthese hemmenden Antibiotika besteht, ist davon auszugehen, dass Avilamycin an eine andere Stelle innerhalb des Ribosoms bindet, und auch die zur Resistenz führenden Methylierungen an anderen Positionen stattfinden als den zum Beispiel aus der MLS-Resistenz bereits bekannten.



## 6 Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F.M. (1998) Association between decreased susceptibility to a new antibiotic for treatment of human diseases, evernimicin (SCH 27899), and resistance to an antibiotic used for growth promotion in animals, avilamycin. *Microb. Drug Resist.* 4: 137-141
- Aarestrup, F.M., Jensen, L.B. (2000) Presence of Variations in Ribosomal Protein L16 Corresponding to Susceptibility of Enterococci to Oligosaccharides (Avilamycin and Evernimicin). *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3425-3427
- Adrian, P.V., Zhao, W., Black, T.A., Shaw, K.J., Hare, R.S., Klugman, K.P. (2000) Mutations in Ribosomal Protein L16 Conferring Reduced Susceptibility to Evernimicin (SCH 27899): Implications for Mechanism of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 732-738
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Arthur, M., Reynolds, P., Courvalin, P. (1996) Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiol.* 4: 401-407
- 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
- Bauer, N.J., Kreuzman, A.J., Dotzlaf, J.E., Yeh, W.K. (1988) Purification, characterization, and kinetic mechanism of S-adenosyl-L-methionine:macrocin O-methyltransferase from *Streptomyces fradiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 15619-15625
- Bechthold, A., Floss, H. (1994) Overexpression of the thiostrepton resistance genes from *Streptomyces azureus* in *Escherichia coli* and characterization of recognition sites of the 23S rRNA A1067 2'-methyltransferase in the GTPase centre of 23S ribosomal RNA. *Eur. J. Biochem.* 224: 431-437
- Belova, L., Tenson, T., Xiong, L., McNicholas, P.M., Mankin, A.S. (2001) A novel site of antibiotic action in the ribosome: Interaction of evernimicin with the large ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3726-3731
- Bibb, M.J., Jansen, G.R., Ward, J.M. (1985) Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* 38: 215-226
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagaraja Rao, R., Schoner, B.E. (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* ssp. *Gene* 116: 43-49
- 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
- Braun, C. (1995) Untersuchungen an einem Antibiotikum aus der Orthosomycingruppe. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Brautaset, T., Sekurova, O.N., Sletta, H., Ellingsen, T.E., StrLm, A.R., Valla, S., Zotchev, S.B. (2000) Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* 7: 395-403
- Brawner, M.E., Auerbach, J.I., Fornwald, J.A., Rosenberg, M., Taylor D. (1985) Characterization of *Streptomyces* promoter sequences using the *Escherichia coli* galactokinase gene. *Gene* 40: 191-201

- Bullok, 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
- Buzzetti, F., Eisenberg, F., Grant, H.N., Keller-Schierlein, W., Voser, W., Zähler, H. (1968) Avilamycin. *Experientia* 24: 320-323
- Chater, K.F., Merrick, M.J. (1979) Streptomycetes. In Parish, J.H. (ed.), *Developmental biology of prokaryotes*. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Chater, K.F., Bruton, C.J. (1983) Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylnomycin are clustered. *EMBO J.* 4: 1893-1897
- Chen, H., Thomas, M.G., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Walsh, C.T., Burkart, M.D. (2000) Deoxysugars in glycopeptide antibiotics: Enzymatic synthesis of TDP-L-epivancosamine in chloroeremomycin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11942-11947
- Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J.W., Roberts, R.J. (1993) Crystal structure of the *HhaI* methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* 74: 299-307
- Chiu, H.T., Hubbard, B.K., Shah, A.N., Eide, J., Fredenburg, R.A., Walsh, C.T., Khosla, C. (2001) Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8548-8553
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaiia, 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., Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 11: 537-544
- Cullum, J., Altenbuchner, J., Flett, F., Piendl, W. (1986): DNA amplification and genetic instability in *Streptomyces*. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 4: 59-78
- Cundliffe, E. (1981) in *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, eds. Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H., Waring, M.J. (Wiley, New York), pp. 402-545
- Cundliffe, E. (1989) How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 207-233
- Cundliffe, E. (1990) in *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*, eds. Hill, W.E. et al. (ASM, Washington DC), pp. 479-490
- Davies, J. (1994) Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. *Science* 264: 375-382
- Devereux, J., Haerberli, 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. (1997) Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* 15: 8041-8056
- 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
- Feinman, S.E. (1995) Antibiotics in Animal Feed – Drug Resistance Revisited. *ASM News* 64: 24-30
- Feitelson, J.S., Hopwood, D.A. (1983) Cloning of a streptomycetes gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 190: 394-398

