

Spectinomycin und Netropsin

Biosynthese und Resistenz in den Produzentenstämmen der Gattung *Streptomyces*

von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Tina V. M. Stumpp

aus Stuttgart

Hauptberichter:	Prof. Dr. Ralf Mattes
Mitberichter:	Prof. Dr. Christoph Sydatk
Tag der mündlichen Prüfung:	15. Mai 2003

Institut für Industrielle Genetik

Universität Stuttgart

2003

Wenn Du keinen Baum erschaffen kannst, lege einen Samen.
(Lord Byron)

Diese Arbeit wurde von mir selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Mittel und
Literatur durchgeführt und angefertigt.

Vielen Dank!

.....allen, die in irgendeiner Weise zum Entstehen und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben und ohne deren Mithilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

.....Prof. Dr. R. Mattes für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes und für die Korrektur der Arbeit.

.....Prof. Dr. C. Syldatk für die Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu erstellen.

.....Dr. Joe Altenbuchner für die andauernde hervorragende, engagierte und intensive wissenschaftliche Betreuung und Korrektur aller Arbeiten. Seine zahlreichen Ratschläge und wertvollen Anregungen sowie sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit haben maßgeblich zu ihrem Erfolg beigetragen.

.....meinen Kolleginnen und Kollegen aus Labor 1, auch allen Ehemaligen, für die gute Zusammenarbeit, die praktische Hilfe im Labor und das jederzeit gute Betriebsklima. Mit ihrer Aufmunterung und den alltäglichen Gesprächen fachlicher und nicht-fachlicher Art ging vieles leichter.

.....allen Mitarbeitern des IIG für die Einweisung in unterschiedliche Arbeitstechniken, viele wertvolle Tipps und die Unterstützung, gerade bei Computerproblemen und chemischen Fragestellungen. Ihre stets vorhandene Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre werden mir in guter Erinnerung bleiben.

.....Iris Haug für unvergessliche Zeiten während des Studiums und als Laborpartnerin. Wir haben zusammen geweint, aber auch Tränen gelacht. Ohne sie und ihr gutes Zureden hätte ich aufgegeben.

.....Fabian, der immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte.

.....meinen Eltern, dass sie mir durch ihren finanziellen Beistand mein Studium ermöglicht haben. Sie haben mich immer unterstützt und gefördert, vor allem haben sie unentwegt an mich geglaubt, auch wenn ich dies schon längst selbst nicht mehr konnte.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	10
1	Zusammenfassungen	13
1.1	Summary	13
1.2	Zusammenfassung	15
2	Einleitung	17
2.1	Streptomyceten als Antibiotika-Produzenten	17
2.2	Regulation der Antibiotika-Produktion in Streptomyceten	18
2.3	Isolierung von Antibiotika-Biosyntheseegenen und Modifikation von Antibiotika	22
2.4	Spectinomycin	27
2.4.1	Eigenschaften von Spectinomycin	27
2.4.2	Resistenz gegenüber Spectinomycin	29
2.4.3	Biosynthese von Spectinomycin	30
2.5	Netropsin	31
2.5.1	Eigenschaften von Netropsin	31
2.5.2	Biologische Wirkung von Netropsin	33
2.6	Zielsetzung	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	35
3.2	Chemikalien und Enzyme	41
3.3	Medien, Puffer und Lösungen	42
3.3.1	Medien	42
3.3.2	Puffer	46
3.3.3	Lösungen	48
3.4	Stammhaltung und Bakterienanzucht	50
3.4.1	Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	50
3.4.2	Dauerkulturen von <i>Streptomyces</i>	50
3.4.3	Anzuchtbedingungen	51
3.5	Proteinanalytische Methoden	51

3.5.1	Herstellung eines Zellextrakts	51
3.5.2	Proteinbestimmung	52
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
3.5.4	Aceton-Fällung von Proteinen	53
3.5.5	Proteinreinigung über Affinitätschromatographie	53
3.5.6	Dehydrogenase-Aktivitätstest	53
3.5.7	Aktivitätstest der Spectinomycin-Phosphotransferase	54
3.5.7.1	Gekoppelter Assay	54
3.5.7.2	Radioaktiver Assay	55
3.6	Molekulargenetische Methoden	55
3.6.1	DNA-Isolierung	55
3.6.1.1	Isolierung von genomischer DNA über CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation	55
3.6.1.2	Plasmidisolierung nach Lee & Rasheed	56
3.6.1.3	Plasmidisolierung aus Streptomyceten	56
3.6.1.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> nach Kieser	57
3.6.1.5	Plasmidisolierung mit dem Qiaprep Spin Miniprep-Kit	57
3.6.1.6	Midi-Präparation von Plasmiden mit dem Qiagen Plasmid Midi-Kit	57
3.6.2	Enzymatische Behandlung von DNA	58
3.6.2.1	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	58
3.6.2.2	Fällung von DNA	58
3.6.2.3	Behandlung mit der Klenow-Polymerase	58
3.6.2.4	Behandlung mit alkalischer Phosphatase	58
3.6.2.5	Ligation	59
3.6.2.6	Bereitstellung von DNA-Längenstandard für Agarose-Gelelektrophorese	59
3.6.3	Transformation von <i>E. coli</i> und <i>Streptomyces</i>	59
3.6.3.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	59
3.6.3.2	Herstellung von <i>Streptomyces</i> -Protoplasten	59
3.6.3.3	Transformation von <i>E. coli</i>	60
3.6.3.4	Transformation von <i>Streptomyces</i> -Protoplasten mit Plasmid-DNA	60
3.6.4	Transposon-Mutagenese und Konjugation	61
3.6.5	DNA-Gelelektrophorese	61
3.6.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	61

3.6.5.2	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	61
3.6.6	Polymerase-Kettenreaktion	62
3.6.6.1	Reinigung von PCR-Fragmenten	63
3.6.7	LightCycler-PCR	63
3.6.8	Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	63
3.6.8.1	Southern Blot	63
3.6.8.2	Kolonie-Hybridisierung	64
3.6.9	Markierung von DNA-Sonden	64
3.6.9.1	Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden	64
3.6.9.2	Markierung von DNA mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP	65
3.6.9.3	Reinigung über Sephadex-Säulen	65
3.6.10	Hybridisierung	66
3.6.10.1	Hybridisierung mit einer nicht-radioaktiven Sonde	66
3.6.10.2	Nachweis von DIG-markierter DNA	66
3.6.10.3	Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde	67
3.6.11	Sequenzierung von Doppelstrang-DNA	67
3.6.12	Konstruktion einer Genbank von <i>Streptomyces flavopersicus</i> NRRL B-2820	69
3.6.12.1	Klonierung genomischer DNA in Cosmid-Vektoren	69
3.6.12.2	Präparation von λ <i>in vitro</i> Verpackungsextrakten	69
3.6.12.3	<i>In vitro</i> Verpackung	70
3.6.12.4	Infektion von <i>E. coli</i> mit dem Phagenlysat	70
3.7	Aufreinigung und Nachweismethoden von Spectinomycin	70
3.7.1	Aufreinigung von Spectinomycin	70
3.7.2	Antibiotika-Produktion und Agarplatten-Diffusionsassay	71
3.7.3	Dünnschichtchromatographie	72
3.7.4	HPLC-Analytik	72
4	Ergebnisse	74
4.1	Vergleich der unter <i>Streptomyces flavopersicus</i>, <i>Streptomyces netropsis</i> und <i>Streptoverticillium baldacii</i> geführten Actinomyceten-Stämme	74
4.1.1	Taxonomie der Spectinomycin- und Netropsin-Produzenten	74

4.1.2	Wachstum und Morphologie der Spectinomycin- und Netropsin-Produzenten	74
4.1.3	Präsenz eines DNA-Restriktions-/Modifikationssystems in <i>S. flavopersicus</i>	75
4.1.4	Restriktionsmuster-Analyse der chromosomalen DNA aus den Spectinomycin- und Netropsin-Produzenten	76
4.1.5	Nachweis des Spectinomycin-Genclusters in verschiedenen Streptomyceten-Stämmen	77
4.2	Konstruktion einer Cosmid-Genbank von <i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820	78
4.2.1	Konstruktion zweier neuer Cosmid-Vektoren	78
4.2.2	Herstellung einer Genbank von <i>S. flavopersicus</i> NRRL2820	80
4.2.3	Untersuchung und Screening der Genbank von <i>S. flavopersicus</i>	81
4.2.4	Grobkartierung und Sequenzierung des Genbankplasmids pTST63	81
4.3	Analyse der Gesamtsequenz des Spectinomycin-Biosynthese-Gencluster	83
4.4	Datenbank-Recherche mit den Gensequenzen des Spc-Clusters	87
4.5	Nachweis der Produktion von Spectinomycin	94
4.5.1	Optimierung der Kulturbedingungen	94
4.5.2	Aufreinigung von Spectinomycin	97
4.5.3	Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Spectinomycin	99
4.5.4	HPLC-Analyse von Spectinomycin	100
4.5.5	Integration des Genbankplasmids pTST63 in das Genom von <i>S. lividans</i> TK64	101
4.5.6	Expression des Spc-Genclusters in <i>S. lividans</i> TK64 und Test auf Spectinomycin-Produktion	103
4.6	Heterologe Expression einiger <i>spc</i>-Gene	103
4.6.1	Untersuchung der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN aus <i>S. spectabilis</i> NRRL2494	103
4.6.1.1	Expression des Spectinomycin-Phosphotransferasegens <i>spcN</i>	103
4.6.1.2	Aufreinigung der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN	105
4.6.1.3	Substratspezifität der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN	106
4.6.1.4	Aktivitätsmessungen der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN	108

4.6.2	Analyse der beiden im Spc-Gencluster codierten Dehydrogenasen SpcB und SpcH	114
4.6.2.1	Klonierung und Expression der Dehydrogenasegene <i>spcB</i> und <i>spcH</i> in <i>E. coli</i>	115
4.6.2.2	Klonierung und Expression des Dehydrogenasegens <i>spcB</i> in <i>Streptomyces</i>	117
4.6.2.3	Aktivitätsbestimmung der Dehydrogenasen SpcB und SpcH	119
4.7	Modifikation des Streptomycin-Biosynthese-Clusters von <i>S. griseus</i> N2-3-11	122
4.7.1	Konstruktion eines Plasmids für den Genaustausch von <i>strB1</i> durch <i>spcG</i>	123
4.7.2	Identifikation von rekombinanten <i>S. griseus</i> -Klonen, bei denen <i>strB1</i> durch <i>spcG</i> ersetzt wurde	125
4.7.3	Untersuchung der rekombinanten <i>S. griseus</i> BG-Klone auf Antibiotika-Produktion	127
4.8	Versuche zur Inaktivierung einiger Spc-Biosynthesegene	127
4.8.1	Darstellung der zur Geninaktivierung eingesetzten Strategien und Plasmid-Derivate	128
4.8.2	Transformation von <i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820 mit den Geninaktivierungsplasmiden	134
4.8.3	Untersuchung der Inaktivierungsmutanten von <i>S. flavopersicus</i>	136
4.9	Netropsin-Resistenz und -Biosynthese in verschiedenen Streptomyceten	139
4.9.1	Suche nach Peptid-Synthetasegenen im Genom von <i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820 und <i>S. netropsis</i> DSM40259	140
4.9.2	Screening einer Genbank von <i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820 nach Peptid-Synthetasegenen	142
4.9.3	Suche nach den Netropsin-Resistenzgenen im Genom von <i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820	143
4.9.3.1	Isolierung von Netropsin-resistenten <i>S. lividans</i> TK23-Transformanten	143
4.9.3.2	Analyse des Fragments mit den Netropsin-Resistenzgenen aus <i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820	144
4.9.3.3	Datenbank-Recherche mit den Sequenzen der Netropsin-Resistenzgene <i>netP1</i> und <i>netP2</i>	146

4.9.3.4	Untersuchungen zum Zusammenwirken der beiden Netropsin-Resistenz-Transporter NetP1 und NetP2	147
5	Diskussion	153
5.1	Vergleich der Spectinomycin-Biosynthese-Gencluster aus <i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820, <i>S. spectabilis</i> NRRL2494 und <i>S. spectabilis</i> NRRL2792	153
5.2	Hypothetischer Biosyntheseweg von Spectinomycin	157
5.2.1	Hypothetischer Biosyntheseweg von Actinamin	158
5.2.2	Hypothetischer Biosyntheseweg des Actinospectose-Vorläufers	161
5.2.3	Zusammenbau von Spectinomycin aus seinen Untereinheiten	163
5.3	Export von Spectinomycin	164
5.4	Regulation des Spectinomycin-Biosynthese-Genclusters	167
5.5	Spectinomycin-Resistenz	169
5.6	Inaktivierung und Modifikation von Antibiotika-Biosynthese-Clustern	173
5.7	Netropsin-Resistenz	176
5.8	Netropsin-Biosynthese	178
5.9	Ausblick	179
6	Literaturverzeichnis	181
7	Anhang	194
7.1	Restriktionskarten einiger Vektoren	194
8	Lebenslauf	195

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ap ^R	Ampicillin-Resistenz
Apr ^R	Apramycin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
ca.	circa
ccc	covalently closed circles (doppelsträngige, ringförmig geschlossene DNA-Moleküle)
chrom.	chromosomal
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
DC	Dünnschichtchromatographie
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5`-triphosphat
DSpc	Dihydrospectinomycin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N` ,N` -tetraacetat
EtOH	Ethanol
h	Stunde
HPLC	„High Pressure Liquid Chromatography“
HTH-Motiv	Helix-Turn-Helix-Motiv
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	„Inverted Repeat“
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaar(e)

(k)Da	(Kilo)Dalton
LMW	„Low Molecular Weight“
M	Molar (mol/l)
min	Minute
MOPS	γ -Morpholino-Propansulfonsäure
NAD(P) ⁺	Nikotinamid-Adenindinukleotid(phosphat), oxidiert
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenindinukleotid(phosphat), reduziert
NaP	Natriumphosphat
<i>net</i> / Net	Netropsin
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
ORF	offener Leserahmen
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pfu	„plaques forming unit“
PLP	Pyridoxalphosphat
ppGpp	Guanosintetraphosphat
RE	Restriktionsendonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RP	„Reverse Primer“
rpm	„rotations per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
<i>S. species</i>	<i>Streptomyces species</i>
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sm. species</i>	<i>Streptoverticillium species</i>
<i>spc</i> / Spc	Spectinomycin-
Spc ^R	Spectinomycin-Resistenz
ss-DNA	Einzelstrang-DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA

TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts ^R	Thiostrepton-Resistenz
TSS	„Transformation and Storage Solution“
U	Unit (internationale Enzymeinheit)
UP	„Universal Primer“
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Zusammenfassungen

1.1 Summary

Several streptomycetes are known as producers of the antibiotics spectinomycin and netropsin. The pheno- and genotypical properties of some of the strains were determined and compared. No significant difference was detected between *Streptomyces flavopersicus* NRRL B-2820, *Streptoverticillium baldaccii* ATCC19756 and *Streptomyces netropsis* DSM40093. Therefore most investigations were carried out with *S. flavopersicus* NRRL B-2820.

Different media compositions and culture conditions for the production of the aminoglycoside antibiotic spectinomycin were tested until the antibiotic could be concentrated from a culture broth of *S. flavopersicus* NRRL B-2820 in sufficient amounts and purified after modification of published methods. The production of spectinomycin was proven by bio-assays, thin-layer chromatography and HPLC analysis.

The synthesis of a second antibiotic, that has not been found in *S. flavopersicus* before, interfered with the detection of spectinomycin. Due to the properties of the active agent and the close relationship of *S. flavopersicus* NRRL B-2820 and *S. netropsis* DSM40259, a producer of the peptide antibiotic netropsin, it was assumed that this substance is identical to netropsin.

The biosynthesis gene cluster for spectinomycin was cloned using a cosmid gene library from *S. flavopersicus* NRRL B-2820. One cosmid containing the assumedly whole biosynthesis cluster was identified, sequenced and analysed. In this region 21 complete and 2 incomplete ORFs were identified. The functions of the putative proteins were deduced from database comparisons and the proteins were classified into protein families. Putative functions in spectinomycin biosynthesis could be assigned for 16 proteins (SpcRNTABCDXEYFGHIJK). In particular, there was a transcriptional regulatory protein, a spectinomycin resistance protein, a transport protein, a monophosphatase, two dehydrogenases, two aminotransferases/dehydratases, an epimerase, a keto-isomerase, a 4,6-dehydratase, a glycosyltransferase, a methyltransferase, a thymidyltransferase, a sugar binding protein and a protein which showed similarity to molybdenum-cofactor-biosynthesis proteins. The cluster was compared to the spectinomycin biosynthesis genes from *S. spectabilis* NRRL2494 and *S. spectabilis* NRRL2792. A putative pathway for the biosynthesis of spectinomycin was postulated in consideration of all available data.

The spectinomycin phosphotransferase SpcN was identified as spectinomycin resistance enzyme in *S. flavopersicus* NRRL B-2820 and in *S. spectabilis* NRRL2494. The *spcN* gene of *S. spectabilis* NRRL2494 was expressed in *Escherichia coli* and the protein was purified by immobilised metal affinity chromatography. Different assays were carried out with the purified protein. It was demonstrated that SpcN phosphorylates spectinomycin and dihydro-spectinomycin, an intermediate of the biosynthesis pathway, in an ATP-dependent reaction. The enzyme exhibited a stringent substrate specificity, i.e., it showed no activity against other tested aminoglycoside antibiotics and there was no competitive inhibition by other antibiotics. The K_M -value of the spectinomycin phosphotransferase for spectinomycin was approximately 20 μM .

There are two putative oxidoreductase-encoding genes in the spectinomycin gene cluster, *spcB* and *spcH*, but in the postulated biosynthesis pathway more dehydrogenase reactions are needed. An exact assignment of the enzymes to the catalysed reactions was not possible. The proteins SpcB and SpcH were expressed in *E. coli*. In assays using four of the possible substrates (*myo*-inositol, *scyllo*-inosose, spectinomycin and dihydrospectinomycin) and the coenzymes NAD(P)^+ and NAD(P)H no activity of either SpcB or SpcH was found.

Inactivation of several biosynthesis genes using different methods showed no success. The reasons were the very low transformation efficiency of *S. flavopersicus* and that no spores with single chromosomes were obtained. Experiments regarding the combinatorial biosynthesis, i.e., the replacement of the methyltransferase gene *spcG* in *S. flavopersicus* through the amidinotransferase gene *strB1* from *S. griseus* N2-3-11, could therefore not be realised. However the reciprocal replacement of the gene *strB1* in *S. griseus* by *spcG* resulted in mutants that did not show antibiotic activity.

The search for the netropsin resistance determinant from *S. flavopersicus* NRRL B-2820 revealed two genes *netP1* and *netP2*. The deduced proteins displayed homology to ABC-transporters and shared some characteristic motifs, i.e., the transmembrane and ATP-binding domains with these proteins. When one of the two genes was mutated, the mutants still exhibited weak netropsin resistance in different assays. It is speculated, that the transport proteins NetP1 and NetP2 usually act as heterodimers, but can possibly also form homodimers. The detected genome fragment will serve as a probe to identify the netropsin biosynthesis gene cluster in a genomic library.

1.2 Zusammenfassung

Die beiden Antibiotika Spectinomycin und Netropsin werden von verschiedenen Streptomyceten synthetisiert. Einige der Produzentenstämme wurden hinsichtlich ihrer phäno- und genotypischen Eigenschaften näher charakterisiert und verglichen. Dabei konnten zwischen den Stämmen *Streptomyces flavopersicus* NRRL B-2820, *Streptoverticillium baldaccii* ATCC19756 und *Streptomyces netropsis* DSM40093 keine Unterschiede festgestellt werden. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde hauptsächlich der Stamm *S. flavopersicus* NRRL B-2820 herangezogen.

Nach einer Optimierung der Kulturbedingungen wurde das Aminoglykosid-Antibiotikum Spectinomycin von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 in hinreichender Menge gebildet. Durch Modifikation bekannter Methoden konnte der Wirkstoff aus den Kulturüberständen des Stammes aufgereinigt und anhand von Agarplatten-Diffusionsassays, Dünnschichtchromatographie und HPLC-Analytik nachgewiesen werden.

Ein Problem im Nachweis der Spectinomycin-Produktion stellte die Synthese eines zweiten Antibiotikums dar, das vorher nicht in *S. flavopersicus* gefunden worden war. Aufgrund der Eigenschaften dieses Wirkstoffs und der Ähnlichkeit von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 mit *S. netropsis* DSM40259, einem Netropsin-Produzenten, wurde vermutet, dass es sich dabei um das Peptid-Antibiotikum Netropsin handelt.

Ein bereits bekannter und sequenzierter Teil des Spectinomycin-Biosynthese-Genclusters von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 diente als Ausgangspunkt, um in einer Genbank nach weiteren Synthesegenen zu suchen. Ein Cosmid mit dem vermeintlich gesamten Biosynthese-Cluster bestehend aus 16 offenen Leserahmen (*spcRNTABCDXEYFGHIJK*) wurde identifiziert. Über Homologie-Vergleiche und der Suche nach konservierten Regionen konnten den daraus abgeleiteten Proteinen mögliche Funktionen zugeteilt und sie Protein-Familien zugeordnet werden. Danach gibt es einen Transkriptionsregulator, ein Protein für Spectinomycin-Resistenz, ein Transportprotein, eine Monophosphatase, zwei Dehydrogenasen, zwei Amino-transferasen/Dehydratasen, eine Epimerase, eine Keto-Isomerase, eine 4,6-Dehydratase, eine Glykosyltransferase, eine Methyltransferase, eine Thymidyltransferase, ein Zuckerbindeprotein und ein Protein mit Ähnlichkeit zu einem Molybdän-Cofaktor-Biosyntheseprotein. Das Synthese-Cluster wurde mit den bereits bekannten Spectinomycin-Biosynthesegenen aus *S. spectabilis* NRRL2494 und *S. spectabilis* NRRL2792 verglichen. Anhand aller verfügbaren Daten konnte ein möglicher Biosyntheseweg für Spectinomycin postuliert werden.

Das für die Spectinomycin-Resistenz verantwortliche Enzym in *S. flavopersicus* NRRL B-2820 und *S. spectabilis* NRRL2494 ist eine Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN. Das Protein aus *S. spectabilis* wurde in *Escherichia coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mit Hilfe verschiedener Aktivitätstests wurde festgestellt, dass das Enzym mit ATP als Cosubstrat spezifisch Spectinomycin und Dihydrospectinomycin phosphoryliert. Eine Inaktivierung anderer Aminoglykosid-Antibiotika ebenso wie eine kompetitive Inhibition des Enzyms durch diese Substanzen konnte nicht nachgewiesen werden. Der K_M -Wert der Spectinomycin-Phosphotransferase für Spectinomycin betrug etwa 20 μ M.

Die Gene für die beiden Dehydrogenasen, SpcB und SpcH, aus dem Spectinomycin-Gencluster von *S. flavopersicus* konnten in *E. coli* nur in geringer Menge exprimiert werden. Im postulierten Biosyntheseweg von Spectinomycin könnten sie mehrere denkbare Oxidations-/Reduktionsreaktionen katalysieren. Mit einigen der möglichen Substrate, *myo*-Inositol, *scyllo*-Inosose, Spectinomycin und Dihydrospectinomycin, konnte in *in vitro* mit NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H als Coenzym jedoch keine Aktivität festgestellt werden.

Die Inaktivierung einiger Biosynthesegene über verschiedene Methoden zeigte keinen Erfolg. Dies lag zum einen daran, dass für *S. flavopersicus* kein zufriedenstellendes Transformationsprotokoll erstellt werden konnte, und zum anderen daran, dass durch das Fehlen von Sporen die Mutanten inhomogen waren, und in einem Myzel Wildtyp- und mutierte Sequenz parallel vorkamen. Daher konnten die Ansätze zur kombinatorischen Biosynthese, d.h. der Austausch des Methyltransferasegens *spcG* in *S. flavopersicus* gegen das Amidinotransferasegen *strB1* aus *S. griseus*, nicht verwirklicht werden. Dagegen führte der umgekehrte Austausch von *strB1* gegen *spcG* in *S. griseus* zu Mutanten, die keine antibiotische Aktivität mehr aufwiesen. Des Weiteren wurden die Netropsin-Resistenzgene *netP1* und *netP2* aus *S. flavopersicus* NRRL B-2820 isoliert. Die daraus abgeleiteten Proteine zeigten Homologie zu ABC-Transportern und wiesen charakteristische Motive dieser Proteine auf, insbesondere eine Transmembran- und eine ATP-Bindedomäne. Verschiedene Mutanten in *netP1* und *netP2* wurden in unterschiedlichen Tests auf ihre Netropsin-Resistenz untersucht. Aufgrund der Ergebnisse wird postuliert, dass NetP1 und NetP2 als Heterodimer wirken, aber zu einem sehr geringen Teil auch als Homodimer aktiv sind.

2 Einleitung

2.1 Streptomyceten als Antibiotika-Produzenten

Streptomyceten sind gram-positive, aerobe Bakterien, die zur Gruppe der Actinomyceten gehören. Sie kommen zahlreich und ubiquitär im Boden vor. Nur sehr wenige Stämme sind human- und tierpathogen, einige können Krankheiten bei Pflanzen auslösen.

Bakterien der Gattung *Streptomyces* zeichnen sich durch einen recht ungewöhnlichen Lebenszyklus aus. In ihrer natürlichen Bodenumgebung liegen sie größtenteils als inaktive Sporen vor. Diese Sporen halten Austrocknung aus, sind aber nicht hitzeresistent. Durch äußere Signale keimen die Sporen zu Zellen aus, die ein Substratmyzel bilden. Ausgelöst durch physiologischen Stress, wie Nahrungsmangel, aber auch durch chemische Signalstoffe entsteht ein Luftmyzel (s. 2.2), von dessen Lufthyphen sich wiederum Sporenketten abschnüren. Während der Differenzierung werden charakteristische Pigmente gebildet. Anhand der Lufthyphen, der Kolonieform, -farbe und -größe, aber auch an ihrem Geruch können Streptomyceten-Stämme grob unterschieden werden.

Viele Streptomyceten produzieren hydrolytische Exoenzyme wie Proteasen, Lipasen, Cellulasen, Amylasen, Xylanasen u.a., mit denen sie in ihrer natürlichen Umgebung schwer zersetzliche Naturstoffe abbauen. Sie leisten damit einen Beitrag zur Biodegeneration von Polymeren. Einige der Stämme und Enzyme werden industriell genutzt (McCarthy & Williams, 1992). So werden z.B. Xylanasen in der Papierindustrie zum Bleichen von Zellstoff eingesetzt.

Außerdem zählen Streptomyceten zu den wichtigen Produzenten von Naturstoffen, darunter Pestizide, Herbizide, Immunsuppressoren und Antibiotika, die in der Agrarwirtschaft sowie in der Human- und Veterinärmedizin zum Einsatz kommen. Von den etwa 12.000 bekannten, von Mikroorganismen gebildeten Antibiotika werden 67 % von Actinomyceten produziert, wovon wiederum 80 % aus der Gruppe der Streptomyceten stammen (Kieser et al., 2000). Im Gegensatz zu der Pilzfamilie der Aspergillales, die ebenfalls einen Großteil der bekannten antibiotisch wirksamen Substanzen produziert, ist die chemische Mannigfaltigkeit der Verbindungen bei den Streptomyceten um einiges größer. So konnten aus Streptomyceten-Kulturen unter anderem Aminoglykoside, Makrolide, Polyketide und Peptid-Antibiotika isoliert werden. Bisher wurden über 2.000 Antibiotika näher charakterisiert, von denen jedoch nur etwa 50 therapeutisch angewandt werden.

In Streptomyceten liegen die Gene zur Biosynthese eines Antibiotikums meist in einem Cluster mit dem Resistenzgen vor und sind in der Regel chromosomal codiert. Bisher wurden nur die Synthesegene für Methylenomycin auf einem Plasmid gefunden. Darüber hinaus enthalten Antibiotika-Biosynthese-Gencluster meist auch Syntheseweg-spezifische, regulatorische Gene, die als Transkriptionsaktivatoren wirken und von übergeordneten Elementen oder Regulationskaskaden kontrolliert werden (s. 2.2). In *Streptomyces coelicolor* wurden über 20 verschiedene solcher pleiotroper Gene nachgewiesen, die die Antibiotika-Produktion beeinflussen. Dazu zählen z.B. Gene für „two-component“ regulatorische Systeme, Proteinkinasen, verschiedene σ -Faktoren oder für Enzyme zur Synthese von ppGpp und γ -Butyrolactonen (Bibb, 1996; Chater & Bibb, 1997). Im Genom von *S. coelicolor* A3(2) wurden 965 Gene gefunden, deren Produkten eine potentielle regulatorische Funktion zugeordnet wurde, darunter allein 65 mutmaßliche Gene für σ -Faktoren (Bentley et al., 2002). Abhängig von der Komplexität der Substanz umfassen die Biosynthese-Cluster im Durchschnitt 20 - 30 Gene, sind also etwa 20 - 30 kb groß. Bei der Analyse der DNA-Sequenz von *S. coelicolor* A3(2), dessen Genom komplett sequenziert wurde, wurden mehr als 20 Cluster zur potentiellen Synthese von Sekundärmetaboliten beschrieben. In *S. avermitilis*, dessen Chromosom ebenfalls zum Großteil sequenziert vorliegt, belegen die Gencluster zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten einen Anteil des Genoms von 6,4 % (Omura et al., 2001). Diese nicht-essentiellen Gene, sowie auch die Gene für die hydrolytischen Exoenzyme, liegen eher in den Randbereichen des linearen Chromosoms (Bentley et al., 2002).

2.2 Regulation der Antibiotika-Produktion in Streptomyceten

Die Produktion von Sekundärmetaboliten in Streptomyceten ist vor allem von der Wachstumsphase abhängig und setzt meist ein, wenn die Kultur in die stationäre Phase eintritt bzw. die morphologische Differenzierung beginnt. Als negative Effektoren können Medienkomponenten wie N-Quellen, Phosphat oder Glucose wirken, die die Antibiotika-Synthese reprimieren. Es wird angenommen, dass mindestens ein gemeinsames Kontrollelement für die Antibiotika-Produktion und für die Bildung des Luftmyzels verantwortlich ist. Häufig findet man auch Mutanten, die unfähig sind zu sporulieren und gleichzeitig auch keine Sekundärmetabolite mehr produzieren können (Chater & Bibb, 1997). Die übergeordneten Regulatoren wirken oft über Kontroll-Kaskaden auf die Expression von Biosyntheseweg-

spezifischen Regulatorgenen oder Biosynthesegenen ein oder beeinflussen die Aktivität der zugehörigen Enzyme.

Eine Vielzahl physiologischer Aktivitäten in Bakterien wie konjugativer Plasmidtransfer, Sporulation, Biolumineszenz, Synthese von Sekundärmetaboliten oder die Bildung eines Biofilms unterliegt unter anderem einer „Quorum-sensing“-Regulation, d.h. die Zellen produzieren in Abhängigkeit der Zellpopulationsdichte und der Wachstumsphase chemische Signalmoleküle, sogenannte Autoinducer oder Pheromone, und setzen diese in die Umgebung frei. Wird eine bestimmte, meist schon sehr niedrige Konzentration der Pheromone überschritten, führt dies zu Änderungen der Genexpression. Gram-negative Bakterien nutzen häufig acetylierte Homoserin-Lactone (Miller & Bassler, 2001), während in Streptomycceten die Autoinducer meist zur Familie der γ -Butyrolactone gehören, wie z.B. der A-Faktor, die nach der Bindung an ihre zugehörigen Rezeptorproteine eine „Quorum-sensing“-Regulationskaskade auslösen können. Diese kann schließlich zur morphologischen Differenzierung und zur Produktion von Sekundärmetaboliten führen.

In *S. griseus* wurde das regulatorische Zusammenspiel von morphologischer Differenzierung und Streptomycin-Biosynthese zum Teil aufgeklärt und ein Regulationsmodell aufgestellt (Abb. 1). Eine zentrale Rolle spielt dabei der A-Faktor, ein kleines, diffundierbares Signalmolekül aus der Gruppe der γ -Butyrolactone, das schon in extrem niedrigen Konzentrationen wirkt. Während des Wachstums des Substratmyzels wird der A-Faktor durch die Aktivität des Synthese-Enzyms AfsA („A-factor synthesis“) angehäuft. Überschreitet seine Konzentration eine kritische Menge, bindet er an das Repressor-Rezeptorprotein ArpA („A-factor receptor protein“), das die Promotorregion des Gens *adpA* („A-factor-dependent protein“) blockiert. Dadurch dissoziiert der Repressor von der DNA, und es kommt zu einer Expression des Aktivators AdpA. Dieser wiederum aktiviert die Transkription von *strR*, indem er an die stromaufwärts des *strR*-Promotors gelegene „upstream activating sequence“ (UAS) bindet, wodurch es zur Ausbildung der Streptomycin-Resistenz durch Synthese der Streptomycin-Phosphotransferase StrA sowie zur Bildung des Regulators StrR kommt. StrR wirkt als Syntheseweg-spezifischer Transkriptionsaktivator auf die UAS einiger Promotoren von Streptomycin-Biosynthesegenen.

Weitere Erläuterungen zur Aktivität von StrR finden sich auch unter Kapitel 5.4. AdpA, d.h. auch der A-Faktor, stimulieren zusätzlich die Bildung von Luftmyzel und Sporen in *S. griseus*. Es wird angenommen, dass AdpA als Transkriptionsaktivator für noch unbekannte Gene zum Start der Luftmyzel-Bildung fungiert. Der A-Faktor hat darüber hinaus in

S. griseus auch einen Einfluss auf Enzyme des Primärstoffwechsels (PEP-Carboxylase) und ist für eine Vielzahl weiterer Phänotypen verantwortlich (Ohnishi et al., 1999; Thamm, 1999). Die Form der Regulation in *S. griseus* unterscheidet sich von der Kontrolle der Virginiamycin-Produktion in *S. virginiae*. Dort hat der γ -Butyrolacton-Autoregulator Virginiae-Butanolid (VB) nur unmittelbaren Einfluss auf die Synthese des Sekundärmetaboliten, nicht jedoch auf die Entstehung von Luftmyzel. Während der A-Faktor Wachstumsphasen-abhängig in einer frühen Phase sowohl die Differenzierung als auch die Antibiotika-Synthese induziert, wird VB erst kurz vor der Virginiamycin-Produktion gebildet und kontrolliert eine späte Stufe innerhalb der Regulationskaskade für den Sekundärmetabolismus. Es wird angenommen, dass in den meisten Streptomycceten Regulationssysteme über γ -Butyrolactone zu finden sind, die die physiologische und morphologische Entwicklung zusammen oder nur einen Zweig davon beeinflussen. So wurden z.B. in *S. coelicolor* A3(2) sechs verschiedene γ -Butyrolactone und mindestens drei *arpa*-verwandte Gene identifiziert (Ohnishi et al., 1999).

In Streptomycceten unterscheidet man mindestens drei Klassen von Biosyntheseweg-spezifischen Transkriptionsregulatoren. Die größte davon bilden die SARP-Proteine („Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins“), zu denen die Aktivatoren der Actinorhodin-Synthese ActII-ORF-IV und der Undecylprodigiosin-Synthese RedD aus *S. coelicolor* zählen. Sie besitzen keine definierten Helix-Turn-Helix-Motive (HTH) und auch keine anderen stark konservierten Domänen. Es wurde jedoch postuliert, dass sich der C-Terminus der Proteine für die DNA-Bindung und die Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase verantwortlich zeichnet (Wietzorrek & Bibb, 1997). Der oben erwähnte Regulator der Streptomycin-Biosynthese StrR aus *S. griseus* bildet eine eigene Klasse, zu der bislang nur die beiden Proteine HstR aus dem 5'-Hydroxy-Streptomycin-Gencluster von *S. glaucescens* und SpcR aus dem Spectinomycin-Gencluster von *S. flavopersicus* zugeordnet werden konnten. Sie weisen keine Ähnlichkeit mit anderen Regulatorproteinen auf und besitzen ein zentral gelegenes HTH-Motiv, mit dem sie, wie im Fall von StrR und HstR auch bewiesen wurde, an palindrome DNA-Sequenzen binden (Thamm, 1999). Der Vertreter der dritten, LysR-genannten Klasse ist der Transkriptionsaktivator der Bialaphos-Synthese aus *S. hygrosopicus*. Er zeichnet sich durch ein C-terminales HTH-Motiv sowie drei hydrophobe N-terminale Bereiche aus, die als Transmembran-Domänen oder zur Protein-Protein-Interaktion dienen könnten (Raibaud et al., 1991).

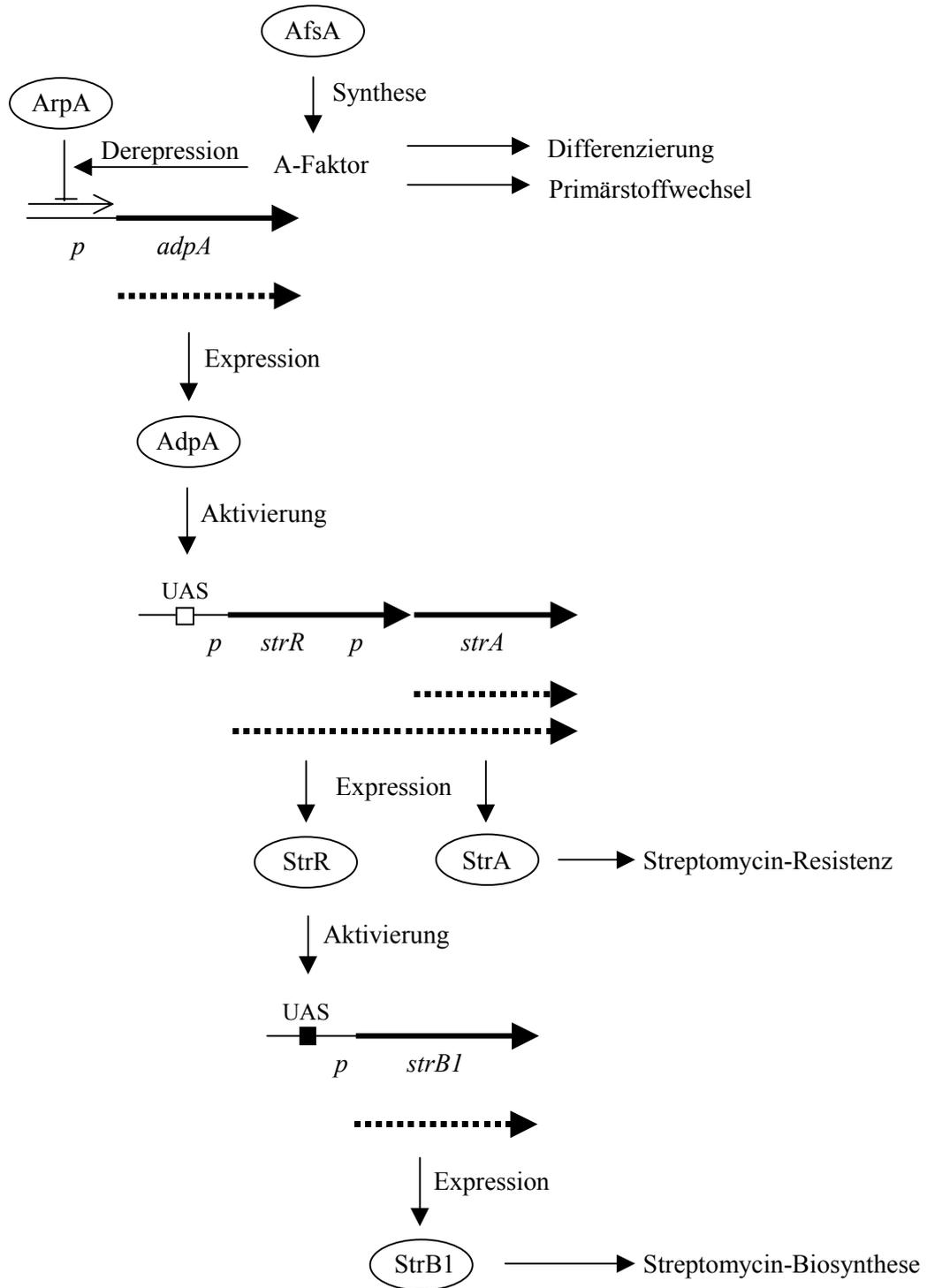


Abb. 1: Modell der A-Faktor-abhängigen Regulationskaskade zur Streptomycin-Produktion in *S. griseus* (modifiziert nach Thamm, 1999). p = Promotor; UAS = „upstream activating sequence“; gestrichelte Pfeile = mRNA. Nähere Erläuterungen s. Text.

2.3 Isolierung von Antibiotika-Biosynthesegenen und Modifikation von Antibiotika

In den letzten Jahrzehnten stieg die Anzahl an Antibiotika-resistenten, pathogenen Mikroorganismen drastisch an. Zusätzlich nahmen Mehrfachresistenzen zu und erfassen nun beinahe alle antibakteriellen Substanzgruppen wie auch die Glykopeptide, die bisher noch als gut wirksame „Reserveantibiotika“ galten oder die erst Ende der achtziger Jahre eingeführten Neuentwicklungen (z.B. Fluorochinolone). So erhöhte sich etwa der Anteil an Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen in Deutschland von 1,7 % im Jahr 1990 innerhalb von 5 Jahren auf 8,7 % und lag in den USA im Jahre 1996 schon bei 35 % (Witte & Klare, 1999). Des Weiteren flammen bisher behandelbare Infektionskrankheiten, wie zum Beispiel die Tuberkulose in Osteuropa, erneut auf.

Diese Situation macht deutlich, wie wichtig die Suche und Isolierung von neuen Antibiotika und auch die Modifikation bereits bekannter Substanzen ist. Es wird geschätzt, dass bisher nur etwa 10 - 20 % der existierenden Antibiotika bekannt sind (Gräfe, 1992). Zusätzlich ist die Pharmaindustrie bestrebt, die Leistung von schon vorhandenen Produzentenstämmen zu steigern, um so die Ausbeute an Sekundärmetaboliten zu erhöhen. Dafür werden die Produktionsbedingungen und Medien optimiert und versucht, durch Mutation, auch von regulatorischen Genen, aktivere Produzenten zu erzeugen.

Da Streptomyceten die Mehrheit der bereits in Human- und Tiermedizin angewandten Sekundärmetabolite produzieren, im Erdreich ubiquitär vorkommen und zudem, bis auf wenige Ausnahmen, nicht pathogen sind, sind sie als Organismengruppe zur Suche neuer Wirkstoffe gut geeignet. Das Auffinden neuer Wirksubstanzen verläuft meist über großflächige Screens, indem aus einer Bodenprobe Bakterien aus einer Gruppe wie den Actinomyceten angereichert werden und die erhaltenen Kulturen mit den üblichen Methoden z.B. nach einem Antibiotikum getestet werden. Neuerdings versucht man auch über kombinatorische Biosynthese bekannte Antibiotika zu modifizieren und damit die Wirksamkeit der Substanzen zu erhöhen und die Resistenzmechanismen zu umgehen. Um gezielt in die Synthese der Antibiotika eingreifen zu können, ist es nötig, die Biosynthesegene in Händen zu halten. Dabei macht man sich oft zunutze, dass die Gene zur Biosynthese, Resistenz und Regulation geclustert vorliegen. Kieser und Co-Autoren beschreiben in ihrem Buch „Practical *Streptomyces* Genetics“ sechs Möglichkeiten zum Auffinden von Antibiotika-Synthese-Clustern (Kieser et al., 2000):

1. Genetische Komplementation von Blockmutanten: Stämme, die das zu analysierende Antibiotikum aufgrund einer Mutation im Biosynthese-Cluster nicht mehr produzieren, können durch Transformation der gesuchten Gene wieder zu Wirkstoffproduzenten werden.
2. Klonierung des Resistenzgens: Über die Selektion resistenter, heterologer Transformanten können aus einer Genbank Klone isoliert werden, die das Resistenzgen enthalten. Dieses liegt meist in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Biosynthesegenen.
3. Viele Enzyme, die zur Synthese bestimmter Antibiotika-Klassen benötigt werden, wie Polyketid-Synthasen, Oligopeptid-Synthetasen oder Proteine zur Synthese von Desoxyzuckern, sind verwandt und haben konservierte Regionen gemeinsam. Eine Hybridisierung mit heterologen Sonden oder eine PCR-Amplifikation mit degenerierten Primern dieser Bereiche kann zum Auffinden weiterer Gene, die solche Enzyme codieren, in verschiedenen Stämmen führen. So zeigten z.B. in einem Screen mehr als 50 Streptomyceten, die 6-Desoxyhexose-enhaltende Sekundärmetabolite produzierten, ein Hybridisierungssignal mit den dTDP-Glucose-Synthase- und 4,6-Dehydratase-Genen aus dem Streptomycin-Biosynthese-Cluster von *S. griseus* (Stockmann & Piepersberg, 1992).
4. „Mutational Cloning“ mit dem temperenten Phagen ϕ C31KC400: Bei diesem Phagen wurden die „Attachment-Sites“ für die Integration deletiert. Wird der Antibiotika-produzierende Stamm mit Phagen, die eine Genbank des gleichen Stamms enthalten, infiziert, können durch Rekombination homologer DNA-Bereiche Phagen, die Gene aus dem Antibiotika-Biosyntheseweg tragen, integrieren und dabei zu einer Unterbrechung der Expression dieser Gene führen. Es muss also nach Transfektanten gesucht werden, die keine wirksame Substanz mehr produzieren.
5. Bei Antibiotika, die eine relativ einfache Grundstruktur besitzen und daher nur wenige Gene für ihre Synthese benötigen, kann das gesamte Biosynthese-Cluster in einen heterologen Wirt kloniert werden, der dann in der Lage sein sollte, den Wirkstoff zu synthetisieren.
6. Klonierung von Aktivatorgenen, die bei einer Überexpression dazu führen, dass das Antibiotikum überproduziert wird: Viele Antibiotika-Synthese-Cluster beinhalten Aktivatorgene, die häufig auch in einem Wirt aktiv und nachweisbar sind, der eine ähnliche Substanz produziert.

Der Erfolg dieser Methoden ist von vielen Faktoren abhängig, wie z.B. der Menge an produziertem Antibiotikum und seiner Nachweisbarkeit, der Transformierbarkeit des Stammes oder der Expression der Gene in einem heterologen Wirt.

Mit Hilfe von verschiedenen chromatographischen Methoden oder Extraktionen können die produzierten Antibiotika angereichert und aufgereinigt werden. Ihr Nachweis erfolgt über Agarplatten-Diffusionsassays, Dünnschicht-, Papier- oder Gaschromatographie und HPLC-Analytik, während zur Strukturaufklärung Massenspektroskopie, Kernresonanzspektroskopie und die Röntgenstrukturanalyse zum Einsatz kommen.

Liegen die Sequenzinformationen der Biosynthese-, Resistenz- und Regulationsgene vor, erlaubt dies einen gezielten Eingriff in den Biosyntheseweg. Durch Manipulation von Syntheseweg-spezifischen oder global wirkenden regulatorischen Genen kann die Menge der produzierten Substanz erhöht werden. Außerdem wurden bereits Versuche unternommen, um neue „Hybrid“-Antibiotika herzustellen. Dabei werden gezielt einzelne Biosynthesegene oder Cluster, die alle Gene zur Synthese einer Untereinheit des Moleküls codieren, ausgetauscht bzw. ergänzt. Zum Beispiel wurden schon einzelne Module von Peptid-Synthetasen substituiert, was zum Einbau einer anderen Aminosäure in das Peptid-Antibiotikum führte (Stachelhaus et al., 1995). Ähnliche Versuche wurden auch an Polyketid-Synthasen unternommen. Werden dort einzelne Module inseriert, entfernt oder ausgetauscht, führt dies ebenfalls zu einer modifizierten Grundstruktur aus mehr oder weniger bzw. veränderten Acyl-Einheiten (Cane et al., 1998).

Bei glykosylierten Antibiotika tragen Zuckerreste ebenso zur Wirkung der Substanz bei wie die Aglyconreste. Daher werden auch Versuche unternommen, um die Synthesegene für die seltenen Zucker durch andere zu ersetzen oder zu modifizieren. Von Nutzen ist dabei, dass die Glykosyltransferasen häufig eine sehr breite Substratspezifität besitzen. Diese kombinatorische Biosynthese kann noch ergänzt werden, indem chemisch synthetisierte Precursor als Substrate zugefüttert werden. So stellt z.B. *S. echinatus* Varianten des Peptid-Antibiotikums Echinomycin her, die sich in den endständigen Chinoxalinsäure-Resten unterscheiden, wenn dem Medium verschiedene Chinoxalincarbonsäure-Analoga zugegeben werden (Gräfe, 1992).

Im Moment ist allerdings noch kein Antibiotikum auf dem Markt, das durch kombinatorische Biosynthese hergestellt wurde, und chemische Modifikationen der bereits isolierten und gereinigten Wirkstoffe sind nach wie vor von größerer Bedeutung. Einige Moleküle werden totalsynthetisch produziert. Hierzu zählt z.B. L-Alanyl-L-1-aminoethylphosphonsäure, ein Inhibitor der Zellwand-Synthese, der nach dem Vorbild des natürlich vorkommenden Cycloserin „maßgeschneidert“ wurde, aber einen größeren Wirkungsbereich als dieses besitzt und weniger toxisch wirkt (Gräfe, 1992).

Die Methoden der chemischen Partialsynthese, bei der die Strukturen natürlich vorkommender Substanzen gezielt abgewandelt werden, um z.B. das Wirkungsspektrum und die Löslichkeit zu verbessern oder Nebenwirkungen zu verringern, sind bei Antibiotika fast aller Strukturklassen gut ausgearbeitet. Vor allem im Fall der β -Lactam-Antibiotika, wie den Penicillinen und Cephalosporinen, werden sie industriell eingesetzt, um die β -Lactamase-stabilität zu erhöhen und die pharmakokinetischen Eigenschaften (bessere orale Absorption, verlängerte Halbwertszeit, höhere Säurestabilität) zu verbessern. Dabei sind auch die Fortschritte in der Bioinformatik von Nutzen, bei der mit Hilfe von speziellen Computer-Programmen Moleküle entworfen und ihre Bindungen an die Zielorte oder Wechselwirkungen mit Resistenzenzymen vorhergesagt werden können. Semisynthetische Penicilline werden ausgehend von 6-Aminopenicillansäure hergestellt, an die verschiedene, z.T. modifizierte Amidseitenketten angehängt werden. Zu den bekannten Derivaten zählt Ampicillin, das einen D-Phenylglycin-Substituenten trägt (Abb.2).

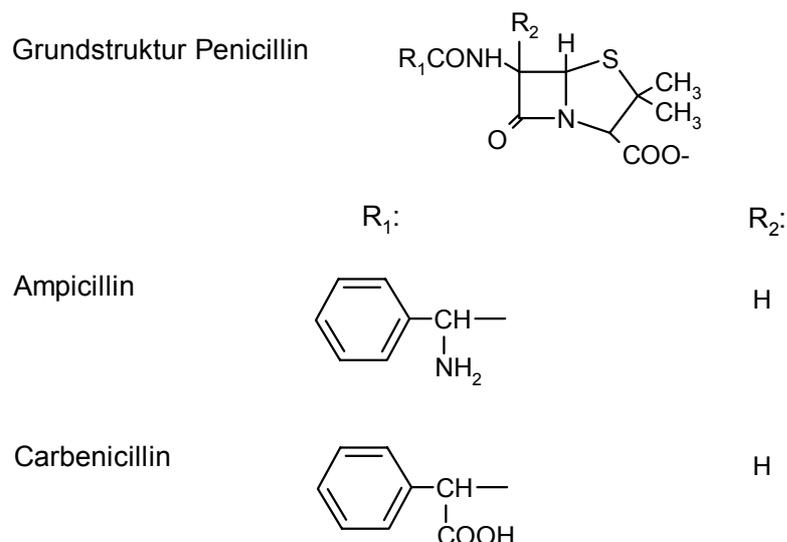


Abb. 2: Chemische Grundstruktur von Penicillin und zwei halbsynthetischen Derivaten.

Bessere Möglichkeiten zur Modifikation bieten jedoch die Cephalosporine, da sie zwei Seitengruppen besitzen, an denen Veränderungen möglich sind. Im Zeitraum von 1985 - 1990 wurden über 1.000 halbsynthetische Cephalosporin-Derivate neu charakterisiert. Die Vorstufe 7-Aminocephalosporansäure kann entweder biotechnologisch gewonnen werden oder chemisch durch Ringerweiterung aus Penicillin. Da bis zum Endprodukt mehr chemische Syntheseschritte nötig sind als bei den Penicillinen, ist die Produktion von modifizierten

Cephalosporinen teurer, bietet aber gegenüber Penicillin den Vorteil eines breiteren Aktivitätsspektrums, der Wirksamkeit gegen penicillinasebildende Bakterien und eines nicht vorhandenen Allergie-Potentials der Wirkstoffe. Cephalosporine können sowohl an der 3- als auch an der 7 α - und 7 β -Position durch Anhängen verschiedener Seitengruppen modifiziert werden (Gräfe, 1992) (Abb. 3).

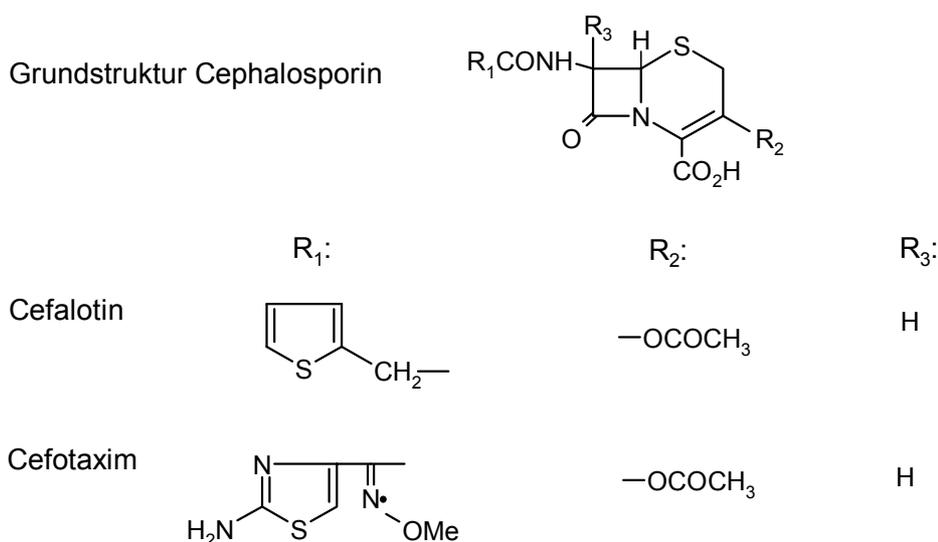


Abb. 3: Chemische Grundstruktur von Cephalosporin und zwei halbsynthetischen Derivaten.

Von Aminoglykosid-Antibiotika werden ebenfalls semisynthetische Derivate erzeugt, die z.T. zum Einsatz kommen. Hier soll nur näher auf Versuche eingegangen werden, die vor etwa 15 - 20 Jahren unternommen wurden, um Spectinomycin chemisch, z.B. durch Desoxygenierungen, Demethylierungen, Chlorierungen oder Aminierungen, zu modifizieren. Diese Modifikationen zielten einerseits darauf ab, die antibiotische Aktivität zu erhöhen und die Alkali-Instabilität der Substanz zu reduzieren. Andererseits sollten durch Veränderungen bestimmter Reste die Angriffspunkte von Resistenzenzymen unzugänglich gemacht werden. Allerdings hatten alle Modifikationen, die an der Actinamin-Untereinheit vorgenommen wurden und zu Spectinomycin-Derivaten wie 7-*epi*-Spectinomycin, 7-Desoxyspectinomycin (Abb. 4), 9-Desoxyspectinomycin, *mono*-N-Demethyl- und N,N'-Didemethylspectinomycin führten, eine Verringerung oder einen Verlust der antibiotischen Aktivität als Konsequenz (Rosenbrook, 1979). Änderungen an der Zucker-Untereinheit ergaben bessere Resultate. So hatte zwar eine Reduktion der C-4 Ketogruppe in Actinospectose zu den beiden Epimeren Dihydrospectinomycin noch eine verringerte Aktivität zur Folge, aber 4-Amino-4(R)-Dihydrospectinomycin und 4-Aminomethyl-4(R)-Dihydrospectinomycin und N-alkylierte

und acylierte Derivate davon zeigten eine erhöhte Wirkung gegenüber einer Vielzahl von Mikroorganismen. Dabei wurde auch festgestellt, dass 4(R)-Analoge aktiver als 4(S)-Analoge waren (Thomas & Fritzen, 1988). Spectinomycin-Derivate, die an der C-2 Position modifiziert wurden, wiesen im Vergleich zu Änderungen an der C-4 Position die höchsten antibakteriellen Aktivitäten auf. Trospectomycin, ein 2-Propyl-Spectinomycin-Derivat, erwies sich als 4- bis 32-mal aktiver gegen viele pathogene Bakterien (Abb. 4). Dies deutet darauf hin, dass beide Untereinheiten zur antibiotischen Wirkung von Spectinomycin beitragen.

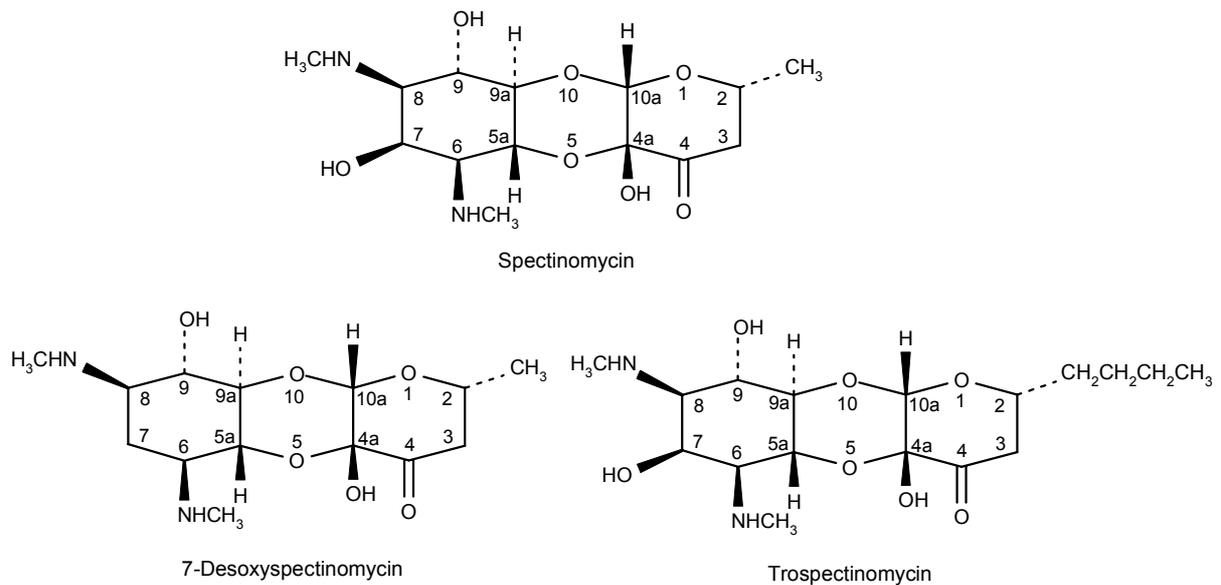


Abb. 4: Strukturformel von Spectinomycin und zwei chemisch modifizierten Spectinomycin-Derivaten.

2.4 Spectinomycin

2.4.1 Eigenschaften von Spectinomycin

Spectinomycin ist ein Aminocyclitol, das zur Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika gezählt wird (Abb. 5). Es wurde 1961 und 1962 aus den Fermentationsbrühen von *Streptomyces spectabilis* (Mason et al., 1961) und *Streptomyces flavopersicus* (Oliver et al., 1962) durch die Firmen Upjohn Company bzw. Abbott Laboratories isoliert und zuerst unter dem Namen Actinospectacin oder M-141 bekannt. Wenig später wurde es auch in den Fermentations-

überständen von *Streptomyces hygroscopicus* zusammen mit dem Hygromycin-Komplex gefunden (Yamamoto et al., 1974).

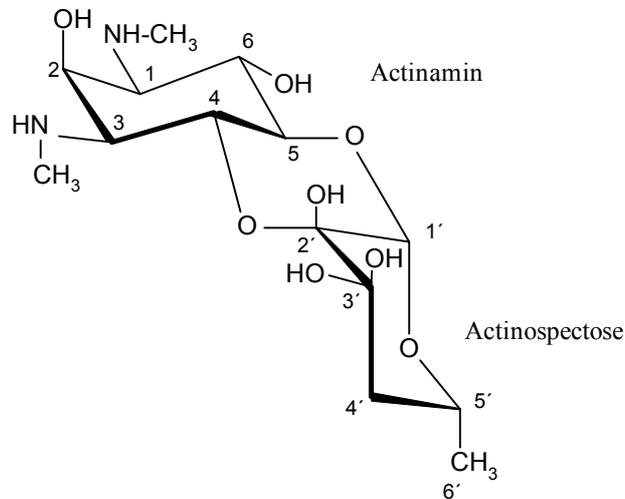


Abb. 5: Chemische Struktur des Aminocyclitol-Antibiotikums Spectinomycin mit alternativer Nummerierung der C-Atome (vergleiche Abb. 4).

Spectinomycin wirkt als Breitspektrum-Antibiotikum gegen eine Vielzahl aerober, gram-positiver und auch gram-negativer Organismen. Eine Wirkung gegenüber Pilzen, Parasiten oder als Antitumor-Agens konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Mason et al., 1961). Spectinomycin greift in die Translation ein. Es inhibiert die Translokation der Peptidyl-tRNA von der A-Site zur P-Site, indem es die Bindung des Elongationsfaktors G an das bakterielle Ribosom inhibiert. Dabei interagiert es spezifisch mit den Resten G₁₀₆₄ und C₁₁₉₂ in der 16S rRNA und verhindert dadurch, dass sich die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen lösen. So wird die 30S-Untereinheit des Ribosoms in einer inaktiven Konformation konserviert, in der es die Translation weder beginnen noch beenden kann (Brink et al., 1994). Im Gegensatz zu vielen anderen Aminoglykosid-Antibiotika führt Spectinomycin nicht zu einem „Misreading“, d.h. zu einem Falscheinbau von Aminosäuren. Bakterien, auf die das Antibiotikum einwirkt, gelangen in einen „quasi-relaxed“ Zustand, in dem einige Proteine, z.B. Elemente des Translationsapparates, sogar noch überproduziert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich in Gegenwart von Spectinomycin keine unbeladenen tRNAs anhäufen, die als regulatorische Komponenten zu einem Anstieg von Guanosintetraphosphat führen würden (Piepersberg, 1985). Die Wirkung von Spectinomycin ist eher als bakteriostatisch denn als bakteriozid anzusehen. Nur gegen Gonokokken wurde ein starker bakteriozider Einfluss nachgewiesen (Ward, 1977). Daher wird Spectinomycin hauptsächlich

zur Behandlung von Penicillin-resistenten *Neisseria gonorrhoeae*-Infektionen klinisch angewandt (Pederson et al., 1972), oder es kommt bei Personen, die unter einer Allergie gegen β -Lactam-Antibiotika leiden, zum Einsatz. Im Gegensatz zu manch anderen Aminoglykosiden schädigt es die Flimmerhaare des Ohrenepithels nicht und wirkt nicht nephrotoxisch. Weiterhin findet Spectinomycin in der Tiermedizin (Schermerhorn et al., 1995) und in der Geflügelzucht in den USA Verwendung. Im Handel wird Spectinomycin unter den Namen Spectam[®], Spectogard[®], Stanilo[®], Togamycin[®] und Trobicin[®] vertrieben.

