Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Avilamycin-Biosynthese und Resistenz in *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

1998

vorgelegt von

Sibylle Gaisser

Tag der mündlichen Prüfung:	27. August 1998
Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. L. Heide
2. Berichterstatter:	PD Dr. A. Bechthold

Es ist eine trügerische Hoffnung, eine bessere Welt schaffen zu können, wenn man nicht zuvor die Einzelwesen besser macht. Um das aber zu erreichen, muß jeder an seiner eigenen Vervollkommnung arbeiten, da er durch seinen Anteil für das Ganze mitverantwortlich ist.

Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG 2

2 EINLEITUNG 4

2.1 Antibiotika im Wandel der Zeit 4

2.2 Resistenzmechanismen und ihre Verbreitung 4

2.3 Wege zu neuen Antibiotika 6

2.4 Voraussetzungen für die Kombinatorische Biosynthese 7

2.5 Polyketidsynthasen 8

2.6 Die Gattung Streptomyces 10

2.7 Genetik von Streptomyceten 10

2.8 Streptomyces viridochromogenes - der Produzent des Orthosomycinantibiotikums Avilamycin 11

2.9 Wirkmechanismus von Avilamycin A 13

2.10 Klonierungsstrategien 13

2.11 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit 15

3 MATERIAL UND METHODEN 16

3.1 Nährmedien 16

3.1.1 Medium zur Kultivierung von E.coli 16

3.1.2 Medium zur Kultivierung von Bacillus subtilis 16

3.1.3 Medien zur Kultivierung von Streptomyceten 16

3.1.4 Medium zur Protoplastentransformation von Streptomyceten 17

3.1.5 Produktionsmedien 18

3.2 Antibiotika 18

3.3 Puffer und Lösungen 18

3.3.1 DNA-Gelelektrophorese 18

3.3.2 Sequenzierung 19

3.3.3 Protein-Gelelektrophorese 19

3.3.4 Transformation 20

3.4 Chemikalienliste 21

3.4.1 Enzyme 21

3.4.2 Medien-Bestandteile 21

3.4.3 Chemikalien 21

3.5 Stämme und Plasmide 22

3.5.1 Bakterien-Stämme 22

3.5.2 Vektoren 22

3.5.3 Eigene Plasmid-Konstrukte 23

3.6 Kulturbedingungen 24

3.6.1 Anzucht und Kultivierung von E.coli 24

3.6.2 Anzucht und Kultivierung von Streptomyceten *24*
3.6.3 Antibiotika-Gradienten-Platte *24*
3.6.4 Herstellung einer Sporensuspension *24*
3.6.5 Herstellung von Protoplasten *24*
3.7 Isolierung von DNA 25
3.7.1 Isolierung genomischer DNA *25*
3.7.2 Plasmidisolierung *25*
3.8 Prozessierung von DNA 26
3.8.1 Restriktionsspaltung und Charakterisierung von DNA *26*
3.8.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel *27*
3.8.3 Ligation von DNA *27*
3.8.4 Transformation in E.coli *27*
3.8.5 Transformation von Streptomyceten *27*
3.8.6 Erstellung einer Cosmid-Bank *27*
3.8.7 Kolonie- und Southern-Hybridisierung *28*
3.8.8 PCR-Methoden *28*
3.8.9 Konstruktion des Überexpressionskonstrukts *31*
3.9 DNA-Sequenzierung 31
3.9.1 Sequenzier-Reaktion *31*
3.9.2 Auswertung der Sequenzdaten *32*
3.10 Identifikation und Charakterisierung des Resistenzgens 32
3.11 Isolierung und Analytik von Sekundärstoffen 33
3.11.1 Isolierung von Avilamycin *33*
3.11.2 Agardiffusionstest *33*
3.11.3 Analytik von Avilamycin *34*
3.11.4 Isolierung von Orsellinsäure *34*
3.11.5 Analytik von Orsellinsäure *35*
3.12 Aktivitätsbestimmung der Orsellinsäuresynthase AviM 35
3.12.1 Herstellung des zellfreien Extrakts *35*
3.12.2 Aktivitätsbestimmung von AviM im Rohextrakt *35*
3.13 Isolierung und Aktivitätsbestimmung der UDP-Glucose-4-Epimerase 36
3.13.1 Isolierung eines Histidinfusionsproteins *36*
3.13.2 Bestimmung der Proteinkonzentration *36*
3.13.3 min Silberfärbung *36*
3.13.4 Bestimmung der Enzymaktivität der UDP-Glucose-4-Epimerase *37*

4 ERGEBNISSE 38
4.1 Charakterisierung von Streptomyces viridochromogenes Tü57 38
4.2 Herstellung und Screening einer Cosmidbank 38
4.2.1 Herstellung der Cosmidbank *38*

4.2.2 Herstellung der Sonde ... 39
4.2.3 Screening der Cosmidbank ... 40
4.3 Charakterisierung der hybridisierenden Cosmide ... 41
4.3.1 Grundlagen ... 41
4.3.2 Restriktionskartierung der hybridisierenden Cosmide ... 42
4.3.3 Southern-Hybridisierungsexperimente und Partialsequenzierung ... 43
4.3.4 Anordnung der Cosmide ... 46
4.4 AviM - eine ungewöhnliche Polyketidsynthase ... 48
4.4.1 Biosynthesegene im zentralen Bereich von Cosmid F4 ... 48
4.4.2 Analyse von AviM und AviN auf Proteinebene ... 51
4.4.3 Funktionelle Expression von aviM ... 54
4.4.4 Identifikation des Produkts von AviM ... 56
4.5 Resistenzmechanismen in S.viridochromogenes Tü57 ... 58
4.5.1 Grundlagen ... 58
4.5.2 Identifikation eines ABC-Transporters im Avilamycin-Biosynthesecluster ... 59
4.5.3 Lokalisation und Expression des ABC-Transportergens aviABC ... 62
4.5.4 Identifikation eines weiteren Resistenz-vermittelnden Bereichs ... 62
4.5.5 Charakterisierung des Resistenz-vermittelnden Bereichs ... 64
4.5.6 Untersuchungen zur Funktion von AviQ ... 66
4.5.7 Eingrenzung des Resistenz-vermittelnden Bereichs ... 69
4.5.8 Klonierung und Expression von aviR und aviRII in S.lividans ... 71
4.5.9 Expression von AviR in E.coli ... 72
4.5.10 Untersuchungen zur Funktion von AviR ... 73
4.5.11 Einfluß der Kopienzahl des Resistenz-vermittelnden Bereichs auf die Resistenzstärke ... 74
4.5.12 Spezifität des Resistenz-vermittelnden Bereichs ... 75
5 DISKUSSION ... 76
5.1 Identifikation des Avilamycin-Biosynthesegenclusters ... 76
5.2 Kartierung des isolierten Biosynthesegenclusters ... 77
5.3 AviM - eine ungewöhnliche Polyketidsynthase ... 79
5.4 Ein ABC-Transporter in S.viridochromogenes Tü57 ... 80
5.5 AviQ - eine UDP-Glucose-4-Epimerase ... 81
5.6 Das Resistenzgen aviR ... 83
5.7 Kreuzresistenz zwischen dem Humanantibiotikum Sch27899 und dem "Leistungsförderer" Avilamycin ... 85
6 LITERATURVERZEICHNIS ... 86
7 ANHANG ... 94
7.1 DNA Sequenzen ... 94
7.1.1 PCR-Fragment von aviE ... 94

7.1.2 aviN und aviM 94
7.1.3 Resistenz-vermittelnder Bereich 99
7.1.4 PCR-Fragment von aviABC 101
7.2 Vektoren 102
7.2.1 pBluescript-SK⁻ (Stratagene) 102
7.2.2 pOJ446 (Biermann et al., 1992) 102
7.2.3 pWHM3 (Vara et al., 1989) 103
7.2.4 pKC1218 (Bierman et al., 1992) 103
7.2.5 pWHM4 =pEM4 (Quiros et al., 1998) 104*
7.2.6 pRSETb (Invitrogen) 104
8 DANKSAGUNG 105
9 LEBENSLAUF 107

Abkürzungen und Akronyme

*g	mal Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
µ	mikro
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP-binding cassette-Transporter
*aph*I	Neomycinresistenzgen, kodiert für eine Aminophosphotransferase
APS	Ammoniumperoxosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
aviD	dNDP-Glucose-Synthetasegen aus dem Avilamycin-Biosynthesegencluster
aviE	dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen aus dem Avilamycin-Biosynthesegencluster
aviF	UDP-Glucose-4-Epimerasegen aus dem Avilamycin-Biosynthesegencluster
aviM	Orsellinsäuresynthasegen aus dem Biosynthesegencluster für Avilamycin
AviM	Genprodukt von *aviM,* die Orsellinsäuresynthase
aviN	Gen aus dem Biosynthesecluster von Avilamycin, homolog zu *dpsC*
aviQ	UDP-Glucose-4-Epimerasegen aus dem Avilamycin-Biosynthesegencluster
aviR	ORF, der für Resistenzgen kodiert
*aviR*II	ORF, in umgekehrter Orientierung zu *aviR*
bp	Base
CoA	Coenzym A
chlC	putatives Epimerasegen aus dem Chlorothricin-Biosynthesegencluster
chlD	dTDP-Glucose-Synthetasegen aus dem Chlorothricin-Biosynthesegencluster
d	Dicke der Küvette (cm)
Da	Dalton
dam	DNA-Adenin-Methylase
DC	Dünnschichtchromatographie
dcm	DNA-Cytosin-Methylase
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
ΔE	Extinktionsänderung
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNDP	Desoxynucleosiddiphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dpsC	Gen aus dem Biosynthesegencluster von Daunorubicin/Doxorubicin
Δt	Zeitintervall
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffzient
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f	Größe des DNA-Inserts/Größe des Genoms
F	Verdünnungsfaktor
FTM	Fortimicin
FTMKH	Zwischenprodukt in der Fortimicinbiosynthese
GC-Gehalt	Gehalt an Guanosin und Cytosin in der DNA
h	Stunde
His	Histidinrest
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-ß-thiogalaktopyranosid
kat	katal, Einheit der katalytischen Aktivität: 1 mol Substrat umgesetzt in 1 sec
kb	Kilobasenpaare
K_m	Michaelis-Menten-Konstante

KP_i	Kaliumphosphatpuffer bestehend aus K_2HPO_4 und KH_2PO_4
l	Liter
lacZ	ß-Galactosidasegen
m	milli
M	molar
min	Minuten
MSAS	Methylsalicylsäuresynthase aus *Penicillium patulum*
N	Anzahl der zu untersuchenden Klone
n	nano
NAD	ß-Nicotinamidadenindinucleotid
NMR	nuclear magnetic resonance
ORF	offener Leserahmen
p	pico
P	Identifikationswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBS	Ribosomenbindungsstelle
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.	*Streptomyces*
Sch27899	Everninomycin-Derivat von Schering-Plough, USA
SDS	Natriumdodecylsulfat
T3	Primersequenz zum Sequenzieren in pBluescript SK^-
T7	Primersequenz zum Sequenzieren in pBluescript SK^-
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonat
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UV	ultraviolettes Licht
V	Volumen des Reaktionsansatzes
vgl.	vergleiche
v_{max}	maximale Geschwindigkeit der Katalyse einer Enzymreaktion
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid

Die verwendeten Vektoren und Vektorkonstrukte, sowie die eingesetzten Bakterienstämme sind im Abschnitt Material und Methoden 3.5 aufgelistet.

Weitgehende Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Wissenschaftliche Publikationen

S. Gaisser, A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning, A. Bechthold: "Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tü57". J. Bacteriol. (1997), **179** (20): 6271-6278.

L. Westrich, S. Gaisser, B. Reichenstein, A. Bechthold: "Preparation and Screening of Cosmid Libraries from Streptomyces Strains Using the Rapid DNA Ligation Kit, Digoxygenin Labelling-, and Detection Kit from Boehringer Mannheim". Biochemica Information (1997), **101:**30-32.

H. Decker, S. Gaisser, S. Pelzer, P. Schneider, L. Westrich, W. Wohlleben, A. Bechthold: "A general approach for cloning and characterization of dNDP-glucose dehydratase genes from actinomycetes." FEMS Microbiol. Letters (1996) **14**: 195-201.

Tagungsbeiträge

Vorträge

S. Gaisser, S. Stockert, A. Bechthold: "Überexpression und funktionelle Charakterisierung von Genen aus dem Biosynthese-Cluster für Avilamycin A aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü57." Symposium zu Plasmiden und Genregulation, Blaubeuren, Oktober 1997.

S. Gaisser, S. Stockert, A. Trefzer, A. Bechthold: "Klonierung des Biosynthese-Clusters für Avilamycin A aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü57."
VAAM-Workshop: Biologie der Actinomyceten, Tübingen, September 1996.

Poster:

S. Gaisser, S. Stockert, A. Bechthold: "Isolation of a DNA region from *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 involved in the biosynthesis of avilamycin A."
Symposium Enzymology of Biosynthesis of Natural Products, Berlin, September 1996.

S. Gaisser, A. Bechthold: "The biosynthesis of avilamycin A by *Streptomyces viridochromogenes* Tü57." Tagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Halle, September 1995.

1 Zusammenfassung

Avilamycine, gebildet von *Streptomyces viridochromogenes* Tü57, gehören zu den Orthosomycin-Antibiotika. Avilamycine besitzen eine Heptasaccharidseitenkette, die über eine Esterbindung mit einem Polyketidderivat verknüpft ist. Avilamycine sind wie andere Orthosomycine antibiotisch sehr wirksam und zeigen auch noch gegen multiresistente Keime eine ausgezeichnete Aktivität. Bisher werden Orthosomycine humanmedizinisch nicht eingesetzt - ein möglicher Einsatz als Humanantibiotikum wird jedoch derzeit diskutiert und erforscht.

1. Herstellung und Screening einer Cosmidbank:
Aus genomischer DNA von *S.viridochromogenes* Tü57 wurde eine Cosmidbank erstellt. Mittels PCR konnte ein internes Fragment eines dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gens aus genomischer DNA des Avilamycin-Produzenten *S.viridochromogenes* Tü57 amplifiziert werden, das als Sonde zum Screenen der Cosmidbank eingesetzt wurde. Sechs positiv hybridisierende Cosmide konnten isoliert werden.

2. Charakterisierung der Cosmide:
Vier der sechs positiv hybridisierenden Cosmide konnten mittels Southern-Hybridisierungsexperimenten und Restriktionskartierung in einem gemeinsamen Cluster angeordnet werden. Die isolierten Cosmide überspannen einen Bereich von 55 kb.

3. Detektion und Charakterisierung einer multifunktionellen Polyketidsynthase (AviM):
Auf einem 5,5 kb großen *Pst*I-Fragment auf Cosmid F4 konnte das Gen *aviM* identifiziert werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz besaß Homologie zu einer Polyketidsynthase aus Pilzen. Ein Sequenzvergleich zwischen AviM und der homologen Methylsalicylsäuresynthase (MSAS) aus *Penicillium patulum* zeigte den kolinearen Aufbau der drei katalytischen Zentren Ketosynthase, Acyltransferase und Acyl-Carrier-Protein. Die katalytischen Domänen für die Ketoreduktase und Dehydratase fehlten in AviM im Vergleich zur MSAS. Expression von *aviM* in *Streptomyces lividans* TK24 führte zur Produktion von Orsellinsäure. Mit dem Genprodukt des Orsellinsäuresynthasegens *aviM* wurde erstmalig in Prokaryoten der Nachweis über ein multifunktionelles Protein erbracht, das zur Gruppe der iterativen Polyketidsynthasen TypI gehört.

4. Amplifikation eines ABC-Transportergens:

Auf einem weiteren Cosmid konnte mittels PCR ein Genfragment amplifiziert werden, das Homologie zu einen ABC-Transporter aus *Streptomyces antibioticus* zeigt. Ein Fragment, das das ABC-Transportergen *aviABC* enthält, verleiht Resistenz gegen Avilamycin. Bei dem gefundenen ABC-Transportergen könnte es sich somit um ein Resistenzgen handeln.

5. Detektion und Charakterisierung einer UDP-Glucose-4-Epimerase (AviQ):
Auf einem 3,7 kb-*Bam*HI-Fragment des Cosmids F4 wurde das Gen *aviQ* detektiert. AviQ zeigte Homologie zu UDP-Glucose-4-Epimerasen. Dieses Gen wurde zur biochemischen Charakterisierung in *E.coli* überexprimiert und das Protein als Histidin-Fusionsprotein funktionell aktiv gereinigt. Mit einem K_m-Wert = 1,4 mM für UDP-Galactose und einer v_{max}= 13 µkat/mg Protein weist es ähnliche kinetische Konstanten wie vergleichbare Epimerasen auf.

6. Detektion des Resistenzgens *aviR:*
Auf dem 3,7 kb *Bam*HI-Fragment wurde außerdem *aviR* detektiert. AviR verleiht in *S.lividans* Resistenz gegen Avilamycin. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte keine ausgeprägte Homologie zu anderen bekannten Resistenzfaktoren. Zur biochemischen Charakterisierung wurde *aviR* in Form eines Histidinfusionsproteins als natives, lösliches Protein gereinigt. Eine Veränderung an Avilamycin als Wirkung des Resistenzfaktors konnte unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

2 Einleitung

2.1 Antibiotika im Wandel der Zeit

Seit einem halben Jahrhundert finden Antibiotika weltweit Einsatz - Infektionskrankheiten, vormals ein unabwendbares, unheilbares Schicksal, stellen in der heutigen Zeit kein Problem mehr dar. Wer dieses glaubt, ist weit entfernt von jeglicher Realität (Zähner et al., 1995). Zwar stieg die durchschnittliche Lebenserwartung in den Industrieländern von 1920 bis 1990 um 20 Jahre - 10 Jahre davon werden der Einführung der Antibiotika zugeschrieben (Gräfe, 1992). Gleichzeitig stieg jedoch in den USA zwischen 1980 und 1992 die Zahl der Todesfälle durch Infektionskrankheiten um 50 %. Damit waren Infektionskrankheiten die dritthäufigste Todesursache überhaupt (Hellwig, 1998). Ursache für diesen Rückfall in die "Ära vor Einführung der Antibiotika" (Zähner et al., 1995) ist die Entwicklung von resistenten Mikroorganismen. Einer Untersuchung von Mitsuhashi (1977) zufolge liegt der Anteil resistenter Keime bei Einführung eines neuen Antibiotikums unter 1 %. Je nach Häufigkeit des Antibiotikumeinsatzes steigt die Rate der resistenten Keime nach 8-12 Jahren drastisch an und resistente Keime finden sich in 60 -70 % aller Isolate. Dieser Wettlauf zwischen Mensch und Mikrobe wurde lange Zeit ohne größere Konsequenzen hingenommen. Genügte es doch, durch Einführung einer Seitengruppe ein herkömmliches Antibiotikum zu modifizieren und man hatte für einige Zeit wieder ein wirkungsvolles Medikament. Inzwischen reicht diese einfache Modifikation jedoch nicht mehr aus, da die erworbenen Resistenzmechanismen (z.B. aktives Effluxsystem) nicht nur ein einzelnes Antibiotikum wirkungslos machen, sondern gegen eine oder sogar mehrere Substanzklassen von Antibiotika wirksam sind (Nikaido, 1994).

2.2 Resistenzmechanismen und ihre Verbreitung

Bis 1983 waren bereits 50 verschiedene Resistenzgene identifiziert worden (Banbury Report, 1986). Durch diese Resistenzmechanismen können praktisch alle Angriffsorte der Antibiotika wie DNA-, RNA- und Protein-Biosynthese sowie Zellwandaufbau und Folsäuremetabolismus geschützt werden. Diese Mechanismen beruhen einerseits auf der Modifikation der Antibiotika selbst z.B. durch Spaltung mit ß-Lactamasen oder Inaktivierung mittels Transferasen. Andererseits kann eine gezielte Veränderung des Angriffsortes z.B. durch eine veränderte Gyrase oder die Modifikation der Ribosomen Resistenz vermitteln (Neu, 1992).

Ursprünglich hatte man angenommen, daß eine Resistenzentwicklung weitgehend ausgeschlossen sei, da die Anzahl der nötigen Mutationen im Vergleich zur Mutationsrate sehr hoch ist (Davies, 1994). Nach diesen Annahmen sollten nur wenige Resistenzen, die durch eine Punktmutation zustande kommen, ein Problem darstellen. Beispiel ist die Streptomycin-Resistenz, die durch den Austausch einer einzigen Aminosäure im ribosomalen Bindeprotein entsteht (Forth et al., 1987). Erst in den Folgejahren nach Einführung der Antibiotika konnte gezeigt werden, daß Bakterien in der Lage sind, über die Artenschranken hinweg DNA auszutauschen. Dieser horizontale Gentransfer erlaubt die Weitergabe großer R (= Resistenz)-Plasmide von einer Vielzahl von Mikroorganismen einschließlich der Antibiotika-produzierenden Bakterien auf pathogene Keime (Davies, 1994). Die R-Plasmide tragen zahlreiche Resistenzgene, die durch ihre Lokalisation auf Transposons rekombiniert werden können und dadurch den Mikroorganismen eine schnelle Reaktionsfähigkeit auf geänderte Selektionsbedingungen ermöglichen. Neben den herkömmlichen bakteriellen DNA-Transfermechanismen von einem Donororganismus zu einem Akzeptororganismus wurden in den letzten Jahren weitere Ursachen für die rasche Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen diskutiert. So finden Antibiotika als Tierfutterzusatzstoffe in der Tiermast Einsatz (Banbury Report, 1986). Die Verwendung der Tierfutterantibiotika erfolgt in subtherapeutischen Konzentrationen, was eine rasche Resistenzentwicklung fördert. Da diese Tierfutterantibiotika zusätzlich in der Regel keine Reinsubstanz darstellen, sondern lyophilisierte Zellen des jeweiligen Antibiotikaproduzenten sind, gelangen Resistenzgene in das Tierfutter (Webb et al., 1993). In einer Untersuchung an Mäusen konnte desweiteren gezeigt werden, daß diese oral applizierte DNA über den Verdauungstrakt in die Blutbahn der Tiere gelangen kann (Schubbert et al., 1994). Über die normalen DNA-Aufnahme-Mechanismen der Mikroorganismen könnte diese DNA dann wieder einen Wirt finden. Von ersten Indizien für die Brücke vom resistenten Keim im Tier zum multiresistenten humanpathogenen Mikroorganismus wurde nach der Erkrankung eines Mädchens mit Chinolon-resistenten Salmonellen 1996 berichtet (Hiereth, 1996). Daß es bis zur endgültigen Absicherung dieser Befunde nicht mehr lange dauern wird, ist zu befürchten, da auch bereits in Lebensmitteln zahlreiche antibiotikumresistente Bakterien identifiziert wurden (Teuber et al., 1996).

2.3 Wege zu neuen Antibiotika

Durch die Krise der Antibiotika wird die Suche nach neuen bioaktiven Substanzen zu einer großen Herausforderung für die Forschung. Dabei können zwei grundsätzliche Wege beschritten werden. Im ersten, traditionellen Weg werden Organismen (Bakterien, Pflanzen, Pilze etc.) kultiviert und ihre Metabolite auf mögliche antibiotische Wirkung untersucht. Nachteilig an dieser Methode ist die Tatsache, daß zahlreiche Mikroorganismen im Labor nicht kultivierbar sind und dadurch für eine industrielle Nutzung ausscheiden. Darüber hinaus findet man im klassischen Screening bei der Fülle an bereits bekannten Sekundärstoffen nur bei einer aus 500 isolierten bioaktiven Substanzen tatsächlich eine neue Substanz (Zähner et al., 1995). Seit einigen Jahren wird deshalb verstärkt auf den Einsatz molekularbiologischer und gentechnologischer Methoden gesetzt (Hutchinson, 1994). Dabei werden nicht mehr wie im klassischen Screening-Verfahren neue Produzentenstämme gesucht, sondern vorhandene Stämme so verändert, daß sie neue bioaktive Substanzen produzieren. Beispielsweise reicherte sich durch Geninaktivierung im Erythromycin-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* Desoxyerythromycin A an, das bei gleichen antibiotischen Eigenschaften wesentlich säurestabiler ist (Weber et al., 1991). Am Beispiel des Pristinamycin (Sezenow et al., 1997) konnte gezeigt werden, daß durch Überexpression einzelner Gene im Produzentenstamm *Streptomyces pristinaespiralis* die Ausbeute gesteigert werden kann und das Gleichgewicht in Richtung des gewünschten Produkts PIIA hin verschoben werden kann.
Die Versuche an Pristinamycin und Erythromycin können als Vorläufer der "Kombinatorischen Biosynthese" gelten, wie sie von Katz und Donadio 1993 beschrieben wurde. Dabei werden Gene aus interessanten Antibiotika-Biosynthesegenclustern in Expressionssystemen neu kombiniert und in einen Wirtsstamm eingebracht. Die damit erzielten Metabolite können dann wiederum auf ihre Bioaktivität untersucht werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß Gene von nicht-kultivierbaren Organismen kombiniert und in einem kultivierbaren Wirtsstamm überexprimiert werden können. Darüber hinaus könnten in der Zukunft auch Gene, deren Austausch und Kombination durch die Artenschranke verhindert wird, in der Kombinatorischen Biosynthese zur gemeinsamen Expression gebracht werden. Daß diese Methodik einen zukünftigen Weg zur Gewinnung neuer Antibiotika darstellen wird, zeigen die Arbeiten in den Arbeitsgruppen um Baltz mit Hybridglycopeptidantibiotika (Solenberg et al., 1997) und Koshla mit neuen Polyketiden (McDaniel et al., 1993).

2.4 Voraussetzungen für die Kombinatorische Biosynthese

Die Kombinatorische Biosynthese als Methode zur Herstellung neuer bioaktiver Substanzen setzt voraus, daß Expressions- und Transformationssysteme für den Wirtsstamm vorhanden sind. Traditionell war die Gattung *Streptomyces* ein guter Produzent von Antibiotika. Diese Fähigkeit zum Sekundärmetabolismus wird auch in der Kombinatorischen Biosynthese genutzt. Seit den grundlegenden Arbeiten zur Streptomycetengenetik in den 70er und 80er Jahren (Hopwood et al., 1985) liegen für gentechnologische Arbeiten in *Streptomyces* geeignete Vektorsysteme vor. DNA kann aus *Streptomyces* in ausreichender Menge isoliert werden und mittels der herkömmlichen Methodik molekularbiologisch bearbeitet werden. Bei der zufälligen Kombinatorischen Biosynthese werden DNA-Fragmente ohne Kenntnis ihrer Funktionen kombiniert und exprimiert. Dieses Verfahren verlangt zur nachfolgenden Analyse eine hohe Screening-Effizienz (high throughput screening). Dagegen werden bei einer gezielten Kombinatorik einzelne Gene charakterisiert und zu einer gerichteten Synthese eingesetzt. Dies setzt detaillierte Kenntnisse der Gene, ihrer Promotoren und Regulatoren voraus.

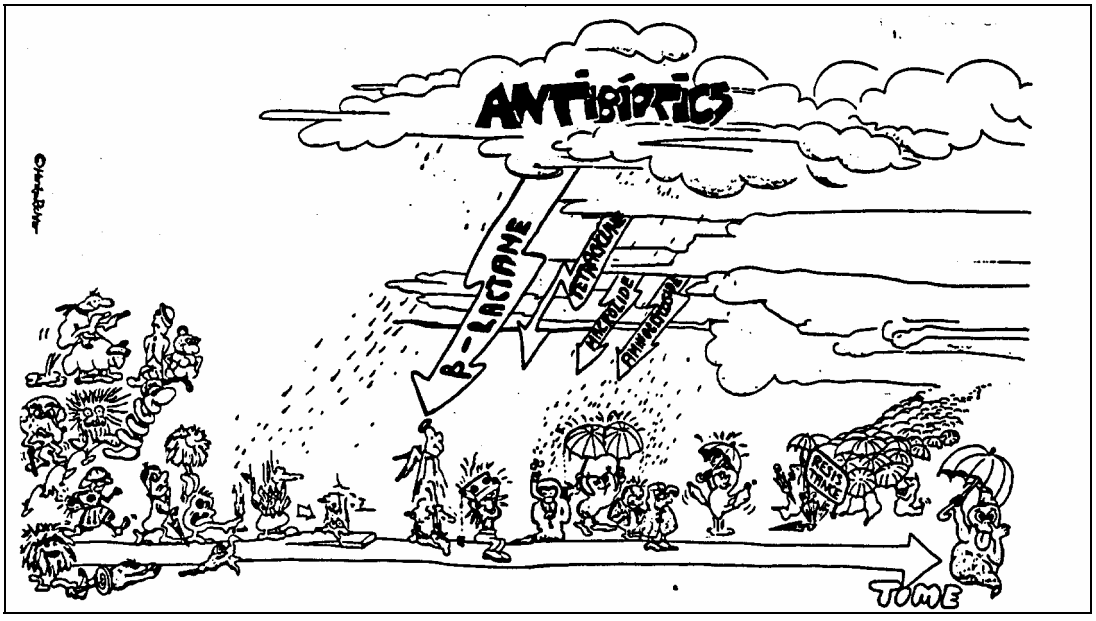


Abb. 2.1: Resistenzentwicklung nach Antibiotika-Applikation (aus Zähner et al., 1995)

2.5 Polyketidsynthasen

Die Polyketidbiosynthese wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Sie stellt darüber hinaus eines der ersten Beispiele der geglückten Kombinatorischen Biosynthese dar (Plater et al., 1994, Hutchinson et al., 1995). Polyketidsynthasen (PKS) katalysieren die Verknüpfung von Acetat-Einheiten. Damit sind sie den Fettsäurensynthasen (FAS) der Tiere vergleichbar (Abb. 2.2). Die Biosynthese wird initiiert durch die Bildung eines Komplexes aus einem Acyl-CoA-Ester und der Ketosynthase-Komponente der Polyketidsynthase. Auf diesen Komplex wird durch Kondensation unter CO_2-Abspaltung eine Verlängerungseinheit (z.B. Malonyl-CoA) übertragen. In weiteren Schritten kann die gebildete Kette durch Reduktase-, Dehydratase-, und Enoylreduktase-Komponenten der Polyketidsynthase verändert werden, bevor der Zyklus der Kettenverlängerung von neuem beginnt (Hopwood, 1997).

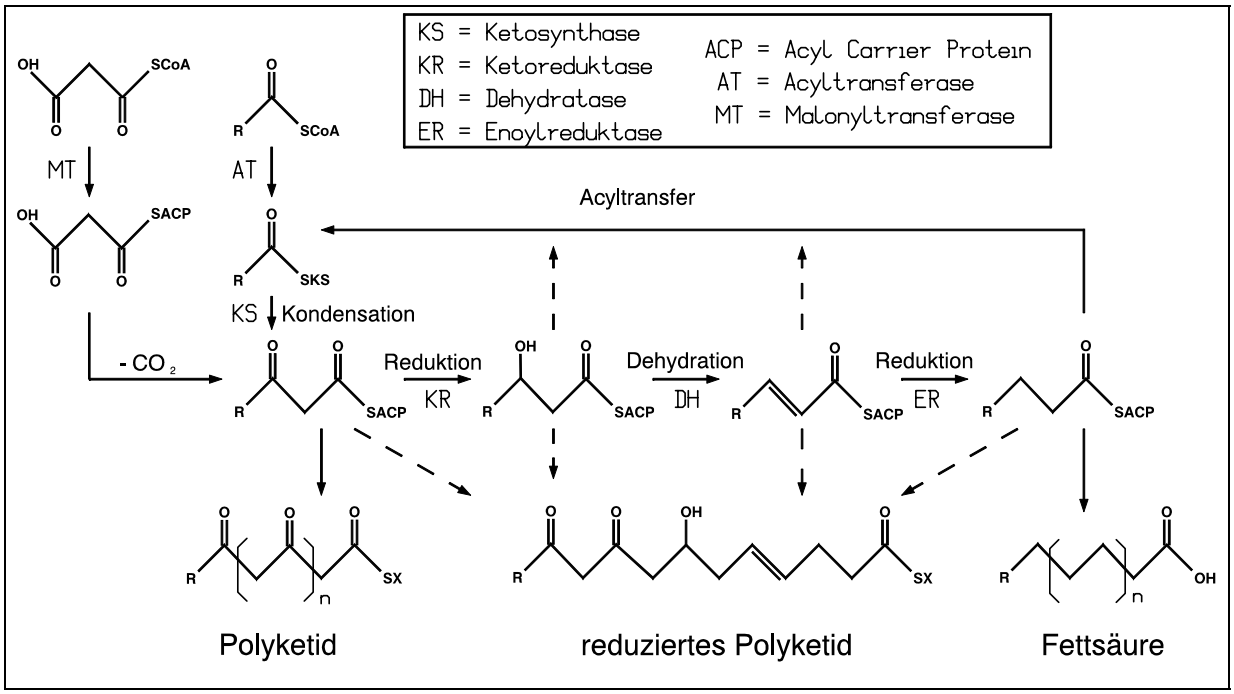


Abb. 2.2: Biosynthese von Polyketiden und Fettsäuren (nach Hopwood, 1997).