- Fernandez-Moreno, M.A., Martinez, E., Caballero, J.L., Ichinose, K., Hopwood, D.A., Malpartida, F. (1994) DNA sequence and function of the *actVI* region of the actinorhodin biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Biol. Chem.* 269: 24854-24863
- Foster, D.R., Rybak, M.J. (1999) Pharmacologic and bacteriologic properties of SCH27899 (Ziracin), an investigational antibiotic from the everninomicin family. *Pharmacotherapy* 19:1111-1117
- Fuchs, P.C., Barry, A.L., Brown, S.D. (1999) In vitro activities of SCH27899 alone and in combination with 17 other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2996-2997
- Gäumann, E., Prelog, V., Vischer, E. (1960) Herstellung und Gewinnung des Antibiotikums Avilamycin. Deutsches Patentamt, Auslegeschrift: 1116864
- Gaisser, S. (1998) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Avilamycin-Biosynthese und Resistenz in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Gaisser, S., Böhm, G.A., Cortes, J., Leadlay, P.F. (1997) Analysis of seven genes from the *eryAI-eryK* region of the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* 256: 239-251
- Gaisser, S., Böhm, G.A., Doumith, M., Raynal, M.-C., Dhillon, N., Cortes, J., Leadlay, P.F. (1998) Analysis of *eryBI*, *eryBIII* and *eryBVII* from the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* 258: 78-88
- Gaisser, S., Reather, J., Wirtz, G., Kellenberger, L., Staunton, J., Leadlay, P.F. (2000) A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Microbiol.* 36: 391-401
- 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
- Galmarini, O.L., Deulofeu, V. (1961) Curamycin-I. Isolation and analysis of some hydrolysis products. *Tetrahedron* 15: 76-88
- Ganguly, A.K. (2000) Ziracin, a Novel Oligosaccharide Antibiotic. *J. Antibiotics* 53: 1038-1044
- Gil, J.A., Hopwood, D.A. (1983) Cloning and expression of a p-aminobenzoic acid synthetase gene of the candicidin-producing *Streptomyces griseus*. *Gene* 25: 119-132
- Gonzalez, A., Remsing, L.L., Lombo, F., Fernandez, M.J., Prado, L., Brana, A.F., Künzel, E., Rohr, J., Mendez, C., Salas, J.A. (2001) The *mtmVUC* genes of the mithramycin gene cluster in *Streptomyces argillaceus* are involved in the biosynthesis of the sugar moieties. *Mol. Gen. Genet.* 264: 827-835
- 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
- Heilman, W., Kupfer, E., Keller-Schierlein, W., Zähler H., Wolf, H., Peter, H.H. (1979) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen: Avilamycin C. *Helvetica Chimica Acta* 62: 1ff.
- Hesk, D., Gunnarsson, I., Hendershot, S., Koharski, D., McNamara, P., Schwartz, J.L., Thonoor, M., Wirth, M. (1999) Synthesis of <sup>3</sup>H- and <sup>14</sup>C-SCH27899 by Fermentation and Evaluation of *in vivo* Label Stability. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 42: 159-167
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Oguri, K., Tenover, F. (1997) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 1135-1136