2.4.2 Resistenz gegenüber Spectinomycin

Resistenz gegenüber Aminoglykosid- und Aminocyclitol-Antibiotika wird entweder durch Modifikationen an den Strukturen selbst oder durch Mutationen und Modifikationen an ihrem Angriffspunkt vermittelt. Die meisten Streptomyceten besitzen mehrere Resistenzmechanismen gegen die von ihnen selbst produzierten Antibiotika. Die Aminoglykosid-Resistenzgene werden meist konstitutiv exprimiert und unterliegen keiner Regulation. In einigen Fällen erfüllen die Enzyme, die von den Resistenzgenen codiert werden, gleichzeitig auch Funktionen in den Biosynthesewegen der Antibiotika (Martin & Liras, 1989) bzw. die Entwicklung ging so weit, dass die Biosynthesegene durch Mutationen vollständig zu Resistenzgenen umgewandelt wurden.

In klinischen Isolaten, die sich als resistent gegenüber Spectinomycin zeigten, wurden Mutationen in der 16S rRNA an den Positionen 1064, 1191 und 1193 nachgewiesen, wodurch eine Bindung des Antibiotikums verhindert werden kann (Brink et al., 1994). Interessanterweise führen auch Mutationen im ribosomalen Protein RpsE bzw. S5 zu Resistenz, obwohl Spectinomycin nicht an dieses Protein bindet (Carter et al., 2000). Außerdem konnten verschiedene R-Faktoren isoliert werden, die Spectinomycin-Adenylyltransferasen codieren. Durch Transfer eines Adenylylrests von ATP an die C-9 Position (Abb. 4) durch dieses Enzym kommt es zu einer Inaktivierung von Spectinomycin (Benveniste & Davies, 1973).

In jüngster Zeit wurde eine Spectinomycin-Phosphotransferase aus *Legionella pneumophila* beschrieben, die das Antibiotikum durch Phosphorylierung an der C-9 Position inaktiviert (Thompson et al., 1998). Der gleiche Resistenzmechanismus wurde auch in den Produzentenstämmen *S. flavopersicus* und *S. spectabilis* gefunden (Lyutskanova et al., 1997).

2.4.3 Biosynthese von Spectinomycin

Die Biosynthese von Antibiotika und auch aller anderen Sekundärmetabolite erfolgt über einen „Multistep“-Weg, an dessen Anfang Verbindungen aus dem Primärstoffwechsel stehen, die durch spezifische, meist monofunktionale Enzyme in die Komponenten der Antibiotika umgewandelt werden. Die einzelnen Einheiten werden dann aktiviert und zum kompletten Sekundärmetabolit zusammengefügt (Martin & Liras, 1981). Die Antibiotika-Biosynthesegene sind gewöhnlich in einem Cluster zusammen mit dem entsprechenden Resistenzgenen und Genen für Exportproteine und Regulatoren organisiert.

Über die einzelnen Schritte des Biosynthesewegs von Spectinomycin und den daran beteiligten Enzymen ist noch nicht allzu viel bekannt.

Spectinomycin setzt sich aus der Aminocyclitol-Untereinheit Actinamin oder N,N'-Dimethyl-2-*epi*-Streptamin und der neutralen Zucker-Untereinheit Actinospectose zusammen (Abb. 6). Die beiden Grundeinheiten sind über eine β -glykosidische Bindung und eine Hemiketal-Bindung zu einem tricyclischen Ringsystem verbunden.

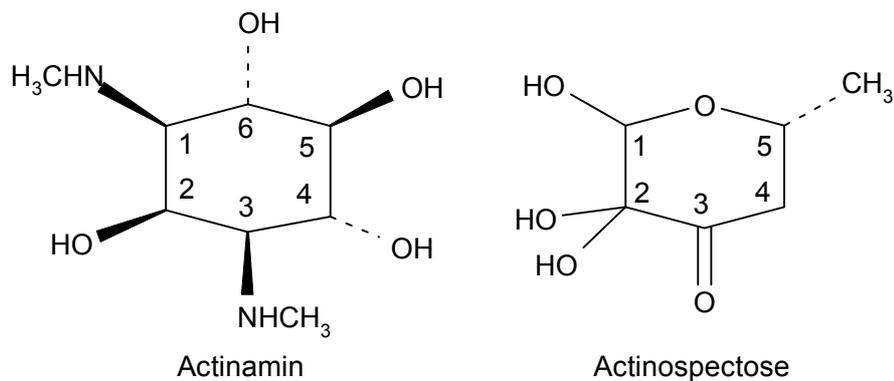


Abb. 6: Chemische Struktur der Untereinheiten Actinamin und Actinospectose.

In vivo-Zufütterungsversuche haben gezeigt, dass D-Glucose als Vorläufer von sowohl Actinospectose als auch von Actinamin dient. Letzteres wird über *myo*-Inositol als Zwischenstufe gebildet. Donor der beiden N-Methylgruppen ist Methionin (Mitscher et al., 1971). Durch *in vitro* Experimente mit Myzel-Rohextrakten von *S. flavopersicus* aus der stationären Wachstumsphase konnte nachgewiesen werden, dass die α -Aminogruppe von L-Glutamin die beiden Aminogruppen der Actinamin-Einheit liefert, wobei die N¹-Aminogruppe zuerst angehängt wird, gefolgt von der N³-Aminogruppe (Walker, 1995). Beide N-Methylierungen finden erst statt, wenn beide Aminogruppen vorhanden sind und bevor der

Ringschluss zum Spectinomycin erfolgt (Okuda & Ito, 1982). Darüber hinaus wurde im Fermentationsüberstand von *S. spectabilis* Dihydrospectinomycin nachgewiesen, das als unmittelbarer Vorläufer von Spectinomycin angesehen wird (Hoeksema & Knight, 1975). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde von Okuda und Ito ein möglicher Biosyntheseweg für Spectinomycin postuliert (Okuda & Ito, 1982).

2.5 Netropsin

2.5.1 Eigenschaften von Netropsin

Netropsin, das auch unter den Synonymen Congocidin und Sinanomycin bekannt ist, wurde erstmals 1951 aus Kulturfiltraten von *Streptomyces netropsis* isoliert und aufgereinigt (Finlay et al., 1951). Neben diesem Produzentenstamm *S. netropsis* ATCC23940 = DSM40259 führt die American Type Culture Collection noch zwei weitere Streptomyceten (*S. ambofaciens* ATCC23877 und *S. ambofaciens* ATCC15154), die Netropsin produzieren, die Deutsche Stammsammlung dagegen drei (*S. ambofaciens* DSM40053 = ATCC23877, *S. parvulus* DSM40728 und *S. sp.* DSM 40384).

Netropsin ist ein basisches Peptid-Antibiotikum (Abb. 7). Aufgrund der beiden vorhandenen N-Methylpyrrol-Ringe wird es auch als Pyrrolocarboximid bezeichnet. Die nicht-proteinogenen Aminosäure-Reste sind über drei Peptidbindungen verbunden, die sehr wahrscheinlich nicht-ribosomal mittels einer Peptid-Synthetase geknüpft werden. Über die Ausgangssubstanzen und die Biosynthese der Aminosäuren und der anderen Vorläuferprodukte von Netropsin ist nichts bekannt.

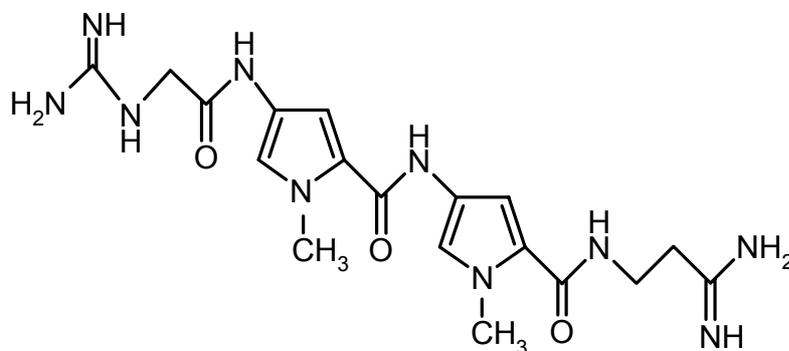


Abb. 7: Chemische Struktur des Peptid-Antibiotikums Netropsin.

Netropsin geht eine nicht-kovalente Interaktion mit der DNA ein, ohne dabei zu interkalieren (Gräfe, 1992). Es bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Grube der DNA, so dass die Amidgruppen auf der konkaven Seite und die Carbonyl- und Methylgruppen auf der konvexen Seite zu liegen kommen. Dabei bilden die Amidgruppen Wasserstoffbrücken mit H₂O aus und die geladenen Amino-Endgruppen interagieren mit Sulfat-Anionen (Abb. 8) (Berman et al., 1979).

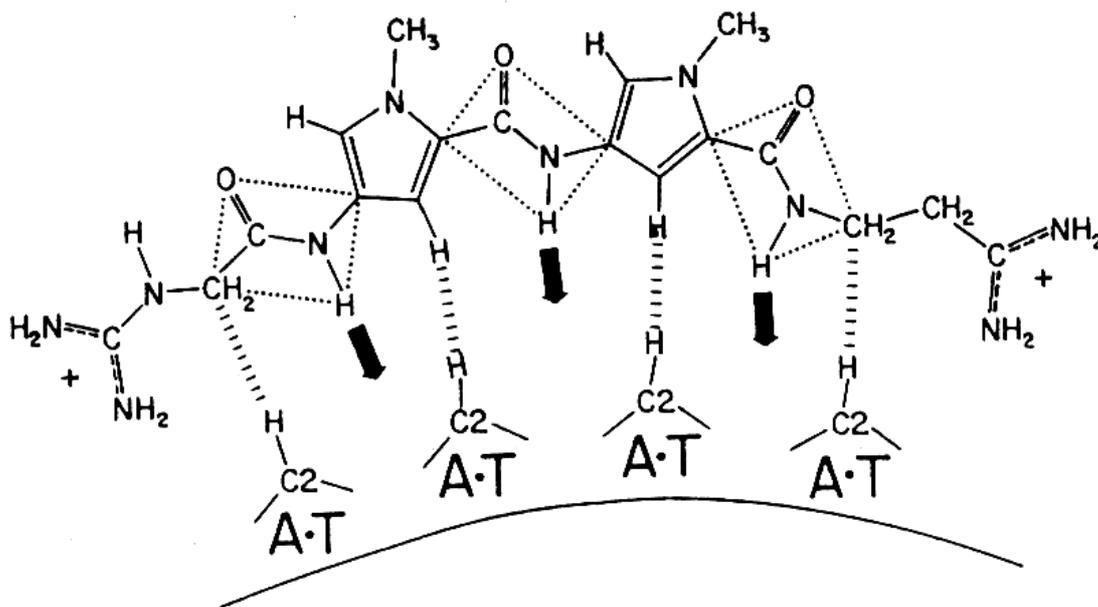


Abb. 8: Interaktion von Netropsin mit der kleinen Furche der DNA. Schwarze Pfeile symbolisieren H-Brücken, gestrichelte Linien stellen van-der-Waals-Kräfte zwischen Netropsin und den C-2 H-Atomen von Adenin dar (Kopka et al., 1985).

Die nicht-kovalente DNA-Bindung von Netropsin bot Anregung zur Entwicklung von Substanzen, die größere DNA-Abschnitte durch Bindung blockieren können. Diese als Lexitropine bezeichneten Stoffe können als Inhibitoren zur Analyse von Genaktivitäten eingesetzt werden (Gräfe, 1992). Ferner wurde nachgewiesen, dass Netropsin zwischen die -10- und die -35-Region von *E. coli*-Promotoren bindet und damit wahrscheinlich die Struktur des Promotors verändern kann, was zu einer verstärkten Bindung der RNA-Polymerase führt. Dieser Effekt könnte zu einer gesteigerten Transkriptionsaktivierung von Genen in *E. coli* eingesetzt werden (Bruzik et al., 1987).

2.5.2 Biologische Wirkung von Netropsin

Aufgrund seiner DNA-bindenden Eigenschaften wirkt Netropsin gegen eine Vielzahl gram-positiver und gram-negativer Mikroorganismen, Mykobakterien, Hefen, Pilze und Protozoen. Auch ein larvizider und molluscizider Effekt konnte beobachtet werden. Die antivirale Aktivität des Wirkstoffs gegen verschiedene DNA-Viren hat jedoch offenbar wenig mit den DNA-bindenden Eigenschaften zu tun (Gräfe, 1992).

Netropsin übt eine Vielzahl verschiedener Effekte auf die unterschiedlichen Organismen aus. So bewirkt die DNA-Antibiotikum-Bindung, dass die Erkennungs- und Spaltungstelle der bakteriellen Gyrase blockiert werden kann. Dies führt zu positiv superspiralisierten DNA-Molekülen und einer Erhöhung der Verwindungszahl der DNA (Snounou et al., 1983).

Außerdem inhibieren Netropsin und Netropsin-Dimere, die über verschieden lange Ketten synthetisch miteinander verknüpft wurden, die katalytische Aktivität der Topoisomerase II aus Säugetieren und beeinflussen die Stabilität der Spalt-Komplexe von Topoisomerase I und II im Nucleus (Beerman et al., 1991).

Das Antibiotikum hemmt *in vitro* die Integration der DNA des „Moloney murine leukemia“ Virus ins Wirtsgenom. Das Virus weist in seinen langen, terminalen Sequenzwiederholungen AT-reiche Bereiche auf, die als Bindestelle der Integrase dienen. Durch Interaktion von Netropsin mit dieser Region wird die Spaltung der DNA durch die Integrase und der Strang-Transfer blockiert und damit eine Integration der Virus-DNA ins Wirtschromosom inhibiert (Carteau et al., 1994).

Ein weiterer Effekt von Netropsin betrifft den Zellzyklus. Es kann eine Dekondensation von heterochromatischen Regionen auf den Metaphase-Chromosomen auslösen. Es verzögert das Zellwachstum durch Verlängerung der G1-Phase, bewirkt einen Arrest in der G2-Phase und erhöht damit auch die Polyploidisation (Poot et al., 1990).

2.6 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Spectinomycin-Biosynthese-Gencluster aus *S. flavopersicus* vollständig kloniert und sequenziert werden. Dadurch wurden nähere Einsichten in den Biosyntheseweg von Spectinomycin, die Regulation, den Export des Antibiotikums aus der Zelle und den Resistenzmechanismus erhofft. Mit bereits bekannten Biosynthese-Clustern von Spectinomycin und ähnlicher Antibiotika und daraus abgeleiteten

Proteinen sollten Vergleiche gezogen werden. Einzelne Gene sollten exprimiert und anhand von Aktivitätstests die postulierte Funktion der abgeleiteten Proteine bestätigt werden. Ferner sollte über Inaktivierung und Austausch einiger Gene deren Beteiligung am Syntheseweg geklärt werden, um letztendlich eventuell durch kombinatorische Biosynthese modifizierte Grundstrukturen der Antibiotika zu erhalten. Des Weiteren sollten die in den Spectinomycin-Produzenten vorhandenen Netropsin-Biosynthesegene isoliert werden, indem im ersten Schritt die Resistenzgene kloniert wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind mit ihren genotypischen Merkmalen und ihrer Herkunft in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 2 gibt die verwendeten Vektoren bzw. Plasmide mit ihren relevanten Eigenschaften wieder, während in Tabelle 3 die in dieser Arbeit entstandenen Plasmide aufgelistet sind.

In Tabelle 4 sind die Sequenzen der Oligonukleotide dargestellt, die für Sequenzierungen, PCR und Klonierungen verwendet wurden.

Tab. 1: Bakterienstämme mit ihren Geno- bzw. Phänotypen.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
71 / 18	<i>supE thi Δ(lac-proAB)</i> F' [<i>proAB⁺ lacI^f lacZΔM15</i>]	Dente et al., 1983
BHB2688	N205 <i>recA</i> [<i>λimm434 cIts b2 red Eam Sam</i>]	Hohn, 1979
BHB2690	N205 <i>recA</i> [<i>λimm434 cIts b2 red Dam Sam</i>]	Hohn, 1979
BL21(DE3)/pLysS	<i>hsdS gal (λcIts875 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7-gene1)</i>	Studier & Moffatt, 1986
ET12567	<i>dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR recF143 zji201::Tn10 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl5 leuB6 thi1 ton A31 rpsL136 hisG4 tsx78 mtl-1 glnV44 F⁻</i>	MacNeil et al., 1992
HB101	<i>supE44 hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Boyer & Roulland-Dussoix, 1969
JM108 F ⁻ ::Tn5491	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB)/ F⁻ lacI proAB::Tn5491 Tc^R</i>	Fischer et al., 1996
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB)/ F⁻ [traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
RR1	<i>supE44 hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Bolivar et al., 1977
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820/ <i>Sm. baldaccii</i> ATCC19756/ <i>S. netropsis</i> DSM40093	Wildtyp	Oliver et al., 1962
<i>S. netropsis</i> DSM40259	Wildtyp	Finlay et al., 1951
<i>S. spectabilis</i> NRRL2494	Wildtyp	Mason et al., 1961
<i>S. lividans</i> TK23	Spc ^R	Hopwood et al., 1983
<i>S. lividans</i> TK64	<i>pro-2 str-6</i>	Hopwood et al., 1983

Tab. 2: Verwendete Plasmide und Vektoren.

Plasmid	Genotyp/Eigenschaft	Replikon	Resistenz	Referenz
pACYC184		p15A	Cm ^R , Tc ^R	Chang & Cohen, 1978
pCDC201	<i>Ptac, lacI^q, PstIM</i>	pBR322	Ap ^R	Jack, unveröffentlicht
pCR [®] -BluntII-TOPO [®] -Vektor	<i>Plac, lacZα, ccdB</i>	pUC	Kan ^R , Zeocin	Bernard et al., 1993
pDH5	<i>lacZα, lacI</i>	pUC, fl	Ap ^R , Ts ^R	Hillemann et al., 1991
pFIS251b	<i>rep1, rep2, mrpS, mrpA</i>	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R	Haug, unveröffentlicht
pIC19H	<i>lacZα</i>	pUC	Ap ^R	Marsh et al., 1984
pIJ702	<i>mel</i>	pIJ101	Ts ^R	Katz et al., 1983
pJOE551.1		pUC	Ap ^R , Ts ^R	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE1082.1	temperatursensitiver <i>E.coli-Streptomyces</i> -Shuttlevektor	pUC, pSG5	Ap ^R , Kan ^R	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE2010.2	temperatursensitiver <i>E.coli-Streptomyces</i> -Shuttlevektor	pUC, pSG5	Ap ^R , Kan ^R , Tsr ^R	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE2114	2 x <i>res, mel</i>	pUC	Ap ^R	Altenbuchner et al., 1992
pJOE3005.1	<i>spcA, spcT, spcN, spcZ*</i> (aus <i>S. spectabilis</i>)	pUC	Ap ^R	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE3065.1	Expressionsvektor mit <i>rhaP_{BAD}</i> und PT7, His ₆	pUC	Ap ^R	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE3075.3	Expressionsvektor mit <i>rhaP_{BAD}</i> und PT7, <i>malE</i> ,	pUC	Ap ^R	Stumpp et al., 2000
pJOE3084.1		pUC	Ap ^R , Apr ^R	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE4132.1	<i>rep1, rep2, mrpS, mrpA, parA, parB</i>	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R	Altenbuchner, unveröffentlicht
pUC18	<i>lacZα</i>	pUC	Ap ^R	Norrander et al., 1983
Sfcos10	DNA-Fragment (XhoII, partial) aus <i>S. flavopersicus</i> in Supercos-1	pBR322, SV40	Ap ^R , Kan ^R	Lyutzkanova, unveröffentlicht
Supercos-1	Cosmid-Vektor	pBR322, SV40	Ap ^R , Kan ^R	Wahl et al., 1987
pWHM4	<i>lacZα, Perme*</i>	pUC, pWHM4*	Ap ^R , Ts ^R	Vara, unveröffentlicht

Ap^R = Ampicillin-Resistenz; Apr^R = Apramycin-Resistenz; Cm^R = Chloramphenicol-Resistenz; Kan^R = Kanamycin-Resistenz; Tc^R = Tetracyclin-Resistenz; Ts^R = Thiostrepton-Resistenz

Tab. 3: In dieser Arbeit entstandene Plasmide.

Plasmid	Genotyp/relevante Eigenschaften	Replikon	Resistenz
pTST35.3	ϕC31 <i>att</i> -Site, <i>int</i> , Tn5494	pUC	Ap ^R , Tc ^R
pTST59.1	Cosmid-Vektor mit <i>att</i> -Site und Integrasegen von ϕC31 zur Integration ins Genom von Streptomyceten	pBR322, SV40	Ap ^R , Kan ^R
pTST63	Cosmid aus <i>S. flavopersicus</i> -Genbank mit Spc-Biosyntheseegenen	pBR322, SV40	Ap ^R , Kan ^R
pTST69	~ 6,6 kb- <i>Sma</i> I-Fragment aus pTST63 in pIC19H	pUC	Ap ^R
pTST72	einige Spc-Biosyntheseene in pJOE2114.1 zur Tn-Mutagenese und Sequenzierung	pUC	Ap ^R
pTST78.2	<i>spcB</i> (PCR, ab 10.815 bp) aus <i>S. flavopersicus</i> in pJOE3065.1; His ₆	pUC	Ap ^R
pTST95.1	<i>spcN</i> (PCR) aus <i>S. spectabilis</i> in pJOE3075.3; His ₆	pUC	Ap ^R
pTST99.1	<i>spcB</i> (PCR, ab 10.843 bp) aus <i>S. flavopersicus</i> in pWHM4	pUC, pWHM4	Ap ^R , Ts ^R
pTST103.1	<i>E. coli</i> /Streptomyces-Vektor mit Polylinker und His-Tag	pUC, pIJ101	Ap ^R , Ts ^R
pTST108.2	pUC-Derivat mit Ts ^R ; Δ <i>Pst</i> I	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST108 Pep42	potentielles Peptid-Synthetase-Fragment (PCR) in pTST108.2	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST108 Pep58	potentielles Peptid-Synthetase-Fragment (PCR) in pTST108.2	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST113.29	<i>spcB</i> (PCR, ab 10.818 bp) aus <i>S. flavopersicus</i> in pTST103.1	pUC, pIJ101	Ap ^R , Ts ^R
pTST117.7	PCR-Fragmente für Genaustausch in pCR [®] -BluntII-TOPO [®] -Vektor	pUC	Kan ^R , Zeocin
pTST128.4	PCR-Fragmente für Genaustausch mit Ts ^R -Gen in pJOE1082.1	pUC, pIJ101	Ap ^R , Ts ^R , Kan ^R
pTST145.1	<i>spcK</i> (PCR) aus <i>S. flavopersicus</i> in pJOE3075.3; His ₆	pUC	Ap ^R
pTST158.1	<i>spcF</i> -Fragment (PCR) in pTST108.2; zur Inaktivierung	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST159.1	<i>spcB</i> -Fragment (PCR) in pTST108.2; zur Inaktivierung	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST161.1	<i>spcR</i> -Fragment (PCR) in pTST108.2; zur Inaktivierung	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST162.1	Fragmente stromaufwärts und –abwärts von <i>spcG</i> (PCR) in pTST108.2	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST163.5	<i>strB1</i> aus <i>S. griseus</i> (PCR) in pTST108.2; für Genaustausch	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST166.1	Δ <i>spcH</i> in pTST108.2; zur Inaktivierung	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST167.2	mutiertes <i>spcK</i> in pTST108.2; zur Inaktivierung	pUC	Ap ^R , Ts ^R
pTST180.1	<i>spcF</i> -Fragment (PCR) in pTST108.2 mit Apr ^R ; zur Inaktivierung	pUC	Ap ^R , Ts ^R , Apr ^R
pTST181.1	<i>spcR</i> -Fragment (PCR) in pTST108.2 mit Apr ^R ; zur Inaktivierung	pUC	Ap ^R , Ts ^R , Apr ^R
pTST182.1	<i>spcB</i> -Fragment (PCR) in pTST108.2 mit Apr ^R ; zur Inaktivierung	pUC	Ap ^R , Ts ^R , Apr ^R
pTST183.1	Fragmente stromaufwärts und –abwärts von <i>spcG</i> (PCR) in pTST108.2 mit Apr ^R ; zur Inaktivierung	pUC	Ap ^R , Ts ^R , Apr ^R
pTST184.1	<i>strB1</i> aus <i>S. griseus</i> (PCR) in pTST108.2 mit Apr ^R ; für Genaustausch	pUC	Ap ^R , Ts ^R , Apr ^R
pTST188.1	<i>spcB</i> -Fragment in pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i> ; zur Inaktivierung	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R

Plasmid	Genotyp/relevante Eigenschaften	Replikon	Resistenz
pTST189.1	Δ <i>spcH</i> in pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i> ; zur Inaktivierung	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST191.1	<i>spcB</i> -Fragment in pTST108.2 mit Apr ^R und instabilem SCP2- <i>ori</i> ; zur Inaktivierung	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R , Apr ^R
pTST195.1	<i>spcF</i> -Fragment in pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i> ; zur Inaktivierung	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST196.1	<i>spcR</i> -Fragment in pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i> ; zur Inaktivierung	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST197.1	mutiertes <i>spcK</i> in pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i> ; zur Inaktivierung	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST200.1	Fragmente stromaufwärts und –abwärts von <i>spcG</i> in pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i> ; zur Inaktivierung	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST202.1	<i>spcB</i> -Fragment in Shuttlevektor aus pGM11 und pACYC184	p15A, pSG5	Cm ^R , Kan ^R
pTST203.2	Δ <i>spcK</i> in Shuttlevektor aus pGM11 und pACYC184	p15A, pSG5	Cm ^R , Kan ^R
pTST204.1	<i>spcR</i> -Fragment in Shuttlevektor aus pGM11 und pACYC184	p15A, pSG5	Cm ^R , Kan ^R
pTST220.1	<i>Bam</i> HI-Fragment aus pTST264 mit <i>netP1</i> und Δ <i>netP2</i> in pFIS251b	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST228.1	<i>Eco</i> RI-Fragment aus pTST264 mit <i>netP1</i> und Δ <i>netP2</i> in pFIS251b	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST245.2	<i>spcF</i> -Fragment (PCR) in pDH5; zur Inaktivierung	pUC, fl	Ap ^R , Ts ^R
pTST246.1	<i>spcB</i> -Fragment (PCR) in pDH5; zur Inaktivierung	pUC, fl	Ap ^R , Ts ^R
pTST247.6	<i>spcR</i> -Fragment (PCR) in pDH5; zur Inaktivierung	pUC, fl	Ap ^R , Ts ^R
pTST250.8	pTST59.1 mit Oligonukleotid s3673	pBR322, SV40	Ap ^R , Kan ^R
pTST257.7	pTST250.8 mit Ts ^R anstatt Kan ^R	pBR322, SV40	Ap ^R , Ts ^R
pTST264	<i>S. flavopersicus</i> -Genbank mit <i>netP1</i> und <i>netP2</i> in pFIS251b	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST270.1	<i>spcH</i> (PCR) aus <i>S. flavopersicus</i> in pJOE3075.3	pUC	Ap ^R
pTST279.3	<i>spcH</i> (PCR) aus <i>S. flavopersicus</i> in pJOE3075.3; His ₆	pUC	Ap ^R
pTST283.2	<i>Eco</i> RV-Fragment aus pTST264 mit <i>netP1</i> und <i>netP2</i> in pFIS251b	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST285.1	<i>spcB</i> (PCR, ab 10.863 bp) aus <i>S. flavopersicus</i> in pJOE3075.3	pUC	Ap ^R
pTST286.1	<i>spcB</i> (PCR, ab 10.863 bp) aus <i>S. flavopersicus</i> in pJOE3075.3; His ₆	pUC	Ap ^R
pTST287.2	<i>spcB</i> (PCR, ab 10 815 bp) aus <i>S. flavopersicus</i> in pJOE3065.1	pUC	Ap ^R
pTST288.2	<i>Eco</i> RV-Fragment aus pTST264 mit Δ <i>netP1</i> und <i>netP2</i> in pFIS251b	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R
pTST293.1	<i>Eco</i> RV-Fragment aus pTST264 mit <i>netP1</i> und Δ <i>netP2</i> in pFIS251b	pUC, SCP2	Ap ^R , Ts ^R

His₆: Fusion mit Histidin-Codons; Ap^R = Ampicillin-Resistenz; Apr^R = Apramycin-Resistenz; Cm^R = Chloramphenicol-Resistenz; Kan^R = Kanamycin-Resistenz; Ts^R = Thiostrepton-Resistenz

Tab 4: Verwendete Oligonukleotide. Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen hervorgehoben. In Kapitel 4 sind die Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierungen verwendet wurden, in Klammern hinter den Oligonukleotiden angegeben.

Nummer	5'-3'-Sequenz	Verwendung
UP	Cy5-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung
RP	Cy5-CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung
s2143	GCAGGACTTCTACTACTAC	Sequenzierung in pTST117.7
s2172	ACTGTTTCATCGAGCTGCTG	Sequenzierung in pTST117.7
s2251	AAAAGGATCCGCTATGGTCCCCCTCCCAT	PCR von <i>spcB</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s2252	AAAAGGATCCACCCCGGCTTGTCTTTGCCT	PCR von <i>spcB</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s2779	GTGATGACGTCGCGG	Sequenzierung in pTST72
s2780	GTGGCGTGAAGTGGC	Sequenzierung in pTST72
s2781	GGTGCGGTGGTCCAG	Sequenzierung in pTST72
s2782	CTCGTCCTCATCGACG	Sequenzierung in pTST72
s2797	CCAGGTGTGGTCGTTG	Sequenzierung in pTST72
s2798	CGTCTTCGACCGCGGC	Sequenzierung in pTST72
s2799	CCCCGAGCACCGACG	Sequenzierung in pTST72
s2816	GCCGCCCGGATACGAC	Sequenzierung in pTST72
s2852	AAAACATATGAGGGGCGCAATCATTGGC	PCR von <i>spcH</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s2853	AAAAGATCTCGCCGGGAGCAGGTCCTCGG	PCR von <i>spcH</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s2854	AAAACATATGCAGAATCTTCCTGAAAAG	PCR von <i>spcN</i> aus <i>S. spectabilis</i>
s2855	AAAAGATCTGGCTGCGGATCCGCCCGCCG	PCR von <i>spcN</i> aus <i>S. spectabilis</i>
s2906	AAAACAATTGGACCGGCATTCTCGCGG	PCR von <i>spcB</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s2907	AAAAGAATTCTTCTGCGGGCGCGGTCTC	PCR von <i>spcB</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s2913	ACGACGACGAGGCCATGG	PCR Fragment stromabwärts von <i>strB1</i> aus <i>S. griseus</i>
s2914	TCGGTCACGTCGTAACGC	PCR Fragment stromaufwärts von <i>strB1</i> aus <i>S. griseus</i>
s2915	AGCCGTCGGTCCTGGCCTGAGAGCGACCACTCAACTCCGT	PCR <i>spcG</i> aus <i>S. flavopersicus</i> , komplementär zu s2918
s2916	CCACCTGATGGAGGAGAGTCGTGACCGAGCTGACCCCGAC	PCR <i>spcG</i> aus <i>S. flavopersicus</i> , komplementär zu s2917
s2917	GTCGGGGTTCAGCTCGGTCACGACTCTCCTCCATCAGGTGG	PCR Fragment stromabwärts von <i>strB1</i> aus <i>S. griseus</i> , komplementär zu s2916
s2918	ACGGAGTTGAGTGGTCGCTCTCAGGCCAGGACCGACGGC	PCR Fragment stromaufwärts von <i>strB1</i> aus <i>S. griseus</i> , komplementär zu s2915
s3021	CGAATTCTAGAAGCTTGTTAACGGATCCCATCATCATCATCATTAAGAGCT	Oligo mit Polylinker-Sequenz und 6 His-Codons
s3022	CTTAATGATGATGATGATGATGGGATCCGTTAACAAGCTTCTAGAATTCGCATG	Oligo mit Polylinker-Sequenz und 6 His-Codons
s3023	AAAAGCATGCCGGCTATGGTCCCCCTCCC	PCR von <i>spcB</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3034	AAAGAATTCTTACSTCSGGSTCSACSGGS	degenerierter Primer zur Amplifikation von Peptid-Synthetasegenen
s3035	AAATCTAGACTSACCTCSCCGRGCTCGAT	degenerierter Primer zur Amplifikation von Peptid-Synthetasegenen
s3077	AAA <u>ACTGCAG</u> CTAGGCTGCGGATCCG	PCR von <i>spcN</i> aus <i>S. spectabilis</i>

Nummer	5'-3'-Sequenz	Verwendung
s3140	GCGGAAGCCGCGGATCTTCA	Genbank-Screening mit LightCycler-PCR
s3141	GCCGCCGGCTCCTCCAGC	Genbank-Screening mit LightCycler-PCR
s3142	GATGCGCGGCCGTGACGC	Genbank-Screening mit LightCycler-PCR
s3143	AGGCTGAAGGGCGTGGCGGT	Genbank-Screening mit LightCycler-PCR
s3192	ATCAGGGCATCGCCCTCG	Sequenzierung in pTST117.7
s3263	ACCACCGGCAGGCCNAARGSNGT	degenerierter Primer zur Amplifikation von Peptid-Synthetasegenen (CODEHOP)
s3264	TGGACGGTGGTCTCGGTNRKNCCRTA	degenerierter Primer zur Amplifikation von Peptid-Synthetasegenen (CODEHOP)
s3266	GGCGCGGCGGTCNAVYTTNCC	degenerierter Primer zur Amplifikation von Peptid-Synthetasegenen (CODEHOP)
s3276	AAAACATATGCGTGGAATCCTCTTGGC	PCR von <i>spcK</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3277	AAAAGGATCCCACGCGTCTCGGCCG	PCR von <i>spcK</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3328	AAAAGGATCCTCCTCCCGCCCATCACCG	PCR <i>spcR</i> -Fragment aus <i>S. flavopersicus</i> zur Inaktivierung
s3329	AAAAGAATTTCGGCCATCCGCTGCTCACG	PCR <i>spcR</i> -Fragment aus <i>S. flavopersicus</i> zur Inaktivierung
s3330	AAAAGGATCCAGACGACCACGACGCCG	PCR <i>spcF</i> -Fragment aus <i>S. flavopersicus</i> zur Inaktivierung
s3331	AAAAGAATTTCGGCCGAGAAGTGGTCGT	PCR <i>spcF</i> -Fragment aus <i>S. flavopersicus</i> zur Inaktivierung
s3332	AAAAGGATCCTCATGCACCTGCCCTATCT	PCR <i>spcB</i> -Fragment aus <i>S. flavopersicus</i> zur Inaktivierung
s3333	AAAAGAATTCCCCCACGAGGGAACGC	PCR <i>spcB</i> -Fragment aus <i>S. flavopersicus</i> zur Inaktivierung
s3334	AAAAAGATCTGGCCCGCAAGGAGTGGCG	PCR Fragment stromabwärts von <i>spcG</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3335	AAAAGAATTACGGCGGTCATTCGGAAGCC	PCR Fragment stromabwärts von <i>spcG</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3336	AAAAGAATTCCGACATGCCGTCGGTCCT	PCR Fragment stromaufwärts von <i>spcG</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3337	AAAAGGTACCGCGTCGAGAGTACGCAGAG	PCR Fragment stromaufwärts von <i>spcG</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3338	AAAAGAATTTCGATGGAGGGAGGTCATGAG	PCR <i>strB1</i> aus <i>S. griseus</i>
s3339	AAAAGAATTCTCAGAACTGGTACGTCTCA	PCR <i>strB1</i> aus <i>S. griseus</i>
s3340	CACCAAGCCGTCGCGAT	PCR-Nachweis von Ts ^R
s3341	GCGCGATTCCGAGGGAA	PCR-Nachweis von Ts ^R
s3456	AAAAGGATCCTCAACCCCGGCTTGTCTTTGC	PCR von <i>spcB</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3457	AAAAAGATCTTCACGCCGGGAGCAGGTCC	PCR von <i>spcH</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3463	AAAACATATGTCAGAGACACAACGCATACG	PCR von <i>spcB</i> aus <i>S. flavopersicus</i>
s3549	GAGCGGGGCGAGCCGGTA	Nachweis von Deletion bzw. Austausch von <i>spcG</i>
s3550	GCGGAGCTGATCAGGGAGG	Nachweis von Deletion bzw. Austausch von <i>spcG</i>
s3673	CTAGACCTTAGGGTTAACCCCTAAGGT	Oligo für Genbankcosmid-Vektor

3.2 Chemikalien und Enzyme

Abbott Laboratories, Chicago, USA	Cottonseed Flour, Dihydrostreptomycin, Dried Brewer's Yeast
Amersham Bioscience, Freiburg	[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP, [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP, Auto Read Sequenzier-Kit, ReproGel™, Sephadex G-50
Biomaster GmbH, Köln	Taq-DNA-Polymerase
Biomol GmbH, Hamburg	Ampicillin, CsCl, NAD(P) ⁺ , NAD(P)H
Bio-Rad Laboratories, München	APS, „Bio-Rad Protein-Assay“ zur Proteinbestimmung, SDS-Längenstandard für Proteine, TEMED
Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf	Easy Pure, Gelelutionskit
Cronex 4, DuPont, Baden-Baden	Röntgenfilm
Difco Laboratories, Heidelberg	Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Beefextrakt, Casamino-Acid, Euro-Agar, Hefeextrakt, Trypton,
GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe	DNA-Längenstandard
Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz	Amberlite IRC-50, DMSO, Dowex 2 x 8, EDTA, NZ Amine TypA
ICN Biomedicals GmbH, Eschwege	Soja-Öl
Invitrogen GmbH, Karlsruhe	PCR-Topo-Kit
Merck KGaA, Darmstadt	Chemikalien p.a., Kieselgel-Platten 60 F ₂₅₄ , Malzextrakt
New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	Restriktionsendonukleasen
Oxoid GmbH, Wesel	Soja-Pepton, Soja-Trypton
Qiagen GmbH, Hilden	Ni-NTA-Agarose, Qiagen Plasmid Midi-Kit, Qiaprep Spin Miniprep-Kit, Qiaquick PCR-Reinigungskit
Roche Diagnostics, Mannheim	alkalische Phosphatase, Expand Long Template PCR System, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, LightCycler-DNA Master SYBR GreenI, Nylon-Membranen, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase
Roth GmbH & Co, Karlsruhe	30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30), Dextrin, dNTPs für PCR, Ethanol p.a., IPTG, Isopropanol, SDS-Längenstandard für Proteine, Sucrose, Tris
Schleicher & Schuell GmbH, Dassel	Faltenfilter, Sterilfilter, Whatman-Papier
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	Feinchemikalien, PEG 6.000
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	Casein-Hydrolysat, Lysozym, <i>myo</i> -Inositol, PEG 1.000, Spectinomycin, Sperminetetrahydrochlorid, Streptomycin
Tetnal Photowerk GmbH, Norderstedt	Fotochemikalien

3.3 Medien, Puffer und Lösungen

3.3.1 Medien

<u>Fermentationsmedium</u>	MOPS	15 g (gelöst in 700 ml H ₂ O, pH 7,5 mit 50 % NaOH)
	Glucose	102 g
	Cottonseed Flour	32 g
	Dried Brewer's Yeast	7,2 g
	K ₂ SO ₄	0,18 g
	H ₂ O	ad 1 l
<u>HT</u> (Pridham et al., 1957)	Hefeextrakt	1 g
	Beefextrakt	1 g
	Dextrin	10 g
	NZ Amine TypA	2 g
	CoCl ₂ · 7 H ₂ O [20 g/l]	1 ml
	H ₂ O	ad 1 l
	pH 7,3	
	für Agar-Platten wurde zu 400 ml zugegeben:	
Euro-Agar	8 g	
<u>LB₀</u> (Luria et al., 1960)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	pH 7,2	
	für Agarplatten wurde zu 400 ml zugegeben:	
Euro-Agar	6,4 g	
<u>M3-Medium</u>	Dextrin	8 g
	Soja-Pepton	2 g
	CaCO ₃	0,2 g
	H ₂ O	ad 200 ml
	pH 7,0	
<u>M9-Medium</u> (Sambrook et al., 1989)	Euro-Agar	7,5 g
	H ₂ O	ad 450 ml
	nach dem Autoklavieren wurde zugegeben:	
	10 x M9-Salze	50 ml
	1 M MgSO ₄	0,5 ml
	0,1 M CaCl ₂	0,5 ml
	20 mg/ml Thiamin	50 µl
	20 % C-Quelle	5 ml

<u>10 x M9-Salze</u>	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	4,25 g
	KH ₂ PO ₄	1,5 g
	NaCl	0,25 g
	NH ₄ Cl	0,5 g
	H ₂ O	ad 50 ml
<u>M79-Medium</u>	Glucose	10 g
	Bacto-Pepton	10 g
	10 % Casein-Hydrolysat	10 ml
	Hefeextrakt	2 g
	NaCl	6 g
	H ₂ O	ad 1 l
	pH 7,0	
<u>Meat-Medium</u>	Glucose	10 g
	Bacto-Pepton	5 g
	Beefextrakt	3 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
<u>myo-Inositol-Medium</u> (Walker, 1990)	Glucose	0,1 g
	myo-Inositol	1 g
	Trypton	2 g
	Soja-Pepton	2 g
	Hefeextrakt	0,4 g
	K ₂ HPO ₄	34,8 mg
	H ₂ O	ad 200 ml
<u>R2</u> (Hopwood et al., 1985)	Sucrose	41,2 g
	K ₂ SO ₄	0,1 g
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	4,05 g
	Glucose	4 g
	Casamino-Acid (vitamin-frei)	0,04 g
	Bacto-Agar	8,8 g
	H ₂ O	ad 320 ml
	nach dem Autoklavieren wurde zugegeben:	
	Spurenelement-Lösung (s. 3.3.3)	1 ml
	0,5 % KH ₂ PO ₄	4 ml
	3,68 % CaCl ₂ · 2 H ₂ O	32 ml
	0,25 M TES-Puffer, pH 7,2	40 ml
	1 M NaOH	2 ml
	10 % Hefeextrakt	20 ml
	20 % Prolin	6 ml
<u>R2-Softagar (0,8 %)</u>	Zusammensetzung s. R2, Zugabe von 0,64 g LMP-Agarose pro 80 ml	

<u>R9</u>	Glucose	8 g
	K ₂ SO ₄	0,2 g
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	3,28 g
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	5,88 g
	NaNO ₃	1,6 g
	KCl	0,8 g
	MgSO ₄	0,16 g
	Casamino-Acid	0,32 g
	FeSO ₄	0,016 g
	MOPS	4,6 g
	Hefeextrakt	4 g
	Sucrose	164 g
	Bacto-Agar	17,6 g
	H ₂ O	ad 800 ml
	pH 7,4 nach dem Autoklavieren wurde 1,6 ml Spurenelement-Lösung (s. 3.3.3.) zugegeben	
<u>Seed-Medium</u>	Soja-Pepton	15 g
	Glucose	15 g
	CaCO ₃	0,5 g
	NaCl	2,5 g
	H ₂ O	ad 1 l
<u>SGGP-Medium</u>	Bacto-Pepton	4 g
	Hefeextrakt	4 g
	Glycin	2 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
	H ₂ O	ad 960 ml
	pH 7,0 - 7,2 nach dem Autoklavieren wurden 20 ml 50 % Glucose und 20 ml 0,5 M KH ₂ PO ₄ zugegeben	
<u>Soja-Mannitol-Medium</u>	Soja-Pepton	20 g
	Mannitol	20 g
	H ₂ O	ad 1 l
<u>Soja-Medium</u>	Soja-Pepton	20 g
	Glucose	20 g
	CaCO ₃	1 g
	H ₂ O	ad 1 l
<u>Spectinomycin- Produktionsmedium</u> (Oliver et al., 1961)	Soja-Pepton	4 g
	Glucose	5 g
	NaCl	1 g
	CaCO ₃	0,2 g
	Soja-Öl	1 g
	H ₂ O	ad 200 ml

<u>TSB</u>	Soja-Trypton H ₂ O	30 g ad 1 l
<u>TSS</u> (Chung et al., 1989)	LB ₀ (pH 6,5) PEG 6.000 DMSO MgCl ₂	82,5 ml 10 g 5 ml 50 mM
<u>TY</u>	Trypton Hefeextrakt H ₂ O pH 7,2	10 g 5 g ad 1 l
<u>YEME</u> (Hopwood et al., 1985)	Hefeextrakt Bacto-Pepton Malzextrakt Glucose Sucrose H ₂ O nach dem Autoklavieren wurden zugegeben: 1 M MgCl ₂ 10 % Glycin	3 g 5 g 3 g 10 g 270 g ad 1 l 5 ml 50 ml

Alle Medien wurden autoklaviert und danach Antibiotika (Tab. 5) und andere Zusätze zugegeben.

Tab. 5: Antibiotika und andere Medienzusätze.

	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml] zur Anzucht von <i>E. coli</i>	Endkonzentration [µg/ml] zur Anzucht von Streptomyceten
Apramycin	50 in H ₂ O	50	25
Ampicillin	100 in 50 % EtOH	100	
Chloramphenicol	25 in 50 % EtOH	25	
Hygromycin	50 in H ₂ O	100	50
Kanamycin	50 in 0,1 N NaOH	50	15
Nalidixinsäure	20 in 0,1 N NaOH	40	
Spectinomycin	40 in H ₂ O	100	100
Tetrazyklin	15 in 50 % EtOH	15	
Thiostrepton	50 in DMSO		15 (Flüssigkultur) 50 (Agarplatten) 400 (Überschichten)
IPTG	100 mM in 50 % EtOH	0,15 mM	
Rhamnose	20 % in H ₂ O	0,2 %	
X-Gal	80 in Dimethylformamid	80	

3.3.2 Puffer

<u>Auftragspuffer für DNA-Elektrophorese (10x)</u>	Xylencyanol	0,25 g
	Bromphenolblau	0,25 g
	87 % Glycerin	57,5 ml
	0,5 M EDTA, pH 8,0	ad 100 ml
<u>Auftragspuffer für SDS-PAGE (5x)</u>	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	1 ml
	10 % SDS	1,6 ml
	β-Mercaptoethanol	0,4 ml
	87% Glycerin	4,6 ml
	Bromphenolblau	0,8 mg
	H ₂ O	0,2 ml
<u>Lysepuffer (Lee & Rasheed, 1990)</u>	20 % Glucose	22,7 ml
	2 M Tris/HCl, pH 8,0	6,25 ml
	0,5 M EDTA, pH 8,0	10 ml
	H ₂ O	ad 0,5 l
vor Gebrauch zugeben:	Lysozym	10 mg/ml
	RNaseA	0,25 mg/ml

Puffer zur Herstellung von *Streptomyces*-Protoplasten und zur Transformation:
(Hopwood et al., 1985)

<u>L-Puffer</u>	Sucrose	10,3 g
	K ₂ SO ₄	0,025 g
	Spurenelement-Lösung	0,2 ml
	MgCl ₂	0,203 g
	H ₂ O	ad 80 ml
	nach dem Autoklavieren wurden zu 80 ml zugegeben:	
	0,5 % KH ₂ PO ₄	1 ml
	3,68 % CaCl ₂	1 ml
	0,25 M TES, pH 7,2	10 ml
	H ₂ O	9 ml

<u>P-Puffer</u>	Grundlösung s. L-Puffer	
	nach dem Autoklavieren wurden zugegeben:	
	0,5 % KH ₂ PO ₄	1 ml
	3,68 % CaCl ₂	10 ml
	0,25 M TES, pH 7,2	10 ml

<u>T-Puffer</u>	PEG 1.000	2,5 g
	autoklavieren, vor Gebrauch schmelzen und folgende Reagentien zugeben:	
	2,5 % Sucrose	7,5 ml
	0,5 % KH ₂ PO ₄	0,1 ml
	2,5 % K ₂ SO ₄	0,1 ml
	1 M MgCl ₂	0,1 ml
	5 M CaCl ₂	0,2 ml
	1 M Tris/Maleinsäure	0,5 ml

Puffer zur Proteinreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie:

<u>Waschpuffer 1</u>	2 M Tris/HCl, pH 7,5	10 ml
	NaCl	5,8 g
	1 M DTT	1 ml
	H ₂ O	ad 1 l

<u>Waschpuffer 2</u>	2 M Tris/HCl, pH 7,5	10 ml
	NaCl	8,8 g
	1 M Imidazol	50 ml
	1 M DTT	1 ml
	H ₂ O	ad 1 l

<u>Elutionspuffer</u>	2 M Tris/HCl, pH 7,5	10 ml
	NaCl	5,8 g
	1 M Imidazol	200 ml
	1 M DTT	1 ml
	H ₂ O	ad 1 l

Puffer zur Herstellung von Phagenlysaten:

<u>Puffer A</u>	2 M Tris/HCl, pH 8,0	20 µl
	2 M MgCl ₂	3 µl
	0,5 M EDTA, pH 8,0	4 µl
	Mercaptoethanol	1 µl
	H ₂ O	ad 2 ml

<u>Puffer M1</u>	1 M Tris/HCl, pH 7,5	3 µl
	Spermidin + Putrescin-Lösung	300 µl
	0,1 M ATP	75 µl
	Mercaptoethanol	1 µl
	2 M MgCl ₂	4,5 µl
	H ₂ O	ad 500 µl

<u>Spermidin + Putrescin-Lösung</u>	Spermidin-Trichlorid	63 mg
	Putrescin-Dichlorid	80 mg
	H ₂ O	ad 5 ml
	neutralisieren mit 1 - 2 Tropfen 1 M Tris/HCl, pH 7,5	

<u>0,1 M ATP</u>	ATP (Dinatrium-Salz) H ₂ O pH 7,0 mit 1 N NaOH	60 mg ad 1 ml
<u>SM-Phagenpuffer</u>	NaCl MgSO ₄ 1 M Tris/HCl, pH 7,5 2% Gelatine-Lösung H ₂ O	5,8 g 2 g 50 ml 5 ml ad 1 l
<u>SDS-Laufpuffer (5x)</u>	Tris SDS Glycin H ₂ O	15,1 g 10 g 94 g ad 1 l
<u>TAE (50x)</u>	Tris Eisessig 0,5 M EDTA, pH 8,0 H ₂ O	242 g 57,1 ml 100 ml ad 1 l
<u>TBE (10x)</u>	Tris Borat EDTA H ₂ O	121,14 g 51,32 g 3,72 g ad 1 l
<u>TE 10.01</u>	2 M Tris/HCl, pH 8,0 0,5 M EDTA, pH 8,0 H ₂ O	5 ml 0,2 ml ad 1 l

3.3.3 Lösungen

<u>Coomassie-Färbelösung</u>	Coomassie Brilliant BlueR250 Methanol Ethanol Eisessig H ₂ O	2 g 50 ml 425 ml 100 ml 425 ml
<u>Entfärbelösung für SDS-PAGE</u>	Ethanol Eisessig H ₂ O	450 ml 100 ml 450 ml

Lösungen zur Hybridisierung:

<u>Denaturierungslösung</u>	NaOH NaCl H ₂ O	20 g 87,66 g ad 1 l
<u>Neutralisierungslösung</u>	NaCl 1 M Tris/HCl, pH 7,5 H ₂ O	87,66 g 500 ml ad 1 l
<u>20 x SSC</u>	NaCl Na ₃ Citrat · 2 H ₂ O H ₂ O filtrieren	175,3 g 88,2 g ad 1 l
<u>Hybridisierungslösung für DIG-markierte Sonden</u>	20 x SSC Blockingreagenz 10 % N-Lauroylsarcosinat 10 % SDS H ₂ O bei 70°C lösen	25 ml 1 g 1 ml 200 µl 75 ml
<u>Hybridisierungslösung für radioaktive Sonden</u>	20 x SSC Blockingreagenz 10 % N-Lauroylsarcosinat 10 % SDS Formamid H ₂ O	25 ml 2 g 1 ml 200 µl 50 ml 25 ml
<u>Waschlösungen</u>	2 x SSC / 0,1 % SDS 0,1 x SSC / 0,1 % SDS	
<u>Puffer 1</u>	Maleinsäure NaCl H ₂ O pH-Wert mit NaOH-Plätzchen auf 7,5 einstellen	23,22 g 17,53 g ad 2 l
<u>Puffer 2</u>	Blockingreagenz Puffer 1 bei 70°C lösen	1 g 100 ml
<u>Puffer 3</u>	Tris NaCl MgCl ₂ H ₂ O pH 9,5	2,43 g 1,17 g 2,03 g ad 200 ml
<u>Waschpuffer</u>	Tween 20 Puffer 1	3 ml ad 1 l

<u>Spurenelement-Lösung</u>	ZnCl ₂	40 mg
	Fe ³⁺ Cl ₃ · 6 H ₂ O	200 mg
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mg
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	10 mg
	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	10 mg
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	10 mg
	H ₂ O	ad 1 l
 <u>Tris/Maleinsäure-Lösung</u>	 1 M Tris-Lösung mit 1 M Maleinsäure auf pH 8,0 titrieren	

3.4 Stammhaltung und Bakterienanzucht

3.4.1 Dauerkulturen von *E. coli*

Dauerkulturen von *E. coli* wurden hergestellt, indem 5 ml LB-Medium mit Einzelkolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Roller (New Brunswick, TC-7) inkubiert wurden. Die Zellen wurden 5 min bei 4.500 rpm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0) und das Pellet anschließend in 3 ml TY mit 50 % Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur kurzfristigen Aufbewahrung der Stämme wurden Strichkolonien auf Agarplatten angelegt und bei 4°C gelagert.

3.4.2 Dauerkulturen von *Streptomyces*

Einzelkolonien von *Streptomyces* wurden auf HT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und bis zur vollständigen Sporulation bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Bakterien mit 5 ml sterilem H₂O mit leichtem Druck einer Pipette von der Platte abgeschwemmt und durch nicht adsorbierende Baumwolle filtriert, wobei das Myzel von den Sporen abgetrennt wurde. Das Filtrat wurde 10 min bei 4.000 rpm in einer Heraeus Megafuge 1.0 zentrifugiert, das Pellet in 1 ml 20 % Glycerin aufgenommen und als Sporensuspension bei -20°C gelagert.

Konnten auf diese Weise keine Sporen gewonnen werden, wurden Myzelkulturen von den Stämmen angelegt. Dazu wurden 5 ml einer in YEME-Medium gut angewachsenen Kultur abzentrifugiert (5 min, 4.500 rpm, Heraeus Megafuge 1.0) und das Pellet anschließend in 3 ml TY mit 50 % Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.4.3 Anzuchtbedingungen

Ausgehend von 5 ml Übernachtskulturen in LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum, die mit *E. coli*-Einzelkolonien beimpft und bei 37°C im Roller inkubiert wurden, wurden Hauptkulturen im selben Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C im Schüttler (New Brunswick, GIO Gyrotory Shaker) bis zur gewünschten Zelldichte angezogen. Das Wachstum wurde bei 600 nm im Photometer (Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02) verfolgt.

Vereinzelungsausstriche von *E. coli* auf selektiven Agarplatten wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert.

Zur Anzucht von Streptomyceten wurden 20 ml YEME in 100 ml-Schikane-Kolben mit 20 µl Sporen-Suspension angeimpft, ca. 3 Tage bei 30°C im Schüttler inkubiert, im Mikroskop auf Kontamination untersucht und daraus Hauptkulturen in 500 ml-Kolben mit Schikanen oder Stahlspirale im Verhältnis 1:100 im selben Medium angeimpft. Ihre Inkubationsdauer lag zwischen 32 und 36 Stunden bei 30°C.

3.5 Proteinanalytische Methoden

3.5.1 Herstellung eines Zellextrakts

Ausgehend von einer 5 ml *E. coli*-Übernachtskultur in LB mit Antibiotikum wurde die Tageskultur 1:100 mit demselben Medium verdünnt und im Brutraum bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der Zelldichte wurde die OD₆₀₀ verfolgt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 wurden Zellen, die Plasmide mit dem T7-Promotor-System trugen, mit 0,4 mM IPTG induziert, während Zellen, die Plasmide mit Rhamnose-Promotor enthielten, mit 0,2 % Rhamnose induziert wurden. Um die Bildung von Inclusion bodies gering zu halten, wurden alle Kulturen nach der Induktion für 4 - 7 h bei maximal 30°C inkubiert. Ein Kulturvolumen, das 10 OD₆₀₀ Zellen entsprach, wurde abzentrifugiert und in 1 ml Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,0) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis 3 x 30 Sekunden per Ultraschall aufgeschlossen (Ultrasonic Sonicator, Mikrotip 4,8 mm, duty cycle 50 %). Verbleibende Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, 4°C, Heraeus Biofuge A) vom Rohextrakt abgetrennt und in 1 ml Puffer aufgenommen.

Streptomyceten-Kulturen wurden mindestens 4 x 30 Sekunden einem Ultraschall-Aufschluss unterzogen.

Größere Zellmengen wurden in etwa $\frac{1}{20}$ des ursprünglichen Volumens resuspendiert und mit einer French Press (500 - 600 psi, American Instrument Company, Illinois) in drei Durchgängen aufgeschlossen.

3.5.2 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Die Proteingehaltsbestimmung nach Bradford erfolgte mit Hilfe des „BIO-RAD-Protein-Assay“. Die Proteinextrakte wurden in H₂O verdünnt und davon 800 µl mit 200 µl Färbereagenz gemischt. Nach 10 min Inkubation wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm gegen eine Küvette mit H₂O gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmt, die mit einer Verdünnungsreihe von BSA in Wasser erstellt worden war.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Mit der SDS-PAGE in vertikalen Gelelektrophorese-Apparaturen (8 x 8 x 0,1 cm, Biometra, Göttingen) wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Lösungen, ausreichend für 2 Polyacrylamid-Gele, setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

	12 % iges Trenngel	4 % iges Sammelgel
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	8 ml	0,67 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	5 ml	-
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	-	1,25 ml
10 % SDS	200 µl	50 µl
H ₂ O	6,7 ml	3 ml
10 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Das Trenngel wurde zwischen die gut abgedichteten Glasplatten bis etwa zu $\frac{3}{4}$ der Gelhöhe eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Trennschicht zu erhalten. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel eingegossen und der Kamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen an SDS-Auftragspuffer versetzt, 5 min in kochendem Wasser denaturiert und aufgetragen. Der Gellauf erfolgte zuerst bei einer Stromstärke von 10 mA pro Gel und wurde nach dem Eintritt der Proben ins Trenngel auf 20 mA erhöht. Anschließend wurden die Gele etwa 20 min bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung gefärbt, in Entfärberlösung 20 min entfärbt und in 7,5 % iger Essigsäure fixiert. Für die weitere Aufbewahrung wurden die Gele in 7,5 % iger Essigsäure in

PE-Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert. Zur Molekulargewichtsbestimmung diente ein Standard-Proteingemisch von Roth oder BioRad:

Roth		BioRad	
Myosin	200 kDa	Phosphorylase	97,4 kDa
β-Galaktosidase	119 kDa	BSA	66,6 kDa
Serumalbumin	66 kDa	Ovalbumin	45,5 kDa
Ovalbumin	43 kDa	Carboanhydrase	31 kDa
Carboanhydrase	29 kDa	Trypsininhibitor	21,5 kDa
Trypsininhibitor	20 kDa	Lysozym	14,4 kDa
Lysozym	14,5 kDa		

3.5.4 Aceton-Fällung von Proteinen

Um Proteine auszufällen, wurde das vierfache Volumen an Aceton zu den Reaktionsansätzen gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bis zum vollständigen Verdampfen des Acetons unter dem Abzug offen stehen gelassen.

3.5.5 Proteinreinigung über Affinitätschromatographie

Zur Reinigung der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN wurde diese am C-Terminus mit 6 Histidinresten fusioniert und mit Hilfe einer Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Matrix von Qiagen (Hilden) aus der löslichen Rohextrakt-Fraktion einer induzierten Kultur von *E. coli* JM109/pTST95.1 aufgereinigt. Die Vorbereitung und das Äquilibrieren der Säule erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit Waschpuffer 1.

Die Säule wurde mit 2 ml aufgeschlossenem Rohextrakt einer 50 ml-Kultur befüllt. Nach dem Durchfluss des Überstandes erfolgten 5 Waschschrte mit je 1 ml Waschpuffer 1 und 5 Schritte mit 1 ml Waschpuffer 2. Anschließend wurden die Proteine mit 3 ml Elutionspuffer eluiert. Dabei wurden Fraktionen mit einem Volumen von 200 - 300 µl gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und mindestens zweimal gegen die 500-fache Menge eines entsprechenden Puffers dialysiert.

3.5.6 Dehydrogenase-Aktivitätstest

Die Enzymaktivität wurde photometrisch bestimmt, indem die Umsetzung von NAD(P)⁺ bzw. NAD(P)H durch die Dehydrogenasen bei 340 nm verfolgt wurde.

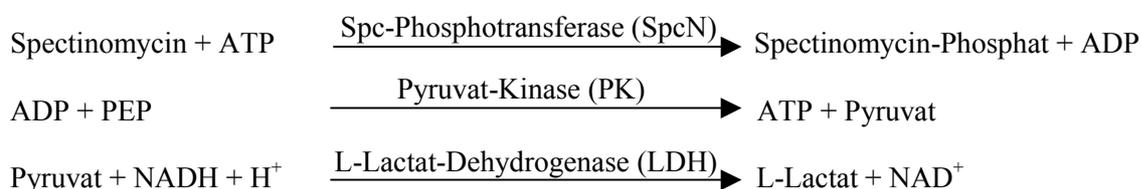
Als Substrate dienten *myo*-Inositol, *scyllo*-Inosose, Spectinomycin und Dihydro-spectinomycin. Die Konzentrationen von *myo*-Inositol und Spectinomycin im Ansatz wurden zwischen 10 mM - 100 mM variiert, die Endkonzentration von *scyllo*-Inosose und Dihydro-spectinomycin lag gleichbleibend bei 10 mM. Zu einem Gesamtvolumen von 500 µl wurden 62 µl Rohextrakt, d.h etwa 19 µg Protein gegeben. Die Reaktionen fanden in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,5 bei 25°C statt und wurden durch Zugabe des entsprechenden Coenzym in einer Endkonzentration von 2 mM gestartet. Die Messung erfolgte in Form einer Zeitkinetik in einem Kontron Uvikon 860 Photometer. Zehn Messungen wurden im Intervall von 5 s durchgeführt, danach wurden die Ansätze weiter bei 25°C inkubiert und nach 3 Stunden bzw. über Nacht noch einmal vermessen.

In einem weiteren Test betrug die Endkonzentration von Spectinomycin 100 mM und von NADH bzw. NADPH 0,2 mM. Die Reaktionen fanden in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,5 und in 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,0 bei 25°C statt. Dabei wurde die Menge an Rohextrakt zwischen 10 - 600 µl (entspricht 3 - 180 µg Protein) pro 1 ml Gesamtvolumen variiert. Als Kontrolle diente jeweils der gleiche Ansatz ohne Spectinomycin. Die Messung erfolgte wiederum im Photometer in Form einer Zeitkinetik, wobei 20 Messwerte in Abständen von 60 s genommen wurden.

3.5.7 Aktivitätstest der Spectinomycin-Phosphotransferase

3.5.7.1 Gekoppelter Assay

Dieser Assay basierte auf einem Testsystem von Roche Applied Science, das zur Bestimmung von Glycerin in der Lebensmittelanalytik verwendet wird. Es wurde leicht abgewandelt und folgende Reaktionen gekoppelt:



Die Abnahme von NADH wurde in einem Photometer bei 340 nm bestimmt und entspricht dabei stöchiometrisch der Menge an phosphoryliertem Spectinomycin.

Zur Messung wurden 300 µl Lösung 1 (Glycylglycin-Puffer, NADH, ATP, PEP, MgSO₄), 40 - 50 µg gereinigtes SpcN und 10 µl Lösung 2 (PK, LDH) auf 900 µl mit H₂O aufgefüllt und 15 min bei 25°C inkubiert, um durch spontane Hydrolyse entstandenes ADP zu

entfernen. Nach Zugabe von 100 µl Spectinomycin in den Endkonzentrationen von 0,001 - 20 mM wurde die Adsorption bei 340 nm in einem Kontron Uvikon 860 Photometer in Form einer Zeitkinetik gemessen.