Wie in Abbildung 2.3 zusammengefaßt, konnten die bisher bekannten Polyketidsynthasen aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien, sowie die Fettsäuresynthasen der Tiere aufgrund ihrer Struktur in 3 Gruppen eingeteilt werden. Innerhalb der Prokaryoten unterscheidet man die iterativen und die modularen Polyketidsynthasen. Bei den iterativen Polyketidsynthasen (z.B. Actinorhodin-Biosynthese (Malpartida et al., 1986)) liegt für jede Reaktion der Polyketidsynthese ein separates Enzym vor. Ketosynthasen (KS), Acyltransferasen (AT), Ketoreduktasen (KR), Dehydratasen (DH) und Acylcarrierproteine (ACP) katalysieren in wiederholten Reaktionen die Polyketidbildung. Bei modularen Polyketidsynthasen (z.B. Erythromycin-Biosynthese (Donadio et al., 1991)) liegen mehrere Multienzymkomplexe vor, welche die verschiedenen Reaktionen mittels funktioneller Domänen für die KS, AT, KR, DH und ACP katalysieren. Dabei katalysiert jedes multifunktionelle Enzym in der Biosynthese eines Polyketids einen Zyklus aus Kondensation und Reduktion. Die Polyketidsynthasen der Pflanzen und Pilze sowie die Fettsäuresynthasen der Tiere stellen eine Kombination aus beiden Mechanismen dar. Diesen Enzymtyp könnte man als "iteratives", multifunktionelles Enzym bezeichnen. Dabei wird ein Multienzymkomplex mit funktionellen Domänen im Verlauf der Polyketidsynthese wiederholt eingesetzt und katalysiert mehrere Zyklen aus Kondensation und Reduktion (z.B. Methylsalicylsäuresynthase aus *Penicillium patulum* (Beck et al., 1990).

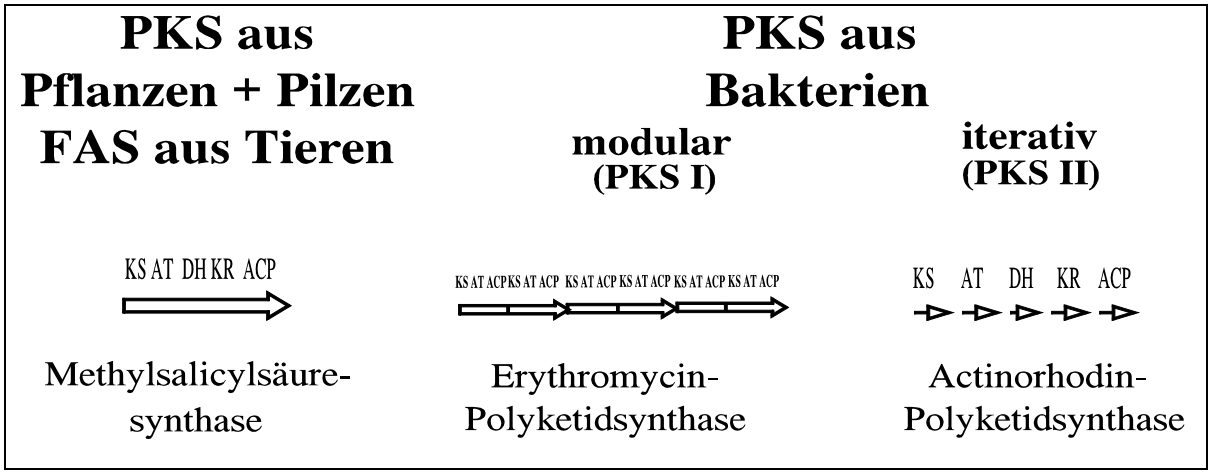


Abb. 2.3: Systematik der bekannten Polyketidsynthasen (PKS) bei Pflanzen und Pilzen, der Fettsäuresynthasen (FAS) bei Tieren und PKS bei Prokaryoten
(KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, DH = Dehydratase, KR = Ketoreduktase, ACP = Acylcarrierprotein).

2.6 Die Gattung Streptomyces

Streptomyceten, die zur Ordnung der Actinomycetales gehören, sind obligat aerobe gram-positive Bodenbakterien. Ihre DNA ist durch einen hohen Gehalt an Guanin und Cytosin charakterisiert (Wright et al., 1992). Streptomyceten zeichnen sich darüber hinaus durch die Fähigkeit zur morphologischen und physiologischen Differenzierung aus: aus einer Spore wird ein verzweigtes Substratmycel gebildet. Bei Nährstoffmangel entwickelt sich daraus ein Luftmycel. Aus diesem werden in der weiteren Entwicklung Ketten von Arthrosporen abgeschnürt, die als Dauerformen den Fortbestand der Art sichern (Ikeda et al., 1990). Ihre kommerzielle Bedeutung erlangen Streptomyceten jedoch durch ihre Fähigkeit zur Sekundärstoffbildung. Eine Vielzahl der von Streptomyceten gebildeten bioaktiven Substanzen finden therapeutischen Einsatz als Antibiotika und Zytostatika (Alderson et al., 1993; Aharonowitz et al., 1985).

2.7 Genetik von Streptomyceten

Das meist lineare Genom von Streptomyceten hat eine Größe von 8000 - 10000 kb. Einzelne Bereiche zeigen eine hohe Rekombinationsrate mit starker genetischer Instabilität (Cullum et al., 1986). Im Genom von Streptomyceten liegen die Gene eines bestimmten Biosynthesewegs häufig geclustert vor. Das bedeutet, daß z.B. Biosynthesegene, Regulatorgene und zugehörige Resistenzgene für die Biosynthese eines Antibiotikums in einem Abschnitt des Genoms lokalisiert sind (Martin et al., 1989). Aufgrund dieser Clusterung können bei Kenntnis einzelner Sequenzen aus dem gesuchten Bereich Gene eines ganzen Biosynthesewegs isoliert werden. Dieser Weg wurde erstmals erfolgreich von Malpartida et al. 1987 beschritten, der mittels der Sonden *actI* und *actIII* die Polyketidsynthase des Granaticin-Produzenten *Streptomyces violaceoruber* isolieren konnte. Bereits zu dieser Zeit wurde jedoch auch die Problematik dieser Methode offensichtlich: nicht alle isolierten Gene stammten aus den gesuchten Biosynthesegenclustern. So wurden ebenfalls mit den Sonden *actI* und *actIII* eine Polyketidsynthase aus *Streptomyces coelicolor* isoliert, von der später durch Komplementation gezeigt werden konnte, daß sie an der Biosynthese eines Sporenpigments beteiligt ist (Malpartida et al., 1987; Davies et al., 1990). Ein isolierter DNA-Bereich muß somit genau durch weitere Experimente (Inaktivierung, Komplementation oder Expression) überprüft werden, um seine tatsächliche Funktion bestätigen zu können.

2.8 *Streptomyces viridochromogenes - der Produzent des Orthosomycinantibiotikums Avilamycin*

Der Stamm *Streptomyces viridochromogenes* ETH23575 (später *S.viridochromogenes* Tü57) wurde Anfang der 60er Jahre aus einer Bodenprobe Venezuelas isoliert (Hütter, 1962). Aus ihm konnten in den Folgejahren die Avilamycine A-N isoliert werden (Buzzetti et al., 1968, Heilman et al., 1979, Mertz et al., 1986). Strukturell unterscheiden sich die verschiedenen Avilamycine nur geringfügig in ihrem Methylierungsmuster. Die prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Avilamycine schwankt je nach Kultivierungsbedingungen und verwendeter Subspecies. Generell gilt jedoch, daß Avilamycin A mit rund 75 % den größten Anteil ausmacht, gefolgt von Avilamycin B mit ca. 10 % der Gesamtavilamycin-Produktion (Eli Lilly, pers. Mitteilung 1998). Ein Laborstamm produziert innerhalb von 2-3 Tagen ca. 20-30 mg Avilamycin/l Medium.

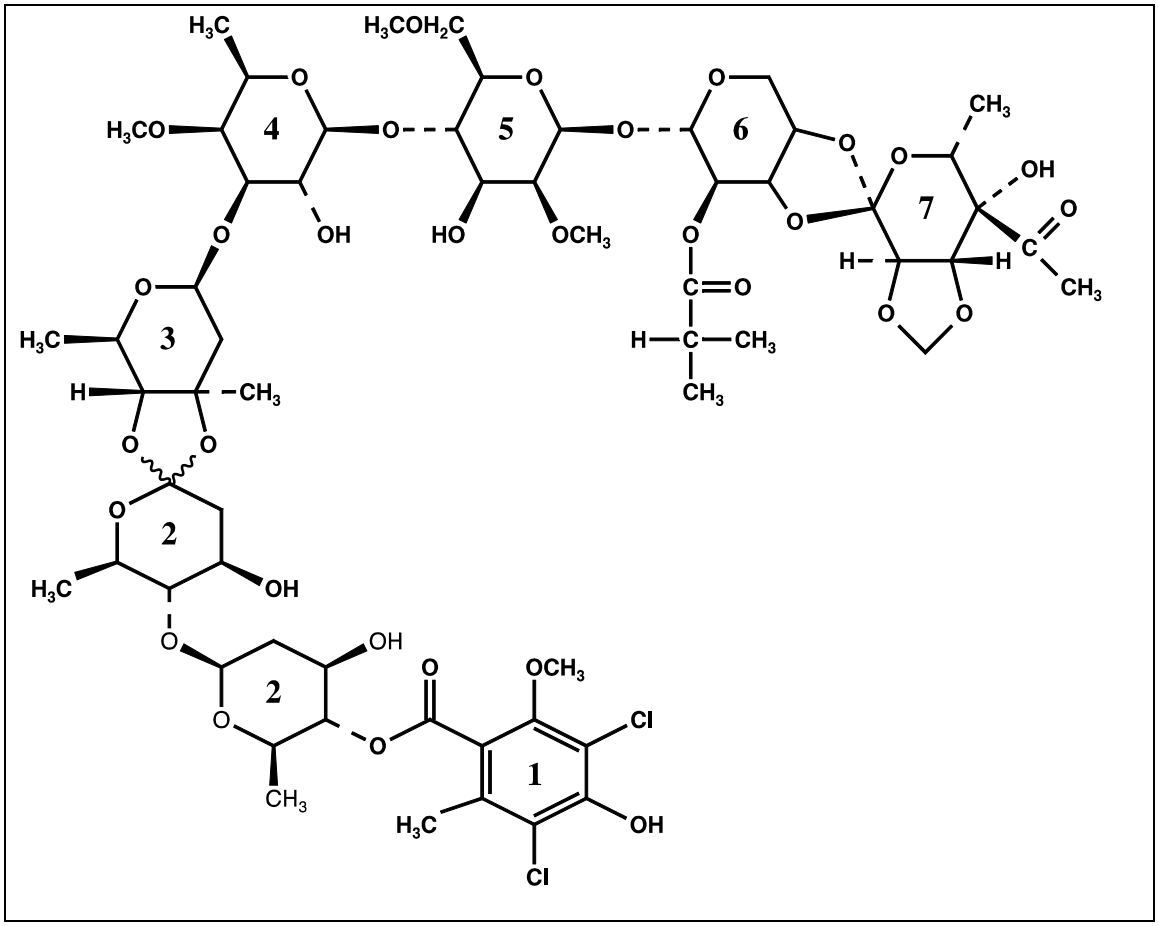


Abb. 2.4: Struktur von Avilamycin A (1 = Dichloroisoeverninsäure, 2 = D-Olivose, 3 = 2-Desoxy-D-evalose, 4 = 4-O-Methyl-L-fucose, 5 = 2,6-Di-O-Methyl-D-mannose, 6 = L-Lyxose mit Isobutyrat-Rest, 7 = Methyleurekanat)

Wie Abbildung 2.4 zeigt, besteht Avilamycin aus einem Polyketidanteil, der Dichloro-isoeverninsäure (1). An diesen ist esterglykosidisch eine Oligosaccharidkette geknüpft, welche aus den Zuckern D-Olivose (2), 2-Desoxy-D-evalose (3), 4-O-Methyl-L-fucose (4), 2,6-Di-O-Methyl-D-mannose (5) und L-Lyxose (6) gebildet wird. Bedeutend für die antimikrobielle Wirksamkeit ist die terminale Dichloroisoeverninsäure sowie die Orthoesterverknüpfungen zwischen D-Olivose und 2-Desoxy-D-evalose und L-Lyxose und Methyleurekanat (Wright, 1979). Aufgrund dieses Strukturmerkmals werden die Avilamycine auch zur Klasse der Orthosomycine gerechnet. Orthosomycine zeigen hohe Wirksamkeit gegen multiresistente gram-positive Bakterien. Wie eine Studie der Firma Hoffmann-La Roche zeigte (Angehrn, 1993), besitzt Avilamycin gegen zahlreiche Problemkeime eine hervorragende Aktivität (Tab. 2.1).

	Avi	Van	Tet	Ery	Cip	Met
S.aureus 138	0,25	0,5	>16	>16	0,5	64
S.haemolyticus 75	1	2	1	0,5	16	2
S.epidermidis 50/0	1	2	>16	0,5	>16	4
E.faecalis 16	0,5	2	>16	2	n.d.	n.d.
E.faecium BK206	0,5	2	0,5	1	n.d.	n.d.

Tab. 2.1: Wirkung von Avilamycin A im Vergleich zu anderen Antibiotika nach Angehrn, 1993 (Angabe der Minimalen Hemmkonzentration (MIC) in µg/ml; n.d. = nicht bestimmt).

Die verwendeten Abkürzungen stehen für:
Avi = Avilamycin, Van = Vancomycin, Tet = Tetracyclin, Ery = Erythromycin, Cip = Ciprofloxacin, Met = Methicillin.
S.aureus = *Staphylococcus aureus*, *S.haemolyticus* = *Staphylococcus haemolyticus*, *S.epidermidis* = *Staphylococcus epidermidis*, *E.faecalis* = *Enterococcus faecalis*,*E.faecium* = *Enterococcus faecium*

Aufgrund dieser ausgezeichneten Bioaktivität erfahren derzeit die Orthosomycine eine Renaissance. So entwickelte Schering-Plough, USA, aus Everninomycin, einem weiteren Orthosomycin (Weinstein et al., 1964), die Substanz Sch27899. Diese befindet sich derzeit bereits als Humantherapeutikum in der klinischen Prüfung (Travis, 1994; Cormican et al., 1996) und soll bald als hochwirksames Antibiotikum gegen multiresistente Keime auf den Markt kommen. Leider wird das Orthosomycin Avilamycin unter dem Handelsnamen MaxusG® (Elanco, Bad Homburg) als Tierfutterzusatzstoff in der Ferkelaufzucht verwendet. Dies könnte die Verwendung der Orthosomycine als Humantherapeutikum stark einschränken.

2.9 Wirkmechanismus von Avilamycin A

Der Wirkmechanismus von Avilamycin ist bisher noch nicht endgültig geklärt. Von Wolf (1973) wird eine Hemmung der Proteinbiosynthese durch Avilamycin beschrieben. Danach kann die 30S-Untereinheit des Ribosoms in Gegenwart von Avilamycin die Initiator-tRNA nicht mehr an das Startcodon anlagern. Dagegen wird für das Orthosomycin Everninomycin als Wirkmechanismus ein Membraneffekt diskutiert, der die Stoffaufnahme verringert und in Folge zur Hemmung der DNA-Replikation führt (Walker, 1976). Da diese beiden postulierten Wirkmechanismen von zwei strukturell eng verwandten Antibiotika sich stark unterscheiden, wurde eine vergleichende Untersuchung zur Wirkungsweise von Avilamycin A und Everninomycin B durchgeführt (E. Langer, 1987, Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen). Mit Hilfe von Chemomutagenese wurden dabei Avilamycin- bzw. Everninomycin-resistente *Bacillus subtilis* erzeugt. Die Mutanten wurden physiologisch charakterisiert. Dabei wurden die Ergebnisse von Wolf (1973) und Walker (1976) bestätigt, weitere Erkenntnisse zur Wirkungsweise der Orthosomycine konnten jedoch nicht erzielt werden.

Am Beispiel des Thiostrepton konnte gezeigt werden, daß der Wirkort des Thiostreptons, nämlich die 50S-Untereinheit der Ribosomen (Gräfe, 1992), und der Selbstresistenz-mechanismus, die Methylierung der 23S rRNA in der großen Untereinheit (Bechthold et al., 1994), eng miteinander verknüpft sind. Es erscheint deshalb sinnvoll, auch im Avilamycin-Produzenten-Stamm *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 den Selbstresistenzmechanismus zu untersuchen. Dies könnte weitere Aussagen über den Wirkmechanismus von Avilamycin ermöglichen.

2.10 Klonierungsstrategien

Anfang der 90er Jahre wurde von Bergh et al. (1992a) versucht, das Biosynthesegencluster von Curamycin, einem Orthosomycin aus *Streptomyces curacoi* zu isolieren. Die dabei verfolgte Klonierungsstrategie bediente sich der *actI*-Sonde (Malpartida et al., 1987). In diesen Versuchen wurden 3 Plasmide isoliert, von denen die Autoren annahmen, es sich dabei um das Polyketidsynthasegen aus dem Curamycin-Biosynthesegencluster handele. Allerdings wurde bereits 1992 festgestellt (Bergh et al., 1992b), daß die abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Homologie zu WhiE, einer Polyketidsynthase aus dem Biosynthesegencluster für das Sporenpigment von *S.coelicolor* aufwies (Davis et al., 1990). Die Überexpression von *curA*,

dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Homologie zu einer ß-Ketoacylsynthase gezeigt hatte, führte zur Produktion eines braunen Pigments.

Diese Beobachtung sowie die Tatsache, daß in Folge der Publikationen aus dem Jahr 1992 keine weiteren Veröffentlichungen zum Curamycin-Biosynthesegencluster erschienen sind, legen die Vermutung nahe, daß das identifizierte Cluster nicht das Curamycin-Biosynthesegencluster darstellte, sondern das Biosynthesegencluster eines Sporenpigments umfaßte (Hopwood, 1997).

Eine alternative Klonierungsstrategie für die Biosynthesegencluster von Sekundärmetaboliten aus Streptomyceten wurde 1992 von der Arbeitsgruppe um Piepersberg (Stockmann et al., 1992) beschrieben. Hier waren aus den Biosynthesegenen *strDELM* für 6-Desoxyzucker aus *Streptomyces griseus* heterologe Sonden abgeleitet worden. 30 der 43 getesteten Stämme besaßen Gene mit genügend hoher Homologie, so daß in Southern Hybridisierungs-experimenten Signale detektiert werden konnten. 30 % der untersuchten Stämme hatten jedoch Desoxyzuckerbiosynthesegene, deren Homologie zu den eingesetzten heterologen Sonden nicht hoch genug war, um eine Detektion mittels Southern Hybridisierungs-experimenten zu gewährleisten. Hier wurden also auch die Grenzen dieser Detektionsmethode offensichtlich.

2.11 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Biosynthesegencluster für Avilamycin aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 zu isolieren. Daraus resultierten drei zentrale Fragen:

1.) Mit welchen Verfahren kann das Biosynthesegencluster kloniert werden?

2.) Kann durch Inaktivierungs- oder Expressionsexperimente nachgewiesen werden, daß tatsächlich das gesuchte Biosynthesegencluster isoliert wurde?

3.) Liegen in *S.viridochromogenes* Tü57 Biosynthesegene für Avilamycin und Resistenzgene geclustert vor?

Die Experimente gliederten sich im einzelnen folgendermaßen:

- Erstellung einer Cosmidbank
- Isolierung des Avilamycin-Biosynthesegenclusters durch Screening der Cosmidbank mit einer dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegensonde
- Charakterisierung und Kartierung der gefundenen Cosmide mit weiteren Sonden aus anderen Antibiotika-Biosynthesegenclustern
- Nachweis durch Expression eines charakteristischen Biosynthesegens, daß das richtige Cluster kloniert wurde
- Suche nach und Charakterisierung von Resistenzgenen

3 Material und Methoden

3.1 Nährmedien

3.1.1 Medium zur Kultivierung von *E.coli*

LB-Medium (Sambrook et al., 1989)

Angaben je Liter Nährmedien

Bactotrypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	171 mM
	pH 7,0

LB-Medium wird mit Leitungswasser angesetzt. Für Festmedium werden 20 g Agar je Liter Medium eingesetzt.

3.1.2 Medium zur Kultivierung von *Bacillus subtilis*

NB-Medium für Bioassay-Platten

Angaben je Liter Nährmedien

Nutrient Broth	8,0 g
NaCl	85 mM
Agar	15 - 18 g
	pH 7,2

NB-Medium wird mit demineralisiertem Wasser angesetzt.

3.1.3 Medien zur Kultivierung von Streptomyceten

HA-Medium

Angaben je Liter Medium

Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
Glucose	22 mM
$CaCl_2$	1 mM
	pH 7,3

HA-Medium wird mit Leitungswasser angesetzt. Für Festmedium werden 20 g Agar je Liter Medium eingesetzt.

CRM-Medium

Angabe je Liter Medium

Saccharose	103,0 g
Tryptic Soy Broth	20,0 g
$MgCl_2$	100 mM
Hefeextrakt	10, 0 g

CRM-Medium wird mit Leitungswasser angesetzt. Nach dem Autoklavieren $CaCl_2$ in einer Endkonzentration von 10 mM steril zugeben.

Minimal-Medium (Brawner et al., 1985)

Angabe je Liter Medium

$(NH_4)_2SO_4$	45 mM
K_2HPO_4	34 mM
KH_2PO_4	7 mM
$MgCl_2$	5 mM
$CaCl_2$	2 mM
NaCl	34 mM
$FeCl_3$	10 µM

Minimal-Medium wird mit Bidest-Wasser angesetzt. Für Festmedien werden 20 g Agar je Liter Medium eingesetzt.

3.1.4 Medium zur Protoplastentransformation von Streptomyceten

R2YE-Medium (modifiziert nach Hopwood et al., 1985)

Lösung A: ad 500 ml H_2O bidest

K_2SO_4	1,4 mM
$MgCl_2$	50 mM
Glucose	55 mM
Casaminosäuren	0,1 g
Spurenelemente	2 ml
Agar	16 g

Lösung B: ad 464 ml H_2O bidest, pH 7,4

TES	25 mM
Hefeextrakt	5,0 g
Saccharose	103,0 g

Lösung C: ad 10 ml H_2O bidest.

KH_2PO_4	0,4 mM

Lösung D: ad 15 ml H_2O bidest.

L-Prolin	26 mM

Lösung E: ad 4 ml H_2O bidest.

$CaCl_2 * 2\ H_2O$	20 mM

Lösungen A bis E getrennt autoklavieren, steril mischen und NaOH in einer Endkonzentration von 7 mM zugeben. Die R2YE-Platten gut trocknen. Die beste Protoplastenregeneration bekommt man mit älteren Platten.

3.1.5 Produktionsmedien

R5-Medium (modifiziert nach Hopwood et al, 1985)

Dieses Medium stellt eine schnellere Variante des R2YE-Mediums aus 3.1.4 dar. Für weniger empfindliche Protoplasten kann es auch zur Regeneration von Protoplasten nach der Transformation verwendet werden. Zur Herstellung werden die Bestandteile von Lösung A und Lösung B zusammen in einem Volumen von 964 ml angesetzt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden die Lösungen C bis E aus 3.1.4 steril zugegeben.

NL19+-Medium

Angaben je Liter Medium

Mannit	20, 0 g
Sojamehl Vollfett	20,0 g
L-Valin	20 mM
	pH 7,5

NL19+-Medium wird mit Leitungswasser angesetzt. Für Festmedium werden 20 g Agar je Liter Medium eingesetzt.

3.2 Antibiotika

Die Antibiotika werden als Stocklösungen mit den angegebenen Konzentrationen angefertigt und bei -20°C gelagert. Stocklösungen in H_2O werden durch Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm) sterilisiert. Die Antibiotika werden direkt vor der Verwendung steril zum entsprechenden Nährmedium zugegeben.

Antibiotikum	Endkonzentration in		Lösungsmittel	Bezugsquelle
	Medium [µg/ml]	Stocklösung [mg/ml]		
Apramycin	100	100	H_2O	Eli Lilly
Avilamycin	5 - 100	2	Ethanol	Eli Lilly
Carbenicillin	50	50	H_2O	Roth
Chloramphenicol	34	34	Ethanol	Merck
Erythromycin	50	25	Ethanol	Fluka
Kanamycin	25	25	H_2O	Serva
Tetracyclin	10	10	70 % Ethanol	Sigma
Thiostrepton	25	50	DMSO	Sigma

3.3 Puffer und Lösungen

3.3.1 DNA-Gelelektrophorese

TE-Puffer

Zum Lösen von DNA. Für Plasmid-DNA pH 8,0, für genom. DNA pH 7,6.

Tris	10 mM
EDTA	1,0 mM
Einstellung des pH-Werts mit HCl	

TAE-Elektrophoresepuffer

Tris	40,0 mM
Natriumacetat	10,0 mM
EDTA	1,0 mM
	pH 7,8 mit Eisessig

Auftragspuffer für Agarosegele

Saccharose	40,0 %
Indikator Farbstoff	0,25 %

(Bromphenolblau (~0,5kb) oder Xylen Cyanol FF (~3,0kb))

Ethidiumbromid-Färbebad für Agarosegele

Stocklösung:	10,0 mg/ ml
Färbebad:	10,0 µg/ ml

3.3.2 Sequenzierung

Polyacrylamid (5 %) für Sequenziergele

Acrylamid	4,5 %
Bisacrylamid	0,5 %
Harnstoff	7,0 M

Lösung in 1 ∗ TBE ansetzen

TBE-Elektrophoresepuffer (für Sequenziergele)

Tris	90,0 mM
Borsäure	90,0 mM
EDTA	2,0 mM
	pH 8,0

3.3.3 Protein-Gelelektrophorese

Polyacrylamid (30 %) für Proteingele

Acrylamid	30 %
Bisacrylamid	0,8 %

Lösung in destilliertem H_2O ansetzen

Puffer für Trenngel

Tris/HCl	1,5 M, pH 8,8

Puffer für Sammelgel

Tris/HCl	0,5 M; pH 6,8

Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin	50 mM
SDS	10 %

Ladepuffer

Tris/HCl (pH 6,8)	80 mM
Glycerin	10 %
SDS	2 %
Bromphenolblau	0,01 %

Proteinmarker

Protein	Mol. Gewicht [kDa]	Menge/Vial [µg]
Phosphorylase b	94	64
Albumin	67	83
Ovalbumin	43	147
Carboanhydrase	30	83
Trypsin-Inhibitor	21,1	80
α-Lactalbumin	14,4	121

3.3.4 Transformation

Lösungen für blau- weiß Selektion

Stocklösungen

IPTG	20,0 mM (in H_2O, sterilfiltrieren)
X-Gal	100,0 mg/ml (in DMF)

Pro Platte werden ausplattiert

IPTG	400 µMol (=20 µl)
X-Gal	20 mg (=20 µl)

Protoplastierungspuffer (Thompson,1982)

Saccharose	103,0 g (ad 858 ml H_2O)
Die nachfolgenden Lösungen getrennt autoklavieren. Steril in folgender Endkonzentration zur Saccharose-Lösung zugeben	
Spurenelementlösung	2 %
TES (pH 7,2)	25,0 mM
$MgCl_2$	10,0 mM
$CaCl_2$	2,5 mM
K_2SO_4	1,4 mM
KH_2PO_4	0,4 mM

Transformationspuffer (Thompson, 1982)

PEG 1000	25,0%
Die nachfolgenden Lösungen getrennt autoklavieren. Steril in folgender Endkonzentration zur PEG-Lösung zugeben	
Saccharose	2,5 %
K_2SO_4	1,4 mM
KH_2PO_4	0,4 mM
Tris-Maleat (pH 8,0)	50,0 mM
$MgCl_2$	10,0 mM
Spurenelementlösung	0,3 %
$CaCl_2$	100 mM

Spurenelemente (Hopwood et al., 1985)

$FeCl_3$	740 µM	(= 200,0 mg/l)
$Na_2B_4O_7$	26 µM	(= 10,0mg/l)
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	8 µM	(= 10,0mg/l)
$CuCl_2$	59 µM	(= 10,0 mg/l)
$MnCl_2$	50 µM	(= 10,0 mg/l)
$ZnCl_2$	30 µM	(= 40,0 mg/l)

Spurenelementlösung wird mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

3.4 Chemikalienliste

3.4.1 Enzyme

alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim
Lysozym	Sigma
pfu-Polymerase	Stratagene
Restriktionsenzyme	Amersham, New-England Biolabs
RNase	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	Amersham

3.4.2 Medien-Bestandteile

Alle nicht separat aufgeführten Bestandteile wurden von der Firma Difco bezogen. Salze und ähnliches stammen aus den unter 3.4.3 angegebenen Quellen.

D-Mannit	Merck
Glucose	SHS Pharm
Nurupan Sojamehl Vollfett	HartGe Ingredients, Hamburg
Saccharose	Südzucker (feine Raffinade)

3.4.3 Chemikalien

Alle nicht getrennt aufgeführten Substanzen wurden von der Firma Merck, Heidelberg bezogen.