- Hoffmeister, D., Ichinose, K., Domann, S., Faust, B., Trefzer, A., Dräger, G., Kirschning, A., Fischer, C., Künzel, E., Bearden, D.W., Rohr, J., Bechthold, A. (2000) The NDP-sugar co-substrate concentration and the enzyme expression level influence the substrate specificity of glycosyltransferases: cloning and characterization of deoxysugar biosynthetic genes of the urdamycin biosynthetic gene cluster. *Chem. Biol.* 7: 821-831
- Hoffmeister, D., Ichinose, K., Bechthold, A. (2001) Two sequence elements of glycosyltransferases involved in urdamycin biosynthesis are responsible for substrate specificity and enzymatic activity. *Chem. Biol.* 8: 557-567
- 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
- Hütter, R. (1962) Zur Systematik der Actinomyceten. *Archiv für Mikrobiologie* 43: 23-49
- Hutchinson, C.R. (1994) Drug synthesis by genetically engineered microorganisms. *Biotechnology (NY)* 12: 375-380
- Hyun, C., Kim, S.S., Sohng, J.K., Hahn, J., Kim, J., Suh, J. (2000) An efficient approach for cloning the NDP-glucose synthase gene from actinomycetes and its application in *Streptomyces spectabilis*, a spectinomycin producer. *FEMS Microbiol. Lett.* 183: 183-189
- Ichinose, K., Bedford, D.J., Tornus, D., Bechthold, A., Bibb, M.J., Revill, W.P., Floss, H.G., Hopwood, D.A. (1998) The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22: sequence analysis and expression in a heterologous host. *Chem. Biol.* 5: 647-659
- Ingrosso, D., Fowler, A.V., Bleibaum, J., Clarke, S. (1989) Sequence of the D-Aspartyl/L-Isoaspartyl Protein Methyltransferase from Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 264: 20131-20139
- Jones, R.N., Barrett, M.S. (1995) Antimicrobial activity of SCH27899, oligosaccharide member of the everninomicin class with a wide gram-positive spectrum. *J. Clin. Microb. Infect.* 1: 35-43
- Jones, R.N. (2001) Resistance patterns among nosocomial pathogens. Trends over the past few years. *CHEST* 119: 397S-404S
- Joshi, C.P., Chiang, V.L. (1998) Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Molecular Biology* 37: 663-674
- 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
- Kaneda, T. (1991) Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55: 288-302
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 30 (Suppl.): 185-209
- Katz, L., Hutchinson, R. (1992) Genetic engineering of antibiotic producing organisms. *Annual reports in medicinal chemistry* 27: 129-138

- Katz, L., Donadio, S. (1993) Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 875-912
- Katz, L. (1997) Manipulation of modular polyketide synthases. *Chem. Rev.* 97: 2557-2576
- Katz, L., McDaniel, R. (1999) Novel macrolides through genetic engineering. *Med. Res. Rev.* 19: 543-558
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Kikuchi, H. (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.* 30: 83-101, 145-152
- Kim, W.-S., Wang, Y., Fang, A., Demain, A. (2000) Methionine Interference in Rapamycin Production Involves Repression of Demethylrapamycin Methyltransferase and S-Adenosylmethionine Synthetase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2908-2910
- Kirschning, A., Bechthold, A.F.-W., Rohr, J. (1997) Chemical and Biochemical Aspects of Deoxysugars and Deoxysugar Oligosaccharides. *Top. Curr. Chem.* 188: 1-84
- Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbusch, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 27: 364-370
- Koshla, C., Zawada, R.J.X. (1996) Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis. *Trends in Biotechnology* 14: 335-341
- Kruger, N., Oppermann, F.B., Lorenzl, H., Steinbuchel, A. (1994) Biochemical and molecular characterization of the *Clostridium magnum* acetoin dehydrogenase enzyme system. *J. Bacteriol.* 176: 3614-3630
- Krzyzosiak, W., Denman, R., Cunningham, P., Ofengand, J. (1988) An Efficiently Mutagenizable Recombinant Plasmid for *in Vitro* Transcription of the *Escherichia coli* 16S RNA Gene. *Anal. Biochem.* 175: 373-385
- Kuroda, M., Kuwahara-Arai, K., Hiramatsu, K. (2000) Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 485-490
- Lacalle, R.A., Ruiz, D., Jimenez, A. (1991) Molecular analysis of the *dmpM* gene encoding an O-demethyl puromycin O-methyltransferase from *Streptomyces alboniger*. *Gene* 109: 55-61
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Liu, H.W., Thorson, J.S. (1994) Pathways and Mechanisms in the Biogenesis of Novel Deoxysugars by Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 223-256
- Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Naples, L., Moss, E.L., Menzel, F., Hare, R.S., Miller, G.H. (1994) Biological activity of SCH27899 (EVE), an everninomycin antibiotic. 33rd ICAAC, Session 41: Poster 456
- Lombo, F., Blanco, G., Fernandez, E., Mendez, C., Salas, J.A. (1996) Characterization of *Streptomyces argillaceus* genes encoding a polyketide synthase involved in the biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *Gene* 172: 87-91