3.5.7.2 Radioaktiver Assay

Die Reaktionsansätze bestanden aus Spectinomycin oder Dihydrospectinomycin in Konzentrationen von 0 - 20 mM, 100 nM - 10 mM kaltem ATP, 30 µl Rohextrakt bzw. aufgereinigter Spectinomycin-Phosphotransferase (~ 25 µg) und etwa 0,6 µCi [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP. Sie wurden mit 20 mM MOPS / 10 mM MgCl₂ auf 50 µl aufgefüllt und 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Je 10 µl dieser Ansätze wurden mit Aceton gefällt und die Überstände nach der Fällung einer Dünnschichtchromatographie unterzogen.

3.6 Molekulargenetische Methoden

3.6.1 DNA-Isolierung

3.6.1.1 Isolierung von genomischer DNA über CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Präparation von genomischer DNA aus Streptomyceten wurde eine 10 ml Kultur in YEME-Medium in 100 ml-Schikanekolben 24 h bei 30°C geschüttelt und danach abzentrifugiert (10 min, 15.000 rpm, Sorvall SS34-Rotor). Das Pellet wurde in 8 ml 25 mM Tris/HCl, 25 mM EDTA, 10 % Sucrose resuspendiert und 1 ml Lysozymbromid (100 mg/ml in TE10.01) zugegeben. Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und dabei mehrmals durch Aufziehen mit einer Pipette durchmischt. Nach Zugabe von 1 ml 10 % N-Lauroylsarcosinat wurde weitere 15 min erst bei 37°C, danach bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf genau 10 ml mit TE10.01 aufgefüllt, zu 10 g CsCl dazugegeben und bei 65°C gelöst. Die Lysate wurden zu 400 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) in Ultrazentrifugen-Röhrchen gefüllt und zentrifugiert (48 h, 35.000 rpm, 17°C, Sorvall T-1270-Rotor). Die DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einer Spritze abgezogen, mindestens 2 h gegen TE10.01 dialysiert und mit Phenol (äquilibriert in TE10.1, pH 7,5 - 8,0) extrahiert, bis das Ethidiumbromid vollständig verschwunden war (ca. 3 x). Die DNA wurde erneut 24 h bei

mindestens dreimaligem Pufferwechsel gegen TE10.01 dialysiert und konnte bei 4°C gelagert werden.

3.6.1.2 Plasmidisolierung nach Lee & Rasheed (1990, modifiziert)

Eine *E. coli*-Übernachtskultur in 1,5 ml LB mit Antibiotikum wurde 5 min bei 5.000 rpm (Heraeus Biofuge A) abzentrifugiert und das Pellet im verbliebenem Tropfen Medium resuspendiert. Nach 5 min Inkubation in 200 µl Lysepuffer bei RT erfolgte eine alkalische Lyse mit 300 µl 0,2 N NaOH / 1 % SDS. Die Proben wurden kräftig geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 400 µl gekühltes 7,5 M Ammoniumacetat, pH 7,5 zugesetzt, erneut gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A) wurden 800 µl vom Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol gefällt. Der Ansatz wurde wiederum zentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A) und zweimal mit 50 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 30 - 50 µl TE10.01 aufgenommen.

3.6.1.3 Plasmidisolierung aus Streptomycceten (nach Kieser, 1984, modifiziert)

Von einer gut angewachsenen Streptomycceten-Kultur in Soja-Mannitol- oder YEME-Medium wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 5.000 rpm (Heraeus Biofuge A) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl Lysozymlösung (4 mg/ml Lysozym + 50 µg/ml RNaseA in H₂O) resuspendiert und bis zur Lyse des Myzels etwa 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 250 µl 0,3 N NaOH / 2 % SDS zupipettiert und 15 min bei 70°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann einer zweimaligen Phenolextraktion unterzogen, indem 100 µl Phenol (äquibriert in TE10.1, pH 7,5 - 8,0) zugegeben, 1 min gevortext und 2 min bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge A) abzentrifugiert wurde. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und 150 µl einer 5 M Kalium-Acetat (KAc)-Lösung, pH 5,0 zugesetzt, stark gevortext, dann 150 µl 6 M KAc, pH 8,0 zugegeben, erneut gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A) wurden 800 µl vom Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol gefällt. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (10 min, 13 000 rpm), das Pellet in 100 µl TE 10.01 aufgenommen und mit 5 µl einer 0,1 M Sperminetetrahydrochlorid-Lösung für 5 min gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 13.000 rpm) wurde das Pellet für 1 h in 1 ml Sperminataustauschlösung (70 % EtOH / 30 % 0,01 M MgCl₂, 0,3 M NaAc, pH 8,0) belassen.

Der Ansatz wurde wieder zentrifugiert (s.o.), das Pellet getrocknet und anschließend in 30 µl TE 10.01 aufgenommen.

3.6.1.4 Plasmidisolierung aus *E. coli* nach Kieser (1984, modifiziert)

Eine *E. coli*-Übernachtskultur in 4 ml LB mit Antibiotikum wurde 5 min bei 4.500 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) abzentrifugiert und das Pellet im verbliebenem Tropfen Medium resuspendiert. Nach 5 min Inkubation in 0,5 ml Lysozymlösung (4 mg/ml Lysozym in 10 % Saccharose, 25 mM Tris, pH 8,0, 25 mM EDTA, pH 8,0) bei RT erfolgte eine alkalische Lyse. Dazu wurden 300 µl 0,3 M NaOH / 2 % SDS zugegeben, geschüttelt bis die Lösung klar wurde und anschließend für 20 min bei 80°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden 150 µl einer 5 M KAc-Lösung, pH 5,0 zugesetzt, stark gevortext, dann 150 µl 6 M KAc, pH 8,0 zugegeben, erneut gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A) wurden 800 µl vom Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol gefällt. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (10 min, 13.000 rpm), das Pellet in 100 µl TE 10.01 aufgenommen und mit 5 µl einer 0,1 M Sperminetrahydrochlorid-Lösung für 5 min gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 13.000 rpm) wurde das Pellet für 1 Stunde in 1 ml Spermin austauschlösung (70 % EtOH / 30 % 0,01 M MgCl₂, 0,3 M NaAc, pH 8,0) belassen. Der Ansatz wurde wieder zentrifugiert (s.o.), das Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl TE 10.01 aufgenommen.

3.6.1.5 Plasmidisolierung mit dem Qiaprep Spin Miniprep-Kit

Für die Sequenzierreaktionen erfolgte die DNA-Isolierung mit dem Qiaprep Spin Miniprep-Kit in einer Heraeus Biofuge A nach den Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden).

3.6.1.6 Midi-Präparation von Plasmiden mit dem Qiagen Plasmid Midi-Kit

Um größere Mengen an Plasmid- bzw. Cosmid-DNA zu erhalten, wurde das Qiagen Plasmid Midi-Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

3.6.2 Enzymatische Behandlung von DNA

3.6.2.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Etwa 0,2 - 0,5 µg DNA wurden in einem 10 µl Ansatz mit 3 U Restriktionsenzym und dem zugehörigen, vom Hersteller angegebenen 10 x Reaktionspuffer für mindestens 1 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. War die Spaltung mit zwei Enzymen notwendig, wurde die DNA zwischen den einzelnen Restriktionsverdau mit Isopropanol gefällt (s. 3.6.2.2). Für präparative Ansätze, die zur Isolierung einzelner Fragmente aus dem Gel dienten, wurden etwas mehr DNA und 10 U Restriktionsendonuklease eingesetzt. Nach der Spaltung wurden die Proben mit $\frac{1}{10}$ Volumen Auftragspuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.6.2.2 Fällung von DNA

Die DNA-Probe wurde mit $\frac{1}{10}$ Volumen an 3 M NaAc-Puffer, pH 6,2 und 1:1 mit Isopropanol versetzt, gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A) wurde das Pellet für 5 min in der Speed-Vac (SpeedVacConcentrator SVC100H, Savant) getrocknet und in TE 10.01 aufgenommen.

3.6.2.3 Behandlung mit der Klenow-Polymerase

Die große Untereinheit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurde zum Auffüllen 5'-überstehender Enden oder zum Entfernen 3'-überstehender Enden verwendet. Die DNA (0,2 - 0,5 µg) wurde einer Isopropanol-Fällung unterzogen, in 8 µl TE 10.01 resuspendiert und mit 1 µl 2 mM dNTP-Gemisch, 1 µl 10 x Reaktionspuffer und 2 U Klenow-Enzym behandelt. Die Reaktion wurde für 15 min bei 37°C durchgeführt und die DNA durch Gelelektrophorese oder Fällung gereinigt.

3.6.2.4 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Die alkalische Phosphatase entfernt Phosphatgruppen an den 5'-Enden und verhindert damit eine Religation des Vektors. Die mit Restriktionsendonukleasen linearisierte Vektor-DNA (~ 0,2 - 0,5 µg) wurde gefällt (s. 3.6.2.2), in 8 µl TE10.01 resuspendiert und mit 1 µl 10 x

AP-Puffer und 20 U alkalischer Phosphatase (isoliert aus Kälberdärmen) versetzt. Der Ansatz wurde für 15 - 30 min bei 37°C inkubiert und die alkalische Phosphatase durch Agarose-Gelelektrophorese von der DNA abgetrennt.

3.6.2.5 Ligation

Äquimolare Mengen der zu ligierenden DNA-Fragmente (~ 50 µg/ml) wurden gemischt, zu einem Volumen von 8 µl mit H₂O aufgefüllt und mit 10 x Ligasepuffer und 1 U T4-DNA-Ligase versetzt. Die Ligation überstehender Enden erfolgte bei 4°C über Nacht oder auch bei RT für einige Stunden. Glatte Enden wurden immer bei RT über Nacht ligiert.

3.6.2.6 Bereitstellung von DNA-Längenstandard für Agarose-Gelelektrophorese

λ-DNA (25 µg) wurde in einem Volumen von 200 µl mit 40 U *Bgl*I bzw. *Hind*III über Nacht bei 37°C verdaut, danach 10 min auf 65°C erhitzt und mit 20 µl Auftragspuffer versetzt. Von diesen λ-Markern wurden 10 - 13 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.6.3 Transformation von *E. coli* und *Streptomyces*

3.6.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (Chung et al., 1989)

Aus einer Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes wurde 50 ml LB₀-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4 erreicht war. Die Zellen wurden 10 min bei 4.000 rpm (Sorvall SS34 Rotor) abzentrifugiert, in 2 ml eiskaltem TSS aufgenommen und sofort zur Transformation eingesetzt.

3.6.3.2 Herstellung von *Streptomyces*-Protoplasten (Hopwood et al., 1985)

In 100 ml-Schikanekolben wurden 20 ml YEME-Medium mit 50 µl Sporen-Suspension beimpft und 2 Tage bei 30°C im Schüttler inkubiert. Daraus wurden 80 ml YEME-Medium in 500 ml-Kolben mit Schikanen oder Stahlspirale 1:100 verdünnt angeimpft, weitere 32 h bei 30°C geschüttelt und im Mikroskop auf Kontamination untersucht. Dem Ansatz wurden 80 ml steriles H₂O zugegeben und 5 min bei 7.000 rpm zentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor).

Der Überstand wurde sofort vorsichtig über das Pellet abdekandiert, dann zweimal gewaschen, indem das Pellet in 10 ml 10,3 % Sucrose mit der Pipette resuspendiert und wieder abzentrifugiert wurde (5 min, 7.000 rpm, Sorvall SS34 Rotor). Das Pellet wurde in 9 ml L-Medium gelöst, mit 1 ml Lysozym-Lösung (40 mg/ml, gelöst in L-Medium, sterilfiltriert) gemischt und bei 30°C unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Die Bildung der Protoplasten wurde unter dem Mikroskop verfolgt und war meist nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten abgeschlossen. Um die Protoplasten von den Myzel-Resten zu trennen, wurde der Ansatz durch nicht adsorbierende Baumwollwatte filtriert. Das Lysozym wurde durch Zentrifugation (5 min, 3.000 rpm, Sorvall SS34-Rotor) und zweimaligem Waschen mit 10 ml P-Medium entfernt und anschließend das Pellet in 10 ml P-Medium aufgenommen. Die Protoplasten wurden zu je 1 ml aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.6.3.3 Transformation von *E. coli*

Zu 50 - 100 ng DNA wurden 200 µl kompetente Zellen gegeben, gemischt und auf Eis 30 min inkubiert. Die Ansätze wurden dann einem Hitzeschock von 42°C für 90 s ausgesetzt, zu 2 ml LB gegeben und für 1 Stunde bei 37°C gerollert. Je 100 µl des Transformationsansatzes sowie das in einem Tropfen Medium resuspendierte Pellet wurden auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um die Transformationsrate zu bestimmen, wurden kompetente Zellen mit pUC18-DNA bekannter Konzentration transformiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Plasmid-DNA.

3.6.3.4 Transformation von *Streptomyces*-Protoplasten mit Plasmid-DNA

Ein Aliquot der Protoplasten-Suspension (1 ml) wurde bei 3.000 rpm für 5 min in einer Heraeus Biofuge A abzentrifugiert und im restlichen Überstand resuspendiert. Die Plasmid-DNA (0,5 - 1 µg) wurde mit den Protoplasten gemischt und 0,5 ml komplettes T-Medium zugegeben. Sofort danach wurde der Ansatz mit 6 ml geschmolzenem R2-Softagar versetzt und davon jeweils 3 ml auf eine R2-Platte gegossen, die zuvor ca. 2 1/2 h unter der Steril-Bank getrocknet wurde. Nach spätestens 24 h wurde die Platte mit 3 ml R2-Softagar mit Antibiotikum überschichtet und bei 30°C inkubiert.

3.6.4 Transposon-Mutagenese und Konjugation (Fischer et al., 1996)

E. coli JM108 $F'lac[::Tn5491]$ wurde mit einem pJOE2114-Plasmid-Derivat, in das ein Transposon inseriert werden sollte, transformiert und der Bakterienrasen am nächsten Tag mit 2 ml LB₀-Medium abgeschwemmt. Bei der Insertion des Transposons in das Plasmid bildet sich vorübergehend ein Kointegrat zwischen Plasmid und F-Plasmid aus. Durch Konjugation des Plasmid-tragenden Stamms JM108 $F'lac[::Tn5491]$ mit *E. coli* HB101 kann das nicht-konjugative oder mobilisierbare pJOE2114-Derivat über das Kointegrat in HB101 übertragen werden. Die Resolvase löst das Kointegrat auf, was einmal zum Ausschneiden des Plasmids aus dem F-Plasmid führt und in einer zweiten Reaktion zur Deletion eines Großteils des Transposons im pJOE2114-Derivat. Für die Kreuzung wurden etwa 5×10^8 Zellen der beiden Stämme (bestimmt über OD₆₀₀) in 5 ml LB₀-Medium gemischt und bei 30°C für 6 - 8 h im Roller inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen des Kreuzungsansatzes auf LB-Agarplatten mit Ampicillin und Streptomycin plattiert und bei 37°C inkubiert. Aus den dabei erhaltenen Kolonien wurden Plasmide isoliert und sequenziert.

3.6.5 DNA-Gelelektrophorese

3.6.5.1 Agarose-Gelelektrophorese (Sharp et al., 1973)

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarosegele erfolgte in Elektrophorese-Kammern von Renner. In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde der Agarose-Gehalt der Gele zwischen 0,7 - 1 % variiert. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid aufgeköcht und nach Abkühlen in die Gel-Schlitten gegossen. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit $\frac{1}{10}$ Volumen Auftragspuffer versetzt und danach bei 10 V/cm im elektrischen Feld aufgetrennt. Als Größenstandard diente meist ein 1 kb-Marker (Invitrogen). Nach dem Lauf wurden die DNA-Banden unter UV-Licht mit einer Kamera (Cybertech CS 1, Cybertech Berlin) und angeschlossenem Thermoprinter (Mitsubishi, Japan) dokumentiert.

3.6.5.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Easy Pure)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem

Easy Pure-Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) weiter aufgereinigt.

3.6.6 Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al., 1986)

Um DNA-Sequenzen gezielt amplifizieren zu können, wurde die Polymerase-Chain-Reaction angewandt. Dafür wurde zum Teil das Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science) eingesetzt, bei dem eine Enzym-Mischung aus der Taq-Polymerase und einer Polymerase mit Proofreading-Funktion zum Einsatz kommt. Auf 100 µl Gesamtvolumen wurden 10 µl 10 x Puffer mit 15 mM MgCl₂, 2 µl dNTP-Gemisch (je 10 mM), etwa 50 ng Template-DNA, 30 pmol beider Primer, 5 - 10 µl DMSO, 0,75 µl Enzym-Mischung und H₂O gemischt. Die Reaktion wurde in einem GeneAmp PCRSystem 2400-Gerät (Perkin Elmer) in 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	2 - 5 min	94°C
Denaturierung	30 s	94°C
Annealing	45 s	etwa 5°C unter der für die Primer errechneten Schmelztemperatur
Polymerisation	60 s	72°C
	7 min	72°C

Alternativ wurden in 99,5 µl Gesamtvolumen 10 µl 10 x Taq-PCR-Reaktionspuffer, 3 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl dNTP-Gemisch (je 10 mM), etwa 50 ng Template-DNA, 30 pmol jedes Primers und H₂O gemischt. Zur Amplifikation GC-reicher Streptomycceten-DNA wurde noch 5 oder 10 % DMSO hinzugefügt. Der Ansatz wurde etwa 2 min bei 99°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und bei 94°C 2,5 U Taq-Polymerase (Hot Start) zugegeben. Die Reaktion umfasste 30 Zyklen in einem PCR-Gerät (Mini Cycler, MJ Research). Je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments und der Schmelztemperatur der Primer wurden folgende Bedingungen gewählt:

	2 - 5 min	94°C
Denaturierung	45 - 90 s	94°C
Annealing	45 - 90 s	etwa 5°C unter der für die Primer errechneten Schmelztemperatur
Polymerisation	45 - 90 s	72°C
	10 min	72°C

Die Schmelztemperatur der Primer wurde aus 2°C pro AT-Paar und 4°C pro GC-Paar errechnet. Für Fragmente bis zu 0,5 kb betrug die Dauer der einzelnen Schritte 45 s, für 0,5 - 1 kb-Fragmente wurden 60 s, für Fragmente ab ~ 1 kb 90 s gewählt.

Um zu überprüfen, ob die gewählten Primer auch unspezifisch binden, wurden Ansätze mit je einem Primer und ein Ansatz ohne Template dem gleichen Temperaturprofil unterzogen.

Sollten Fragmente amplifiziert werden, die länger als etwa 2 kb waren, wurde das Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.6.6.1 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des Qiaquick-Kits von Qiagen laut Herstellerangaben gereinigt.

3.6.7 LightCycler-PCR

Zum Screening der Cosmid-Genbank von *S. flavopersicus* wurde der LightCycler-DNA Master SYBR GreenI-Kit unter Nutzung eines LightCycler-Instruments nach Angaben des Herstellers (Roche Applied Science) eingesetzt. SYBR GreenI ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der bevorzugt an doppelsträngige DNA bindet. PCR-Amplifikate konnten so anhand der Fluoreszenz nachgewiesen und zusätzlich über eine Schmelzkurven-Analyse charakterisiert werden (LightCycler Software, Version 3). Nach einmaligem Denaturieren für 45 s bei 95°C umfasste die Reaktion 55 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung	1 s	95°C
Annealing	10 s	etwa 5°C unter der für die Primer errechneten Schmelztemperatur
Polymerisation	30 s	72°C

3.6.8 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

3.6.8.1 Southern Blot

Die zu analysierende genomische und Plasmid- bzw. Cosmid-DNA wurde nach der Spaltung durch Restriktionsenzyme im Agarosegel aufgetrennt, das anschließend zusammen mit einem Lineal, zur späteren Identifikation der Banden, unter UV-Licht fotografiert wurde. Danach wurde das Gel 2 x 15 min in 0,25 M HCl-Lösung gelegt, um die DNA partiell zu fragmentieren, kurz in H₂O gewaschen und 2 x 15 min in Denaturierungslösung gelegt. Auf das Gel wurde eine angefeuchtete, positiv geladene Nylonmembran (Porengröße 0,45 µm,

Roche Applied Science) und einige Lagen Whatman-Papier aufgelegt und die DNA durch Kapillarkräfte auf die Membran transferiert. Nach 2 h wurde die Nylonmembran von beiden Seiten mit UV-Licht bestrahlt (UV-Stratalinker 1800, Stratagene), wodurch die DNA auf der Membran fixiert wurde. Danach wurde sie kurz in 2 x SSC gewaschen.

3.6.8.2 Kolonie-Hybridisierung

E. coli-Kolonien wurden auf LB-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen, über Nacht bei 37°C bebrütet und danach für 1 - 2 h bei 4°C gekühlt. Eine positiv geladene Nylonmembran (1,2 µm, Roche Applied Science) wurde auf die Platte aufgelegt, markiert und nach ca. 5 min wieder abgezogen. Der Filter wurde mit den Kolonien nach oben 15 min auf mit Denaturierungslösung getränktes Whatman 3MM-Papier gelegt, anschließend 15 min auf mit Neutralisierungslösung getränktes Whatman 3MM-Papier und abschließend 10 min auf mit 2 x SSC getränktes Whatman 3MM-Papier. Die DNA wurde durch UV-Crosslinking der Filter von beiden Seiten (UV-Stratalinker 1800, Stratagene) fixiert. Danach wurde die Membran für für 1 Stunde bei 37°C mit 0,5 ml Proteinase K (2 mg/ml in 2 x SSC) behandelt und die Zellreste mit angefeuchtetem Whatman-Papier entfernt.

3.6.9 Markierung von DNA-Sonden

3.6.9.1 Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Für die Hybridisierung von Southern Blots wurden ganze Plasmide oder einzelne, linearisierte DNA-Fragmente eingesetzt. Sie wurden mit dem „Random primed DNA Labeling“-Kit von Roche Applied Science markiert, indem das Klenow-Fragment Digoxigenin-markierte Desoxynukleotide in den neu synthetisierten DNA-Strang einbaute. Als Primer für das Enzym diente ein Hexanukleotid-Gemisch aller möglichen Basenzusammensetzungen. Etwa 100 - 200 ng DNA wurde 10 min bei 95°C denaturiert, in Eiswasser abgekühlt, mit 2 µl Hexanukleotid-Gemisch, 2 µl dNTP-Gemisch und 1 µl Klenow-Polymerase (5 U/µl) versetzt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Markierungsreaktion geschah bei 37°C für 1 - 12 h und wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Danach wurde die DNA mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl 100 % Ethanol 30 min bei -70°C gefällt, abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm) und mit 70 % Ethanol gewaschen. Vor der Hybridisierung wurde die markierte DNA 5 min aufgekocht. λ-DNA wurde auf die gleiche

Weise Digoxigenin-markiert, um auf dem Southern Blot die Marker-Banden sichtbar zu machen.

3.6.9.2 Markierung von DNA mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP

Die Markierung von Plasmiden oder linearen DNA-Fragmenten mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP wurde mit Hilfe der Klenow-Polymerase durchgeführt. Etwa 50 - 100 ng DNA wurde 10 min aufgekocht und sofort auf Eis gegeben, um Einzelstränge zu erhalten. In einem Gesamtvolumen von 20 μl wurde die DNA, 3 μl eines Gemisches der Desoxynukleotide dATP, dGTP und dTTP (je 0,5 mM), 2 μl Hexanukleotid-Reaktionsgemisch (Roche Applied Science), 1 μl Klenow-Polymerase (2 U/ μl) und 5 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit TE10.01 auf 100 μl aufgefüllt und nicht eingebaute Desoxynukleotide über eine Sephadex-G50-Säule abgetrennt (s. 3.6.9.3). Vor und nach der Reinigung wurde die Aktivität im Benchcounter gemessen und darüber die Einbaurrate des radioaktiven Nukleotids ermittelt. Vor der Hybridisierung wurde die Sonde 10 min auf 95°C erhitzt.

3.6.9.3 Reinigung über Sephadex-Säulen

Um die Sonden für die Hybridisierungen von nicht eingebauten, markierten dNTPs zu trennen, wurde Sephadex G50-Säulenmaterial mit TE10.01 aufgeschwemmt und in mit silikonisierter Glaswolle abgedichtete 1 ml-Spritzen gefüllt. Das TE10.01 wurde bei 2.000 rpm 2 min abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0) und der Vorgang so lange wiederholt, bis die Spritze bis ca. 1 cm unter den Rand gefüllt war. Danach wurden 100 μl TE10.01 auf die Säule gegeben und das Volumen des Durchlaufs bestimmt. Entsprechend dieses dem aufgetragenen Volumen, wurde die DNA-Probe in die Säule gefüllt und die gereinigte Sonde durch Zentrifugation (2 min, 2.000 rpm, Heraeus Megafuge 1.0) eluiert, während freie dNTPs am Säulenmaterial absorbiert wurden.

3.6.10 Hybridisierung

3.6.10.1 Hybridisierung mit einer nicht-radioaktiven Sonde

Um unspezifische Bindestellen auf der Nylonmembran abzusättigen, wurde sie nach dem Blotten für 60 min einer Vorhybridisierung in 20 ml Hybridisierungslösung bei 68°C unterzogen. Danach erfolgte die Hybridisierung in frischer Hybridisierungslösung (5 ml / 100 cm² Membran) mit 25 - 50 µl markierter Sonden-DNA (s. 3.6.9.1) und 1 µl markierter λ-DNA bei 68°C über Nacht. Die Membran wurde dafür in PE-Folie eingeschweißt. Um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Tag 30 min in 2 x SSC / 10 % SDS bei RT, dann 4 x je 20 min in 0,1 x SSC / 0,1 % SDS bei 68°C gewaschen.

3.6.10.2 Nachweis von DIG-markierter DNA

Der Nachweis von Digoxigenin-markierter DNA erfolgte einerseits mit einem Chemilumineszenz-Nachweis-System von Roche. Hierbei wird ein Antikörper gegen Digoxigenin eingesetzt, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Die Phosphatase spaltet das Substrat CSPD, dessen instabiles Intermediärprodukt Licht (477 nm) emittiert, das durch Exposition auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann. Andererseits konnte die Sonde auch über eine Farbreaktion nachgewiesen werden.

Die Nylonmembran wurde nach der Hybridisierung und Entfernung nicht gebundener Sonden kurz in Waschpuffer gewaschen und zum Blockieren 30 min in ca. 100 ml Puffer 2 inkubiert. In der anti-DIG-AP-Konjugat-Lösung (2 µl Konjugat in 20 ml Puffer 2) verblieb die Membran 30 min, wurde dann 2 x 15 min in 100 ml Waschpuffer gewaschen und 5 min in 20 ml Puffer 3 äquilibriert. Das Substrat CSPD wurde 1:100 in Puffer 3 verdünnt, und die Membran darin 5 min inkubiert. Anschließend wurde sie in PE-Folie eingeschweißt und 15 min bei 37°C inkubiert. Der aufgelegte Röntgenfilm wurde nach 30 - 60 min Exposition bei Raumtemperatur entwickelt.

Für den Nachweis mit Farbsubstraten wurde die Membran wie oben beschrieben mit Waschpuffer und Puffer 2 behandelt. Nach Inkubation für 30 min in anti-DIG-AP-Konjugat-Lösung (4 µl Konjugat in 20 ml Puffer 2) wurde die Membran 2 x 15 min in 100 ml Waschpuffer gewaschen und 2 min in 20 ml Puffer 3 äquilibriert. Danach wurde sie mit 10 ml Puffer 3, dem 45 µl NBT- und 35 µl BCIP-Lösung zugegeben wurde, in PE-Folie

eingeschweißt. Die Filter wurden 1 - 24 h im Dunkeln inkubiert bis farbige Banden sichtbar waren.

3.6.10.3 Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde

Die Membranen aus Southern Blot und Kolonie-Hybridisierung (s. 3.6.8.1 und 3.6.8.2) wurden mindestens eine Stunde bei 42°C in Hybridisierungslösung mit Formamid prä-hybridisiert. Danach wurde frische Hybridisierungslösung mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP-markierter Sonde zugegeben (s. 3.6.9.2), so dass die Membranen knapp mit Flüssigkeit bedeckt waren, und über Nacht bei 42°C in geschlossenen Plastikschaalen hybridisiert. Die Lösung wurde entfernt und die Membran 4 x kurz in 2 x SSC / 0,1 % SDS gespült und anschließend 4 x 30 min mit 0,1 x SSC / 0,1 % SDS bei 65°C gewaschen. Die Membranen wurden an der Luft leicht getrocknet, in Frischhaltefolie eingepackt und gebundene Sonde durch Auflegen eines Röntgenfilms oder eines Phosphoscreens nachgewiesen. Die Exposition erfolgte je nach Signalstärke 1 - 24 Stunden bei -70°C oder bei RT.

3.6.11 Sequenzierung von Doppelstrang-DNA (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierungen wurden nach der Didesoxynukleotid-Kettenabbruch-Methode durchgeführt und mit Hilfe eines automatisierten Laser Fluoreszenz-Sequenzierers (A.L.F.) von Pharmacia untersucht. Für die Sequenzierreaktionen wurde ein Kit von Amersham Bioscience (Auto Read™) verwendet.

Von der zu sequenzierenden DNA wurde 32 μl (~ 6,4 μg) mit 8 μl 2 M NaOH versetzt und für 10 min bei RT denaturiert. Durch Zugabe von 28 μl H_2O , 12 μl 3 M NaAc, pH 4,8 und 240 μl 100 % Ethanol erfolgte eine Fällung für 15 min bei -70°C. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (15 min, 13.000 rpm), mit 70 % Ethanol gewaschen und in der SpeedVac (SpeedVacConcentrator SVC100H, Savant) getrocknet. Das Pellet wurde danach entweder bei -20°C gelagert oder in 10 μl gelöst und sofort zur weiteren Sequenzierreaktion eingesetzt.

Zur Sequenzierung wurden Cy5-markierte Oligonukleotide verwendet. Standen die Primer nur unmarkiert zur Verfügung, wurde Cy5-markiertes dATP eingesetzt und die Reaktion leicht modifiziert. Die DNA wurde mit 3 pmol markiertem Primer, 2 μl Annealing-Puffer und 3 μl DMSO gemischt und zuerst 15 min bei 37°C, dann 10 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit konnten sich die Primer anlagern. Nach Zugabe von 1 μl Extension-Puffer und

2 µl T7-Polymerase (1,5 U/µl in Verdünnungspuffer) wurden je 4,5 µl des Ansatzes zu je 2,5 µl Desoxy-/Didesoxynukleotid-Gemisch pipettiert. Die Desoxy-/Didesoxynukleotidgemische (A-, C-, G- und T-Mix) waren zuvor auf eine Terasakiplatte aufgetragen und auf 37°C vorgewärmt worden. Die Polymerisation geschah bei 37°C für mindestens 5 min, danach wurden die Reaktionen mit 5 µl Stopp-Lösung beendet. Bei der zweiten Methode mit unmarkierten Oligonukleotiden wurde die DNA mit 10 pmol Primer 5 min bei 65°C inkubiert und nach Zugabe von 2 µl Annealing-Puffer 10 min bei 37°C und weitere 5 min bei RT das Oligo gebunden. Danach wurden 1 µl Labeling-Mix und 2 µl T7-Polymerase (1,5 U/µl in Verdünnungspuffer) zugesetzt. Nach 5 min bei RT wurde 1 µl Extension-Puffer und 3 µl DMSO zugefügt und 4,5 µl des Ansatzes in die vorgelegten Desoxy-/Didesoxynukleotid-Gemische pipettiert. Die Reaktion wurde nach mindestens 5 min Inkubation bei 37°C mit 5 µl Stopp-Lösung beendet. Die Sequenzieransätze konnten dann bei -20°C gelagert werden und wurden unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel für 3 min bei 80°C denaturiert. Für die Elektrophorese wurden 0,3 mm dicke Sequenziergele (ReproGel™ LongRead) gegossen und zur Polymerisation 10 min mit UV-Licht bestrahlt. Das Gel wurde auf 55°C vorgeheizt, bevor je 4 µl Probe aufgetragen und die Elektrophorese in 0,5 x TBE-Laufpuffer unter folgenden Bedingungen durchgeführt wurde:

Spannung	1500 V
Stromstärke	60 mA
Leistung	25 W
Temperatur	55°C
Sampling Intervall	2 s
Laufzeit	700 min

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der AM Software, Version 3.02. Sie wurden mit einem HP DeskJet 820Cxi ausgedruckt und mit GCG-Programmen analysiert. Für Datenbank-Suchen wurde auf die Programme BLASTX, BLASTP und BLASTN des National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD zurückgegriffen. Mögliche offene Leserahmen wurden mit Hilfe des „Codonpräferenz“-Programms (Devereux et al., 1984) unter Berücksichtigung einer „Codon-Usage-Liste“ von Streptomycceten (Sedlmeier & Altenbuchner, 1992) bestimmt.

3.6.12 Konstruktion einer Genbank von *Streptomyces flavopersicus* NRRL B-2820

3.6.12.1 Klonierung genomischer DNA in Cosmid-Vektoren

Zur Präparation der beiden λ -Arme wurden etwa 2 μ g des Cosmid-Vektors pTST59.1 mit 20 U *Xba*I gespalten. Nach einer Isopropanolfällung wurde das Plasmid in TE10.01 resuspendiert und mit 5 U *Bam*HI geschnitten. Die DNA wurde erneut mit Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20 μ l TE10.01 resuspendiert.

Chromosomale DNA von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 (~ 1 μ g) wurde mit verschiedenen Konzentrationen *Sau*3A (0,01 U; 0,05 U; 0,1 U; 0,2 U und 0,3 U) eine Stunde partial verdaut, mit Isopropanol gefällt, gewaschen und in 10 μ l TE10.01 resuspendiert. Ein Aliquot der Proben wurde auf einem Agarosegel überprüft. Ansätze, bei denen der Partialverdau Fragmente um 5 - 40 kb lieferte, wurden in die *Bam*HI-Schnittstelle von pTST59.1 zwischen die λ -Arme inseriert.

3.6.12.2 Präparation von λ *in vitro* Verpackungsextrakten (Sambrook et al., 1989)

Für die Verpackung der DNA in Phagenpartikel wurden zwei getrennte Verpackungsextrakte isoliert. Aus *E. coli* BHB2690 wurden die Phagenköpfe gewonnen und aus *E. coli* BHB2688 das Verpackungsprotein D und alle anderen Verpackungskomponenten.

„Freeze Thaw Lysate“ (FTL)

Aus einer Übernachtskultur von BHB2688 in LB₀ bei 30°C wurden 3 x 500 ml LB₀ auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bei 30°C geschüttelt. Die Phagen wurden durch 15 min Inkubation bei 45°C induziert und die Zellen anschließend für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde abzentrifugiert (9.000 rpm, 10 min, Sorvall GSA-Rotor) und der Überstand vollständig entfernt. Alle Pellets wurden in einem Gesamtvolumen von 6 ml kalter Sucroselösung (10% Sucrose, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) resuspendiert, auf zwei SS34-Röhrchen verteilt und zu jedem Röhrchen 75 μ l Lysozym (2 mg/ml in 0,25 M Tris/HCl, pH 7,5) zugegeben. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach Auftauen bei RT mit 75 μ l Puffer M1 versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (50 min, 17.000 rpm, 4°C, Sorvall SS34-Rotor) wurde der Überstand mit den Phagenpartikeln zu je 100 μ l in Eppendorfgläsern aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

„Sonicated Extrakt“ (SE)

Aus einer Übernachtskultur von BHB2690 in LB₀ bei 30°C wurden 500 ml LB₀ auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bei 30°C angezogen. Die weiteren Schritte erfolgten analog der Präparation von FTL. Nach der ersten Zentrifugation wurden die Zellen in 4,6 ml Puffer A resuspendiert, in Eppendorfgläsern aliquotiert und mittels Ultraschall (Ultrasonic Sonicator, Mikrotip 4,8 mm, duty cycle 50 %) auf Eis aufgeschlossen, bis die Lösung nicht mehr viskos war (~ 3 x 15 s). Nach Zentrifugation bei 4°C (6 min, 6.000 rpm, Heraeus Biofuge A) wurde der Überstand zu je 100 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.6.12.3 *In vitro* Verpackung

Für die Verpackung der Cosmide in Phagenpartikel wurden 7 µl Puffer A, der Ligationsansatz, 1 µl Puffer M1, 6 - 10 µl SE und 10 - 50 µl FTL gemischt und 1 h bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl SM-Phagenpuffer und 2 Tropfen Chloroform wurde das Phagenlysate bei 4°C gelagert.

3.6.12.4 Infektion von *E. coli* mit dem Phagenlysate

Für die Phagenvermehrung wurde der Stamm *E. coli* RR1 verwendet, der über Nacht bei 37°C in LB mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgCl₂ angezogen wurde. Verschiedene Verdünnungen des Phagenlysates wurden mit 100 µl des Stamms gemischt. Nach 20 min bei 37°C wurden 2 ml LB zugegeben und 45 - 60 min bei 37°C gerollert. Die Ansätze wurden abzentrifugiert (5 min, 4.500 rpm, Heraeus-Megafuge 1.0), das Pellet im verbliebenem Tropfen Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.

3.7 Aufreinigung und Nachweismethoden von Spectinomycin

3.7.1 Aufreinigung von Spectinomycin

Spectinomycin-Produktionsstämme wurden in 10 ml Seed-Medium in 100 ml-Schikankolben angeimpft und nach 2 Tagen in 500 ml Fermentationsmedium überimpft. Dazu wurden fünf 500 ml-Kolben mit Schikanen oder Stahlspirale mit je 100 ml Medium und 2 ml

Vorkultur befüllt. Für einige Versuchsteile wurde weniger Kultur benutzt und die weiteren Mengen und Volumina entsprechend verringert. Nach 7 bis 10 Tagen wurde die Kultur abzentrifugiert (10 min, 5.000 rpm, Sorvall GSA-Rotor) und das Pellet mit 350 ml H₂O gewaschen. Der Kulturüberstand und das Waschwasser wurden durch Filtration zunächst über Faltenfilter und anschließend über Rundfilter (Schleicher & Schuell) von noch vorhandenen Zellen befreit. Die vereinigten Filtrate wurden nach modifizierten Literaturangaben folgendermaßen weiterbehandelt. Zum Kulturüberstand wurden 15 g des Kationenaustauscher Amberlite IRC-50 (Na⁺-Form) gegeben (Um das Amberlite von der H⁺-Form in die Na⁺-Form umzuwandeln, wurde es etwa 45 min in 1 N NaOH gerührt, über eine Nutsche abgetrennt und mit H₂O gewaschen, bis der pH-Wert des Eluats bei etwa pH 8,5 lag.). Der Überstand mit Amberlite wurde etwa 3 - 4 h bei RT gerührt. Das Ionenaustauschermaterial wurde über eine Nutsche abgetrennt und mit 200 ml H₂O gewaschen. Spectinomycin konnte dann mit zwei verschiedenen Methoden eluiert werden. Zum einen wurde zum Ionenaustauscher 40 ml 2 M NaCl zugegeben und eine Stunde bei RT gerührt. Die Matrix wurde über eine Nutsche abgetrennt und mit wenig H₂O gewaschen.

Die zweite Variante war eine Elution mit H₂SO₄ und anschließender Neutralisation. Hierfür wurden zum Amberlite 40 ml H₂O zugegeben und der pH-Wert der Suspension mit H₂SO₄ auf pH 1,8 - 1,9 eingestellt. Nach 30 min Rühren bei RT wurde die Matrix wieder über eine Nutsche abgetrennt und mit H₂O gewaschen. Dem Eluat wurde der Anionenaustauscher Dowex 2 x 8 (OH⁻-Form) zugegeben, bis die Lösung einen pH-Wert von 6 - 7 erreicht hatte. Das Austauschermaterial wurde anschließend wieder über eine Nutsche entfernt. Dowex wurde von der Cl⁻-Form in die OH⁻-Form umgewandelt, indem es 45 min in 1 N NaOH gerührt, über eine Nutsche abgetrennt und mit H₂O gewaschen wurde, bis das Eluat etwa pH 7,0 hatte.

Die Eluate wurden bei -20°C eingefroren, in Petrischalen lyophilisiert (Lyovac GT2, Finn Aqua) und in möglichst wenig Wasser wieder gelöst. Durch Zugabe von Aktivkohle und nachfolgender Zentrifugation konnten die gelösten Lyophilisate entfärbt werden.

3.7.2 Antibiotika-Produktion und Agarplatten-Diffusionsassay

Zur Optimierung der Antibiotika-Produktion wurden die Streptomyceten-Stämme bei 30°C in verschiedenen Medien angezogen. Dazu wurden 100 ml-Schikanekolben mit 20 ml Medium verwendet. Nach unterschiedlichen Zeiten, d.h. nach 1 - 11 Tagen Inkubation, wurden Proben entnommen, abzentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, Heraeus-Biofuge A) und der Überstand für

einen Diffusionstest verwendet. Um eine Spectinomycin-Produktion festzustellen, wurden Zellrasen von *E. coli* JM109, *S. cerevisiae*, *S. lividans* TK64 und *S. lividans* TK23 ausplattiert und 50 µl Überstand in ausgestanzte Löcher in den Agarplatten pipettiert. Die Löcher mit einem Durchmesser von 0,4 cm wurden mit einem Korkbohrer in den Agar gestanzt, dessen Füllhöhe in den Petrischalen etwa bei 0,5 - 0,6 cm lag. Die Durchmesser der entstehenden Hemmhöfe wurden nach ca. 24 h und nach mehreren Tagen bestimmt. Die Resistenz der Streptomyceten gegenüber verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen wurde ebenfalls im Diffusionstest festgestellt.

3.7.3 Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung von Spectinomycin erfolgte nach modifizierten Literaturangaben (British Pharmacopoeia, 1998; Sherma, 1991) mit Fertigplatten der Firma Merck (Kieselgel-Platten 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm). Als Laufmittel wurde entweder ein Gemisch aus Eisessig : Pyridin : Isopropanol : H₂O (5 : 5 : 40 : 50) oder 10 % KH₂PO₄ gewählt.

Wurde Spectinomycin radioaktiv markiert, konnte es durch Auflegen eines Röntgenfilms oder Phosphoscreens auf die Kieselgelplatte sichtbar gemacht werden. Ansonsten erfolgte der Nachweis durch Besprühen der Platten mit Ninhydrin (1 g in 50 ml EtOH + 10 ml Eisessig) und anschließendem Erhitzen auf 110°C für 15 min oder durch Besprühen mit 50 % Kaliumpermanganat (in H₂O).

3.7.4 HPLC-Analytik (Debremaeker et al., 2002, modifiziert)

Ein Nachweis von Spectinomycin und seinen Derivaten wurde auch durch eine „Reversed-phase ion-pair“ Chromatographie, gekoppelt mit einer „pulsed electrochemical“ Detektion geführt. Dafür wurde eine Anlage der Firma Merck-Hitachi (Pumpe: L-6200A, Interface: D-6000A, Autosampler: AS-2000A) mit einer Hypersil BDS C18 5µm-Säule (250 mm x 4,6 mm) verwendet. Als Laufmittel diente 1,25 g KH₂PO₄ + 6,56 g Pentafluorpropionsäure (Na-Salz) + 5,5 ml Tetrahydrofuran (ad 1 l H₂O, pH 6,25, sterilfiltriert) mit einer Flussrate von 0,6 ml/min. Das Injektionsvolumen der Probe betrug 20 µl.

Der amperometrische Nachweis basiert auf einer Oxidation der Substanzen an einer Gold-Elektrode, wofür alkalische Bedingungen nötig sind. Um die Moleküle danach von der Elektrode wieder zu lösen, wird eine negative Spannung angelegt. Zum Nachweis wurde

daher zum Eluat der HPLC-Säule über einen Mixer 20 g/l NaOH als „Post-column“-Lösung mit einer Flussrate von 0,18 ml/min zugepumpt. Der elektrochemische Detektor setzte sich aus einer Au-Indikator-Elektrode, einer Ag/AgCl-Referenz-Elektrode und einer Edelstahl-Counter-Elektrode zusammen. Die Spannungen lagen bei 0,05 V zur Detektion, +0,75 V zur Oxidation und -0,15 V zur Reduktion.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der unter *Streptomyces flavopersicus*, *Streptomyces netropsis* und *Streptoverticillium baldaccii* geführten Actinomyceten-Stämme

4.1.1 Taxonomie der Spectinomycin- und Netropsin-Produzenten

Im Zuge mehrerer taxonomischer Neuordnungen wurde der Stamm *Streptomyces flavopersicus* NRRL B-2820 wiederholt neu klassifiziert und umbenannt. Dabei wurde auch seine Zugehörigkeit zur Gattung *Streptomyces* oder *Streptoverticillium* mehrmals geändert. Die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ führt ihn zur Zeit unter dem Namen *Streptomyces netropsis* DSM40093, während er in der American Type Culture Collection ATCC bis vor kurzem unter *Streptoverticillium baldaccii* ATCC19756 zu finden war und neuerdings in *Streptomyces netropsis* ATCC19756 umbenannt wurde. Beide Stammsammlungen geben an, dass die Stämme Spectinomycin (Spc) produzieren.

Unter dem Namen *S. netropsis* sind in der DSMZ derzeit 5 Stämme unter verschiedenen Nummern abgelegt. Der eng mit *S. netropsis* DSM40093 verwandte Stamm *S. netropsis* DSM40259 wird als Produzent des Peptid-Antibiotikums Netropsin beschrieben, während *S. netropsis* DSM40846 Distamycin produziert, das sich von Netropsin nur in einer Seitenkette unterscheidet.

Um sicher zu gehen, dass der für bisherige Untersuchungen verwendete Spectinomycin-Produzent *S. flavopersicus* NRRL B-2820, der von D. Lyutskanova zur Verfügung gestellt wurde, den neu benannten Stämmen entspricht, wurden die Stämme *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *S. netropsis* DSM40093 und *Sm. baldaccii* ATCC19756, sowie *S. netropsis* DSM40259 näher untersucht. *S. netropsis* DSM40093 und *S. netropsis* DSM40259 wurden für diese Zwecke von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen und *Sm. baldaccii* ATCC19756 von der American Type Culture Collection bezogen.

4.1.2 Wachstum und Morphologie der Spectinomycin- und Netropsin-Produzenten

Alle Stämme wiesen sowohl in verschiedenen Flüssigmedien als auch auf Agarplatten gleiche Morphologie und gleiches Wachstumsverhalten auf. Die Stämme bildeten in Flüssigkultur nach ca. 2 Tagen ein leicht verzweigtes Myzelgeflecht. Das Luftmyzel auf Agarplatten war weiß-gelblich gefärbt und sehr flaumig. Nach etwa 7 Tagen entstanden auf der

Myzeloberfläche Tropfen mit rötlich-brauner Flüssigkeit, die in einem Agarplatten-Diffusionsassay die Sporulation der Testsämme *S. lividans* TK64 und TK23 hemmte. Unter dem Mikroskop war keine Sporenbildung bei *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *S. netropsis* DSM40093, *Sm. baldaccii* ATCC19756 und *S. netropsis* DSM40259 zu erkennen. Eine Gewinnung von Sporen nach der üblichen Methode war daher nicht möglich, und es mussten Flüssigkulturen der Stämme für die Gewinnung von Dauerkulturen herangezogen werden.

Ferner sind *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *S. netropsis* DSM40093, *Sm. baldaccii* ATCC19756 und *S. netropsis* DSM40259 resistent gegenüber Netropsin, unterscheiden sich aber in ihrer Spectinomycin-Resistenz. *S. netropsis* DSM40259 ist als einziger der getesteten Stämme Spectinomycin-sensitiv. Bei *S. flavopersicus* NRRL B-2820 wurde die Resistenz auch gegenüber den Aminoglykosid-Antibiotika Streptomycin, Hygromycin, Neomycin, Kanamycin und Gentamicin in einem Agarplatten-Diffusionsassay getestet. Dabei wurden die Antibiotika in Konzentrationen von 10, 25, 50 bzw. 100 µg in Löcher im Agar gegeben, auf den der Stamm zuvor ausplattiert wurde. *S. flavopersicus* NRRL B-2820 erwies sich jedoch nur als Spectinomycin-resistent.

4.1.3 Präsenz eines DNA-Restriktions-/Modifikationssystems in *S. flavopersicus*

Von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 war bekannt, dass er das TypII Restriktions-/Modifikationssystem *SfiI* (<http://rebase.neb.com>) besitzt, das die Sequenz CTGCA[^]G erkennt und modifiziert. Diese Sequenz ist auch die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *PstI*, weshalb DNA, die aus *S. flavopersicus* isoliert wurde, nicht von *PstI* geschnitten werden konnte. Eine Aktivität des Restriktionsenzym konnte nachgewiesen werden, indem Rohextrakt und mit Ammoniumsulfat-gefällter Rohextrakt von *S. flavopersicus* mit der DNA des Phagen λ oder mit verschiedener Plasmid-DNA inkubiert wurde. Die DNA ließ nach einer Auftrennung im Agarosegel das gleiche Restriktionsmuster wie nach einem Verdau mit *PstI* erkennen.

Das Vorhandensein von *SfiI* in den anderen Stämmen wurde untersucht, indem ihre genomische DNA mit *PstI* behandelt wurde. Die Agarose-Gelelektrophorese zeigte, dass nur die DNA von *S. netropsis* DSM40259 ebenso wie die DNA der Kontrolle *S. lividans* TK64 von *PstI* verdaut werden kann (Abb. 9). Die beiden anderen Stämme *S. netropsis* DSM40093 und *Sm. baldaccii* ATCC19756 sollten daher auch das Restriktions-/Modifikationssystem *SfiI* besitzen.

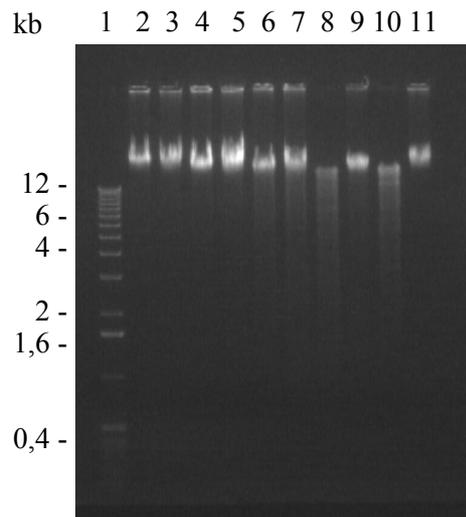


Abb. 9: Identifikation eines DNA-Modifikationssystems in verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen. Chromosomale DNA von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 (2, 3), *S. netropsis* DSM40093 (4, 5), *Sm. baldaccii* ATCC19756 (6, 7), *S. netropsis* DSM40259 (8, 9) und *S. lividans* TK64 (10, 11) wurde mit *Pst*I geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Spuren: (1) 1 kb-Leiter; (2, 4, 6, 8, 10) DNA mit *Pst*I verdaut; (3, 5, 7, 9, 11) DNA unverdaut.

4.1.4 Restriktionsmuster-Analyse der chromosomalen DNA aus den Spectinomycin- und Netropsin-Produzenten

Die Genome der Stämme wurden auf Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus untersucht. Chromosomale DNA aus *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *S. netropsis* DSM40093, *Sm. baldaccii* ATCC19756 und *S. netropsis* DSM40259 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt und im Agarosegel aufgetrennt (Abb. 10). Dabei konnte kein Unterschied im Bandenmuster festgestellt werden, während die DNA von *S. lividans* TK64 ein anderes Muster zeigte.

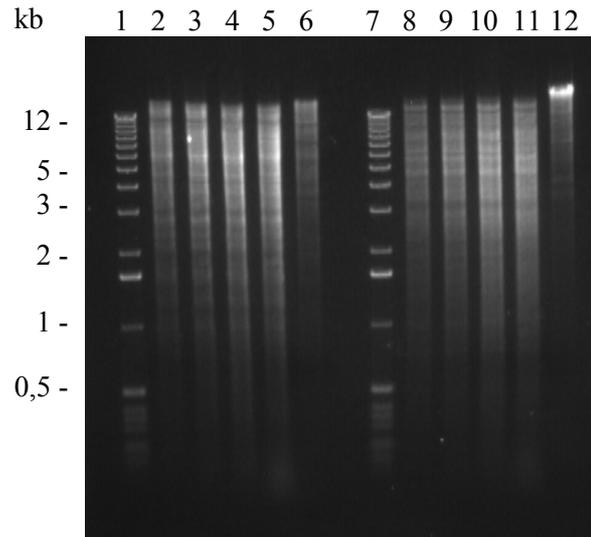


Abb. 10: Restriktionsmuster-Analyse der chromosomalen DNA verschiedener *Streptomyces*-Stämme. Chromosomale DNA von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 (2, 8), *S. netropsis* DSM40093 (3, 9), *Sm. baldaccii* ATCC19756 (4, 10), *S. netropsis* DSM40259 (5, 11) und *S. lividans* TK64 (6, 12) wurde mit *Bam*HI (2 - 6) und *Sac*I (8 - 12) geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Spuren: (1, 7) 1 kb-Leiter.

4.1.5 Nachweis des Spectinomycin-Genclusters in verschiedenen Streptomyceten-Stämmen

Nach einem Restriktionsverdau der chromosomalen DNA der zu untersuchenden Streptomyceten wurde das Gel geblottet und die erhaltene Membran mit dem Cosmid pTST63 (s. 4.5.5), welches alle Gene des Spectinomycin-Synthese-Clusters trug, hybridisiert. Hybridisierungssignale gleicher Größe wurden bei genomischer DNA von *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *S. netropsis* DSM40093 und *Sm. baldaccii* ATCC19756 erhalten. Dagegen fand keine Hybridisierung mit genomischer DNA von *S. netropsis* DSM40259 (Abb. 11) statt. Dies deutet darauf hin, dass *S. netropsis* DSM40259 das Gencluster zur Biosynthese von Spectinomycin nicht besitzt, was auch mit dem Befund übereinstimmt, dass der Stamm Spectinomycin-sensitiv ist.

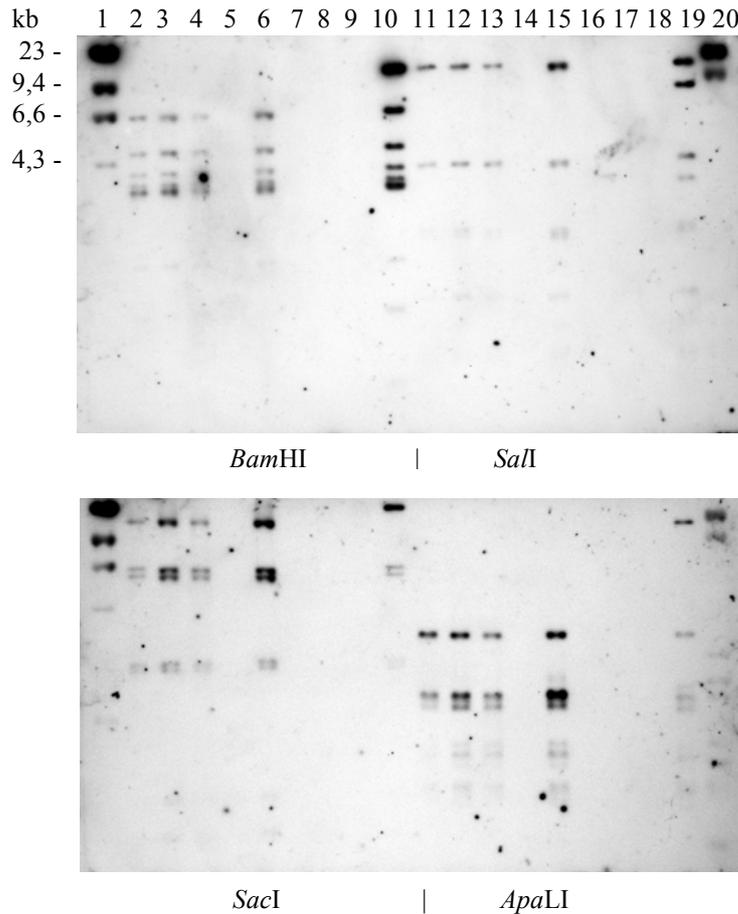


Abb. 11: Southern Blot-Nachweis des Spc-Genclusters im Genom verschiedener *Streptomyces*-Stämme. Chromosomale DNA von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 (2, 6, 11, 15), *S. netropsis* DSM40093 (3, 12), *Sm. baldaccii* ATCC19756 (4, 13), *S. netropsis* DSM40259 (5, 7, 14, 16), *S. spectabilis* NRRL2494 (8, 17) und *S. lividans* TK64 (9, 18) wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Als Sonde diente das Genbankcosmid pTST63 (10, 19). Spuren: (1) λ -DNA, *Hind*III-verdaut; (20) λ -DNA, *Bgl*I-verdaut.

4.2 Konstruktion einer Cosmid-Genbank von *S. flavopersicus* NRRL B-2820

4.2.1 Konstruktion zweier neuer Cosmid-Vektoren

Das Cosmid Supercos-1 kann in Streptomyceten nicht replizieren, da es nur einen Replikationsursprung für *E. coli* besitzt. In vielen Fällen kann es aber von Nutzen sein, Cosmide einer Genbank in Streptomyceten zu vermehren. Aus diesem Grund wurde das Cosmid pTST59.1 konstruiert. Es enthält neben einem großen Bereich aus Supercos-1 noch

die Attachment-Site (*att*) und das Integrasegen (*int*) des Streptomycten-Phagen ϕ C31. Mit Hilfe dieses Site-spezifischen Rekombinationssystems kann das Cosmid nach einer Transformation von Streptomycten in das Chromosom integrieren und bleibt so stabil erhalten.

Die *att*-Site und das *int*-Gen des Phagen ϕ C31 wurden als 3,9 kb-Fragment mit *Kpn*I aus dem Plasmid pTST35.3 geschnitten und die überstehenden 3'-Enden mit Klenow-Polymerase abgebaut. Der Vektor Supercos-1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hpa*I und *Sma*I verdaut und mit dem Fragment aus pTST35.3 ligiert.

Die Integration des neuen Vektors pTST59.1 (Abb. 12A) ins Chromosom wurde im Falle des Genbankcosmids pTST63 nachgewiesen (s. 4.5.5).

Für einen weiteren Cosmid-Vektor wurde in die *Xba*I-Schnittstelle des Plasmids pTST59.1 das mit sich komplementäre Oligonukleotid s3673 ligiert, dessen Sequenz neben den überstehenden *Xba*I-Enden aus zwei Schnittstellen des Restriktionsenzym *Bsu*36I bestand. Die beiden Erkennungssequenzen von *Bsu*36I unterscheiden sich in einer Base, so dass damit eine Religation des Vektors verhindert bzw. eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase umgangen werden kann (Abb. 12B). Der aus der Ligation hervorgegangene Vektor wurde pTST250.8 genannt.

Im Übrigen erwies sich die Kanamycin-Resistenz von pTST59.1 als Selektionsmarker problematisch, da Aminoglykosid-Antibiotika bei hohen Salz- oder Zuckerkonzentrationen, wie sie in den für die Streptomycten verwendeten Regenerationsplatten vorkommen, in ihrer Wirkung abgeschwächt werden. Daher wurde über einen Zwischenklonierungsschritt das Kanamycin-Resistenzgen mit *Sph*I gegen das Thiostrepton-Resistenzgen aus dem Vektor pJOE551.1 ausgetauscht, wodurch der neue Cosmid-Vektor pTST257.7 entstand (Abb. 12A).

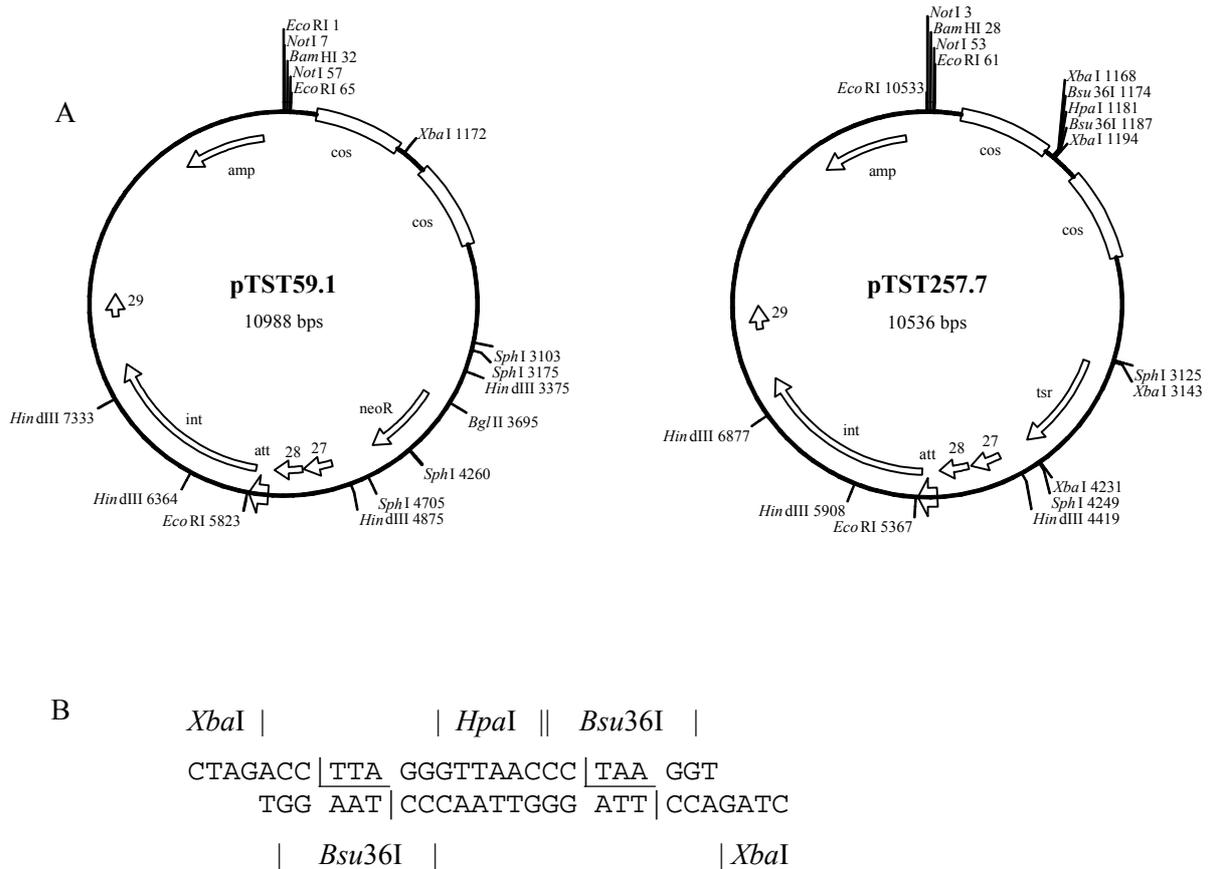


Abb. 12: Restriktionskarten der Genbankcosmide pTST59.1 und pTST257.7 (A) sowie des komplementären Oligonukleotids s3673 mit den unsymmetrischen *Bsu*36I-Schnittstellen (B).