Agarose	Biozym, GibcoBRL
Bromphenolblau	EGA Chemie
IPTG	Boehringer
L-Prolin	Fluka
Maleinsäure	Sigma
N-Lauryl Sarcosin (35 % Lösung)	Serva
Natriumcitrat	Serva
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Phenol/Chloroform (pH 8,0)	Roth
Polyacrylamid für Proteingel (Rotiphorese Gel30)	Roth
Polyacrylamid für Sequenziergel (5 % Mix)	USB
Polyethylen Glykol (PEG 1000)	Sigma
TES	Roth
Tris	Roth
Tris Maleat	Roth
Triton X-100	Roth
Tween 80	Sigma
X-Gal	Roth

3.5 Stämme und Plasmide

3.5.1 Bakterien-Stämme

E. coli	relevante Marker	Referenz
XL1-Blue MRF´	*rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17 *sup*E44 *rel*A1 *lac* [F´ *pro*AB *lac*I^{q}ZDM15 Tn10 (Tet^r)]	Raleigh et al., 1991
Bl21-pLys	*E.coli* B: F$^-$ *dcm omp*T *hsd*S(r_b- m_b-) *gal* λ(DE3) [pLysS Cam^R]	Phillips, 1984 Borck, 1976
GM2929	F$^-$ *ara*$^-$14 *leu*B6 *thi*$^-$1 *fhu*A31 *lac*Y1 *tsx*$^-$78 *gal*K2 *gal*T22 *sup*E44 *his*G4 *rps*L136 (Str^r) *xyl*$^-$5 *mtl*$^-$1 *dam*13::Tn9 (Cam^r) *dcm*$^-$6 *mcr*B1 *hsd*R2 (r_k^- m_k^+) *mcr*A *rec*A13	Palmer, 1994

Bacillus		
Bacillus subtilis (Ehrenberg) COHN ATCC6051	Avilamycin sensitiver Testkeim	

Streptomyces		
*S. viridochromogenes*Tü57	Wildtyp, Avilamycin Produzent	Hütter, 1962
S.coelicolor CH999	*S.coelicolor*-Mutante, Wirtsstamm zur Produktion von Polyketidderivaten	McDaniel et al., 1993
S. lividans TK24	Wirtsstamm zur Vermehrung von Streptomyceten-Plasmiden, sensitiv gegen Avilamycin	Feitelson et al., 1983

3.5.2 Vektoren

Karten siehe Anhang

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBluescript SK$^-$	*bla^r*, *lacZ´*, α-Komplementationsystem, f1-origin, Sequenziervektor durch Primer M13 forward, M13 reverse, T7 und T3	Short et al., 1989
pWHM3	*Streptomyces-E. coli* Shuttle Plasmid; *bla^r, tsr^r,* α-Komplementationsystem, high copy	Vara et al., 1989
pWHM4* = pEM4	*Streptomyces-E. coli* Shuttle Plasmid; *bla^r, tsr^r,* α-Komplementationsystem, konstitutiver erm-Promotor	Vara et al., 1989 Quiros et al., 1998
pKC1218	*Streptomyces-E. coli* Shuttle Plasmid; *am^r,* α-Komplementationsystem, low copy	Biermann et al., 1992
pOJ446	Cosmid, Vektor der *S. viridochromogenes* Tü57 Genbank, *am^r*	Biermann et al., 1992
pRSETb	Überexpressionsvektor mit T7-Promotor zur Expression eines Histidinfusionsprotein, *bla^r*	Schoepfer 1993

3.5.3 Eigene Plasmid-Konstrukte

Plasmid-Bezeichnung	Beschreibung
E1A	38 kb großes DNA-Fragment aus *S.viridochromogenes* Tü57 in Cosmid pOJ446
F4	36 kb großes DNA-Fragment aus *S.viridochromogenes* Tü57 in Cosmid pOJ446, enthält u.a. *aviM* und *aviR*
H4	40kb großes DNA-Fragment aus *S.viridochromogenes* Tü57 in Cosmid pOJ446, trägt *aviABC*
P2	32kb großes DNA-Fragment aus *S.viridochromogenes* Tü57 in Cosmid pOJ446, trägt *aviABC*
P4	36 kb großes DNA-Fragment aus *S.viridochromogenes* Tü57 in Cosmid pOJ446
P5	35 kb großes DNA-Fragment aus *S.viridochromogenes* Tü57 in Cosmid pOJ446
pF4E7	6,8 kb *Eco*RI-Fragment aus F4 in pWHM3 mit Resistenzbereich
pB3/1	3,7 kb *BamH*I-Fragment aus F4 in pWHM3, trägt *aviQ* und *aviR*
pPst6/11	2,6 kb *PstI*-Fragment aus pB3/1 in pWHM3
pHin-Bgl	1,1 kb *Bgl*II-Fragment mit *aviQ* in derselben Orientierung wie Thiostrepton-Resistenz-Gen in pWHM3
pRück-Bgl	1,1 kb *Bgl*II-Fragment mit *aviQ* in umgekehrter Orientierung wie Thiostrepton-Resistenz-Gen in pWHM3
pVerB3/1	pB3/1, aus welchem das *Bgl*II-Fragment mit *aviQ* ausgeschnitten wurde
pKC-B3/1	3,7 kb *BamH*I-Fragment aus F4 in pKC1218, trägt *aviQ* und *aviR*
pExoB3/1	pB3/1 mit Frameshift an Position 1243
pBal/Stu	pB3/1 mit Deletion zwischen Base 2430 und 3704
pEpilang	*aviQ* mit RBS mittels PCR amplifiziert und über eine *Bam*HI/*Eco*RI-Schnittstelle hinter ermP* in pWHM4* ligiert
pRSET-Epi	Überexpressionskonstrukt aus *aviQ*, welches mittels PCR amplifiziert und über eine *Bam*HI/*Eco*RI-Schnittstelle in pRSETb hinter Sequenz für 6 Histidin ligiert wurde
pMSS4.3	5,5 kb *Pst*I-Fragment mit Orsellinsäuresynthase-Gen *aviM* in derselben Orientierung wie Thiostrepton-Resistenzgen des Vektors pWHM3
pMSS4.5	5,5 kb *Pst*I-Fragment mit Orsellinsäuresynthase-Gen *aviM* in umgekehrter Orientierung wie Thiostrepton-Resistenzgen des Vektors pWHM3
pABC-Eco	6 kb *Eco*RI-Fragment mit ABC-Transporter-Gen *aviABC* in pWHM3
pABC-Pst	14 kb *Pst*I-Fragment mit ABC-Transporter-Gen *aviABC* in pWHM3
pAviR	*aviR* mit RBS mittels PCR amplifiziert und über eine *Bam*HI/*Eco*RI-Schnittstelle hinter ermP* in pWHM4* ligiert
pAviRII	*aviR*II mit RBS mittels PCR amplifiziert und über eine *Bam*HI/*Eco*RI-Schnittstelle hinter ermP* in pWHM4* ligiert
pRSET-*aviR*	Überexpressionskonstrukt aus *aviR*, welches mittels PCR amplifiziert und über eine *Bam*HI/*Eco*RI-Schnittstelle in pRSETb hinter Sequenz für 6 Histidin ligiert wurde
pRSET-*aviR*II	Überexpressionskonstrukt aus *aviR*II, welches mittels PCR amplifiziert und über eine *Bam*HI/*Eco*RI-Schnittstelle in pRSETb hinter Sequenz für 6 Histidin ligiert wurde

3.6 Kulturbedingungen

3.6.1 Anzucht und Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht und Kultivierung von *E.coli* erfolgt nach Sambrook et al. (1989) in LB-Medium bei 37°C, 170 rpm und dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion.

3.6.2 Anzucht und Kultivierung von Streptomyceten

Generell werden Streptomyceten zur Stammhaltung, Produktion und Transformation bei 28°C auf HA-Medium kultiviert. *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 wird zur Stammhaltung bei 37°C auf HA kultiviert, zur Produktion auf NL19+-Medium bei 28°C. Kultivierung in Flüssigmedium erfolgt in 100 ml Medium in 500 ml Erlenmeyer-Kolben mit einer Schikane bei 180 rpm auf dem Rundschüttler.

3.6.3 Antibiotika-Gradienten-Platte

Zur Bestimmung der maximalen Antibiotika-Toleranz durch resistente Streptomyceten werden Agar-Platten mit ansteigender Antibiotika-Konzentration hergestellt. Dazu wird HA-Medium oder Minimalmedium verwendet. In quadratische Petrischalen (Kantenlänge 11 cm) werden 100 ml Agarmedium gegossen. Während des Erkaltens wird die Platte an einer Kante auf einen 0,5 cm hohen Gegenstand gestellt, so daß die Schichtdicke an dieser Kante nur noch wenige Millimeter beträgt. Nach dem Erkalten wird in die nun eben stehende Schale Agarmedium mit Antibiotikum gegossen.

3.6.4 Herstellung einer Sporensuspension

Eine gut bewachsene und durchsporulierte Platte wird mit 5 ml sterilem H_2O abgeschwemmt und mit weiteren 2 ml H_2O nachgespült. Die Suspension wird 1 min bei maximaler Leistung gevortext und durch sterile Watte filtriert, um Mycelreste von den Sporen zu trennen. Die Sporensuspension wird 10 min bei 5000*g abzentrifugiert und das Pellet in 20 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Sporen werden auf Minimalmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum getitert und bei -20°C gelagert.

3.6.5 Herstellung von Protoplasten

Zur Herstellung von Protoplasten werden je nach Stamm die Streptomyceten 1-3 Tage in CRM-Medium mit 1 % Glycin bei 28°C kultiviert. 100 ml Zellen werden für 10 min bei 700*g pelletiert, zweimal mit TE (pH8,0) + Saccharose (10 %) gewaschen und anschließend in 5 ml Protoplastierungspuffer mit 2 mg/ml Lysozym resuspendiert. Inkubation erfolgt bei 30°C für 30 bis 90 min unter leichtem Schütteln. Alle 15 min wird eine sterile Probe entnommen und der Protoplastierungsgrad überprüft. Bei erfolgter Protoplastierung wird die Reaktion durch Zugabe von 5 ml kaltem Protoplastierungspuffer abgestoppt, und verbliebene Mycelstücke durch sterile Glaswolle abfiltriert. Die Protoplasten werden bei 700*g und 4°C abzentrifugiert, und das Pellet in kaltem Protoplastierungspuffer (1-3 ml) aufgenommen. Die Protoplasten werden aliquotiert und schonend im Eisbad bei -70°C eingefroren. Lagerung bei -70°C.

3.7 Isolierung von DNA

3.7.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wird nach einer modifizierten Methode von Altenbuchner und Cullum (1984) durchgeführt. Dafür wird *S.viridochromogenes* Tü57 2 bis 3 Tage in CRM-Medium mit 1 % Glycin bei 37°C kultiviert. 100 ml Zellen werden bei 700*g pelletiert, das Pellet mit TE (pH 8,0) mit 10 % Saccharose gewaschen und in 5 ml LI-Lösung (25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8,0; nach dem Autoklavieren 300 mM Saccharose steril zugeben) mit 10 mg/ml Lysozym für 45 min bei 37°C inkubiert. Einige Male wird durch Invertieren gemischt. Es werden 2 ml 5 % SDS-Lösung zugegeben, durch Auf-und Abpipetieren mit einer Glaspipette mit großer Öffnung gemischt und 10 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird die wäßrige Phase 2 mal mit 5-10 ml Phenol/Chloroform versetzt, durch Invertieren bzw. Auf-und Abpipettieren vorsichtig gemischt und 15 min bei 10000*g zentrifugiert. Zur Oberphase werden 1/10 * Volumen Natriumacetat (3 M, pH 8,0) und 1 * Volumen Isopropanol zugegeben und durch Invertieren gemischt. Das sich bildende Präzipitat wird auf eine Pasteurpipette aufgewickelt, zum Waschen in 70 % Ethanol getaucht und in TE-Puffer (pH 7,6) über Nacht bei 4°C gelöst.

3.7.2 Plasmidisolierung

3.7.2.1 aus E.coli zur Routineuntersuchung (Minipräparation)

Standardmäßig werden Plasmide nach einer modifizierten Methode von Sambrook et al. (1989) isoliert. Zwei bis vier Milliliter einer Übernachtkultur werden bei 1000*g für 10 min pelletiert, das Pellet in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) mit 0,1 mg Lysozym resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 200 µl frisch angesetzter Lyse-Puffer (1 % SDS, 0,15 N NaOH) zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert bis die Lösung klar wird (ca. 5 min). Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis werden 150 µl kalter Fällungs-Puffer (3 M Natriumacetat, pH 5,2) zugegeben und die Präparation 15 min auf Eis inkubiert. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C und 10000*g für 20 min. Zum Überstand werden 0,7*Volumen Isopropanol zugegeben, kurz gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min bei 4°C und 10000*g zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE (pH 8,0) aufgenommen.

3.7.2.2 aus E.coli in größerem Maßstab

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (z.B. zur nachfolgenden Transformation von Streptomyceten) werden 2*100 ml einer Übernachtkultur über Nucleobond AX100-Säule (Macherey&Nagel, Düren) gereinigt. Die Nucleobond-Lyse stellte eine abgewandelte alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) dar. Die Aufreinigung des durch Natriumacetat erhaltenen Plasmid-haltigen Überstands erfolgt über eine Nucleobond AX-Kartusche nach dem Prinzip der Ionen-Austausch-Chromatographie. Das Auftrennungsprinzip beruht darauf, daß doppelsträngige DNA erst bei einer KCl-Konzentration von 1000 mM (pH 8,5) eluiert wird, während Proteine und andere Nucleinsäuren bereits bei geringeren Konzentrationen eluieren. Zur zweifachen Verwendung der Kartusche wird zunächst das Plasmid aus dem Überstand von 100 ml Übernachtkultur nach der Gebrauchsanweisung von Macherey&Nagel isoliert. Elution mit 4 ml Elutionspuffer erhöht die Ausbeute um 30 %. Anschließend wird die Säule mit 1 ml Elutionspuffer gereinigt, mit 4 ml Äquilibrierungspuffer neu äquilibriert und die Aufreinigung der zweiten 100 ml Übernachtkultur entsprechend des Protokolls von Macherey&Nagel durchgeführt.

3.7.2.3 aus E.coli zum Sequenzieren

Zum Sequenzieren wird salzfreie DNA hoher Reinheit benötigt. Zu diesem Zwecke kann DNA aus Minipräparationen in einer weiteren Polyethylenglykol-Fällung aufgereinigt werden: 32 µl DNA werden dazu mit 8 µl 4 M NaCl und 40 µl 13 % PEG 6000 für 20 min auf Eis inkubiert, bei 12000*g, 4°C zentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und das getrocknete Pellet in 10 µl H_2O aufgenommen. Alternativ kann sehr saubere DNA auch über Wizard Spin Columns (Promega, Madison, USA) gewonnen werden. Die Aufarbeitung stellt wiederum eine modifizierte alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) mit anschließender Ionen-Austausch-Chromatographie über eine zentrifugierbare Säule dar.

3.7.2.4 aus Streptomyceten

Die Plasmidisolierung aus Streptomyceten ist leider weniger effizient als bei *E.coli*. Zwei Methoden haben sich als praktikabel erwiesen.

A) Bei Derivaten von pIJ101 kann eine direkte Isolierung nach folgender Methode durchgeführt werden (Modifizierung des Nachtrags zu Hopwood Handbuch (1985) S.93): Zellen werden für 3 Tage in HA-Medium kultiviert, 3 ml durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen werden in 300 µl Lyse-Puffer 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA (pH 8,0), 4 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 30 min bei 37°C inkubiert. 400 µl frischer Lyse-Puffer 2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) werden zugegeben, es wird vorsichtig gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation mit 400 µl Lösung 3 (5 M Kaliumacetat, pH 5,2) auf Eis werden Zellbruchstücke und Proteine durch Zentrifugation für 15 min bei 14000*g entfernt. Im Überstand verbliebene Proteine werden durch Phenolisieren entfernt. Die DNA wird mit dem 2 fachen Volumen 100 % Ethanol bei 14000*g, 4°C gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wird in 50 µl TE (pH 8,0) aufgenommen.

B) Häufig ist die Plasmidisolierung nach der ersten Methode nicht möglich, da genomische DNA die zu isolierende Plasmid-DNA verunreinigt. In diesem Fall bietet es sich bei Shuttle-Vektoren an, Gesamt-DNA nach der Methode von Altenbuchner und Cullum (3.7.1) zu isolieren und diese in *E.coli* zu transformieren. Da sich nur das Plasmid in *E.coli* vermehren kann, kann dann über Miniprep aus *E.coli* das Plasmid isoliert und charakterisiert werden.

C) Ist das zu isolierende Plasmid kein Shuttle-Vektor, so muß eine direkte Aufarbeitung angewandt werden. Dazu bietet sich die Reinigung über Nucleobond AX100 Säulen (Macherey&Nagel, Düren) an. Die Aufarbeitung aus 3.7.2.2 ist dabei leicht modifiziert (H. Decker, persönl. Mitteilung). Die Puffer S1, S2 und S3 werden im dreifachen Volumen im Vergleich zu den Angaben in der Produktbeschreibung eingesetzt. Vor der alkalischen Lyse mit Puffer S2 erfolgt eine Lysozym-Behandlung. Dazu wird Puffer S1 mit 2 mg/ml Lysozym und 2 µg/ml RNase versetzt und die pelletierten Zellen 20 - 30 min bei 37°C inkubiert. Die AX100 Säulen werden mit 10 ml Puffer N3 gewaschen. Die Ausbeute liegt nach dieser Methode bei 20 - 40 µg Plasmid.

3.8 Prozessierung von DNA

3.8.1 Restriktionsspaltung und Charakterisierung von DNA

Die Restriktionsspaltung wird für jedes Enzym spezifisch mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern bei den jeweils optimalen Temperaturbedingungen durchgeführt. Bei Doppelverdau mit unterschiedlichen Standardpuffern wird die Restriktion mit One-Phor-All-Puffer von Pharmacia durchgeführt. Die Auftrennung der DNA erfolgt in Abhängigkeit von den zu untersuchenden Fragmentgrößen im 0,3 % (5-60 kb) bis 1,5 % (0,2-3 kb) Agarosegel in 1*TAE als Laufpuffer nach Sambrook et al. (1989). Die Längenbestimmung erfolgt durch folgende Größenmarker:

- 1 kb-Leiter (BRL), Bereich 0,2 kb bis 12 kb.
- High-molecular weight marker (BRL), Bereich 8 kb bis 48 kb.
- Phage λ DNA, *Hind*III geschnitten und DIG markiert (Boehringer), Bereich 0,5 kb bis 23 kb.

3.8.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Zur gezielten Klonierung von DNA-Fragmenten werden diese nach Restriktionsspaltung in einem Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Die gewünschte DNA-Bande wird mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und das DNA-Fragment über eine Filtrationseinheit isoliert. Dazu wird ein Membranfilter (Schleicher & Schuell, Ref-No. 404112, Porengröße 0,2 µm) trichterförmig in ein am Grunde perforiertes Eppendorfgefäß gesteckt. Diese Filtrationseinheit wird in ein weiteres Eppendorfgefäß gestellt. Die DNA wird durch Zentrifugation (2000*g, 5 min) von der Agarose getrennt. Reste der Agarose können durch Phenolisieren entfernt werden. Anschließend wird die DNA zur Konzentrierung mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

3.8.3 Ligation von DNA

Ligationen werden entsprechend der Methodik von Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Kohäsive Enden werden über Nacht bei 12°C, glatte Enden bei 4°C ligiert. Um Selbstligation zu vermeiden, kann der Vektor mit 0,1 U alkalischer Phosphatase (Pharmacia) dephosphoryliert werden.

3.8.4 Transformation in *E.coli*

E.coli werden mittels der $CaCl_2$-Methode (Sambrook et al., 1989) transformiert. Für Stämme, bei denen durch α-Komplementation der β-Galactosidase eine Blau-Weiß-Selektion zur Unterscheidung von leerem Vektor und Vektor-Insert-Konstrukt möglich ist (z.B. *E.coli* XL1-Blue MRF´ von Stratagene) werden die Selektionsplatten (LB mit dem entsprechenden Antibiotikum) vor dem Ausplattieren mit IPTG und X-Gal (3.3.4) überschichtet. Eine starke Blau-Färbung kann durch Zugabe von 1 µl IPTG (0,2 M) bereits zur 1 stündigen Regeneration der transformierten Zellen induziert werden.

3.8.5 Transformation von Streptomyceten

Die Aufnahme von Plasmid-DNA kann in Protoplasten von Streptomyceten mittels Polyethylenglykol nach einer Methode von Hopwood et al. (1985) induziert werden. Dazu werden Streptomyceten schnell unter lauwarmem Wasser aufgetaut oder frische Protoplasten verwendet. Die Protoplasten werden 1:1 mit Protoplastierungspuffer gemischt. DNA (ca. 10 µg gelöst in H_2O) und 500 µl Transformationpuffer werden zugegeben, der Ansatz sofort durch Auf- und Abziehen in einer Pipettenspitze gemischt, auf zwei bis vier R2YE-Platten verteilt und vorsichtig ausplattiert. Die Transformanden werden 14-16 h im Brutschrank bei 28°C inkubiert, dann wird Selektionsdruck durch vorsichtiges Überschichten der Platten mit 10-fach konzentrierter Antibiotikalösung (bezogen auf die Plattenkonzentration aus 3.2) ausgeübt und weiter bei 28°C inkubiert. Nach ca. 4-6 Tagen können einzelne Klone gepickt und zur Überprüfung auf HA-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert werden.

3.8.6 Erstellung einer Cosmid-Bank

Zur Erstellung einer Cosmid-Bank wird genomische DNA mit *Sau*3A so partiell restringiert, daß Fragmente mit einer Größe von 20-50 kb entstehen. Die Fragmente werden dephosphoryliert. Der Cosmid-Vektor pOJ446 (Bierman et al. , 1992) wird mit *Hpa*I und *Bam*HI linearisiert und die genomische DNA in den Vektor ligiert. Die *Hpa*I-Restriktion minimiert die Bildung von Vektor-Konkatemeren. DNA, welche zwischen zwei Cos-Stellen liegt, kann nun in Lambda-Phagenköpfe verpackt werden und zur Transfektion von *E.coli* verwendet werden. Die in vitro Verpackung und Transfektion erfolgt mit Verpackungsextrakten aus Gigapack II Gold (Stratagene, Heidelberg) unter den im Benutzerhandbuch angegebenen Bedingungen. Der Titer der Cosmid-Bank wird bestimmt und die Bank bis zur Durchführung der weiteren Experimente in 18 % Glycerin bei -70°C gelagert.

3.8.7 Kolonie- und Southern-Hybridisierung

Kolonie-und Southern-Hybridisierung finden nach der Methode von Sambrook et al. 1989 mit Digoxigenin-markierter Sonde statt. Die Detektion erfolgt über einen Antikörper, welcher ein Konjugat aus Antidigoxigenin und Alkalischer Phosphatase darstellt. Der Abbau des Chemilumineszenz-Substrats CSPD® (Boehringer Mannheim) durch die Alkalische Phosphatase an Stellen mit gebundenem Antikörper bewirkt Schwärzung eines Röntgenfilms.

Die Sonden werden durch PCR amplifiziert (siehe 3.8.8), das DNA-Fragment als Plasmid vermehrt, mittels Restriktionsverdau ausgeschnitten und über ein Gel gereinigt. Die Markierung der Sonde mit Digoxigenin, die Hybridisierung und die Detektion mittels Chemilumineszenz finden mit Chemikalien von Boehringer Mannheim (DIG DNA labelling and detetection kit) mit den im Benutzerhandbuch angegebenen Methoden statt (Westrich et al.,1997). Der DNA-Transfer erfolgt auf Hybond-N Nylon-Membranen von Amersham (Sambrook et al., 1989). Die DNA wird durch UV-Bestrahlung (1 min auf der Vorderseite, 0,5 min auf der Rückseite) auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 68°C. Die Exposition der Röntgenfilme (Hyperfilm-ECL, Amersham) beträgt je nach Stärke des Signals zwischen 10 min und 12 h. Anstatt des von Boehringer Mannheim gelieferten (teuren) Blocking Reagenz kann auch Magermilch-Pulver eingesetzt werden. Dies wird jeweils zur Prähybridisierung und Präinkubation 3 %-ig verwendet, zur Hybridisierung und Antikörperbindung 1,5 %-ig. Für die Southern-Hybridisierung wird genomische DNA in einer Menge von ca. 5 µg zur Restriktion eingesetzt, Plasmide und Cosmide mit ca. 50 bis 100 ng.

Bei der Koloniehybridisierung werden jeweils 50 Kolonien auf eine Platte gepickt, es können 5-10 Filter in einem Durchlauf bearbeitet werden. Dabei ist besonders darauf zu achten, daß die Filter in der Denaturierungs- bzw. Neutralisationslösung nur benetzt, und nicht vollständig durchweicht werden. Für eine deutliche Unterscheidung von positiven und negativen Klonen ist es erforderlich, nach dem Transfer, der Denaturierung und Fixierung der DNA, Zelltrümmer von der Membran zu entfernen, da diese unspezifische Signale hervorrufen. Aus diesem Grund müssen positive Signale auch in weiteren Screeningrunden überprüft werden.

3.8.8 PCR-Methoden

Alle PCR-Methoden wurden auf einem Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 der Firma Perkin Elmer in einem Volumen von 100 µl durchgeführt.

A) dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase

Aus den Sequenzdaten der dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase von *S.griseus* N2-3-11, *S.violaceoruber* Tü22 und *Saccharopolyspora erythraea* DSM 5908 werden 2 Primer für interne Bereiche der dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase abgeleitet (Decker et al., 1996).

Primer 1: 5´-CSGGSGSSGCSGGSTTCATSGG -3´
Primer 2: 5´-GGGWRCTGGYRSGGSCCGTAGTTG -3`
(R: AG; W: AT; Y: CT; S: CG)

Die PCR erfolgt unter nachfolgenden Bedingungen.

dNTP	200 µM
Primer 1 und Primer 2	je 1 µM
genom. DNA von Tü57	0,2 µg
Gelatine	1 %
$MgCl_2$	0,2 mM
Taq DNA Polymerase	1 U

Zeit	Temperatur	
4 min	96 °C	
1,5 min	95 °C	} 35 Zyklen
1,5 min	72 °C	
10 min	72 °C	
unendlich	4 °C	

Das amplifizierte DNA-Fragment wird in den Vektor pBluescript-SK⁻ ligiert und sequenziert.

B) ABC-Transporter

Zur Amplifikation eines ABC-Transporters aus genomischer DNA und Cosmid-DNA von *S.viridochromogenes* Tü57 wurden Primer aus den Walker-Motiven verschiedener ABC-Transporter abgeleitet (Olano et al., 1995).

Primer IA4 (WalkerA): 5´-GATCGAATTCGGGCCCAACGGCGCCGGCAAG-3´
Primer IA6 (WalkerB): 5´-GATCAAGCTTGAGGCCGGTGGTGGGTTCGTC-3´

Die Primer besitzen eine *Eco*RI- bzw. eine *Hind*III-Schnittstelle zur besseren Klonierung des amplifizierten Fragments.

dNTP	200 µM
Primer IA4 und Primer IA6	je 0,3 µM
genomische DNA von Tü57	50 - 100 ng
$MgCl_2$	0,2 mM
Taq DNA Polymerase	1 U

Zeit	Temperatur	
5 min	95°C	
0,5 min	95 °C	} 35 Zyklen
0,5 min	68°C	
0,5 min	72°C	
5 min	72°C	
unendlich	4°C	

Das amplifizierte Fragment wird in den Vektor pUC18 kloniert und sequenziert.

C) UDP-Glucose-4-Epimerase

Zur Überexpression der UDP-Glucose-4-Epimerase wird diese aus dem Resistenz-vermittelnden Bereich B3/1 mittels PCR amplifiziert. Zur leichteren Klonierung werden aus der Sequenz für den offenen Leserahmen *aviQ* zwei Primer abgeleitet, welche durch einen Überhang zwei Schnittstellen einfügen.

Epi-hin: 5´-GGAGGATCCCCATATGTCCATGTTCCCGGGGT-3´
Epi-ruck: 5´-GTGAATTCGAGGCGCGACG-3´

Zusätzlich erfolgt die PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar Epi-hinlang und Epi-ruck, das vor das Startcodon eine RBS einfügt und dadurch die Expression von *aviQ* in *Streptomyces lividans* erlaubt.

Epi-hinlang: 5´-ATGCCGGATTCCGAGGAAAGGC-3´
Epi-ruck: 5´-GTGAATTCGAGGCGCGACG-3´

Dabei bindet Primer Epi-hin am Genanfang und führt eine *Bam*HI, und eine *Nde*I-Schnittstelle ein, Primer Epi-ruck bindet bei Base 3240-3220 von B3/1 und führt eine *Eco*RI-Schnittstelle ein.

dNTP	200 µM
Primer Epi-hin und Primer Epi-ruck	je 1 µM
Template (Resistenz-vermitt. Bereich)	100 ng
Glycerin	20 %
$MgCl_2$	0,2 mM
pfu-Polymerase (Stratagene)	1,25 U

Zeit	Temperatur	
4 min	96 °C	
1,8 min	95 °C	} 35 Zyklen
1,8 min	61 °C	
1,8 min	72 °C	
10 min	72 °C	
unendlich	4 °C	

Das amplifizierte Fragment wird durch Schnitt mit *Bam*HI und *Eco*RI in den mit diesen Enzymen geöffneten Vektor pBluescript-SK^- ligiert. Das PCR-Fragment wird zur Kontrolle ansequnziert. Anschließend wird das PCR-amplifizierte Gen in die Vektoren pRSETb bzw. pWHM4* umkloniert.

D) AviR

Zur Überexpression des Resistenzgens *aviR* wird dieses aus dem Resistenz-vermittelnden Bereich B3/1 mittels PCR amplifiziert. Zur leichteren Klonierung werden aus der Sequenz für den offenen Leserahmen zwei Primer abgeleitet, welche durch einen Überhang zwei Schnittstellen einfügen. Dabei werden folgende Konstrukte hergestellt:

aviR ohne Ribosomenbindungsstelle zur Klonierung in pRSETb mit dem Primerpaar

zaviRhin	´5-ACTGGGGGATCCACATATGAGTGCGTACCG -3´
zaviRruck	´5-GTGAAAACACTGGAATTCACACTGGGGACA -3´

aviR mit Ribosomenbindungsstelle zur Klonierung in pWHM4* mit dem Primerpaar

zaviRhin-lang	´5-CTATGATGGATCCAGGGCTGCGACGGAGGC -3´
zaviRruck	´5-GTGAAAACACTGGAATTCACACTGGGGACA -3´

Zusätzlich wurde auch in der entgegengesetzten Orientierung von *aviR* ein möglicher offener Leserahmen identifiziert. Dieser wurde *aviR*II genannt und mit den folgenden Primern amplifiziert.

*aviR*II ohne Ribosomenbindungsstelle zur Klonierung in pRSETb mit dem Primerpaar

aviRIIhin	´5-TGGGGATCCACATATGAAAACACTGGAGAA -3´
aviRIIruck	´5-TGTGTCCGGCGGCAGCTGGGGAATTCCCCG -3´

*aviR*II mit Ribosomenbindungsstelle zur Klonierung in pWHM4* mit dem Primerpaar

aviRIIhin-lang	´5-GCCCTCCCAAGGATCCACCTGTAGCCACCA -3´
aviRIIruck	´5-TGTGTCCGGCGGCAGCTGGGGAATTCCCCG -3´

Dabei binden die Primer zaviRhin und aviRIIhin am Genanfang und führen eine *Bam*HI, und eine *Nde*I-Schnittstelle ein, die Primer zaviRruck und aviRIIruck binden am Genende von *aviR* bzw. *aviR*II und führen eine *Eco*RI-Schnittstelle ein.

dNTP	200 µM
Primer Epi-hin und Primer Epi-ruck	je 1 µM
Template (Resistenz-vermitt. Bereich)	100 ng
Glycerin	20 %
$MgCl_2$	0,2 mM
pfu-Polymerase (Stratagene)	1,25 U

Zeit	Temperatur	
4 min	96 °C	
1,8 min	95 °C	} 35 Zyklen
1,8 min	60 °C	
1,8 min	72 °C	
10 min	72 °C	
unendlich	4 °C	

Das amplifizierte Fragment wird durch Schnitt mit *Bam*HI und *Eco*RI in den mit diesen Enzymen geöffneten Vektor pBluescript-SK$^-$ ligiert und zur Kontrolle der Lesegenauigkeit der pfu-Polymerase ansequenziert. Das PCR-amplifizierte Gen wird in die Vektoren pRSETb bzw. pWHM4* umkloniert.

3.8.9 Konstruktion des Überexpressionskonstrukts

Die mittels PCR amplifizierten Gene *aviQ* und *aviR* enthalten zur Klonierung in den Überexpressionsvektor pRSETb eine *Bam*HI und eine *Eco*RI-Schnittstelle. Über diese Schnittstellen können sie leicht in der richtigen Orientierung hinter die 6 Histidincodons und die Ribosomenbindungsstelle kloniert werden. Zusätzlich wurde durch die PCR-Amplifikation eine *Nde*I-Schnittstelle eingefügt. Dies ermöglicht es, die 6 Histidincodons durch *Nde*I-Schnitt mit anschließender Religation leicht zu entfernen (Abb. 3.1).

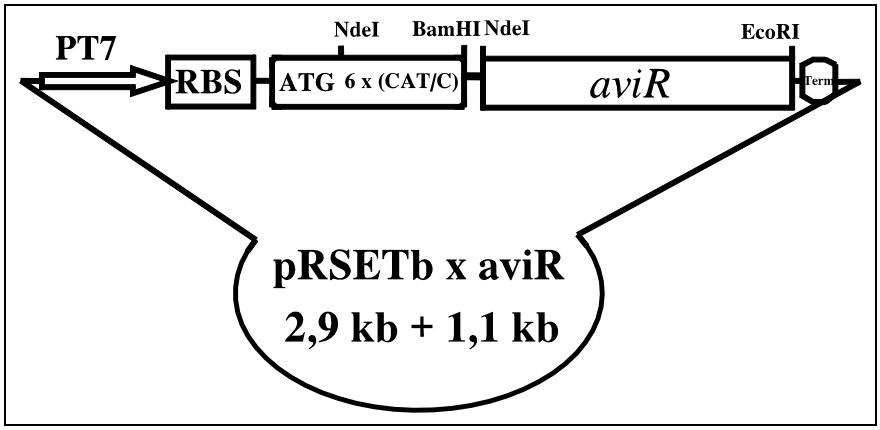


Abb. 3.1: Überexpressionskonstrukt am Beispiel von *aviR*. Über eine *Bam*HI und eine *Eco*RI-Schnittstelle wird das PCR-amplifizierte Gen in den Vektor pRSETb ligiert. Durch *Nde*I-Schnitt und Religation kann das für sechs Histidinreste kodierende Oligonukleotid aus dem Konstrukt entfernt werden.