- Lombo, F., Siems, K., Brana, A.F., Mendez, C., Bindseil, K., Salas, J.A. (1997) Cloning and Insertional Inactivation of *Streptomyces argillaceus* Genes Involved in the Earliest Steps of Biosynthesis of the Sugar Moieties of the Antitumor Polyketide Mithramycin. *J. Bacteriol.* 179: 3354-3357
- Lyutzkanova, D., Distler, J., Altenbuchner, J. (1997) A spectinomycin resistance determinant from the spectinomycin producer *Streptomyces flavopersicus*. *Microbiology* 143: 2135-2143
- MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., MacNeil, T. (1992) Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111: 61-68
- Madduri, K., Torti, F., Colombo, A.L., Hutchinson, C.R. (1993) Cloning and sequencing of a gene encoding carminomycin 4-O-methyltransferase from *Streptomyces peucetius* and its expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175 (12): 3900-3904
- 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
- Maimets, T., Remme J., Villems R. (1984) Ribosomal protein L16 binds to the 3'-end of transfer RNA. *FEBS Lett.* 166: 53-56
- Malpartida, F., Hopwood, D.A. (1984) Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* 309: 462-464
- Mann, P.A., Xiong, L., Mankin, A.S., Chau, A.S., Mendrick, C.A., Najarian, D.J., Cramer, C.A., Loebenberg, D., Coates, E., Murgolo, N.J., Aarestrup, F.M., Goering, R.V., Black, T.A., Hare, R.S., McNicholas, P.M. (2001) EmtA, a rRNA methyltransferase conferring high-level evernimicin resistance. *Mol. Microbiol.* 41: 1349-1356
- Martin, J.F., Liras, P. (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 173-206
- McCurdy, A., Jimenez, L., Stauffer, D.A., Dougherty, D.A. (1992) Biomimetic catalysis of S-N2 reactions through cation-pi interactions: The role of polarizability in catalysis. *JACS* 114: 10314-10321
- McDaniel, R., Thamchaipenet, A., Gustafsson, C., Fu, H., Betlach, M., Ashley, G. (1999) Multiple genetic modifications of the erythromycin gene cluster to produce a library of novel 'unnatural' natural products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1846-1851
- McDevitt, D., Rosenberg, M. (2001) Exploiting genomics to discover new antibiotics. *TRENDS in Microbiology* 9: 611-617
- McNicholas, P.M., Najarian, D.J., Mann, P.A., Hesk, D., Hare, R.S., Shaw, K.J., Black, T.A. (2000) Evernimicin Binds Exclusively to the 50S Ribosomal Subunit and Inhibits Translation in Cell-Free Systems Derived from both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1121-1126
- McNicholas, P.M., Mann, P.A., Najarian, D.J., Miesel, L., Hare, R.S., Black, T.A. (2001) Effects of Mutations in Ribosomal Protein L16 on Susceptibility and Accumulation of Evernimicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 79-83
- Mertz, J.L., Peloso, J.S., Barker, B.J., Babbitt, G.E., Occolowitz, J.L., Simson, V.L., Kline, R.M. (1986) Isolation and Structural Identification of Nine Avilamycins. *J. Antibiotics* 39: 877-887



- Metcalf, W.W., Wolfe, R.S. (1998) Molecular genetic analysis of phosphite and hypophosphite oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88. J. Bacteriol. 180: 5547-5558
- Moffat, B.A., Studier, F.W. (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. Cell 49: 221-227
- Morona, J.K., Morona, R., Paton, J.C. (1997) Molecular and genetic characterization of the capsule biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* type 19B. J. Bacteriol. 179: 4953-4958
- Motamedi, H., Hopwood, D.A. (1987) Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4445-4449
- Motamedi, H., Shafiee, A., Cai, S.-J., Streicher, S.L., Arison, B.H., Miller, R.R. (1996) Characterization of Methyltransferase and Hydroxylase Genes Involved in the Biosynthesis of the Immunosuppressants FK506 and FK520. J. Bacteriol. 178: 5243-5248
- Muralikrishna, P., Cooperman, B.S. (1995) Ribosomal components neighboring the 2475 loop in *Escherichia coli* 50S subunits. Biochemistry 34: 115-121
- Nagy, I., De Mot, R. (1999) Sequence analysis of the oxidase/reductase genes upstream of the *Rhodococcus erythropolis* aldehyde dehydrogenase gene *thcA* reveals a gene organisation different from *Mycobacterium tuberculosis*. DNA Seq. 10: 61-66
- Nakashio, S., Iwasawa, H., Dun, F.Y., Kanemitsu, K., Shimada, J. (1995) Everninomicin, a new oligosaccharide antibiotic: its antimicrobial activity, post-antibiotic effect and synergistic bactericidal activity. Drugs Exp. Clin. Res. 21: 7-16
- Nelson, K.E., Fraser, C.M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. Nature 399: 323-329
- Neu, H.C. (1992) The Crisis in Antibiotic Resistance. Science 257: 1064-1072
- Ng, W.V., Kennedy, S.P., Mahairas, G.G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H.D., Lasky, S.R., Baliga, N.S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T.A., Welti, R., Goo, Y.A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M.J., Hough, D.W., Maddocks, D.G., Jablonski, P.E., Krebs, M.P., Angevine, C.M., Dale, H., Isenbarger, T.A., Peck, R.F., Pohlschroder, M., Spudich, J.L., Jung, K.W., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C.J., Dennis, P.P., Omer, A.D., Ehardt, H., Lowe, T.M., Liang, P., Riley, M., Hood, L., DasSarma, S. (2000) Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 24: 12176-12181
- Nikaido, H. (1994) Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. Science 264: 382-388
- Ninet, L., Benazet, F., Charpentie, Y., Dubost, M., Florent, J., Lunel, J., Mancy, D., Preud'Homme, J. (1974) Flambamycin, a new antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus* DS 23230. Experientia 30: 1270-1272
- Okanishi, M., Suzuki, K., Umezawa, H. (1974) Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: cultural condition and morphological study. J. Gen. Microbiol. 80: 389-400
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (21): 12215-12220