4.2.2 Herstellung einer Genbank von *S. flavopersicus* NRRL2820

Für die Konstruktion einer Genbank von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 wurde der Cosmid-Vektor pTST59.1 verwendet. Durch einen Doppelverdau mit *Bam*HI und *Xba*I wurde der Vektor in zwei Arme mit je einer *cos*-Site getrennt, und chromosomale DNA, die mit *Sau*3A partial verdaut wurde, konnte in die *Bam*HI-Schnittstelle zwischen den Vektorarmen inseriert werden. Die linearen Moleküle wurden in λ -Phagenpartikel verpackt, und mit den Lysaten wurde *E. coli* RR1 infiziert. Der höchste erreichte Phagentiter betrug $7,4 \times 10^3$ pfu/ml. Von den untersuchten Cosmide enthielten 73 % ein Insert. Mit folgender Gleichung ließ sich die Repräsentanz der Genbank errechnen (Clarke & Carbon, 1976):

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - x/y)$$

N: Anzahl der benötigten Klone

P: Wahrscheinlichkeit, dass jedes DNA-Fragment des Genoms repräsentiert wird

x: durchschnittliche Insertgröße (35 kb)

y: Größe des Gesamtgenoms

Für die Länge des Genoms von *S. flavopersicus* wurden, wie für *S. coelicolor* A3(2) und *S. avermitilis* bekannt, etwa 8.000 kb angenommen. Damit jeder beliebige Abschnitt der DNA mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % ($P = 0,99$) vorhanden war, lag die erforderte Größe der Genbank bei 1.050 Klonen. Berücksichtigte man zusätzlich die Klone, die Cosmide ohne Inserts beinhalteten, waren mindestens 1.440 Transduktanten für eine repräsentative Genbank nötig. Diese Anzahl wurde mit dem Phagenlysat etwa 5-mal erhalten.

4.2.3 Untersuchung und Screening der Genbank von *S. flavopersicus*

Die erhaltenen Kolonien der Genbank von *S. flavopersicus* wurden einer Kolonie-Hybridisierung unterzogen (s. 3.6.8.2). Eine etwa 24 kb-lange Sequenz des Spectinomycin-Biosynthese-Genclusters war zu Beginn der Arbeit bereits bekannt und lag als Insert des Genbankplasmids Sfcos10 vor, das mit dem Vektor Supercos-1 konstruiert worden war. Die DNA-Sequenzierung und das Ergebnis eines Southern Blots zeigten, dass sich das Insert in Sfcos10 aus zwei getrennten chromosomalen Bereichen von *S. flavopersicus* zusammensetzte, und das Spc-Gencluster unvollständig war. Daher wurde ein ~ 0,8 kb-Fragment von einem Ende des Spc-Clusters als Sonde zum Screening der Genbank mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP markiert. Koloniefilter mit ungefähr 1.700 Klonen der *S. flavopersicus*-Genbank wurden angefertigt und mit der Sonde hybridisiert. Das Screening führte zu 23 vermeintlich positiven Kolonien. Im Southern Blot konnte das Hybridisierungssignal nur bei einem Cosmid reproduziert werden. Die anderen Signale kamen eventuell dadurch zustande, dass bei diesen Kolonien mehr Zellmaterial auf den Filtern haften blieb. Das erhaltene Cosmid wurde als pTST63 bezeichnet.

4.2.4 Grobkartierung und Sequenzierung des Genbankplasmids pTST63

Das aus dem Screening der Genbank hervorgegangene Cosmid pTST63 und das Cosmid Sfcos10, das bereits einen Großteil des Spectinomycin-Genclusters enthielt, wurden mit

verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (Abb. 13). Das Bandenmuster war z.T. identisch, wies aber bei pTST63 auch Banden auf, die bei Sfcos10 nicht vorhanden waren.

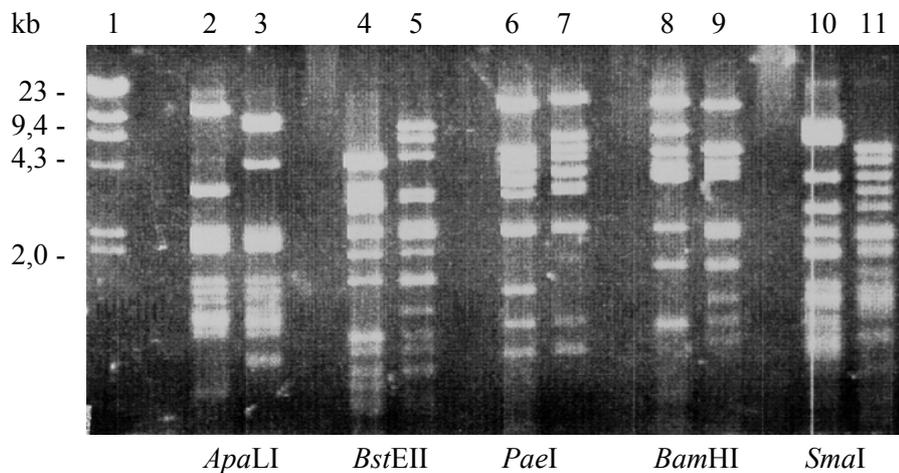


Abb. 13: Agarosegel der mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnittenen Genbankplasmide pTST63 und Sfcos10. Spuren: (1) λ -DNA, *Hind*III-verdaut; (2, 4, 6, 8, 10) pTST63; (3, 5, 7, 9, 11) Sfcos10.

Über Southern Blot-Analyse wurde ein $\sim 6,5$ kb großes *Sma*I-Fragment von pTST63 identifiziert, das mit der Sonde, die auch zum Screening der Genbank eingesetzt wurde, hybridisierte. Dieses Fragment wurde in pIC19H subkloniert, woraus pTST69 hervorging, und von beiden Enden ansequenziert. Dabei konnten etwa 1,2 kb von einem Ende des Inserts in der bereits bekannten Sequenz ab Base 24.215 des *Spc*-Clusters wiedergefunden werden.

Das Insert aus pTST69 wurde in das Plasmid pJOE2114, einen positiven Selektionsvektor mit zwei „res-Sites“ als palindromische Sequenzen, umkloniert (s. 7.1), wodurch das Plasmid pTST72 entstand. Die „Inverted Repeats“ in pJOE2114 verhinderten, dass der Vektor ohne Insert-DNA in *E. coli* replizieren konnte. Außerdem stellten die „res-Sites“ ein wichtiges Werkzeug für die nachfolgende Transposon-Mutagenese mit dem Transposon *Tn5491* dar (Fischer et al., 1996), mit der die Gesamtsequenz des Inserts ermittelt wurde.

E. coli JM108 *F'**lac*::*Tn5491*] wurde mit pTST72 transformiert und eine Transposon-Mutagenese durchgeführt (s. 3.6.4). Aus den erhaltenen Transkonjuganten wurden die Plasmide isoliert und mit *Sca*I und *Eco*RI kartiert. So konnte der Integrationsort und die Orientierung des Transposons ermittelt werden. Ungefähr 40 verschieden deletierte Plasmide wurden anschließend sequenziert.

Die Sequenzdaten wurden mit dem GCG-Programm der University of Wisconsin analysiert und zusammengesetzt. Bereiche, die mit Hilfe der Transposon-Mutanten nicht erfasst wurden, wurden mittels spezifischer Primer sequenziert. Um Fehler zu korrigieren, wurde die Sequenz beider Stränge des DNA-Fragments bestimmt. Die Sequenzierung des Inserts von pTST72 lieferte eine neue Sequenz von etwa 5,3 kb am Ende der bereits bekannten Biosynthesegene. Damit ergab sich zusammen mit den Sequenzdaten von Sfcos10 eine Gesamtsequenz von 29.601 bp.

4.3 Analyse der Gesamtsequenz des Spectinomycin-Biosynthese-Genclusters

Mit Hilfe eines Codon-Usage-Programms für Streptomycetengene (Sedlmeier & Altenbuchner, 1992) wurden offene Leseraster in allen 6 Leserastern in der Sequenz des Spc-Genclusters analysiert und ihnen über Homologie-Vergleiche in den Datenbanken mögliche Funktionen zugeordnet. Die DNA-Sequenz und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden in der Datenbank unter der Accession-Nummer U70376 hinterlegt. Der GC-Gehalt des sequenzierten Bereichs betrug 68,6 % und entspricht dem typischen, hohen GC-Gehalt von Streptomyceten-DNA.

Aufgrund von Homologien zum Spectinomycin-Biosynthese-Gencluster und unter Berücksichtigung des möglichen Biosynthesewegs von Spectinomycin konnten folgende mögliche Gene dem Spectinomycin-Cluster zugeteilt werden (Abb. 14). Dazu zählten Gene für einen Transkriptionsregulator, eine Spectinomycin-Phosphotransferase, d.h. ein Spectinomycin-Resistenzgen, ein Transportprotein, eine *myo*-Inositol-Monophosphatase, zwei Dehydrogenasen, zwei Aminotransferasen/Dehydratasen, eine Epimerase, eine Keto-Isomerase, eine 4,6-Dehydratase, eine Glykosyltransferase, eine Methyltransferase, eine Thymidyltransferase, ein Zuckerbindepotein und ein Protein, das zu Molybdän-Cofaktor-Biosyntheseproteinen Ähnlichkeit zeigt. Auf die einzelnen Proteine wird in Kapitel 4.4 näher eingegangen.

Eindeutige Ribosomen-Bindestellen konnten nicht vor allen Genen ausgemacht werden. Für das Gen *spcB* zum Beispiel kommen daher mehrere mögliche Start-Codons in Betracht.

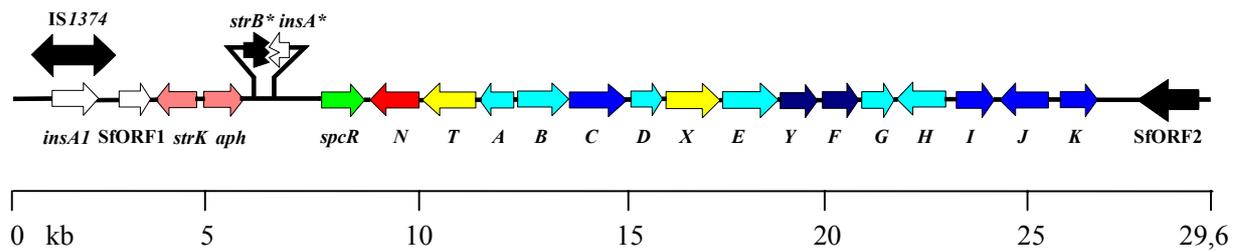


Abb. 14: Physikalische Karte des Spectinomycin-Biosynthese-Genclusters von *S. flavopersicus* NRRL B-2820. Die abgeleiteten Proteine sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Zwei palindromische Sequenzen, die die Basen 7.356 bis 7.396 und 7.435 bis 7.467 umfassen, wurden zwischen den Genen *spcR* und *spcN* gefunden. Sie könnten als Transkriptionsterminatoren, einer für jedes Gen, dienen. Am Ende der beiden in entgegengesetzte Richtungen transkribierten Gene *spcG* und *spcH* befindet sich ebenfalls eine mögliche Terminatorstruktur aus je 16 bp langen, invers orientierten Sequenzwiederholungen mit einem Loop von 8 bp dazwischen (Position 19.409 bp - 19.449 bp). Ein zweiter kürzerer Terminator könnte zwischen den Genen *spcJ* und *spcK* liegen.

Des Weiteren ist eine ausgeprägte direkte Sequenzwiederholung von 19 bp bei Position 19.361 bp - 19.405 bp vorhanden. Dabei befindet sich der erste Repeat innerhalb von *spcG* und schließt mit dem TGA-Stopp-Codon ab, während der zweite Repeat nach einem Zwischenraum von 6 Basen folgt. Die beiden Gene *spcH* und *spcI* bzw. *spcJ* und *spcK* werden jeweils in verschiedene Richtungen transkribiert. In der intercistronischen Region *spcH* - *spcI* liegt eine kurze gleich orientierte Sequenzwiederholung von je 9 bp (GGAAACAGG), wobei die letzte Base des ersten Repeats mit der ersten Base des zweiten Repeats überlappt. Zwischen *spcJ* - *spcK* umfasst ein kurzer „Direct Repeat“ je 7 Basen (GTGCAAA).

Als mögliche Promotorregionen kommen die Regionen vor den Genen *spcR*, *spcA* - *spcB*, *spcH* - *spcI* und *spcJ* - *spcK* in Betracht. Sie sind relativ AT-reich, weisen aber untereinander über längere Bereiche keine Ähnlichkeit auf.

In Streptomyceten wird die Differenzierung und Produktion von Sekundärmetaboliten stringent reguliert und ist z.T. abhängig von zusätzlichen Genprodukten. Dazu zählt eine Leucin-spezifische tRNA, die von *blcA* codiert wird und das seltene Codon UUA erkennt. Je ein solches TTA-Codon befindet sich am 5'-Ende der Gene *spcR*, *spcH* und *spcK*.

Tab. 6: Homologie und Eigenschaften der in der unmittelbaren Nachbarschaft des Spc-Genclusters von *S. flavopersicus* codierten Proteine.

Gen	Länge (AS)	Protein-Familie	homologes Protein [Organismus] Accession-Nummer	mögliche Funktion	Bemerkungen
<i>insA1</i>	390	-	Transposase IS1357 [<i>Methylobacterium sp.</i>] EMB CAA65721	Transposase	Transposasegen ist Bestandteil von IS1374
SfORF1	198	Acetyltransferase-(GNAT) Familie	mögliche Acetyltransferase [<i>Mesorhizobium loti</i>] REF NP_105070	-	
<i>strK</i>	256	alkalische Phosphatase-Familie	Streptomycin-6-Phosphat-Phosphatase [<i>S. glaucescens</i>] EMB CAA07382	Streptomycin-Phosphat-Phosphatase	Protein ist durch DNA-Rearrangements an den N- und C-terminalen Regionen des Gens wahrscheinlich inaktiv
<i>aph</i>	315	-	Streptomycin-6-Phosphotransferase [<i>S. glaucescens</i>] SP P18622	Streptomycin-Resistenz	„low level“ Streptomycin-Resistenz
<i>strB*</i>	100	-	Amidinotransferase [<i>S. glaucescens</i>] PIR S44229	unvollständige Amidinotransferase	Gen ist am C-Terminus deletiert, überlappt mit <i>insA*</i>
<i>insA*</i>	90	-	Insertionselement IS112 28.4 kDa-Protein [<i>S. albus</i>] SP P23393	unvollständige Transposase	Gen ist am C-Terminus deletiert, überlappt mit <i>strB*</i>
SfORF2	694	Ive, Integrase-„Core“-Domäne	mögliche Transposase [<i>S. coelicolor</i>] EMB CAC03660	Transposase	

*: Gene sind unvollständig; -: unbekannt.

4.4 Datenbank-Recherche mit den Gensequenzen des Spc-Clusters

Um die Funktion der von den identifizierten ORFs abgeleiteten Proteine näher zu bestimmen, wurden Homologie-Suchen mit dem Blast-Programm des National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchgeführt. Direkte Homologie-Vergleiche zwischen zwei Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des Align-Programms von Lipman und Pearson (Lipman & Pearson, 1985) durchgeführt. Zusätzlich wurde in den Datenbanken CDD, Pfam, Prosite und InterPro nach konservierten Bereichen gesucht, die eine Klassifikation in Protein-Familien ermöglichen sollte. Tabelle 7 gibt alle möglichen zum Spc-Cluster gehörenden Gene, die dazugehörigen Proteine, ihre Homologie und die Zugehörigkeit zu Protein-Familien wieder.

SpcA

SpcA weist auf Aminosäure-Ebene mässige Identität zu *myo*-Inositol-Monophosphatasen aus verschiedenen Organismen auf. Die Protein-Datenbanken ordnen SpcA der Inositol-Monophosphatase-Familie zu. Mitglieder dieser Familie weisen zwei konservierte Bereiche auf, die an der Bindung eines Metallions, meist Mg^{2+} , und der Phosphatgruppe des Substrats beteiligt sind. Diese Sequenzen mit den für die Bindung des Metallions notwendigen Aspartat- und Leucin-Resten wurden auch in SpcA zwischen den Aminosäuren 89 - 101 bzw. 219 - 233 gefunden.

SpcB und SpcH

Beide Proteine zeigen Homologie zu *myo*-Inositol-Dehydrogenasen. Bei SpcB ist diese mit 33 % Identität zur *myo*-Inositol-Dehydrogenase von *Bacillus halodurans* jedoch höher als bei SpcH (23 % Identität zur *myo*-Inositol-Dehydrogenase von *Methanosarcina mazei*), das die höchste Ähnlichkeit zu NADH-abhängigen Dehydrogenasen bzw. zu Glucose/Fructose-Oxidoreduktasen aufweist.

Für den Beginn des Gens *spcB* kommen zwei mögliche Start-Codons in Betracht. Ein Sequenzvergleich mit den Enzymen von *S. spectabilis*, die zu 73 % identisch sind, zeigte, dass die Ähnlichkeit erst ab dem späteren Start-Codon bei Base 10.863 der Gesamtsequenz einsetzt.

Tab. 7: Homologien und Eigenschaften der im Spc-Gencluster von *S. flavopersicus* codierten Proteine.

Gen	Länge (AS)	Protein-Familie	homologes Protein [Organismus] Accession-Nummer	identische Aminosäuren [%]	mögliche Funktion
<i>spcA</i>	266	Inositol-Monophosphatase-Familie	<i>myo</i> -Inositol-1 (oder 4)-Monophosphatase [<i>E. coli</i>] PIR D65030	38	(<i>myo</i> -Inositol)- Monophosphatase
<i>spcB</i>	376/ 392	GFO-IDH-MocA, Oxidoreduktase-Familie	NADH-abhängige Dehydrogenase [<i>Mesorhizobium loti</i>] DBJ BAB49569	29	(<i>myo</i> -Inositol)-Dehydrogenase
<i>spcC</i>	441	Aminotransferase Klasse-III (Pyridoxalphosphat)-Familie	Pyridoxalphosphat-abhängige Aminotransferase [<i>Pyrococcus abyssi</i>] PIR G75108	32	Aminotransferase/Dehydratase
<i>spcD</i>	262	-	D-Tagatose-3-Epimerase [<i>Pseudomonas cichorii</i>] SP O50580	22	Epimerase
<i>spcE</i>	435	DegT/DnrJ/EryC1/StrS- Familie, Aminotransferase-Familie	L-Glutamine: <i>scyllo</i> -Inosose-Aminotransferase [<i>S. griseus</i>] EMB CAA70012 pleiotropes regulatorisches Protein DegT [<i>Pyrococcus furiosus</i>] NP_578496	45 31	Aminotransferase/Dehydratase
<i>spcF</i>	270	Glykosyltransferase	UDP-Hexose-Transferase [<i>Bradyrhizobium japonicum</i>] GB AAC04822	23	Glykosyltransferase
<i>spcG</i>	271	DNA-Methylase	<i>PvuII</i> DNA-Methyltransferase [<i>Proteus vulgaris</i>] GB AAA96336	25	Methyltransferase
<i>spcH</i>	346	GFO-IDH-MocA, Oxidoreduktase-Familie	mögliche Dehydrogenase und verwandte Proteine [<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>] GB AAM25130	28	Dehydrogenase

Fortsetzung Tab.7

Gen	Länge (AS)	Protein-Familie	homologes Protein [Organismus] Accession-Nummer	identische Aminosäuren [%]	mögliche Funktion
<i>spcI</i>	312	NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase-Familie	zur NAD-abhängigen Epimerase/Dehydratase-Familie gehörendes Protein [<i>Mycobacterium tuberculosis</i>] GB AAK48097	29	(4-Keto-6-Desoxyglucose)-Isomerase
<i>spcJ</i>	328	NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase-Familie	dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase SgcA [<i>S. globisporus</i>] GB AAF13998	67	(dTDP-Glucose-4,6)-Dehydratase
<i>spcK</i>	303	Nukleotidyltransferase	dTDP-Glucose-Synthase [<i>S. rishiriensis</i>] GB AAG29804	70	Thymidyltransferase
<i>spcN</i>	330	Aminoglykosid-Phosphotransferase	<i>strN</i> Protein [<i>S. glaucescens</i>] PIR S44234	30	Resistenz (Spectinomycin-Phosphotransferase)
<i>spcR</i>	330	-	Regulatorprotein [<i>S. glaucescens</i>] PIR S44506	36	Regulator
<i>spcT</i>	433	Monocarboxylat-Transporter, Zucker (und andere) Transporter	Transmembran-Effluxprotein [<i>S. coelicolor</i> A3(2)] EMB CAB62691	29	Transportprotein
<i>spcX</i>	397	bakterielles extrazelluläres Bindeprotein	Zucker-ABC-Transporter (Zucker-Bindeprotein) [<i>B. halodurans</i>] DBJ BAB07399	24	Zucker-Bindeprotein
<i>spcY</i>	302	MoaA/NifB/PqqE-Familie	Molybdän-Cofaktor-Biosyntheseprotein (MoaA) [<i>Methanococcus jannaschii</i>] GB AAB98823	21	-

-: unbekannt.

Beide Enzyme konnten in die GFO/IDH/MocA- oder Oxidoreduktase-Familie eingeordnet werden. Diese nutzt NADP⁺ oder NAD⁺ als Cofaktor. Im N-terminalen Bereich von SpcB konnte mit der Aminosäuresequenz GVIIGCG (AS 26 - 31) ein Bereich gefunden werden, der in etwa der Konsensus-Sequenz GXGXXG entspricht, die auch als „β α β“- oder „Rossmann-Fold“ bezeichnet und als NAD⁺-Bindemotiv angesehen wird. In SpcH konnten keine konservierten Regionen ausgemacht werden, und der Rossmann-Fold ist nur unvollständig zwischen den Aminosäuren 7 bis 12 (GFGTIA) vorhanden.

SpcC und SpcE

SpcC zeigt Ähnlichkeit zu Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängigen Aminotransferasen und konnte auch der Aminotransferase-Familie der Klasse III zugeordnet werden. Das charakteristische Motiv dieser Familie, in dem an den konservierten Lysin-Rest die kovalente Bindung von Pyridoxalphosphat stattfindet, kommt auch im zentralen Bereich (AS 244 - 283) von SpcC vor.

SpcE besitzt mit 45 % relativ hohe Identität zur L-Glutamin:*scyllo*-Inosose-Aminotransferase StsC von *S. griseus* (Abb. 16). Es konnten aber auch etwas niedrigere Identitäten zu Aminotransferasen verschiedener anderer Streptomyceten, zu regulatorischen Proteinen, zu Pyridoxalphosphat-bindenden Proteinen der DegT/DnrJ/EryC1/StrS-Familie und zu Glucose-Dehydratasen gefunden werden. Die Suche in den Protein-Datenbanken ergab eine Zuordnung von SpcE zur DegT/DnrJ/EryC1/StrS-Aminotransferase-Familie. Mitglieder dieser Familie sind wahrscheinlich alles Pyridoxalphosphat-abhängige Aminotransferasen mit einer Vielzahl an molekularen Funktionen. Außerdem zeigen sie einige Charakteristika von Sensor-Proteinen der „two-component“ Signal-Transduktionssysteme, obwohl sie keine Sequenzähnlichkeit zu diesen Protein-Kinasen aufweisen. Konsensus-Motive zur Bindung von Pyridoxalphosphat oder das typische Helix-Turn-Helix-Motiv von DNA-bindenden Proteinen, das die Mitglieder haben, konnten beide in SpcE nicht gefunden werden.

SpcD

Für SpcD wurde die höchste Homologie zu einer Tagatose-Epimerase von *Pseudomonas cichorii* gefunden, aber auch zu Epimerasen aus anderen Organismen besteht Übereinstimmung. Die Zuordnung zu einer Protein-Familie ergab kein Resultat.

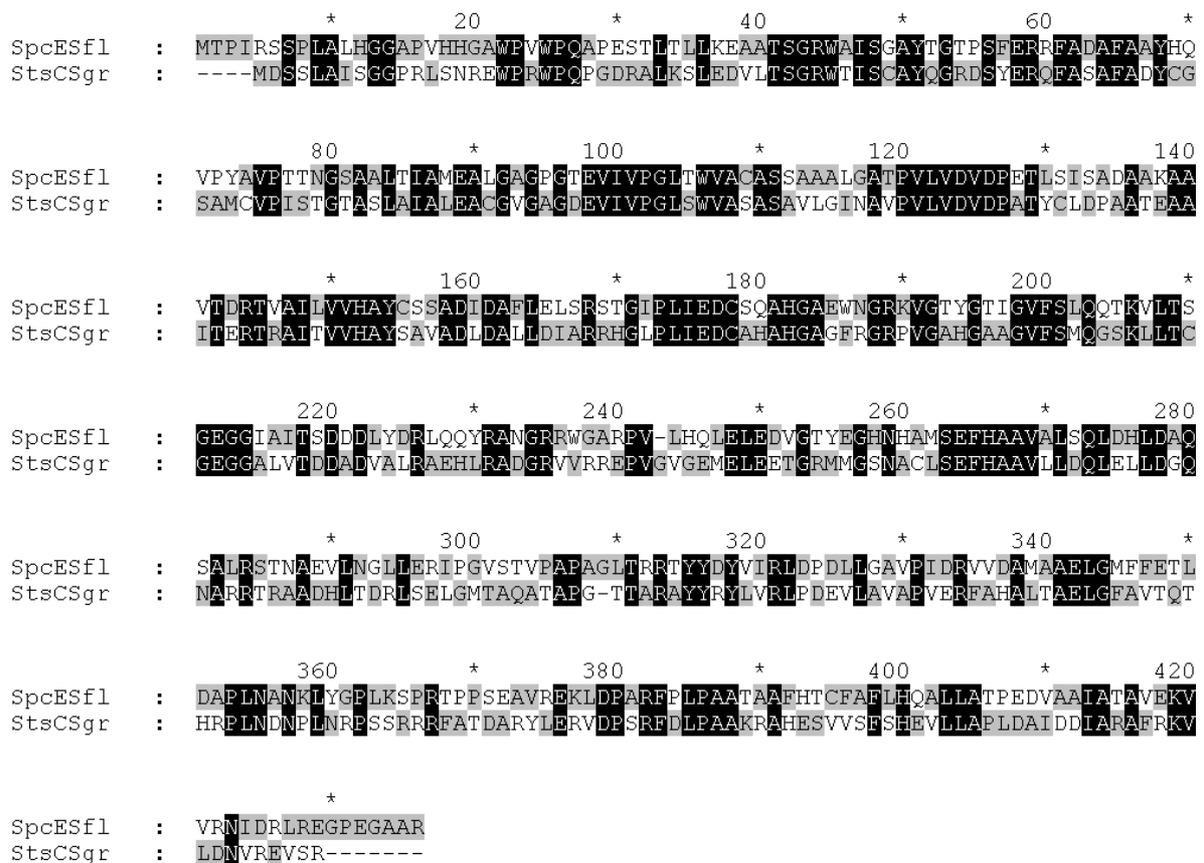


Abb. 16: Sequenzvergleich der potentiellen Aminotransferase/Dehydratase SpcE aus *S. flavopersicus* (SpcESfl) und der L-Glutamin:*scyllo*-Inosose-Aminotransferase StsC aus *S. griseus* (StsCSgr).

SpcF

SpcF zeigt Homologie zu Glykosyltransferasen aus einer Vielzahl von Organismen, worunter sich allerdings bis auf *S. coelicolor* keine Streptomycceten befinden. Glykosyltransferasen können in verschiedene Familien eingeteilt werden, wobei SpcF in die Glykosyltransferase-Familie 2 fällt. Dagegen fallen alle anderen Glykosyltransferasen, die bisher aus Antibiotika-produzierenden Actinomyceten isoliert wurden, unter die Glykosyltransferase-Familie 1 (Méndez & Salas, 2001). An konservierten Motiven ist nur das DXD-Motiv zwischen der 104. und 106. Aminosäure im zentralen Teil des Enzyms vorhanden. Die beiden Aspartat-Reste binden vermutlich ein Magnesium-Kation, das die Nukleotidzucker-Diphosphatgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms verankert (He & Liu, 2002).

SpcG

Aufgrund seiner Sequenzidentität wird für SpcG eine mögliche Methyltransferase-Aktivität angenommen. Interessanterweise ist die Ähnlichkeit nur zu DNA-Methyltransferasen vorhanden, nicht aber zu Methyltransferasen aus anderen Antibiotika-Biosynthese-Clustern. SpcG teilt mit Mitgliedern der N-6 Adenin-spezifischen und N-4 Cytosin-spezifischen DNA Methylase-Familien die Konsensus-Sequenz [LIVMF]TSPP[FY] im N-Terminus (AS 40 - 46), die eventuell an der Substrat-Bindung oder der katalytischen Aktivität der Enzyme beteiligt zu sein scheint. Andere konservierte Bereiche, unter anderem eine SAM-Bindestelle (Kagan & Clarke, 1994), konnten nicht gefunden werden.

SpcI

Nach einer Suche mit dem Blast-Programm konnten mehrere verschiedene zu SpcI homologe Proteine identifiziert werden. Diese umfassen dTDP-Glucose-4,6-Dehydratasen, NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase-Proteine und dTDP-4-Keto-6-Desoxyhexose-4-Keto-reduktasen. Eine Klassifizierung von SpcI führte zur NAD-abhängigen Epimerase/Dehydratase-Familie. Zwei konservierte Motive, die auch bei der „short-chain“ Dehydrogenase/Reduktase-Superfamilie auftreten, konnten in der Sequenz von SpcI ausgemacht werden. Dazu zählt einerseits im zentralen Bereich YXXXX (AS 139 - 143), wovon sich der Tyrosin-Rest im aktiven Zentrum befindet und an der katalytischen Aktivität der Enzyme beteiligt ist. Dieses Motiv wird als charakteristisch sowohl für „short-chain“ Dehydrogenasen (He & Liu, 2002) als auch für Ketoreduktasen und Epimerasen (Trefzer et al., 1999) beschrieben. Zusätzlich wurde im N-Terminus die Konsensus-Sequenz GXXGXXG (AS 22 - 28) gefunden. Diese ist als NAD⁺-Bindestelle bekannt. Allerdings unterscheidet sie sich leicht vom typischen $\beta\alpha\beta$ -Fold GXGXXG der meisten NAD⁺-abhängigen Enzyme.

SpcJ

Mit 67 % ist die Identität von SpcJ zu dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen aus verschiedenen Streptomyceten sehr hoch. SpcJ konnte sowohl in die Familie der NAD-abhängigen Epimerasen/Dehydratasen als auch in die „short-chain“ Dehydrogenase/Reduktase-Superfamilie eingeordnet werden. Desgleichen finden sich beide oben erwähnten konservierten Motive wieder, die zwischen den Aminosäuren 8 bis 13 (Rossmann-Fold) bzw. 151 bis 160 liegen. SpcJ besitzt im Gegensatz zu SpcI den charakteristischen $\beta\alpha\beta$ - oder Rossmann-Fold GXGXXG zur Bindung von NAD⁺. Die Unterfamilie von NAD-abhängigen Epimerasen/

Dehydratasen, die zur „short-chain“ Dehydrogenase/Reduktase-Superfamilie gerechnet werden, nutzen NAD^+ als katalytische prosthetische Gruppe und nicht als Cosubstrat.

SpcK

SpcK zeigt mit bis zu 74 % Identität sehr hohe Homologie zu dTDP-Glucose-Synthasen oder Glucose-Phosphat-Thymidyltransferasen von Streptomyceten und anderen Organismen und konnte daher der Familie der Nukleotidyltransferasen zugeordnet werden. Im N-Terminus von SpcK findet sich ein konserviertes Motiv (AS 7 - 19), das als allosterische oder Substrat-Bindestelle in vielen Thymidyltransferasen vorhanden ist, während der Lysin-Rest im zentral gelegenen EKP-Motiv bei den Aminosäuren 158 bis 160 möglicherweise ebenfalls zur Substrat-Bindung beiträgt (Trefzer et al., 1999).

SpcN

Das Spectinomycin-Resistenzenzym SpcN zeigt Identität zur Phosphotransferase StrN aus *S. glaucescens*, die allerdings an der Streptomycin-Biosynthese und nicht an der Streptomycin-Resistenz beteiligt ist. SpcN gehört zur Familie der Aminoglykosid-Phosphotransferasen und weist zwischen den Aminosäuren 223 bis 243 ein mögliches II/III-Motiv dieser Enzyme auf.

SpcR

Für SpcR wurde relativ hohe Homologie zu Transkriptionsregulator-Proteinen aus den Streptomycin-Biosynthese-Clustern von *S. glaucescens* und *S. griseus* gefunden. Das Enzym weist mit den Aminosäuren 181 bis 201 ein Helix-Turn-Helix-Motiv auf, das für DNA-bindende Proteine charakteristisch ist.

SpcT

Bei SpcT könnte es sich aufgrund der Datenbank-Suche um ein Transmembran-Export-Protein handeln, das in die breite Familie der Zucker-Transporter eingeordnet werden kann. Während Mitglieder dieser Familie 12 Transmembran-Domänen aufweisen, konnten in SpcT mit dem Programm TMHMM (CBS, Denmark) nur 10 solcher Bereiche identifiziert werden. Außerdem besitzt SpcT keine hydrophilen Regionen und kein Walker-Motiv, wie sie für ABC-Transporter typisch sind.

SpcX

Für SpcX konnte eine Klassifizierung in die Familie 1 der bakteriellen extrazellulären Zucker-Bindeproteine vorgenommen werden. Diese Proteine tragen meist im Komplex mit Transmembranproteinen und Membran-assoziierten ATP-Bindeproteinen zum aktiven Transport von Substanzen durch die Zytoplasmamembran bei. Dabei fungieren sie wahrscheinlich als Rezeptoren, die die Translokation eines Substrats initiieren oder vorantreiben, indem sie an externe Stellen der integralen Membranproteine binden. In gram-positiven Bakterien sind die Bindeproteine über einen N-terminalen Lipid-Anker in die Membran eingebunden. Ein solcher Anker ebenso wie ein konservierter Bereich im zentralen Teil des Proteins konnte in SpcX nicht ausgemacht werden. Extrazelluläre Proteine besitzen ferner eine Signalpeptid-Sequenz, die in SpcX nicht vorhanden ist.

SpcY

Für SpcY, das Identität mit Molybdän-Cofaktor-Biosyntheseproteinen und mit Fe-S Oxidoreduktasen aufweist, wurde eine Zugehörigkeit zur MoaA/NifB/PqqE-Familie festgestellt. Dazu zählen Enzyme, die an der Synthese von Metallo-Cofaktoren beteiligt sind. Die Konsensus-Sequenz CXXXCXXC (AS 24 - 31) in ihrem N-Terminus findet sich auch in der Aminosäuresequenz von SpcY wieder. Die drei Cysteine sind wahrscheinlich an der Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters beteiligt. Außerdem wird SpcY als Mitglied der radikalischen SAM-Superfamilie geführt, da es drei längere Domänen aufweist, die für diese Familie typisch und eventuell an der Bindung von SAM beteiligt sind. Radikalische SAM-Proteine katalysieren eine Vielzahl verschiedener Reaktionen, z. B. ungewöhnliche Methylierungen, Isomerisierungen oder Ringbildungen, und fungieren in DNA-Vorläufer-, Vitamin-, Cofaktor- oder Antibiotika-Biosynthesen und Biodegradationsabbauwegen (Sofia et al., 2001).

4.5 Nachweis der Produktion von Spectinomycin

4.5.1 Optimierung der Kulturbedingungen

Um die optimalen Bedingungen für die Spectinomycin-Produktion durch *S. flavopersicus* NRRL B-2820 festzustellen, wurden bei der Anzucht des Stamms die Medien und z.T. die Inkubationstemperatur variiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde 1 ml der Kultur abzentrifugiert und der Überstand im Agarplatten-Diffusionsassay auf Hemmhof-

Bildung getestet. Als Teststämme dienten hauptsächlich der Spectinomycin-sensitive Stamm *S. lividans* TK64 und der Spectinomycin-resistente *S. lividans* TK23. In einigen Fällen wurde auch *E. coli* JM109 und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt.

Auffallend war, dass durch den Kulturüberstand von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 immer auch der Spectinomycin-resistente Stamm *S. lividans* TK23 gehemmt wurde. Zum Vergleich wurde der von ATCC unter dem Namen *Sm. baldaccii* ATCC19756 angebotene Stamm dem gleichen Test unterzogen, wobei auch wieder Hemmhöfe bei beiden Teststämmen erhalten wurden. Dies legte nahe, dass *S. flavopersicus* noch eine zweite antibiotisch wirkende Substanz produzieren musste, obwohl in den Datenbanken nichts dergleichen verzeichnet war. Dieses Produkt wirkt nicht nur antibakteriell, sondern hemmt auch das Wachstum des Eukaryoten *S. cerevisiae*. Das Peptid-Antibiotikum Netropsin, das von *S. netropsis* DSM40259 gebildet wird, wirkt zytotoxisch und ist auch gegen Hefe und andere Pilze aktiv. Aufgrund der Ähnlichkeit von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 mit *S. netropsis* DSM40259 und der Ergebnisse der Hemmhof-Tests wurde vermutet, dass es sich bei dem zweiten Antibiotikum um Netropsin handeln könnte.

Die Kulturüberstände des Netropsin-Produzenten *S. netropsis* DSM40259 und von *S. flavopersicus* aus verschiedenen Medien produzierten in einem Agarplatten-Diffusionsassay vergleichbare Hemmhöfe bei den Teststämmen *S. lividans* TK64, *E. coli* und *S. cerevisiae*. Der Teststamm *S. lividans* TK23 wurde dagegen im Vergleich zu TK64 durch den Netropsin-Produzenten stärker gehemmt.

Tabelle 8 gibt die Größe der Hemmhöfe wieder, die mit den Überständen von *S. flavopersicus* in verschiedenen Produktionsmedien gemessen wurden. Relativ hohe Glucose-Konzentrationen in den Kulturmedien führten zu einer stärkeren Inhibition der Teststämmen, während andere C-Quellen, z.B. *myo*-Inositol, ein Biosynthese-Vorläufer der Actinamin-Untereinheit, gegenüber Glucose keine Verbesserung zeigte. Soja-Mannitol-Medium wird sehr häufig zur Produktion von Antibiotika eingesetzt. Die Wirkstoff-Synthese durch *S. flavopersicus* in diesem Medium war allerdings gering. Ein Austausch von Mannitol gegen Glucose und eine Erhöhung der Konzentration führte zu größeren Hemmhöfen, die sich jedoch bei den beiden Teststämmen TK64 und TK23 nicht unterschieden.

Tab. 8: Ergebnisse der Diffusionsassays mit Überständen von *S. flavopersicus* nach 3 Tagen Wachstum in verschiedenen Flüssigmedien.

Medium	Zucker/Hexitol	Hemmhöfe [cm] bei den Teststämmen <i>S. lividans</i>	
		TK64	TK23
Spectinomycin (50 µg)		0,75	0
Soja-Mannitol	2 % Mannitol	0,37	0,23
Soja-Glucose	20 % Glucose	0,80	0,80
Spectinomycin-Produktionsmedium	2,5 % Glucose	0,50	0,55
<i>myo</i> -Inositol-Medium	0,05 % Glucose; 0,5% <i>myo</i> -Inositol	0,53	0,60
M3	4 % Dextrin	0,60	0,50
M79	1 % Glucose	0,70	0,70
Fermentationsmedium	20,4 % Glucose	0,75	0,65

Spectinomycin wird von Abbott Laboratories noch heute produziert, allerdings mit Hochleistungsstämmen von *S. flavopersicus*, die über klassische Mutagenese und Screening isoliert worden waren. Zur Fermentation wird zunächst eine Vorkultur des Stamms in Seed-Medium angezogen, die in Fermentationsmedium mit einer sehr hohen Glucose-Konzentration überimpft wird. Die Zusammensetzung der Medien und einige Medienbestandteile wurden freundlicherweise von der Firma Abbott Laboratories zur Verfügung gestellt, so dass das Protokoll im kleinen Maßstab übernommen werden konnte. Eine Vorkultur der Streptomyceten in Seed-Medium wurde nach 2 Tagen im Verhältnis 1 : 20 in Fermentationsmedium in Schüttelkolben mit Schikanen überimpft und bei 30°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen.

Nach etwa 4 Tagen Inkubation in Fermentationsmedium erreichte die Antibiotika-Produktion bei *S. flavopersicus* NRRL B-2820 ihren Höhepunkt. Außerdem war unter diesen Bedingungen erstmals ein deutlicher Unterschied in der Hemmhof-Größe zwischen TK64 und TK23 ersichtlich, wobei die Differenz mit der Länge der Inkubationsdauer der Kultur zunahm. Dies könnte auf die relativ hohe Instabilität von Netropsin zurückzuführen sein. Auch bei *Sm. baldaccii* ATCC19756 setzte nach etwa 4 Tagen eine hohe Hemmstoff-Produktion ein. Die Überstände dieses Stamms führten allerdings bei *S. lividans* TK23 zu einer nur etwa halb so großen Hemmhofzone als die Kultur von *S. flavopersicus*. Mit Überständen von *S. netropsis* DSM40259, dessen Hemmzonen nur durch Netropsin verursacht werden dürften, wurden in etwa gleich große Höfe bei TK64 erreicht wie mit den

Kulturbrühen der beiden anderen getesteten Stämmen. Wie schon die Diffusionsassays mit *S. netropsis* DSM40259 zeigten, der in verschiedenen anderen Medien angezogen wurde, wird der Teststamm TK23 stärker inhibiert als TK64. Die Ergebnisse der Bio-Assays sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Ergebnisse der Diffusionsassays mit Überständen von *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *Sm. baldaccii* ATCC19756 und *S. netropsis* DSM40259 bei Anzucht in Fermentationsmedium.

Überstand von Inkubations- dauer [Tage]	<i>S. flavopersicus</i> NRRL B-2820		<i>Sm. baldaccii</i> ATCC19756		<i>S. netropsis</i> DSM40259	
	Hemmhöfe [cm] bei <i>S. lividans</i>		Hemmhöfe [cm] bei <i>S. lividans</i>		Hemmhöfe [cm] bei <i>S. lividans</i>	
	TK64	TK23	TK64	TK23	TK64	TK23
1	0,48	0,40	0,35	0,30	0,60*	0,60*
2	0,70*	0,75*	0,58	0,47	0,65*	0,70*
3	0,68	0,63	0,52	0,30	0,74	0,87
4	0,72	0,55	0,62	0,25	0,77	0,94
5	0,85	0,58	0,65	0,30	0,85	1,08
6	0,80	0,45	0,58	0,20	0,78	1,05
7	0,84	0,58	0,72	0,21	0,95	1,05
8	0,80*	0,55*	1,10*	0,10*	-	-
9	0,80*	0,55*	0,85*	0,10*	-	-
10	0,88	0,47	0,92	0,17	0,90	1,13
11	0,80*	0,35*	0,63	0,40	-	-
12	-	-	0,75*	0,40*	-	-

Die Hemmhof-Größe wurde als Durchschnitt mehrerer Messungen bestimmt.

* nur ein Wert wurde ermittelt; - nicht bestimmt.

4.5.2 Aufreinigung von Spectinomycin

Spectinomycin wird von den Produzentenstämmen aus den Zellen ins Medium ausgeschleust. Die Isolierung von Spectinomycin aus dem Kulturüberstand von *S. flavopersicus* und anderen Streptomyceten erfolgte, indem bestehende Methoden (s. 3.7.1) modifiziert wurden. Da *S. flavopersicus* in Fermentationsmedium am meisten Spectinomycin produzierte und vergleichsweise wenig der anderen antibiotisch wirkenden Substanz (s. 4.5.1), wurde die

Kultur in diesem Medium angeimpft. Das folgende Fließschema gibt die einzelnen Schritte der Aufreinigung wieder (Abb. 17).

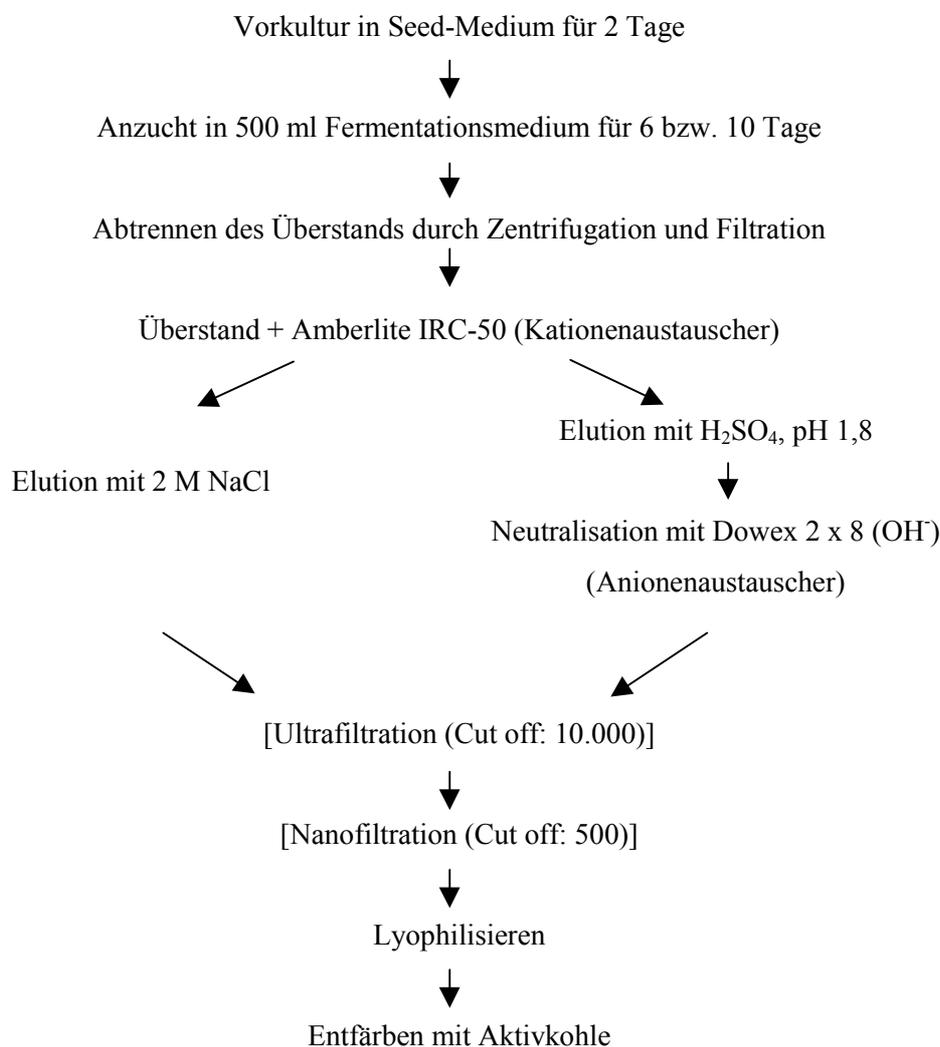


Abb. 17: Fließschema zur Aufkonzentrierung von Spectinomycin aus Kulturüberständen. Die in Klammern angegebenen Schritte sind optional.

Da sich die hohe NaCl-Konzentration der ersten Elutionsmethode für eine weitere Charakterisierung von Spectinomycin mittels DC und HPLC als störend erwies, wurde hauptsächlich die Elution mit H₂SO₄ und die Neutralisation mit Dowex verwendet. In den ersten Elutionsfraktionen befand sich noch ein geringer Anteil Netropsin, das ebenfalls an Amberlite gebunden werden kann. Dies zeigte sich im Bio-Assay, in dem mit den Fraktionen ein kleiner Hemmhof beim Spectinomycin-resistenten *S. lividans* TK23 auftrat. Wurden alle Elutionsfraktionen gepoolt und lyophilisiert, war die Verdünnung des Netropsin so groß, dass kein Hemmhof mehr ausgemacht werden konnte.

Ultra- und Nano-Filtration zum Abtrennen von Proteinen und zum Aufkonzentrieren der Proben wurden getestet. Da in den Eluatn aber in einem Bradford-Assay keine Proteine mehr nachgewiesen werden konnten, wurde auf die Filtrationen meist verzichtet. Eine Kristallisation des gereinigten Spectinomycins mit Aceton, Methanol und 95 % Ethanol konnte nicht erreicht werden.

4.5.3 Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Spectinomycin

Um die Produktion und Aufreinigung von Spectinomycin verfolgen zu können und die Aktivität einiger Gene des Clusters zu bestimmen, war es nötig, Spectinomycin und das Biosynthese-Intermediat Dihydrospectinomycin, die unmittelbare Vorstufe von Spectinomycin, einfach und schnell nachzuweisen.

Im Agarplatten-Diffusionsassay konnte eine antibiotische Wirkung des Kulturüberstandes von *S. flavopersicus* festgestellt werden. Ein Hemmhof zeigte sich jedoch auch beim Spectinomycin-resistenten Teststamm *S. lividans* TK23, was auf die Produktion eines zweiten Antibiotikums durch *S. flavopersicus* hindeutete. Die beiden Antibiotika konnten in diesem Assay nicht unterschieden werden, d.h. eine Produktion von Spectinomycin konnte auf diesem Weg nicht eindeutig bewiesen werden.

Der Nachweis von Spectinomycin gelang mittels Dünnschichtchromatographie, indem bekannte Methoden (British Pharmacopoeia, 1998; Sherma, 1991) optimiert und an die jeweiligen Versuchsbedingungen angepasst wurden (s. 3.7.3). Weniger als 40 µg Spectinomycin konnte auf diese Weise nachgewiesen werden.

Mit Eisessig : Pyridin : Isopropanol : H₂O als Laufmittel laufen Spectinomycin und Dihydrospectinomycin, das freundlicherweise von Abbott zur Verfügung gestellt wurde, in der Dünnschichtchromatographie auf gleicher Höhe mit einem R_F-Wert von etwa 0,44 - 0,55 (Abb. 18A).

Verwendete man 10 % KH₂PO₄ als Laufmittel, erschienen mit Spectinomycin zwei Flecken unterschiedlicher Intensität. Der R_F-Wert des schwächeren Flecks liegt bei etwa 0,43 - 0,47 und der des stärkeren bei ~ 0,49 - 0,63. Der R_F-Wert von Dihydrospectinomycin beträgt ~ 0,4 - 0,54 (Abb. 18B). Daraus ist ersichtlich, dass die kommerziell vertriebene Spectinomycin-Präparation auch geringe Mengen an Dihydrospectinomycin, durch den unteren Fleck repräsentiert, enthält.

Im aufgereinigten Überstand von *S. flavopersicus* gelang somit nach DC der Nachweis von Spectinomycin (Abb. 18C).

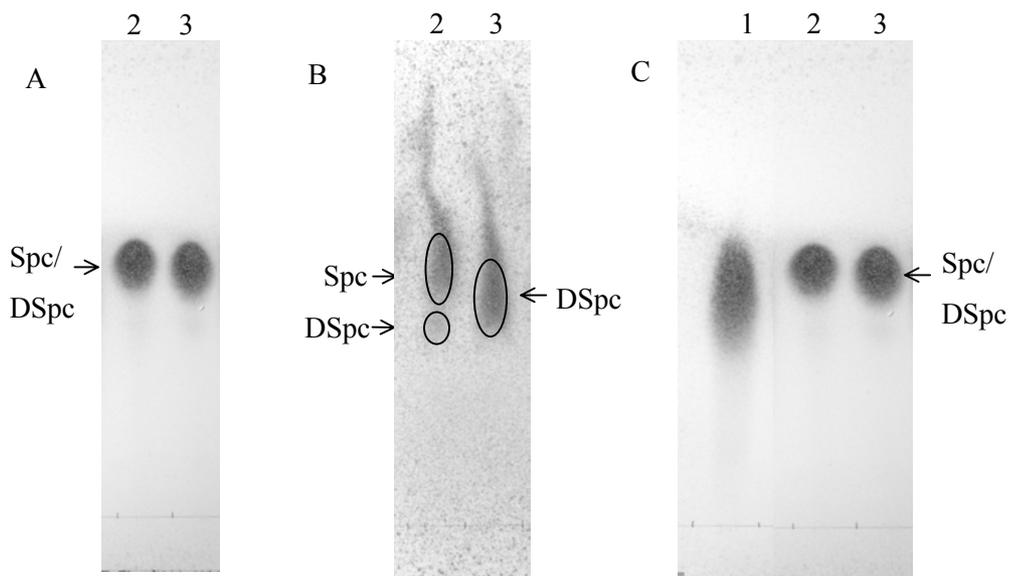


Abb. 18: Dünnschichtchromatogramm von Spectinomycin (2) und Dihydrospectinomycin (3) bzw. nach Aufreinigung von Spectinomycin (mit H_2SO_4 und Dowex) aus dem Kulturüberstand von *S. flavopersicus* (1). Je 80 μg Spectinomycin und Dihydrospectinomycin wurden aufgetragen. Als Laufmittel wurde Eisessig : Pyridin : Isopropanol : H_2O (A, C) und 10 % KH_2PO_4 (B) eingesetzt. Zur Verdeutlichung wurden die Spots in (B) markiert. Spc = Spectinomycin; DSpc = Dihydrospectinomycin.

4.5.4 HPLC-Analyse von Spectinomycin

Neben dem Nachweis von Spectinomycin und Dihydrospectinomycin über DC wurden die Substanzen auch mittels „reversed-phase ion-pair“ Chromatographie gekoppelt mit einer gepulsten elektrochemischen Detektion identifiziert (Debremaeker et al., 2002), wie sie näher unter Material und Methoden beschrieben wurde (s. 3.7.4). Die Retentionszeit von Spectinomycin unter den gewählten Bedingungen sollte bei etwa 33 min liegen, für Dihydrospectinomycin bei ~ 51 min für die (R)-Form und bei ~ 62 min für die (S)-Form. Weniger als 50 μg reines Spectinomycin konnten noch identifiziert werden. Das Elutionsdiagramm von kommerziell erhältlichem Spectinomycin zeigte neben dem Spectinomycin-Peak bei 33 min drei zusätzliche, kleinere Peaks, von denen zwei den Verunreinigungen Spectinomycin-Anomer (~ 19 min) und (S)-Dihydrospectinomycin (~ 62 min) zugeordnet werden konnten. Die Herkunft des dritten Peaks bei ungefähr 44 min ist unklar (Abb. 19A).

Mit aufgereinigtem Überstand von *S. flavopersicus* war im HPLC-Diagramm ein großer Peak zu sehen, der in etwa die gleiche Retentionszeit wie Spectinomycin besaß. Außerdem zeigten

sich Peaks bei etwa 9 min (Actinamin) und 18 min (Spectinomycin-Anomer). Wahrscheinlich aufgrund von noch vorhandenen Verunreinigungen wurden die Substanzen im Vergleich zur reinen Spectinomycin-Lösung etwas früher eluiert. Die Peaks konnten dennoch zugeordnet werden (Abb. 19B). Wie auch bei *S. spectabilis* (Hoecksema & Knight, 1975) konnten im Kulturüberstand von *S. flavopersicus* auch geringe Mengen an Dihydrospectinomycin nachgewiesen werden. Die Basallinie fiel jedoch nach dem Spectinomycin-Peak immer so stark ab, dass der Dihydrospectinomycin-Peak nicht im gleichen Elutionsdiagramm sichtbar gemacht werden konnte.

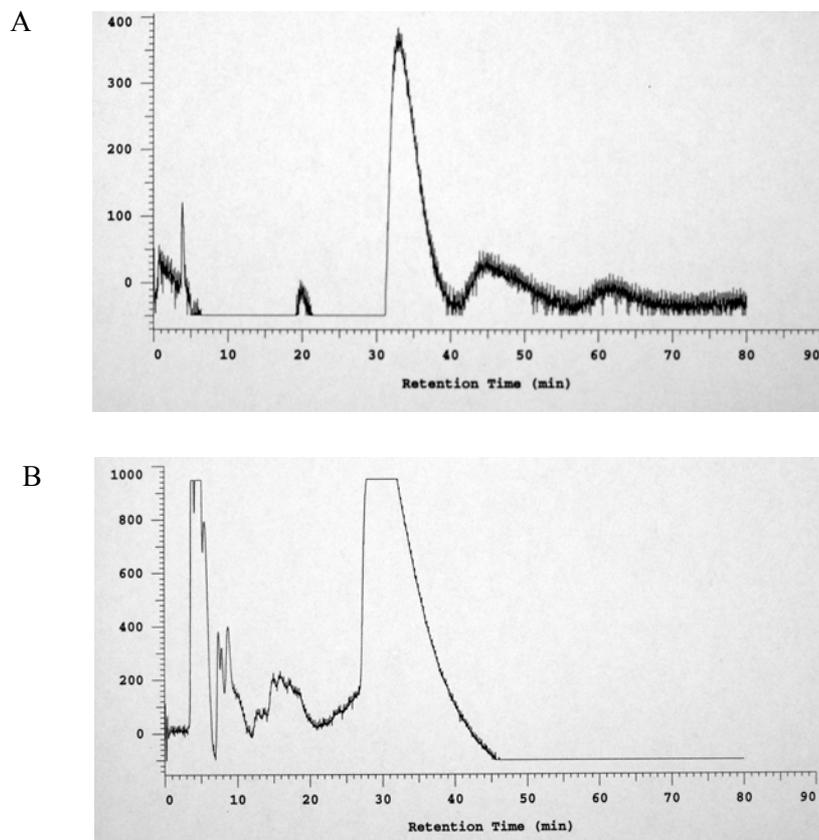


Abb. 19: HPLC-Elutionsdiagramme von Spectinomycin (5 μ g) (A) und aufgereinigtem Überstand von *S. flavopersicus* (B). Aufgrund des Abfalls der Basallinie ist der Dihydrospectinomycin-Peak bei B nicht zu sehen.

4.5.5 Integration des Genbankplasmids pTST63 in das Genom von *S. lividans* TK64

Das Insert des Cosmids pTST63 wurde von beiden Seiten ansequenziert, um sicher zu gehen, dass es das komplette bisher bekannte Spc-Biosynthese-Cluster trägt. Es begann ab Base

1.013 innerhalb des Insertionselements *IS1374* und endete nach dem Transposasegen in einer Region, die nicht mehr sequenziert wurde.

S. lividans TK64 wurde mit dem Cosmid transformiert. Aus zwei der erhaltenen Transformanten, die über Spectinomycin und Kanamycin selektioniert worden waren, wurde die genomische DNA durch einen CsCl-Gradienten isoliert und sie sowie pTST63 mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Bgl*II, *Mlu*I und *Sph*I verdaut. Die Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und das Gel geblottet. Als Sonde für die Hybridisierung diente das komplette DIG-markierte Plasmid pTST63. Integriert das Plasmid über die „att-Sites“ des Phagen ϕ C31 ins Chromosom, sollte beim Hybridisierungs-Muster der chromosomalen DNA im Vergleich zum Muster des Plasmids eine Bande, die dem Vektoranteil des Cosmids entspricht, wegfallen und dafür zwei neue Banden zu sehen sein. Dies war besonders deutlich beim Verdau mit *Bgl*II zu erkennen. Die 15 kb-Bande, die bei pTST63 vorhanden war, fiel beim Fragmentmuster der chromosomalen DNA weg, während zwei Banden mit ~ 2,6 kb und 20 kb zusätzliche Signale lieferten (Abb. 20). Eine Integration des Cosmids pTST63 ins Genom von *S. lividans* TK64 war somit nachgewiesen.

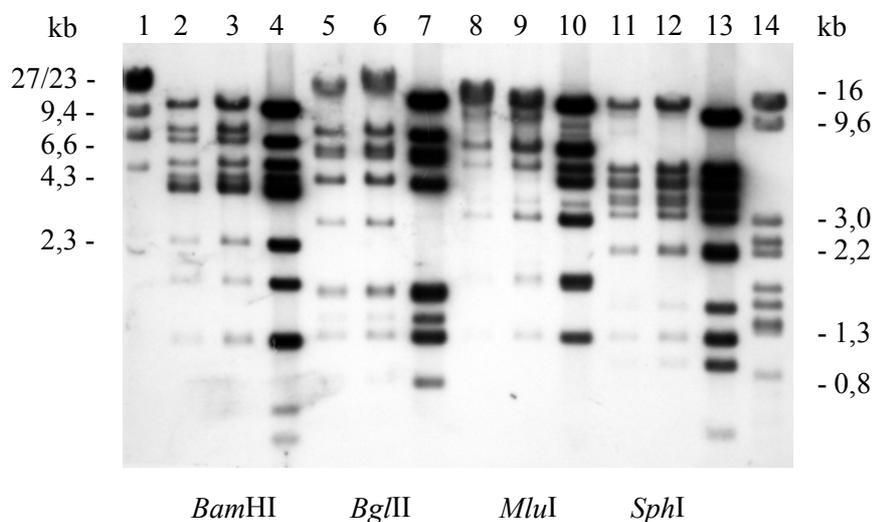


Abb. 20: Southern Blot-Analyse der Integration des Genbankplasmids pTST63 ins Chromosom von *S. lividans* TK64. Chromosomale DNA zweier TK64/pTST63-Klone und pTST63 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Als Sonde diente das DIG-markierte Genbankplasmid pTST63. Spuren: (1) λ -DNA, *Hind*III-verdaut; (2, 5, 8, 11) chrom. DNA aus TK64/pTST63 Klon 1; (3, 6, 9, 12) chrom. DNA aus TK64/pTST63 Klon 2; (4, 7, 10, 13) pTST63; (14) λ -DNA, *Bgl*I-verdaut.

4.5.6 Expression des *Spc*-Genclusters in *S. lividans* TK64 und Test auf Spectinomycin-Produktion

Transformanten von *S. lividans* TK64 mit pTST63 erwiesen sich sowohl gegen Kanamycin (Resistenz des Cosmid-Vektors) als auch gegen Spectinomycin resistent. Dies deutete darauf hin, dass das auf dem Genbankplasmid vorhandene *spcN*-Gen für die Spectinomycin-Phosphotransferase exprimiert wurde.

Um die Antibiotika-Produktion zu testen, wurden mehrere Transformanten von *S. lividans* TK64/pTST63 als Flüssigkulturen in Soja-Mannitol- und Fermentationsmedium angezogen und der Überstand in Agarplatten-Diffusionsassays eingesetzt. Es konnten jedoch keine Hemmhöfe bei den Teststämmen TK23 und TK64 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden andere Varianten des Bio-Assays getestet. Zum einen wurden aus einem auf einer Agarplatte gut angewachsenem TK64/pTST63-Bakterienrasen Blöckchen ausgestanzt und diese auf Platten mit den Teststämmen aufgelegt. Ferner wurden solche Kulturen direkt auf Platten mit den Teststämmen replikaplatziert. Zum anderen wurde TK64/pTST63 mit Sporensuspensionen von *S. lividans* TK64 und TK23 überschichtet. In keinem Fall zeigten sich Hemmzonen. Die Nachweisgrenze von Spectinomycin wurde getestet und lag bei TK64 unter 10 µg. Entweder produzierte *S. lividans* TK64/pTST63 kein Spectinomycin oder die gebildete Menge lag unterhalb dieser Grenze.

4.6 Heterologe Expression einiger *spc*-Gene

4.6.1 Untersuchung der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN aus *S. spectabilis* NRRL2494

4.6.1.1 Expression des Spectinomycin-Phosphotransferasegens *spcN*

Die Sequenz der Spectinomycin-Biosynthese-Gencluster von *S. spectabilis* NRRL2494 und *S. spectabilis* NRRL2792 liegt teilweise bzw. vollständig vor und weist eine große Homologie zur Sequenz von *S. flavopersicus* auf (s. 5.1). Die am Beginn jedes Clusters codierte Phosphotransferase wurde als Spectinomycin-Resistenzenzym identifiziert. Da schon einige biochemische Untersuchungen zur Aktivität der Spectinomycin-Phosphotransferase aus *S. flavopersicus* gemacht wurden (Lyutskanova et al., 1997), wurde das entsprechende Gen

aus *S. spectabilis* NRRL2494 kloniert. Die Aktivität des Genprodukts konnte so mit SpcN aus *S. flavopersicus* verglichen werden.

Zur Expression der Phosphotransferase in *E. coli* wurde der Vektor pJOE3075.3 (s.7.1) gewählt, der sowohl einen T7- als auch einen Rhamnose-Promotor besitzt. Das Gen stand somit unter Kontrolle beider Promotoren und konnte bei Verwendung des *E. coli*-Stamms BL21(DE3) durch Zugabe von entweder IPTG oder Rhamnose induziert werden. In mehreren Versuchen zeigte sich, dass eine Induktion über den positiv regulierten Rhamnose-Promotor bessere Ergebnisse lieferte, vor allem wenn die Expression im Stamm *E. coli* JM109 durchgeführt wurde. Der Rhamnose-Promotor besitzt zwar eine geringere Promotorstärke als der T7-Promotor, weist aber auch eine sehr viel geringere Basalaktivität auf und reduzierte so die Bildung von Inclusion Bodies.