3.9 DNA-Sequenzierung

3.9.1 Sequenzier-Reaktion

Die DNA-Sequenzierung wird auf der Grundlage der Methode nach Sanger (1977), der Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode, durchgeführt. Hierbei wird durch eine DNA-Polymerase von einem bestimmten Startpunkt (Primer) aus ein Strang komplementär zur template DNA neusynthetisiert. Standardprimer sind dabei die T3- und T7-Sequenzen bzw. die reverse- und forward-Sequenzen auf dem Plasmid pBluescript-SK$^-$, welche den Polylinker flankieren. Der mit dem zu sequenzierenden Insert ausgestattete Vektor wird mit dem jeweiligen Primer gemischt und auf 4 Ansätze verteilt. Durch Zugabe von je einem ddNTP Nucleotid im Reaktionsansatz kann aufgrund der fehlenden 3´-OH-Gruppe kein weiteres Nucleotid angehängt werden und es kommt zum Kettenabbruch. In jedem Ansatz wird in einem bestimmten Verhältnis zum entsprechenden dNTP Nucleotid das ddNTP Nucleotid zugegeben, so daß es statistisch an jeder Position, an der dieses Nucleotid eingebaut wird, zum Abbruch kommt. Die so entstandenen unterschiedlich langen Fragmente werden anschließend in vier parallelen Spuren durch Acrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Diese erlaubt es, Unterschiede von einer Base in der Länge der Fragmente aufzulösen. Dadurch kann anschließend die Sequenz vom Muster im Gel "gelesen" werden. Zur Detektion müssen die neugebildeten Fragmente markiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu fluoreszenz-markierte Primer verwendet. Die Neusynthese der DNA erfolgt durch gleichzeitige Amplifikation mit PCR ("Cycle Sequencing"). Beim Cycle Sequencing entsteht pro Zyklus eine neue Kopie, so daß man für die gleiche Signalstärke- je nach Anzahl der Zyklen- eine geringere Menge an template DNA benötigt. Die Verwendung von 7-deaza-dGTP verringert die Wahrscheinlichkeit von Kompressionen während der Elektrophorese.

Bei Verwendung des automatischen Sequenzierers Vistra 725 (Molecular Dynamics, Krefeld) wird zur Markierung der Fluoreszenz-Farbstoff Texas Red™ benutzt. Dieser Farbstoff wird vom Helium-Neon Laser des automatischen Sequenzierers bei einer Wellenlänge von 594 nm angeregt und emittiert bei 615 nm. Die Detektion erfolgt durch ein Diodenarray-System senkrecht zur Einstrahlungsrichtung des Lasers.
Die Sequenzierreaktion wird nach den Angaben und mit den Chemikalien des "Thermo Sequenase core sequencing kit with 7-deaza-dGTP "(Amersham, Großbritannien) durchgeführt. Pro Sequenzreaktion werden für alle 4 Ansätze zusammen ca. 2 µg template DNA eingesetzt.
Die PCR wird in einem Gesamtvolumen von 8 µl nach folgenden Bedingungen durchgeführt.

Zeit	Temperatur	
5 min	98 °C	
0,5 min	98 °C	} 25 Zyklen
0,5 min	60 °C	
0,5 min	60 °C	
unendlich	4 °C	

Anschließend werden 2 µl Auftragspuffer zugesetzt und das Volumen vor dem Auftragen in der Vakuumzentrifuge auf ca. 2 µl eingeengt.
Als Sequenziergel mit der besten Leseweite für die GC-reiche DNA der Streptomyceten erwies sich das DNA Sequencing Gel Mix Kit der Firma USB (dieses enthält Acrylamid-Gel Fertigmischung und 10 x TBE Laufpuffer).
Pro Gel werden 25 ml dieses Gelmixes verwendet. Die Polymerisierung wird durch Zugabe von 175 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS) und 21 µl N,N,N´,N´-Tetramethylethylen-Diamin (TEMED) gestartet. Die Polymerisationszeit beträgt 1-1,5 h. Pro Sequenzierlauf können mit dem Haifischkamm 10 Templates unter nachfolgenden Bedingungen sequenziert werden.

Spannung	1400 V
Temperatur	42°C - 44°C
Laufpuffer	1 x TBE
Vorlauf	1 - 5 min
Laufzeit	480 min

3.9.2 Auswertung der Sequenzdaten

Die computerunterstützte Auswertung der Sequenzdaten erfolgt mittels des DNASIS-Softwarepackets (Version 2, 1995, Hitachi Software Engineering, San Bruno, USA). Homologievergleiche auf DNA und Protein-Ebene werden mittels blastx-Analyse (Altschuh et al., 1990) am National Health Institute, USA über Internet durchgeführt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast?Jform=0 mit dem Eintragsdatum 24. Nov. 1997 und der BlastX-Version 1.4.11). Die Identifikation offener Leserahmen erfolgt durch das CODONPREFERENCE-Programm (Devereux et al., 1984) unter Berücksichtigung des besonderen Codon-Gebrauchs von Streptomyceten (Wright, 1992).

3.10 Identifikation und Charakterisierung des Resistenzgens

Die Isolierung und Identifikation des Restistenzgens erfolgt nach folgender Strategie. Zunächst werden alle im Screening mit der dNDP-Glucose-Dehydratase-Gensonde detektierten Cosmide (vgl. 3.8.7) über Midi-Präparation aus *E.coli* XL1-Blue MRF´ aufgereinigt und in den *dam/dcm*-negativen *E.coli*-Stamm GM2929 transformiert. Midi-Präparationen der Cosmide aus diesem Stamm eignen sich zur Transformation von *S.lividans* TK24. Die Transformation von *S.lividans* erfolgt wie in 3.8.5 dargestellt. Als Selektionsmarker besitzen die Cosmide ein Apramycin-Resistenzgen. Von Apramycin-resistenten Transformanden werden Sporensuspensionen angelegt wie in 3.6.4 dargestellt. Diese werden auf HA-Avilamycin mit 5 bis 50 µg/ml

Avilamycin auf Resistenz gegen Avilamycin getestet. Cosmid F4, das in *S.lividans* Resistenz vermittelt hatte, wird zur weiteren Eingrenzung des Resistenzgens als *Bam*HI-, *Eco*RI- und *Pst*I-Fragmente in den *E.coli*-Streptomyceten-Shuttle-Vektor pWHM3 subkloniert. Diese Subclones werden wiederum nach Passage in *E.coli* GM2929 in *S.lividans* TK24 transformiert. Selektionsmarker von pWHM3 ist Thiostrepton. Thiostrepton-resistente Transformanden werden nach einer Kontrollpassage auf HA-Thiostrepton auf HA-Avilamycin (5-100 µg/ml) gepickt und auf Avilamycin-Resistenz hin überprüft. Von Avilamycin-resistenten Klonen werden zur weiteren Charakterisierung Sporensuspensionen angelegt. Durch Verdünnungsreihen wird der Titer der Sporensuspension bestimmt. HA-Platten und Minimalmediumsplatten jeweils mit 0 - 250 µg/ml Avilamycin werden mit 200 bis 500 Sporen angeimpft. In regelmäßigen Abständen wird das Wachstum der Avilamycin-resistenten Transformanden sowie der Negativkontrollen (Transformanden mit leerem Vektor pWHM3, Wildtyp *S.lividans* TK24) und der Positivkontrolle *S.viridochromogenes* Tü57 überprüft. Die Bestimmung der maximalen Avilamycin-Toleranz erfolgt auf Antibiotika-Gradienten-Platten (3.6.3).

3.11 Isolierung und Analytik von Sekundärstoffen

3.11.1 Isolierung von Avilamycin

400 ml NL19+-Medium werden mit 10 µl Sporen von *S.viridochromogenes* Tü57 angeimpft und für 72 h bei 200 rpm und 28°C kultiviert. Das Medium wird mit 400 ml Ethylacetat extrahiert, die Zellen mit 50 ml Methanol. Ethylacetat und Methanol werden unter Vakuum entfernt und die Produkte in 0,5 bis 1 ml Methanol vereinigt. Dieser Rohextrakt kann zur Bestimmung der biologischen Aktivität im Agardiffusionstest (3.11.2) verwendet werden. Zur weiteren Reinigung wird eine Gelfiltration mit Sephadex LH20 (Pharmacia) mit Methanol als Lösungsmittel durchgeführt.

3.11.2 Agardiffusionstest

Zur Analyse der biologischen Aktivität der Avilamycin-Extrakte wird ein Agardiffusionstest durchgeführt. Dazu werden bei einer Temperatur von 42°C zu je 100 ml NB-Medium 10^6-10^7 Sporen von *Bacillus subtilis* gegeben, gemischt und Platten zu je 20 ml mit Hilfe eines Schwanenhalses gegossen. Die Bioassay-Platten können einige Monate bei 4°C gelagert werden.

Für die Aktivitätsbestimmung von Avilamycin werden 10 µl des methanolischen Extrakts aus 3.11.1 auf eine Filterrondelle gegegeben. Als Leerwert dient reines Methanol. Die Filterrondellen werden nach vollständigem Trocknen auf die Bioassayplatten aufgelegt und die Platten für 14-20 h bei 37°C inkubiert. Aus dem Durchmesser des Hemmhofs kann man anhand nachfolgender Eichgerade (Abb. 3.2) auf die Konzentration von Avilamycin schließen.

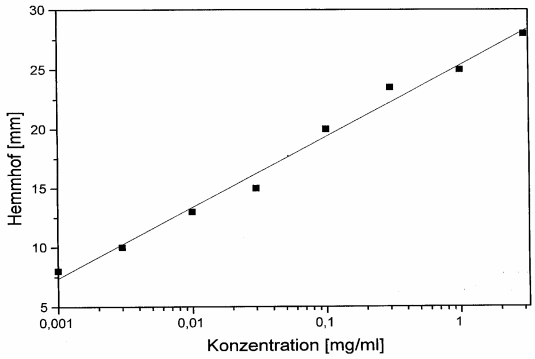


Abb. 3.2: Korrelation von Hemmhofdurchmesser und Avilamycin-Konzentration im Agardiffusionstest mit *Bacillus subtilis*

3.11.3 Analytik von Avilamycin

Avilamycin-Extrakte werden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und durch Hochleistungsflüssig-chromatographie (HPLC) analysiert. Bei der Dünnschichtchromatographie werden Silicaplatten (Merck, Darmstadt) in Dichlormethan-Methanol (9:1) entwickelt. Zur Detektion werden die Platten mit Anisaldehyd-Lösung (1 % Anisaldehyd in Methanol-Eisessig-Schwefelsäure (8:1:1)) besprüht und für 5 min auf 120°C erhitzt. Alle Avilamycine färben sich schwarz, das Avilamycinderivat mit dem höchsten Mengenanteil (Avilamycin A) erscheint bei einem R_f-Wert von 0,62.
Zur Analytik von Avilamycin mittels HPLC wurde die Methode aus dem Arbeitskreis von Prof. Fiedler auf die HPLC-Anlage Hewlett Packard 1090, welche mit Micropore-Kapillaren ausgestattet ist, angepaßt. Die Laufmittel sind dabei: Laufmittel A: 0,1 % H_3PO_4 in H_2O, Laufmittel B: 0,1 % H_3PO_4 in Acetonitril. Der Fluß beträgt 0,2 ml/min, gemessen wird bei einer Wellenlänge von 210 nm. Folgender linearer Gradient mit anschließender Spül- und Äquilibrierungsstufe wird angewandt:

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
0,01 min	85 %	15 %
20 min	0 %	100 %
23 min	0 %	100 %
25 min	85 %	15 %
30 min	85 %	15 %

Beim Standard von Eli Lilly sind unter diesen Bedingungen 2 Hauptpeaks (R_t = 12,6 min und R_t = 13,6 min) und 6 kleine Nebenpeaks mit Avilamycin-Spektrum zu identifizieren. Der Peak bei R_t = 12,6 min ist Avilamycin B und stellt 12 % des Gesamt-Avilamycins dar, der Peak bei R_t = 13,6 min ist Avilamycin A und stellt 68 % des Gesamt-Avilamycins dar (Eli Lilly, persönliche Mitteilung, vgl. Abb. 3.3).

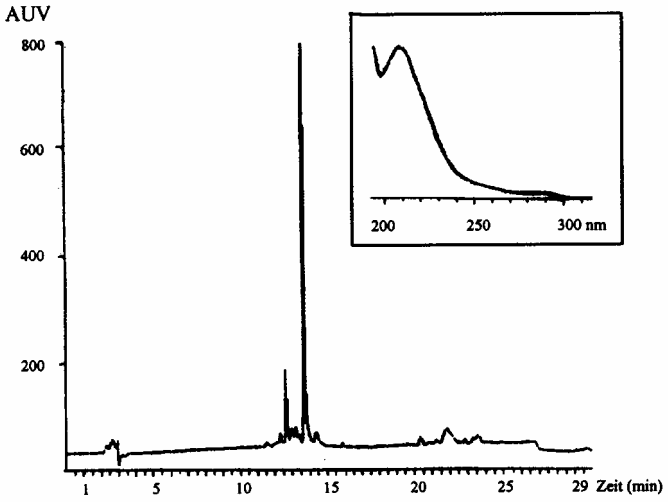


Abb. 3.3: Chromatogramm und Spektrum von Avilamycin-Referenzsubstanz von Eli Lilly. Bei R_f =12,6 min findet man Avilamycin B, bei R_f = 13, 6 min Avilamycin A.

3.11.4 Isolierung von Orsellinsäure

R5-Platten werden mit Sporen von *S.lividans* x pMSS4.3 bzw. mit *S.coelicolor* CH999 x pMSS4.3 angeimpft und 5 Tage bei 28°C inkubiert. Die Platten werden in Methanol zerkleinert (je aufzuschließende Platte 20 ml Methanol) und 20-30 min stark gerührt. Das Methanol wird im Rotationsverdampfer entfernt und die extrahierten Bestandteile in 200 ml H_2O + 1 % Essigsäure aufgenommen. Es folgt zweimaliges Ausschütteln mit je 200 ml Ethylacetat + 1 % Essigsäure. Die Ethylacetatphase wird zweimal mit je 200 ml 1 % $NaCO_3$-Lösung ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird anschließend mit 1 N HCl auf pH 2-3 gebracht (20-40 ml) und zweimal

mit 200 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird zur Trockne eingeengt und in ca. 10 ml Methanol aufgenommen. Die gesamte Fraktion wird über eine präparative Dünnschichtchromatographie auf Silicagel (Merck, Darmstadt) in Dichlormethan:Methanol:Essigsäure (9:1:0,1) aufgetrennt. Orsellinsäure erscheint bei einem R_f-Wert von 0,42. Die ausgekratzte Orsellinsäure wird durch Vortexen und kurze Ultrabeschallung in 5-10 ml Methanol vom Kieselgel abgelöst. Feine Kieselgelpartikel sowie Verunreinigungen, welche über die präparative DC nicht entfernt werden konnten, werden durch Gelfiltration über eine Sephadex LH20 Säule (2,5 cm * 40 cm; Pharmacia) mit Methanol als Lösungsmittel abgetrennt. Das Lösungsmittel der einzelnen Fraktionen wird entfernt und die Proben in 0,2 ml Methanol aufgenommen. Die Identifizierung der Orsellinsäure-haltigen Fraktion erfolgt mittels Dünnschicht-chromatographie, wie unter 3.11.5 beschrieben.

3.11.5 Analytik von Orsellinsäure

Zur dünnschichtchromatographischen Analytik werden Extrakte über Silicagel (Merck, Darmstadt) in Dichlormethan:Methanol:Essigsäure (9:1:0,1) aufgetrennte. Orsellinsäure zeigt auf Kieselgel 60 F_{254}-DC-Platten eine dunkelblaue Fluoreszenzlöschung bei einem R_f-Wert von 0,42. Durch Besprühen mit 1 % $FeCl_3$ in 50 % Ethanol färbt sich das Produkt irreversibel braun. Durch Besprühen des Produkts mit Anisaldehyd-Lösung (1 % Anisaldehyd in Methanol-Eisessig-Schwefelsäure (8:1:1)) und anschließendem Erhitzen auf 120°C für 5 min färbt sich Orsellinsäure rot. Die UV- und IR-Spektren von Orsellinsäure werden durch DC-UV-Kopplung auf einem Desaga Densitometer CD 60 bzw. DC-IR-Kopplung auf einem Bruker IFS48-Gerät bestimmt.
Die Strukturaufklärung der Orsellinsäure erfolgt mittels ^{1}H NMR- und ^{13}C NMR-Spektroskopie sowie über Massenspektroskopie bei Dr. A. Kirschning, Universität Clausthal. NMR-Spektroskopie erfolgt in d_6 -Aceton auf den Geräten Bruker ARX 400 und Bruker DPX 200, die Massenspektroskopie erfolgt auf einem Gerät von Hewlett Packard (HP5989b).

3.12 Aktivitätsbestimmung der Orsellinsäuresynthase AviM

3.12.1 Herstellung des zellfreien Extrakts

5 Tage alte Suspensionskulturen von *S.lividans* wt und *S.lividans* x pMSS4.3 werden pelletiert. 5 g Naßgewicht werden in 5 - 8 ml Aufschlußpuffer (50 mM KP_i, pH 7,5) 10 mM Dithiotreitol (DTT), 20 µM Phenylmethyl-sulfonylfluorid (PMSF) und 0,05 g/ml Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) resuspendiert und mit einer Spatelspitze Seesand 10 - 15 min gemörsert. Nach 15 min Zentrifugation bei 30000*g und 4°C wird der Überstand über eine Sephadex G-25 PD-10-Säule (Amersham) mit 50 mM KP_i (pH 7,6) plus 2 mM DTT filtriert und umgepuffert. Die Proteinkonzentration des Rohextrakts wird nach der Methode nach Bradford (1976) bestimmt (vgl. 3.13.2).

3.12.2 Aktivitätsbestimmung von AviM im Rohextrakt

Die Aktivität der Orsellinsäuresynthase AviM im Rohextrakt von Streptomyceten wird durch einen fluorimetrischen Test, modifiziert nach Vogel und Lynen (1975) für 6-Methylsalicylsäuresynthase, bestimmt. Die Reaktion findet in 100 mM KP_i (pH 7,6) in einem Gesamtvolumen von 1 ml statt. Im Reaktionsansatz befindet sich Rinderserumalbumin 25 mg/ml, 20 mM NADPH, 10 mM Acetyl-CoA und 20 mM Malonyl-CoA sowie 100-500 µl des Rohextrakts. Die Reaktion wird durch Zugabe von Malonyl-CoA gestartet. Inkubiert wird bei 25°C für 30 min.
Gemessen wird die Zunahme von Orsellinsäure in einem Fluorimeter von Perkin Elmer (Fluorescence Spektrophotometer 650-10S). Die Excitation erfolgt bei 310 nm. Orsellinsäure hat bei dieser Excitationswellenlänge ein Emissionsmaximum bei 427 nm.

3.13 Isolierung und Aktivitätsbestimmung der UDP-Glucose-4-Epimerase

3.13.1 Isolierung eines Histidinfusionsproteins

Zur Reinigung eines Histidin-Fusions-Proteins werden Nickel-NTA-Schleuder-Säulchen von Quiagen verwendet. Die Aufarbeitungsstrategie folgt dabei den im mitgelieferten Qiagen-Handbuch empfohlenen Schritten (Handbuch QIAexpressionist, S.46, Auflage März 1997). Dazu wird eine Übernachtkultur der transgenen *E.coli* (Bl21-pLys x pRSET-Epi) mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4 h werden die Zellen bei 1500*g für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml Lyse-Puffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) aufgenommen. Der schonendste Aufschluß erfolgt mittels French Press. Dabei genügt es, die Zellen ohne Vorbehandlung zweimal mit 1000 psi im vorgekühlten Zylinder zu pressen. Anschließend werden die Zellbruchstücke für 30 min bei 10000*g abzentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen, mit Lyse-Puffer und Wasch-Puffer (50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen und mit Elutionspuffer (50 mM NaH_2PO_4, pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) von der Säule eluiert. Zur Visualisierung werden die Proben auf einem SDS-Gel aufgetrennt und das Gel mit Silber gefärbt (Nesterenko et al., 1994). Die Ausbeute über Ni-NTA-Schleuder-Säulchen beträgt je Säule etwa 100 µg Protein.

Zur Isolierung größerer Mengen an Protein eignet sich Ni-NTA-Harz von Qiagen. Dazu werden wie im Handbuch QIAexpressionist S.65 ff beschrieben je 4 ml des Überstands mit den löslichen Proteinen mit 1 ml 50 % Ni-NTA gemischt und 1 h auf Eis gerührt. Das beladene Harz wird in eine Säule gepackt und mit Lyse-Puffer und Wasch-Puffer gewaschen. Anschließend wird das Fusionsprotein mit 4 * 0,5 ml Elutions-Puffer von der Säule eluiert. Pro Milliliter Ni-NTA-Harz können 5 - 10 mg Protein gereinigt werden.
Die Isolierung des Genprodukts von *aviR* erfolgt analog zu der oben beschriebenen Methodik mit dem Überexpressionsstamm *E.coli* BL21-pLys x pRSETb-aviR.

3.13.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mittels der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Das 5-fach konzentrierte Bradford-Reagenz wird mit demineralisiertem H_2O verdünnt und 24 h im Kühlschrank gelagert. Direkt vor Gebrauch wird die Lösung filtriert. Diese Lösung ist maximal 4 Wochen bei 4°C haltbar. Proteinlösungen (0,5 bis 10 µg) werden mit demineralisiertem H_2O auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Extinktion bei 595 nm gemesssen. Für jede Meßreihe wird eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin erstellt.

3.13.3 min Silberfärbung

Die 30 min Silberfärbung nach Nesterenko et al. (1994) stellt eine schnelle Variante der herkömmlichen Silberfärbung nach Sambrook et al. (1989) dar. Dazu werden folgende Stocklösungen angesetzt.

- Acetonstocklösung: 50 % Aceton in H_2O
- TCA-Stocklösung: 50 % TCA in H_2O
- Silbernitratstocklösung: 20 % $AgNO_3$ in H_2O
- $Na_2S_2O_3$-Stocklösung: 10 % $Na_2S_2O_3$ * 5 H_2O

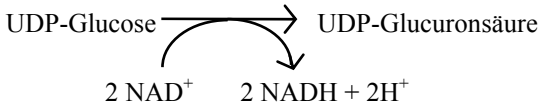
Die Färbung erfolgt nach folgenden Arbeitsschritten (Mengenangaben der Lösungen für ein Gel).

1.) Fixieren in 240 ml Acetonstocklösung, 6 ml TCA-Stocklösung, 100 µl 37 % HCOH für 5 min.
2.) Mehrmaliges Waschen mit demineralisiertem Wasser für 3 * 5 sec, 5 min, 3* 5 sec.
3.) Fixieren in 240 ml Acetonstocklösung für 5 min.
4.) Fixieren in 400 µl $Na_2S_2O_3$-Stocklösung in 240 ml H_2O für 1 min.
5.) Waschen in demineralisiertem Wasser für 3 * 5 sec.

6.) Färben in 3,2 ml $AgNO_3$-Stocklösung, 2,4 ml 37 % HCOH, 240 ml H_2O für 8 min.
7.) Waschen in demineralisiertem Wasser für 2 * 5 sec.
8.) Entwickeln in 4,8 g Na_2CO_3, 100 µl 37 % HCOH, 100 µl $Na_2S_2O_3$, 240 ml H_2O für 10-20 sec. Hierbei ist es wichtig, das Gel beim gewünschten Färbungsgrad sofort abzustoppen.
9.) Stoppen in 3 % Eisessig in 200 ml H_2O für 5 min. Während des Abstoppens Gefäß abdunkeln.
10.) Spülen in demineralisiertem Wasser für 10 sec.
11.) Waschen in demineralisiertem Wasser plus 1 % Glycerin für mindestens 15 min.

3.13.4 Bestimmung der Enzymaktivität der UDP-Glucose-4-Epimerase

Die Enzymaktivität der UDP-Glucose-4-Epimerase wird mittels eines diskontinuierlichen Tests nach Fukusawa et al. (1979) bestimmt. Dabei wird zunächst UDP-Galactose in UDP-Glucose umgesetzt, anschließend die Menge an gebildeter UDP-Glucose durch folgende Enzymreaktion bestimmt.



In der ersten Reaktion werden in einem Gesamtvolumen von 200 µl in 0,1 M Glycin-NaOH (pH 9,5) 0,4 mM UDP-Galactose mit Enzymlösung (in entsprechenden Verdünnungen) für 2 min bei 25°C umgesetzt. Die Enzymreaktion wird für 5 min bei 95°C abgestoppt und kurz zentrifugiert. 35 µl aus diesem Ansatz werden in einem Gesamtvolumen von 1 ml in 0,1 M Tris/HCl (pH 8,7) mit 0,8 mM NAD umgesetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,1 U UDP-Glucose-Dehydrogenase gestartet. Es wird die Bildung von NADH in einer Quarzglasküvette bei 340 nm bis zur vollständigen Umsetzung der gebildeten UDP-Glucose gemessen.

Daraus läßt sich nach

$$c(\text{UDP-Glucose}) = V^* \Delta E / (\varepsilon * d * 2)$$

die Konzentration an gebildeter UDP-Glucose berechnen (mit V = Assay-Volumen = 1ml, Δ E = Extinktionsänderung, ε (NADH) = $6{,}22*10^6$, d = Dicke der Küvette = 1 cm). Aus der Konzentration an gebildeter UDP-Glucose kann die Volumenaktivität der UDP-Glucose-4-Epimerase nach der Gleichung

$$\text{Volumenaktivität} = c(\text{UDP-Glucose}) / \Delta t$$

mit Δt = Zeitintervall im Testansatz berechnet werden. Durch Kombination der beiden Gleichungen und Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors F für die Enzymfraktion der UDP-Glucose-4-Epimerase läßt sich folgende Gleichung für die Volumenaktivität der UDP-Glucose-4-Epimerase ableiten:

$$\text{Volumenaktivität} = (\Delta E / \varepsilon * 2 / \Delta t) * F$$

Bei Division der Volumenaktivität durch die Proteinkonzentration im Testansatz erhält man die Spezifische Aktivität der UDP-Glucose-4-Epimerase.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Streptomyces viridochromogenes Tü57

Der Stamm *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 wurde uns aus der Stammsammlung von Prof. H. Zähner zur Verfügung gestellt. Da sich Streptomyceten durch eine hohe genetische Instabilität auszeichnen (Cullum et al., 1986) wurde der Stamm vor Beginn der molekularbiologischen Arbeiten auf seine Produktivität von Avilamycin hin untersucht. Wie in 3.11.1 beschrieben, wurden Avilamycinderivate aus Flüssigkulturen von *S.viridochromogenes* Tü57 isoliert und durch Agardiffusionstest (3.11.2) und Analytik durch Hochleistungsdruckchromatographie (HPLC) und Dünnschichtchromatographie (DC) (3.11.3) detektiert. Der verwendete Stamm produzierte 20 bis 30 mg Avilamycin je Liter Nährmedium. Dies belegte, daß der verwendete Stamm die Gene für die Biosynthese von Avilamycin besaß und für die geplanten molekularbiologischen Arbeiten geeignet war.

4.2 Herstellung und Screening einer Cosmidbank

4.2.1 Herstellung der Cosmidbank

Es war zu erwarten, daß das Avilamycin-Biosynthesegencluster auf einem mindestens 30 bis 40 kb großen DNA-Fragment lokalisiert war, da Biosynthesegencluster für andere Antibiotika in ähnlichen Größen bereits identifiziert werden konnten (z. B. Epp et al., 1989, Fernandez-Moreno et al., 1991, Dairi et al., 1992). Um in einem Screeningverfahren möglichst große DNA-Fragmente klonieren zu können, sollte eine Cosmidbank angelegt werden. Aus genomischer DNA von *S.viridochromogenes* Tü57 wurde nach der unter 3.8.6 beschriebenen Methodik eine Cosmidbank erstellt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abbildung 4.1 zusammengefaßt. Es wurden verschiedene DNA-Isolierungsmethoden getestet - nach der unter 3.7.1 dargestellten Methode nach Altenbuchner und Cullum konnte DNA am schonendsten isoliert werden. Hierbei war die DNA vor dem *Sau*3A-Partialverdau größer als 50 kb. Mit DNA, die nach dem Partialverdau eine Größe von 35 - 45 kb besaß, erhielt man eine zufriedenstellende Verpackungseffizienz bei der *in vitro*-Verpackung.

Die *in vitro*-Verpackung erbrachte einen Titer von 200000 cfu/ml. Die Anzahl der Falsch-positiven, d.h. Cosmide ohne Insert lag unter 5 %. Die Cosmide aus 25 zufällig ausgewählten Kolonien hatten eine durchschnittliche Größe von 35 kb. Die minimale Insertgröße lag bei

diesen Cosmiden bei 32 kb, die maximale Insertgröße bei 40 kb. Dies entspricht den Fragmentgrößen, wie sie mit dem verwendeten Verpackungsextrakt GigapackII Gold von Stratagene zu erwarten waren. Diese Cosmidbank konnte in den folgenden Experimenten zum Screening verwendet werden.

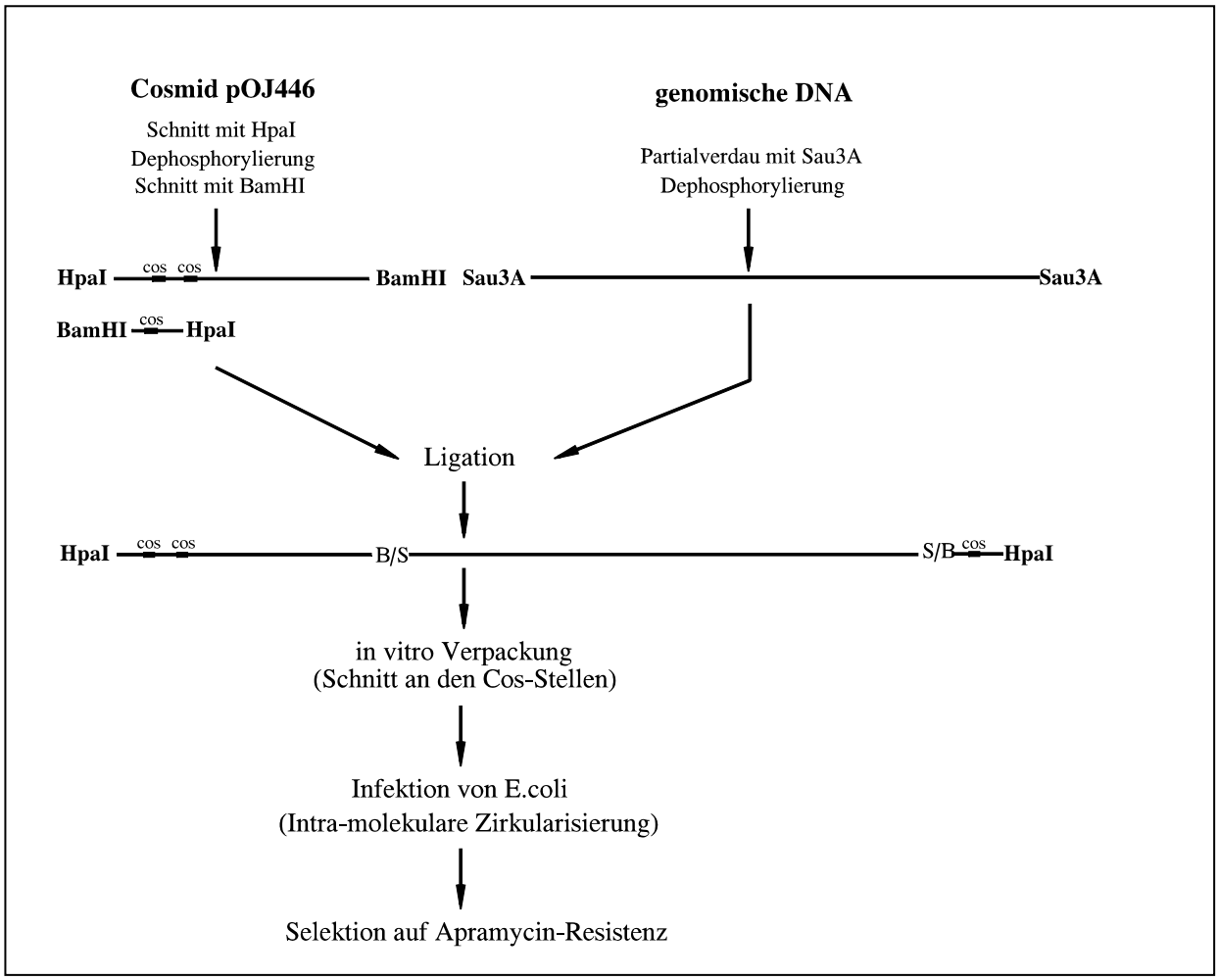


Abb. 4.1: Prinzip zur Erstellung der Cosmidbank aus pOJ446 (Bierman et al., 1992) und genomischer DNA von *S.viridochromogenes* Tü57. Aus *S.viridochromogenes* Tü57 wird genomische DNA isoliert (vgl. 3.7.1), mit *Sau*3A partiell restringiert und dephosphoryliert. Der Cosmidvektor wird mit *Bam*HI und *Hpa*I geöffnet und die genomische DNA in den Vektor ligiert. Die *in vitro* Verpackung erfolgt mit dem Stratagene Verpackungskit (vgl. 3.8.6).