- Pelzer, S., Reichert, W., Huppert, M., Heckmann, D., Wohlleben, W. (1997) Cloning and analysis of a peptide synthetase gene of the balhimycin producer *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908 and development of a gene disruption/replacement system. *J. Biotechnol.* 56: 115-128
- Quiros, L.M., Fidalgo, S., Mendez, F.J., Hardisson, C., Salas, J.A. (1988) Novel mechanisms of resistance to lincosamides in *Staphylococcus* and *Arthrobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 420-425
- Raty, K., Kunnari, T., Hakala, J., Mantsala, P., Ylihonko, K. (2000) A gene cluster from *Streptomyces galilaeus* involved in glycosylation of aclarubicin. *Mol. Gen. Genet.* 264: 164-172
- 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 8Mb *Streptomyces coelicolor* A3 chromosome. *Mol. Microbiol.* 21: 77-96
- Richardson, M.A., Kuhstoss, S., Solenberg, P., Schaus, N.A., Nagaraja Rao, R. (1987) A new shuttle cosmid vector, pKC505, for streptomycetes: its use in the cloning of three different spiramycin-resistance genes from a *Streptomyces ambofaciens* library. *Gene* 61: 231-241
- Rodriguez, E., McDaniel, R. (2001) Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. *Current Opinion in Microbiology* 4: 526-534.
- Rodriguez, L., Rodriguez, D., Olano, C., Brana, A.F., Mendez, C., Salas, J.A. (2001) Functional Analysis of OleY L-Oleandrosyl 3-O-Methyltransferase of the Oleandomycin Biosynthetic Pathway in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* 183: 5358-5363
- Salah-Bey, K., Doumith, M., Michel, J.-M., Haydock, S., Cortes, J., Leadlay, P.F., Raynal, M.-C. (1998) Targeted gene inactivation for the elucidation of deoxysugar biosynthesis in the erythromycin producer *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* 257: 542-553
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sanders, W.E. (JR.), Sanders, C.C. (1974) Microbiological Characterization of Everninomicins B and D. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6: 232-238
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Sattler, A., Schaffner, C.P. (1970) The Everninomicins. *Biosynthetic Studies. J. Antibiotics* 23: 210-215
- Schenborn, E.T., Mierendorf, R.C. (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res.* 13: 6223
- Schluckebier, G., O'Gara, M., Saenger, W., Cheng, X. (1995) Universal Catalytic Domain Structure of AdoMet-dependent Methyltransferases. *J. Mol. Biol.* 247: 16-20
- Schoepfer, R. (1993) The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* 124: 83-85
- Shafiee, A., Motamedi, H., Chen, T. (1994) Enzymology of FK-506 biosynthesis. Purification and characterization of 31-O-demethyl-FK-506 O-methyltransferase from *Streptomyces* sp. MA6858. *Eur. J. Biochem.* 225: 755-764