Das Gen *spcN* wurde mit den Primern s2854 und s2855 amplifiziert. Die Primer hatten endständig die für die Klonierung passenden Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BglIII*. Als Template diente pJOE3005, ein Plasmid, das Teile des Spc-Clusters von *S. spectabilis* trug. Bei der Klonierung über die Schnittstellen *NdeI* und *BglIII* in pJOE3075.3 wurde das Gen am 3'-Ende mit den sechs im Vektor vorhandenen Histidin-Codons fusioniert. Das entstandene Plasmid wurde pTST95.1 genannt. Um auszuschließen, dass die C-terminale Fusion beim daraus resultierenden Genprodukt die Aktivität beeinflusst, wurde das Plasmid pTST119.1 konstruiert, in dem *spcN* nicht fusioniert mit dem ursprünglichen Stopp-Codon vorlag. Als Primer wurden s2854 und s3077 mit einer endständigen *PstI*-Schnittstelle eingesetzt.

Die Expression erfolgte in *E. coli* JM109 bei 28°C oder 30°C durch Zugabe von 0,2 % L-Rhamnose. Mittels SDS-PAGE wurde die Expression von *spcN* überprüft (Abb. 21). Nach 6 - 7 Stunden Induktion der Zellen war eine zusätzliche Proteinbande mit dem Molekulargewicht von ~ 36 kDa bei SpcN ohne His-Tag bzw. ~ 37 kDa beim Protein mit His-Tag zu sehen. Das errechnete Molekulargewicht von SpcN lag bei 36,1 kDa. Beide Varianten der Phosphotransferase wurden zum größten Teil als lösliches Protein gebildet.

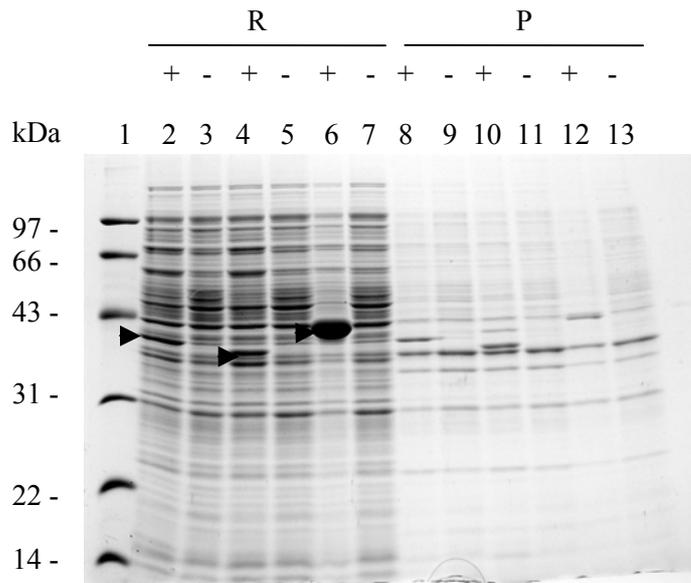


Abb. 21: SDS-PAGE-Analyse der Expression des Spectinomycin-Phosphotransferasegens *spcN* aus *S. spectabilis*. *E. coli* JM109 lösliche (R) und unlösliche Rohextraktfraktionen (P) wurden nach 6 h Induktion mit (+) oder ohne (-) Rhamnose bei 30°C erhalten und auf ein 12 % iges Gel aufgetragen. Spuren: (1) LMW-Marker; (2, 3, 8, 9) JM109/pTST95.1; (4, 5, 10, 11) JM109/pTST119.1; (6, 7, 12, 13) JM109/pJOE3075.3. Die Pfeile zeigen auf induzierte Proteinbanden. Die stark induzierte Bande in der löslichen Fraktion von JM109/pJOE3075.3 entspricht dem MalE-Protein.

4.6.1.2 Aufreinigung der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN

Die in JM109/pTST95.1 exprimierte Phosphotransferase konnte durch die sechs am C-Terminus fusionierten Histidinreste einfach und schnell aufgereinigt werden. Nach der Induktion wurden im Durchschnitt 5×10^{11} Zellen geerntet, mit einer French Press aufgeschlossen und durch Zentrifugation in Pellet und Überstand getrennt. Der lösliche Rohextrakt wurde einer Affinitätschromatographie an einer Ni^{2+} -Nitriltriessigsäure (NTA)-Säule (Hochuli et al., 1987) unterworfen. SpcN lag in den mit 200 mM Imidazol eluierten Fraktionen in einer Konzentration von etwa $0,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ fast vollständig rein vor (Abb. 22) und konnte nach Dialyse für biochemische Untersuchungen eingesetzt werden. Insgesamt wurde aus den 5×10^{11} Zellen $\sim 1,1$ mg Protein gereinigt.

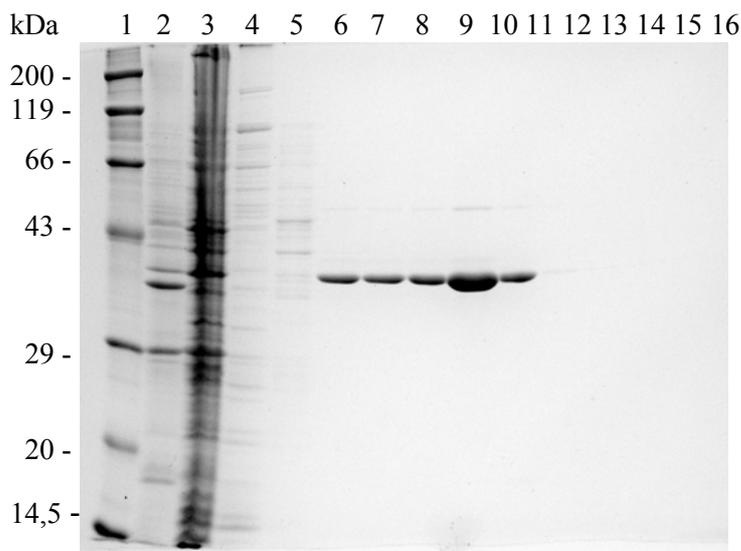


Abb. 22: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von SpcN aus *S. spectabilis*. Einzelne Schritte der Aufreinigung aus einer Kultur von JM109/pTST95.1 wurden auf ein 12 % iges SDS-Gel aufgetragen. Spuren: (1) LMW-Marker; (2) unlösliche Fraktion des Rohextraktes; (3) lösliche Fraktion des Rohextrakt; (4) Durchfluss; (5) Waschfraktion; (6 - 16) Elutionsfraktionen.

4.6.1.3 Substratspezifität der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN

Im Bio-Assay wurde die Spectinomycin-Resistenz von JM109/pTST95.1 mit verschiedenen Spectinomycin-Konzentrationen geprüft. Außerdem sollte getestet werden, ob Dihydro-spectinomycin auch von SpcN phosphoryliert werden kann. Dihydro-spectinomycin wird als unmittelbare Vorstufe von Spectinomycin in der Biosynthese angesehen (Hoeksema & Knight, 1975). Es ist ebenfalls antibiotisch aktiv, allerdings um 30 - 40 % geringer als Spectinomycin.

Für den Resistenztest wurde der Stamm mit Plasmid und als Kontrolle ohne Plasmid in LB mit Ampicillin und 0,2 % Rhamnose angezogen und als Zellrasen auf LB₀-Platten plattiert. In Löcher, die in diese Platten eingestanzt wurden, wurden Spectinomycin und Dihydro-spectinomycin in verschiedenen Konzentrationen gegeben. Die entstandenen Hemmhöfe wurden nach einem und zwei Tagen Inkubation bei 30°C gemessen. Bei einer Spectinomycin-Konzentration von 50 µg erwies sich JM109/pTST95.1 als resistent, während bei 100 µg noch ein leichter Hemmhof zu sehen war. Dihydro-spectinomycin musste wie an der Kontrolle JM109 sichtbar ist, in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um die gleiche Wirkung

wie mit Spectinomycin zu erzielen. JM109/pTST95.1 war auch gegenüber Dihydro-spectinomycin resistent (Tab. 10).

Tab. 10: Ergebnisse der Diffusionsassays mit Spectinomycin und Dihydro-spectinomycin. Die Stämme wurden über Nacht in LB mit Rhamnose angezogen und die Hemmhöfe nach einem Tag gemessen.

Substrat	Konzentration	Hemmhöfe [cm] bei <i>E. coli</i>	
		JM109/pTST95.1	JM109
Spectinomycin	10 µg	0	0,20
	25 µg	0	0,35
	50 µg	0	0,45
	100 µg	0,20	0,75
Dihydro-spectinomycin	10 µg	0	0
	25 µg	0	0,25
	50 µg	0	0,40
	75 µg	0	-

-: nicht bestimmt.

Die Spezifität von SpcN gegenüber verschiedenen Aminoglykosid-Antibiotika wurde in einem ähnlichen Bio-Assay wie oben beschrieben getestet. Zur optimalen Induktion wurde jedoch eine Übernachtskultur von JM109/pTST95.1 in LB mit Ampicillin 1:2 verdünnt, mit 0,2 % Rhamnose 5 h bei 30°C induziert und als Zellrasen auf LB-Platten mit Rhamnose ausgestrichen. In eingestanzte Löcher wurden die Antibiotika Streptomycin, Apramycin, Gentamicin, Hygromycin, Kanamycin und Neomycin in unterschiedlichen Konzentrationen gefüllt und die entstandenen Hemmhöfe nach einem Tag Inkubation bei 30°C gemessen. Aus den Werten war abzulesen (Tab. 11), dass die Phosphotransferase spezifisch Spectinomycin phosphoryliert und damit inaktiviert, während die anderen getesteten Antibiotika nicht als Substrate dienen.

Tab. 11: Ergebnisse des Diffusionsassays mit verschiedenen Aminoglykosid-Antibiotika. Die Stämme wurden 5 Stunden in LB mit Rhamnose induziert und die Hemmhöfe nach einem Tag gemessen.

Substrat	Konzentration	Hemmhöhe [cm] bei <i>E. coli</i>	
		JM109/pTST95.1	JM109/pJOE3075.3
Spectinomycin	50 µg	0	0,75
	100 µg	0,20	0,95
Streptomycin	50 µg	1,20	1,00
	100 µg	1,20	1,40
Apramycin	25 µg	0,90	0,85
	50 µg	1,00	1,00
Gentamicin	25 µg	1,00	1,00
	50 µg	1,00	1,00
Hygromycin	25 µg	0,70	0,85
	50 µg	0,85	0,90
Kanamycin	25 µg	1,00	1,00
	50 µg	1,10	1,10
Neomycin	25 µg	0,60	0,60
	50 µg	0,75	0,70

4.6.1.4 Aktivitätsmessungen der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN

Für *S. flavopersicus* NRRL B-2820 war bekannt, dass die von ihm codierte Phosphotransferase durch Übertragung einer Phosphat-Gruppe von ATP auf Spectinomycin dieses inaktiviert. Der gleiche Mechanismus wurde auch für die Phosphotransferase von *S. spectabilis* angenommen und in Reaktionen mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ getestet. Die Expression von *spcN* in JM109/pTST95.1 wurde induziert (s. 4.6.1.1) und das Enzym aufgereinigt (s. 4.6.1.2). Die Tests wurden wie unter Material und Methoden (s. 3.5.7) beschrieben durchgeführt. Als Substrate in den Phosphorylierungsansätzen dienten Spectinomycin und Dihydro-spectinomycin in verschiedenen Konzentrationen von 0,001 mM - 20 mM. Ferner wurde die Konzentration an kaltem ATP von 0,1 mM bis 10 mM variiert, um den Einfluss der Substrat- bzw. ATP-Konzentration auf das Enzym zu überprüfen. Die durchschnittlich verwendete Proteinmenge des gereinigten SpcN lag bei 25 µg/ml. Von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wurden 0,6 µCi eingesetzt. Nach einer Fällung des Proteins mit Aceton wurden Substrate und Produkte über DC aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm oder einem Phosphoscreen sichtbar gemacht.

Sowohl mit Spectinomycin als auch mit Dihydrospectinomycin im Reaktionsansatz erhielt man gegenüber einer Kontrolle ohne Substrat oder ohne Enzym zusätzlich zu den radioaktiven Spots von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ auf dem Dünnschichtchromatogramm weitere Signale. Diese Flecken wurden auch mit dem Enzym ohne His-Tag erhalten. Sie wurden jedoch von weiteren Flecken überlagert, da hier nicht gereinigter Rohextrakt von JM109/pTST119.1 eingesetzt werden musste. Ein Einfluss der Substrat-Konzentration auf die Reaktion war nicht zu erkennen.

Mit 10 % KH_2PO_4 als Laufmittel traten mit Spectinomycin als Substrat drei radioaktive Flecken auf dem Dünnschichtchromatogramm auf (Abb. 23A). Der R_f -Wert des stärksten Peaks lag bei 0,36 - 0,45 und entsprach wahrscheinlich Spectinomycin-Phosphat. Beim unteren, kleineren Punkt mit einem R_f -Wert von 0,27 - 0,38 handelte es sich um Dihydrospectinomycin-Phosphat. Dieser Spot stimmte mit dem überein, der nach der DC erhalten wurde, wenn reines Dihydrospectinomycin im Reaktionsansatz eingesetzt und durch SpcN phosphoryliert wurde. Dies zeigte noch einmal, dass in der kommerziell erhältlichen Spectinomycin-Präparation auch Dihydrospectinomycin vorhanden war (s. 4.5.3). Der oberste Fleck bei $R_f = 0,48 - 0,55$ war im Vergleich zu den anderen nur nach längerer Exposition des Films schwach zu erkennen und konnte nicht eindeutig einem Produkt zugeordnet werden. Im HPLC-Elutionsdiagramm waren neben Spectinomycin auch Peaks zu erkennen, die dem Spectinomycin-Anomer entsprachen (s. 4.5.4). Eventuell ist dieses Anomer in der phosphorylierten Form auch auf dem Dünnschichtchromatogramm sichtbar. Unter sauren Bedingungen zerfällt Spectinomycin unter anderem in seine Untereinheit Actinamin, die von der Spectinomycin-Phosphotransferase aus *S. flavopersicus* NRRL B-2820 ebenfalls phosphoryliert werden kann (Lyutskanova et al., 1997). Da der pH-Wert des Laufmittels der DC bei 4,5 lag, könnte es zu einer sauren Hydrolyse von Spectinomycin gekommen sein, und der oberste Spot würde Actinamin-Phosphat entsprechen. Mit 10 % KH_2PO_4 als Laufmittel befand sich nicht eingebautes $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ an der oberen Front der Kieselgelplatte und war für die Auswertungen nicht hinderlich.

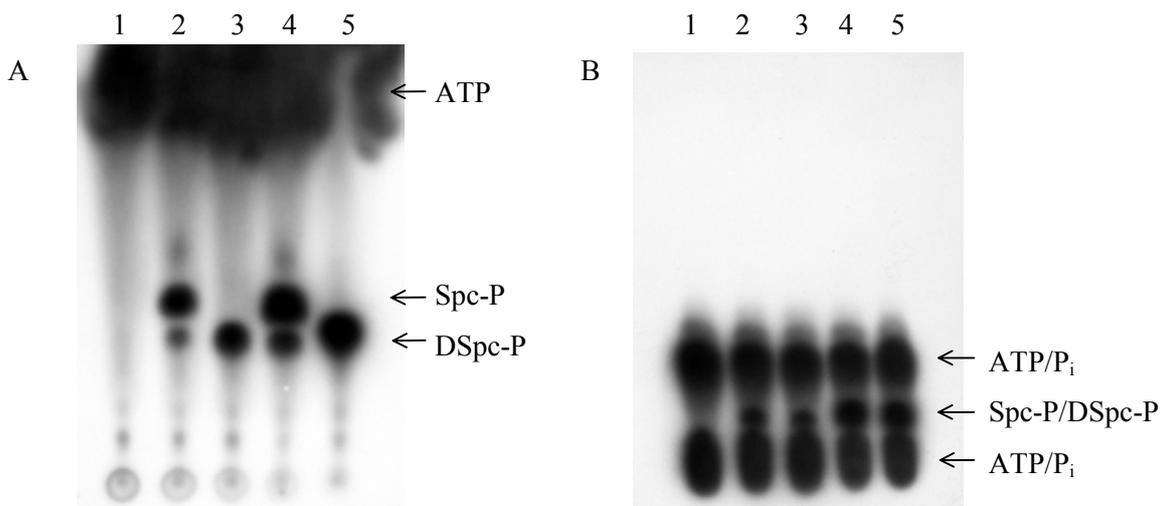


Abb. 23: Autoradiogramm der DC von Spectinomycin und Dihydrospectinomycin nach Phosphorylierung durch SpcN. Aufgetragen wurden Reaktionsansätze ohne Substrat (1) und mit 0,01 mM bzw. 0,1 mM Spectinomycin (2, 4) oder Dihydrospectinomycin (3, 5). Als Laufmittel dienten 10 % KH₂PO₄ (A) und Eisessig : Pyridin : Isopropanol : H₂O (B). P_i = Phosphat; Spc-P = Spectinomycin-Phosphat; DSpc-P = Dihydrospectinomycin-Phosphat.

Durch die Kopplung der Phosphat-Gruppe veränderte sich der R_F-Wert der Produkte Spectinomycin-Phosphat und Dihydrospectinomycin-Phosphat jeweils um etwa 0,1 im Vergleich zu den zugehörigen nicht phosphorylierten Substraten, wenn 10 % KH₂PO₄ als Laufmittel verwendet wurde. Dies konnte in einem nicht radioaktiven Versuch gezeigt werden, in dem die Phosphat-Gruppe von nicht markiertem ATP auf Spectinomycin und Dihydrospectinomycin übertragen wurde, und die phosphorylierten Produkte im DC mit anschließender Ninhydrin-Färbung neben Spectinomycin bzw. Dihydrospectinomycin aufgetragen wurden (Abb. 24).

Mit Eisessig : Pyridin : Isopropanol : H₂O als Laufmittel wiesen Spectinomycin-Phosphat und Dihydrospectinomycin-Phosphat den gleichen R_F-Wert von ~ 0,15 - 0,21 auf, der sich vom Wert der nicht-phosphorylierten Substrate um den Faktor 0,3 unterschied (Abb. 23B). Der Nachteil dieses Laufmittels war das Laufverhalten von [γ ³²P]ATP und hydrolysiertem [³²P]_i, die mit den R_F-Werten von ~ 0 - 0,15 und ~ 0,25 - 0,35 die phosphorylierten Produkte umgaben.

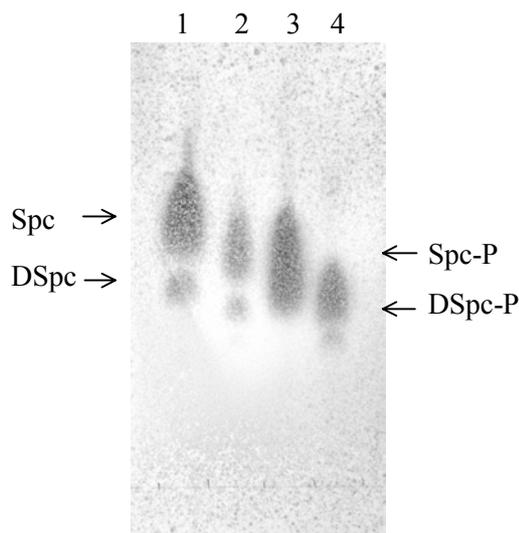


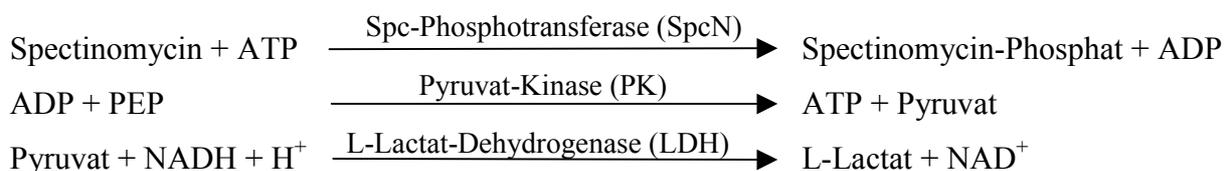
Abb. 24: Dünnschichtchromatogramm von Spectinomycin (1, 2) und Dihydro-spectinomycin (3, 4) vor (1, 3) und nach (2, 4) Phosphorylierung durch SpcN. Als Laufmittel diente 10 % KH_2PO_4 , die Anfärbung erfolgte mit Ninhydrin. Spc(-P) = Spectinomycin(-Phosphat); DSpC(-P) = Dihydro-spectinomycin(-Phosphat).

Die Stärke bzw. Größe der erhaltenen Spots auf dem DC nahm proportional zu, wenn die Spectinomycin/Dihydro-spectinomycin-Konzentrationen schrittweise von 0,001 mM bis auf 0,5 mM angehoben wurden. Bei einer weiteren Erhöhung der Spectinomycin/Dihydro-spectinomycin-Konzentration bis auf 20 mM nahm die Intensität der Spots nicht mehr weiter zu. Daraus lässt sich allerdings noch kein Schluss auf eine mögliche Substrat-Inhibition von SpcN ziehen, da dies auch in der Nachweismethode (Schwärzung eines Röntgenfilms) liegen könnte. Eine Variation der ATP-Konzentrationen (nicht markiertes ATP) zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Stärke bzw. Größe der erhaltenen Flecke.

In einem weiteren Experiment wurden je 10 mM *myo*-Inositol und *scyllo*-Inosose als Substrate eingesetzt. Auf dem DC war kein Signal der phosphorylierten Produkte zu erkennen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die phosphorylierten Produkte die gleichen R_f -Werte wie nicht verbrauchtes ATP besaßen, und so von diesen Signalen überlagert wurden. Da jedoch zwei verschiedene Laufmittel getestet wurden, scheint es wahrscheinlicher zu sein, dass *myo*-Inositol und *scyllo*-Inosose nicht von SpcN erkannt wurden.

Als zusätzlicher Assay zur Bestimmung der Aktivität der Phosphotransferase wurde ein gekoppeltes System verwendet, über das indirekt die Menge an gebildetem phosphoryliertem Substrat gemessen werden kann (s. 3.5.7.1).

Dabei wurde ein nicht-radioaktives Testsystem von Roche Applied Science leicht abgewandelt und folgende Reaktionen in einem Ansatz gekoppelt:



Die Menge an oxidiertem NADH konnte photometrisch bestimmt werden und entspricht dabei stöchiometrisch der Menge an phosphoryliertem Spectinomycin.

Ein Problem bei diesem Test war der unter den Testbedingungen zu beobachtende anfängliche Extinktionsabfall ohne Zugabe von Spectinomycin, der eine exakte Ermittlung von K_M -Wert und maximaler Reaktionsgeschwindigkeit nicht möglich machte. Da im Reaktionsansatz viele Substanzen vorhanden waren, konnte nicht geklärt werden, ob es sich um eine spontane Hydrolyse von ATP zu ADP, eine langsame Umwandlung von PEP zu Pyruvat oder eine durch andere Faktoren verursachte Oxidation von NADH handelte.

Die Reaktionen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben (s. 3.5.7.1) angesetzt. Die eingesetzte Menge an gereinigtem SpcN lag bei etwa 40 $\mu\text{g/ml}$. Um den spontanen Extinktionsabfall am Anfang der Messungen zu umgehen, wurden die Ansätze vor Zugabe des Substrats 15 min bei 25°C inkubiert. Zur Bestimmung des K_M -Werts wurden Spectinomycin-Konzentrationen zwischen 0,001 mM bis 1,5 mM gewählt. Sofort nach Start der Reaktion wurde die Abnahme der Extinktion gemessen, bis eine Verringerung durch Substrat-Limitierung eintrat. Die Messwerte wurden in Form einer Michaelis-Menten-Kinetik und nach Lineweaver-Burk aufgetragen. Aus den Diagrammen konnte ein ungefährer K_M -Wert der Spectinomycin-Phosphotransferase von 20 μM abgelesen werden (Abb. 25A, B).

Die Temperaturstabilität der Phosphotransferase wurde getestet, indem das Enzym, bevor es zum Reaktionsansatz zugegeben wurde, 15 min bei 20°C - 75°C inkubiert wurde. Die Spectinomycin-Konzentration betrug bei diesen Messungen 0,5 mM. Über 40°C war ein deutlicher Abfall der Aktivität zu bemerken (Abb. 25C).

Ferner wurden außer Spectinomycin die Aminoglykosid-Antibiotika Streptomycin, Apramycin, Hygromycin, Kanamycin und Neomycin als Substrate mit den Endkonzentrationen von 1 mM und 10 mM eingesetzt. Die anderen Testparameter entsprachen den oben angeführten Werten. Mit diesen Antibiotika konnte keine Reaktion festgestellt

werden (Abb. 25D). Dies bestätigte die Ergebnisse des Resistenztests (s. 4.6.1.3), d.h. SpcN phosphoryliert spezifisch Spectinomycin.

Um zu sehen, ob andere Aminoglykosid-Antibiotika eventuell die Phosphorylierung von Spectinomycin kompetitiv inhibieren, indem sie das aktive Zentrum von SpcN blockieren, selbst aber nicht phosphoryliert werden können, wurden 0,1 mM Apramycin, Neomycin und Streptomycin parallel mit 0,1 mM Spectinomycin in den Assay eingesetzt. Die Aktivität änderte sich gegenüber Spectinomycin nicht. Die getesteten Antibiotika wirkten also nicht als kompetitive Inhibitoren auf die Spectinomycin-Phosphotransferase.

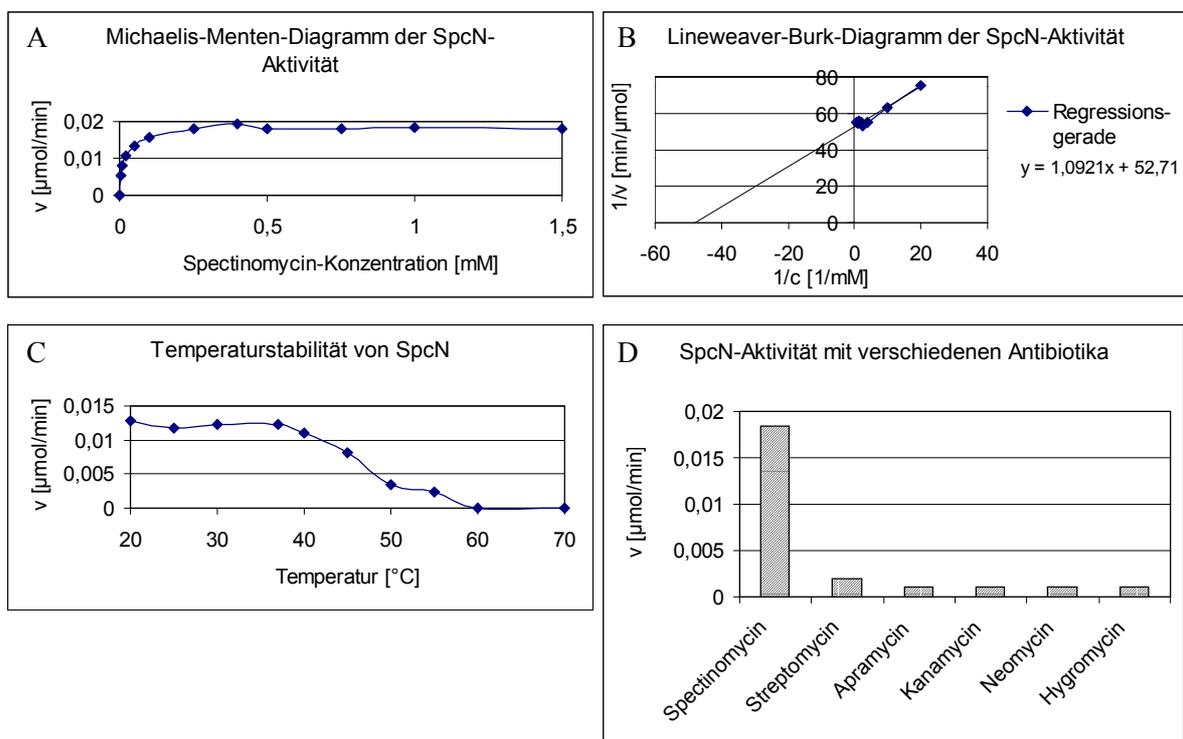


Abb. 25: K_M -Bestimmung, Temperaturstabilität und Substratspezifität der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN aus *S. spectabilis*. (A) Auftragung nach Michaelis-Menten bzw. (B) Lineweaver-Burk zur Ermittlung des K_M -Wertes; (C) Temperaturstabilität von SpcN; (D) SpcN-Aktivität mit anderen Aminoglykosid-Antibiotika (je 1 mM).

4.6.2 Analyse der beiden im Spc-Gencluster codierten Dehydrogenasen SpcB und SpcH

Betrachtet man den postulierten Biosyntheseweg von Spectinomycin (s. 5.2), sollten dabei vier Reduktionsschritte ablaufen, die von Dehydrogenasen katalysiert werden. In einem der ersten Schritte zur Biosynthese der Actinamin-Untereinheit wird *myo*-Inositol unter Verbrauch von NAD(P)^+ zu *scyllo*-Inosose umgewandelt. Im weiteren Ablauf der Actinamin-Synthese ist erneut eine Dehydrogenasereaktion nötig. An der Synthese von 4,6-Didesoxy-Ketozuckern, wie Actinospectose, sollte ebenfalls eine Reduktase beteiligt sein (He & Liu, 2002). Wird Dihydrospectinomycin als Intermediat und nicht als Nebenprodukt des Synthesewegs gesehen, ist eine weitere Reduktion von Dihydrospectinomycin zu Spectinomycin nötig. Die denkbaren Reaktionen sind im Folgenden dargestellt:

1. *myo*-Inositol + NAD(P)^+ \longrightarrow *scyllo*-Inosose + NAD(P)H
2. *scyllo*-Inososamin + NAD(P)^+ \longrightarrow 3-Keto-*scyllo*-Inososamin + NAD(P)H
3. dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose + NAD(P)^+ \longrightarrow 3-Keto-4,6-Didesoxyglucose + NAD(P)H
4. Dihydrospectinomycin + NAD(P)^+ \longrightarrow Spectinomycin + NAD(P)H

Im sequenzierten Gencluster von *S. flavopersicus* wurden zwei Gene, *spcB* und *spcH*, gefunden, die aufgrund von Sequenzhomologien Dehydrogenasen codieren sollten. Wegen seiner Ähnlichkeit zur *myo*-Inositol-2-Dehydrogenase von *Bacillus halodurans* und seiner Lage am Anfang des Clusters erschien es am wahrscheinlichsten, dass SpcB die Reaktion von *myo*-Inositol zu *scyllo*-Inosose katalysiert. Eventuell sollte dieses Enzym auch für die zweite Dehydrogenasereaktion bei der Synthese von Actinamin verantwortlich sein, während SpcH die Umwandlung von Dihydrospectinomycin zu Spectinomycin durchführen könnte.

Für den Translationsstart von SpcB kommen zwei mögliche Start-Codons in Frage. Das erste ATG-Codon liegt bei Base 10.815 der Gesamtsequenz und würde zu einem Protein mit 392 Aminosäuren führen. Die Synthese des kleineren Enzyms mit 376 Aminosäuren würde am GTG-Codon bei 10.863 bp beginnen. Vor keinem der beiden Start-Codons befindet sich eine eindeutige Shine-Dalgarno-Sequenz. Sequenzvergleiche mit den beiden SpcB-Dehydrogenasen von *S. spectabilis* NRRL2494 und *S. spectabilis* NRRL2792 zeigten, dass die Ähnlichkeit der drei Proteine erst ab dem späteren Start-Codon beginnt. Für Expressionsstudien und Aktivitätsbestimmungen von SpcB wurden sowohl das längere als auch das kürzere Gen kloniert.

4.6.2.1 Klonierung und Expression der Dehydrogenasegene *spcB* und *spcH* in *E. coli*

Als Expressionsvektoren wurden pJOE3075.3 und pJOE3065.1 (s. 7.1) gewählt, die über einen Rhamnose- und einen T7-Promotor verfügen (s. 4.6.1.1). In pJOE3065.1 konnte über eine entsprechende Klonierungsstrategie das Gen am 5'-Ende mit den ersten 12 Aminosäuren des T7-*gene10* fusioniert werden, was zu einer verbesserten Translationsinitiation beitragen könnte. Die konstruierten Plasmide mit den Dehydrogenasegenen *spcB* und *spcH* sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tab. 12: Verschiedene Plasmid-Derivate mit den Dehydrogenasegenen *spcB* und *spcH* und ihre Konstruktion.

Plasmid	Vektor	Primer (RE-Schnittstellen)	Template bei der PCR-Amplifikation	Gen (Start-Codon)	Bemerkungen
pTST78.2	pJOE3065.1	s2251 (<i>Bam</i> HI) s2252 (<i>Bam</i> HI)	Sfcos10	<i>spcB</i> (10.815 bp)	N-terminale Fusion mit T7- <i>gene10</i> und C-terminal mit His-Tag
pTST287.2	pJOE3065.1	s2251 (<i>Bam</i> HI) s3456 (<i>Bam</i> HI)	chromosomale DNA von <i>S. flavopersicus</i>	<i>spcB</i> (10.815 bp)	N-terminale Fusion mit T7- <i>gene10</i>
pTST285.1	pJOE3075.3	s3463 (<i>Nde</i> I) s3456 (<i>Bam</i> HI)	chromosomale DNA von <i>S. flavopersicus</i>	<i>spcB</i> (10.863 bp)	
pTST286.1	pJOE3075.3	s3463 (<i>Nde</i> I) s2252 (<i>Bam</i> HI)	chromosomale DNA von <i>S. flavopersicus</i>	<i>spcB</i> (10.863 bp)	C-terminale Fusion mit His-Tag
pTST270.1	pJOE3075.3	s2852 (<i>Nde</i> I) s3457 (<i>Bgl</i> II)	chromosomale DNA von <i>S. flavopersicus</i>	<i>spcH</i> (20.494 bp)	
pTST279.3	pJOE3075.3	s2852 (<i>Nde</i> I) s2853 (<i>Bgl</i> II)	chromosomale DNA von <i>S. flavopersicus</i>	<i>spcH</i> (20.494 bp)	C-terminale Fusion mit His-Tag

Alle amplifizierten Gene wurden komplett sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass im Plasmid pTST279.3 durch die PCR ein Basenaustausch verursacht wurde. Dieser Fehler in

der Sequenz führte gleichzeitig zu dem Aminosäure-Austausch Leucin gegen Phenylalanin im C-terminalen Bereich von *spcH*.

E. coli JM109 wurde mit den sechs Plasmiden transformiert und die Expression unter Kontrolle des Rhamnose-Promotors durch Zugabe von 0,2 % L-Rhamnose induziert. Die Induktion wurde etwa 6 ½ Stunden bei 28°C durchgeführt. Da von einigen Dehydrogenasen bekannt war, dass sie nur in Anwesenheit von Zink aktiv sind, wurde dem Medium parallel zur Induktion 0,8 mM ZnCl₂ zugefügt. Nach Ultraschall-Aufschluss und SDS-PAGE war ersichtlich, dass alle vier SpcB-Konstrukte von *S. flavopersicus* nur in geringer Menge als lösliche Proteine exprimiert wurden (Abb. 26). Ein etwa gleich großer Anteil der Proteine fiel als unlösliche Inclusion Bodies aus. Das errechnete Molekulargewicht von SpcB lag bei 43,4 kDa, wenn das erste Start-Codon gewählt wurde bzw. bei 41,8 kDa mit dem zweiten Start-Codon. Das Molekulargewicht der gebildeten Fusionsproteine mit His-Tag war um circa 0,6 kDa größer, während die Proteine, die mit dem T7*gene10* gekoppelt wurden ungefähr 1,3 kDa größer waren. Die erwartete Proteinbande von SpcB im löslichen Rohextrakt JM109/pTST285.1 wurde auf dem SDS-Gel wahrscheinlich durch eine *E. coli*-Proteinbande überlagert und war nicht eindeutig zu sehen. Die Dehydrogenase SpcH wurde um einen geringen Prozentsatz besser als lösliches Protein exprimiert als SpcB. Auch hier war die Bildung von Inclusion Bodies zu erkennen. Das errechnete Molekulargewicht von SpcH lag bei 38 kDa. Der Aminosäure-Austausch in pTST279.3 schien keine Auswirkungen auf die Expression des Proteins zu haben.

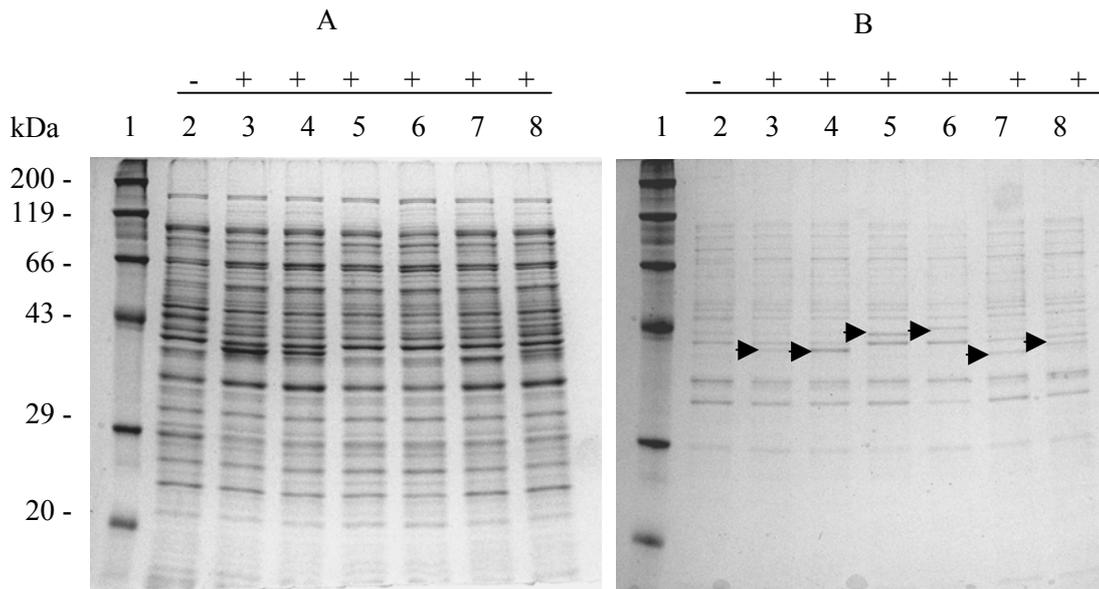


Abb. 26: SDS-PAGE-Analyse der Expression der Dehydrogenasogene *spcB* und *spcH* aus *S. flavopersicus*. Lösliche (A) und unlösliche Fraktionen (B) der aufgeschlossenen *E. coli*-Rohextrakte wurden nach 6 h Induktion in LB mit Ampicillin und $ZnCl_2$ bei 28°C erhalten und auf ein 12 % iges Gel aufgetragen. Spuren: (1) LMW-Marker; (2, 7) JM109/pTST285.1; (3) JM109/pTST270.1; (4) JM109/pTST279.3; (5) JM109/pTST287.2; (6) JM109/pTST78.2; (8) JM109/pTST286.1. + = induziert; - = nicht induziert. Die Pfeile zeigen auf induzierte Banden.

4.6.2.2 Klonierung und Expression des Dehydrogenasogens *spcB* in *Streptomyces*

Die Expression von *spcB* in *Streptomyces* wurde mittels zweier verschiedener Vektoren durchgeführt. Mit den Primern s2906 (*MunI*-Schnittstelle) und s2907 (*EcoRI*-Schnittstelle) wurde das Gen 28 Basen vor dem ersten möglichen Start-Codon und 16 Basen nach dem Stopp-Codon aus der chromosomalen DNA von *S. flavopersicus* amplifiziert und über die eingebrachten Restriktionsschnittstellen in die *EcoRI*-Schnittstelle von pWHM4 inseriert. Eine möglicherweise vor dem Gen liegende Shine-Dalgarno-Sequenz sollte auf diese Weise mit in den Vektor inseriert werden. Es entstand das Plasmid pTST99.1 (Abb. 27A). Beim Vektor pWHM4 handelt es sich um einen *E. coli*/*Streptomyces*-Shuttlevektor, bei dem das Gen unter Kontrolle des konstitutiven *ermE**-Promotors steht.

Des Weiteren wurde der Shuttlevektor pTST103.1 konstruiert, indem eine Deletionsmutante (*PvuII*) von pIC20R und Streptomyceten-spezifische Sequenzen von pIJ702 mit *NdeI* fusioniert wurden. Zwischen die *SphI*- und *SacI*-Schnittstellen des Plasmids wurde außerdem

über die Oligonukleotide s3021 und s3022, deren Sequenz in Abbildung 27B zu sehen ist, eine Polylinker-Sequenz und sechs Histidin-Codons eingebracht. Nach Amplifikation von *spcB* mit dem Template Sfcos10 und den Primern s3023 (*Sph*I) und s2252 (*Bam*HI) wurde das Gen (Position 10.818 bp bis 11.990 bp in der Gesamtsequenz) über die Restriktionschnittstellen als 808 bp-*Sph*I- und 373 bp-*Sph*I/*Bam*HI-Fragment in den neuen Expressionsvektor kloniert und dabei mit der His-Tag-Sequenz fusioniert. Das daraus entstandene Plasmid wurde pTST113.29 genannt (Abb. 27A). Durch die Wahl von *Sph*I zur Klonierung stand das Gen unter Kontrolle des Promotors des *mel*-Operons und zwischen dem ersten möglichen ATG-Start-Codon von *spcB* und dem zweiten Codon wurde ein Prolin-Codon zusätzlich eingefügt.

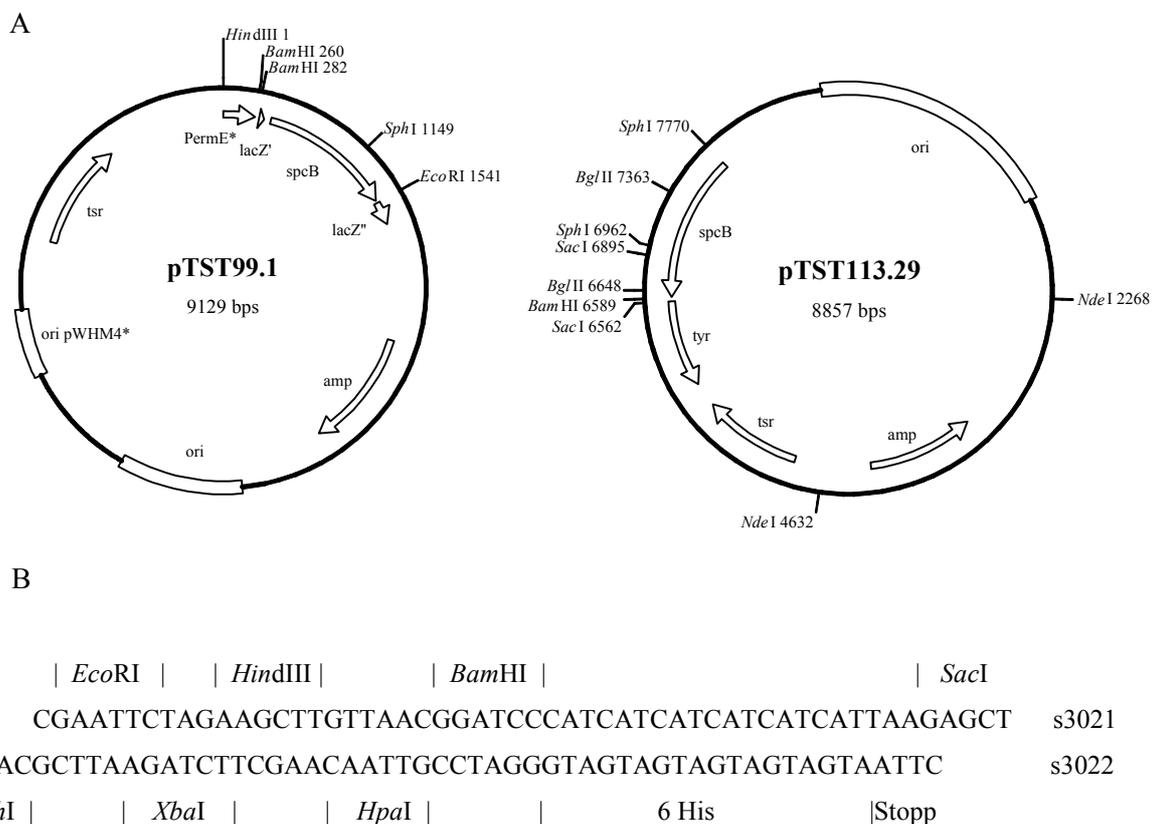


Abb. 27: Restriktionskarten der Plasmide pTST99.1 und pTST113.29 zur Expression von *spcB* in Streptomyceten (A) und Sequenz der Oligonukleotide s3021 und s3022 mit Restriktionschnittstellen und 6 Histidin-Codons (B).

S. lividans TK64 wurde mit pTST99.1 bzw. pTST113.29 transformiert. Zwei Klone von TK64/pTST99.1 wurden in Soja-Mannitol-Medium mit Thiostrepton angezogen, die Kulturen

nach 4 Tagen mittels Ultraschall aufgeschlossen und Rohextrakt sowie Pellet auf ein SDS-Gel aufgetragen. Eine prominente Proteinbande in der Größe von SpcB war jedoch nicht sichtbar. Von TK64/pTST113.29 wurden nach 1, 2, 3, 4, und 7 Tagen Inkubation in Soja-Mannitol-Medium ohne Antibiotikum Proben entnommen und aufgeschlossen. Auch hier war auf dem SDS-Gel keine eindeutige Bande in der Größe von SpcB zu identifizieren.

4.6.2.3 Aktivitätsbestimmung der Dehydrogenasen SpcB und SpcH

Wie bereits oben erwähnt sind zur Synthese von Spectinomycin wenigstens drei bis vier Dehydrogenasereaktionen nötig. Da *scyllo*-Inosamin, 3-Keto-*scyllo*-Inosamin und dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose nicht kommerziell erhältlich waren, konnte nur getestet werden, ob die Dehydrogenasen SpcB und SpcH die Umsetzungen 1 oder 4 katalysieren (s. 4.6.2). Als Coenzyme für die Reaktionen kommen NAD^+/NADH bzw. $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in Betracht, deren Reduktion bzw. Oxidation im Photometer bei 340 nm gemessen werden sollte.

Die Kulturen von *E. coli* JM109/pTST78.2, pTST287.2, pTST285.1, pTST286.1, pTST270.1 und pTST279.3 wurden mit 0,2 % Rhamnose induziert und zusätzlich 0,8 mM ZnCl_2 zugegeben. Nach 6 Stunden Inkubation bei 28°C wurden die Proben mit Ultraschall aufgeschlossen und die so gewonnenen löslichen Rohextrakte in einem Aktivitätstest eingesetzt, der unter Material und Methoden (s. 3.5.6) näher beschrieben ist.

Der Standardpuffer bestand aus 0,1 M Natrium-Phosphat, pH 7,5. Da für einige Dehydrogenasen, z. B. die Mannitol-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* (Brünker et al., 1997), jedoch bekannt war, dass die Oxidationsreaktion bevorzugt bei höheren pH-Werten abläuft, wurde für einzelne Versuche zusätzlich 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,0 verwendet. Als Substrate wurden Spectinomycin bzw. *myo*-Inositol mit den Endkonzentrationen 10 mM, 50 mM und 100 mM und Dihydrospectinomycin bzw. *scyllo*-Inosose mit 10 mM eingesetzt. Die Cofaktor-Endkonzentration betrug 2 mM, die Menge an Protein im löslichen Rohextrakt lag gleichbleibend bei etwa 19 µg in 500 µl Gesamtvolumen. In Tabelle 13 sind einige der ermittelten Messwerte mit den Substraten *myo*-Inositol und Dihydrospectinomycin exemplarisch aufgelistet. Als Kontrolle wurde die lösliche Fraktion einer nicht induzierten *E. coli* JM109/pTST285.1-Kultur eingesetzt und die Reaktionen mit *myo*-Inositol (50 mM) und Spectinomycin (50 mM) durchgeführt. Die Δ -Extinktionswerte der Kontrollmessungen lagen zwischen 0 - 0,002 und wurden von den Werten, die in Tabelle 13 aufgelistet sind, nicht subtrahiert. Ein Kontrollwert ist exemplarisch in Tabelle 13 angegeben.

Tab. 13: Auszug aus den Messwerten der Aktivitätstests mit den Dehydrogenasen SpcB und SpcH unter Verwendung verschiedener Substrate und Coenzyme.

löslicher Rohextrakt	Substrat (Endkonzentration)	Coenzym (je 2 mM Endkonzentration)	Δ Extinktion/min [340 nm]
JM109/pTST285.1 nicht induziert	<i>myo</i> -Inositol (50 mM)	NAD ⁺	0,001
JM109/pTST270.1 induziert	Dihydrospectinomycin (10 mM)	NAD ⁺	0,005
JM109/pTST270.1 induziert	<i>myo</i> -Inositol (10 mM)	NAD ⁺	0,000
JM109/pTST285.1 induziert	Dihydrospectinomycin (10 mM)	NAD ⁺	0,004
JM109/pTST285.1 induziert	<i>myo</i> -Inositol (10 mM)	NADP ⁺	0,003
JM109/pTST287.2 induziert	Dihydrospectinomycin (10 mM)	NADP ⁺	0,003
JM109/pTST287.2 induziert	<i>myo</i> -Inositol (100 mM)	NAD ⁺	0,003

konstante Testparameter: 500 μ l Gesamtvolumen; Proteinkonzentration: 19 μ g; Puffer: 0,1 M NaP, pH 7,5; 25°C.

Die Menge an NAD(P)H, die im obigen Test eingesetzt wurde, lag über den Werten, die im Photometer noch linear gemessen werden konnten. Ein Extinktionsabfall konnte unter diesen Bedingungen also nur nachgewiesen werden, wenn die Enzyme die Reaktionen sehr schnell katalysierten. Die Meßwerte, die mit *scyllo*-Inose und Spectinomycin erhalten wurden, fielen in einem Zeitraum von einer Minute nicht ab. Da aber eine langsame Umsetzung durch die Enzyme durchaus möglich erschien, wurden die Δ -Extinktion-Werte nicht in der Tabelle 13 aufgenommen und ein weiterer Test durchgeführt, bei dem die NAD(P)H-Konzentration auf eine Endkonzentration von 0,2 mM erniedrigt wurde. Die Menge an löslichem Rohextrakt wurde zwischen 10 - 600 μ l auf 1 ml Gesamtvolumen variiert, d.h. es wurden etwa 3 - 180 μ g Protein eingesetzt. Die Spectinomycin-Endkonzentration wurde mit 500 mM und die NAD(P)H-Konzentration mit 0,2 mM konstant gehalten. Um den spontanen Zerfall von NADH zu messen, wurde ein Ansatz ohne Rohextrakt und Substrat gemessen (Tab. 14). Zum

Vergleich wurden die gleichen Messungen mit und ohne Spectinomycin durchgeführt. Tabelle 14 gibt beispielhaft einige Testansätze wieder.

Tab. 14: Auszug aus den Messwerten der Aktivitätstests mit den Dehydrogenasen SpcB und SpcH in Abhängigkeit von der Rohextraktmenge.

löslicher Rohextrakt (eingesetzte Menge)	Substrat (je 100 mM)	Coenzym (je 0,2 mM)	Puffer	Δ Extinktion/min [340 nm]
-	-	NADH	0,1 M NaP, pH 7,5	0,011
JM109/pTST270.1 (20 μ l)	-	NADH	0,1 M NaP, pH 7,5	0,037
JM109/pTST270.1 (20 μ l)	Spectinomycin	NADH	0,1 M NaP, pH 7,5	0,036
JM109/pTST270.1 (100 μ l)	-	NADPH	0,1 M NaP, pH 7,5	0,004
JM109/pTST270.1 (100 μ l)	Spectinomycin	NADPH	0,1 M NaP, pH 7,5	0,001
JM109/pTST285.1 (100 μ l)	-	NADH	0,1 M NaP, pH 7,5	0,031
JM109/pTST285.1 (100 μ l)	Spectinomycin	NADH	0,1 M NaP, pH 7,5	0,044
JM109/pTST285.1 (100 μ l)	-	NADH	0,1 M Glycin/NaOH, pH 9,0	0,053
JM109/pTST285.1 (100 μ l)	Spectinomycin	NADH	0,1 M Glycin/NaOH, pH 9,0	0,048
JM109/pTST287.2 (300 μ l)	-	NADH	0,1 M NaP, pH 7,5	0,048
JM109/pTST287.2 (300 μ l)	Spectinomycin	NADH	0,1 M NaP, pH 7,5	0,043
JM109/pTST287.2 (100 μ l)	-	NADH	0,1 M Glycin/NaOH, pH 9,0	0,050
JM109/pTST287.2 (100 μ l)	Spectinomycin	NADH	0,1 M Glycin/NaOH, pH 9,0	0,046

konstante Testparameter: 1 ml Gesamtvolumen; Substrat- und Coenzym-Endkonzentration (s. oben); 25°C. - : keine Substrat-Zugabe.

In allen getesteten Variationen der Assay-Bedingungen konnte allerdings im Photometer keine Reaktion anhand eines spezifisch durch die Enzyme bedingten Extinktionsabfalls oder -anstiegs nachgewiesen werden. Auch nach Inkubation der Reaktionsansätze über Nacht fand keine Umsetzung statt.

Im Fall der zweiten Messreihe konnten zwar relativ starke Veränderungen der Extinktion gemessen werden. Diese traten aber immer auch bei den Kontrollansätzen ohne Substrat-Zugabe auf und sind wahrscheinlich auf andere Enzyme im Rohextrakt zurückzuführen.

Da keine spezifische Reaktion nachweisbar war, die Expression der Proteine nur sehr schwach war und in einem Plasmid-Derivat zusätzlich ein Aminosäure-Austausch vorhanden war, wurde darauf verzichtet, die mit einem His-Tag versehenen Enzyme über eine Affinitätschromatographie-Säule aufzureinigen und gereinigtes Protein im Test einzusetzen.

Obwohl nach SDS-PAGE mit Extrakten von *S. lividans* TK64/pTST99.1 keine SpcB-Proteinbande zu sehen war, wurden auch diese Überstände auf ihre Dehydrogenase-Aktivität getestet. Dazu wurden 30 µl bzw. 100 µl aufgeschlossene Zellen mit 75 mM *myo*-Inositol und 2 mM NAD(P)⁺ in Natrium-Phosphat-Puffer zur Reaktion gebracht. Eine Umsetzung war allerdings nicht zu sehen.

4.7 Modifikation des Streptomycin-Biosynthese-Clusters von *S. griseus* N2-3-11

Das Streptomycin-Biosynthese-Cluster von *S. griseus* wurde als eines der ersten Gencluster zur Synthese von Aminoglykosid-Antibiotika sequenziert und der Biosyntheseweg inklusive seiner Regulation, bisher allerdings noch unvollständig, aufgeklärt (Piepersberg & Distler, 1997).

Streptidin, eine Untereinheit von Streptomycin, und die Spectinomycin-Untereinheit Actinamin besitzen sehr ähnliche Strukturformeln. Während sich bei Streptidin an den Positionen C-1 und C-3 eine Amidinogruppe befindet, wird bei Actinamin die Aminogruppe an diesen Positionen methyliert. Die Biosynthesewege sollten daher bis zu einem gewissen Grade analog verlaufen (Abb. 28).

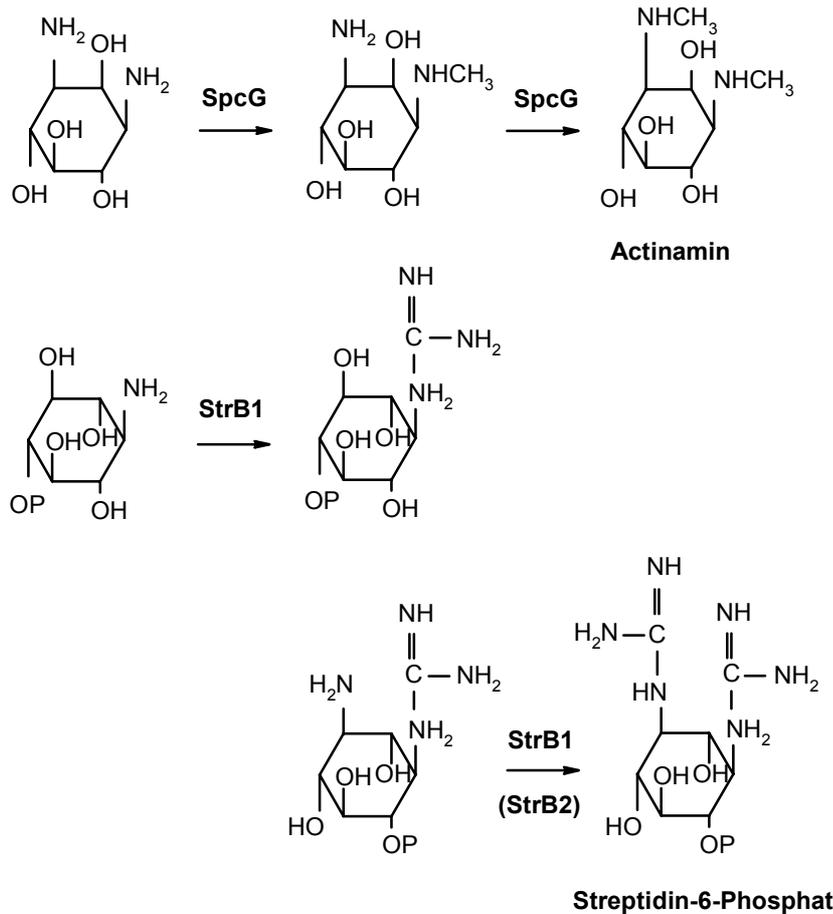


Abb. 28: Vergleich einiger Reaktionen zur Biosynthese von Actinamin und Streptidin-6-Phosphat.

Im Gencluster von *S. griseus* N2-3-11 wurden zwei Amidinotransferasegene *strB1* und *strB2* gefunden, von denen *strB1* den Transfer von mindestens einer Amidinogruppe katalysiert (Walker, 1990). In der Sequenz von *S. flavopersicus* konnte nur ein Methyltransferasegen *spcG* identifiziert werden. Da der Biosyntheseweg von Streptomycin gut untersucht ist, wurde versucht diesen zu modifizieren. Dazu sollte das Amidinotransferasegen *strB1* von *S. griseus* N2-3-11 vom Start- bis zum Stopp-Codon durch das Methyltransferasegen *spcG* aus *S. flavopersicus* ersetzt werden. Die unmittelbare Umgebung mit der Shine-Dalgarno-Sequenz von *strB1* blieb durch diesen Austausch unberührt.

4.7.1 Konstruktion eines Plasmids für den Genaustausch von *strB1* durch *spcG*

Mit den Primern s2913 und s2917 wurde ein etwa 1 kb-großes Fragment direkt stromaufwärts vom Start-Codon von *strB1* aus der chromosomalen DNA von *S. griseus* N2-3-11 amplifiziert. Mit s2914 und s2915 wurde ein etwa 1 kb-großes Fragment stromabwärts von

strB1 erhalten. Dabei wurden die Primer s2917 und s2915 so gewählt, dass sie mit 20 Basen direkt vor bzw. nach dem Amidinotransferasegen paarten und mit 20 weiteren Basen mit dem Start- bzw. Stopp-Codon des Methyltransferasegens überlappten. Das Methyltransferasegen *spcG* wurde mit den Oligonukleotiden s2916 und s2918, deren Sequenz komplementär zu s2917 und s2915 gewählt wurde, aus *Sfcos10* vervielfältigt (Abb. 29).

Alle drei PCR-Produkte wiesen durch die Primer an den Enden überlappende Sequenzen auf. In einer weiteren PCR konnten dadurch jeweils zwei der Fragmente zusammengesetzt werden. Das Fragment stromaufwärts von *strB1* und das *spcG*-Amplifikat wurden zuerst durch 10 Zyklen ohne Primer und danach durch 30 Zyklen mit den Primern s2913 und s2918 verbunden und amplifiziert. Die Kopplung von *spcG* mit dem Fragment rechts von *strB1* erfolgte analog mit s2914 und s2916.

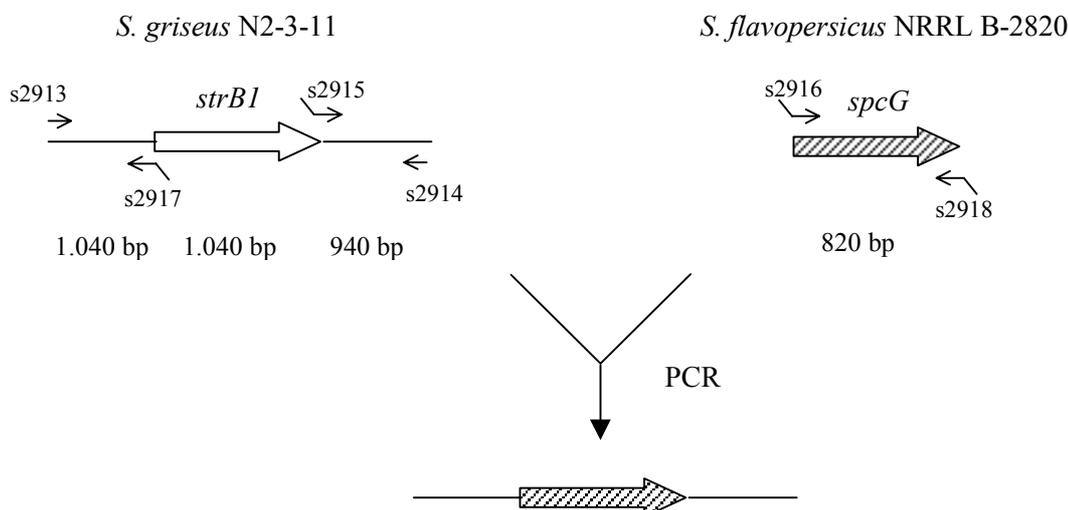


Abb. 29: Schematische Darstellung der für den Genaustausch von *strB1* durch *spcG* gewählten Fragmente und Primer.

Um alle drei Fragmente zu verbinden, wurde die obige Vorgehensweise mit dem Expand Long Template Kit (Roche Applied Science) wiederholt. Als Template dienten die beiden schon verbundenen Fragmentstücke und als Oligonukleotide s2913 und s2914. Das Amplifikat aus allen drei Fragmenten wurde in den pCR[®]-BluntII-TOPO[®]-Vektor (Invitrogen) kloniert. Diese Vektoren sind bereits linear, besitzen einen überstehenden Thymidinrest am 3'-Ende und haben an jedem Ende kovalent die DNA-Topoisomerase I gebunden. PCR-Produkte mit überstehendem 3'-Adeninrest können ohne vorherige Behandlung mit Klenow-Polymerase durch die Topoisomerase mit dem Vektor verknüpft werden. Dabei entstand pTST117.7, dessen Insert durch Ansequenzieren mit den Primern UP

und RP überprüft wurde. Die Übergänge zwischen den Sequenzen von *S. flavopersicus* und *S. griseus* wurden durch Sequenzieren mit den Primern s2143, s2172 und s3192 überprüft. Über einen Zwischenklonierungsschritt wurde das Insert und ein Thiostrepton-Resistenzgen mit *Hind*III in den Vektor pJOE1082.1 (s. 7.1) ligiert. Dabei handelt es sich um einen Shuttlevektor aus pUC18 und pGM11. Der pGM11-Anteil ist ein pSG5-Derivat, ein natürlicherweise temperatursensitives Plasmid aus *S. glaucescens* mit einem Kanamycin-Resistenzgen, das daher für Gen-Replacements geeignet ist. *S. griseus* N2-3-11 wurde mit dem entstandenen Plasmid pTST128.4 transformiert und erhaltene Transformanten auf HT-Platten mit Thiostrepton ausplattiert. Aufgrund der homologen Bereiche sollte das Plasmid mit der chromosomalen DNA von *S. griseus* rekombinieren. Dieser Vorgang wurde forciert, indem die Platten bei 35 °C inkubiert wurden, da bei erhöhter Temperatur der Vektor nicht mehr replizierfähig ist.