4.2.2 Herstellung der Sonde

Da Avilamycin unter anderem aus an Position C-6 desoxygenierten Zuckern aufgebaut ist (vgl. 2.8), erschien es wahrscheinlich, daß an der Biosynthese von Avilamycin auch eine dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase beteiligt ist. Bereits 1992 konnte gezeigt werden, daß das dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen *strE* aus *S.griseus* N2-3-11 geeignet war, Dehydratasegene in anderen Organismen zu detektieren (Stockmann et al., 1992). Um eine spezifische Sonde einsetzen zu können, sollte ein internes Fragment eines denkbaren dNDP-

Glucose-4,6-Dehydratasegens aus *S.viridochromogenes* mittels PCR amplifiziert werden. Beim Vergleich der Sequenzdaten dreier dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen aus *S.griseus* N2-3-11, *S.violaceoruber* Tü22 und *Saccharopolyspora erythraea* DSM 5908 konnten homologe Bereiche gefunden werden. Aus diesen Bereichen konnten zwei Primer für die PCR abgeleitet werden (Decker et al., 1996).

Primer 1: 5´-CSGGSGSSGCSGGSTTCATSGG-3´

Primer 2: 5´-GGGWRCTGGYRSGGSCCGTAGTTG-3`

Nach der in Abschnitt 3.8.8 dargestellten Methode konnten von A. Bechthold mittels PCR aus genomischer DNA ein 501 bp großes Fragment und ein 523 bp großes Fragment amplifiziert werden. Beide Fragmente wurden in pBluescript-SK¯ kloniert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des 501 bp-Fragments zeigte keine Homologie zu anderen Sequenzen aus der Datenbank. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des 523 bp großen Fragments zeigte 56 bis 61% Identität zu den drei bekannten dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasen, aus denen die Primer abgeleitet worden waren (*S.violaceoruber*: 56 % Identität, 67 % Ähnlichkeit; *S.griseus*: 61 % Identität, 79 % Ähnlichkeit; *Saccharopolyspora erythraea*: 58 % Identität, 73 % Ähnlichkeit). Das Fragment wurde über ein Agarosegel aufgereinigt (vgl. 3.8.2) und als Sonde mit Digoxigenin wie unter 3.8.7 beschrieben markiert.

4.2.3 Screening der Cosmidbank

Zum Screenen der Cosmidbank wurden die *E.coli*-Kolonien vereinzelt. Die Anzahl der Klone, die untersucht werden mußten, um statistisch einen bestimmten Klon aus der Cosmidbank zu identifizieren, konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$N = (\ln(1-P)) / (\ln(1-f))$$

(mit N = Anzahl der zu untersuchenden Klone, P = Identifikationswahrscheinlichkeit, f = Größe des Inserts / Größe des Gesamtgenoms). Mit einer Identifikationswahrscheinlichkeit von P = 99,9 %, der durchschnittlichen Insertgröße von 35 kb und der Genomgröße von 8000 kb ergab sich dabei für die Anzahl der zu untersuchenden Klone N = 1575.

Es wurden 3000 *E.coli*-Klone aus der Cosmidbank vereinzelt und mittels Kolonie-hybridisierung untersucht, wie unter 3.8.7 beschrieben. 6 Klone zeigten bei der Hybridisierung mit der Sonde aus dem Gen für die dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase ein positives Signal (vgl. Abb. 4.2). Die Cosmide wurden isoliert und zur weiteren Charakterisierung durch Restriktionskartierung, Southern Hybridisierung mit verschiedenen Sonden anderer Biosynthesegene und Partialsequenzierung untersucht.

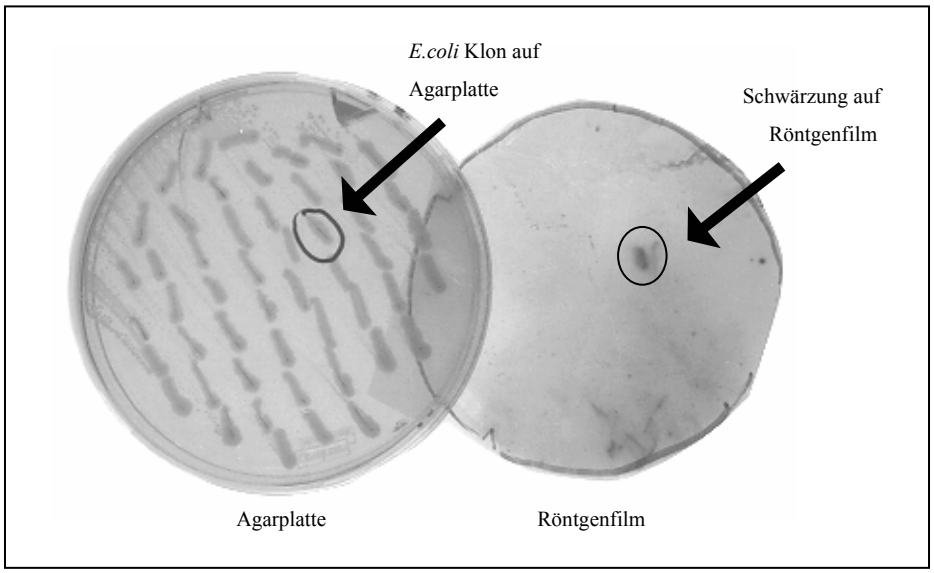


Abb. 4.2: Koloniehybridisierung zur Identifizierung von *E.coli*-Kolonien mit Cosmiden, die mit einem internen Fragment aus einem Dehydratasegen als Sonde hybridisierten. Ein positiver Klon bewirkt die Schwärzung des Röntgenfilms (vgl. Material und Methoden 3.8.7).

4.3 Charakterisierung der hybridisierenden Cosmide

4.3.1 Grundlagen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, muß der DNA-Bereich, welcher aus einem Organismus mittels einer homologen Sonde isoliert wurde, in weiteren Untersuchungen daraufhin überprüft werden, ob er tatsächlich die gesuchten Biosynthesegene enthält. Beispiele aus der Vergangenheit hatten gezeigt, daß die Isolierung eines Biosynthesegenclusters mittels Sonden nicht immer zum gewünschten Cluster führt. So war im Erythromycin-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* ein TDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen identifiziert worden (Linton et al., 1995). Es lag jedoch nicht im Erythromycinbiosynthesegencluster. Im Fall des Curamycins wurde angenommen, daß eine Polyketidsynthase TypI an der Biosynthese beteiligt ist. Das Cluster, das mittels dieser Sonde isoliert wurde, kodierte jedoch nicht für die Curamycin-Biosynthesegene, sondern war vermutlich an der Sporenbildung beteiligt (Bergh et al., 1992b, Hopwood, 1997).

Zur Charakterisierung des identifizierten Clusters wurde deshalb der isolierte Bereich durch Southernhybridisierungsexperimente mit anderen Genen aus bekannten Antibiotika-biosynthesegenclustern untersucht und der Bereich um das dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen zur Lokalisation weiterer Biosynthesegene sequenziert.

4.3.2 Restriktionskartierung der hybridisierenden Cosmide

Die sechs Cosmide, welche in der Koloniehybridisierung mit der Sonde für das Dehydratasegen (vgl. 4.2.3) positive Signale gegeben hatten, wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Pst*I und *Eco*RI geschnitten und mittels Southern-Hybridisierung untersucht. Das Restriktionsmuster wurde zur Kartierung der Cosmide herangezogen. Abbildung 4.3 zeigt ein typisches Ergebnis der Restriktionskartierung und Southern-Hybridisierung.

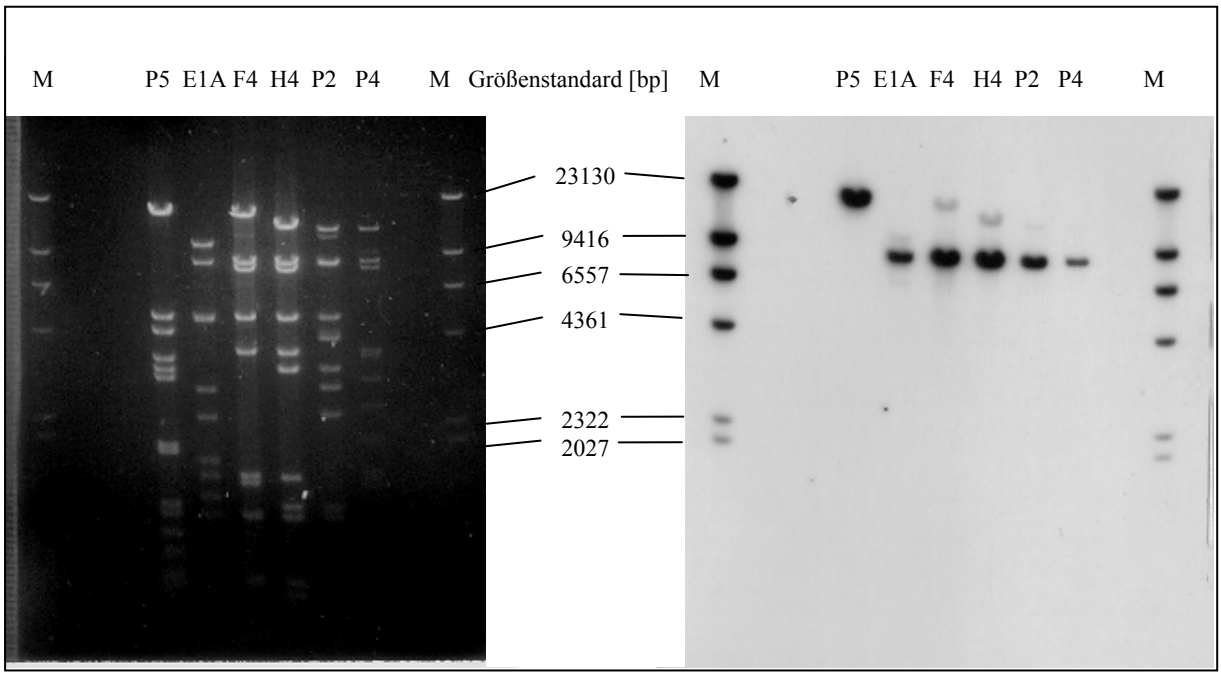


Abb. 4.3: Restriktionsverdau der Dehydratase-positiven Cosmide mit *BamH*I (vgl. 3.8.1) und Southern Hybridisierung der Fragmente mit einer Digoxigenin-markierten Sonde für die dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase (vgl. 3.8.7). Die dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase liegt bei den Cosmiden E1A, F4, H4, P2 und P4 auf einem 8 kb großen Fragment, bei Cosmid P5 auf einem 15 kb großen Fragment.

4.3.3 Southern-Hybridisierungsexperimente und Partialsequenzierung

4.3.3.1 Desoxyzuckerbiosynthesegene

Die Dehydratasegen-Sonde wurde in Southern-Hybridisierungsexperimenten eingesetzt, um die Lage des dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gens zu identifizieren. Auf den Cosmiden E1A, F4, H4, P2 und P4 hybridisierte ein 8 kb *Bam*HI-Fragment, in Cosmid P5 ein 15 kb *Bam*HI-Fragment (Abb. 4.3). Im *Eco*RI-Schnitt wurde das dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gen in allen im Screening identifizierten Cosmiden (P5, E1A, P4, F4, H4, P2) auf einem 6 kb-Fragment lokalisiert.

4.3.3.2 Fragmente des Chlorothricin-Clusters

Zur Lokalisation weiterer Biosynthesegene wurden Southern-Hybridisierungsexperimente mit Gensonden aus dem Biosynthesecluster von Chlorothricin durchgeführt. Wie in Abbildung 4.4 dargestellt, baut sich Chlorothricin aus *Streptomyces antibioticus* Tü99 ebenso wie Avilamycin unter anderem aus D-Olivose und einem aromatischen Polyketid auf.

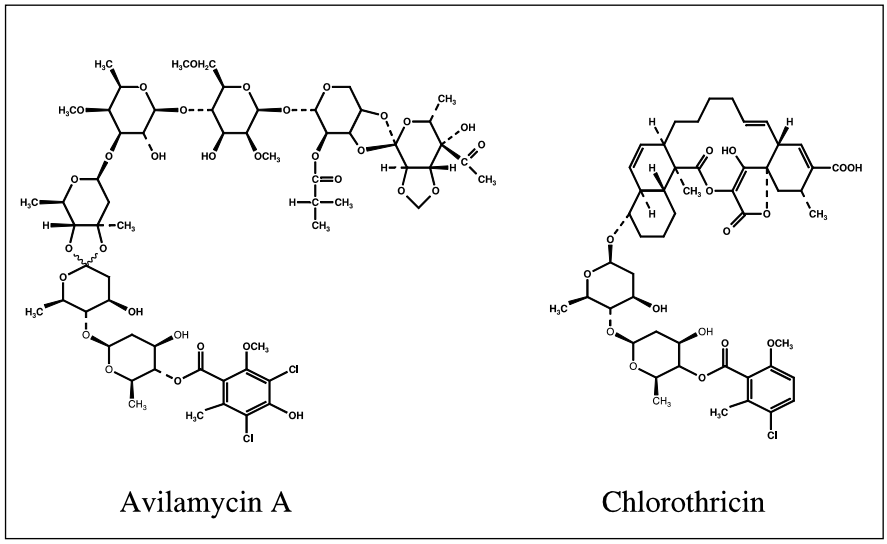


Abb. 4.4: Strukturvergleich von Avilamycin und Chlorothricin. Im Bereich des aromatischen Polyketids und der sich daran anknüpfenden Di-Olivose-Kette sind die beiden Antibiotika identisch.

Ein Subclone aus dem Chlorothricin-Biosynthese-Cluster wurde von Dr. J. Sohng, Seattle, USA (Sohng et al., 1996) zur Verfügung gestellt. Als Sonde wurde ein 200 bp großen *Eco*RI-

Fragment von *chlC* (putatives Epimerasegen) und ein 400 bp großen *Bam*HI-Fragment von *chlD* (dTDP-Glucose-Synthetase-Gen) verwendet (J. Sohng, persönl. Mitteilung).
Sowohl die Sonde *chlC* für das putative Epimerasegen als auch die Sonde für das dTDP-Glucose-Synthetasegen hybridisierten mit demselben 8 kb *Bam*HI-Fragment, auf dem auch das Gen für die dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase lokalisiert worden war. Im *Eco*RI-Schnitt hybridisierte die Sonde für die dTDP-Glucose-Synthetase mit dem 6 kb-Fragment, auf dem auch die dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase liegt, die Epimerase-Sonde hybridisierte mit einem weiteren 6 kb *Eco*RI-Fragment. Dieses Experiment deutete darauf hin, daß die drei offenen Leserahmen, welche für Enzyme der Zucker-Biosynthese kodieren, in enger Nachbarschaft zueinander im Cosmid lokalisiert sind.

4.3.3.3 Sonde aus dem ABC-Transportergen aviABC

Wie in Abschnitt 4.5.2 dargestellt, wurde aus genomischer DNA von *S.viridochromogenes* Tü57 das Fragment eines ABC-Transporters amplifiziert. Dieses wurde zur Charakterisierung der Cosmide eingesetzt. Auf den Cosmiden H4 und P2 konnte das ABC-Transportergen lokalisiert werden. In diesen Cosmiden hybridisierte ein 6 kb *Eco*RI- und ein 14 kb *Pst*I-Fragment. In den Cosmiden P4, F4, E1A und P5 konnte das Gen für den ABC-Transporter nicht lokalisiert werden.

4.3.3.4 Sonde eines Resistenz-vermittelnden Subclones

Wie in Abschnitt 4.5.4 dargestellt, konnte aus den Dehydratase-positiven Cosmiden ein Subclone identifiziert werden, welcher Resistenz gegen Avilamycin verlieh. Dieser Resistenz-vermittelnde Bereich wurde als Sonde zur Charakterisierung der Cosmide eingesetzt. Auf den Cosmiden H4, F4 und P4 hybridisierten ein 6,3 kb *Eco*RI- bzw. ein 3,7 kb *Bam*HI-Fragment mit der Sonde für den Resistenz-vermittelnden Bereich. Die Cosmide P2, E1A und P5 zeigten keine Hybridisierung mit dem Resistenz-vermittelnden Bereich als Sonde.

4.3.3.5 Fragmente des Actinorhodin-Biosynthesegenclusters

Avilamycin setzt sich aus einer Saccharidseitenkette und einer aus Acetateinheiten aufgebauten Dichloroisoeverninsäure zusammen. Die Dichloroisoeverninsäure ist ein Polyketid. Mehrfach wurde in der Literatur gezeigt, daß mittels einer Sonde, welche vom Polyketidsynthasegen (PKS) des Actinorhodin-Clusters (*act*I und *act*III) abgeleitet wurde,

andere aromatische PKS-Gencluster von Actinomyceten kloniert werden konnten (Hopwood, 1997).

So wurden zur möglichen Identifikation einer iterativen PKS (PKSII) ein 1,6 kb *Sal*I-Fragment und ein 6 kb *Bam*HI-Fragment aus dem Polyketidsynthasebereich *gra*I-*gra*III des Granaticin-Biosynthesegenclusters von *S.violaceoruber* Tü22 verwendet (Sherman et al. 1989, Bechthold et al. 1995). Diese beiden Fragmente wurden als Sonden in der Southern Hybridisierung mit den Dehydratase-positiven Cosmiden und genomischer DNA von *S.viridochromogenes* Tü57 eingesetzt. Für keine der PKSII-Sonden konnten spezifische Hybridisierungssignale detektiert werden.

4.3.3.6 Partialsequenzierung von Cosmid F4

Von Cosmid F4 wurden in Kooperation mit Axel Trefzer (Diplomarbeit am Pharmazeutischen Institut, 1996) von allen *Bam*HI- und *Eco*RI-Fragmenten Subclones im Vektor pBluescript-SK$^-$ erstellt. Diese wurden von beiden Seiten ansequenziert (3.9.1) und die Daten über Homologievergleich mit dem Programm blastx ausgewertet (3.9.2). Die gefundenen Sequenzhomologien bestätigten einerseits die Daten aus den Southern Hybridisierungsexperimenten, andererseits gaben sie Hinweise auf weitere Gene.

So konnte auf dem *Eco*RI-Subclone F4E5 auch durch Sequenzierung das dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gen wiedergefunden werden. Auf den drei Subclones F4B7, F4B8 und F4E5 wurde ein Gen gefunden, das Homologie zu einem Methylsalicylsäuresynthase-Gen aus *Penicillium patulum* zeigte. Auf einem weiteren *Eco*RI-Subclone (F4E7) fand sich Homologie zu *dpsC*, das für eine Polyketidsynthase aus der Daunorubicin-Biosynthese kodiert. Auf zwei weiteren *Bam*HI-Subclones konnten Gene identifiziert werden, die Homologie zu in der Datenbank hinterlegten Sequenzen zeigten. Der Datenbankvergleich zeigte für den Subclone F4B2 Homologie zu einem Gen, das für ein regulatorisches Protein kodierte. Auf dem Subclone F4B4 wurde Homologie zu einem ORF aus *Mycobacterium leprae* gefunden. Diesem ORF konnte bislang jedoch keine Funktion zugeordnet werden. Für alle anderen *Bam*HI- und *Eco*RI-Subclones wurden beim Ansequenzieren des Randbereichs keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen detektiert.

4.3.4 Anordnung der Cosmide

Die Ergebnisse aus den Southern-Hybridisierungsexperimenten lassen sich wie in Tabelle 4.1 dargestellt zusammenfassen.

Sonde		P2	H4	F4	P4	E1A	P5
Dehydratase-gensonde	*Bam*HI	8	8	8	8	8	15
	*Eco*RI	6	6	6	6	6	6
chlD-Gensonde	*Bam*HI	8	8	8	8	8	15
	*Eco*RI	6	6	6	6	6	6
chlC-Gensonde	*Bam*HI	8	8	8	8	8	15
	*Eco*RI	6*	6*	6*	6*	6*	-
aviABC-Gensonde	*Eco*RI	6	6	-	-	-	-
	*Pst*I	14	- (x)	-	-	-	-
Resistenz-bereich	*Bam*HI	-	3,7	3,7	3,7	-	-
	*Eco*RI	-	6,8	6,8	6,8	-	-
act-Sonde		-	-	-	-	-	-

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Southernhybridisierungsexperimenten aus 4.3.3.1 bis 4.3.3.5. Die Southern-Hybridisierung erfolgte wie unter 3.8.7 dargestellt. P2, H4, F4, P4, E1A und P5 sind die im Screening identifizierten Dehydratase-positiven Cosmide. Spalte 2 gibt das Restriktionsenzym an, mit dem die Cosmide im jeweiligen Experiment geschnitten wurden. Die Zahlenangaben geben die Größe des hybridisierenden Fragments in kb wider. Für Fragment 6* konnte über Partialsequenzierung gezeigt werden, daß es sich dabei um ein von Fragment 6 verschiedenes Fragment handelt. Ein Strich bedeutet, daß kein Hybridisierungssignal detektiert werden konnte. (x) Fragmente mit einer Größe über 16 kb lassen sich im Southern Blotting nicht quantitativ auf die Membran übertragen.

Folgende Schlußfolgerungen wurden daraus gezogen:

- sowohl die dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen-Sonde als auch die Synthetasegensonde hybridisierten mit einem 6 kb *Eco*RI und einem 8 kb *Bam*HI-Fragment. Beide Gene liegen offensichtlich im isolierten Cluster in enger Nachbarschaft.
- Das putative Epimerasegen *chlC* hybridisierte mit einem 6 kb *Eco*RI-Fragment, das sich von dem mit der Dehydratasegen-Sonde hybridisierenden *Eco*RI-Fragment unterscheidete. Es hybridisierte jedoch mit dem gleichen *Bam*HI-Fragment. Ein mögliches Epimerasegen liegt demnach in Nachbarschaft zum Dehydratasegen.
- Die Sonde aus dem ABC-Transportergen *aviABC* hybridisierte mit Fragmenten aus den Cosmiden P2 und H4. Die DNA beider Cosmide ist demnach an einem Ende des isolierten Biosynthesegenclusters anzuordnen.
- Nur die Cosmide H4, F4 und P4 hybridisierten mit einem 3,7 kb *Bam*HI-Fragment (Resistenzbereich) und sind demnach am anderen Ende des isolierten Biosynthesegenclusters anzuordnen.

- Die Cosmide E1A und P5 hybridisierten weder mit dem 3,7 kb *Bam*HI-Fragment noch mit *aviABC.* Dies kann folgendermaßen erklärt werden:
  1) Beide Fragmente enthalten DNA, die sich von der DNA der anderen Cosmide unterscheidet.
  2.) Beide Cosmide enthalten DNA-Fragmente, die so nicht im Genom von *S.viridochromogenes* Tü57 angeordnet sind.
- Die Sonden *act*I und *act*III ergaben keine spezifischen Hybridisierungssignale. Dies deutet darauf hin, daß keine Gene, die für iterative PKS kodieren auf dem isolierten Biosynthesegencluster lokalisiert sind.

Anhand dieser Charakterisierung durch Restriktionskartierung, Southern-Hybridisierungs-experimente und Partialsequenzierung konnten die Cosmide P2, H4, F4 und P4 in einer gemeinsamen Karte angeordnet werden (Abb. 4.5). Mit den Cosmiden P2, H4, F4 und P4 wird ein Bereich von etwa 55 kb aus dem Genom von *S.viridochromogenes* Tü57 abgedeckt. Die Cosmide E1A und P5 ließen sich nicht in diese Karte einordnen, da sie weder mit der Sonde für das ABC-Transportergen noch für den zweiten Resistenz-vermittelnden Bereich hybridisierten.

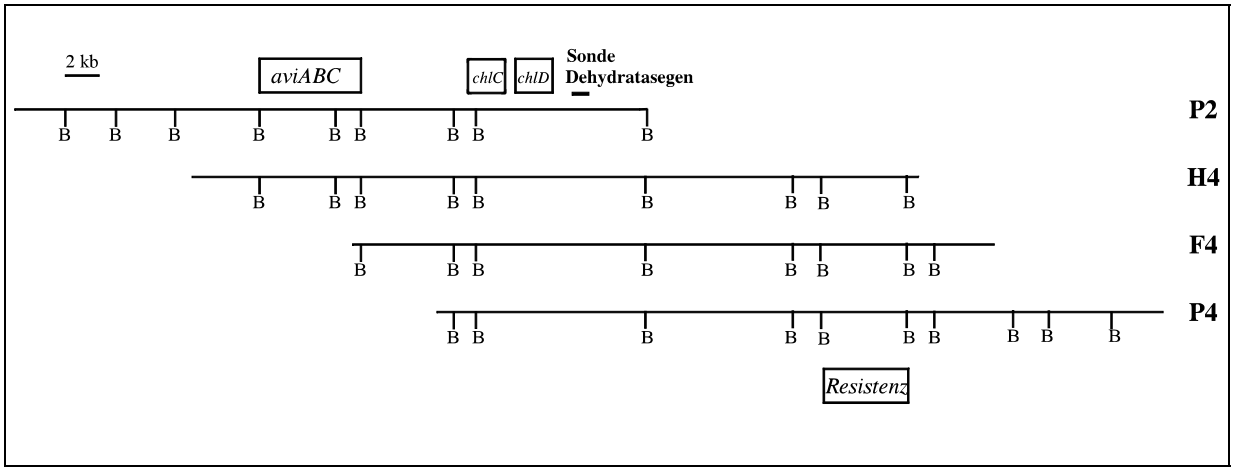


Abb. 4.5: Restriktionskarte der Dehydratase-positiven Cosmide basierend auf *Bam*HI-Fragmenten (B = Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI), Southern Hybridisierungsexperimenten mit den Sonden für das dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gen, *chlC* (putatives Epimerasegen), *chlD* (dTDP-Glucose-Synthetase-gen) und den beiden Resistenzbereichen *aviABC* und *Resistenz.* Die Sonde für das dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen hybridisierte in allen Cosmiden mit einem 8 kb Fragment. Die Cosmide überspannen einen Bereich von 55 kb.

4.4 AviM - *eine ungewöhnliche Polyketidsynthase*

4.4.1 Biosynthesegene im zentralen Bereich von Cosmid F4

Wie in Abschnitt 4.3 dargestellt, konnten im Bereich um das dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen zwei weitere Zuckerbiosynthesegene (*aviD, aviF*) identifiziert werden. Partialsequenzierung lieferte darüber hinaus Hinweise dafür, daß im zentralen Bereich des Cosmids F4 zwei Gene (*aviM, aviN*) lagen, deren Sequenzhomologien eine Beteiligung des entsprechenden Genprodukts am Polyketidstoffwechsel vermuten ließen.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die vollständige Sequenz dieses Bereichs in Kooperation mit Axel Trefzer, der im Rahmen seiner Diplomarbeit ca. ein Drittel aus diesem Bereich sequenzierte, ermittelt. Der durch Sequenzierung und Southern Hybridisierung charakterisierte Bereich umfaßte etwa 9 kb. Das Gen *aviM* war auf einem 8 kb *Bam*HI-Fragment und auf dem benachbarten 7 kb *Bam*HI-Fragment lokalisiert. Um diesen Bereich zu sequenzieren, wurde ein 5,1 kb-Fragment, das beide Genhälften enthielt, in sequenzierbare Subclones mittels der Restriktionsenzyme *Acc*I, *Nar*I, *Rsa*I, *Sac*I, *Sac*II, *Sal*I, und *Sau*3A unterteilt und durch Verkürzung der jeweiligen Subclones im Vektor pBluescript-SK$^-$ weitere Subclones erzeugt. Sequenziert wurde jeweils ausgehend von den Primern T3 und T7 (vgl. 3.9). Fünf Problembereiche aus *aviM,* bei denen eine starke Sekundärstrukturbildung die Sequenzierung mittels T3 und T7 Primer unmöglich machte, wurden durch Auftragssequenzierung durch Firma Medigene, München, mittels interner Primer sequenziert. Zur Erstellung der Consensussequenz von *aviM* wurden insgesamt 85 Einzelsequenzen herangezogen, wobei durch zufällige Subklonierung einige Bereich auch mehrfach sequenziert wurden. Abbildung 4.6 stellt das Alignment in beiden Orientierungen anhand charakteristischer Klone dar. Die Sequenz ist in der Datenbank unter der Accession Nummer Y11985 hinterlegt und in Journal of Bacteriology (**179 (20):** 6271-6278 (1997)) publiziert (vgl. dazu auch Anhang).

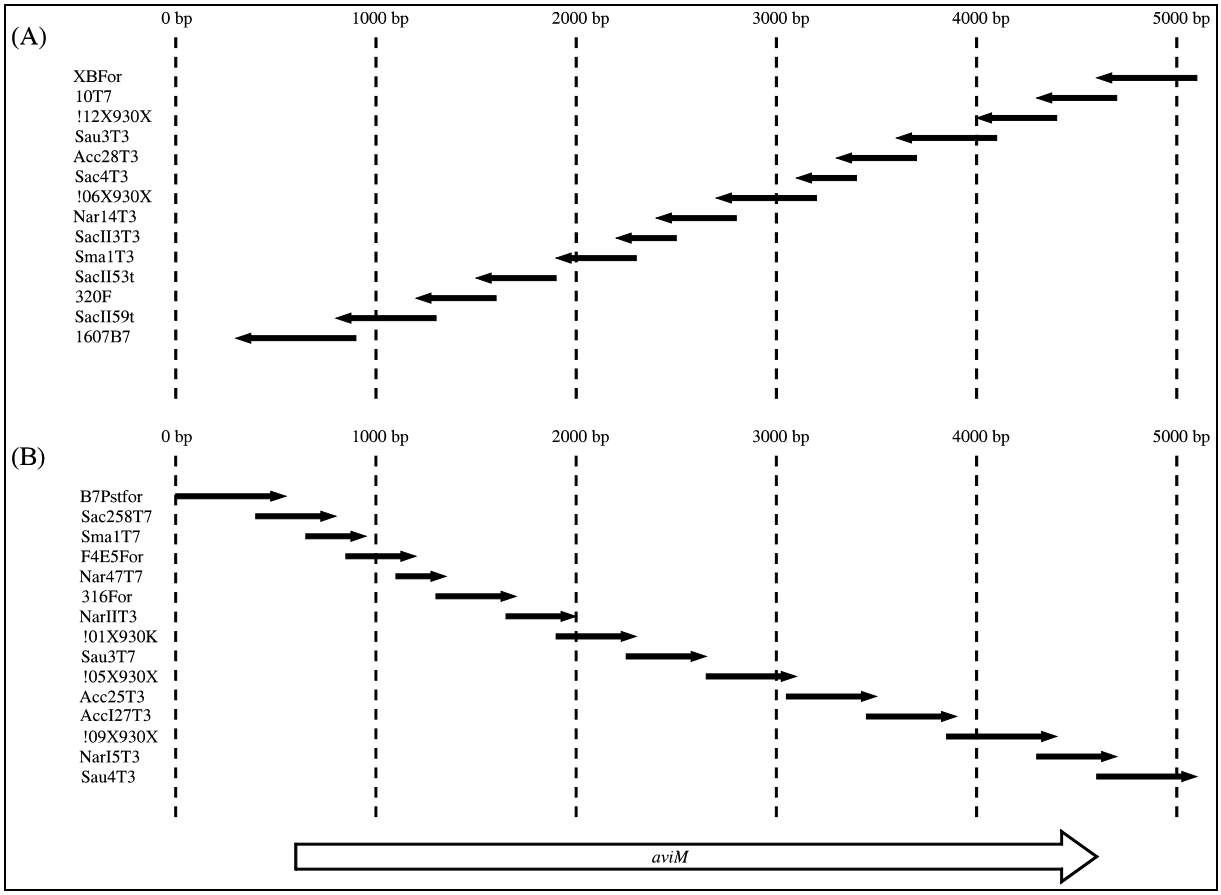


Abb. 4.6: Alignment von Subclones des 5,1 kb Fragments, der den offenen Leserahmen von *aviM* enthält. (A) stellt Subclones in entgegengesetzter Orientierung zum offenen Leserahmen von *aviM* dar, (B) faßt die Subclones in Orientierung zum offenen Leserahmen von *aviM* zusammen. Der offene Pfeil stellt den ORF für *aviM* dar.