- She, Q., Singh, R.K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M.J., Chan-Weiher, C.C., Clausen, I.G., Curtis, B.A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P.M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A.C., Kozera, C.J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H.P., Redder, P., Schenk, M.E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R.A., Ragan, M.A., Sensen, C.W., Van der Oost, J. (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7835-7840
- Shibasaki, T., Mori, H., Chiba, S., Ozaki, A. (1999) Microbial proline 4-hydroxylase screening and gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4028-4031
- 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
- Skeggs, P.A., Thompson, J., Cundliffe, E. (1985) Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis*. *Mol. Gen. Genet.* 200: 415-421
- Smith, H.J., Damman, M., van der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Smits, M.A. (1999) Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect. Immun.* 67: 1750-1756
- Spratt, B.G. (1994) Resistance to Antibiotics Mediated by Target Alterations. *Science* 264: 388-393
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 31: 959-964
- Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219: 37-44
- Summers, R.G., Wendt-Pienkowski, E., Motamedi, H., Hutchinson, C.R. (1992) Nucleotide sequence of the *tcmII-tcmIV* region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* and evidence that the *tcmN* gene encodes a multifunctional cyclase-dehydratase-O-methyl transferase. *J. Bacteriol.* 174 (6):1810-1820
- Summers, R.G., Donadio, S., Staver, M.J., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C.R., Katz, L. (1997) Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiology* 143: 3251-3262
- Tabor, S., Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1074-1078
- Teuber, M., Perreten, V., Wirsching, F. (1996) Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie. *Lebensmittel-Technologie* 29: 182-199
- Teuber, M. (2001) Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 4: 493-499
- Thompson, C.J., Ward, J.M., Hopwood, D.A. (1982) Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. *J. Bacteriol.* 151: 668-677

- Torkkell, S., Kunnari, T., Palmu, K., Hakala, J., Mantsala, P., Ylihonko, K. (2000) Identification of a cyclase gene dictating the C-9 stereochemistry of anthracyclines from *Streptomyces nogalater*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 396-399
- Travis, J. (1994) Reviving the antibiotic miracle? *Science* 264: 360-362
- Trefzer, A. (1997) Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von Avilamycin A. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Trefzer, A., Salas, J.A., Bechthold, A. (1999) Genes and enzymes involved in deoxysugar biosynthesis in bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 16: 283-299.
- Trefzer, A., Hoffmeister, D., Künzel, E., Stockert, S., Weitnauer, G., Westrich, L., Rix, U., Fuchser, J., Bindseil, K.U., Rohr, J., Bechthold, A. (2000) Function of glycosyltransferase genes involved in urdamycin A biosynthesis. *Chem. Biol.* 7: 133-142
- Tsujibo, H., Miyamoto, K., Tanaka, K., Kawai, M., Tainaka, K., Imada, C., Okami, Y., Inamori, Y. (1993) Cloning and sequence of an alkaline serine protease-encoding gene from the marine bacterium *Alteromonas* sp. strain O-7. *Gene* 22: 247-251
- Tuynman, A., Spelberg, J.L., Kooter, I.M., Schoemaker, H.E., Wever, R. (2000) Enantioselective Epoxidation and Carbon-Carbon Bond Cleavage Catalyzed by *Coprinus cinereus* Peroxidase and Myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 275: 3025-3030
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* 176: 386-390
- Wayne, P. (1997) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically. In: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 4th edn.
- Weber, J.M., Leung, J.O., Swanson, S.J., Idler, K.B., McAlpine, J.B. (1991) An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*. *Science* 252: 114-117
- Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Bager, F. (1999) Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 329-335
- Weinstein, M.J., Wagman, G.H., Oden, E.M., Luedemann, G.M., Sloane, P., Murawski, A., Marquez, J. (1965) Purification and biological studies of everninomicin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 821-827
- Weitnauer, G., Gaisser, S., Trefzer, A., Stockert, S., Westrich, L., Quiros, L.M., Mendez, C., Salas, J.A., Bechthold, A. (2001) An ATP-Binding Cassette Transporter and two rRNA methyltransferases are involved in resistance to avilamycin in the producer organism *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 690-695
- Weitnauer, G., Mühlenweg, A., Trefzer, A., Hoffmeister, D., Süßmuth, R.D., Jung, G., Welzel, K., Vente, A., Girreser, U., Bechthold, A. (2001) Biosynthesis of the orthosomycin antibiotic avilamycin A: deductions from the molecular analysis of the *avi* biosynthetic gene cluster of *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 and production of new antibiotics. *Chem. Biol.* 8: 569-581
- Weitnauer, G., Gaisser, S., Kellenberger, L., Leadlay, P.F., Bechthold, A. (2002) Analysis of a C-methyltransferase gene (*aviG1*) involved in avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 and complementation of a *Saccharopolyspora erythraea eryBIII* mutant by *aviG1*. *Microbiology* 148: 373-379