4.7.2 Identifikation von rekombinanten *S. griseus*-Klonen, bei denen *strB1* durch *spcG* ersetzt wurde

Von *S. griseus*-Klonen mit dem Plasmid pTST128.4, die auf HT-Platten mit Thiostrepton bei erhöhter Temperatur wuchsen (s. 4.7.1), wurden Sporen geerntet und auf HT-Platten als Einzelkolonien ausplattiert. Die Kolonien wurden auf HT-Platten ohne Antibiotikum und HT-Platten mit Thiostrepton bzw. Kanamycin ausgestrichen. Bei einer erfolgreichen Integration des *spcG*-Gens und anschließendem Ausschneiden des Vektors durch homologe Rekombination sollten beide Resistenzen verloren gehen. Thiostrepton- und Kanamycin-sensitive *S. griseus*/pTST128.4-Klone sowie *S. griseus* wurden angezogen, ihre genomische DNA isoliert und die Region um das ausgetauschte Gen mit den Primern s2913 und s2914 amplifiziert. Mit Hilfe von geeigneten Restriktionsverdau des Amplifikats konnten vier Klone identifiziert werden, die statt des ursprünglich vorhandenen *strB1*-Gens nun *spcG* besaßen. Sie wurden mit *S. griseus* BG1 - 4 bezeichnet. Die Integration wurde zusätzlich mittels Southern Blot überprüft. DNA der vier Klone, über CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert, zeigte dabei nur noch ein Signal mit dem Methyltransferasegen *spcG* von *S. flavopersicus* als Sonde und nicht mit dem Amidinotransferasegen *strB1* von *S. griseus*. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass kein Vektoranteil mehr in den Stämmen vorhanden war, da mit dem Vektor pJOE2010.2, einem pJOE1082.1-Derivat mit zusätzlichem Thiostrepton-Resistenzgen, kein Signal erhalten wurde (Abb. 30).

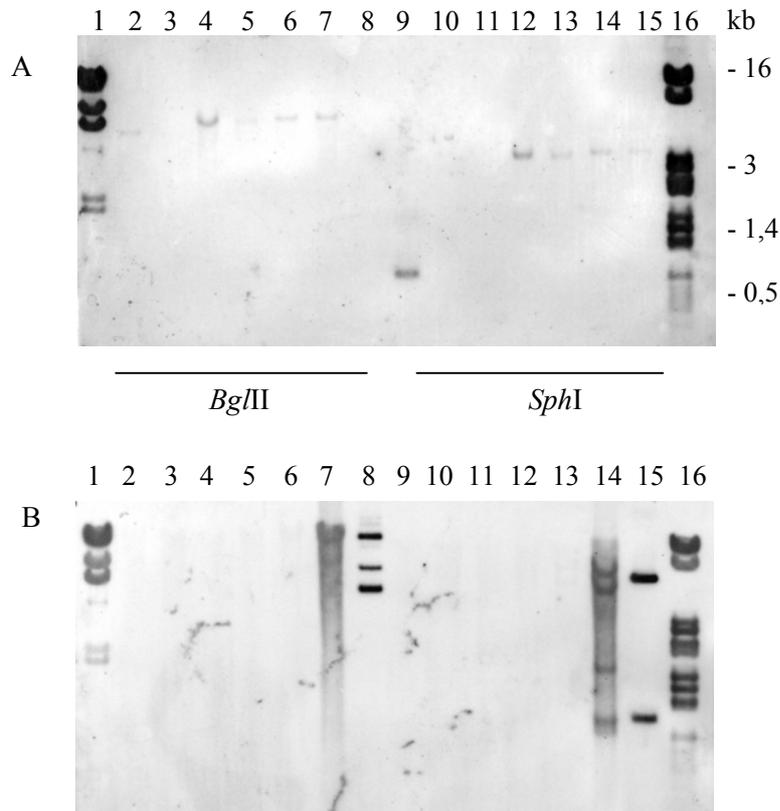


Abb. 30: Southern Blot-Analyse zur Überprüfung der Mutanten des Genaustauschs *strBI* gegen *spcG*. (A) Chromosomale DNA von *S. flavopersicus* (2, 10), *S. griseus* (3, 11) und *S. griseus* BG1 - 4 (4 - 7, 12 - 15) wurden mit *Bgl*II (2 - 7) und *Sph*I (10 - 15) geschnitten und aufgetrennt. Als Sonde wurde DIG-markiertes PCR-Fragment von *spcG* eingesetzt. Spuren: (1) λ -DNA, *Hind*III-verdaut; (8) PCR-Fragment *strBI*; (9) PCR-Fragment *spcG*; (16) λ -DNA, *Bgl*II-verdaut. (B) Chromosomale DNA von *S. griseus* (2, 9), *S. griseus* BG1 - 4 (3 - 6, 10 - 13) und *S. griseus*/pTST128.4 vor der Temperaturselektion (Ts^R, Kan^R) (7, 14) sowie pJOE2010.2 (8, 15) wurden mit *Bgl*II (2 - 8) und *Sph*I (9 - 15) geschnitten und aufgetrennt. Als Sonde wurde DIG-markiertes Plasmid pJOE2010.2 eingesetzt. Spuren: (1) λ -DNA, *Hind*III-verdaut; (16) λ -DNA, *Bgl*II-verdaut. Hier nicht gezeigt ist der Southern Blot mit dem PCR-Fragment *strBI* als Sonde, da wie gewünscht bis auf die Positivkontrolle keine Banden zu sehen waren.

4.7.3 Untersuchung der rekombinanten *S. griseus* BG-Klone auf Antibiotika-Produktion

S. griseus und *S. griseus* BG1 - 4 wurden in vier verschiedenen Medien (Fermentationsmedium, Soja-Mannitol, TSB, Meat-Medium) angezogen und auf Antibiotika-Produktion im Agarplatten-Diffusionsassay getestet. Der Überstand von *S. griseus* hemmte nur den Streptomycin-sensitiven Teststamm *S. lividans* TK23, nicht dagegen den Streptomycin-resistenten Stamm TK64. Bei den Überständen von *S. griseus* BG1 - 4 traten in Abhängigkeit des verwendeten Mediums kein Hemmhof oder Hemmhöfe in gleicher, geringer Größe sowohl bei TK64 als auch bei TK23 auf. Die Größe der Höfe war allerdings deutlich kleiner als diejenigen, die mit der *S. griseus*-Wildtyp-Kultur erzielt wurden.

Streptomycin wurde aus den Überständen mit der gleichen Methode aufkonzentriert, die zur Aufreinigung von Spectinomycin verwendet wurde. Dabei gelang die Isolierung von Streptomycin aus einer *S. griseus*-Kultur, während das Lyophilisat der *S. griseus* BG1-Probe keine Hemmhöfe im Bio-Assay aufwies. Die erhaltenen Resultate lieferten keinen eindeutigen Hinweis, welche Auswirkungen der Genaustausch hatte. Denkbar wäre, dass die Stämme *S. griseus* BG1 - 4 gar kein Antibiotikum mehr produzierten, oder aber eine veränderte Substanz, die durch die ausgetauschte Seitengruppe die Teststämme nicht mehr hemmte.

4.8 Versuche zur Inaktivierung einiger Spc-Biosynthesegene

Inaktivierungen einzelner Gene eines Biosynthese-Clusters können vielerlei Hinweise liefern. Zum einen kann ein Ausbleiben der Antibiotika-Produktion den Beweis erbringen, dass die aufgefundenen Gene tatsächlich die Synthesegene beinhalten. Zum anderen kann durch gezieltes „Knock-out“ einzelner Gene deren Funktion innerhalb der Biosynthese untersucht werden, z.B. durch Komplementation mit einem Gen bekannter, analoger Funktion oder durch Isolierung von Biosynthese-Intermediaten. Mit dieser Zielsetzung sollten auch einige Gene des Spectinomycin-Biosynthese-Genclusters inaktiviert werden. Dafür wurden unterschiedliche Gene ausgewählt. Da sich die Versuche aufgrund der unten beschriebenen Schwierigkeiten als problematisch erwiesen, wurden verschiedene Vektoren und Strategien getestet, deren Prinzip in Kapitel 4.8.1 erläutert wird. Die Ergebnisse werden nicht im Einzelnen dargelegt, sondern nur anhand von einigen Beispielen.

4.8.1 Darstellung der zur Geninaktivierung eingesetzten Strategien und Plasmid-Derivate

Gene können im Allgemeinen durch verschiedene Methoden inaktiviert werden. Zum einen kann ein Fragment des betreffenden Gens in einen Vektor inseriert werden und eine homologe Rekombination führt zu einer Integration des Plasmids ins Genom. Durch den Vektoranteil sollten somit die Gene unterbrochen werden, und unter Selektionsdruck sollten die Insertionen stabil bleiben. Dies wurde mit den Genen *spcB*, *spcF* und *spcR* aus dem Spectinomycin-Biosynthese-Gencluster von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 durchgeführt. Jeweils etwa 600 bp-Fragmente aus der Mitte der Gene wurden mit Oligonukleotiden amplifiziert, die am 5'-Ende eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Eco*RI-Schnittstelle für die nachfolgenden Klonierungen einbrachten. Ein Bereich aus *spcF* wurde mit den Primern s3330 und s3331 von Base 17.823 - 18.356 der Gesamtsequenz amplifiziert, *spcB* wurde mit den Primern s3332 und s3333 von 10.921 - 11.544 bp vervielfältigt und *spcR* mit den Primern s3328 und s3329 von Base 6.420 - 7.033.

Eine zweite Möglichkeit ist das Einführen von Mutationen, vor allem Frame-Shift-Mutationen, in die zu inaktivierenden Gene. Hierzu kann z.B. eine singuläre Restriktionschnittstelle ungefähr in der Mitte des Gens so deletiert bzw. aufgefüllt werden, dass es zu einer Verschiebung des Leserasters kommt. Nach einer Integration des Plasmids ins Chromosom und anschließender Exzision, beides über homologe Rekombination, bleibt die Mutation und damit die Inaktivierung in etwa 50 % der Chromosomen erhalten. Die Gene *spcH* und *spcK* sollten auf diese Weise inaktiviert werden. Durch Deletion der *Aat*II-Schnittstelle in der Mitte von *spcH* bei Position 19.974 und durch Auffüllen der *Age*I-Schnittstelle bei 23.302 bp innerhalb von *spcK* wurden jeweils mit der Klenow-Polymerase Leserasterverschiebungen um 4 Basen eingeführt. Die Mutation in *spcH* wurde im Plasmid pTST279.3 (s. 4.6.2.1) durchgeführt. Das komplette Gen *spcK* war für vorherige Versuche schon mit den Primern s3276 und s3277 amplifiziert und als *Nde*I/*Bam*HI-Fragment in den Vektor pJOE3075.3 inseriert worden (pTST145.1). Die Mutation und weitere Klonierungsschritte gingen von diesem Plasmid aus. Ein Nachteil dieser und der obigen Methode ist, dass die nachfolgenden Gene, die in gleicher Orientierung transkribiert werden, möglicherweise ebenfalls beeinflusst werden (polare Effekte). Daher wurden mit *spcH* und *spcK* monocistronische Gene ausgewählt, also Gene, die nicht Teil eines Operons sind.

Als weitere Methode bietet sich die komplette Deletion eines Gens an. Die flankierenden Regionen direkt vor und hinter dem Gen müssen dazu amplifiziert und in einen Suizidvektor

kloniert werden, der unter Selektionsdruck ins Genom integriert. Werden die Transformanten danach ohne Selektion angezogen, kann es zu einer zweiten Rekombination, d.h. zu einer Exzision des Vektoranteils kommen. Dabei sollte bei etwa der Hälfte der Zellen der ursprüngliche Zustand wieder hergestellt werden, während in der anderen Hälfte das Gen deletiert wurde. Zur Inaktivierung von *spcG* wurde dieses Verfahren verwendet. Mit den Primern s3334 und s3335, die endständig eine für die nachfolgende Klonierung nötige *Bgl*II- bzw. *Eco*RI-Schnittstelle trugen, wurde die flankierende Region stromabwärts von *spcG* zwischen den Basen 17.582 - 18.542 der Gesamtsequenz amplifiziert. Zur Amplifikation der Region stromaufwärts von *spcG* von 19.380 - 20.369 bp wurden die Primer s3336 und s3337 mit den endständigen Schnittstellen für *Eco*RI bzw. *Kpn*I eingesetzt. Beide Fragmente konnten über die *Eco*RI-Schnittstellen verbunden werden und mit *Bgl*II und *Kpn*I in verschiedene Vektoren inseriert werden. Die so entstandenen Plasmide konnten auch dazu verwendet werden, um in *S. flavopersicus* einen Genaustausch, in umgekehrter Weise wie er bereits in *S. griseus* durchgeführt wurde, zu versuchen (s. 4.7). Zu diesem Zweck wurde das Amidinotransferasegen *strBI* aus *S. griseus* mit den Oligonukleotiden s3338 und s3339, die beide *Eco*RI-Schnittstellen am Ende hatten, amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass das PCR-Produkt 14 Basen vor dem Start-Codon von *strBI* begann und damit eine potentielle Shine-Dalgarno-Sequenz umfasste, und mit dem Stopp-Codon von *strBI* endete. Über die eingebrachten Schnittstellen konnte das Gen zwischen die flankierenden Bereiche von *spcG* in die Plasmide ligiert werden. Nach Transformation von *S. flavopersicus* und erfolgter Rekombination sollte *spcG* im Genom durch *strBI* substituiert werden.

Für die Inaktivierungsexperimente standen mehrere Vektoren zur Verfügung, die auf verschiedenen Strategien zur Insertion basieren. Die zugehörigen Restriktionskarten sind im Anhang (s. 7.1) dargestellt. Derivate von pUC, die ein Resistenzgen tragen, das in *Streptomyces* exprimiert wird, können als Suizidvektoren eingesetzt werden. Da sie keinen Replikationsursprung für Streptomyceten besitzen, wird unter Selektionsdruck mit den in Streptomyceten wirksamen Antibiotika eine Integration des Plasmids ins Chromosom forciert. Ein solcher Suizidvektor stand mit dem Plasmid pTST108.2 zur Verfügung, einem pIC20H-Derivat mit einem Thiostrepton-Resistenzgen und deletierter *Pst*I-Schnittstelle (Abb. 31). Da *S. flavopersicus* das *Sfi*I (*Pst*I)-Restriktions-/Modifikationssystem exprimiert, musste diese Schnittstelle aus der Linker-Sequenz dieses Vektors ebenso wie aus allen anderen verwendeten Vektoren entfernt werden. Da nicht sicher war, welche Resistenzen in *S. flavopersicus* am besten exprimiert und selektioniert werden konnten, wurde zu einigen der entstandenen Plasmide das Apramycin-Resistenzgen hinzuligiert. Dazu wurde das Gen als

etwa 1,8 kb-*Bam*HI/*Bg*III-Fragment aus pJOE3084.1 in die *Bg*III-Schnittstelle der Plasmide eingebracht.

In der Regel werden Bakterien mit den ccc-Formen der Plasmide transformiert. In manchen Fällen kann DNA jedoch besser von Streptomycceten aufgenommen werden, wenn sie einzelsträngig vorliegt. Hierzu können die Vektoren durch eine Behandlung mit 1 M NaOH für 10 Minuten bei 37°C denaturiert werden (Oh & Chater, 1997), oder es können sogenannte Phagemide eingesetzt werden, die einen Replikationsursprung von einzelsträngigen Phagen wie M13 oder f1 besitzen. Sie haben den Vorteil, dass sie einerseits als doppelsträngige DNA in den Zellen vorliegen und andererseits nach Infektion der Bakterien mit den Phagen in großen Mengen als einzelsträngige DNA aus den Viruspartikeln isoliert werden können. Das Plasmid pDH5 kombiniert die Eigenschaften eines Phagemids mit denen eines Suizidvektors (s. 7.1). Neben einem Replikationsorigin von pUC und des Phagen f1 codiert es eine Ampicillin- und eine Thiostrepton-Resistenz (Hillemann et al., 1991).

Ferner können zur Inaktivierung in Streptomycceten instabile Vektoren eingesetzt werden, denen die Stabilitätsgene fehlen und die daher unter Selektionsdruck verstärkt ins Chromosom integrieren bzw. durch Wegnahme des Selektionsdrucks wieder ausgeschnitten werden und dann verloren gehen sollten. Dazu wurden instabile Shuttlevektoren konstruiert, indem aus dem Vektor pJOE4132.1 (s. 7.1), einem SCP2-Derivat, der Replikationsursprung und die beiden *rep*-Gene, wie weiter unten beschrieben, in die Suizidvektoren ligiert wurden.

Eine gute Möglichkeit zur Integration von Genen ins Chromosom bieten auch konditional letale Vektoren, die unter bestimmten Bedingungen, z.B. aufgrund einer Temperaturerhöhung, nicht mehr replizieren können und damit eine Integration ins Chromosom forciert wird. Für Streptomycceten wird häufig der temperatursensitive Vektor pGM11 benutzt. Bei einem Anstieg der Temperatur wird die Replikation des Vektors unterdrückt, weshalb unter Antibiotikaselektion nur Zellen mit in das Genom integrierten Plasmiden überleben können. Fällt die Selektion danach wieder weg, tritt bei permissiver Temperatur häufig ein zweiter Rekombinationsschritt ein, der zum Ausschneiden des Vektoranteils führt, da die Replikationsregion eines „high-copy“-Vektors im Chromosom störend wirkt. Anstelle von pGM11 wurde das Shuttle-Derivat pJOE1082.1 mit einem pUC-Replikationsursprung und den Genen für Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz verwendet (s. 7.1).

Alle Plasmide für die Inaktivierungsversuche, deren Klonierungen im Folgenden beschrieben werden, sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Ihre Restriktionskarten sind in Abb. 31 abgebildet, dabei wurden zur besseren Übersicht nur die Plasmide dargestellt, in die ein Fragment aus *spcB* inseriert wurde.

Die Genfragmente von *spcB*, *spcF* und *spcR*, bzw. die Mutationen enthaltenden Gene *spcH* und *spcK*, die Fragmente zur Deletion von *spcG* wie auch das Fragment zum Austausch von *spcG* gegen *strBI* wurden über die oben angegebenen Restriktionsschnittstellen, die mit den Primern eingeführt wurden, in den Suizidvektor pTST108.2 inseriert (Abb. 31, pTST159.1). Mit derselben Vorgehensweise wurden auch die Amplifikate von *spcB*, *spcF* und *spcR* sowie Δ *spcG* und *strBI* in pTST108.2 mit dem zusätzlichen Apramycin-Resistenzgen ligiert (Abb. 31, pTST182.1).

In die Polylinker-Sequenz des Phagemids pDH5 wurden die Teilbereiche der Gene *spcB*, *spcF* und *spcR* mit *Bam*HI und *Eco*RI eingebracht (Abb. 31, pTST246.1). *E. coli* 71/18 wurde mit den Plasmiden transformiert und mit einem f1-R408-Phagen-Lysat infiziert. Aus den neu entstandenen Phagenpartikeln konnte Einzelstrang-DNA isoliert und diese wiederum zur Transformation von *S. flavopersicus* genutzt werden.

Aus den Suizidvektor-Derivaten, die als Insert die zu deletierenden Gene trugen, wurden instabile Shuttlevektoren konstruiert, indem der SCP2-*ori*, *rep1* und *rep2* aus pJOE4132.1 als *Bam*HI-Fragment in die *Bgl*II-Schnittstelle der Inaktivierungsplasmide inseriert wurden (Abb. 31, pTST188.1).

Für die Inaktivierungen mit dem konditional letalem Vektor pJOE1082.1 wurden die Gene *spcB*, *spcR* und *spcK* ausgewählt und mit *Bam*HI und *Eco*RI inseriert. Der Vektor besitzt allerdings drei *Pst*I-Schnittstellen in essentiellen Regionen. Aufgrund des *Sfi*II (*Pst*I)-Restriktions-/Modifikationssystems in *S. flavopersicus* konnte er somit nicht ohne weiteres für die Inaktivierungsversuche verwendet werden. Von Dr. Bill Jack (New England Biolabs) wurde freundlicherweise das Plasmid pCDC201, ein pBR322-Derivat mit dem *Pst*I-Methyltransferasegen, zur Verfügung gestellt. Die Methylase sollte in *E. coli* die *Pst*I-Restriktionsschnittstellen von coexistenten Plasmiden methylieren. Als weiterer Schritt mussten in den pJOE1082.1-Derivaten der pUC-Replikationsorigin sowie die Ampicillin-Resistenz ausgetauscht werden, damit die Plasmide zusammen mit pCDC201 kompatibel in den Zellen vorhanden sein und selektioniert werden konnten. Dazu wurde aus den pJOE1082.1-Inaktivierungsplasmiden mit *Hind*III und *Ssp*I die Ampicillin-Resistenz und der Replikationsursprung entfernt und durch ein Chloramphenicol-Resistenzgen und den p15A-Origin aus pACYC184 ersetzt, das mit *Hind*III und *Nru*I geschnitten wurde (s. 7.1). Ein Verdau mit *Ssp*I und *Nru*I führt in beiden Fällen zu glatten Enden, so dass die Fragmente direkt ligiert werden konnten (Abb. 31, pTST202.1). *E. coli* ET12567/pCDC201 wurde mit den neu entstandenen Inaktivierungsplasmiden transformiert und eine Mischung der Plasmide

aus den erhaltenen Transformanten isoliert. Diese konnten durch *PstI* nicht mehr geschnitten werden.

Tab. 15: Darstellung der zur Inaktivierung mit verschiedenen Vektoren konstruierten Plasmide.

mutiertes bzw. deletiertes Gen	Vektor	zur Insertion des Gens verwendete Restriktionsschnittstellen	entstandenes Plasmid
<i>spcB</i>	Suizidvektor pTST108.2	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST159.1
	Suizidvektor pTST108.2 mit Apr ^R	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST182.1
	pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i>	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST188.1
	pTST108.2 + Apr ^R mit instabilem SCP2- <i>ori</i>	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST191.1
	temperatursensitiver Shuttlevektor aus pGM11 und pACYC184	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST202.1
	Vektor pDH5 zur Gewinnung von ssDNA	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST246.1
<i>spcF</i>	Suizidvektor pTST108.2	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST158.1
	Suizidvektor pTST108.2 mit Apr ^R	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST180.1
	pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i>	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST195.1
	Vektor pDH5 zur Gewinnung von ssDNA	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST245.2
<i>spcR</i>	Suizidvektor pTST108.2	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST161.1
	Suizidvektor pTST108.2 mit Apr ^R	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST181.1
	pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i>	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST196.1
	temperatursensitiver Shuttlevektor aus pGM11 und pACYC184	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST204.1
	Vektor pDH5 zur Gewinnung von ssDNA	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	pTST247.6
<i>spcH</i>	Suizidvektor pTST108.2	<i>Eco</i> RI + <i>Sph</i> I	pTST166.1
	pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i>	<i>Eco</i> RI + <i>Sph</i> I	pTST189.1
<i>spcK</i>	Suizidvektor pTST108.2	<i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	pTST167.2
	pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i>	<i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	pTST197.1
	temperatursensitiver Vektor pJOE1082.1	<i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	pTST201.1
	temperatursensitiver Shuttlevektor aus pGM11 und pACYC184	<i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI	pTST203.2
<i>spcG</i>	Suizidvektor pTST108.2	<i>Bgl</i> II + <i>Kpn</i> I	pTST162.1
	Suizidvektor pTST108.2 mit Apr ^R	<i>Bgl</i> II + <i>Kpn</i> I	pTST183.1
	pTST108.2 mit instabilem SCP2- <i>ori</i>	<i>Bgl</i> II + <i>Kpn</i> I	pTST200.1
<i>spcG</i> ↔ <i>strB1</i>	Suizidvektor pTST108.2	<i>Bgl</i> II + <i>Kpn</i> I, <i>strB1</i> mit <i>Eco</i> RI inseriert	pTST163.5
	Suizidvektor pTST108.2 mit Apr ^R	<i>Bgl</i> II + <i>Kpn</i> I, <i>strB1</i> mit <i>Eco</i> RI inseriert	pTST184.1

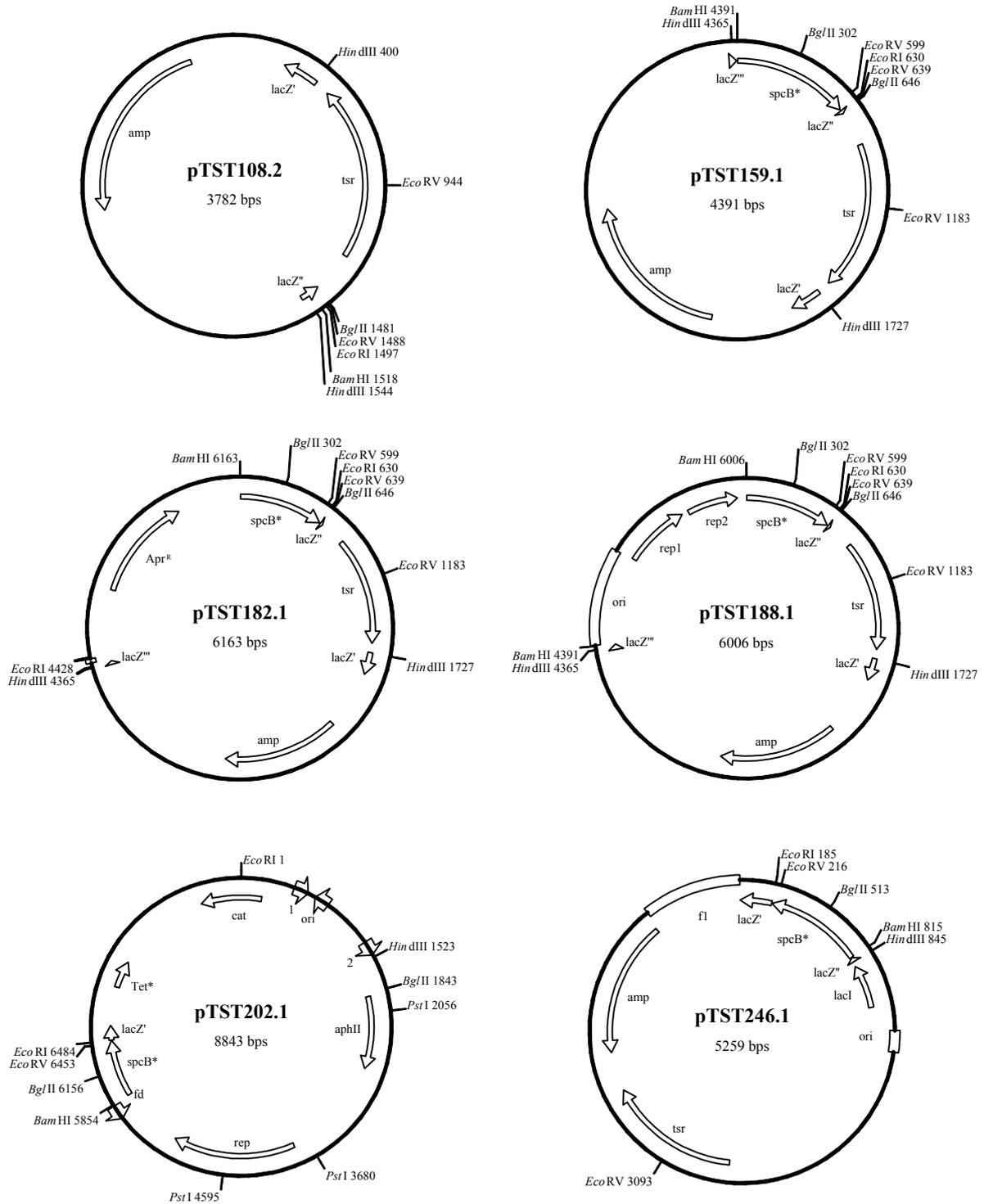


Abb. 31: Restriktionskarten verschiedener Inaktivierungsderivate. Als Beispiel sind alle Plasmide mit einem Fragment aus *spcB* (*spcB**) dargestellt. Nähere Erläuterungen s. Text.

4.8.2 Transformation von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 mit den Geninaktivierungsplasmiden

S. flavopersicus wurde mit den verschiedenen in Tabelle 15 genannten Plasmid-Derivaten transformiert. Da Streptomyceten, z.B. *S. coelicolor* A3(2), häufig *dam*- oder *dcm*-methylierte DNA restringieren, wurden die zu transformierenden Plasmide aus *E. coli* ET12567 isoliert. Dieser ist defizient in den *dam*- und *dcm*-Methylierungsgenen. Eine Ausnahme bildete die Einzelstrang-DNA, die aus Phagen-Partikeln gewonnen wurde, die aus *E. coli* 71/18 stammten. Die Protoplastierung und Transformation von *S. flavopersicus* nach der üblichen Methode (s. 3.6.3.2 und 3.6.3.4) erwies sich jedoch als sehr schwierig, weshalb einzelne Modifikationen vorgenommen wurden. So wurde zur Protoplastierung unter anderem das Protokoll von Lyutzkanova et al. (1993) angewendet, in dem eine Vorkultur des Stamms in SGGP-Medium angeimpft und nach etwa einem Tag in SGGP-Medium mit 2 % Glycin überimpft wurde. Dies führte zu keiner nennenswerten Verbesserung der Transformationsrate. Da unter dem Mikroskop bei beiden Methoden viele Protoplasten ohne Auffälligkeiten zu erkennen waren, wurde angenommen, dass die Probleme eher bei der Transformation oder Regeneration der Protoplasten zu suchen seien. Einzelstrang-DNA wird häufig besser von Streptomyceten aufgenommen als Doppelstrang-DNA. Daher wurden einige Plasmide denaturiert (s. 4.8.1) und *S. flavopersicus* damit und zum Vergleich parallel mit unbehandelter DNA transformiert. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Transformationseffizienz festgestellt werden. Des Weiteren wurden R9-Platten mit sehr hoher Sucrose-Konzentration getestet, auf denen die Protoplasten jedoch wesentlich schlechter regenerierten als auf den üblicherweise verwendeten R2-Platten. Als letzter Schritt wurde die Transformation wie bei Kieser et al. (2000) beschrieben ohne R2-Softagar durchgeführt, allerdings wieder ohne Verbesserung des Ergebnisses. Nur bei etwa der Hälfte der unternommenen Transformationen wurden Kolonien erhalten. Diese waren zum größten Teil stark braun gefärbt und schleimig und bildeten kein Luftmyzel. Nach dem Ausstreichen auf geeignete Selektionsplatten wuchsen sie nicht mehr an.

Wurde Einzelstrang-DNA in *S. flavopersicus* gebracht, die durch den Phagen fl1 verpackt worden war, erhielt man keine Transformanten (z.B. pTST246.1). Dasselbe war der Fall, wenn die Zellen mit einer Mischung aus pCDC201 und unterschiedlichen, temperatursensitiven pJOE1082.1-Derivaten (z.B. pTST202.1), deren *Pst*I-Schnittstellen durch Methylierung vor einem Verdau durch die Restriktionsendonuklease in *S. flavopersicus* geschützt sein sollten, transformiert wurden.

Wenn *S. flavopersicus* mit verschiedenen pUC-Suizidderivaten transformiert wurde (z.B. pTST159.1 und pTST182.1), wurden sehr wenige Kolonien erhalten, die eine normale Morphologie und Luftmyzelbildung zeigten. Diese erwiesen sich jedoch sehr häufig als instabil und wuchsen nach mehrmaligem Ausstreichen auf HT-Platten mit Selektionsantibiotikum nicht mehr an. Nur im Fall von *S. flavopersicus*/pTST183.1 und *S. flavopersicus*/pTST184.1 konnten stabile Klone gewonnen werden. In beiden Fällen handelte es sich um den Suizidvektor pTST108.2 mit zusätzlicher Apramycin-Resistenz. Mit Hilfe von pTST183.1 sollte das Gen *spcG* komplett deletiert werden, während mit pTST184.1 das Methyltransferasegen *spcG* in *S. flavopersicus* gegen das Amidinotransferasegen *strB1* aus *S. griseus* ausgetauscht werden sollte (Abb. 32).

Im Fall der instabilen Plasmid-Konstrukte mit dem Streptomyceten-Replikationsursprung aus SCP2 (pJOE4132.1) wurden ebenso nur wenige Transformanten erhalten, die nach Ausstreichen auf Platten mit und ohne Antibiotikum nicht mehr weiterwuchsen. Einzig von *S. flavopersicus*/pTST189.1 wuchsen einige stabile Kolonien heran. Das Plasmid trug das Gen *spcH* mit einer Frame-Shift-Mutation (Abb. 32).

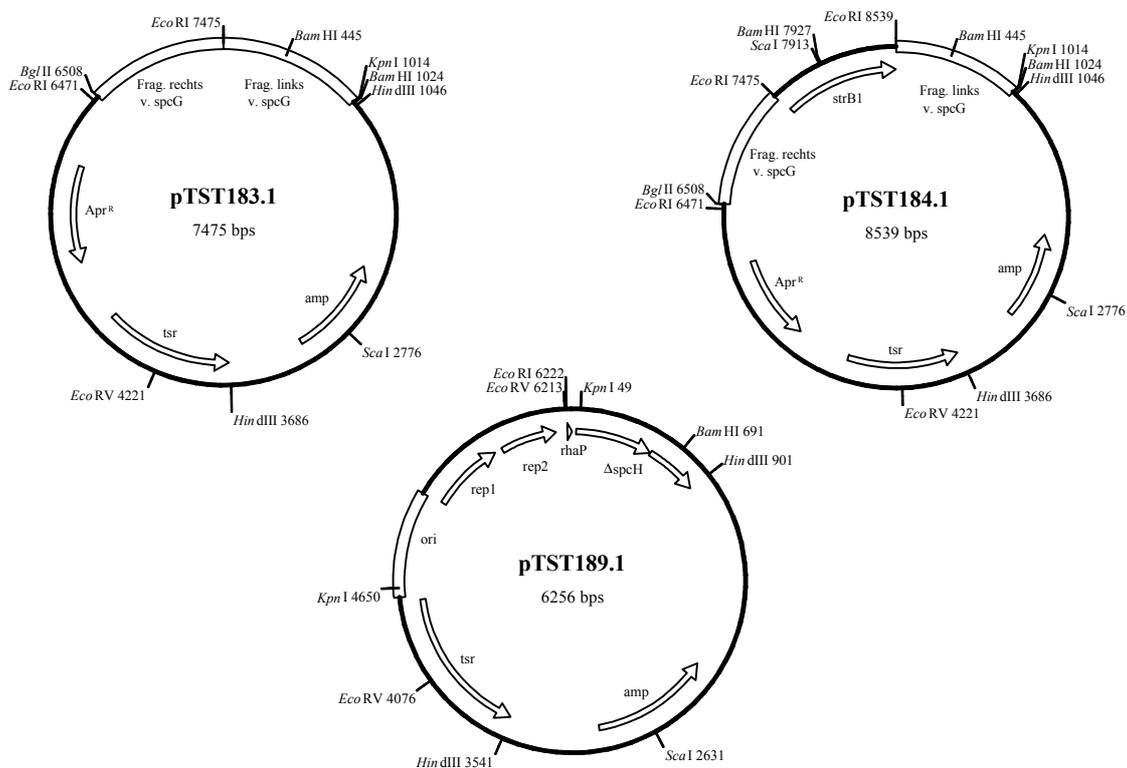


Abb. 32: Restriktionskarten der Inaktivierungsplasmide pTST183.1, pTST184.1 und pTST189.1. Nähere Beschreibung s. Text.

4.8.3 Untersuchung der Inaktivierungsmutanten von *S. flavopersicus*

Die Inaktivierungsplasmide pTST183.1, pTST184.1 und pTST189.1, mit denen als einzige stabile *S. flavopersicus*-Transformanten erhalten werden konnten, sollten unter Selektionsdruck in Chromosom integrieren. Nach erfolgreicher Rekombination der Gene sollte bei diesen Konstrukten der Vektoranteil wieder ausgeschnitten werden und damit die Resistenz verloren gehen. Dies sollte einmal zum Wildtyp-Zustand führen oder zu Mutanten. Die erhaltenen Kolonien von *S. flavopersicus*/pTST183.1, *S. flavopersicus*/pTST184.1 und *S. flavopersicus*/pTST189.1 wurden parallel auf HT-Platten mit und ohne Thiostrepton, *S. flavopersicus*/pTST183.1 und *S. flavopersicus*/pTST184.1 zusätzlich noch auf Platten mit Apramycin ausgestrichen. Alle Zellen wuchsen, z.T. nur schwach, aber dennoch auf den Thiostrepton- und Apramycin-Platten. Der Grund wurde darin vermutet, dass jeder Protoplast und die sich daraus entwickelnden Hyphen mehrere Chromosomen enthalten und die Integration der Plasmide auch nach Antibiotikaselektion nicht in alle Chromosomen erfolgt war bzw. nach Wegfall der Selektion der zweite Rekombinationsschritt in einigen der Chromosomen unterblieb und der Vektoranteil mit der Thiostrepton-Resistenz weiterhin integriert im Chromosom vorlag. In einem Protoplasten bzw. in den daraus entstehenden Hyphen könnten also 5 verschiedene Varianten des Chromosoms bzw. Plasmids vorliegen: das Wildtyp-Genom, bei dem nie eine Rekombination stattgefunden hat; das Wildtyp-Genom nach einer Integration und Exzision des Plasmids; das Genom noch mit Vektoranteil nach Integration des Plasmids; das Genom nach erfolgreicher zweiter Rekombination, die zur Exzision des Vektors und zum Austausch geführt hat sowie das nicht integrierte Plasmid. Eine Trennung der Chromosomen kann über Sporen erfolgen, in denen jeweils immer nur eine Kopie des Chromosoms vorliegt. Da *S. flavopersicus* allerdings nicht zur Sporulation angeregt werden konnte, wurde versucht, die verzweigten Myzelfäden zu trennen, um daraus Einzelkolonien zu gewinnen. Die nur schwach resistenten Bakterien wurden ausgewählt, mit Ultraschall behandelt, auf Einzelkolonien ausplattiert und zur Selektion auf Platten mit und ohne Thiostrepton ausgestrichen. Es wurden vier Klone von *S. flavopersicus*/pTST183.1, zwei Klone von *S. flavopersicus*/pTST184.1 und vier Klone von *S. flavopersicus*/pTST189.1 erhalten, die nur nach sehr langer Inkubationszeit etwas Wachstum auf den Antibiotikumhaltigen Platten zeigten.

Um festzustellen, ob es sich bei den Zellen um Mutanten oder den wiederhergestellten Wildtyp handelte, wurde chromosomale DNA aus den Bakterien isoliert und der Bereich, in dem die Rekombination stattgefunden haben sollte, über PCR amplifiziert. Durch das Plasmid

pTST189.1 wurde eine Frame-Shift-Mutation in das Gen *spcH* eingeführt, indem eine *AatII*-Schnittstelle in der Mitte des Gens deletiert worden war. Mit den Primern s2852 und s3457 wurde *spcH* vom Start- bis zum Stopp-Codon amplifiziert. Nach einer erfolgreichen Rekombination in der chromosomalen DNA einer Mutante sollte das PCR-Amplifikat nicht mehr von *AatII* geschnitten werden können, was bei einem der Klone zutraf, der als *S. flavopersicus* Δ H1 bezeichnet wurde. Mit pTST183.1 wurde das komplette Gen *spcG* deletiert. Das PCR-Amplifikat, das mit den Oligonukleotiden s3549 und s3550 erhalten wurde, sollte also um die Länge dieses Gens kürzer sein als bei der Kontrolle mit DNA von *S. flavopersicus*. Die Primer banden dabei im Bereich von 18.410 bp bzw. 19.580 bp innerhalb der Gesamtsequenz. Die Deletion konnte bei einer Mutante, *S. flavopersicus* Δ G1, nachgewiesen werden, allerdings war auf dem Agarosegel auch noch eine schwache Wildtyp-Bande zu erkennen. Mit Hilfe des Plasmids pTST184.1 sollte *spcG* gegen das Amidinotransferasegen *strB1* aus *S. griseus* ausgetauscht werden. Durch Auswahl eines geeigneten Restriktionsenzym konnte entschieden werden, welches Gen über die PCR mit den Primern s3549 und s3550 vervielfältigt wurde. Ein Verdau der PCR-Fragmente mit *Bam*HI, das nur innerhalb von *strB1* schneiden sollte, zeigte, dass in keinem der getesteten Klone *strB1* vorhanden war.

E. coli wurde mit der aus *S. flavopersicus* Δ G1 und *S. flavopersicus* Δ H1 isolierten Gesamt-DNA transformiert. Dabei erhielt man mit der DNA aus *S. flavopersicus* Δ H1 noch 8 Kolonien. Da in dieser Mutante ein instabiles Plasmid-Derivat vorhanden war, das nach einigen Zellteilungen verloren gehen oder aber integrieren sollte, ist zu vermuten, dass noch nicht genügend Generationen vergangen waren und in einigen Zellen noch freie Plasmide vorlagen. Diese wurden mit der Gesamt-DNA isoliert und konnten in *E. coli* selektioniert werden.

Die Mutanten *S. flavopersicus* Δ H1 und *S. flavopersicus* Δ G1 wurden in Fermentationsmedium angezogen und nach 11 Tagen Spectinomycin aus dem Kulturüberstand aufgereinigt. In einem Platten-Diffusionstest, bei dem Überstände während verschiedener Inkubationszeiten getestet wurden, erzeugte der Überstand von *S. flavopersicus* Δ G1 etwas kleinere Hemmhöfe als derjenige der Kontrolle *S. flavopersicus* und von *S. flavopersicus* Δ H1. Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte sowie die gereinigten Lyophilisate wurden ebenfalls in einem Bio-Assay getestet. Dabei zeigte das Konzentrat aus *S. flavopersicus* Δ G1 einen etwa um den Faktor 3 kleineren Hemmhof als die Kontrolle. Das Eluat von *S. flavopersicus* Δ H1 nach der Aufreinigung erzeugte keinen Hemmhof mehr (Tab. 16).

Tab. 16: Ergebnisse der Diffusionsassays mit Überständen von *S. flavopersicus* und der Mutanten *S. flavopersicus* Δ G1 und *S. flavopersicus* Δ H1 bei Anzucht in Fermentationsmedium.

Überstand von Inkubationsdauer [Tage]	<i>S. flavopersicus</i>		<i>S. flavopersicus</i> Δ G1		<i>S. flavopersicus</i> Δ H1	
	Hemmhöfe [cm] bei <i>S. lividans</i>		Hemmhöfe [cm] bei <i>S. lividans</i>		Hemmhöfe [cm] bei <i>S. lividans</i>	
	TK64	TK23	TK64	TK23	TK64	TK23
1	0,40	0,40	0,50	0,45	0,45	0,40
3	0,65	0,60	0,60	0,70	0,70	0,50
7	0,70	0,60	0,55	0,55	0,80	0,80
8	0,90	0,65	0,80	0,70	0,95	0,90
9	0,80	0,65	0,70	0,65	0,90	0,90
10	0,80	0,60	0,60	0,65	0,85	0,90
gereinigtes Lyophilisat (1:10 verdünnt)	0,95	0	0,30	0	0	0

Die Lyophilisate wurden ferner mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC analysiert. Auf der DC konnten bei beiden Klonen noch Spots erkannt werden, die den gleichen R_f -Wert wie Spectinomycin aufwiesen, aber sehr viel schwächer waren als die Kontrolle aus *S. flavopersicus* (Abb. 33). Vor allem mit dem Überstand von *S. flavopersicus* Δ H1 war der Spectinomycin-Fleck kaum und Dihydrospectinomycin war gar nicht nachzuweisen. Die HPLC-Elutionsdiagramme lieferten einen sehr hohen Hintergrund. Es konnten mit dem Eluat von *S. flavopersicus* Δ G1 ein größerer Peak, der Spectinomycin entspricht und ein kleinerer Dihydrospectinomycin-Peak identifiziert werden, bei *S. flavopersicus* Δ H1 trat kein Peak auf. Zusätzliche Versuche, homogene Mutanten über Protoplastierung zu erreichen, schlugen fehl. Auch in den regenerierten Zellen waren weiterhin Wildtyp und mutiertes Gen vorhanden.

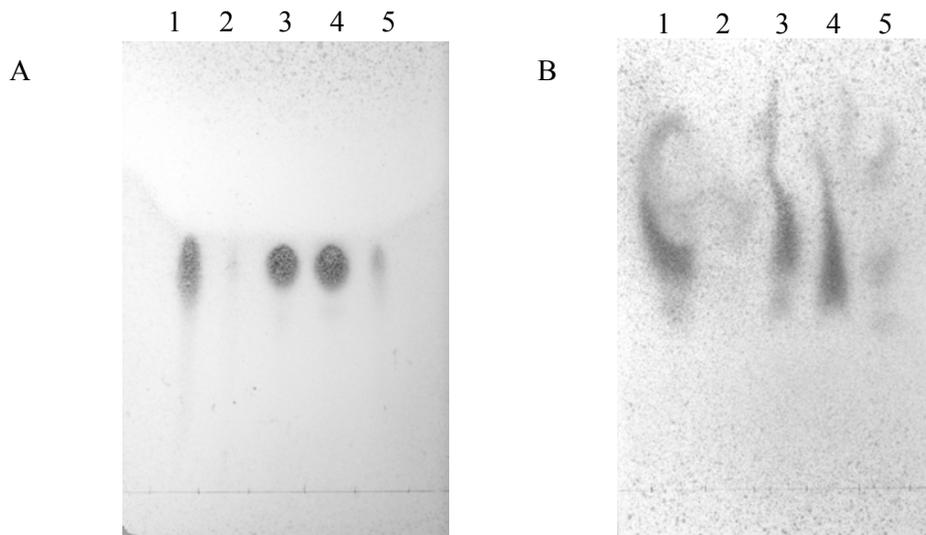


Abb. 33: Dünnschichtchromatogramm der aufgereinigten Überstände von *S. flavopersicus* (1), *S. flavopersicus* Δ H1 (2), *S. flavopersicus* Δ G1 (5) und von Spectinomycin (3) und Dihydro-spectinomycin (4). Laufmittel: Eisessig : Pyridin : Isopropanol : H₂O (A) und 10 % KH₂PO₄ (B).

4.9 Netropsin-Resistenz und -Biosynthese in verschiedenen Streptomyceten

S. netropsis DSM40259 wurde bereits als Netropsin-Produzent beschrieben (Finlay et al., 1951). Da dieser Stamm viele Gemeinsamkeiten mit *S. flavopersicus* NRRL B-2820 aufwies, z.B. die Morphologie oder das Restriktionsmuster der chromosomalen DNA (s. 4.1), wurde vermutet, dass es sich bei der zweiten antibiotisch wirkende Substanz, die neben Spectinomycin in Kulturen von *S. flavopersicus* vorhanden war, um Netropsin handeln könnte. Des Weiteren unterstützt das Wirkspektrum des Antibiotikums und einige andere im Folgenden aufgeführten Untersuchungsergebnisse diese Hypothese. Wie auch Netropsin hemmte der Überstand von *S. flavopersicus* und *S. netropsis* DSM40259 das Wachstum des Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae*. Netropsin ist relativ instabil, was auch bei einem Stabilitätstest mit dem Überstand von *Sm. baldaccii*, der in Fermentationsmedium angezogen wurde, beobachtet werden konnte. So nahm nach Inkubation des Überstandes für zwei Tage bei 37°C die Hemmhof-Größe bei dem Spectinomycin-resistenten Stamm TK23 von etwa 0,6 cm auf 0,1 cm ab, während sie beim Spectinomycin-sensitivem TK64 konstant blieb. In den aufgereinigten Kulturbrühen der Spectinomycin-Produzenten konnte in den ersten Elutionsfraktionen jeweils noch eine andere antibiotische Aktivität bemerkt werden. Da

Netropsin ebenfalls an den Kationenaustauscher Amberlite bindet, könnte es sich also um Netropsin handeln. Ferner wurde festgestellt, dass die Stämme *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *S. netropsis* DSM40093, *Sm. baldaccii* ATCC19756 und *S. netropsis* DSM40259 im Diffusionsassay Resistenz gegenüber mindestens 20 µg Netropsin aufwiesen.

Die Produktion des zweiten Antibiotikums durch *S. flavopersicus* erwies sich als sehr ungünstig für einige Untersuchungen zur Spectinomycin-Biosynthese, -Resistenz und -Detektion. Daher wäre es von erheblichem Vorteil, Mutanten von *S. flavopersicus*, die dieses Antibiotikum nicht mehr produzieren, oder resistente Teststämme für den Hemmhof-Assay zur Verfügung zu haben. Ferner wäre es auch ohne diesen Hintergrund interessant, die Biosynthese und die Resistenzmechanismen für Netropsin, über die bislang nichts bekannt ist, aufzuklären. Da es sich um ein Peptid-Antibiotikum handelt, kann angenommen werden, dass an seiner Synthese eine Peptid-Synthetase beteiligt ist.

4.9.1 Suche nach Peptid-Synthetasegenen im Genom von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 und *S. netropsis* DSM40259

Peptid-Antibiotika werden in den meisten Fällen nicht-ribosomal mit Hilfe von Peptid-Synthetasen synthetisiert. Dabei handelt es sich um große, multi-funktionelle Enzyme, die aus mehreren Modulen aufgebaut sind. Die Module wiederum umfassen alle eine A-Domäne (adenylation), eine T-Domäne (thiolation) und eine C-Domäne (condensation), die die Knüpfung der Peptidbindung katalysieren. Zusätzlich können noch Domänen vorhanden sein, die zur Modifikation der Aminosäuren beitragen. Die Anzahl und die Reihenfolge der Module spiegelt den Aufbau des synthetisierten Peptids wieder, so dass die Peptid-Synthetase zur Synthese von Netropsin, das drei Peptidbindungen aufweist, auch drei Module besitzen müsste. Die einzelnen Domänen zeigen oft große Homologie und enthalten einige konservierte Regionen.

Aus den Datenbanken wurden mehrere Aminosäuresequenzen von Peptid-Synthetasen aus Streptomyceten und anderen Actinomyceten (*S. chrysomallus*, *S. coelicolor*, *Nocardia lactamdurans*, *Amycolatopsis orientalis* und *Mycobacterium avium*) entnommen, in die einzelnen Module unterteilt und ein „Multiple“-Sequenzvergleich mit dem Programm Blocks (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA) durchgeführt. Besonders konservierte Bereiche wie die ATP-Bindedomänen wurden in alle möglichen Nukleotidsequenzen übersetzt und daraus zwei degenerierte Primer s3034 und s3035 abgeleitet, die all diese Sequenzen umfassten. Zur Vereinfachung der Klonierung wurde an

die Oligonukleotide noch eine *EcoRI*- bzw. *XbaI*-Restriktionsschnittstelle angefügt. Nach einer PCR sollte ein etwa 300 bp großes Fragment erhalten werden. Außerdem wurden mit dem CODEHOP- (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) Programm die drei weiteren Primer s3263 (revers), s3264 und s3266 abgeleitet. Diese bestanden aus einer kürzeren 3'-degenerierten Kernregion, die zu Beginn der Amplifikation an das Template binden sollte, und einer längeren Konsensus-, „Clamp“-Region, die später in der PCR zu einer korrekten Bindung an das Produkt beiträgt (Rose et al., 1998). Mit den Oligonukleotiden s3263 + s3264 wurde ein PCR-Produkt von etwa 480 bp, mit s3263 + s3266 von 1,1 kb erwartet.

Eine PCR mit chromosomaler DNA von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 und *S. netropsis* DSM40259 und den degenerierten Primern s3034 und s3035 lieferte auch bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen jeweils sehr viele Amplifikate im Bereich von 250 bp bis 1,4 kb. Die große Anzahl der gefundenen Amplifikate deckte sich mit dem Befund von Sosio et al., (2000). In Southern Blot-Hybridisierungsexperimenten mit chromosomaler DNA von 19 verschiedenen Actinomyceten und zwei Oligonukleotiden, die aus konservierten Bereichen von Peptid-Synthetasegenen abgeleitet wurden, fanden sie pro Stamm bis zu 29 Banden. Positive Signale traten auch bei Stämmen auf, von denen bislang nicht bekannt war, dass sie Oligopeptide synthetisieren konnten (Sosio et al., 2000). Auffallend war jedoch, dass mit den Primern s3034 und s3035 nicht nur Amplifikate in der erwarteten Größe von etwa 300 bp auftraten, sondern auch sehr viele längere Fragmente. Die PCR-Amplifikate, die mit chromosomaler DNA von *S. netropsis* DSM40259 erhalten wurden, wurden über die eingebrachten Restriktionsschnittstellen in den Shuttlevektor pTST108.2 ligiert (Abb. 31) und ansequenziert. Von 27 untersuchten Plasmiden enthielten 17 ein unterschiedliches Insert, aber nur zwei davon zeigten bei Datenbank-Suchen Ähnlichkeit zu Peptid-Synthetasegenen. Sie wurden mit pTST108Pep42 und pTST108Pep58 bezeichnet.

Amplifikationen mit den CODEHOP-Primern s3263 und s3266 aus der chromosomalen DNA von *S. netropsis* DSM40259 wurden im Rahmen einer Studienarbeit von Rüdiger Alt durchgeführt. Die mit dem Computer-Programm abgeleiteten Oligonukleotide erwiesen sich spezifischer als die Primer s3034 und s3035. So traten neben dem erwarteten Fragment bei 1,1 kb nur zwei zusätzliche scharfe Banden auf. Ein Hintergrund-Schmier war dennoch sichtbar. Das gewünschte Amplifikat wurde in den pCR[®]-BlundII-TOPO[®]-Vektor (Invitrogen) ligiert und die Inserts von 21 erhaltenen Plasmiden pRA1.1 - 1.21 ansequenziert. Dabei konnten 6 unterschiedliche Fragmente gefunden werden, die alle Identität zu Peptid-Synthetasen aufwiesen.

S. netropsis DSM40259 und *S. flavopersicus* wurden mit den Plasmiden pTST108Pep42, pTST108Pep58 und pRA1, deren Inserts Homologie zu Peptid-Synthetasegenen zeigten, transformiert. Dabei handelte es sich um einen Suizidvektor mit einem Thiostrepton-Resistenzgen und um ein pUC-Derivat (pRA1) mit einem Kanamycin-Resistenzgen, die über homologe Rekombination der Inserts ins Chromosom integrieren sollten. Der vorhandene Vektoranteil sollte dann durch eine Unterbrechung des Gens zu dessen Inaktivierung führen. Codiert eines der Inserts ein Stück der Peptid-Synthetase zur Synthese von Netropsin, sollte es zu einem Ausbleiben der Netropsin-Produktion in den entsprechenden Transformanten kommen. Ein Resultat blieb jedoch aus, da keine Transformanten erhalten werden konnten (s. 4.8.2).

4.9.2 Screening einer Genbank von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 nach Peptid-Synthetasegenen

Um die Gesamtsequenz der gefundenen Peptid-Synthetase-Fragmente und eventuell benachbarter weiterer Netropsin-Biosynthesegene oder des Resistenzgens zu erhalten, wurde die unter Kapitel 4.2.2 beschriebene Genbank von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 wiederverwendet. *E. coli* RR1 wurde mit dem Genbank-Phagenlysat infiziert und die erhaltenen Kolonien in LB-Medium mit Ampicillin angezogen. Danach wurden je zehn Kolonien vereinigt und daraus die Cosmide mit einer modifizierten Methode nach Lee & Rasheed (1990) isoliert (s. 3.6.1.2). Von den beiden Amplifikaten pTST108Pep42 und pTST108Pep58, die mit den Oligonukleotiden s3034 und s3035 erhalten wurden, wurden spezifische Primer s3140 und s3141 bzw. s3142 und s3143 im Abstand von je etwa 300 bp abgeleitet. In LightCycler-PCR-Ansätzen wurden diese und als Template die 10 jeweils gepoolten Cosmide eingesetzt. Dabei konnte nach 470 untersuchten Cosmiden mit jedem Primerpaar ein positives Signal nachgewiesen werden. Die Reaktion wurde mit den zehn in den Proben vorhandenen Cosmiden einzeln wiederholt, und es wurden somit zwei Cosmide Cos360 und Cos462 erhalten. Damit wurde zum einen versucht *S. flavopersicus* zu transformieren, was wiederum nicht möglich war, zum anderen *S. lividans* TK64. Die regenerierten TK64-Transformanten wurden durch Ausstreichen auf HT-Platten mit 10 µg/ml Netropsin auf ihre Netropsin-Resistenz getestet. Es wuchsen jedoch keine Kolonien an, was darauf hindeutete, dass sich auf den Cosmiden kein Netropsin-Resistenzgen befand. Ferner wurde das Insert der Cosmide Cos360 und Cos462 in pIC19H subkloniert. Von Cos360 wurden 15 der Subklone pTST120 - 125, pTST127, pTST130 und pTST131 ansequenziert, von denen einige identisch waren. Nur

bei den zwei Plasmiden pTST127.2 und pTST127.3 konnte an einem Sequenzende des Inserts eine Identität zu Peptid-Synthetasen gefunden werden. Auf den weiteren subklonierten DNA-Bereichen aus Cos360 konnten keine Ähnlichkeiten zu abgeleiteten Proteinen gefunden werden, die eventuell an der Biosynthese von Netropsin beteiligt sein könnten. Daher wurde das Cosmid nicht weiter untersucht. Entsprechend wurden die Inserts der Subplasmide pTST133 - 139 von Cos462 analysiert. Von 12 Inserts zeigte nur das von pTST139.24 Ähnlichkeit zu Peptid-Synthetasegenen, die jedoch lediglich 240 bp umfasste. Aus diesem Grunde wurde versucht, weitere Genbankcosmide, die Peptid-Synthetasen codieren, zu identifizieren.

Da die spezifischen Primer s3140 - s3143 aus der DNA-Sequenz von *S. netropsis* DSM40259 abgeleitet wurden, die Genbank aber chromosomale DNA von *S. flavopersicus* umfasste, wurde die gleiche Screening-Methode über LightCycler-PCR mit den degenerierten CODEHOP-Oligonukleotiden s3263 und s3264 durchgeführt. Auf diese Weise wurden 1.324 Cosmide untersucht, von denen 17 positive Signale lieferten und somit eventuell ein Peptid-Synthetasegen trugen. Die Cosmide wiesen in Restriktionsverdaus unterschiedliche Bandenmuster auf, d.h. sie waren nicht identisch. Nach Transformation von TK64 waren die erhaltenen Zellen nicht Netropsin-resistent. Aufgrund der großen Anzahl an Cosmiden und der fehlenden Netropsin-Resistenz wurden die Cosmide nicht näher untersucht.

4.9.3 Suche nach den Netropsin-Resistenzgenen im Genom von *S. flavopersicus* NRRL B-2820

Da die Suche nach den Biosynthesegenen von Netropsin, d.h. vornehmlich nach einem Peptid-Synthetasegen, zu keinem Erfolg führte, was vor allem auf die große Anzahl an verschiedenen Peptid-Synthetase-Modulen, die im Genom von *S. flavopersicus* und *S. netropsis* DSM40259 codiert waren, zurückzuführen war, sollte versucht werden, das Netropsin-Resistenzgen bzw. -gene zu identifizieren. Wenn wie zu erwarten die Biosynthese- und Resistenzgene geclustert vorliegen, sollten damit auch die Synthesegene erfasst werden.

4.9.3.1 Isolierung von Netropsin-resistenten *S. lividans* TK23-Transformanten

Chromosomale DNA von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 wurde mit *Xho*II partial verdaut und in den *Bam*HI-geschnittenen positiven Selektionsvektor pFIS251b inseriert (Abb. 34). Da die Vermutung nahe lag, dass es sich bei der Netropsin-Resistenz eventuell um Membranproteine

handeln könnte, wurde mit pFIS251b ein Vektor gewählt, der in Streptomyeten in geringer Kopienzahl vorliegt. Das Shuttleplasmid ist ein Derivat des *E. coli*-Vektors pJOE773 und besitzt den Replikationsursprung und die Stabilitätsregion von SCP2* sowie ein Thiostrepton-Resistenzgen. *E. coli* JM109 wurde mit den Ligationsansätzen transformiert, der entstandene Bakterienrasen abgeschwemmt und aus den vereinigten Kolonien Plasmide isoliert. Insgesamt wurden so Plasmide aus etwa 4.000 *E. coli*-Kolonien erhalten. Zur Kontrolle wurden einige Plasmide aus Einzelkolonien isoliert und verdaut. Dabei konnte gezeigt werden, dass in allen Plasmiden ein Insert vorhanden und bei über der Hälfte mehr als 4 kb groß war. *S. lividans* TK23 wurde mit diesem Plasmidgemisch transformiert, und Thiostrepton-resistente Kolonien wurden selektioniert. Ungefähr 9.000 erhaltene Transformanten wurden auf HT-Platten mit 10 µg/ml Netropsin replikaplatziert, von denen nach zwei Tagen Inkubation eine Netropsin-resistente Kolonie anwuchs. Aus den Zellen wurde das Plasmid pTST264 isoliert und retransformiert in TK23. Die Transformanten erwiesen sich erneut als Netropsin-resistent, was darauf hindeutete, dass es sich nicht um eine spontane Mutation handelte, sondern dass die Resistenz tatsächlich auf dem Plasmid vorlag.

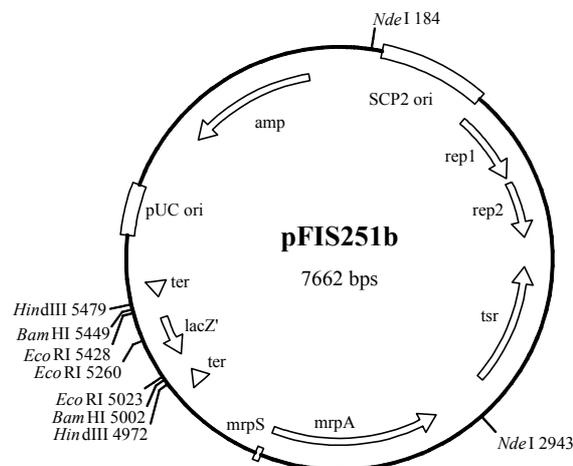


Abb. 34: Restriktionskarte des Vektors pFIS251b.

4.9.3.2 Analyse des Fragments mit den Netropsin-Resistenzgenen aus *S. flavopersicus* NRRL B-2820

Das Insert von pTST264 wurde subkloniert und sequenziert. Es umfasste 9.379 bp. Die Sequenzierung sowie Homologie-Suchen und Datenbank-Vergleiche wurden unterstützt

durch eine Studienarbeit von Sarah Himbert. Durch eine Southern Blot-Analyse wurde allerdings festgestellt, dass sich das Insert eventuell aus zwei verschiedenen Genomfragmenten zusammensetzte. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen auf ein 5,9 kb-großes *EcoRV/BamHI*-Subfragment konzentriert, das die Resistenz enthielt und so auch im Chromosom von *S. flavopersicus* vorhanden war. Mit Hilfe von Datenbank-Suchen und Homologie-Vergleichen wurden zwei Gene mit einer Länge von 1.556 bp bzw. 1.773 bp gefunden, die ABC-Transporter codierten und als die für Netropsin-Resistenz verantwortlichen Enzyme angesehen werden konnten. Die Identität zu ABC-Typ „Multidrug“-Transportsystemen war dabei am höchsten. Die ORFs wurden als *netP1* und *netP2* bezeichnet. Die Gene lagen im Abstand von 2 Basen sehr nahe beieinander, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ihre Transkription in Form einer polycistronischen mRNA von einem Promotor vor *netP1* erfolgt. Der Netropsin-Resistenzmechanismus beruht somit wahrscheinlich auf einem aktiven Export des Antibiotikums durch die ABC-Transporter aus der Zelle. Anschließend an *netP2* fand sich ein unvollständiger offener Leserahmen ORF* von etwa 1 kb, dessen Produkt Homologie zu Peptid-Synthetasen aufwies (Abb. 35). Bei der Suche nach konservierten Proteinregionen in diesem abgeleiteten Protein wurde das Konsensus-Motiv einer AMP-Bindestelle gefunden. Ein solcher Bereich ist in der A-Domäne jeder Peptid-Synthetase, d. h. der ersten Domäne in einem Modul, zu finden. Dies deutete darauf hin, dass auch die Netropsin-Biosynthesegene und Resistenzgene in einem Cluster vorliegen und dass die unvollständige Peptid-Synthetase an der Synthese von Netropsin beteiligt sein könnte.