Im Leserahmen +3 des 5,1 kb Fragments wurden zwei offene Leserahmen identifiziert (Abb. 4.7). ORF 1 stellte das carboxyterminale Ende von *aviN,* dem zu *dpsC* homologen Gen dar. Der 3879 bp große ORF war das Gen *aviM.* Der GC-Gehalt von *aviM* entspricht mit 72 % GC einem typischen Streptomyceten-Gen.

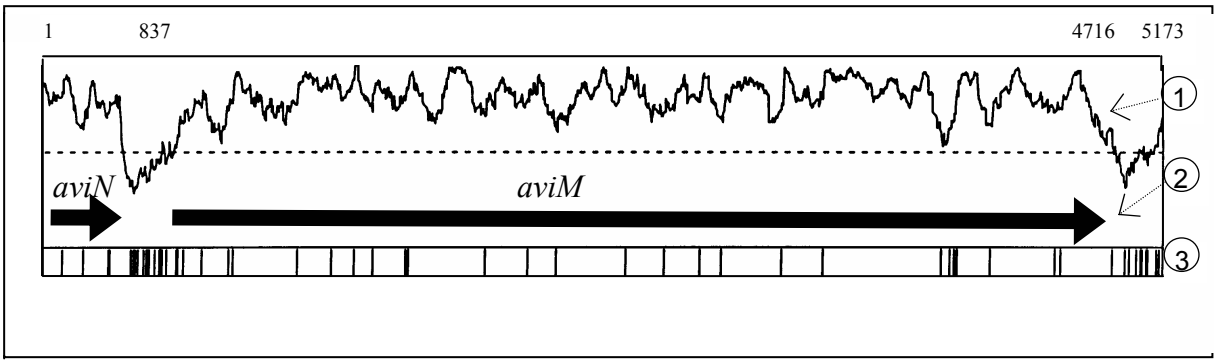


Abb. 4.7: Lesestrang +3 des 5,1 kb Fragments mit dem ORF für *aviM* und dem carboxyterminalen Ende des ORF für *aviN*
(1) = Kodierwahrscheinlichkeit, (2) = postulierter offener Leserahmen, (3) = seltene Codons

Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, befindet sich zwischen *aviN* und *aviM* ein 243 bp großer nicht-kodierender Bereich. Die darin identifizierte Promotor-Sequenz ist ähnlich zu Promotorsequenzen, wie sie von Strohl (1992) beschrieben wurden.

```
                GGATGGCGGA CGTCGCCCGC GTCTCCTTCA TGAACTAATC ACGCGAAGTG
AviN              M  A  D   V  A  R   V  S  F  M   N  *
                GTCGAGCAGT GCTGAATGGC GGCCTGGGGG GTGCCGCTGT CCCGGTCCAC
                                                    -35
                GTGGGAATTC GGCCGGGAGA TCGGCCACTT GCGGGGCCAG CGACCATCTG
                      -10          +1
                CTGTCCATGG AACACATCGT ACGGACCGGT GAGCTCGCCC CCGGCGACCA
                CGTCCTGCAA CTCGCCACGG CCCCGGGCCT GGTGGTGTCC AGCGCCGTCC
                                  RBS
                TTCAGGTTCT CGAATCGCCG GACTGGGACG AATGATGAAT ACCGGCAACG
AviM                                          M  M  N  T   G  N  D
```

Abb. 4.8: Promotorstruktur von *aviM* (nach Strohl, 1992). Fett dargestellt sind konservierte Basen in der Promotorsequenz.

Für die Lokalisation der biosynthetischen Gene im Bereich des dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegens ließ sich damit die folgende Anordnung im Avilamycin-Biosynthesegencluster ableiten (Abb. 4.9).

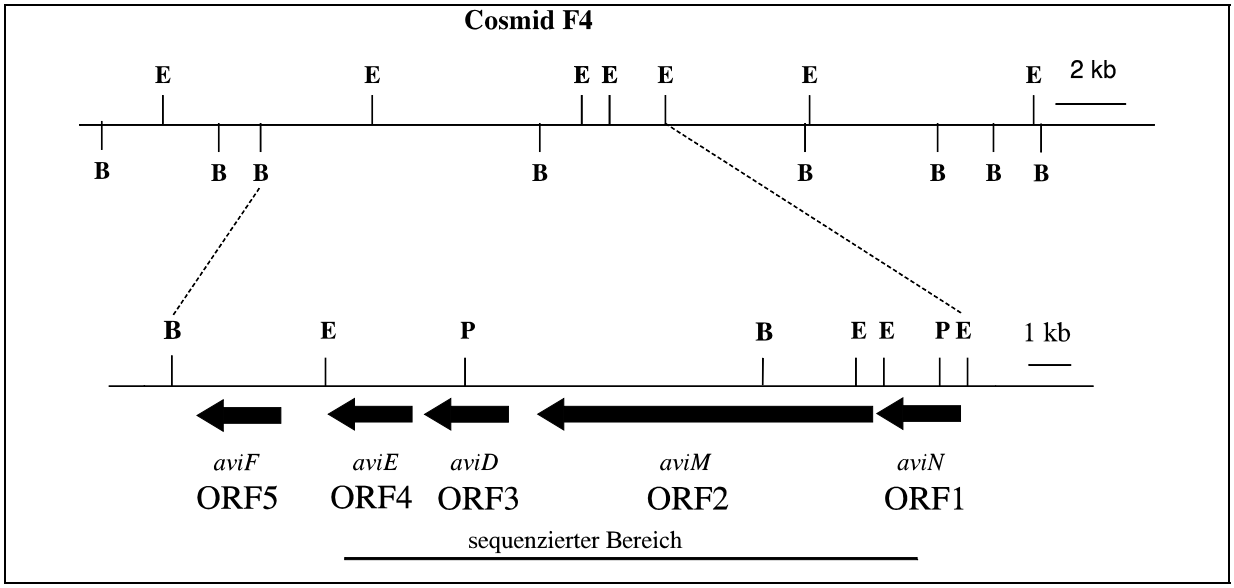


Abb. 4.9: Offene Leserahmen aus Cosmid F4 im Bereich um die dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase Restriktionsschnittstellen zur Kartierung: E = *Eco*RI, B = *Bam*HI, P = *Pst*I.
Der Strich stellt den im Rahmen der vorliegenden Arbeit doppelsträngig sequenzierten Bereich der Biosynthesegene von ca. 9 kb dar.
aviF = UDP-Glucose-Epimerasegen, *aviE* = dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen, *aviD* = dNDP-Glucose-Synthetasegen, *aviM* = Orsellinsäuresynthasegen, *aviN* = homologes Gen zu *dpsC*

Die Zuckerbiosynthesegene *aviF*, welches für eine UDP-Glucose-4-Epimerase kodiert, *aviE*, das Gen der dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase sowie *aviD*, das Gen für das Glucose-aktivierende Enzym dNDP-Glucose-Synthetase liegen in enger Nachbarschaft zueinander.

Stromaufwärts davon und in derselben Leserichtung wie *aviD, aviE,* und *aviF* liegen die beiden Gene *aviM* und *aviN*, deren abgeleitete Aminosäuresequenz Homologien zu Enzymen aus dem Polyketidstoffwechsel von Streptomyceten zeigen.

4.4.2 Analyse von AviM und AviN auf Proteinebene

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *aviN* zeigte 40 % Identität zu DpsC aus *S.peuceticus* ATCC 29050 (Grimm et al., 1994) und zu ORF C aus *Streptomyces* Stamm C5 (Ye et al., 1994). Die beiden Gene sind an der Biosynthese von Doxorubicin bzw. Daunorubicin beteiligt. Ihre exakte Funktion ist jedoch bisher noch nicht bekannt. Von Rajgarhia et al. (1997) wird vermutet, daß DpsC an der Auswahl von Propionyl-Coenzym A als Startereinheit beteiligt ist. Seine Funktion ist jedoch für die Biosynthese eines Polyketids nicht essentiell. Dies hatten Versuche gezeigt, bei denen *dpsC* in *Streptomyces* Stamm C5 durch *aph*I (ein Neomycinaminophosphotransferasegen) ersetzt wurde. Dieser Genaustausch beeinflußte die Produktion des Polyketids Aklanonsäure nicht. Im Falle von AviN könnte seine Funktion in Analogie zur Funktion von DpsC in der Bereitstellung von Malonyl-CoenzymA liegen. Allerdings ist, wie in 4.4.3 gezeigt werden konnte, auch seine Funktion für die Biosynthese des Polyketids nicht essentiell.

Das Gen *aviM* kodierte für ein 1293 Aminosäuren großes Protein. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *aviM* zeigte durchschnittlich 32 % Identität zu einer 6-Methyl-salicylsäuresynthase (MSAS) aus *Penicillium patulum* (Beck et al., 1990). Einzelne Domänen in AviM zeigten höhere Identität als die dazwischenliegenden Bereiche. Diese Bereiche konnten in der MSAS den funktionellen Domänen für die Ketosynthase (KS), die Acyltransferase (AT) und das Acylcarrierprotein (ACP) zugeordnet werden. Die Bereiche der Dehydratase und der Ketoreduktase aus der MSAS fehlen in AviM. Die Anordnung der funktionellen Domänen ist in beiden Enzymen kolinear. Abbildung 4.10 stellt diesen Vergleich der Aminosäuresequenzen von AviM und MSAS mit den funktionellen Domänen dar.

```
AviM          1 MMNTGNDERN MPVISLDRPA DS-------- -LSPVAVVGI GCRFPGGVNS
MSAS          1 MHSAATSTYP SGKTSPAPVG TPGTEYSEYE FSNDVAVVGM ACRVAGGNHN
Konsensus       M             S                    VAVVG   CR  GG

AviM         51 PGEFWDLLTA GRNTVGEMPP DRWEEYRDFG PRFDAALRTA IRSGSFLDDD
MSAS         51 PELLWQSLLS QKSAMGEIPP MRWEPYYRRD ARNEKFLKNT TSRGYFLDR-
Konsensus       P   W  L        GE PP  RWE Y      R    L       G FLD

AviM        101 IAGFDAEFFG ISPREAELMD PQQRLMLEVA WQALEHAGIP PHTLAGTDTG
MSAS        101 LEDFDCQFFG ISPKEAEQMD PQQRVSLEVA SEALEDAGIP AKSLSGSDTA
Konsensus         FD  FFG ISP EAE MD PQQR  LEVA   ALE AGIP    L G DT

AviM        151 VFAGVCTYDY GAGRLEDLPN IDAWTGIGAA VCAVSNRVSH ALDLRGPSLS
MSAS        151 VFWGVNSDDY SKLVLEDLPN VEAWMGIGTA YCGVPNRISY HLNLMGPSTA
Konsensus       VF GV   DY     LEDLPN   AW GIG A  C V NR S   L L GPS

AviM        201 IDTACSASLV ALHTAAQSLR LGECTVALAG GVNLLVSPGQ TIALGTAGAL
MSAS        201 VDAACASSLV AIHHGVQAIR LGESKVAIVG GVNALCGPGL TRVLDKAGAI
Konsensus        D AC  SLV A H   Q  R LGE  VA  G GVN L  PG T  L   AGA

AviM        251 APDGRSKPFA ASADGYGRGE GCGVLVIKLL TDAVRDGDRV LAVLRGSAFN
MSAS        251 SSDGSCKSFD DDAHGYARGE GAGALVLKSL HRALLDHDNV LAVIKGSAVC
Konsensus        DG  K F    A GY RGE G G LV K L   A  D D V LAV  GSA

AviM        301 QDGRTNGIMA PCGQAQEHVM RRALTAAGVA ADTVDFVEAH GTGTRLGDPM
MSAS        301 QDGKTNGIMA PNSVAQQLAA NNALSAANID PHTVRYVEAH ATSTPLGDPT
Konsensus       QDG TNGIMA P   AQ       AL AA      TV  VEAH  T T LGDP

AviM        351 EIGAIAAVYG RDRSGQEPCA VGSVKSNIGH LEGAAGVAGV IKAILALDED
MSAS        351 EISAIASVYG ADRPADDPCY IGSIKPNIGH LEAGAGVMGF IKAVLAIQKG
Konsensus       EI AIA VYG  DR    PC  GS K NIGH  LE  AGV G  IKA LA

AviM        401 RIPASLLDGD PNPEIDWAGL DIRLATRALP WPERPHPRRA AVSGFGYGGT
MSAS        401 VLPPQANLTK LNSRIDWKTA GVKVVQEATP WPESDPIRRA GVCSYGYGGT
Konsensus         P         N  IDW          A P WPE    RRA  V   GYGGT

AviM        451 VAHVVLEQAP TAPARPAPEP AGTLFPVSAA SPEALRDRAA ALAERVEEGA
MSAS        451 VSHAVIEEFS PILQPDPLGN GAVSGPGLLL LSGPQEKRLA LQAKTLRDWM
Konsensus       V H V E                  P          R A   A

AviM        501 DLASVGHTLA HRQSPLVHRA AVVATGRDEL AAGLRALATQ EPAPGLVTGA
MSAS        501 TAEGKDHNLS DILTTLATRR DHHDYRAALV VDDYRDAEQV LQSLANGVDH
Konsensus           H L       L  R               R
AviM        551 ALPDAGRP-- -------VWV FSGHGSQWAG MGRELLEAEP VFAEVIDELE
MSAS        551 TFTTQSRVLG SDISKDVVWV FSGHGAQWPD MGKQLIH-NP VFFAAIQPLD
Konsensus           R            VWV FSGH  QW   MG  L    P VF   I  L

AviM        601 PVFKEEIGFS PRQMLLEGDH TEVDGAQTMI FAMQLGLAAL WRSRGVEPAA
MSAS        601 ELIQAEIGLS PIELLRTGDF ESSDRVQILT YVMQIGLSAL LQSNGITPQA
Konsensus           EIG S P   L  GD     D  Q      MQ GL AL   S G  P A

AviM        651 VIGHSVGEIA AAVTAGALTV TDGARLICRR SLLLREAAGR GAMAMVSLPF
MSAS        651 VIGHSVGEIA ASVVAGALSP AEGALIVTRR ALLYRQVMGK GGMILVNLPS
Konsensus       VIGHSVGEIA A V AGAL     GA    RR  LL R   G  G M  V LP

AviM        701 DEAAERLAGN DAVVAAIASS TTSTVISGDP GEVEKVVGRW TDEGLVVRRV
MSAS        701 AETEEILGSR SDLVVAIDSS PSSCVVAGDK ELVAETAEAL KARGVKTFTV
Konsensus        E  E L       V AI SS   S V  GD    V          G     V

AviM        751 ASDVAFHSPH MDPLLDRLRA A-ADELSPSA PHTPLYTTAL ADPRATVTAD
```