- Weitzmann, C.J., Cunningham, P.R., Ofengand, J. (1990) Cloning, *in vitro* transcription, and biological activity of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 18: 3515-3520
- Westrich, L., Domann, S., Faust, B., Bedford, D., Hopwood, D.A., Bechthold, A. (1998) 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., Fraser, C.M. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 19: 1571-1577
- Witte, W., Klare, I. (1995) Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* outside Hospitals: a commentary. *Microb. Drug Res.* 1: 259-263
- Witte, W. (1998) Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture. *Science* 279: 996-997
- Wohlert, S.-E., Lomovskaya, N., Kulowski, K., Fonstein, L., Occi, J.L., Gewain, K.M., MacNeil, D.J., Hutchinson, C.R. (2001) Insights about the biosynthesis of the avermectin deoxysugar L-oleandrose through heterologous expression of *Streptomyces avermitilis* deoxysugar genes in *Streptomyces lividans*. *Chem. Biol.* 8: 681-700
- Wolf, H. (1973) Avilamycin, an inhibitor of the 30S ribosomal subunit function. *FEBS Lett.* 36: 181-186
- Wright, B., Bibb, M.J. (1992) Codon usage in the G+C rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113: 55-65
- Wright, D.E. (1979) The orthosomycins, a new family of antibiotics. *Tetrahedron* 35: 1207-1237
- Ylihonko, K., Tuikkanen, J., Jussila, S., Cong, L., Mantsala, P. (1996) A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway. *Mol. Gen. Genet.* 251: 113-120
- Zähner, H., Fiedler, H.P. (1995) The need for new antibiotics: possible ways forward. In: Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends, pp. 67-84, Hunter, P.A., Darby, G.K., Russell, N.J. (Ed.). Society for General Microbiology, Cambridge
- Zhang, Y.-X., Denoya, C.D., Skinner, D.D., Fedechko, R.W., McArthur, H.A.I., Morgenstern, M.R., Davies, R.A., Lobo, S., Reynolds, K.A., Hutchinson, C.R. (1999) Genes encoding acyl-CoA dehydrogenase (AcdH) homologues from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* provide insights into the metabolism of small branched-chain fatty acids and macrolide antibiotic production. *Microbiology* 145: 2323-2334
- Zhou, C.C., Swaney, S.M., Shinabarger, D.L., Stockman, B.J. (2002) <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Study of Oxazolidinone Binding to Bacterial Ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 625-629



## 7 Anhang

### Häufig verwendete Abkürzungen:

A.	<i>Archaeoglobus</i>
A <sub>260</sub> /A <sub>600</sub>	Absorption bei 260nm / Absorption bei 600nm
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
AdoMet	S-Adenosyl-L-methionin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>avi</i>	Gen des Avilamycin-Biosyntheseegenclusters
B.	<i>Bacillus</i>
<i>bla</i>	β-Lactamasegen
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
Ci	Curie
CoA	Coenzym A
cpm	Impuls pro Minute
d	Tag(e)
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektion
DC	Dünnschichtchromatographie
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGDP	Desoxyguanosindiphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNDP	Desoxynukleosiddiphosphat
ds	double stranded
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

---

EI	electron impact
<i>ermE</i>	Erythromycin-Resistenzgen aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i>
ESI	electron spray impact
EtBr	Ethidiumbromid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
His	Histidin
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
M	molar
MBK	Minimale Bakterizide Konzentration
mcs	multiple cloning site
mg	Milligramm
MIC (MHK)	Minimal Inhibition Concentration (Minimale Hemmkonzentration)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
$M_r$	relative Molmasse
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
ori	origin of replication
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
p.a.	pro analysis
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PKS	Polyketidsynthase



---

RBS	Ribosomen-Bindungsstelle
Rf	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	reversed phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S.	<i>Streptomyces</i>
s.	siehe
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ss	single stranded
<i>Staph.</i>	<i>Staphylococcus</i>
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit(s)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	volume (Volumen)
vgl.	vergleiche
w	weight (Masse)
wt	Wildtyp



# Danksagung

Herzlichen Dank all denjenigen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Bechthold danke ich für die Überlassung des Themas, für die hilf- und ideenreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und die zahlreichen konstruktiven und interessanten Diskussionen. Darüber hinaus möchte ich mich für die häufige Befürwortung von Kongressbesuchen und die Möglichkeit, Teile der Arbeit auf Tagungen zu präsentieren, bedanken.