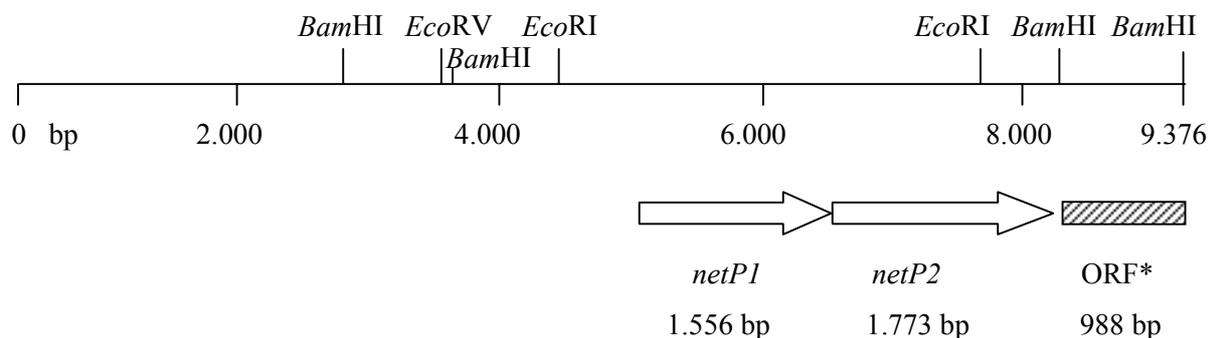


Abb. 35: Restriktionskarte des Inserts von pTST264 mit den Netropsin-Resistenzgenen *netP1* und *netP2* und eines unvollständigen potentiellen Peptid-Synthetasegens ORF*.

4.9.3.3 Datenbank-Recherche mit den Sequenzen der Netropsin-Resistenzgene *netP1* und *netP2*

Der charakteristische Aufbau von ABC-Transportern aus einer Transmembran-Domäne und einer ATP-Bindedomäne fand sich bei der Suche nach konservierten Bereichen sowohl in NetP1 als auch in NetP2 wieder. Die etwa 150 Aminosäuren umfassende, hydrophobe Transmembranregion lag bei beiden Proteinen am N-terminalen Ende. Mit dem Programm TMHMM (CBS, Dänemark) konnten in NetP2 sechs Transmembran-Helices gefunden werden, was der in ABC-Transportern üblichen Anzahl entsprach. In NetP1 wurden mit demselben Programm keine Transmembran-Helices lokalisiert, während mit TMPred (EMBnet-CH) fünf solcher Bereiche ausgemacht wurden. Im Allgemeinen sind die Transmembranregionen der Exporter nicht sehr konserviert, sondern zeichnen sich vor allem durch einen großen Anteil an hydrophoben Aminosäuren aus.

Die ATP-Bindedomänen im C-terminalen Bereich der Exportproteine erstreckten sich über einen Bereich von ungefähr 200 Aminosäuren, waren hochkonserviert und wiesen untereinander etwa 38 % Identität und zu den ATP-Bindestellen anderer Transporter bis zu 58 % Identität auf. Des Weiteren waren in dieser Region die beiden Konsensus-Sequenzen des Walker A-Motivs („P-Loop“) GHS₁GHGKST und des Walker B-Motivs VLLADE sowie die „ABC-Signature“-Sequenz LSGG(XX)Q vorhanden, die für eine Bindung des Nukleotids verantwortlich sind bzw. mit der Phosphatgruppe des Nukleotids interagieren (Abb. 36).

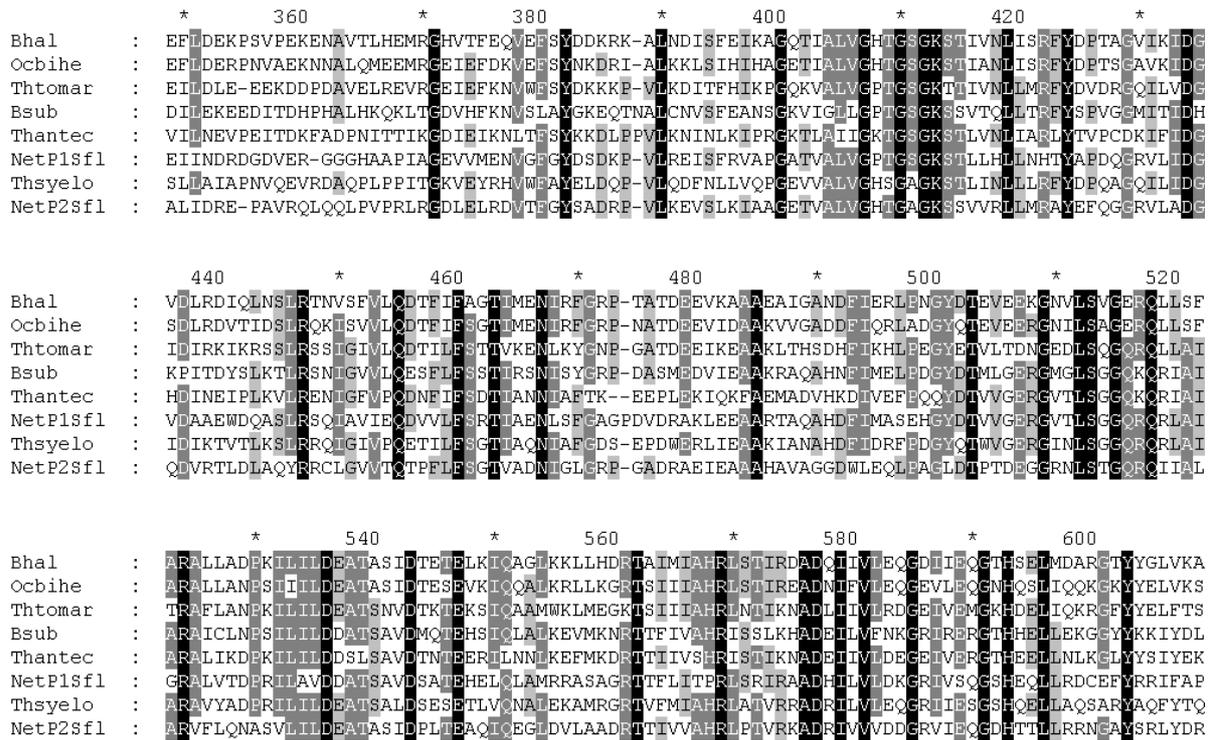


Abb. 36: „Multiple“-Sequenzvergleich der ATP-Bindedomänen von NetP1, NetP2 und anderer ABC-Transporter. Verglichen wurden die ABC-Transporter aus *B. halodurans* (Bhal, BAB07610), *B. subtilis* (Bsub, AAC24906), *Oceanobacillus iheyensis* (Ocbihe, BAC13361), *S. flavopersicus* (Sfl), *Thermoanaerobacter tecongensis* (Thantec, AAM24093), *Thermosynechococcus elongatus* (Thsyelo, BAC08514) und *Thermotoga maritima* (Thtomar, AAD35376). Die Accession-Nummern sind in Klammern angegeben. Als konservierte Bereiche finden sich das Walker A-Motiv (AS 407 - 415), die „ABC-Signatur“-Sequenz (AS 512 - 518) und das Walker B-Motiv (AS 573 - 578) wieder.

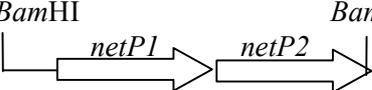
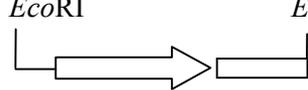
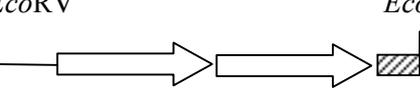
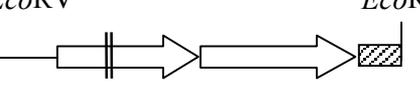
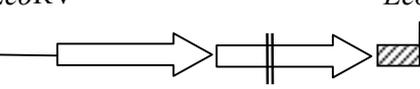
4.9.3.4 Untersuchungen zum Zusammenwirken der beiden Netropsin-Resistenz-Transporter NetP1 und NetP2

ABC-Transporter bestehen im Allgemeinen aus je zwei Transmembran- und zwei ATP-Bindedomänen, die von einem oder zwei getrennten Genen codiert werden können. Die beiden Gene liegen dann in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Zum Teil finden sich auch Gene, die nur je eine Domäne umfassen. Es wird davon ausgegangen, dass die einzeln exprimierten Protein-Untereinheiten sich zum aktiven ABC-Transporter-Komplex zusammen-

lagern und Hetero- oder Homodimere bilden. Bislang ist kein Transporter bekannt, der aus nur einer Transmembran-Domäne und einer ATP-Bindedomäne besteht (Higgins, 1992).

Um zu beweisen, dass die gefundenen Gene *netP1* und *netP2* im Genom von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 Resistenz gegenüber Netropsin vermitteln, und um festzustellen, ob dafür eines der beiden Gene ausreicht, wurden verschiedene Inaktivierungskonstrukte hergestellt. Damit sollte ferner ermittelt werden, ob der Transporter aus zwei Untereinheiten NetP1 bzw. NetP2 oder einem Komplex beider Untereinheiten besteht. Auf eine getrennte Expression der Gene wurde vorerst verzichtet, da vor *netP2* keine Promotorregion ausgemacht werden konnte. Aus dem Plasmid pTST264 wurden die beiden Transportgene als *Bam*HI-, *Eco*RI- und *Eco*RV-Fragment in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen Shuttlevektor pFIS251b ligiert (Abb. 35). Dabei wurden die Fragmente so groß gewählt, dass vor *netP1* noch mindestens 520 bp lagen, und somit der Promotor ebenfalls vorhanden sein sollte. Das Gen *netP2* wurde allerdings am 3'-Ende zum Teil um 90 bp bzw. 701 bp deletiert. Des Weiteren wurde eine „in frame“-Deletion in *netP1* eingeführt, indem ein 345 bp-*Afe*I-Fragment entfernt wurde. Dadurch sollte *netP1* inaktiviert werden, ohne dass die Expression von *netP2* gestört wurde. In einem weiteren Derivat wurde durch Auffüllen der *Not*I-Schnittstelle mit 4 bp durch das Klenow-Enzym innerhalb von *netP2* eine Mutation eingeführt, die zu einer Verschiebung des Leserasters des Gens führen sollte. Der Bereich wurde sequenziert, um die Änderung zu überprüfen. Die entstandenen Plasmide und ihre Deletionen sind in Tabelle 17 wiedergegeben.

Tab. 17: Plasmid-Derivate zur Inaktivierung der Netropsin-Resistenzgene *netP1* und *netP2*.

Plasmid	Insertgröße	Insert*	Mutation
pTST220.1	4.721 bp		Deletion von <i>netP2</i> um 90 bp am 3'-Ende
pTST228.1	3.297 bp		Deletion von <i>netP2</i> um 701 bp am 3'-Ende
pTST283.2	5.918 bp		-
pTST288.2	5.573 bp		„in frame“-Deletion in <i>netP1</i> durch Deletion eines 345 bp- <i>AfeI</i> -Fragments
pTST293.1	5.922 bp		Leserasterverschiebung in <i>netP2</i> durch Auffüllen einer <i>NotI</i> -Schnittstelle

*: Zur Insertion wurden die ursprünglichen Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'-Ende verwendet. Nur die *EcoRV*-Schnittstellen am 3'-Ende stammen aus der Linker-Sequenz des Vektors.

S. lividans TK23 wurde mit den verschiedenen Plasmid-Derivaten transformiert und die erhaltenen Zellen auf HT-Platten mit 10 µg/ml Netropsin replikaplattiert. Von *S. lividans* TK23/pTST220.1 und TK23/pTST283.2 wuchsen gleich viele Kolonien, wie auf den Ursprungsplatten vorhanden waren, auch auf den Netropsin-haltigen Platten an, während in den anderen Fällen die Transformanten wie der Kontrollstamm ohne Plasmid Netropsin-sensitiv waren.

In einem weiteren Test wurde versucht, die minimale Hemmkonzentration von Netropsin auf die Stämme zu bestimmen. Dazu wurden je 10⁵ Sporen in Soja-Mannitol-Medium mit einer exponentiell fallenden Netropsin-Konzentration von 40 µg/ml bis 0,31 µg/ml angeimpft und ihr Wachstum über 7 Tage verfolgt. Eine Wachstumskurve über die optische Dichte wie bei *E. coli* üblich konnte aufgrund der Myzelfäden der Streptomyceten nicht aufgenommen werden, so dass anhand der Menge des Zellmaterials im Kulturröhrchen die Vermehrung abgeschätzt werden musste. Tabelle 18 vergleicht das Wachstum der Stämme nach einem und zwei Tagen Inkubation, während in Tabelle 19 zusammengefasst wurde, bis zu welcher Netropsin-Konzentration noch ein Wachstum zu verzeichnen war. *S. lividans* TK23/

pTST220.1 und TK23/pTST283.2, die auf den Netropsin-Replikaplaten anwuchsen, vermehrten sich auch bei den hohen Konzentrationen sofort. Auffallend war jedoch, dass die anderen Stämme zwar zuerst gehemmt wurden, aber im Vergleich zu TK23 ohne Plasmid nach einigen Tagen auch die höheren Netropsin-Konzentrationen tolerierten.

Tab. 18: Wachstum von *S. lividans* TK23 und verschiedenen *netP1*- bzw. *netP2*-Inaktivierungsmutanten in Soja-Mannitol-Medium mit verschiedenen Netropsin-Konzentrationen nach einem Tag (1 d) und zwei Tagen (2 d).

Netropsin-Konzentration [µg/ml]	Wachstum von											
	<i>S. lividans</i> TK23		<i>S. lividans</i> TK23/pTST220.1		<i>S. lividans</i> TK23/pTST228.1		<i>S. lividans</i> TK23/pTST283.2		<i>S. lividans</i> TK23/pTST288.2		<i>S. lividans</i> TK23/pTST293.1	
	1 d	2 d	1 d	2 d	1 d	2 d	1 d	2 d	1 d	2 d	1 d	2 d
40	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
20	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
10	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-: kein Wachstum; +: Wachstum.

Tab. 19: Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von Netropsin auf *S. lividans* TK23 und verschiedene *netP1*- bzw. *netP2*-Inaktivierungsmutanten.

Inkubation [Tage]	Wachstum nachweisbar ab einer Netropsin-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] bei					
	<i>S. lividans</i> TK23	<i>S. lividans</i> TK23/ pTST220.1	<i>S. lividans</i> TK23/ pTST228.1	<i>S. lividans</i> TK23/ pTST283.2	<i>S. lividans</i> TK23/ pTST288.2	<i>S. lividans</i> TK23/ pTST293.1
1	1,25	40	10	40	5	5
2	2,5	40	20	40	20	20
3	2,5	40	20	40	40	20
4	10	40	40	40	40	40
7	10	40	40	40	40	40

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde noch ein Agarplatten-Diffusionsassay durchgeführt. Je 10^5 Sporen wurden auf HT-Platten ausgestrichen und in eingestanzte Löcher Netropsin-Lösungen verschiedener Konzentrationen gegeben. Die Hemmhöfe wurden nach 1 - 4 Tagen Inkubation bei 30°C vermessen (Tab. 20). Es zeigten sich bei allen Stämmen etwa gleich große Hemmhöfe. Bei TK23/pTST220.1 und TK23/pTST283.2 war ebenfalls eine Inhibitionszone zu erkennen, innerhalb dieser waren allerdings schon nach einem Tag viele kleine Kolonien vorhanden, die nach vier Tagen Inkubation den gesamten Hemmhofbereich ausfüllten. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Netropsin-Resistenz erst nach dem Auskeimen der Sporen exprimiert wird. Die ausplattierten Sporen erwiesen sich somit als Netropsin-sensitiv, und nach der Synthese der Membranproteine wuchsen TK23/pTST220.1 und TK23/pTST283.2 innerhalb der zuerst vorhandenen Hemmzonen. Die gemessenen Hemmhöfe blieben bei den anderen Stämmen auch nach längerer Inkubationsdauer konstant.

Tab. 20: Ergebnisse der Hemmhof-Tests zum Einfluss von Netropsin auf *S. lividans* TK23 und verschiedene *netP1*- bzw. *netP2*-Inaktivierungsmutanten. Die Hemmzonen wurden nach einem (1 d) und nach 4 Tagen (4 d) Inkubation gemessen.

	Hemmhöhe [cm] bei einer Netropsin-Konzentration von											
	50 µg		30 µg		10 µg		5 µg		1 µg		0,1 µg	
	1 d	4 d	1 d	4 d	1 d	4 d	1 d	4 d	1 d	4 d	1 d	4 d
<i>S. lividans</i> TK23	0,85	0,90	0,70	0,75	0,55	0,60	0,45	0,45	0,25	0,25	0	0
<i>S. lividans</i> TK23/ pTST220.1	0,80 *	0,15 *	0,65 *	0,10 *	0,35 *	0,10 *	0,35 *	0,05 *	0,15 *	0	0	0
<i>S. lividans</i> TK23/ pTST228.1	0,75	0,75	0,60	0,50	0,50	0,45	0,35	0,30	0,15	0,10	0	0
<i>S. lividans</i> TK23/ pTST283.2	0,80 *	0,15 *	0,60 *	0,10 *	0,45 *	0,10 *	0,35 *	0,10 *	0,20 *	0	0	0
<i>S. lividans</i> TK23/ pTST288.2	0,80	0,75	0,60	0,60	0,50	0,45	0,40	0,45	0,20	0,15	0	0
<i>S. lividans</i> TK23/ pTST293.1	0,75	0,75	0,60	0,60	0,50	0,50	0,40	0,40	0,20	0,15	0	0

* Wachstum innerhalb der Hemmzone.

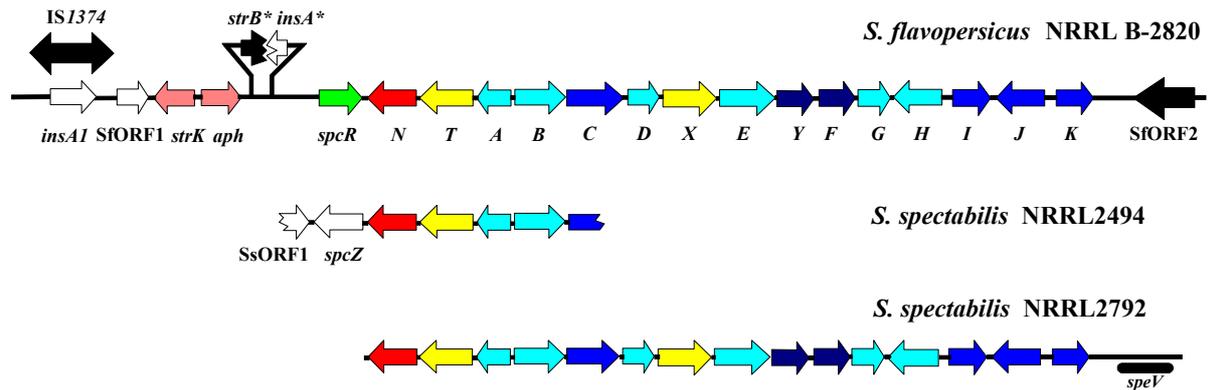
5 Diskussion

5.1 Vergleich der Spectinomycin-Biosynthese-Gencluster aus *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *S. spectabilis* NRRL2494 und *S. spectabilis* NRRL2792

Neben dem in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten Streptomyceten *S. flavopersicus* NRRL B-2820 sind auch die Stämme *S. spectabilis* und *S. hygroscopicus* als Spectinomycin-Produzenten bekannt. Die Sequenz des Spc-Genclusters aus *S. spectabilis* NRRL2494 und *S. spectabilis* NRRL2792 liegt teilweise bzw. vollständig vor.

Aus *S. spectabilis* NRRL2494 wurde das Spectinomycin-Resistenzgen kloniert, indem eine in *S. lividans* konstruierte Genbank nach Spectinomycin-resistenten Klonen selektioniert wurde. Dabei wurde ein 6,7 kb Fragment erhalten und sequenziert. Der Bereich umfasst die bei *S. flavopersicus* *spcN* - *spcB* benannten Gene vollständig, sowie das Gen *spcC* unvollständig, und wurde in der Genbank unter der Accession-Nummer AF170704 hinterlegt (Stumpp et al., 2002).

Das Spc-Cluster aus *S. spectabilis* NRRL2792 wurde von Hyun und Mitarbeitern kloniert (Hyun et al., 2000). Dabei wurden aus konservierten Bereichen von dTDP-Glucose-Synthasegenen spezifische Primer abgeleitet, da erwartet wurde, dass eine dTDP-Glucose-Synthase an der Synthese der Actinospectose-Untereinheit beteiligt ist. Mit den Primern wurde eine Cosmid-Genbank durchsucht und etwa 45 kb isoliert, wovon rund 20 kb sequenziert wurden. Diese Region beinhaltet die Gene *spcN* bis *spcK*, die allerdings z.T. anders benannt wurden. Die Sequenzen einiger Gene wurden in der Datenbank abgelegt. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur Aktivität der *myo*-Inositol-Monophosphatase und der dTDP-Glucose-Synthase durchgeführt (Jo et al., eingereicht). Über das Spc-Biosynthese-Cluster aus *S. hygroscopicus* ist nichts bekannt. Abbildung 37 zeigt die Genkarten der sequenzierten Bereiche aller drei Stämme.



<i>insA1</i>	Transposase	<i>spcN</i>	Spectinomycin-	<i>spcF</i>	Glykosyltransferase
<i>SfORF1</i>	Acetyltransferase		Phosphotransferase	<i>spcG</i>	Methyltransferase
<i>strK</i>	Streptomycin-6-	<i>spcT</i>	Transportprotein	<i>spcI</i>	Keto-Isomerase
	Phosphat-	<i>spcA</i>	<i>myo</i> -Inositol-	<i>spcJ</i>	4,6-Dehydratase
	Phosphatase		Monophosphatase	<i>spcK</i>	Thymidyl- transferase
<i>aph</i>	Streptomycin-	<i>spcB/H</i>	Dehydrogenase		
	Phosphotransferase	<i>spcC/E</i>	Aminotransferase/	<i>SfORF2</i>	Transposase
<i>strB*</i>	Amidinotransferase		Dehydratase	<i>SsORF1</i>	Dioxygenase
<i>insA*</i>	Transposase	<i>spcD</i>	Epimerase	<i>spcZ</i>	unbekannt
<i>spcR</i>	Transkriptions-	<i>spcX</i>	Zucker-Bindeprotein	<i>speV</i>	ABC-Transporter
	regulator	<i>spcY</i>	unbekannt		

Abb. 37: Physikalische Karte der Spectinomycin-Biosynthese-Gencluster von *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *S. spectabilis* NRRL2494 und *S. spectabilis* NRRL2792 und mögliche Funktionen der identifizierten Gene. Sf: *S. flavopersicus*; Ss: *S. spectabilis*; *: Gen ist am 3'-Ende deletiert.

Die sequenzierten Regionen von *S. spectabilis* NRRL2494 und *S. spectabilis* NRRL2792 überlappen sich in 4,9 kb und zeigen 95,3 % Identität auf Nukleinsäure-Ebene. Dies zeigt, dass die beiden Isolate nicht komplett identisch sind.

Die Reihenfolge und die Orientierung der Gene *spcN* bis *spcK*, sowie ihre relative Länge ist bei allen drei Biosynthese-Clustern gleich. Die abgeleiteten Proteine der beiden *S. spectabilis*-Stämme weisen 95 % Aminosäure-Identität zueinander und durchschnittlich 65 % Identität zu den entsprechenden Proteinen von *S. flavopersicus* auf (Tab. 21).

Tab. 21: Vergleich der Genprodukte der Spectinomycin-Biosynthese-Cluster von *S. flavopersicus* NRRL B-2820, *S. spectabilis* NRRL2494 und *S. spectabilis* NRRL2792.

Gen	Länge (AS)	Identität [%]	mögliche Funktion
Sf <i>spcA</i>	266	67 _c	(myo-Inositol)-Monophosphatase
Ss _a <i>spcA</i>	265	96 _d	
Ss _b <i>spcA</i>	264		
Sf <i>spcB</i>	376/392	76 _c	(myo-Inositol)-Dehydrogenase
Ss _a <i>spcB</i>	374	97 _d	
Ss _b <i>spcB</i>	374		
Sf <i>spcC</i>	441	80 _c	Aminotransferase/Dehydratase
Ss _a <i>spcS1</i>	442		
Sf <i>spcD</i>	262	68 _c	Epimerase
Ss _a <i>speD</i>	266		
Sf <i>spcE</i>	435	79 _c	Aminotransferase/Dehydratase
Ss _a <i>spcS2</i>	439		
Sf <i>spcF</i>	270	58 _c	Glykosyltransferase
Ss _a <i>spcG</i>	293		
Sf <i>spcG</i>	271	69 _c	Methyltransferase
Ss _a <i>spcM</i>	267		
Sf <i>spcH</i>	346		Dehydrogenase
Sf <i>spcI</i>	312		Keto-Isomerase
Sf <i>spcJ</i>	328	76 _c	(dTDP-Glucose-4,6)-Dehydratase
Ss _a <i>spcE</i>	330		
Sf <i>spcK</i>	303	75 _c	Thymidyltransferase
Ss _a <i>spcD</i>	291		
Sf <i>spcN</i>	330	71 _c	Spectinomycin-Phosphotransferase
Ss _a <i>spcN</i>	331	94 _d	
Ss _b <i>spcN</i>	332		
Sf <i>spcR</i>	330		Transkriptionsregulator
Sf <i>spcT</i>	433	68 _c	Transportprotein
Ss _a <i>spcT</i>	432	94 _d	
Ss _b <i>spcT</i>	430		
Sf <i>spcX</i>	397	71 _c	Zucker-Bindeprotein
Ss _a <i>speX</i>	396		
Sf <i>spcY</i>	302		unbekannt

Sf: *Streptomyces flavopersicus* NRRL B-2820; Ss_a: *Streptomyces spectabilis* NRRL2792;

Ss_b: *Streptomyces spectabilis* NRRL2494;

_c Identität *S. flavopersicus* NRRL B-2820 - *S. spectabilis* NRRL2792;

_d Identität *S. spectabilis* NRRL2792 - *S. spectabilis* NRRL2494.

Während die Gene *spcN* - *spcK* von *S. flavopersicus* und *S. spectabilis* relativ große Ähnlichkeiten aufweisen, unterscheiden sich die flankierenden Regionen der Spc-Gencluster deutlich. Bei *S. spectabilis* NRRL2494 fehlt das stromabwärts von *spcN* gelegene *spcR*-Gen. An dessen Stelle und in gleicher Orientierung wie *spcN* findet sich ein *spcZ* genanntes Gen. Das von ihm abgeleitete, 267 Aminosäuren große Protein zeigte bei Homologie-Suchen in den Datenbanken keine signifikanten Ähnlichkeiten und ergab keine Klassifikation in eine Protein-Familie. Nur eine sehr schwache Identität zu einer Flavin-haltigen Amin-Oxidase aus *Homo sapiens* konnte nachgewiesen werden. Über die Funktion oder eine mögliche

Zugehörigkeit von *spcZ* zum Spc-Biosynthese-Gencluster kann somit nichts ausgesagt werden. Nach *spcZ* liegt in entgegengesetzter Orientierung ein offener Leserahmen SsORF1, dessen N-terminales Ende nicht vollständig sequenziert wurde. Das abgeleitete Protein weist Homologie zu Dioxygenasen auf und konnte der Protein-Familie der Taurin-Katabolismus Dioxygenasen zugeordnet werden. Zwischen *spcZ* und SsORF1 befindet sich eine palindromische Sequenz, die einen Transkriptionsterminator bilden könnte. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass SsORF1 nicht mehr zum Spc-Cluster zugehörig ist. Interessanterweise fehlt in *S. spectabilis* das Gen *spcR*, von dem angenommen wurde, dass es in *S. flavopersicus* einen Transkriptionsregulator der Spectinomycin-Biosynthesegene codiert. Eine Aktivität des Proteins konnte allerdings nicht festgestellt werden, und das Fehlen des Gens in *S. spectabilis* deutet zudem darauf hin, dass die Annahme eventuell falsch ist (s. 5.4).

Von *S. spectabilis* NRRL2792 liegen keine Sequenzdaten der flankierenden Bereiche stromabwärts bzw. -aufwärts von *spcN* und *spcK* vor. Es ist lediglich bekannt, dass nach *spcK* das Gen *speV* gefunden wurde, das einen ABC-Transporter codieren könnte (Hyun et al., 2000).

Die nicht vorhandene Homologie der Sequenzregionen vor *spcN* und nach *spcK* bei *S. flavopersicus* NRRL B-2820 und *S. spectabilis* NRRL2494 bzw. NRRL2792 im Vergleich zu den hohen Identitäten der Regionen zwischen *spcN* und *spcK* geben Anlass zu der Spekulation, dass diese Gene das komplette Cluster zur Biosynthese von Spectinomycin umfassen. Es ist allerdings denkbar, dass hier nur ein Teil des Clusters vorliegt, während weitere zugehörige Biosynthesegene oder zumindest Regulatorgene in einem anderen Bereich des Genoms der Stämme liegen.

In *S. flavopersicus* befindet sich am Anfang des Clusters ein unvollständiges Amidinotransferasegen *strB**, ein unvollständiges IS112-Element sowie das IS-Element IS1374 (s. 4.3). Dies deutet darauf hin, dass in diesem Bereich Rekombinationen und Rearrangments durch die beiden Insertionselemente stattgefunden haben. Zwischen den IS-Elementen wurde ein offener Leserahmen gefunden, der Homologie zu Acetyltransferasen aufweist, sowie die beiden Gene *strK* und *aph*. Die Anordnung und Orientierung der Gene *strK*, *aph* und *strB** findet sich in analoger Weise im Streptomycin-Synthese-Cluster von *S. glaucescens* wieder. In *S. griseus* trifft dies nur auf *aph* und *strB** zu, während *strK* in umgekehrter Orientierung an anderer Stelle des Clusters liegt. Die zentrale Region von StrK aus *S. flavopersicus* weist etwa 75 % Identität zu den Streptomycin-6-Phosphat-Phosphatasen aus den Streptomycin-Biosynthese-Clustern von *S. glaucescens* und *S. griseus* auf, während die N- und C-terminalen Enden der Proteine nur geringe Ähnlichkeiten zeigen. Ferner ist das

Enzym aus *S. flavopersicus* mit 256 Aminosäuren um 204 bzw. 193 Aminosäuren am C-Terminus kürzer als die analogen Proteine aus *S. glaucescens* und *S. griseus*. Innerhalb dieser C-terminalen Bereiche der Phosphatasen aus den Streptomycin-Produzenten wurden indes konservierte Motive identifiziert, die an der katalytischen Funktion und der Cofaktor-Bindung beteiligt sind (Mansouri & Piepersberg, 1991). StrK aus *S. flavopersicus* ist daher vermutlich inaktiv.

Das Gen *aph* zeigt 78 % Identität zu den Streptomycin-Resistenzgenen *aph(6)*, die die Streptomycin-6-Phosphotransferasen in *S. glaucescens* (Vögtli & Hütter, 1987) und *S. griseus* codieren (Distler et al., 1987). In früheren Versuchen konnte bereits festgestellt werden, dass das Enzym Aph aus *S. flavopersicus* aktiv ist und Streptomycin-Resistenz vermittelt. Dazu wurde das Gen in einen *E. coli*-*Streptomyces*-Shuttlevektor ligiert und transformiert. Die entstandenen *S. lividans*-Transformanten waren schwach Streptomycin-resistent, d.h. auf Agarplatten mit 1, 5 und 10 µg/ml Streptomycin wuchsen etwa 10 - 1000 x weniger Kolonien an wie auf Platten ohne Antibiotikum. Bei *S. lividans*, der nur den leeren Vektor trug, wurde die Kolonienzahl um das 10⁴ - 10⁹-fache reduziert. Außerdem wurde in diese Plasmid-Derivate das Regulatorgen *strR* aus dem Streptomycin-Biosynthese-Cluster von *S. griseus* inseriert. Es konnte jedoch kein Einfluss des Regulators auf die Aktivität von Aph aus *S. flavopersicus* nachgewiesen werden, und es wurde auch keine StrR-Bindestelle vor dem *aph*-Gen identifiziert.

Die dargestellten Befunde erlauben die Aufstellung von zwei Hypothesen. Zum einen könnte in *S. flavopersicus* ein Gencluster für ein Streptomycin-ähnliches Aminoglykosid-Antibiotikum vorgelegen haben, das im Laufe der Evolution durch Mutationen, Insertionen und andere Rearrangements so modifiziert wurde, dass ein verändertes Synthese-Cluster für das neue Antibiotikum Spectinomycin entstand. Zum anderen könnten zwei Synthesecluster für Streptomycin und für Spectinomycin vorhanden gewesen sein, von denen das Streptomycin-Cluster durch die beschriebenen chromosomalen Umordnungen verloren ging.

5.2 Hypothetischer Biosyntheseweg von Spectinomycin

Wie bereits in der Einleitung beschrieben konnten durch *in vivo* Zufütterungsexperimente und durch *in vitro* Untersuchungen mit Rohextrakten von *S. flavopersicus* einige Details der Spectinomycin-Biosynthese aufgeklärt und ein möglicher Biosyntheseweg aufgestellt werden. Die nun vorliegenden molekulargenetischen Sequenzdaten erlauben eine Überprüfung und

nähere Einblicke in den Syntheseweg. Aufgrund der Datenbank-Recherchen und Vergleiche mit bereits bekannten ähnlichen Synthesewegen konnten den im Spc-Gencluster von *S. flavopersicus* codierten Proteinen potentielle Funktionen zugeordnet und der bisher postulierte Syntheseweg modifiziert werden. Dabei bleiben noch viele Fragen offen. Vor allem die Bildung des fertigen Produkts aus den beiden Untereinheiten nach der Glykosyltransferasereaktion ist unklar, da hierfür auch keine anderen vergleichbaren Reaktionen bekannt sind.

Ferner wurden im Spc-Biosynthese-Cluster von *S. flavopersicus* weniger Gene identifiziert wie sie für den postulierten Syntheseweg nötig sind. Dies würde entweder bedeuten, dass außerhalb des Clusters noch zusätzliche Gene zu finden sind, oder aber, dass einige Enzyme mehrere leicht unterschiedliche Reaktionen katalysieren. In dem im Folgenden vorgeschlagenen Syntheseweg wird vom letzteren Fall ausgegangen.

5.2.1 Hypothetischer Biosyntheseweg von Actinamin

Die Synthese von Actinamin geht von Glucose-6-Phosphat aus, das zu *myo*-Inositol-1-Phosphat umgewandelt wird (Abb. 38). Diese Reaktion, eine intramolekulare Aldol-Kondensation, wird üblicherweise von einer NAD⁺- und ATP-abhängigen *myo*-Inositol-1-Phosphat-Synthetase durchgeführt (Walker, 1975). Ein entsprechendes Gen wurde im Spc-Gencluster von *S. flavopersicus* nicht gefunden. Auch unter den bisher bekannten Synthesegenen für Streptomycin konnte kein solches Gen ermittelt werden. *Myo*-Inositol-1-Phosphat spielt auch im Primärmetabolismus der Zellen eine Rolle und dient z.B. als Alkoholkomponente von Phosphoglyceriden. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass dieses Intermediat aus dem Primärmetabolismus abgezweigt wird.

Der nächste Schritt ist die Dephosphorylierung von *myo*-Inositol-1-Phosphat zu *myo*-Inositol durch die von *spcA* codierte *myo*-Inositol-1-Phosphat-Monophosphatase. Diese Enzyme benötigen für ihre Aktivität Metallionen, meist Mg²⁺. Eine entsprechende Bindestelle konnte in der Aminosäuresequenz von SpcA lokalisiert werden. Die Funktion von SpcA aus *S. spectabilis* NRRL2792 wurde über Aktivitätsmessungen mit Rohextrakten rekombinanter *E. coli*-Stämme nachgewiesen (Jo et al., eingereicht). Die dort gegebenen Daten bedürfen einer weiteren Überprüfung mit gereinigtem SpcA-Enzym.

Die Oxidation von *myo*-Inositol zu *scyllo*-Inosose sollte durch eine Dehydrogenase unter Verbrauch von NAD(P)⁺ katalysiert werden. Dafür kommen die beiden Oxidoreduktasen SpcB und SpcH in Betracht (s. 4.6.2). Aufgrund der höheren Identität zu *myo*-Inositol-

Dehydrogenasen aus anderen Organismen und wegen seiner Lage innerhalb des Clusters wurde zunächst SpcB als das für diesen Schritt verantwortliche Enzym angenommen. Die Untersuchungen, die sowohl mit in *E. coli* produziertem SpcB als auch mit SpcH durchgeführt wurden, lieferten leider keine erkennbare Aktivität eines der beiden Enzyme für diese Reaktion. Daher muss eine genaue Zuordnung der Proteine unterbleiben. Eine mögliche Ursache für die fehlende Aktivität könnte die relativ schwache Expression der Gene in *E. coli* sein. Ferner liegt das Gleichgewicht der Reaktion wahrscheinlich auf der Seite von *myo*-Inositol und konnte unter den getesteten Versuchsbedingungen nicht erreicht werden (Piepersberg, persönliche Mitteilung). Durch Elimination des entstehenden NAD(P)H könnte zwar die Rückreaktion verhindert werden, gleichzeitig geht dabei aber auch die photometrische Nachweismöglichkeit einer Aktivität verloren. Eine weitere nicht auszuschließende Möglichkeit ist, dass das eigentliche Substrat *myo*-Inositol-Phosphat ist, und die Dephosphorylierung erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Synthese von Actinamin stattfindet.

Die entstandene Ketogruppe dient als Angriffspunkt für eine Aminotransferase. Auch hierfür sind zwei Proteine des Spc-Genclusters denkbar, SpcC und SpcE. Beide zeigen Homologie zu Aminotransferasen als auch zu Dehydratasen. Die Letzteren katalysieren eine Desoxygenierungsreaktion, die auch zur Synthese des Actinospectose-Vorläufers nötig ist. Mitglieder beider Protein-Familien sind Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängig und binden den Cofaktor als Schiff'sche Base an konservierte Aspartat- und Lysin-Reste (He & Liu, 2002). Hinsichtlich der Reihenfolge von *spcC* und *spcE* im Spc-Gencluster erschien es zunächst wahrscheinlich, dass die Transaminierung vom früher codierten SpcC-Protein durchgeführt wird. Bei der Sequenzanalyse einiger anderer Antibiotika-Biosynthese-Cluster wurde jedoch festgestellt, dass die Abfolge der Gene innerhalb des Clusters selten die Schritte im Biosyntheseweg widerspiegelt. SpcE zeigte hohe Homologie zur L-Glutamin:*scyllo*-Inosose-Aminotransferase StsC aus *S. griseus*, deren Aktivität für die gleiche Reaktion bei der Synthese der Streptomycin-Untereinheit Streptidin nachgewiesen wurde (Walker, 1995). Außerdem wurde für das Enzym eine Zugehörigkeit zur DegT/DnrJ/EryCI/StrS-Familie gefunden, deren Mitglieder ebenfalls aus Antibiotika-Genclustern stammen und Identität zu Dehydratasen besitzen. Von ihnen wird jedoch postuliert, dass sie als Aminotransferasen fungieren. Eine genaue Zuordnung der Proteine SpcC bzw. SpcE zu der Transaminierungsreaktion kann also nicht getroffen werden und müsste durch Aktivitätstests mit gereinigten Enzymen überprüft werden. Durch Untersuchungen mit Rohextrakten von *S. flavopersicus* wurde bereits festgestellt, dass als Donor der NH₂-Gruppe Glutamin dient, dessen α -Aminogruppe auf

scyllo-Inosose übertragen wird, wobei α -Ketoglutaramat entsteht. Dies ist eine relativ unübliche Transaminierungsreaktion in Bakterien. Des Weiteren wurde bewiesen, dass die Aminogruppe zuerst an Position C-1 und danach an C-3 angehängt wird (Walker, 1995).

Für die nachfolgende Oxidation wird wieder eine Dehydrogenase benötigt. Wie bereits oben beschrieben, kommen dafür die Enzyme SpcB und SpcH in Betracht. Eventuell führt eine Dehydrogenase beide Oxidationsreaktionen in der Actinamin-Synthese aus, während die andere bei der Umwandlung von Spectinomycin zu Dihydrospectinomycin benötigt wird. Die Substratspezifität der entsprechenden Dehydrogenase müsste daher möglichst breit sein.

Wie für die Dehydrogenase- gilt auch für die zweite Aminotransferasereaktion, dass beide Schritte vom gleichen Enzym katalysiert werden könnten. Im Fall von SpcC/SpcE könnte das andere Enzym als Dehydratase an der Synthese des Actinospectose-Vorläufers mitwirken.

Als nächster Schritt könnte eine Inversion der Konfiguration der Glucose an Position C-4 durch die von *spcD* codierte Epimerase folgen. Es wäre aber ebenso denkbar, dass die Reaktion früher oder später im Biosyntheseweg stattfindet.

Für die beiden Methylierungen wurde nur ein Gen *spcG* gefunden, dessen Produkt hohe Homologie zu DNA-Methyltransferasen aber kaum zu Methyltransferasen aus anderen Antibiotika-Biosynthese-Clustern aufweist. Bei diesen Antibiotika werden jedoch häufig die Aglycon-Einheiten methyliert, oder es laufen O- und C-Methylierungen, seltener jedoch N-Methylierungen der Zucker-Substituenten ab. So findet z.B. während der Erythromycin-Synthese in *Saccharopolyspora erythraea* unter anderem ein Methyltransfer an C-3 des Zuckers dTDP-Mycarose und ein O-Methyltransfer am Aglycon von Erythromycin A zu Erythromycin C statt (Summers et al., 1997), während bei Nogalamycin die Zucker-Einheit Nogalose O-methyliert wird (Torkkell et al., 2001). Wie auch bei den DNA-Methylasen dient S-Adenosyl-Methionin als Donor der Methylgruppe bei der Synthese von Actinamin. Über die Reihenfolge, mit der die CH₃-Gruppen angehängt werden, ist nichts bekannt. Sicher ist nur, dass zuerst beide Aminogruppen vorhanden sein müssen, bevor die Methylierungen stattfinden (Walker, 1995). Das Vorhandensein von nur einer Methyltransferase SpcG, die zwei Reaktionen katalysiert, bestätigte den Verdacht, dass für die beiden Dehydrogenierungen und beide Aminierungen jeweils auch nur ein Enzym zuständig sein könnte. Die Streptidin-Untereinheit von Streptomycin enthält zwei Amidinogruppen und im Streptomycin-Biosynthese-Gencluster wurden in der Tat zwei Amidinotransferasegene gefunden. Beide Enzyme wurden in *S. lividans* kloniert und waren in einem nicht-spezifischen Assay, der nicht zwischen dem ersten und zweiten Transamidierungsschritt unterschied, aktiv. Die Aktivität der Amidinotransferasen mit ihren postulierten Substraten wurde allerdings noch nicht

getestet, so dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob alle zwei Transamidierungen vom gleichen Protein oder von den beiden unterschiedlichen Proteinen katalysiert werden (Piepersberg & Distler, 1997). Für die Synthese von Bluensidin wird dahingegen nur eine Amidinotransferase benötigt und im Cluster codiert. Unter Versuchsbedingungen konnte diese beide Amidinogruppen an die Streptidin-Untereinheit von Streptomycin anbauen.

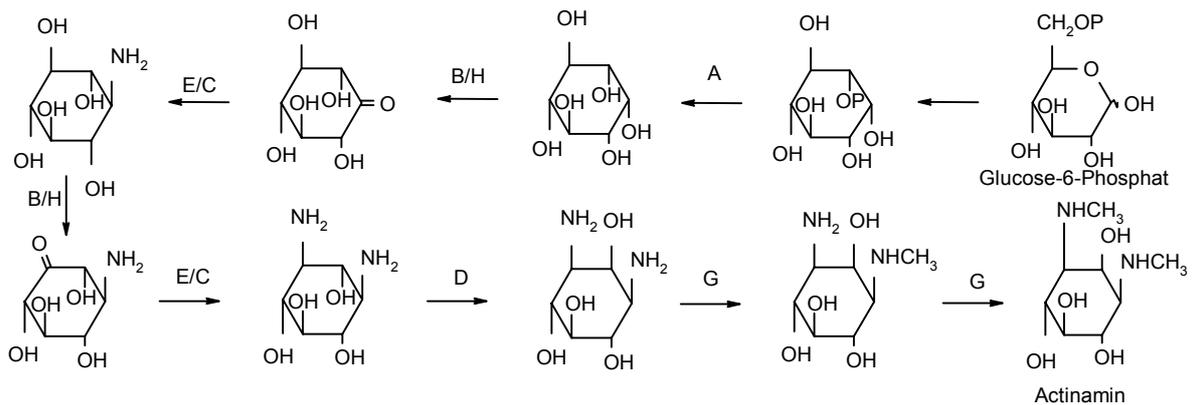


Abb. 38: Postulierter Biosyntheseweg von Actinamin.

5.2.2 Hypothetischer Biosyntheseweg des Actinospectose-Vorläufers

Actinospectose selbst wird während der Biosynthese wahrscheinlich gar nicht gebildet, sondern liegt als aktivierter Vorläufer vor, der mit Actinamin verbunden wird (Abb. 39). Glykosyltransferasen, die diese Reaktionen katalysieren, können nur aktivierte dNDP-Zucker als Donor erkennen. Die Synthese des Precursors geht von Glucose-1-Phosphat aus, das durch die Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase SpcK aktiviert wird. Diese Enzyme sind weit verbreitet in Antibiotika-produzierenden Bakterien und oft hoch homolog zueinander sowie zu dNDP-Glucose-Synthetasen aus anderen Organismen. Meist dient dUTP oder dTTP als Aktivator. Die dTDP-Glucose-Synthase aus *S. spectabilis* NRRL2792 wurde näher untersucht und eine Aktivität des gereinigten Enzyms mit D-Glucose-1-Phosphat und dTTP als Substrat nachgewiesen. Andere Desoxynukleotide wurden nicht getestet (Jo et al., eingereicht).

Der nächste Biosyntheseschritt wird von einer dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase durchgeführt, die von *spcJ* codiert wird. Diese ist wie auch die Thymidyltransferase ein weit verbreitetes und in den Bakterien hoch konserviertes Enzym, da die entstehende dNDP-4-Keto-6-Desoxyglucose ein Precursor für viele andere 6-Desoxyzucker-Derivate ist. Die Reaktion ist

irreversibel und umfasst einen intramolekularen Wasserstoff-Shift von C-4 nach C-6 und eine Elimination von H₂O an C-5 und C-6 durch eine Base im aktiven Zentrum des Enzyms. SpcJ konnte in die Familie der „short-chain“ Dehydrogenasen/Reduktasen eingeteilt werden, zu der auch andere Hexose-4,6-Dehydratasen gehören, die alle NAD(P)⁺ als katalytische prosthetische Gruppe nutzen (He & Liu, 2002).

Die folgenden Reaktionen sind sehr spekulativ und an die von He und Liu postulierte Synthese von 4,6-Didesoxyzuckern angelehnt (He & Liu, 2002). Die Untersuchungen von He und Liu bezogen sich auf die Synthese der Desosamin-Zuckeruntereinheit von Methymycin/Neomethymycin aus *S. venezuelae*. Die Autoren nennen drei mögliche Mechanismen zur C-4-Desoxygenierung, an der mindestens zwei Enzyme beteiligt sind. Die an die vorher beschriebene Reaktion anschließende Tautomerisierung von dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose zu dTDP-3-Keto-6-Desoxyglucose könnte von SpcI katalysiert werden. Dieses Enzym zeigte sowohl Homologie zu Glucose-4,6-Dehydratasen (s. SpcJ), zu NAD-abhängigen Epimerasen/Dehydratasen als auch zu dTDP-4-Keto-6-Desoxyhexose-4-Ketoreduktasen. Ein entsprechendes Protein wurde auch im Desosamin-Cluster gefunden. Es wurde jedoch gezeigt, dass die nachfolgende Dehydratase DesI dTDP-3-Keto-6-Desoxyglucose gar nicht als Substrat erkennt, sondern dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose benötigt. Der Isomerisierungsschritt der Keto- und Hydroxylgruppe wäre also unnötig, und SpcI könnte andere Funktionen im Syntheseweg übernehmen.

Die folgende C-4-Desoxygenierung wird in *S. venezuelae* durch eine Pyridoxalphosphat-abhängige C-4-Dehydratase DesI und eine Reduktase DesII katalysiert. Das zu DesI analoge Protein des Spc-Clusters ist wahrscheinlich entweder SpcC oder SpcE, die, wie bereits bei der Synthese von Actinamin beschrieben, beide Homologie zu PLP-abhängigen Aminotransferasen und Dehydratasen besitzen. Womöglich übt eines der Enzyme eine Funktion als Aminotransferase bei der Synthese von Actinamin aus, während das andere als Dehydratase in der Actinospectose-Precursor-Synthese fungiert. Für die zur Desoxygenierung ebenfalls benötigte Reduktase DesII wurde im Spc-Gencluster kein orthologes Enzym identifiziert. Würde der im Biosyntheseweg abgebildete Tautomerisierungsschritt als unnötig wegfallen, könnte SpcI als potentielle Reduktase angenommen werden, da das Protein auch Identität zu Ketoreduktasen zeigte. Eventuell käme auch eine der beiden Dehydrogenasen SpcB oder SpcH in Betracht. DesII besitzt ein [4Fe-4S]-Center und gehört zur radikalischen SAM-Superfamilie. Das einzige im Spc-Cluster codierte Produkt, das ebenfalls diese Merkmale besitzt, ist SpcY. Es weist allerdings keinerlei Homologie zu Reduktasen auf und auch eine

NAD⁺-Bindestelle ist nicht erkennbar. Denkbar wäre noch, dass die C4-Desoxygenierung nur durch die Dehydratase SpcC/SpcE vollständig katalysiert wird.

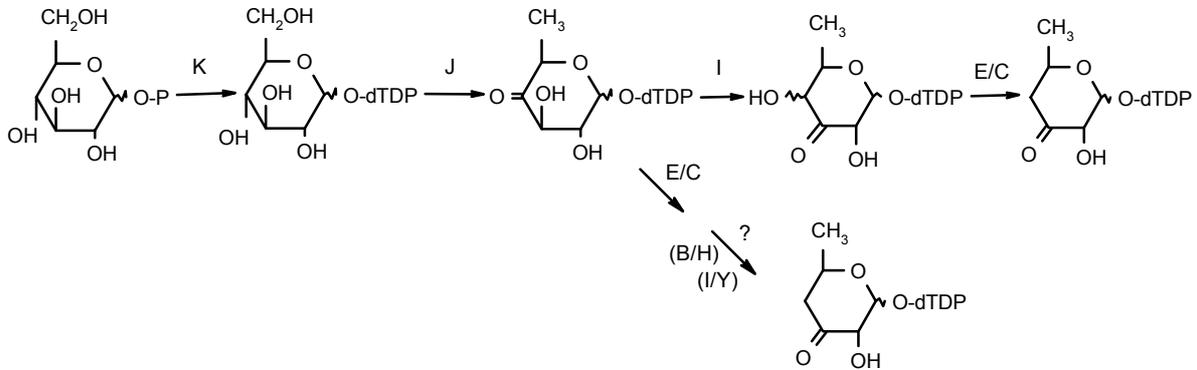


Abb. 39: Postulierter Biosyntheseweg des aktivierten Actinospectose-Vorläufers.

5.2.3 Zusammenbau von Spectinomycin aus seinen Untereinheiten

Die beiden Untereinheiten von Spectinomycin, Actinamin und aktivierte Actinospectose, werden durch die Glykosyltransferase SpcF über eine β -glykosidische Bindung verknüpft (Abb. 40). Die meisten bisher identifizierten Glykosyltransferasen haben eine relaxierte Substratspezifität sowohl für die Zucker- als auch für die Aglycon-Reste und konnten in 26 Familien eingeteilt werden. Der Glykosyltransfer kann entweder über einen „inverting“- oder einen „retaining“-Mechanismus erfolgen. SpcF zählt zu den „invertierenden“ Glykosyltransferasen, d.h. es kommt zu einer Inversion der anomeren Konfiguration des Zuckers infolge eines „single displacement“-Mechanismus, bei dem der Akzeptor einen nukleophilen Angriff auf die Position C-1 des Nukleotid-Diphosphozucker-Donors ausübt (Sinnott, 1991).

Für die Bildung der Hemiketal-Bindung kommt in Ermangelung anderer Enzyme SpcY in Betracht. Das Protein wies geringe Homologie zu Molybdän-Cofaktor-Biosynthesepoteinen auf. Über die Synthese und die Mechanismen der Synthesereaktionen dieser Substanz ist noch wenig bekannt, ein ähnlicher Ringschluss wie bei Spectinomycin wäre aber denkbar.

Mit der von SpcY katalysierten Reaktion könnte es direkt zur Bildung von Spectinomycin kommen, oder aber es wird zuerst Dihydrospectinomycin gebildet, das dann noch durch eine Dehydrogenase zu Spectinomycin reduziert werden muss. Für diese Reaktion kommen die Oxidoreduktasen SpcB oder SpcH in Erwägung. Da in den Kulturüberständen von *S. spectabilis* (Hoecksema & Knight, 1975) und von *S. flavopersicus* (s. 4.5.4) auch Dihydrospectinomycin nachgewiesen wurde, kann diese Substanz als unmittelbares

Intermediat von Spectinomycin im Biosyntheseweg gesehen werden. Es könnte sich aber auch um eine Seitenreaktion handeln. In diesem Fall könnte eine der Dehydrogenasen bei der C-4-Desoxygenierung im Biosyntheseweg des Actinospectose-Precursors mitwirken oder aber eine andere Oxidoreduktase aus *S. flavopersicus* und *S. spectabilis*.

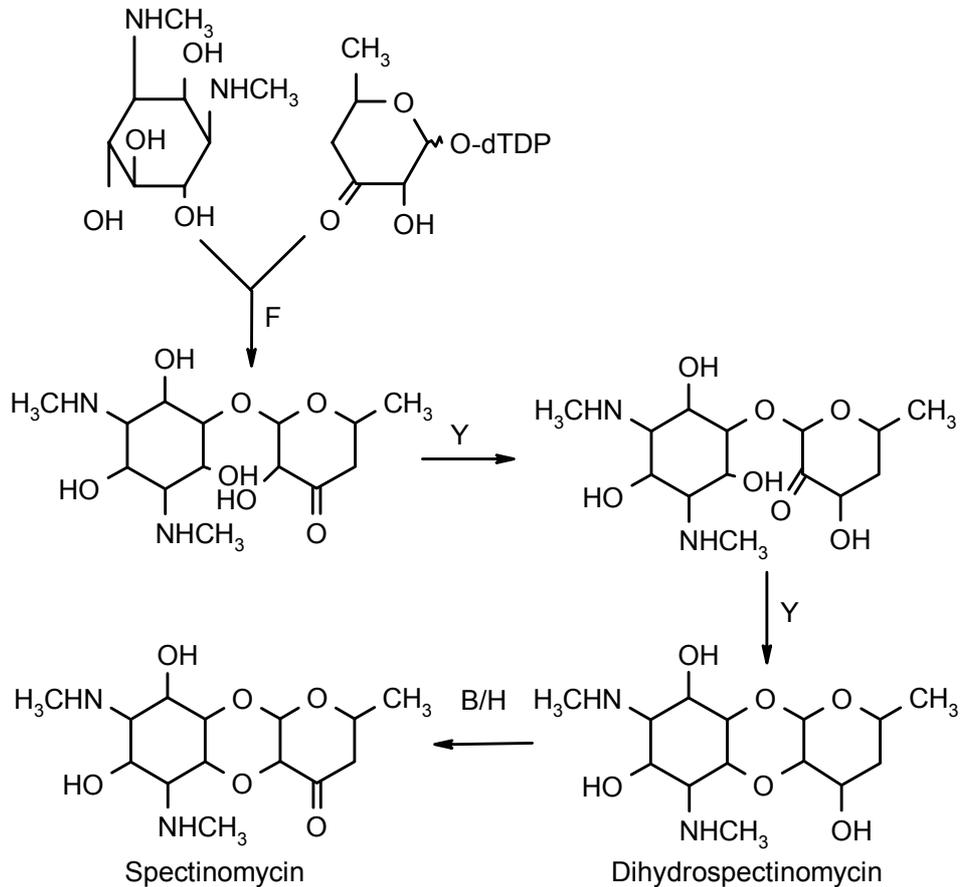


Abb. 40: Postulierte letzte Stufen des Biosynthesewegs von Spectinomycin.

5.3 Export von Spectinomycin

Die Gene für den Export der Antibiotika in den Produzentenstämmen liegen meist geclustert mit den Biosynthesegenen vor. Die Proteine dienen neben dem Export oft auch als Resistenz. Sie können deshalb auch einzeln in resistenten, anderen Bakterien aufgefunden werden. Um die Antibiotika aus den Zellen auszuschleusen, wurden bisher zwei Klassen von Export-Proteinen unterschieden (Méndez & Salas, 1998). Dazu zählen zum einen ABC (ATP-

binding-cassette)-Transporter, die auch als primäre Transporter bezeichnet werden, und zum anderen sekundäre Transporter.

ABC-Transporter können viele verschiedene Substrate in beide Richtungen durch die Zytoplasmamembran transportieren und benötigen dabei Energie in Form von ATP. Ein typischer ABC-Transporter setzt sich zusammen aus zwei Transmembran-Domänen mit je sechs membrandurchspannenden, α -helikalen Regionen und aus zwei ATP-Bindedomänen, die sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran befinden. Solche Proteine wurden z.B. zum Export von Daunorubicin, Tylosin oder Streptomycin in den jeweiligen Produzentenstämmen gefunden.

Sekundäre Transporter bestehen üblicherweise aus einem einzigen integralen Protein mit 12 Transmembran-Regionen. Der Transport basiert auf elektrochemischen Gradienten und der protonenmotorischen oder Natriumionen-getriebenen Kraft entlang der Zytoplasmamembran. Beispiele hierfür sind die Exportproteine für Actinorhodin oder Pristinamycin.

Häufig sind an den Transportprozessen mit ABC-Transportern auch periplasmatische oder extrazelluläre Bindeproteine beteiligt, die die zu transportierende Substanz binden und zu den Membrandomänen des ABC-Transporter-Komplexes transferieren (Driessen et al., 2000). In gram-negativen Bakterien liegen diese Proteine frei diffundierbar im Periplasma vor, während sie in gram-positiven Bakterien oftmals über einen Lipid-Anker in der Zytoplasmamembran fixiert oder mit der Membrandomäne fusioniert sind.

Ein neuer Typ von Transportern, der Eigenschaften der beiden anderen Transportsysteme teilt, wurde bei *Rhodobacter sphaeroides* zur Aufnahme von Glutamat gefunden (Driessen et al., 2000). Hier liegt ein sekundärer Transporter gekoppelt mit einem Bindeprotein vor, und die Energie für den Transport resultiert aus der protonenmotorischen Kraft. Die Proteine besitzen meist zwei integrale Membran-Untereinheiten, von denen die größere 12 Transmembran-Segmente umfasst und wahrscheinlich den Transport und die Bereitstellung der Energie katalysiert, während die kleinere Einheit aus vier Transmembran-Bereichen mit dem Bindeprotein interagiert. Auf Sequenzebene weisen diese Transporter keine Homologie zu den beiden anderen Typen auf und teilen mit diesen auch keine konservierten Motive.

Im Spectinomycin-Biosynthese-Cluster von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 sowie der beiden *S. spectabilis*-Stämme wurde das Gen *spcT* identifiziert, das möglicherweise ein Transmembranprotein codiert, sowie *spcX*, das Homologie zu extrazellulären Bindeproteinen aufweist. SpcT zeigt Homologie zu verschiedenen Zucker-Transportproteinen (32 % Identität zu einem möglichen Export-Protein von *S. avermitilis*) und zu „Multidrug“-Resistenzproteinen, worunter die Homologie zu einer Efflux-Pumpe für das Makrolid-Antibiotikum

Pimaricin (Aparicio et al., 2000) mit 25 % identischer Aminosäuren am höchsten liegt. Zehn membrandurchspannende Bereiche konnten in SpcT nachgewiesen werden. Es fand sich jedoch keine hydrophile Nukleotid-Binderegion mit den Walker A- und Walker B-Motiven, wie sie alle ABC-Transporter zur Bindung und Hydrolyse von ATP aufweisen. Des Weiteren fehlt ein konserviertes Motiv, das für die Membrandomäne von Bindeprotein-abhängigen ABC-Transportern charakteristisch ist und an der Interaktion mit der ATP-Bindedomäne beteiligt zu sein scheint (Driessen et al., 2000).

Extrazelluläre Bindeproteine müssen durch die Zytoplasmamembran ausgeschleust werden. Dafür ist ein Signalpeptid am N-terminalen Ende des Proteins nötig, das anschließend von einer Signalpeptidase vom Typ I oder Typ II wieder entfernt wird. In der Aminosäuresequenz von SpcX konnte kein solches charakteristisches Signalpeptid-Motiv identifiziert werden. Ferner konnte auch kein Lipid-Anker ausgemacht werden, der eventuell zur Fixierung von SpcX in der Membran dienen könnte. Dies legt den Schluss nahe, dass SpcX zwar Homologie zu extrazellulären Bindeproteinen besitzt, aber nicht wie diese ausgeschleust wird, sondern eventuell frei diffundierbar im Zytoplasma der Zellen wirkt. Es könnte dort Spectinomycin binden und zu einem Transportprotein transferieren. Bei diesem Transporter könnte es sich um SpcT handeln, so dass die beiden Proteine SpcT und SpcX zusammen zu der relativ neuen Klasse der Bindeprotein-abhängigen sekundären Transportern gezählt werden könnten. Die geringe Anzahl an Transmembran-Segmenten und das Fehlen von zwei konservierten Sequenzen innerhalb der Aminosäuresequenz von SpcT, die bei Membranproteinen dieser Transportsysteme vorkommen (Driessen et al., 1997), widerspricht allerdings dieser Hypothese.

Das Spectinomycin-Resistenzprotein SpcN inaktiviert Spectinomycin durch Phosphorylierung im Inneren der Zellen (s. 5.5), so dass Spectinomycin-Phosphat exportiert werden müsste. Ein ähnliches Prinzip findet sich bei der Streptomycin-Biosynthese wieder, bei der das Antibiotikum als inaktives Streptomycin-6-Phosphat bzw. Dihydrostreptomycin-6-Phosphat synthetisiert und ausgeschleust wird. Durch eine extrazelluläre Streptomycin-6-Phosphat-Phosphatase StrK entsteht dann außerhalb der Zellen aktives Streptomycin (Piepersberg & Distler, 1997). Ein Gen für eine extrazelluläre Phosphatase konnte allerdings im Spectinomycin-Biosynthese-Cluster nicht gefunden werden. Denkbar wäre es daher auch, dass SpcX eine sehr hohe Affinität für Spectinomycin besitzt und die Substanz sofort nach der Synthese bindet und transportiert. SpcN hätte somit eine ausschließliche Resistenz gegenüber wieder in die Bakterien gelangtes Spectinomycin. Da jedoch mit gereinigtem SpcN-Protein von *S. flavopersicus* nachgewiesen wurde, dass dieses auch schon Actinamin und eventuell

auch Vorstufen aus dem Actinamin-Syntheseweg phosphorylieren kann, erscheint es trotzdem sehr wahrscheinlich, dass Spectinomycin als Spectinomycin-Phosphat in den Zellen vorliegt (s. 5.5). *S. lividans*-Transformanten, die *spcT* auf einem Plasmid trugen, zeigten keine Spectinomycin-Resistenz. Dieses Ergebnis könnte zum einen darauf hindeuten, dass nur Spectinomycin-Phosphat als Substrat von SpcT transportiert werden kann, zum anderen könnte es bedeuten, dass ein Komplex aus SpcT und SpcX für den Export nötig ist.