KS

```
MSAS        751 KSDIAFHSPT LNGLVDPLRD VLAETLSPVS PNVKLYSTAL ADPRGQDLRD
Konsensus        SD AFHSP     L D LR    A  LSP   P   LY TAL ADPR     D

AviM        801 GAYWAANLRN PVRLAAAITA AAEDGHRAFV ELSPHPVVAH SIHETLAERG
MSAS        801 VEYWAGNMVN RVRLTSAVKA AVEDGYRLFL EVSTHPVVSH SINETLMDAG
Konsensus        YWA N  N  VRL  A  A A EDG R F  E S HPVV H SI ETL   G

AviM        851 VEDVFVGPTL RRNQPEARTF RAAVGAAHCH GVSVDWSALQ PNGNLEVLPP
MSAS        851 MEDFAVIPTL LRKKPTEKHI LHSIAQLHCR GAEVNWAAQM PGRWATGVPT
Konsensus        ED  V PTL  R  P             HC  G  V W A   P       P

AviM        901 YPWQHRPLWR SIAGAR-AAE RGHDVDSHTL LGTPGGVAGS DLRLWHSTLD
MSAS        901 TTWMHKPIWR KIETAPLHTG LTHDVEKHTL LGQRIPVPGT DTYVYTTRLD
Konsensus        W H P WR  I  A        HDV  HTL LG    V H  D       LD

AviM        951 DDSRPYPGSH ALNGVEIVPA AVLAVTFLAA GAEGEERRAL QDMTMTHPVL
MSAS        951 NDTKPFPGSH PLHGTEIVPA AGLINTFL-- --KGTGGQML QNVVLRVPVA
Konsensus        D  P PGSH  L G EIVPA A L  TFL      G     L Q      PV

AviM       1001 TAGQRQIQVV REGEVVRLAS RTVADAA--- DPNPAWLVHA EARTAAPDLA
MSAS       1001 INAPRSVQVV VQQDQVKVVS RLIPSEPSQL DDDASWVTHT TAYWDRKVAG
Konsensus         R  QVV      V   S R          D    W  H    A

AviM       1051 GLAARSLLDP GEHRLEPADP GLVSRRLAEV GVPSTGFDWS VE--------
MSAS       1051 SEDRIDFAAV KSRLVTKLAD NFSIDYLDKV GVSAMGFPWA VTEHYRNDKE
Konsensus                                  L  V GV   GF W  V

AviM       1101 ---RLSAGLG VLHAQVLSPD ASSWAPLLDA VMSIAPAAFV GLP-QLRMVV
MSAS       1101 MLARVDVNPA ISGDAPLPWD SSSWAPVLDA ATSVGSTIFP TPALRMPAQI
Konsensus         R             L  D  SSWAP LDA   S     F

AviM       1151 HVDEITVDGT PPEAATVEVA LDPRVADTVH ALVTDGEGRP VASLRGLRYP
MSAS       1151 ERVEVFTSQD PPKISWLYVQ EASDSVPTSH VSVVSEAGEV LAKFTAMRFS
Konsensus         E       PP      V         T H   V    G    A     R

AviM       1201 VVEQPAAP-- ---------- ---------- ---------- ----------
MSAS       1201 EIEGTPGVSG SMESLVHQIA WPPATPAEEP LSIETVILVS PDATTRALYA
Konsensus         E

AviM       1251 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
MSAS       1251 ASLPTRVNSF QFSSTQEFFS NASSLPLEKG TVVTYIPGEV ASLAEVPAAS

AviM       1301 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
MSAS       1301 ESFTWNLLEL IKFTVNGSLP IKVFTLTANI GEGQTPTALA QSPLYGLARV

AviM       1351 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
MSAS       1351 IASEHPDLGT LIDVEEPVIP LSTMRYIQGA DIIRINDGIA RTSRFRSLPR

AviM       1401 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
MSAS       1401 NKLLPASEGP RLLPRPEGTY LITGGLGVLG LEVADFLVEK GARRLLLISR

AviM       1451 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
MSAS       1451 RALPPRRTWD QVSEDLQPTI AKIRLLESRG ASVHVLPLDI TKPDAVEQLT

AviM       1501 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
MSAS       1501 TALDRLSLPS VQGVVHAAGV LDNELVMQTT RDAFNRVLAP KIAGALALHE

AviM       1551 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
MSAS       1551 VFPPKSVDFF VMFSSCGNLV GFTGQASYGS GNAFLDTLAT HRARLGDAAV

AviM       1601 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

AT

(DH)

KR

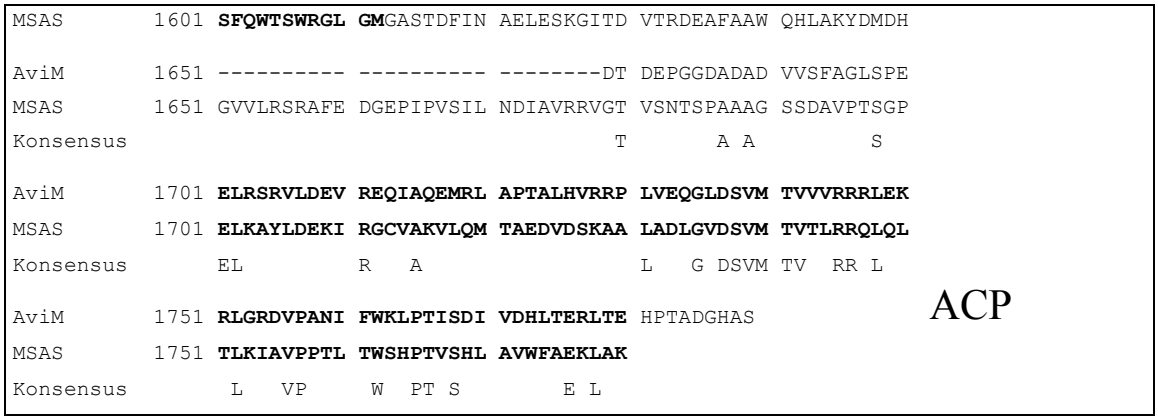


Abb. 4.10: Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von AviM aus *S.viridochromogenes* Tü57 und der Methylsalicylsäuresynthase (MSAS) aus *P. patulum* zeigt den kolinearen Aufbau der beiden Enzyme. Fett dargestellt sind die Bereiche, denen funktionelle Domänen zugeordnet werden konnten
(KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, DH = Dehydratase, KR = Ketoreduktase, ACP = Acylcarrierprotein)

4.4.3 Funktionelle Expression von *aviM*

Zur weiteren Überprüfung der Funktion von AviM wurde ein 5,5 kb *Pst*I-Fragment in den Vektor pWHM3 kloniert. Der Vektor pWHM3 ist ein *E.coli*-Streptomyceten-Shuttle-Vektor, der in hoher Kopienzahl in Streptomyceten vorliegt. Wie frühere Experimente gezeigt hatten, (Decker et al., 1993, Wang et al., 1994), eignet er sich zur Expression von Streptomycetengenen. Auf dem klonierten 5,5 kb *Pst*I-Fragment liegt der carboxyterminale Bereich von *aviN*, sowie der aminoterminale Teil von *aviD*.

Im Konstrukt pMSS4.3 lag, wie in Abb. 4.11 dargestellt, *aviM* in derselben Orientierung wie das Thiostreptonresistenzgen, im Konstrukt pMSS4.5 lag der Leserahmen von *aviM* in umgekehrter Orientierung. Das Konstrukt pMSS4.3 ermöglichte es, den Promotor für das *lacZ*-Gen des Vektors zur Transkription von *aviM* mitzubenutzen, in pMSS4.5 wird ein eigener Promotor auf dem klonierten Fragment benötigt.

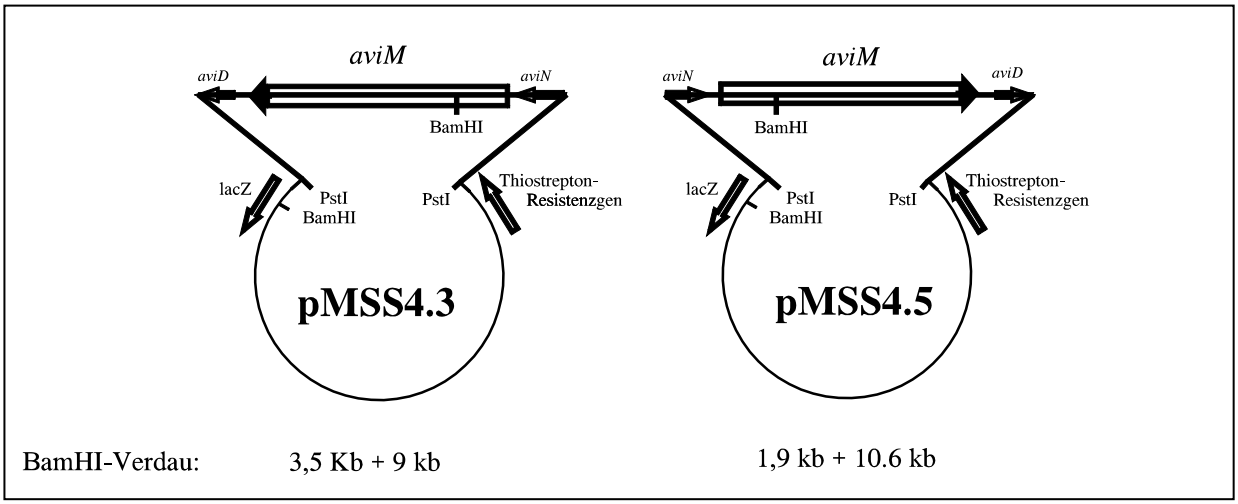


Abb. 4.11: Überexpressionskonstrukte für *aviM*. Ein 5,5 kb *Pst*I-Fragment wurde in pWHM3 kloniert. Das Konstrukt enthält den vollständigen ORF von *aviM*, das carboxyterminale Ende von *aviN* und das aminoterminale Ende von *aviD.* In Konstrukt pMSS4.3 kann *aviM* vom Promotor für *lacZ* transkribiert werden, in pMSS4.5 wird zur Transkription von *aviM* ein eigener Promotor benötigt.

Beide Konstrukte wurden in *S.lividans* TK24 transformiert. Transgene Sporen wurden auf R5-Medium unter Thiostrepton-Selektionsdruck für 5 Tage angezogen. Extraktion der bewachsenen Platten mit Ethylacetat und dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte, wie unter 3.11.5 beschrieben, ergab, daß *S.lividans* x pMSS4.3 ein neues Produkt bildete. Dieses färbte sich bei Besprühen der DC-Platte mit methanolischer $FeCl_3$-Lösung und anschließendem Erhitzen der Platte für 5 min bei 120°C braun (Abb. 4.12). Diese Braunfärbung ist ein Indiz für Salicylsäure und ihre Derivate (Pachaly, 1991). Die Bildung des neuen Produkts konnte in *S.lividans* x pMSS4.5 nicht beobachtet werden.

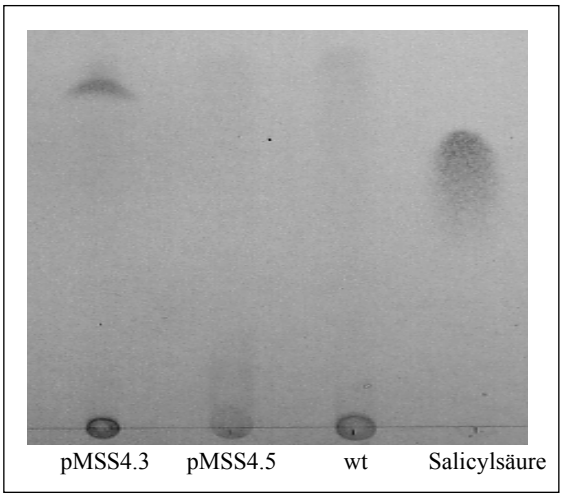


Abb. 4.12: Dünnschichtchromatographische Auftrennung des Produkts von AviM. Das neue Produkt und Salicylsäure als Referenz färben sich nach Besprühen mit $FeCl_3$ braun (vgl. Material und Methoden 3.11.5).

pMSS4.3 = *S.*lividans x pMSS4.3
pMSS4.5 = *S.lividans* x pMSS4.5
wt = Wildtyp *S.lividans*

4.4.4 Identifikation des Produkts von AviM

Von der neuen Substanz wurde mittels DC-UV-Kopplung ein UV-Spektrum angefertigt. Das neue Produkt zeigte die typische Kurve eines Aromaten mit 3 Absorptionsmaxima (Hesse et al., 1995) (Abb. 4.13). Untersuchung des Produkts im Rohextrakt der Ethylacetatextraktion (vgl. 4.4.3) mittels Fluoreszenz-Spektroskopie ergab bei einer Excitation mit 310 nm ein Emissionsmaximum bei 427 nm. Vergleichsdaten aus der Literatur für 6-Methylsalicylsäure (Vogel et al., 1975) zeigten bei einer Excitation mit 310 nm ein Emissionsmaximum bei 420 nm an. Die Untersuchung des neuen Produkts über DC-IR-Kopplung im Vergleich zu Salicylsäure ergab für die neue Substanz charakteristische Peaks bei 1723, 1602, 1494 und 1463 cm^{-1}. Die Vergleichswerte der Salicylsäure lagen bei 1722, 1630, 1598, 1490 und 1464 cm^{-1}. Alle diese Daten deuteten darauf hin, daß es sich bei der neuen Substanz um eine der Salicylsäure verwandte aromatische Substanz handelte.

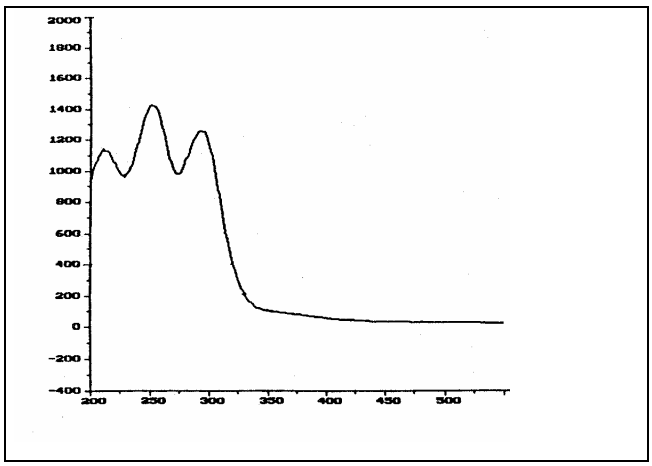


Abb. 4.13: UV-Spektrum des neuen Produkts von AviM aufgenommen durch DC-UV-Kopplung (vgl. Material und Methoden 3.11.5)

Wie unter 3.11.4 beschrieben, wurde das Produkt von AviM aus 20 Platten R5-Medium durch alkalische und saure Extraktion, gefolgt von präparativer Dünnschichtchromatographie und Gelfiltration über Sephadex LH20-Säulen gereinigt. Aus 400 ml Medium konnten 30 mg der neuen Substanz isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels NMR-Spektroskopie in d_6-Aceton und Massenspektroskopie durch Dr. Andreas Kirschning, Technische Universität Clausthal. Das Massenspektrum erbrachte unter hochauflösenden Bedingungen ein Molekulargewicht von m/z = 168,0422 [M^+] (Abb. 4.14). In Kombination mit dem ^{13}C NMR (Abb. 4.15: δ = 174,9 [COOH], 167,1 [C-4], 163,2 [C-2], 145,1 [C-1], 112,0 [C-5],

105,9 [C-6], 101,6 [C-3], 24,5 [CH_3] ppm) konnte daraus die neue Substanz als Orsellinsäure (= 2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoesäure) identifiziert werden.

Dieses Ergebnis wurde in der 400 mHz ^{1}H NMR-Spektroskopie mit zwei Resonanzen für 5-H bei δ = 6,27 ppm (d, *J* = 2.3 Hz) und für 3-H bei δ = 6,21 ppm (d, *J* = 2.3 Hz) bestätigt. Eine Methylgruppe wurde bei 2,53 ppm detektiert. Sie zeigte einen starken Overhauser-Effekt (16 %) zu 5-H. Zusätzlich wurden 3 austauschbare Protonen bei 6,2 bis 5,53 ppm (b, H2) und bei 3,32 ppm (s, 1H) detektiert (A. Kirschning, persönliche Mitteilung).

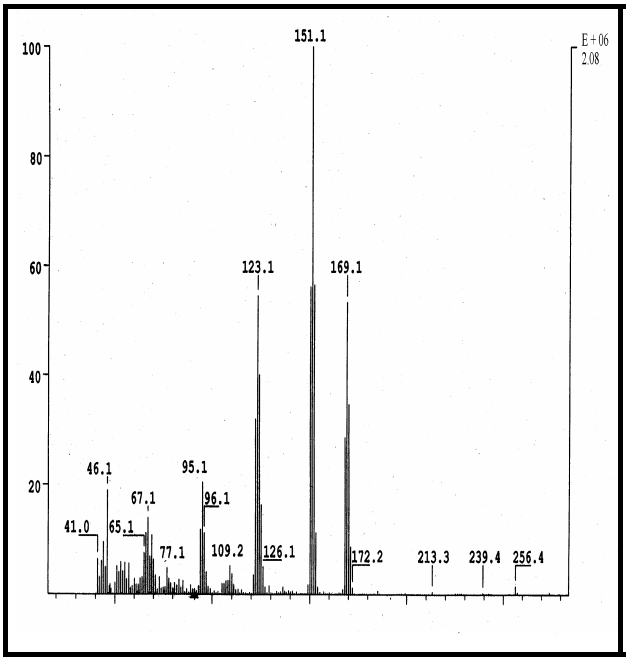


Abb. 4.14: Massenspektrum der Orsellinsäure (erstellt in Kooperation mit Dr. A. Kirschning wie in 3.11.5 beschrieben)

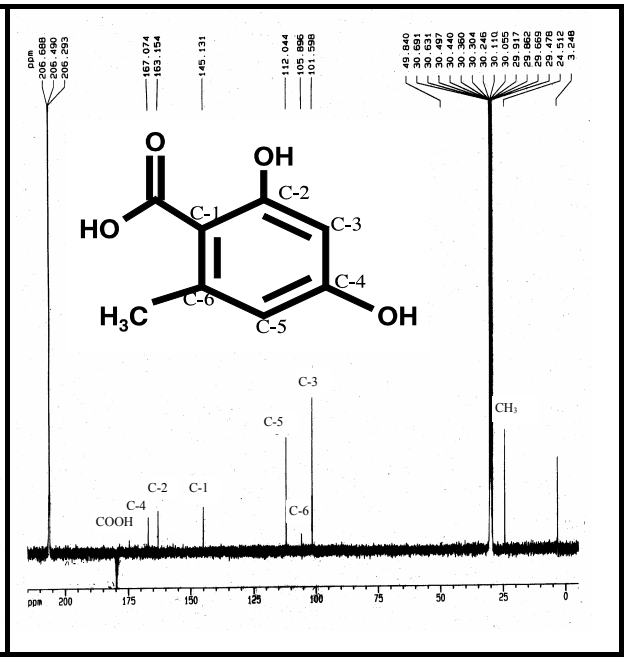


Abb. 4.15: ^{13}C NMR der Orsellinsäure (erstellt in Kooperation mit Dr. A. Kirschning wie in 3.11.5 beschrieben)

Im Vergleich der Orsellinsäure mit der Struktur von Avilamycin zeigt sich, daß die Orsellinsäure eine Vorstufe der Dichloroisoeverninsäure darstellen könnte (Abb. 4.16). Die Biosynthese des Polyketidanteils im Avilamycin könnte durch einen Enzymtyp katalysiert werden, dessen Vorkommen bisher nur für Eukaryoten beschrieben war. Die Orsellinsäuresynthase AviM ist der erste Nachweis, daß auch in Prokaryoten die Polyketidsynthese durch eine multifunktionelle, iterative Polyketidsynthase TypI katalysiert werden kann.

Parallel zur Strukturaufklärung des Produkts der Reaktion von AviM wurden, wie in 3.12.2 beschrieben, Vorversuche zur enzymatischen Aktivität der Orsellinsäuresynthase AviM im Rohextrakt transgener *S.lividans* x pMSS4.3 durchgeführt. Die fluorimetrischen Messungen zeigten ein Emissionsspektrum, das dem der Methylsalicylsäure ähnlich war und weit über

der Hintergrundaktivität der Negativkontrolle mit Rohextrakt aus *S.lividans* x pWHM3 lag. Auf eine Aufreinigung der gebildeten Substanz wurde jedoch verzichtet, da das Produkt, das von *S.lividans* x pMSS4.3 gebildet worden war, zwischenzeitlich eindeutig als Orsellinsäure identifiziert worden war.

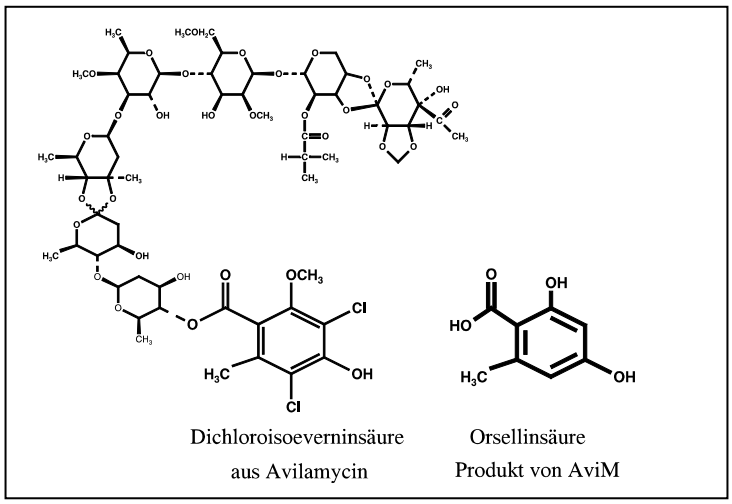


Abb. 4.16: Strukturvergleich von Dichloroisoeverninsäure aus Avilamycin und Orsellinsäure

4.5 Resistenzmechanismen in S.viridochromogenes Tü57

4.5.1 Grundlagen

Im Biosynthesegencluster eines Antibiotikums befinden sich häufig auch Resistenzgene, durch deren Genprodukte der Antibiotikaproduzent vor seinem eigenen Produkt geschützt wird (Chater et al., 1983). Ein Nachweis eines Resistenzgens auf den Dehydratase-positiven Cosmiden stellt deshalb ein weiteres Indiz dafür dar, daß der klonierte Bereich tatsächlich das Biosynthesegencluster für Avilamycin enthält. Die Aufklärung des Resistenzmechanismus hat zusätzlich große Bedeutung, wenn mittels Kombinatorischer Biosynthese neue biologisch aktive Substanzen synthetisiert werden sollen. Die Kenntnis des Resistenzmechanismus sowie seine Koexpression mit den neuen Produkten kann essentiell sein, um den transgenen Produzenten vor seinem eigenen Produkt zu schützen. Zusätzlich kann die Kenntnis des Resistenzmechanismus auch Aussagen über den Wirkort eines Antibiotikums ermöglichen.

4.5.2 Identifikation eines ABC-Transporters im Avilamycin-Biosynthesecluster

Geclustert mit den Biosynthesegenen für ein Antibiotikum findet man häufig Gene für Transportproteine, sogenannte ABC-Transporter. Dabei steht ABC für "ATP binding cassette", dem gemeinsamen Strukturmerkmal aller ABC-Transporter. ABC-Transporter wurden u.a. in *S.antibioticus*, in *S.peuceticus* und in *S.argillaceus* gefunden. Die ABC-Transporter kann man in 3 Gruppen einteilen (Krügel, 1997). Die 3 Gruppen unterscheiden sich durch die Anordnung konservierter Regionen, sogenannter Walker-Regionen und durch das Vorhandensein eines hydrophoben Proteins bzw. einer hydrophoben Domäne (Olano et al., 1995) (Abb. 4.17):

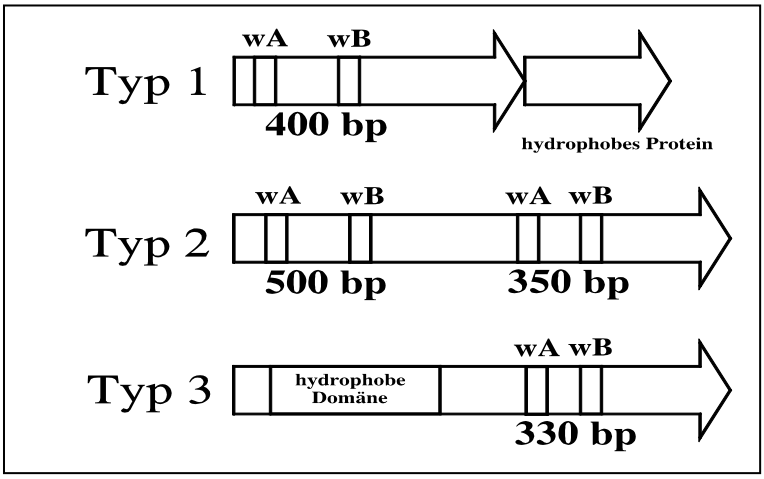


Abb. 4.17: Einteilung der ABC-Transporter (Krügel, 1993). w = Walker-Motiv (Walker et al., 1982)

Im ABC-Transporter Typ1, wie er beispielsweise in OleC aus *S. antibioticus* vorkommt, liegen die konservierten Regionen Walker A (wA) und Walker B (wB) in einem Abstand von ca. 400 bp (Rodriguez et al., 1993). Direkt stromabwärts liegt ein hydrophobes Protein, welches mit der ATP-Bindungsstelle und der Membran interagiert. Im ABC-Transporter Typ2, nachgewiesen beispielsweise bei OleB aus *S.antibioticus*, kommt das Motiv wA-wB zweimal vor. Die Walker-Regionen wA-wB liegen im Abstand von ca. 500 bp und von 350 bp (Olano et al., 1995). In diesem Typ fehlt das hydrophobe Protein stromabwärts. Im dritten Typ, wie er im Bleomycin-Produzenten *S.verticillus* in Blm-ORF7 gefunden wurde, liegt das Motiv wA-wB in einem Abstand von 330 bp (Calcutt et al., 1994). Im aminoterminalen Bereich des Proteins findet sich eine hydrophobe Domäne.

Avilamycin wird während des Wachstums von *S.viridochromogenes* Tü57 an das Nährmedium abgegeben. Deshalb wurde vermutet, daß auch im Avilamycin-Biosynthesegencluster ein ABC-Transportergen lokalisiert ist.

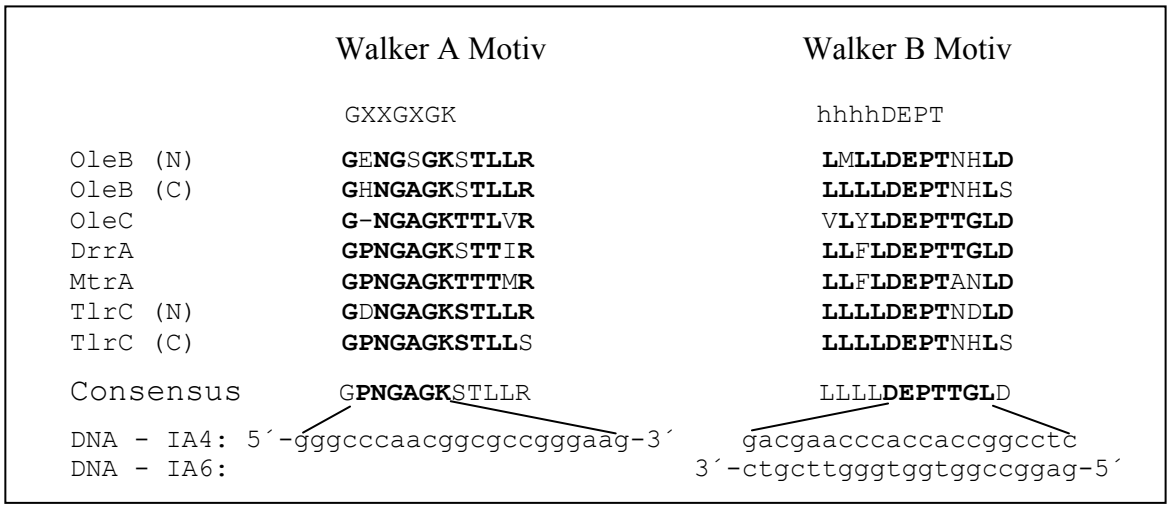


Abb. 4.18: Consensus-Sequenzen aus den Walker-Regionen verschiedener ABC-Transporter. OleB, OleC (Olano et al., 1995), DrrA (Guilfoile et al., 1991), MtrA (Fernandez et al., 1996), TlrC (Rosteck et al., 1991).

Aus den Walker-Regionen verschiedener ABC-Transporter (OleB, OleC (*S.antibioticus*), DrrA (*S.peuceticus*), MtrA (*S.argillaceus*), TlrC (*S.fradiae*)) wurden im Labor von Prof. J.A. Salas, Universität Oviedo, Spanien, Primer abgeleitet (Abb. 4.18).

Wie in 3.8.8 dargestellt, wurden diese Primer zur PCR mit genomischer DNA sowie den positiven Cosmide von *S.viridochromogenes* Tü57 aus 4.3 eingesetzt. Mit dem Primerpaar IA4-IA6, bei dem sich Primer IA6 aus der Consensus-Sequenz von ABC-Transportern Typ1 (DEPT**TG**L: OleC, DrrA, MtrA) ableitete, konnte aus genomischer DNA ein 402 bp Fragment und ein 450 bp Fragment amplifiziert werden. Aus den Cosmiden H4 und P2 wurde ein 402 bp Fragment amplifiziert. Mit dem Primerpaar IA4-wB(all), bei dem sich Primer wB(all) aus dem Walker-Motiv wB der ABC-Transporter Typ2 ableitete (DEPT**NH**L), konnte kein Fragment amplifiziert werden. Die Primer IA4 und IA6 wurden so entwickelt, daß mittels überstehender Enden eine *Eco*RI- (Primer IA4) bzw. eine *Hind*III-Schnittstelle (Primer IA6) eingefügt wurde. Alle Fragmente wurden über die in den Primern enthaltenen *Eco*RI / *Hind*III-Schnittstellen in pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985) subkloniert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des 450 bp großen Fragments zeigte Homologien zu verschiedenen Aminosäure-ABC-Transportern (39 % Identität, 56 % Ähnlichkeit zu Leucin-Transportern aus *E.coli*) - diese Homologie deutete darauf hin, daß dieser Transporter nicht am Resistenz-Mechanismus beteiligt ist (Abb. 4.19). Die abgeleitete

Aminosäuresequenz des 402 bp-Fragments hingegen zeigte 62 % Identität zu OleC, dem Oleandomycin-ABC-Transporter aus *S.antibioticus*. Weitere Homologien in ähnlicher Größenordnung fanden sich für DrrA aus *S.peuceticus* und für den ABC-Transporter aus *S.argillaceus*. Dies sind ABC-Transporter Typ1, welche am Resistenzmechanismus beteiligt sind.

Die Gesamtsequenz des 402 bp großen Fragments ist im Anhang (7.1.4) dargestellt. Anhand der Größe des Fragments von 402 bp, das den Abstand der beiden Walker-Regionen wA und wB im ABC-Transporter Typ1 widerspiegelt sowie der Homologie zu ABC-Transportern vom Typ1 kann davon ausgegangen werden, daß der Export von Avilamycin in *S.viridochromogenes* Tü57 über einen ABC-Transporter Typ1 erfolgt.

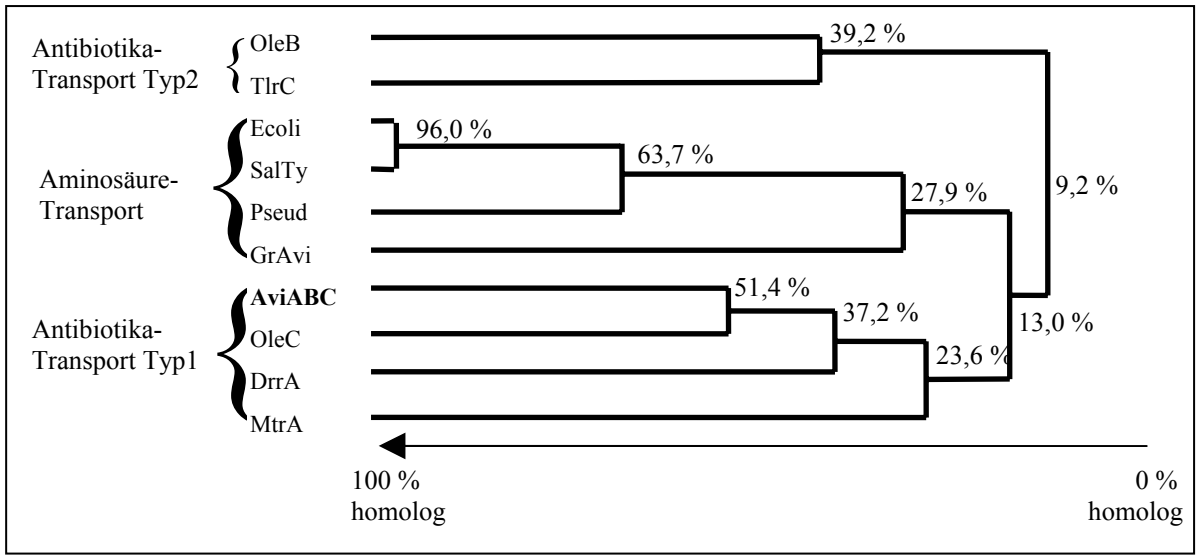


Abb. 4.19: Stammbaum verschiedener ABC-Transporter aufgrund Aminosäurehomologie. Die Prozentangaben geben die Verwandtschaftsnähe wieder, d.h. je höher die Prozentzahl, desto näher die Verwandtschaft zwischen zwei Proteinen. Der Stammbaum wurde mit den Voreinstellungen des "multiple alignment" im Softwarepaket Wdnasis V2.1 erstellt (gap penalty = 5, number of top diagonals = 5, fixed gap penalty = 10, K-tuple = 2, window size =5, floating gap penalty = 10).

OleB = Antibiotika-Transporter Typ2 aus *S.antibioticus* ((Olano et al., 1995)
TlrC = Antibiotika-Transporter Typ2 aus *S.fradiae* (Rosteck et al., 1991)
Ecoli = Aminosäure-Transporter aus *E.coli* (Adams et al., 1990)
SalTy = Aminosäure-Transporter aus *Salmonella typhimurium* (Matsubara et al., 1992)
Pseud = Aminosäure-Transporter aus *Pseudomonas aeruginosa* (Hoshino et al., 1990)
GrAvi = 450 bp Fragment amplifiziert aus genomischer DNA von *S.viridochromogenes* Tü57
AviABC = 402 bp Fragment amplifiziert aus genomischer DNA von *S.viridochromogenes* Tü57
OleC = Antibiotika-Transporter Typ1 aus *S.antibioticus* (Rodriguez et al., 1993)
DrrA = Antibiotika-Transporter Typ1 aus *S.peuceticus* (Guilfoile et al., 1991)
MtrA = Antibiotika-Transporter Typ1 aus *S.argillaceus* (Fernandez et al., 1996)

4.5.3 Lokalisation und Expression des ABC-Transportergens *aviABC*

Das 402 bp Fragment aus genomischer DNA wurde als Digoxigenin-markierte Sonde zur Southern-Hybridisierung der Dehydratase-positiven Cosmide eingesetzt. Auf einem 14 kb *Pst*I-Fragment von Cosmid P2 und einem 6 kb *Eco*RI-Fragment der Cosmide P2 und H4 konnte das ABC-Transportergen über die Southern-Hybridisierungsexperimente lokalisiert werden (Abb. 4.5). Diese Fragmente wurden in den Vektor pWHM3 subkloniert und in *S.lividans* transformiert. Die mit dem ABC-Transportergen transformierten *S.lividans* vermochten auf 30 µg/ml Avilamycin zu wachsen, während *S.lividans* mit dem leeren Vektor pWHM3 bereits bei Konzentrationen von weniger als 5 µg/ml nicht mehr wuchs (Abb. 4.32b).

4.5.4 Identifikation eines weiteren Resistenz-vermittelnden Bereichs

Bei Expression aller Dehydratase-positiven Cosmide in *S.lividans* fiel auf, daß Transformanden mit dem Cosmid F4 resistent gegen Avilamycin waren. Wiederholte Transformation des Cosmids F4 in *S.lividans* bestätigte die Vermutung, daß auf diesem Cosmid ein weiterer Resistenz-vermittelnder Bereich lokalisiert sein mußte. Bedingt durch die Instabilität des Cosmidvektors pOJ446 konnten jedoch bei der Reisolierung des Cosmids nicht mehr alle Banden identifiziert werden. Das ganze Cosmid verlieh in *S.lividans* TK24 Resistenz gegen eine Avilamycinkonzentration von 20 µg/ml in HA-Medium.

Zur Eingrenzung des Resistenz-vermittelnden Bereichs wurden wie unter 3.10 beschrieben alle *Eco*RI- und *Bam*HI-Subclones des Cosmids F4 in *S.lividans* exprimiert und die Transfomanden auf Resistenz gegen Avilamycin untersucht. Ein Resistenz-vermittelnder Bereich konnte auf einem 6,3 kb *Eco*RI-Fragment bzw. einem 3,7 kb *Bam*HI-Fragment stromabwärts des Orsellinsäuresynthasegens *aviM* lokalisiert werden (Abb. 4.20).

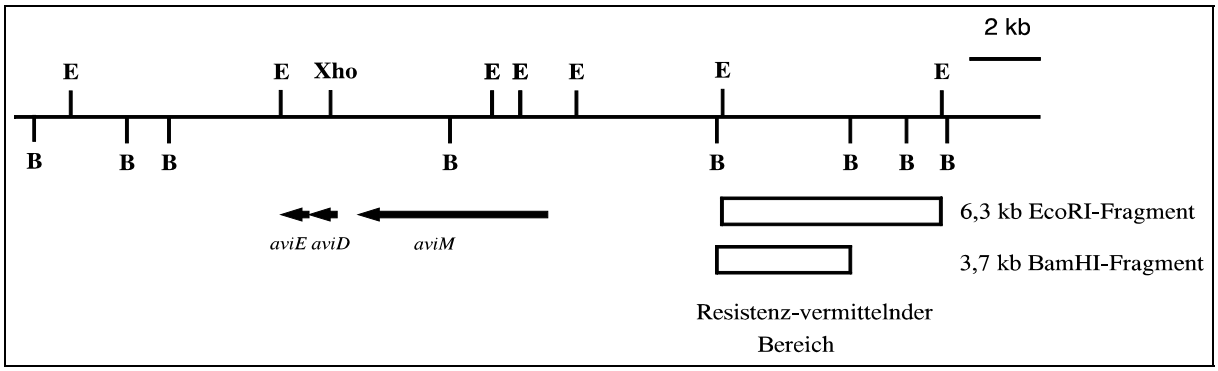


Abb. 4.20: Lokalisation des Resistenz-vermittlenden Bereichs im Cosmid F4
(B = *Bam*HI, E =*Eco*RI, Xho = *Xho*I)

4.5.5 Charakterisierung des Resistenz-vermittelnden Bereichs

Das 3,7 kb *Bam*HI-Fragment wurde doppelsträngig sequenziert. Auf ihm fanden sich drei putative offene Leserahmen (Abb. 4.21).

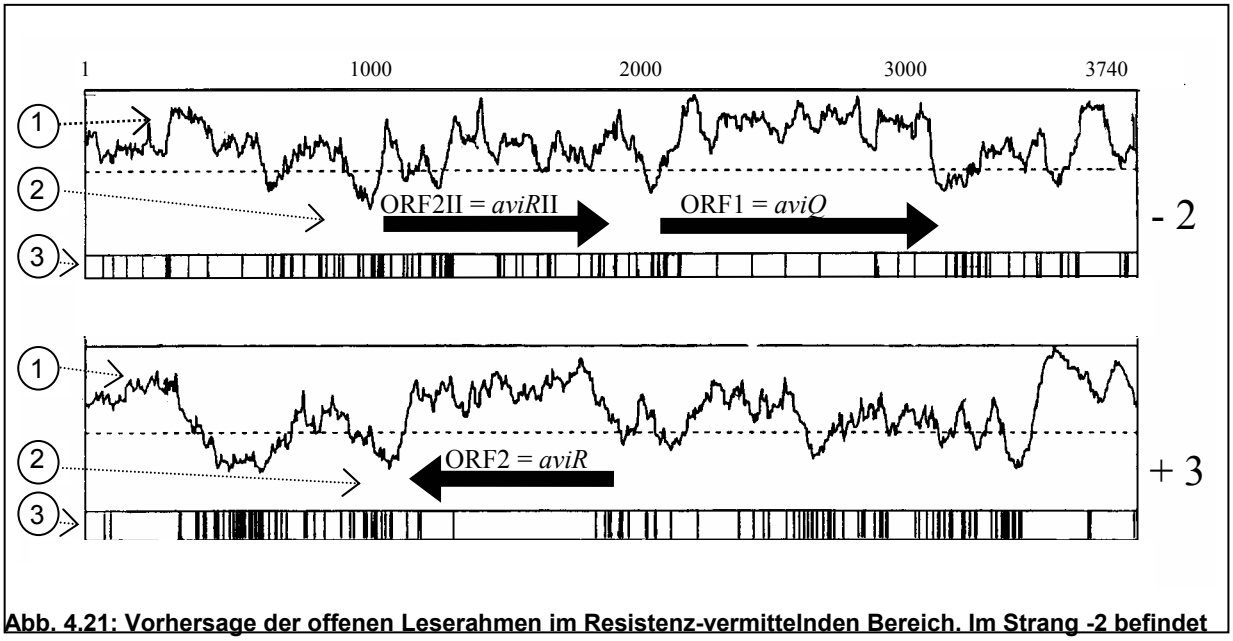


Abb. 4.21: Vorhersage der offenen Leserahmen im Resistenz-vermittelnden Bereich. Im Strang -2 befindet sich ORF1 = *aviQ* und ORF2II = *aviR*II, im Strang +3 lag ORF2 = *aviR*.
(1) = Kodierwahrscheinlichkeit, (2) = postulierter offener Leserahmen, (3) = seltene Codons