Frau Prof. Dr. G. Drews danke ich für die Übernahme der externen Betreuung und die Übernahme des Koreferats.

Ich bedanke mich bei allen meinen Labor- und Arbeitskollegen in Tübingen, Kiel und Freiburg für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse auch außerhalb des Instituts. Insbesondere danke ich Agnes, Axel, Dirk, Lucy, Marion und Sigrid für die hervorragende Einarbeitung in viele Methoden und die zahlreichen wertvollen Tipps.

Herzlichen Dank auch Herrn Dr. Stefan Pelzer für die vielen anregenden Diskussionen und hilfreichen Tipps.

Herrn Prof. Dr. J. Salas von der Universidad de Oviedo danke ich für die Möglichkeit, Arbeiten zur Avilamycinresistenz in seinen Labors in Spanien durchführen zu können. Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Luis Quiros für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die vielen interessanten Gespräche auch über den Laboralltag hinaus. Bei Alfonso, Ana, David, Felipe, Fran, Isa, Leticia, Nerea und Oscar möchte ich mich für die mir spontan entgegengebrachte Gastfreundschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. P. Heisig (Pharmazeutische Biologie, Universität Hamburg) danke ich für die Hilfe bei der Bestimmung der MIC-Werte von Gavibamycin A3.

Herrn Prof. Dr. S. Glaser und Gerd Hauser (TU München), Herrn Dr. R. Süßmuth (Universität Tübingen) und Herrn Dr. U. Girreser (Universität Kiel) danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Strukturaufklärung der Gavibamycine.

Herrn Dr. R. Zettl und Herrn Dr. A. Vente von der Combinature Biopharm AG (Berlin) danke ich für die breite Unterstützung des Avilamycinprojekts und dafür, dass ich in Berlin HPLC-Analysen der Gavibamycine vornehmen konnte. Herrn Dr. Armin Schütz danke ich dabei für die gute Einarbeitung in das Gerät.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern, die mich auch über diese Arbeit hinaus in allen Bereichen immer unterstützt haben.

**Ich danke meinen akademischen Lehrern:**

Prof. Dr. H.P.T. Ammon, Prof. Dr. A. Bechthold, Prof. Dr. med. K. Botzenhart,  
Prof. Dr. G. Drews, Prof. Dr. G. Gauglitz, PD Dr. phil. habil. P. Grabmayr,  
Prof. Dr. L. Heide, Prof. Dr. K.-A. Kovar, PD Dr. H. Pommer, Prof. Dr. E. Reinhard,  
Prof. Dr. H. J. Roth, Prof. Dr. P.C. Schmidt, Prof. Dr. J.E. Schultz, PD Dr. M. Wahl und  
Prof. Dr. A. Wankmüller

## Lebenslauf

---

Name: Gabriele Charlotte Elisabeth Weitnauer  
Geburtsdatum: 06. Oktober 1972  
Geburtsort: Ludwigsburg  
Familienstand: ledig

### Bildungsgang

1979 – 1983                    Grundschule Metzingen  
1983 – 1992                    Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Metzingen  
Okt. 1992 – Okt. 1996        Pharmaziestudium an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen;  
Famulatur in der Stadtapotheke (Inh. G. Kleinknecht) in  
Metzingen; Praktikum in der Krankenhausapotheke des  
Franziskushospitals Harderberg/Osnabrück  
März 1995                      Erster Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung  
08.10.1996                      Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung  
Nov. 1996 – April 1997        Praktikum in der Stadtapotheke in Metzingen  
Mai 1997 – Nov. 1997        Praktikum bei der Röhm GmbH, Darmstadt  
10.12.1997                      Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung  
30.01.1998                      Erteilung der Approbation als Apothekerin  
Jan.1998 – März 2000        Beginn der Anfertigung der vorliegenden Dissertation am  
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Eberhard-Karls-  
Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. A. Becht-  
hold  
April 2000 – März 2001        Fortführung der Dissertation am Lehrstuhl für Pharma-  
zeutische Biologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel  
(unter Anleitung von Prof. Dr. A. Bechthold)  
April 2001 – Juni 2002        Fortführung und Beendigung der Dissertation am Institut  
Pharmazeutische Biologie der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg (unter Anleitung von Prof. Dr. A. Bechthold)

---