Auf einer Seite des Spc-Genclusters aus *S. spectabilis* NRRL2792 konnte ein mögliches ABC-Transportergen *speV* identifiziert werden, dessen Sequenz jedoch nicht in der Genbank hinterlegt ist (Hyun et al., 2000). Darüber, ob SpeV an der Biosynthese, am Export von oder an der Resistenzausbildung gegenüber Spectinomycin beteiligt ist, kann daher keine Aussage gemacht werden.

5.4 Regulation des Spectinomycin-Biosynthese-Genclusters

An einem Ende des Spc-Genclusters von *S. flavopersicus* NRRL B-2820 liegt das Gen *spcR*. Das abgeleitete Protein zeigt eine relativ hohe Identität zum Transkriptionsaktivator HstR aus *S. glaucescens* (46 % identische Aminosäuren) sowie zum Transkriptionsaktivator StrR aus *S. griseus* (40 % identische AS) und besitzt mit ihnen gemeinsam ein Helix-Turn-Helix-Motiv zur DNA-Bindung. Wie bereits in der Einleitung erwähnt (s. 2.2) bilden diese drei Proteine zusammen eine Klasse der Biosyntheseweg-spezifischen Transkriptionsaktivatoren. HstR und StrR binden an palindrome Sequenzen, die innerhalb des Streptomycin-Synthese-Clusters mehrmals vorhanden sind, und induzieren somit die Expression der Synthese- und Resistenzgene. Im Genom von *S. griseus* konnten vier StrR-Bindestellen nachgewiesen werden, von denen drei in intercistronischen Bereichen liegen. StrR wirkt auch bidirektional und kann die Transkription ausgehend von zwei divergent angeordneten Promotoren aktivieren. Ferner konnte eine Aktivierung der heterologen Promotoren aus *S. glaucescens* durch das StrR-Protein nachgewiesen werden. Sowohl in *S. griseus* als auch in *S. glaucescens* befindet sich innerhalb des *strR*-Gens eine weitere StrR-Bindestelle, über deren Funktion noch spekuliert wird. Eventuell könnte eine Interaktion des Aktivators an diese DNA-Bereiche zu einer „feed-back“-Regulation seiner eigenen Expression führen (Thamm, 1999). Ein Modell zur Kontrolle der Streptomycin-Biosynthese durch den A-Faktor, einen übergeordneten Regulator, ist in der Einleitung (Abb. 1) dargestellt.

In früheren Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass SpcR in *E. coli* produziert und aufgereinigt werden kann. In Mobility-Shift-Experimenten mit DNA aus den intercistronischen Bereichen zwischen den Genen *spcA* - *spcB*, *spcH* - *spcI* und *spcJ* - *spcK* konnte jedoch unter verschiedenen Bedingungen keine Bindung des Proteins festgestellt werden. In diesen Regionen konnten auch keine langen Sequenzwiederholungen identifiziert werden. Des Weiteren wurde festgestellt, dass SpcR ebenfalls nicht an die palindromen Bindestellen des StrR-Regulators bindet, von denen auch eine vor dem unvollständigen Amidinotransferasegen *strB** vor dem Spc-Gencluster gefunden wurde (Abb. 7) (Thamm, 1999).

An gleicher Stelle wie *spcR*, allerdings in anderer Orientierung befindet sich im Spectinomycin-Biosynthese-Cluster von *S. spectabilis* NRRL2494 das Gen *spcZ*. Es zeigt keine Homologie zu Regulatoren, und über seine mögliche Funktion ist nichts bekannt (s. 5.1). Die Sequenzdaten von *S. spectabilis* NRRL2792 in dieser Region sind leider nicht untersucht. Andere Gene, die Regulatoren codieren könnten, wurden weder bei *S. flavopersicus* noch bei den beiden *S. spectabilis*-Stämmen in der unmittelbaren Nachbarschaft des Spc-Clusters identifiziert.

Die Resultate legen den Schluss nahe, dass SpcR nicht an der Regulation der Spectinomycin-Biosynthese in *S. flavopersicus* beteiligt ist. Das unvollständige Amidinotransferasegen *strB**, das 86 % Identität zum entsprechenden Produkt des Streptomycin-Clusters aufweist, die beiden ebenfalls zu den Streptomycin-Biosynthesegenen hoch homologen Gene *strK* und *aph*, sowie die beiden unvollständigen bzw. kompletten IS-Elemente vor dem Spc-Cluster gaben Anlass zu der Spekulation, dass in diesem DNA-Bereich Rearrangements stattgefunden haben (s. 5.1). Eventuell wurde ein Biosynthese-Gencluster für Streptomycin oder ein ähnliches Aminoglykosid-Antibiotikum, wie z.B. Bluensidin, durch Insertionen und Deletionen zerstört. SpcR könnte ein Relikt dieses Clusters sein, das durch zusätzliche Mutationen nun auch nicht mehr an die StrR-Bindestelle binden kann.

Über das Integrationssystem des Phagen ϕ C31 wurde das Genbankcosmid pTST63, das alle identifizierten Gene des Spc-Clusters inklusive *spcR* trug, in das Genom von *S. lividans* TK64-Transformanten integriert. Es konnte jedoch keine Produktion von Spectinomycin durch die Transformanten nachgewiesen werden (s. 4.5.6). Auch eine Variation der Kulturbedingungen brachte keinen Erfolg. Dies lässt die Frage offen, ob der sequenzierte Bereich alle Gene, die zur Synthese von Spectinomycin nötig sind, umfasst, oder ob auf anderen Regionen des Chromosoms noch zusätzliche Biosynthesegene codiert sind. Das durch die oben beschriebenen Deletionen notwendige Gene zerstört wurden, erscheint

allerdings unwahrscheinlich, da ja *S. flavopersicus* Spectinomycin produziert. Möglich wäre ferner, dass die Synthesegene von einem Regulator, der außerhalb des Clusters codiert wird, oder von noch weiteren, übergeordneten Elementen reguliert werden, die in *S. lividans* nicht vorhanden sind. So würde wahrscheinlich auch eine Expression des kompletten Streptomycin-Biosynthese-Clusters in manchen *Streptomyces*-Stämmen zu keiner Streptomycin-Produktion führen, da die übergeordnete Regulationskaskade über den A-Faktor, der nicht von allen Streptomyceten gebildet wird, fehlt. Eine ähnliche Ursache könnte für die ausbleibende Spectinomycin-Synthese in TK64/pTST63 verantwortlich sein. Weiterhin wäre denkbar, dass SpcR als Regulator wirkt, aber durch zusätzliche Modifikationen wie Phosphorylierung oder kleine Signalmoleküle aktiviert werden muss. Der Transkriptionsaktivator StrR aus *S. griseus* benötigt dahingegen zur Interaktion mit der DNA keine weiteren spezifischen Faktoren oder Modifizierungen.

5.5 Spectinomycin-Resistenz

Bisher wurden zwei Mechanismen beschrieben, die Organismen vor der Wirkung von Spectinomycin schützen. Dazu gehören Mutationen in der 16S rRNA, dem Angriffsort von Spectinomycin, und im ribosomalen Protein RpsE, die eine Bindung verhindern (Skeggs et al., 1987), sowie Adenylyltransferasen, die Spectinomycin inaktivieren (Haas & Dowding, 1975).

In *S. flavopersicus* NRRL B-2820 sowie in *S. spectabilis* NRRL2494 wurde *spcN* als einziges Gen identifiziert, das Spectinomycin-Resistenz vermittelt. Das abgeleitete Protein zeigt relativ hohe Homologie zu den ATP-abhängigen Phosphotransferasen StrN aus den Streptomycin-Biosynthese-Clustern von *S. glaucescens* und *S. griseus*. Diese Enzyme sind allerdings nicht an der Resistenzausbildung beteiligt, sondern phosphorylieren wahrscheinlich Intermediate zur Synthese der Streptidin-Untereinheit, die dadurch für die nachfolgende Amidinotransferasereaktionen aktiviert werden. Diese Erkenntnis unterstützt die Hypothese, nach der Resistenzgene durch divergente Evolution aus ehemaligen Biosynthesegenen entstanden sein könnten (Piepersberg & Distler, 1997).

Die Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN teilt mit den Enzymen des Streptomycin-Clusters einige charakteristische Motive von Aminoglykosid-Phosphotransferasen und eukaryotischen Protein-Kinasen. Ferner weist sie etwa 20 % Identität zu einer ATP-abhängigen Spectinomycin-Phosphotransferase aus *Legionella pneumophila* auf, deren

Aktivität näher untersucht wurde (Thompson et al., 1998). Ebenfalls analysiert wurde SpcN aus *S. flavopersicus* NRRL B-2820 (Lyutskanova et al., 1997). In *Campylobacter* wurde die Aktivität einer Spectinomycin-Kinase nachgewiesen, über das Enzym ist allerdings nichts Genaueres bekannt (Pinto-Alphandary et al., 1990).

Bei der Phosphotransferase aus *Legionella pneumophila* handelt es sich um ein 331 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 38,5 kDa. Da sich vor dem Gen keine Promotorregion und keine Ribosomen-Bindestelle befindet, wurde angenommen, dass es Teil eines Operons sein könnte. Mit Hilfe eines gekoppelten Assays, wie er in ähnlicher Weise auch mit SpcN aus *S. spectabilis* durchgeführt wurde (s. 4.6.1.4), wurde der K_M -Wert des Enzyms auf 21,5 μ M bestimmt. Bei hohen Spectinomycin-Konzentrationen trat eine Substrat-Inhibition ein, wie sie bei vielen Aminoglykosid-modifizierenden Proteinen gefunden werden konnte. Die Phosphotransferase ist hoch spezifisch und akzeptiert keine anderen Aminoglykosid-Antibiotika, wie z.B. Streptomycin oder Kanamycin. Bei den bislang untersuchten Streptomycin-Kinasen wurde eine solch enge Substratspezifität nicht festgestellt. An der Katalyse scheinen die beiden Aminosäuren Lysin-52 und Aspartat-212 maßgeblich beteiligt zu sein. Über Massenspektroskopie wurde als Phosphorylierungsstelle die Hydroxylgruppe an Position C-9 von Spectinomycin, d.h. an der Actinamin-Untereinheit (Abb. 41), bestimmt und ein möglicher Reaktionsmechanismus aufgestellt (Thompson et al., 1998).

Die Spectinomycin-Phosphotransferasen aus *S. flavopersicus* NRRL B-2820 und *S. spectabilis* NRRL2494 bzw. NRRL2792 sind mit fast 70 % Identität hoch homolog. Daher wurden auch ähnliche Enzymaktivitäten erwartet. Assays mit gereinigtem Enzym aus *S. flavopersicus* und anschließende HPLC-Analyse zeigten, dass sowohl Spectinomycin als auch Actinamin phosphoryliert werden, nicht dagegen Streptomycin, Streptidin, Streptamin und s-Inosamin. Es wurde daher spekuliert, dass die Angriffspunkte von SpcN eine bzw. beide OH-Gruppen an C-2 und C-6 der Actinamin-Untereinheit sind. Dies entspricht einer Phosphorylierung an den Positionen C-7 bzw. C-9 von Spectinomycin (Abb. 41) (Lyutskanova et al., 1997). Es wäre weiterhin denkbar, dass schon Intermediate des Actinamin-Synthesewegs als Substrate für SpcN dienen könnten, und sich die Zelle bereits ziemlich früh während der Produktion vor der antibiotischen Wirkung von Spectinomycin schützt.

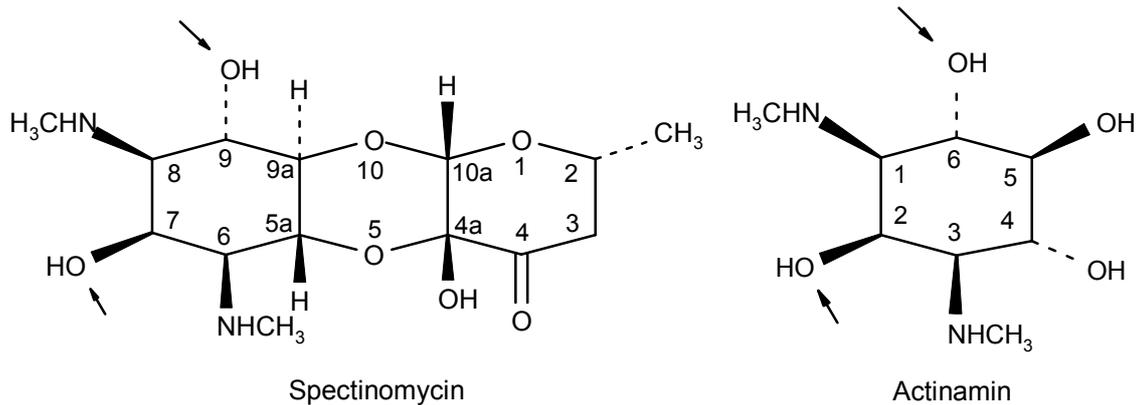


Abb. 41: Strukturformeln von Spectinomycin und Actinamin. Mögliche Angriffspunkte der Spectinomycin-Phosphotransferase SpcN sind mit Pfeilen markiert.

Die Aktivität der Phosphotransferase aus *S. spectabilis* NRRL2494 wurde mit Hilfe verschiedener Tests untersucht (s. 4.6.1.4). Das Enzym war bis zu einer Temperatur von 40°C stabil. In Übereinstimmung mit den bei der Kinase aus *Legionella* gefundenen Werten wurde ein relativ niedriger K_M -Wert von 20 μM für das gereinigte Enzym gemessen und eine sehr enge Substratspezifität festgestellt. Ferner wurde gezeigt, dass es zu keiner kompetitiven Inhibition der Phosphorylierungsreaktion kommt, wenn einige andere Aminoglykosid-Antibiotika neben Spectinomycin eingesetzt wurden. Eine Substrat-Inhibition wie bei der Kinase aus *Legionella* wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen allerdings nicht deutlich.

In den Aktivitätstests wurde auch Dihydrospectinomycin, ein Intermediat oder ein Nebenprodukt der Spectinomycin-Synthese, als Substrat verwendet. Dihydrospectinomycin wird ebenfalls phosphoryliert und verliert dadurch seine geringe antibiotische Wirkung. Actinamin, das von SpcN aus *S. flavopersicus* als Substrat erkannt werden kann, stand für Tests mit dem Enzym aus *S. spectabilis* nicht zur Verfügung. Dennoch kann angenommen werden, dass auch mit diesem Enzym die Phosphorylierung an den Hydroxylgruppen der Positionen C-7 oder C-9 von Spectinomycin stattfindet. Im HPLC-Elutionsdiagramm eines Aktivitätsassays mit SpcN aus *S. flavopersicus* konnte jeweils nur ein phosphoryliertes Produkt nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich in Analogie mit den Daten der Kinase aus *Legionella pneumophila* um Spectinomycin, das an C-9 modifiziert wurde bzw. um Actinamin, das an C-6 phosphoryliert wurde (Abb. 41). Auf den Autoradiogrammen der Dünnschichtchromatogramme, die nach der Reaktion der Phosphotransferase aus *S. spectabilis* mit Spectinomycin angefertigt wurden, waren zwei

phosphorylierte Produkte zu erkennen, von denen eines als Spectinomycin-Phosphat und das andere als Dihydrospectinomycin-Phosphat identifiziert werden konnte (s. 4.6.1.4). Nach längerer Expositionszeit zeigte sich noch ein dritter Spot. Es wäre denkbar, dass SpcN den Phosphatrest bevorzugt an eine bestimmte OH-Gruppe anhängt, aber zu einem geringen Prozentsatz auch an der anderen OH-Gruppe eine Phosphorylierung durchführen kann. Somit könnte der schwache Fleck diesem Nebenprodukt entsprechen. Oder es könnten beide Hydroxylgruppen phosphoryliert werden, was möglicherweise durch einen Überschuss an ATP begünstigt werden könnte. Da mit Dihydrospectinomycin jedoch nicht mehrere Produkte nachgewiesen wurden, scheint es wahrscheinlicher zu sein, dass die Spectinomycin-Phosphotransferase aus *S. spectabilis* nur eine Phosphatgruppe an einen spezifischen Rest anfügt. Da sowohl die Spectinomycin-Kinase aus *Legionella* als auch alle untersuchten Spectinomycin-Adenylyltransferasen C-9 als Angriffspunkt haben (Yamada et al., 1968), trifft dies möglicherweise ebenfalls auf SpcN zu. Der dritte, schwache Fleck könnte eventuell ein phosphoryliertes Anomer von Spectinomycin repräsentieren, was mit Hilfe von Massenspektroskopie und ähnlichen Untersuchungen geklärt werden müsste.

Da die Spectinomycin-Phosphotransferase intrazellulär vorliegt, muss das inaktive Spectinomycin-Phosphat nach seinem Transport aus den Zellen wieder dephosphoryliert werden. Eine für diese Reaktion verantwortliche, extrazelluläre Phosphatase konnte im sequenzierten Spc-Gencluster nicht gefunden werden. Es ist unwahrscheinlich, dass die vor dem Cluster codierte Streptomycin-6-Phosphatase StrK diese Aufgabe übernimmt, da dem Enzym am C-Terminus im Vergleich zu den analogen Proteinen aus den Streptomycin-Biosynthese-Clustern von *S. glaucescens* und *S. griseus* fast 200 Aminosäuren mit z.T. katalytischer Funktion fehlen (s. 5.1).

Möglich wäre es, dass die Transportproteine Spectinomycin sofort nach seiner Biosynthese binden, so dass die Phosphotransferase nicht angreifen könnte (s. 5.3). Da auch Actinamin durch SpcN von *S. flavopersicus* phosphoryliert wird, ist es wahrscheinlicher, dass das Substrat der Glykosyltransferase nicht Actinamin, sondern Actinamin-Phosphat darstellt. Denkbar ist auch, dass schon Vorläufer von Actinamin durch die Phosphotransferase erkannt werden. Alle weiteren Biosynthese-Intermediate würden somit ebenfalls phosphoryliert vorliegen. Dies würde auch die negativen Resultate der Aktivitätstests erklären, bei denen die Umsetzung von Dihydrospectinomycin zu Spectinomycin und umgekehrt durch die Dehydrogenasen SpcB bzw. SpcH untersucht wurden, da hier nur unphosphorylierte Substrate eingesetzt wurden.

5.6 Inaktivierung und Modifikation von Antibiotika-Biosynthese-Clustern

Die Inaktivierung einzelner Gene des Spectinomycin-Biosynthese-Clusters aus *S. flavopersicus* NRRL B-2820 wurde mit verschiedenen Zielen verfolgt.

Eine Insertion im Gen *spcR*, das entsprechend seiner Homologie zu StrR ein Transkriptionsaktivator sein sollte, sollte Hinweise liefern, welche Rolle der Regulator auf die Spc-Synthesegene ausübt. Bisher konnte noch nicht festgestellt werden, ob das Gen zum Synthese-Cluster gehört (s. 5.4). Eine Mutation in *spcR*, die gleichzeitig ein Ausbleiben der Spectinomycin-Produktion zur Folge hätte, würde dies beweisen.

Von den beiden Dehydrogenasen SpcB und SpcH ist nicht bekannt, welche Reaktion sie im Biosyntheseweg von Spectinomycin katalysieren (s. 5.2). Die Inaktivierungsversuche könnten dabei helfen, die Enzyme den postulierten Reaktionen zuzuordnen. Eine Hypothese geht davon aus, dass der unmittelbare Vorläufer im Syntheseweg von Spectinomycin Dihydro-spectinomycin ist, das durch eine Oxidoreduktase zum Endprodukt reduziert wird. Bei dem verantwortlichen Enzym könnte es sich um SpcB oder SpcH handeln. Ein Ausfall des zugehörigen Gens würde eventuell zu einer Anhäufung von Dihydro-spectinomycin führen, das leicht nachgewiesen werden könnte. Eine weitere Dehydrogenasereaktion findet schon sehr früh während der Synthese der Actinamin-Untereinheit statt. Eine Inaktivierung dieses Gens würde wahrscheinlich einen völligen Ausfall der Antibiotika-Produktion bedeuten.

Eine Mutation im Glykosyltransferasegen *spcF* bzw. im Thymidyltransferasegen *spcK* sollte die Synthese des Actinospectose-Precursors unterbinden, so dass sich Actinamin ansammelt. Dies könnte aufgereinigt werden. Über Massenspektroskopie könnte dann geklärt werden, ob Actinamin wie unter Kapitel 5.5 spekuliert, phosphoryliert in der Zelle vorliegt. Das sich akkumulierende Actinamin bzw. Actinamin-Phosphat könnte außerdem in einigen Enzymtests als Substrat eingesetzt werden. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob sich Actinamin in den Zellen anhäuft oder von den postulierten Spectinomycin-Transportproteinen SpcT bzw. SpcX erkannt und exportiert werden kann. In Hemmhof-Tests könnte ferner die antibiotische Wirkung des Moleküls überprüft werden.

Das Methyltransferasegen *spcG* sollte komplett deletiert werden. Mögliche Auswirkungen auf die Biosynthese wären, dass kein Antibiotikum mehr produziert würde oder sich eine unmethylierte Actinamin-Vorstufe anhäufen würde, da diese eventuell nicht von der Glykosyltransferase erkannt wird. Da Glykosyltransferasen aber im Allgemeinen ein sehr breites Substratspektrum sowohl für Zucker- als auch Aglycon-Reste aufweisen, erscheint es wahrscheinlicher, dass verändertes Spectinomycin ohne Methylgruppen entsteht. Dies könnte

auf seine antibiotische Wirkung getestet werden und als Vorläufersubstanz für chemische Modifikationen dienen. Außerdem könnte in den Mutanten das fehlende Gen durch andere Gene, z.B. das Amidinotransferasegen *strB1* von *S. griseus* (s. 4.8.1), komplementiert werden. Die Inaktivierungsversuche in *S. flavopersicus* scheiterten, da der Stamm nur unzureichend transformiert werden konnte, und dadurch, dass die Zellen nicht vereinzelt werden konnten und damit immer eine Mischung aus Wildtyp und Mutanten vorlag. Möglicherweise könnte Fremd-DNA in den Stamm über Kreuzungen eingebracht werden, was bislang noch überprüft wird. Zwei Mutanten-Kolonien wurden trotzdem näher analysiert. Mit Überständen von *S. flavopersicus* $\Delta G1$, bei dem das Methyltransferasegen *spcG* komplett hätte deletiert werden sollen, wurde im Hemmhof-Test eine verringerte Spectinomycin-Produktion festgestellt und das aufgereinigte Lyophilisat zeigte einen wesentlich kleineren Hemmhof beim Teststamm *S. lividans* TK64 als das Lyophilisat vom *S. flavopersicus*-Wildtyp. Dies ließe sich damit erklären, dass durch die Deletion von *spcG* kein Spectinomycin mehr produziert werden konnte bzw. eine Substanz hergestellt wurde, die auf die getesteten Bakterien nicht antibiotisch wirkte. Der kleine Hemmhof könnte auf Spectinomycin basieren, das von den noch im Isolat befindlichen Wildtyp-Zellen hergestellt wurde. Bei *S. flavopersicus* $\Delta H1$, dessen Dehydrogenasegen *spcH* mutiert wurde, konnte mittels Agarplatten-Diffusionstest und HPLC kein Spectinomycin mehr im aufgereinigten Überstand nachgewiesen werden. Nur auf dem Dünnschichtchromatogramm war noch eine Restproduktion zu erkennen. Allerdings zeigte der nicht aufgereinigte Überstand des Stamms noch Hemmhöfe, die eventuell auf Netropsin zurückzuführen sind. Es kann nun spekuliert werden, ob die Mutation von *spcH* eine komplette Inaktivierung der Spectinomycin-Synthese zur Folge hatte, oder ob eine veränderte Substanz produziert wurde. Diese konnte eventuell nicht mehr an den Ionenaustauscher, der zur Aufreinigung eingesetzt wurde, binden, oder sie besaß keine Wirkung mehr auf die Teststämme des Hemmhof-Tests. Wenn SpcH die Umwandlung von Dihydro-spectinomycin zu Spectinomycin katalysieren würde, sollte sich im Überstand der Mutante Dihydro-spectinomycin ansammeln und nachgewiesen werden können. Dies war jedoch nicht der Fall. Denkbar wäre allerdings, dass Dihydro-spectinomycin verstärkt innerhalb der Zellen vorliegt und nicht nach außen transportiert werden kann.

Die oben erwähnte Modifikation der Spectinomycin-Biosynthese durch Austausch eines Gens in *S. flavopersicus* sowie die versuchte Modifikation des Streptomycin-Biosynthesewegs in *S. griseus* (s. 4.7) hatten zum Ziel, veränderte Antibiotika zu produzieren. Diese könnten z.B. ein anderes Wirkungsspektrum oder verminderte Nebenwirkungen aufweisen. Bei *S. griseus* gelang der Austausch des Amidinotransferasegens *strB1* gegen das Methyltransferasegen

spcG aus *S. flavopersicus*. Die erhaltenen Klone zeigten in Hemmhof-Tests keine antibiotische Wirkung mehr auf die Teststämme. Dies könnte mehrere Gründe haben:

1. Durch die Protoplastierung, Transformation und Rekombination könnten weitere Rearrangements im Genom entstanden sein, die die Synthese inaktivierten.
2. Durch den Genaustausch könnte eine veränderte Streptidin-Untereinheit synthetisiert werden, die anstelle der Amidinogruppen Methylgruppen besitzt oder aber keine der beiden Gruppen trägt. Das modifizierte Molekül könnte von den Glykosyltransferasen nicht mehr erkannt oder umgesetzt werden, so dass die Synthese des Streptomycin-Derivats vorzeitig zum Erliegen kommt. Anderenfalls könnte auch das veränderte Streptomycin den nachfolgenden Enzymen nicht mehr als Substrat dienen und somit nicht aus den Zellen exportiert werden oder durch die extrazelluläre Phosphatase dephosphoryliert und damit aktiviert werden.
3. Die Streptomycin-Synthese war ohnehin schwach, da schon mit dem Überstand des *S. griseus*-Wildtyp nur kleine Hemmhöfe im Platten-Diffusionsassay erhalten wurden. Die unter Punkt 2 beschriebenen, veränderten Streptidin-Untereinheiten könnten zwar noch ein Substrat für die nachfolgenden Enzyme sein, aber mit viel geringerer Effizienz. Die Reaktionen würden langsamer ablaufen, und es würde weniger modifiziertes Streptomycin gebildet werden, das somit unter die Nachweisgrenze des Hemmhof-Tests fällt.
4. Die Mutanten könnten ein verändertes Streptomycin synthetisieren, das jedoch nicht mehr antibiotisch aktiv ist. Chemische Modifikationen, die an Spectinomycin verwirklicht wurden, zeigten, dass Veränderungen an Actinamin zu einem Verlust der antibakteriellen Aktivität führten. Diese Beobachtung könnte auch auf Änderungen an der Streptidin-Einheit zutreffen.

Ob in den aufgereinigten Überständen der Kulturen ein modifiziertes Streptomycin zu finden ist, müsste mittels Röntgenstrukturanalyse, Massenspektroskopie oder Kernresonanzspektroskopie näher analysiert werden.

Der umgekehrte Genaustausch, der in *S. flavopersicus* durchgeführt wurde, führte zu Mutanten, die keinen eindeutigen Phänotyp aufwiesen. Dies war zum einen darauf zurückzuführen, dass der Stamm sehr schlecht transformiert werden konnte. Zum anderen konnten keine Sporen mit nur einem Chromosom gewonnen werden, weshalb in den Myzelkolonien immer ein Gemisch aus Wildtyp und Mutanten vorlag. Um *S. flavopersicus* zur kombinatorischen Biosynthese einzusetzen, müssten zuerst diese Probleme gelöst werden (s. 5.9).

5.7 Netropsin-Resistenz

Die Expression der beiden Gene *netP1* und *netP2* aus *S. flavopersicus* NRRL B-2820 in *S. lividans* zeigte, dass die zugehörigen Genprodukte Resistenz gegenüber Netropsin vermitteln. Durch Datenbank-Recherchen wurden beide Proteine als ABC-Transporter identifiziert, die sich üblicherweise aus zwei Transmembran-Domänen und zwei ATP-Bindedomänen zusammensetzen. NetP1 und NetP2 wiesen die typischen Struktur motive je einer hydrophoben Transmembranregion und Konsensus-Sequenzen einer ATP-Bindedomäne auf, die vermutlich ein Heterodimer bilden. In Streptomyceten finden sich sowohl zwei auf dem Chromosom direkt benachbart liegende Transportergene mit je einer Transmembran- und ATP-Bindedomäne, wie z.B. die beiden Amphotericin-Exportproteingene *ampG* und *ampH* aus *S. nodosus*, als auch Einzelgene, die jeweils zwei Transmembran- und ATP-Bindedomänen codieren wie bei *S. coelicolor* (Abb. 42). Zum Teil wurde auch nur ein Gen mit lediglich einer Transmembran- und ATP-Bindedomäne gefunden. Es wird dann davon ausgegangen, dass sich der funktionsfähige Transporter aus zwei gleichen Untereinheiten, d.h. als Homodimer, zusammensetzt.

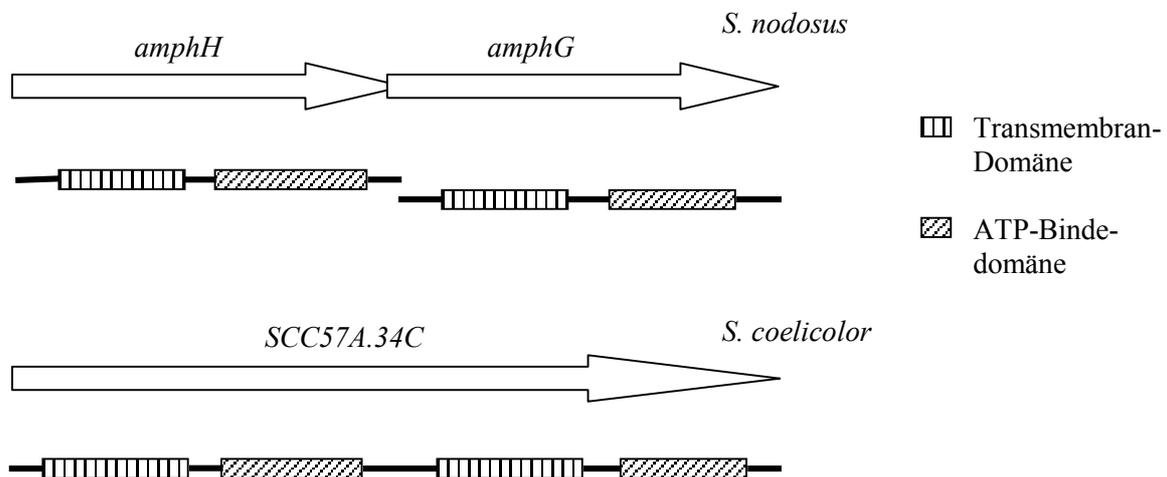


Abb. 42: Schematische Darstellung der Gene und Domänenstruktur der abgeleiteten Exportproteine AmphG und AmphH aus *S. nodosus* (AAK73498, AAK73499) und eines ABC-Transporters aus *S. coelicolor* (NP_626994).

Versuche mit verschiedenen Deletionsmutanten der Transportergene sollten Einblick verschaffen darüber, ob die Exportproteine als Homo- oder Heterodimere wechselwirken. Dabei stellte sich heraus, dass eine Deletion von 30 Aminosäuren am C-Terminus von NetP2 keinen Einfluss auf die Resistenzausbildung hatte. In „Multiple“-Sequenzvergleichen fanden sich in diesem Bereich auch keine großen Übereinstimmungen mit anderen Transporter-Sequenzen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bei dem relativ großen Protein diese letzten Aminosäuren eine untergeordnete Rolle für die Funktion spielen. Wurde dagegen mehr als ein Drittel des C-Terminus von NetP2 deletiert, so dass ein Teil der ATP-Bindedomäne entfernt wurde, wuchsen die untersuchten *S. lividans* TK23-Transformanten nicht mehr auf Platten mit 10 µg/ml Netropsin. Das Gleiche galt für eine in-Frame-Deletion in *netP1*. Daraus kann abgeleitet werden, dass beide Transporter für die Netropsin-Resistenz verantwortlich sind und wahrscheinlich ein Heterodimer bilden. Im Widerspruch dazu stehen allerdings die Ergebnisse der Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration, bei denen die Deletionsmutanten eine erniedrigte Netropsin-Resistenz zeigten im Vergleich zu Zellen mit beiden intakten Transportergenen, aber im Vergleich zum Kontrollstamm TK23 ohne Plasmid doch noch bei höheren Netropsin-Konzentrationen anwuchsen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass NetP1 und NetP2 normalerweise einen heterodimeren Transporter bilden, beide für sich aber zu einem geringen Anteil auch Homodimere bilden könnten. Die Resistenz durch diese Homodimere könnte niedriger sein, da eventuell die Wechselwirkungen zwischen den gleichen Untereinheiten nicht so stark sind, oder da für eine optimale Substrat-Erkennung und -Bindung sowohl NetP1 als auch NetP2 nötig sind. Genauere Untersuchungen mit Deletionen in beiden Genen könnten darüber nähere Erkenntnisse bringen. Ferner könnte auch versucht werden, *netP1* und *netP2* separat unter die Kontrolle eines fremden Promotors zu stellen, zu exprimieren und ihre Aktivität zu messen. Bei den Transportproteinen, die in Datenbank-Vergleichen Ähnlichkeiten zu NetP1 und NetP2 aufwiesen, handelte es sich zum großen Teil um Proteine, deren Funktion als „Multidrug“-Resistenzprotein analysiert oder postuliert wurde. Es wäre daher von Interesse, ob die ABC-Transporter aus *S. flavopersicus* ebenfalls mehrere Substrate erkennen können, ob sie spezifisch für Netropsin sind oder eventuell auch das strukturverwandte Distamycin A transportieren.

5.8 Netropsin-Biosynthese

Neben den beiden Netropsin-Resistenz-vermittelnden Transportergenen wurde auch der Beginn eines Peptid-Synthetasegens, d.h. einer Adenylierungs-Domäne, gefunden. Da für die Synthese des Peptid-Antibiotikums Netropsin eine Peptid-Synthetase benötigt wird, legte dies den Schluss nahe, dass mit den Resistenzgenen auch der Anfang des Netropsin-Biosynthese-Clusters kloniert wurde. Die Resistenzgene würden also, wie auch im Fall von Spectinomycin, geclustert mit den Biosynthesegenen vorliegen. Mit den vorhandenen Sequenzen kann somit in einer Genbank von *S. flavopersicus* nach dem/den vollständigen Peptid-Synthetasegen/en und möglicherweise weiteren Biosynthesegenen gesucht werden. Da Netropsin drei Peptid-Bindungen besitzt, sollte die Peptid-Synthetase aus drei Modulen und einer Startereinheit bestehen. Die für die Herstellung der nicht-proteinogenen Aminosäuren zuständigen Enzyme sollten ebenfalls im Cluster in Form von separaten Genen oder als zusätzliche Domänen innerhalb des Peptid-Synthetasegens codiert werden. So wäre es z.B. denkbar, dass eine Domäne vorhanden ist, die die Heterozyklusbildung zu den Pyrrolringen katalysiert. Bei Peptid-Synthetasen finden sich häufig auch Methylierungsdomänen, die für eine N-Methylierung der Peptid-Bindung verantwortlich sind. Im Fall von Netropsin befinden sich die Methylgruppen an den Pyrrolringen, so dass eventuell eher ein einzelnes Methylasegen vorhanden sein könnte.

Ein weiterer interessanter Aspekt betrifft die Regulation der Resistenzgene und der sich möglicherweise anschließenden Biosynthesegene. „Multidrug“-ABC-Transporter werden oft über globale Regulationssysteme oder über Aktivator- bzw. Repressorproteine kontrolliert, wobei das zu exportierende Molekül die Transkription der Transportergene erhöht, indem es an einen Aktivator oder Repressor bindet. Bei Antibiotika-Resistenz-vermittelnden „Multidrug“-Transportern wird die Expression häufig erst durch den Wirkstoff induziert (Putman et al., 2000). Es wäre zu klären, ob dies auch für Netropsin zutrifft und ob sich ein Regulatorgen innerhalb des Synthese-Clusters befindet. Die Agarplatten-Diffusionsassays, bei denen TK23-Transformanten mit *netP1* und *netP2* ein etwas verzögertes Wachstum aufwiesen und damit zuerst einen Hemmhof zeigten (s. 4.9.3.4), könnten eventuell darauf hindeuten, dass die Gene erst induziert werden müssen. Möglicherweise gibt es in *S. lividans* ein übergeordnetes Regulationssystem, das die *net*-Gene induziert. Alternativ könnte die Resistenz auf das Fehlen der Regulatoren hindeuten, so dass die Gene nur über eine Basalaktivität des Promotors oder durch „Read-through“ von Promotoren des Vektor transkribiert wurden.

5.9 Ausblick

Das sequenzierte und analysierte Spectinomycin-Biosynthese-Gencluster kann als Basis für eine Vielzahl weiterer Untersuchungen dienen, wovon einige schon in vorherigen Diskussionskapiteln angesprochen wurden. Ein Problem dabei stellt jedoch häufig der Stamm *S. flavopersicus* NRRL B-2820 dar, der nur mit sehr geringer Effizienz transformiert werden konnte. Ferner ließ er auch keine Bildung von Sporen erkennen, oder aber diese sind so fest im Luftmyzel verankert, dass eine Ernte der Sporen nicht möglich ist. Vor allem bei den Versuchen, die zur Geninaktivierung durchgeführt wurden (s. 4.8), erwiesen sich diese Eigenschaften als hinderlich. Ein Ziel sollte daher sein, durch geeignete Medien- und Kultivierungsbedingungen den Stamm zur Sporenbildung anzuregen bzw. die Sporen vom Myzel zu trennen. Hierfür wäre eine Behandlung mit Ultraschall denkbar. Des Weiteren wurden schon erste Experimente unternommen, um ein Konjugationssystem für *S. flavopersicus* zu etablieren. So könnte die unzureichende Transformation umgangen werden. Als Konjugationspartner kommt dabei neben anderen Streptomycceten-Stämmen auch *E. coli* in Frage. Transfektion mit spezifischen Phagen wie ϕ C31 stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Transformation zu umgehen.

Als störend erwies sich zusätzlich das Restriktions-/Modifikationssystem von *S. flavopersicus* (s. 4.1.3), so dass keine Vektoren mit *Pst*I-Schnittstellen verwendet werden konnten. Daher wäre es denkbar, Mutanten herzustellen, die defizient in diesem System sind. Experimente mit dem Plasmid pCDC201, das ein *Pst*I-Methyltransferasegen trägt, könnten ausgeweitet werden (s. 4.8.1). Des Weiteren könnte die *Pst*I-Methylase aufgereinigt werden, um damit die DNA vor einer Transformation, Transfektion oder Konjugation zu behandeln.

Ein weiteres Bestreben besteht in der Aufklärung der Regulation des Spc-Genclusters. Mitsamt dem zugehörigen Regulatorgen wäre es dann eventuell möglich, das Cluster doch in *S. lividans* zu exprimieren. Mit dem „Shotgun“-Verfahren könnte *S. lividans* TK64/pTST63 (besitzt im Genom integriertes Spc-Cluster) mit den Cosmiden der *S. flavopersicus*-Genbank transformiert werden. Ein Screening nach Spectinomycin-produzierenden Transformanten könnte so Plasmide identifizieren, auf denen ein Syntheseweg-spezifischer Regulator oder übergeordnete Kontrollelemente codiert sind.

Einzelne Gene des Spectinomycin-Biosynthese-Clusters könnten heterolog exprimiert werden und ihre Aktivität, sofern die Substrate zugänglich sind, überprüft werden. Somit könnten nähere Einblicke in den Biosyntheseweg gewonnen werden. Eine enge Zusammenarbeit mit

der Chemie zur Synthese einiger möglicher Substrate und zur Aufklärung einiger Strukturen mittels Kernresonanzspektroskopie und anderen Verfahren wäre hierbei von Vorteil.

Zudem sind vielfältige Versuche zur kombinatorischen Biosynthese denkbar, wie die Inaktivierung und der Austausch einzelner Gene oder der gesamten Gene für eine Untereinheit (s. 2.3). Auch wenn Spectinomycin wegen seiner wenig komplexen Grundstruktur eine gute Ausgangssubstanz für Modifikationen darstellt, ist es aufgrund der oben beschriebenen Probleme mit *S. flavopersicus* eher ratsam, andere Antibiotika-Produzenten heranzuziehen. In diese Stämme könnten dann die Spectinomycin-Synthesegene eingebracht werden.

Auch das Netropsin-Projekt lässt noch viele Fragen und Ansätze hinsichtlich der Resistenz und Biosynthese offen. Einige davon wurden unter den Kapiteln 5.7 und 5.8 angesprochen. Würde es gelingen, eine Transformations- oder Konjugationsmethode für *S. flavopersicus* zu entwickeln, könnten über Inaktivierungen eventuell Mutanten erhalten werden, die kein Netropsin mehr produzieren. Diese würden Untersuchungen zur Spectinomycin-Biosynthese erheblich vereinfachen. Netropsin-resistente *S. lividans* TK64-Transformanten bieten z.B. einen ersten Ausgangspunkt, indem sie als Teststämme in Hemmhof-Assays im Vergleich zu Netropsin- und Spectinomycin-resistenten TK23-Transformanten zum Nachweis von Spectinomycin eingesetzt werden können.

6 Literaturverzeichnis

- Altenbuchner, J., Viell, P. & Pelletier, I. (1992):** Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. *Methods Enzymol.* **216**, 457-566.
- Aparacio, J.F., Fouces, R., Mendes, M.V., Oliviera, N. & Martin, J.F. (2000):** A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*. *Chem. Biol.* **7**, 895-905.
- Beerman, T.A., Woynarowski, J.M., Sigmund, R.D., Gawron, L.S., Rao, K.E. & Lown, J.W. (1991):** Netropsin and bis-netropsin analogs as inhibitors of the catalytic activity of mammalian DNA topoisomerase II and topoisomerase cleavable complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1090**, 52-60.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. & Hopwood, D.A. (2002):** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
- Benveniste, R. & Davies, J. (1973):** Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2.276-2.280.
- Berman, H.M., Neidle, S., Zimmer, C. & Thrum, H. (1979):** Netropsin, a DNA-binding oligopeptide, structural and binding studies. *Biochim. Biophys. Acta* **561**, 124-131.

- Bernard, P., Kezdy, K.E., Van Melderen, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M.L., Higgins, P.N. & Couturier, M. (1993):** The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.* **234**, 534-541.
- Bibb, M.J. (1996):** The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.* **142**, 1.335-1.344.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. & Boyer, H.W. (1977):** Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95-113.
- Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix, D. (1969):** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**, 459-472.
- Bradford, M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brink, M.F., Brink, G., Verbeet, M.P. & de Boer, H.A. (1994):** Spectinomycin interacts specifically with the residues G₁₀₆₄ and C₁₁₉₂ in 16S rRNA, thereby potentially freezing this molecule into an inactive conformation. *Nucleic Acids Res.* **22**, 325-331.
- British Pharmacopoeia*, **1** (1998). London.
- Brünker, P., Altenbuchner, J., Kulbe, K.D. & Mattes, R. (1997):** Cloning, nucleotide sequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1351**, 157-167.
- Bruzik, J.P., Auble, D.T. & deHaseth, P.L. (1987):** Specific activation of transcription initiation by the sequence-specific DNA-binding agents distamycin A and netropsin. *Biochemistry* **26**, 950-956.
- Cane, D.E., Walsh, C.T. & Khosla, C. (1998):** Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63-68.

- Carteau, S., Mouscadet, J.F., Goulaouic, H., Subra, F. & Auclair, C. (1994):** Inhibition of the *in vitro* integration of moloney murine leukemia virus DNA by the DNA minor groove binder netropsin. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1.821-1.826.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberley, B.T. & Ramakrishnan, V. (2000):** Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**, 340-348.
- Chang, A.C.Y. & Cohen, S.N. (1978):** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1.141-1.156.
- Chater, K.F. & Bibb, M.J. (1997):** Regulation of bacterial antibiotic production. In *Biotechnology* 7, 57-105. Products of secondary metabolism. Kleinkauf, H. & Dören, H.v. (eds.), VCH, Weinheim.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. (1989):** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**, 1.159-1.166.
- Clarke, L. & Carbon, J. (1976):** A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**, 91-99.
- Debremaeker, D., Adams, E., Nadal, E., Van Hove, B., Roets, E. & Hoogmartens, J. (2002):** Analysis of spectinomycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **953**, 123-132.
- Dente, L., Cesareni, G. & Cortese, R. (1983):** pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1.645-1.655.
- Devereux, J., Haerberli, P. & Smithies, O. (1984):** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-392.

- Distler, J., Braun, C., Ebert, A. & Piepersberg, W. (1987):** Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: analysis of a central region including the major resistance gene. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 204-210.
- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M. & Piepersberg, W. (1987):** Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8.041-8.056.
- Driessen, A.J.M., Jacobs, M.H.J. & Konings, W.N. (1997):** A new family of prokaryotic transport proteins: binding protein-dependent secondary transporters. *Mol. Microbiol.* **24**, 881-883.
- Driessen, A.J.M., Rosen, B.P. & Konings, W.N. (2000):** Diversity of transport mechanisms: common structural principles. *TIBS* **25**, 397-401.
- Finlay, A.C., Hochstein, F.A., Sobin, B.A. & Murphy, F.X. (1951):** Netropsin, a new antibiotic produced by a *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 341-343.
- Fischer, J., Maier, H., Viell, P. & Altenbuchner, J. (1996):** The use of an improved transposon mutagenesis system for DNA sequencing leads to the characterization of a new insertion sequence of *Streptomyces lividans* 66. *Gene* **180**, 81-89.
- Gräfe, U. (1992):** *Biochemie der Antibiotika: Struktur - Biosynthese - Wirkmechanismus*. Spektrum, Akademischer Verlag. ISBN: 3-86025-002-7.
- Haas, M.J. & Dowding, J.E. (1975):** Aminoglycosid-modifying enzymes. *Methods Enzymol.* **43**, 611-628.
- He, X.M. & Liu, H. (2002):** Formation of unusual sugars: mechanistic studies and biosynthetic applications. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 701-754.
- Higgins, C.F. (1992):** ABC-transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**, 67-113.

- Hillemann, D., Pühler, A. & Wohlleben, W. (1991):** Gene disruption and gene replacement in *Streptomyces* via single stranded DNA transformation of integration vectors. *Nucl. Acids Res.* **19**, 727-731.
- Hochuli, E., Döbeli, H. & Schacher, A. (1987):** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromat.* **411**, 177-184.
- Hoecksema, H. & Knight, J.C. (1975):** The production of dihydrospectinomycin by *Streptomyces spectabilis*. *J. Antibiot.* **28**, 240-241.
- Hohn, B. (1979):** *In vitro* packing of λ and cosmid DNA. *Methods Enzymol.* **68**, 299-309.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, R.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. & Schrempf, H. (1985):** *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual*. Norwich: John Innes Foundation.
- Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M. & Bibb, M.J. (1983):** Plasmids, recombination and chromosome mapping in *S.lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2.257-2.269.
- Hyun, C.-G., Kim, S.S., Sohng, J.K., Hahn, J.-J., Kim, J.-W. & Suh, J.-W. (2000):** An efficient approach for cloning the dNTP-glucose synthase gene from actinomycetes and its application in *Streptomyces spectabilis*, a spectinomycin producer. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**, 183-189.
- 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.
- Katz, E., Thompson, C.J. & Hopwood, D.A. (1983):** Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2.703-2.714.
- Kieser, T. (1984):** Factors affecting the isolation of ccc DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**, 19-36.

- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. & Hopwood, D.A. (2000):** *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: John Innes Foundation.
- Kopka, M.L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P. & Dickerson, R.E. (1985):** Binding of an antitumor drug to DNA, netropsin and C-G-C-G-A-A-T-T-BrC-G-C-G. *J. Mol. Biol.* **183**, 553-563.
- Laemmli, U.K. (1970):** Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, S.Y. & Rasheed, S. (1990):** A simple procedure for maximum yield of high quality plasmid DNA. *BioTechniques* **9**, 676-679.
- Lipman, D.J. & Pearson, W.R. (1985):** Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**, 1.435-1.441.
- Luria, S.E., Adams, J.N. & Ting, R.C. (1960):** Transduction of the lactose utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particle. *Virology* **12**, 348-390.
- Lyutzkanova, D., Nikolova, B., Stoilova-Discheva, M. & Todorov, T. (1993):** Protoplast formation and regeneration in *Streptomyces flavopersicus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**, 217-219.
- Lyutzkanova, D., Distler, J. & Altenbuchner, J. (1997):** A spectinomycin resistance determinant from the spectinomycin producer *Streptomyces flavopersicus*. *Microbiol.* **143**, 2.135-2.143.
- 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.

- Mansouri, K. & Pipersberg, W. (1991):** Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of five genes, *strFGHIK*, including a phosphatase gene. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 459-469.
- Marsh, J.L., Erfle, M. & Weykes, E.J. (1984):** The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**, 481-485.
- Martin, J.F. & Liras, P. (1981):** Biosynthetic pathway of secondary metabolites in industrial microorganisms. In *Biotechnology* **1**, 211-237. Rehm, H.-J. & Reed, G. (eds.), VCH, Weinheim.
- Martin, J.F. & Liras, P. (1989):** Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**, 173-206.
- Mason, D.J., Dietz, A. & Smith, R.M. (1961):** Actinospectacin, a new antibiotic. I. Discovery and biological properties. *Antibiot. Chemother.* **11**, 118-122.
- McCarthy, A.J. & Williams, S.T. (1992):** Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene* **115**, 189-192.
- Méndez, C. & Salas, J.A. (1998):** ABC transporters in antibiotic-producing actinomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **158**, 1-8.
- Méndez, C. & Salas, J.A. (2001):** Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends Biotechnol.* **19**, 449-456.
- Miller, M.B. & Bassler, B.L. (2001):** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165-199.
- Mitscher, L.A., Martin, L.L. & Feller, D.R. (1971):** The biosynthesis of spectinomycin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 1.541-1.542.

- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G.T. & Ehrlich, H.A. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Norlander, J., Kempe, T. & Messing, J. (1983):** Construction of improved M13 vectors using oligonucleotide directed mutagenesis. *Gene* **26**, 101-106.
- Oh, S.-H. & Chater, K.F. (1997):** Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Possible relevance to other organisms. *J. Bacteriol.* **179**, 122-127.
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H. & Horinouchi, S. (1999):** The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* **34**, 102-111.
- Okuda, T. & Ito, Y. (1982):** Biosynthesis and mutasynthesis of aminoglycoside antibiotics. In *Aminoglycoside antibiotics*, 111-203. Umezawa, H. & Hooper, I.R (eds.). Springer, Berlin.
- Oliver, P.J., Goldstein, A., Bower, R.R., Holper, J.C. & Otto, R.H. (1962):** M-141, a new antibiotic. I. Antimicrobial properties, identity with actinospectacin, and production by *Streptomyces flavopersicus*, sp.n. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1961**, 495-502.
- 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**, 12.215-12.220.
- Pederson, A.H.B., Wiesner, P.J., Holmes, K.K., Johnson, C.J. & Turck, M. (1972):** Spectinomycin and penicillin G in the treatment of gonorrhoea. A comparative evaluation. *J. Am. Med. Assoc.* **220**, 205-208.

- Piepersberg, W. (1985):** Aminoglycosid-Antibiotika: wichtige Therapeutika und Objekte der Grundlagenforschung. *Forum Mikrobiol.* **85**, 153-161.
- Piepersberg, W. & Distler, J. (1997):** Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In *Biotechnology* **7**, 397-487. Rehm, H.-J. & Reed, G. (eds.). VCH, Weinheim
- Pinto-Alphandry, H., Mabilat, C. & Courvalin, P. (1990):** Emergence of aminoglycoside resistance genes *aadA* and *aadE* in the genus *Campylobacter*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1.294-1.296.
- Poot, M., Kausch, K., Kohler, J., Haaf, T. & Hoehn, H. (1990):** The minor-groove binding DNA-ligands netropsin, distamycin A and berenil cause polyploidisation via impairment of the G2 phase of the cell cycle. *Cell Struct. Funct.* **15**, 151-157.
- Pridham, T.G., Anderson, P., Foley, C., Lindenfesler, C.W., Hesseltime, C.W. & Benedict, R.C. (1957):** A selection for media for maintenance and taxonomic studies of *Streptomyces*. *Antibiot. Annu.* **1956-1957**, 947-953.
- Putman, M., van Veen, H.W. & Konings, W.N. (2000):** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 672-693.
- Retzlaff, L. & Distler, J. (1995):** The regulator of streptomycin gene expression, StrR, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol. Microbiol.* **18**, 151-162.
- Ribaud, A., Zalacain, M., Holt, T.G., Tizard, R. & Tompson, C.J. (1991):** Nucleotide sequence analysis reveals linked N-acetyl hydrolase, thioesterase, transport, and regulatory genes encoded by the bialaphos biosynthetic gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Bacteriol.* **173**, 4.454-4.463.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M. & Henikoff, S. (1998):** Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1.628-1.635.

- Rosenbrook, W. (1979):** Chemistry of spectinomycin. *Jap. J. Antibiotics* **32**, 211-227.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989):** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA* **74**, 5.463-5.467.
- Schermerhorn, P.G., Chu, P.-S. & Kiljak, P.J. (1995):** Determination of spectinomycin residues in bovine milk using liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Agric. Food. Chem.* **43**, 2.122-2.155.
- Sedlmeier, R. & Altenbuchner, J. (1992):** Cloning and DNA sequence analysis of the mercury resistance genes of *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 76-85.
- Sherma, J. (1991):** *Handbook of thin-layer chromatography* **55**. New York: Dekker, 991. VIII.
- Sinnott, M.L. (1991):** Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1.170-1.202.
- Skeggs, P.A., Holmes, D.J. & Cundliffe, E. (1987):** Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other organisms. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 915-923.
- Snounou, G. & Malcolm, A.D. (1983):** Production of positively supercoiled DNA by netropsin. *J. Mol. Biol.* **167**, 211-216.
- Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F. & Miller, N.E. (2001):** Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1.097-1.106.

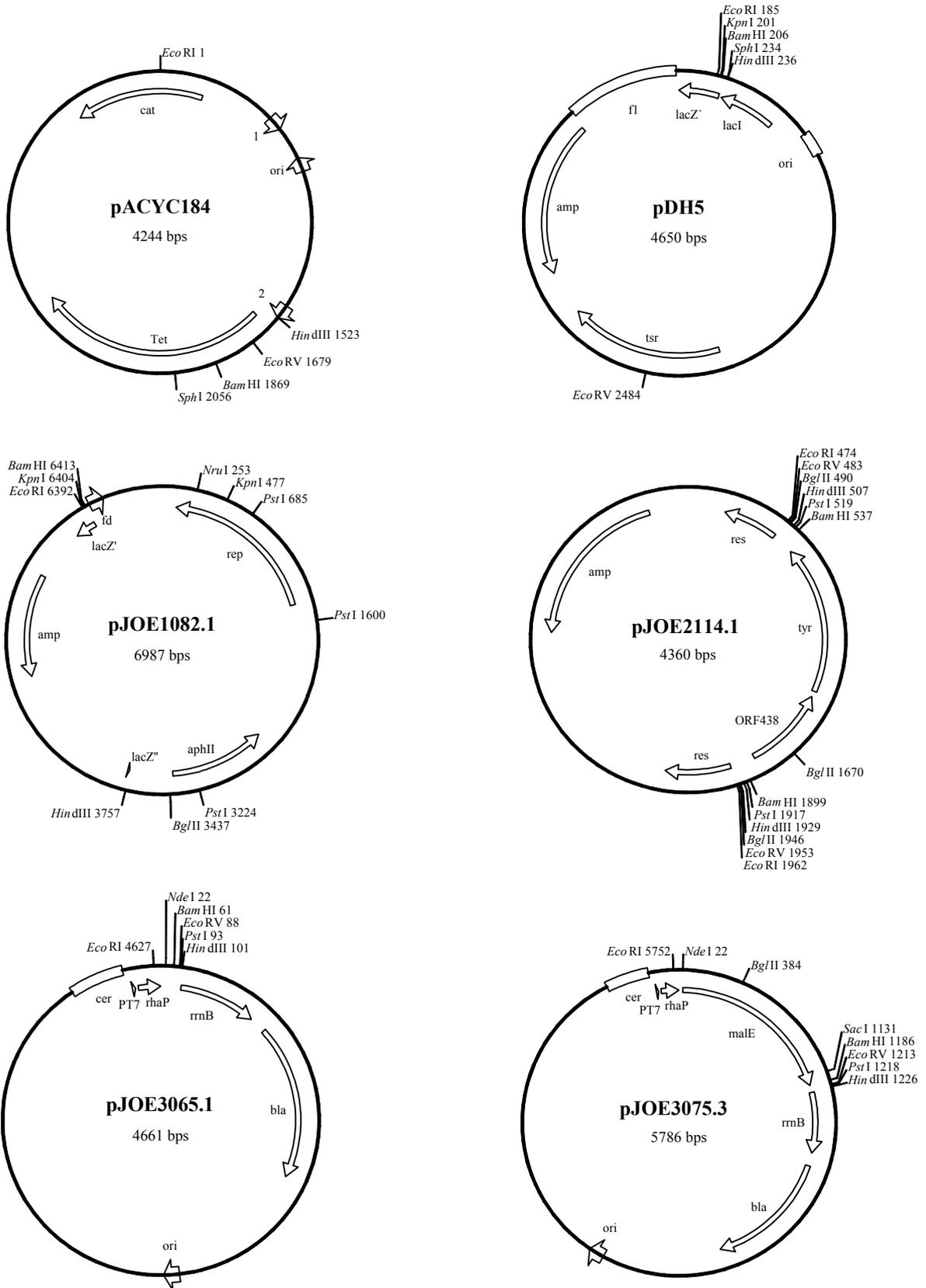
- Sosio, M., Bossi, E., Bianchi, A. & Donadio, S. (2000):** Multiple peptide synthetase gene clusters in actinomycetes. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 213-221.
- Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M.A. (1995):** Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* **269**, 69-72.
- Stockmann, M. & Piepersberg, W. (1992):** Gene probes for the detection of 6-deoxyhexose metabolism in secondary metabolite-producing streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **90**, 185-190.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986):** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-119.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. (1990):** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Stumpp, T., Wilms, B. & Altenbuchner, J. (2000):** Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *Biospektrum* **6**, 33-36.
- Stumpp, T., Jennen, D., Lyutzkanova, D., Starodubtseva, L. & Altenbuchner, J. (2002):** Cloning of the spectinomycin biosynthesis genes. In *Microbial secondary metabolites: biosynthesis, genetics and regulation*, 27-41. Fierro, F. & Martin, J.F. (Eds.). ISBN: 81-7736-113-9.
- 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. *Microbiol.* **143**, 3.251-3.262.
- Suter, T.M., Viswanathan, V.K. & Cianciotto, N.P. (1997):** Isolation of a gene encoding a novel spectinomycin phosphotransferase from *Legionella pneumophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1.385-1.388.

- Thamm, S. (1999):** Genetische und biochemische Untersuchung von StrR - dem „pathway“-spezifischem Transkriptionsaktivator von Genen der Streptomycin-Biosynthese in *S. griseus* N2-3-11. *Dissertation*, Universität Wuppertal.
- Thomas, R.C. & Fritzen, E.L. (1988):** Spectinomycin modification: IV. The synthesis of 3'-aminomethyldihydrospectinomycins via spectinomycin 3'-cyanohydrins. *J. Antibiot.* **41**, 1.439-1.451.
- Thompson, P.R., Hughes, D.W., Cianciotto, N.P. & Wright, G.D. (1998):** Spectinomycin kinase from *Legionella pneumophila*: characterization of substrate specificity and identification of catalytically important residues. *J. Biol. Chem.* **273**, 14.788-14.795.
- Torkkell, S., Kunnari, T., Palmu, K., Mäntsälä, P., Hakala, J. & Ylihonko, K. (2001):** The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces nogalater*: characterization of a 20-kb DNA region and generation of hybrid structures. *Mol. Gen. Genet.* **266**, 276-288.
- Trefzer, A., Salas, J.A. & Bechthold, A. (1999):** Genes and enzymes involved in deoxysugar biosynthesis in bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 283-299.
- Vögtli, M. & Hütter, R. (1987):** Characterization of the hydroxystreptomycin phosphotransferase gene (*sph*) of *Streptomyces glaucescens*: nucleotide sequencing and promoter analysis. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 195-203.
- Wahl, G.M., Lewis, K.A., Ruiz, J.C., Rothenberg, B., Zhao, J. & Evans, G.A. (1987):** Cosmid vectors for rapid genomic walking, restriction mapping, and gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **84**, 2.160-2.164.
- Walker, J.B. (1975):** ATP:streptomycin 6-phosphotransferase. *Methods Enzymol.* **43**, 628-632.
- Walker, J.B. (1990):** Possible evolutionary relationships between streptomycin and bluensomycin biosynthetic pathways: detection of novel inositol kinase and O-carbamoyltransferase activities. *J. Bacteriol.* **172**, 5.844-5.851.

- Walker, J.B. (1995):** Enzymatic synthesis of aminocyclitol moieties of aminoglycoside antibiotics from inositol by *Streptomyces* spp.: detection of glutamine-aminocyclitol aminotransferase and diamino-cyclitol aminotransferase activities in a spectinomycin producer. *J. Bacteriol.* **177**, 818-822.
- Ward, M.E. (1977):** The bactericidal action of spectinomycin on *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **3**, 323-329.
- Wietzorrek, A. & Bibb, M.J. (1997):** A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol. Microbiol.* **25**, 1.177-1.184.
- Witte, W. & Klare, I. (1999):** Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern. *Bundesgesundheitsblatt* **42**, 8-16.
- Yamada, T., Tipper, D. & Davies, J. (1968):** Enzymatic inactivation of streptomycin by R factor-resistant *Escherichia coli*. *Nature* **219**, 288-291.
- Yamamoto, M., Okachi, R., Takasawa, S., Kawamoto, I., Kumakawa, M., Sato, S. & Nara, T. (1974):** Production of spectinomycin by a new subspecies of *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiot.* **27**, 79-80.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985):** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp 18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

7 Anhang

7.1 Restriktionskarten einiger Vektoren



8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tina Verena Marlies Stumpp
Anschrift: Blarerstr.1
D-70374 Stuttgart
Geburtsdatum: 04.08.1973
Geburtsort: Stuttgart
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

09/1980 - 07/1984 Eichendorff-Grundschule in Stuttgart
09/1984 - 05/1993 Elly-Heuss-Knapp-Gymnasium in Stuttgart
Abschluß: Abitur
10/1993 - 11/1998 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart
(Hauptfach: Industrielle Genetik;
Nebenfächer: Immunologie, Mikrobiologie)
Abschluß: Diplom
01/1998 - 11/1998 Diplomarbeit am Institut für Industrielle Genetik der Universität
Stuttgart, bei Prof. Dr. R. Mattes
(„Analyse der Spectinomycin-Biosynthese von *Streptomyces
flavopersicus* NRRL2820“)
01/1999 - 05/2003 Doktorarbeit am Institut für Industrielle Genetik der Universität
Stuttgart, bei Prof. Dr. R. Mattes