ORF 1 (Base 2107 - 3120) zeigte Homologie zu mehreren UDP-Glucose-4-Epimerase-Genen. Wie Tabelle 4.2 zusammenfaßt, wurde die höchste Anzahl identischer Aminosäuren von AviQ zur UDP-Glucose-4-Epimerase aus dem Archaebakterium *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996) sowie zu UDP-Glucose-4-Epimerasen aus Knöllchenbakterien wie *Azospirillum brasilense* (De Troch et al., 1994) und *Rhizobium* spec. (Sanchez-Andujar et al., 1996) gefunden. Diese Identitäten waren stärker ausgeprägt als zu einer UDP-Glucose-4-Epimerase aus *S.lividans* (Adams et al., 1988).

Organismus	Identische Aminosäuren	Datenbank-Eintrag (ID)	Referenz
Methanococcus jannaschii	42 %	Swissprot: GALE_METJA	Bult et al., 1996
Azospirillum brasilense	38 %	Swissprot: EXOB_AZOBR	De Troch et al.,1994
Rhizobium leguminosarum	38 %	Swissprot: EXOB_RHILT	Sanchez-Andujar et al., 1996
Streptomyces lividans	36 %	Swissprot: GALE_STRLI	Adams et al., 1988
Arabidopsis thaliana	34 %	PIR: S62783	Dörmann et al., 1996
Saccharomyces cerevisiae	24 %	Swissprot: GALX_Yeast	Tajima et al., 1985

Tab. 4.2: Identische Aminosäuren von AviQ zu verschiedenen UDP-Glucose-4-Epimerasen aus anderen Organismen.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der denkbaren Gene *aviR* (Base 1094 - 1851, invers) und *aviR*II (Base 1048 - 1908) zeigten keine Homologien zu bekannten Sequenzen aus der Datenbank. Der GC-Gehalt betrug für alle drei offenen Leserahmen mehr als 70 %. Stromaufwärts der Startcodons der drei putativen Leserahmen im Resistenz-vermittelnden Bereich ließen sich Sequenzen für mögliche Ribosomenbindungsstellen identifizieren, die Homologie zu den von Bibb und Cohen (1982) beschriebenen Consensus-Sequenzen aufzeigten (Tab. 4.3). Die Anzahl seltener Codons lag bei 4 % bzw. 5 % für *aviR* und *aviQ*. Das Gen *aviR*II hatte einen Anteil an seltenen Codons von 11 %. Dies könnte ein Indiz dafür sein, daß *aviR*II nicht das gesuchte Reistenzgen ist. Die vollständige Sequenz des Resistenz-vermittelnden Bereichs befindet sich im Anhang unter 7.1.3.

Gen	GC-Gehalt	Shine-Dalgarno-Sequenz	Größe des möglichen Proteins	
aviQ	72 %	TTGCGAGGAAGGGCGGGCCATG	320 AS	33,3 kDa
aviR	71 %	AGTACTGGGGAGTGGACAGGTG	250 AS	26,7 kDa
*aviR*II	72 %	AGGAACTGGGGAAACACTGGTG	286 AS	30,5 kDa

Tab. 4.3: Basengebrauch, Shine-Dalgarno-Sequenz und mögliches Genprodukt der 3 offenen Leserahmen im Resistenz-vermittelnden Bereich. Nucleotide, welche komplementär zum 3´-Ende der 16S rRNA (3´-UCUUUCCUCCACUAG-5´, nach Bibb et al., 1982) sind, sind unterstrichen dargestellt.

Im Bereich zwischen *aviQ* und *aviR* liegt ein 257 bp großes nicht-codierendes Fragment. Hier ließen sich nach den Consensussequenzen von Strohl (1992) zwei Promotorstrukturen in entgegengesetzter Orientierung lokalisieren (Abb. 4.22).

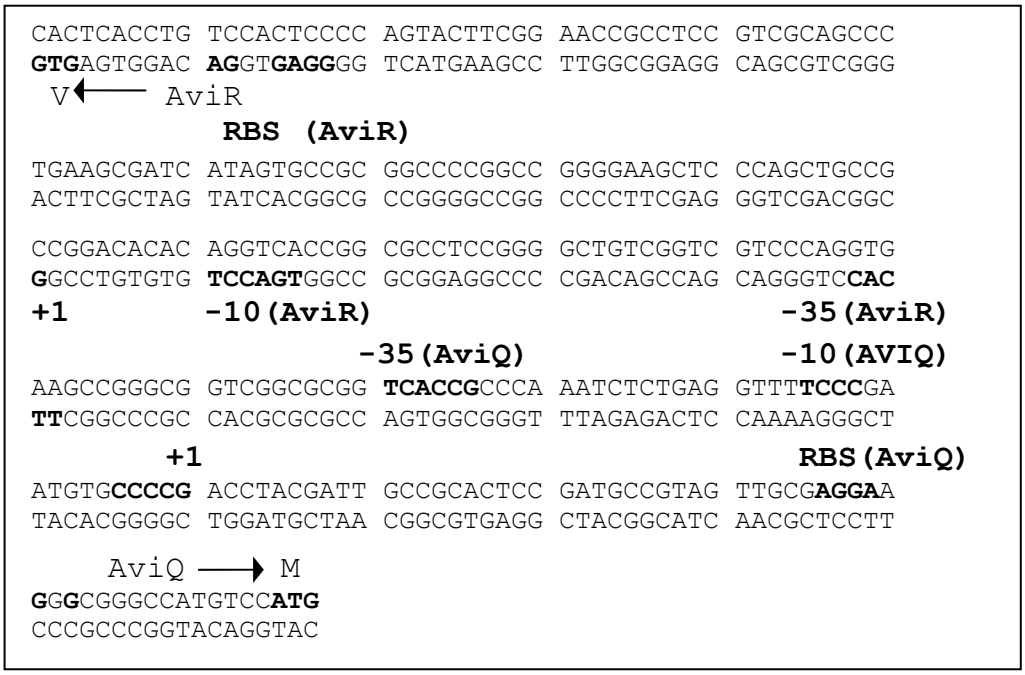


Abb. 4.22: Promotorbereich von *aviR* und *aviQ* nach Strohl (1992).

4.5.6 Untersuchungen zur Funktion von AviQ

Die Zucker im Avilamycin werden neben der Dichloroisoeverninsäure von Wright (1979) als die wichtigsten Bestandteile für die antimikrobielle Wirksamkeit von Avilamycin benannt. So entstand die Vermutung, daß die Resistenz durch Epimerisierung eines der Zucker vermittelt werde. Dies könnte Aufgabe von AviQ, der putativen UDP-Glucose-4-Epimerase sein.

Zur Funktionsaufklärung von AviQ wurde das Gen mittels PCR aus dem Resistenz-vermittelnden Bereich nach der unter 3.8.8 beschriebenen Methode amplifiziert. Die verwendeten Primer führten eine *Bam*HI- und eine *Nde*I-Schnittstelle vor den Genanfang bei Base 2107 und eine *Eco*RI-Schnittstelle kurz nach dem Genende (Base 3120) ein. Das mit *pfu*-Polymerase (Stratagene) amplifizierte Fragment wurde in den Vektor pBluescript-SK$^-$ kloniert und zur Kontrolle ansequenziert. Das Fragment wurde in den Überexpressionsvektor pRSETb umkloniert und in den Expressionsstamm *E.coli* BL21 x pLys transformiert. Produkt des Überexpressionskonstrukts pRSETb-*aviQ* ist ein Histidinfusionsprotein, das leicht über Nickel-NTA-Agarose gereinigt werden kann (Abb. 4.23). Durch Schnitt mit *Nde*I und Religation kann jedoch auch in einer einfachen Klonierung die kodierende Sequenz für die sechs Histidinreste entfernt werden. Dies ermöglicht eine Aktivitätsbestimmung des überexprimierten Enzyms ohne Histidinmarkierung. Wie unter 3.13.1 beschrieben, wurde das Fusionsprotein $(His)_6$-AviQ durch IPTG-Induktion überexprimiert und im nativen Zustand über Nickel-NTA-Säulen gereinigt. Aus 30 ml einer 4 h induzierten Kultur wurde 1 mg natives Enzym isoliert. Das Enzym hatte bei 4°C eine Halbwertszeit von 5 Tagen. Nach Umpufferung des Eluats über eine NAP5-Säule (Pharmacia) auf TE pH 7,4 mit 10 % Glycerin betrug die Aktivität nach 4 Wochen Lagerung bei -20°C noch 90 % der Ausgangsaktivität.

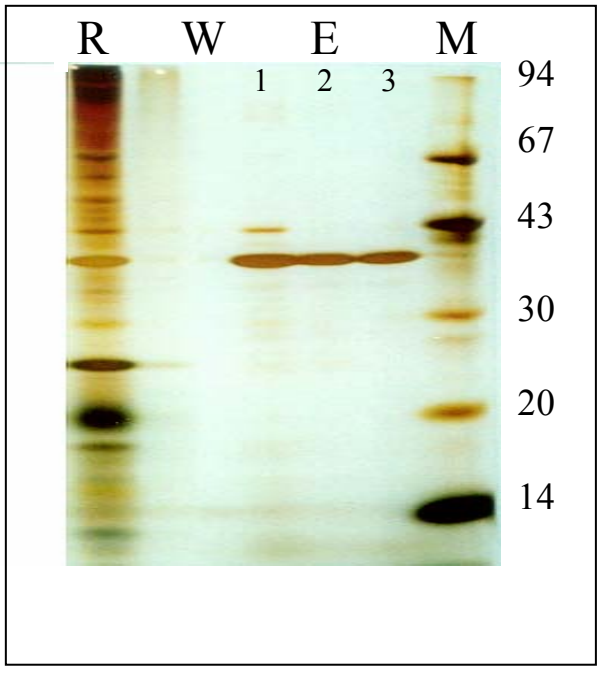


Abb. 4.23: Silbergefärbtes Gel der Reinigung des Fusionsproteins Histidin$_6$-AviQ über Ni-NTA-Säulen nach Material und Methoden 3.3.3, 3.13.1 und 3.13.3
aufgetragene Proteinmenge/Spur:
R = 100 µg, E = 1 µg

(R = Rohextrakt, W = Waschphasen,
E = Säuleneluat, M = Größenstandard)

Zur biochemischen Charakterisierung des Enzyms wurde der UDP-Glucose-4-Epimerase-Test nach Fukusawa et al. (1980) auf die spezifischen Bedingungen für AviQ, wie unter 3.13.4 beschrieben, angepaßt. Wie in Abb. 4.24 dargestellt, verdoppelte sich die Volumenaktivität bei Verdopplung der Proteinmenge im Testansatz. Bei Verwendung von abgekochtem Protein ist keine Aktivität zu messen. Diese beiden Versuche belegen, daß es sich bei der gemessenen Reaktion um die Wirkung eines Proteins handelte. Die Bestimmung der Zeitabhängigkeit (Abb. 4.25) zeigt, daß der Enzymtest unter den gewählten Bedingungen bis 10 min Inkubationszeit im linearen Bereich war. Die weiteren Messungen wurden mit einer Inkubationszeit von 2 min durchgeführt.

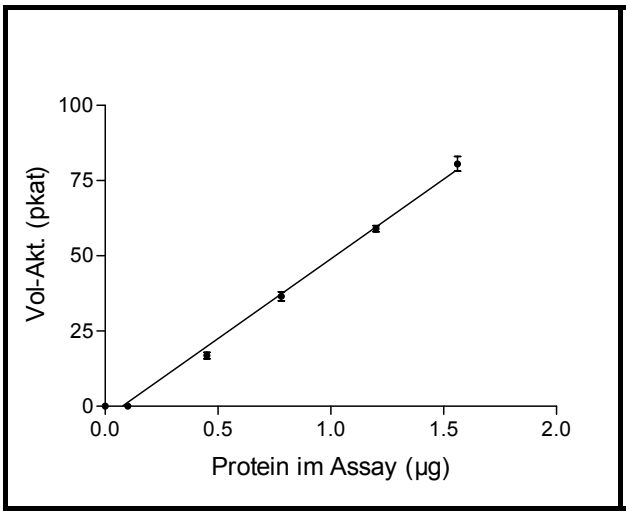


Abb. 4.24: Proteinabhängigkeit der UDP-Glucose-4-Epimerase-Reaktion (Doppelbestimmung) (3.13.4)

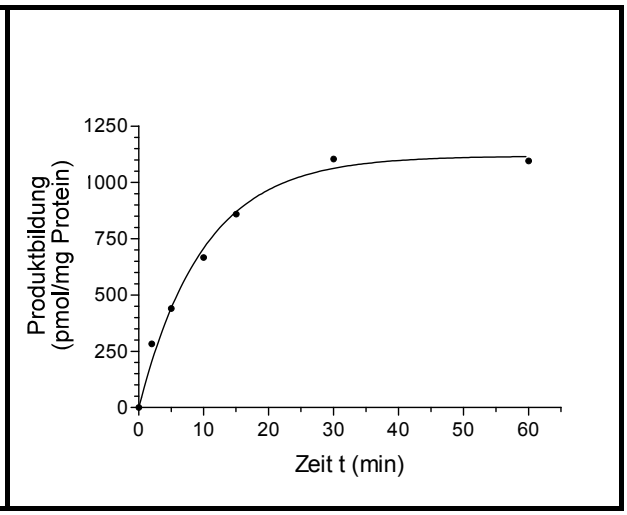


Abb. 4.25: Zeitabhängigkeit der UDP-Glucose-4-Epimerase-Reaktion (Doppelbestimmung) (3.13.4)

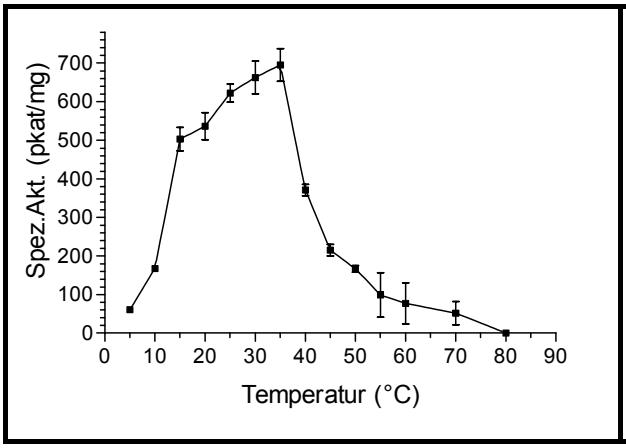


Abb. 4.26: Temperaturabhängigkeit der UDP-Glucose-4-Epimerase-Reaktion (Doppelbestimmung) (vgl. 3.13.4)

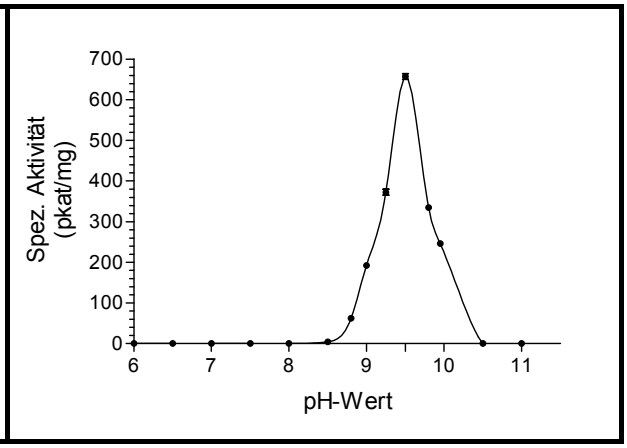


Abb. 4.27: pH-Abhängigkeit der UDP-Glucose-4-Epimerase-Reaktion (Doppelbestimmung) (vgl. 3.13.4)

Die UDP-Glucose-4-Epimerase-Aktivität im Rohextrakt von *E.coli* x RSETb-*aviQ* (Überexpressionskonstrukt) lag bei 120 pkat/mg Protein. Der Vergleichswert in der Negativkontrolle *E.coli* x pRSETb (leerer Vektor) lag bei < 2 pkat/mg Protein. Die gemessene Enzymreaktion wird folglich von dem Genprodukt von *aviQ* katalysiert.

Zur Bestimmung der Temperatur- und der pH-Wertabhängigkeit sowie der Michaelis-Menten-Konstante wurden jeweils frische Enzympräparationen verwendet. Das Temperaturoptimum liegt mit 25-35°C in einem für Bodenbakterien typischen Rahmen (Abb. 4.26). Auch das pH-Optimum liegt mit einem Wert von 9,5 bei einem in der Literatur angegebenen Wert (Dörmann et al., 1996) (Abb. 4.27). Die Michaelis-Menten-Konstante wurde für UDP-Glucose nach der Methode der Lineweaver-Burk-Auftragung auf einen Wert von K_m = 1,4 mM bestimmt (Abb. 4.28). Dieser Wert liegt um einen Faktor 6 höher als die K_m-Wertsangabe für *Saccharomyces cerevisiae* (Fukusawa et al., 1980).

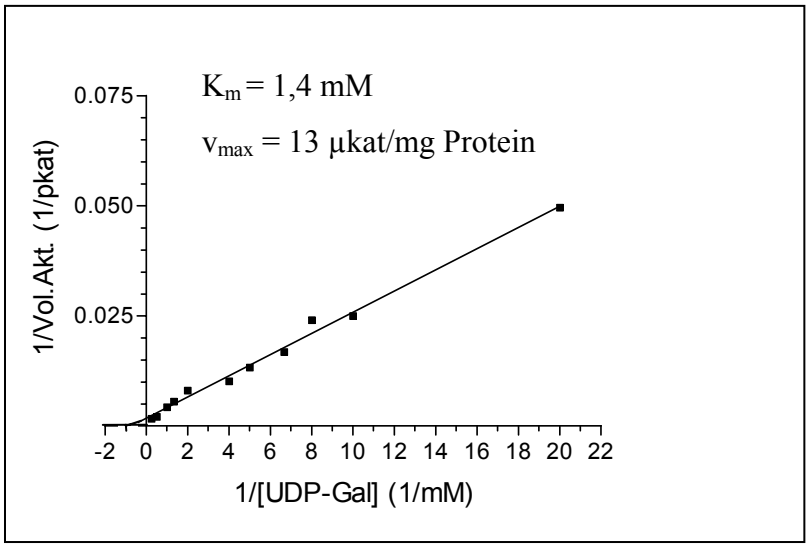


Abb. 4.28: Lineweaver-Burk-Auftragung zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante der UDP-Glucose-4-Epimerase (nach 3.12.4)

In einem weiteren Experiment wurde wie oben beschrieben der Histidin-Anker aus dem Überexpressionskonstrukt entfernt. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante aus dem Rohextrakt von *E.coli* x pRSETb(minus His)-*aviQ* brachte mit K_m=1,3 mM einen Wert in vergleichbarer Höhe. Obwohl ein direkter Vergleich der Ergebnisse ermittelt mit gereinigtem Protein und mit denen aus Rohextrakt nicht möglich ist, deuteten diese Ergebnisse darauf hin, daß die Fusion des Histidinhexamers an AviQ die enzymatische Aktivität nicht beeinflußt hatte.

	pH-Optimum	V_{max}	K_m	Quelle
S.viridochromogenes Tü57	9.5	13 µkat/mg	1,4 mM	
Saccharomyces cerevisiae	6.8 - 8	350 pkat/mg	0,22 mM	Fukusawa et al., 1980
Arabidopsis thaliana	7.0 - 9.5	66 µkat/mg	0,11 mM	Dörmann et al., 1996
Galdiera sulphurica (Rotalge)	8	keine Angabe	0,064 mM	Prosselkov et al., 1996

Tab. 4.4: Vergleich einiger Daten für UDP-Glucose-4-Epimerasen aus der Literatur mit den biochemischen Daten für die UDP-Glucose-4-Epimerase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü57.

Die bestimmten biochemischen Parameter zeigten, daß AviQ als UDP-Glucose-4-Epimerase *in vitro* funktionell aktiv ist und unter den gewählten Bedingungen UDP-Galactose zu UDP-Glucose umsetzen kann. Bei Inkubation des Histidin-AviQ-Fusionsproteins mit Avilamycin unter den oben geschilderten Testbedingungen konnte keine Wirkung detektiert werden. Sowohl die Retentionszeit in der HPLC-Analytik als auch die biologische Aktivität des reisolierten Avilamycins blieben unverändert. Unter den gewählten Bedingungen führte AviQ keine beobachtbaren Veränderungen an Avilamycin durch. Durch biochemische Methodik konnte für AviQ keine Beteiligung am Resistenzmechanismus nachgewiesen werden.

4.5.7 Eingrenzung des Resistenz-vermittelnden Bereichs

Um den Resistenz-vermittelnden Bereich einzugrenzen, wurden parallel zur biochemischen Charakterisierung von AviQ molekularbiologische Techniken eingesetzt. Diese sollten Aufschluß darüber geben, ob AviQ, AviR oder AviRII Resistenz gegen Avilamycin in *S.lividans* verliehen. Dazu wurde der Resistenz-vermittelnde Bereich B3/1 durch Restriktion mit den Enzymen *Bgl*II, *Bal*I, *Stu*I und *Pst*I verkürzt und Mutationen durch *Sph*I-Schnitt gezielt in das Fragment eingeführt (Abb.4.29).

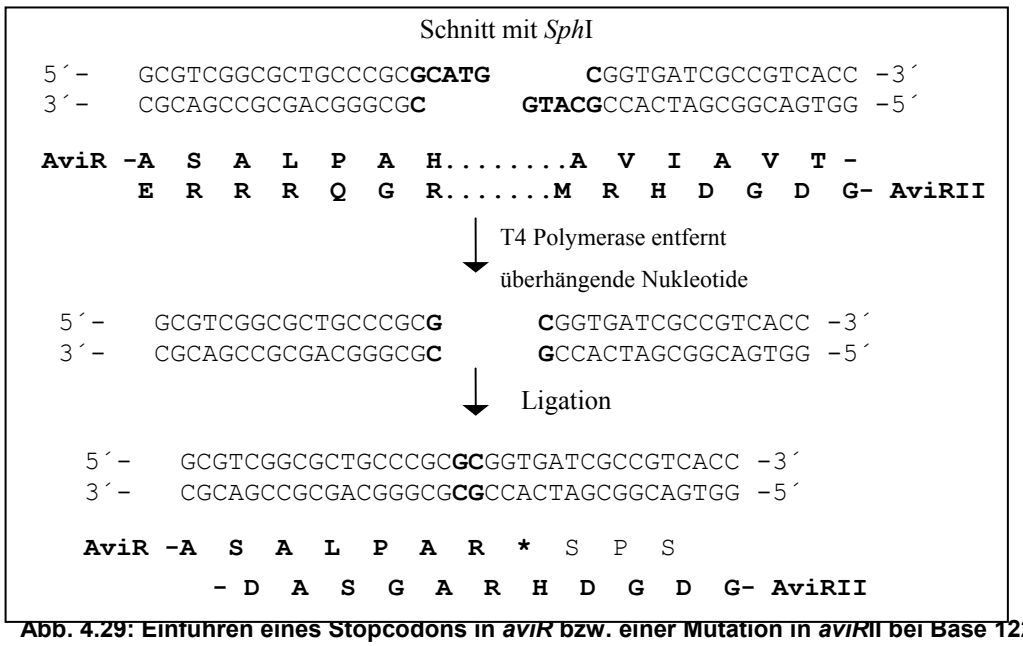


Abb. 4.29: Einführen eines Stopcodons in *aviR* bzw. einer Mutation in *aviR*II bei Base 1227 des Resistenz-vermittelnden Bereichs durch Restriktion mit *Sph*I.

Die so hergestellten Fragmente wurden in pWHM3 ligiert, in *S.lividans* transformiert und das Wachstum der transgenen Klone ermittelt. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden (Abb. 4.30).

- Ein 2,6 kb *Pst*I-Fragment, das die beiden Gene *aviQ* und *aviR/aviR*II enthielt, war zunächst das kleinste Fragment, das in *S.lividans* noch Resistenz gegen Avilamycin verlieh (Konstrukt 2). Ein 1,6 kb *Pst*I/*Bgl*II-Fragment (trägt *aviQ*: Konstrukt 3*)* und ein 1,1 kb *Pst*I/*Bgl*II-Fragment (Konstrukt 4) verliehen beide keine Resistenz.
- Die Einführung einer Deletion (Entfernung eines 1255 bp Fragments zwischen *Bal*I und *Stu*I) führte nicht zum Verlust der Aktivität (Konstrukt 5).
- Das mutierte Fragment B3/1 vermittelte keine Resistenz in *S.lividans* mehr (Konstrukt 6)

Diese Ergebnisse schränken den Resistenz-vermittelnden Bereich auf die beiden offenen Leserahmen *aviR* und *aviR*II ein.

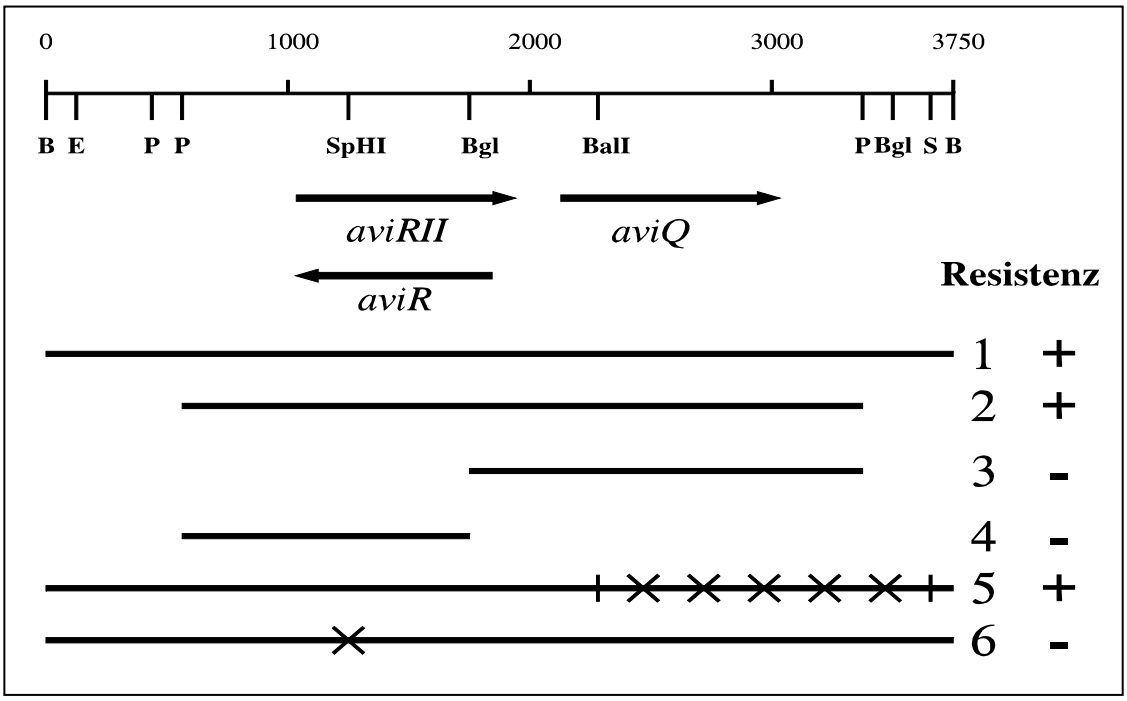


Abb. 4.30: Verkürzte Subclones und Subclones mit Mutationen im Resistenz-vermittelnden Bereich
(B = *Bam*HI, E = *Eco*RI, P = *Pst*I, Bgl = *Bgl*II)

1= 3,7 kb *Bam*HI-Fragment
2 = 2,6 kb *Pst*I-Fragment
3 = 1,6 kb *Pst*I/*Bgl*II-Fragment
4 = 1,1 kb *Pst*I/*Bgl*II-Fragment
5 = Deletion (1255 bp) im Bereich von *aviQ*
6 = Mutation im Bereich von *aviR/aviR*II im 3,7 kb *Bam*HI-Fragment

4.5.8 Klonierung und Expression von *aviR* und *aviR*II in *S.lividans*

Die offenen Leserahmen von *aviR* und *aviR*II wurden mittels PCR aus dem Resistenz-vermittelnden Bereich B3/1 amplifiziert (vgl. 3.8.8). Die Primer wurden aus der Sequenz so abgeleitet, daß vor dem Startcodon eine 57 bp- (*aviR*) bzw. eine 72 bp-Sequenz (*aviR*II) lag, die die Ribosomenbindungsstelle enthielt. Durch die Primer wurde am 5´-Ende zur erleichterten Klonierung eine *Bam*HI-Schnittstelle eingefügt, am 3´-Ende eine *Eco*RI-Schnittstelle.

Die amplifizierten Fragmente wurden in den Vektor pBluescript-SK$^-$ kloniert und zur Kontrolle ansequenziert. Anschließend wurden die beiden Fragmente in den Streptomyceten-Shuttle-Vektor pWHM4* (Quiros et al., 1998) hinter den konstitutiven Promotor ermP* kloniert. Durch die *Bam*HI-Schnittstelle am 5´-Ende war sichergestellt, daß das Gen in der richtigen Orientierung hinter dem Promotor lag. *S.lividans* wurde mit den Konstrukten pWHM4* x *aviR* sowie pWHM4* x *aviR*II transformiert. Tabelle 4.5 faßt die Ergebnisse zusammen.

Konstrukt	Wachstum auf Thiostrepton (50 µg/ml)	Wachstum auf Avilamycin (20 µg/ml)
pWHM4*	+++	-
pWHM4*-*aviR*	+++	+++
pWHM4*-*aviR*II	+	-

Tab. 4.5: Wachtum transgener *S.lividans* auf Thiostrepton und Avilamycin. (pWHM4* = leerer Shuttle-Vektor (Quiros et al., 1998), *aviR* und *aviR*II = DNA-Bereich aus dem 3,7 kb Resistenz-vermittlenden Bereich, der in Abschnitt 4.5.4 Resistenz verliehen hatte).

Nur Transformanden von *S.lividans* mit dem Konstrukt pWHM4*-*aviR* zeigten Wachstum auf Avilamycin. Transformanden mit dem Konstrukt pWHM4*-*aviR*II zeigten keine Resistenz gegen Avilamycin. Auffallend war, daß darüber hinaus Transformanden mit pWHM4*-*aviR*II auch auf Thiostrepton-Platten ein sehr schlechtes Wachstum zeigten. Der Resistenzfaktor im Resistenz-vermittelnden Bereich B3/1 konnte mit diesen Ergebnissen auf den 750 bp großen offenen Leserahmen *aviR* eingeschränkt werden.

4.5.9 Expression von AviR in *E.coli*

Der offene Leserahmen *aviR* wurde in den Überexpressionsvektor pRSETb kloniert. Dazu wurde das Gen mittels PCR aus dem Resistenz-vermittelnden Bereich nach der unter 3.8.8 beschriebenen Methode amplifiziert. Die verwendeten Primer führten eine *Bam*HI- und eine *Nde*I-Schnittstelle direkt vor den Genanfang und eine *Eco*RI-Schnittstelle kurz nach dem Gen ein. Das mit *pfu*-Polymerase (Stratagene) amplifizierte Fragment wurde in den Vektor pBluescript-SK$^-$ kloniert und zur Kontrolle ansequenziert. Das Fragment wurde in den Überexpressionsvektor pRSETb umkloniert und in den Expressionsstamm *E.coli* BL21 x pLys transformiert. Das Konstrukt pRSETb x *aviR* (Abb. 3.1) hat den Vorteil, daß das gebildete Protein leicht als Histidinfusionsprotein über Nickel-NTA-Agarose gereinigt werden kann. Wie unter 3.13.1 beschrieben, wurde auch das Fusionsprotein $(His)_6$-AviR durch IPTG-Induktion überexprimiert und im nativen Zustand über Nickel-NTA-Säulen gereinigt. Aus 30 ml einer 4 h induzierten Kultur wurde 1 mg natives Enzym isoliert. Das überexprimierte Protein hat eine Größe von ca. 30 kDa (Abb. 4.31). Dies entspricht der berechneten Größe von AviR.

Der offenen Leserahmen *aviR*II wurde nach der oben beschriebenen Methode ebenfalls in den Überexpressionsvektor pRSETb kloniert. Nach Induktion und Aufreinigung über Nickel-

NTA-Säulen konnte jedoch gezeigt werden, daß dieser offene Leserahmen nicht für ein exprimierbares Protein kodiert. Das sehr schwach exprimierte Protein stellte eine heterogene Mischung aus Fragmenten in der Größenordnung zwischen 20 und 30 kDa dar.

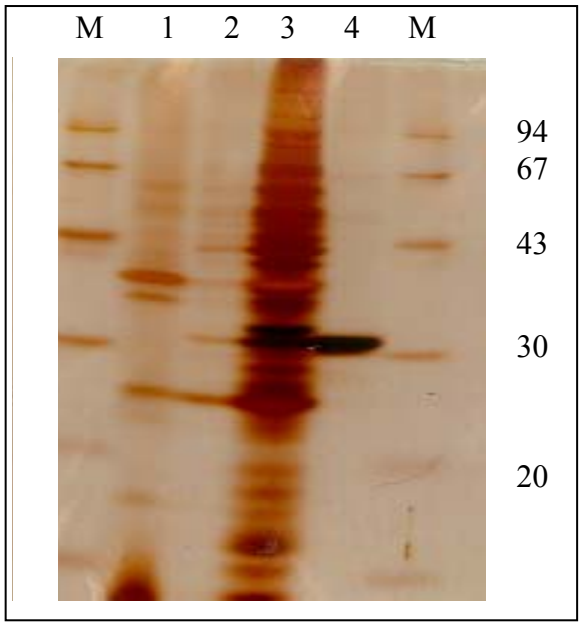


Abb. 4.31: Fusionsprotein Histidin$_6$-AviR: gereinigt über Nickel-Affinitätssäule, aufgetrennt auf silbergefärbtem Acrylamidgel (nach 3.3.3, 3.13.1 und 3.13.3)

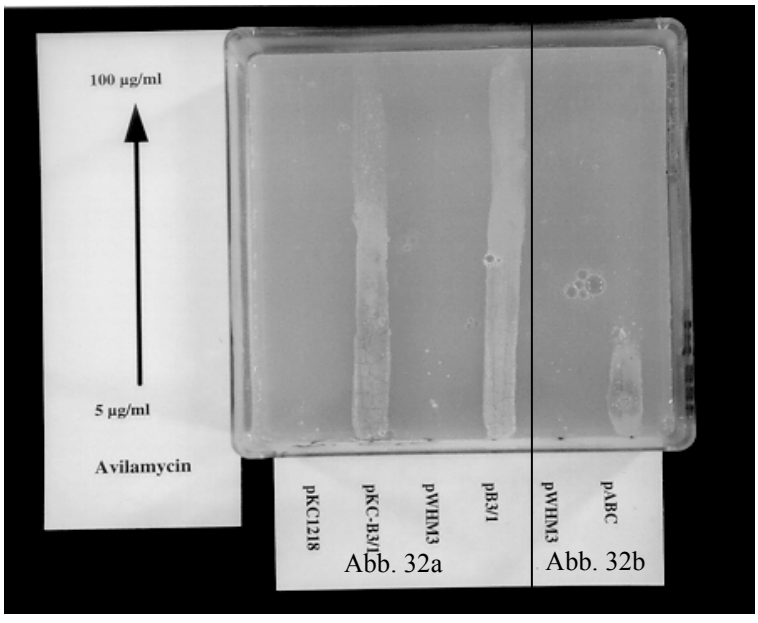
M = Proteinlängenstandard
1 = E.coli Bl21 x pRSETb (induziert): 25 µg/Spur
2 = E.coli Bl21 x pAviR (nicht induziert): 18 µg/Spur
3 = E.coli Bl21 x pAviR (induziert): 200 µg/Spur
4 = AviR (gereinigt): 2µg/Spur

4.5.10 Untersuchungen zur Funktion von AviR

Das gereinigte Fusionsprotein His$_6$-AviR wurde über eine Gelfiltrationssäule (NAP5, Pharmacia) auf pH = 7,4 umgepuffert. Es wurde die Wirkung des Enzyms auf Avilamycin und das Everninomycin-Derivat Sch27899 in Gegenwart verschiedener Kofaktoren überprüft. Als Kofaktoren wurden eingesetzt: Acetyl-Coenzym A (10 µM), $NADP^+$ (20 µM), NAD^+ (20 µM) und als Kofaktorgemisch ein Rohextrakt von *S.lividans* wt (30 µl in einem Testvolumen von 50 µl). Avilamycin und Sch27899 wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C mit AviR inkubiert und anschließend das Antibiotikum mittels Ethylacetat reextrahiert. Das reextrahierte Antibiotikum wurde durch HPLC-Analytik auf Veränderung von Retentionszeit oder Spektrum untersucht, im Agardiffusionstest auf veränderte biologische Aktivität. Spektrum, Retentionszeit (vgl. 3.11.3) und biologische Aktivität (vgl. 3.11.2) des reextrahierten Anitbiotikums zeigten im Vergleich zur Referenz und zur Totkontrolle keine Veränderungen. Auch in Rohextrakten von *S.*lividans x pAviR konnte im Vergleich zu *S.lividans* x pWHM4* keine Wirkung auf Avilamycin oder Sch27899 festgestellt werden. Unter den gewählten Bedingungen hat AviR keine beobachtbare Wirkung auf das Substrat Avilamycin oder Sch27899.

4.5.11 Einfluß der Kopienzahl des Resistenz-vermittelnden Bereichs auf die Resistenzstärke

Das Cosmid F4 hatte in *S.lividans* Resistenz bis ca. 20 µg/ml Avilamycin verliehen. Der 3,7 kb *Bam*HI-Subclone des Resistenz-vermittelnden Bereichs im Vektor pWHM3 verlieh dagegen Resistenz bis ca. 100 µg/ml Avilamycin. Der Vektor pWHM3 liegt in *S.lividans* in hoher Kopienzahl vor, da pWHM3 selbst ein Derivat des multicopy-Vektors pIJ101 darstellt (Vara et al. (1989), Wohlleben et al. (1987)). Um die Abhängigkeit des Resistenzmechanismus von der Kopienzahl zu zeigen, wurde das 3,7 kb *Bam*HI-Fragment in den Vektor pKC1218 mit niedriger Kopienzahl umkloniert. Der Vektor pKC1218 besitzt das SCP2*-Replikon, das normalerweise eine Vektorkopie pro Zelle gewährleistet (Biermann et al., 1992, Wohlleben et al., 1987). Für beide Konstrukte sowie für die leeren Vektoren wurde die maximale Avilamycin-Konzentration bestimmt, bei der transgene *S.lividans* mit den jeweiligen Konstrukten noch wachsen können (Abb. 4.32a). Die transgenen *S.lividans* mit leeren Vektoren wurden bereits durch Avilamycin-Konzentrationen < 5 µg/ml im Wachstum gehemmt. Das Konstrukt pKC-B3/1, welches das 3,7 kb *Bam*HI-Fragment im Vektor pKC1218 enthält, verlieh Resistenz gegen Avilamycin bis zu einer Konzentration von 80 µg/ml. Bei höherer Kopienzahl des Resistenz-vermittelnden Bereichs im Konstrukt pB3/1 (3,7 kb *Bam*HI-Resistenz-Bereich in pWHM3) wuchsen die entsprechenden transgenen *S.lividans* bis zu 100 µg/ml Avilamycin. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß der Resistenz-Mechanismus abhängig von der Kopienzahl des Resistenz-Faktors in der Zelle ist.



pKC1218 =
S.lividans x pKC1218
pKC-B3/1 =
S.lividans x pKC1218 mit 3,7 kb Resistenz-Bereich
pWHM3 =
S.lividans x pWHM3
pB3/1 =
S.lividans x pWHM3 mit 3,7 kb Resistenz-Bereich
pABC =
S.lividans x pWHM3 mit 6 kb *aviABC*-Fragment

Abb. 32: Wachstum transgener *S.lividans* auf steigenden Avilamycin-Konzentrationen (vgl. 3.6.3)
32a) Einfluß der Kopienzahl des 3,7 kb *Bam*HI-Fragments auf die Stärke der Resistenz
32b) Wirkung von *aviABC*

4.5.12 Spezifität des Resistenz-vermittelnden Bereichs

Es wurde getestet, ob der Resistenzmechanismus, welcher durch den Resistenz-vermittelnden Bereich auf *S.lividans* übertragen werden konnte, auch gegen andere Orthosomycine wirksam war. Als weiteres Orthosomycin stand das Everninomycin Sch27899 von Schering, USA zur Verfügung (Abb. 4.33). Zur Überprüfung der Kreuzresistenz wurden *S.lividans* x pB3/1, *S.lividans* x pWHM3 und *S.viridochromogenes* Tü57 auf HA-Platten mit 5 bis 100 µg/ml Sch27899 angeimpft. *S.lividans* x pB3/1 und *S.viridochromogenes* Tü57 wuchsen auf Sch27899 ebenso gut wie auf Avilamycin, während *S.lividans* x pWHM3 ab Konzentrationen von 5 µg/ml Sch27899 abgetötet wurde. Der Resistenzfaktor ist somit trotz der Modifikationen in Sch27899 auch gegen dieses Orthosomycinantibiotikum wirksam.

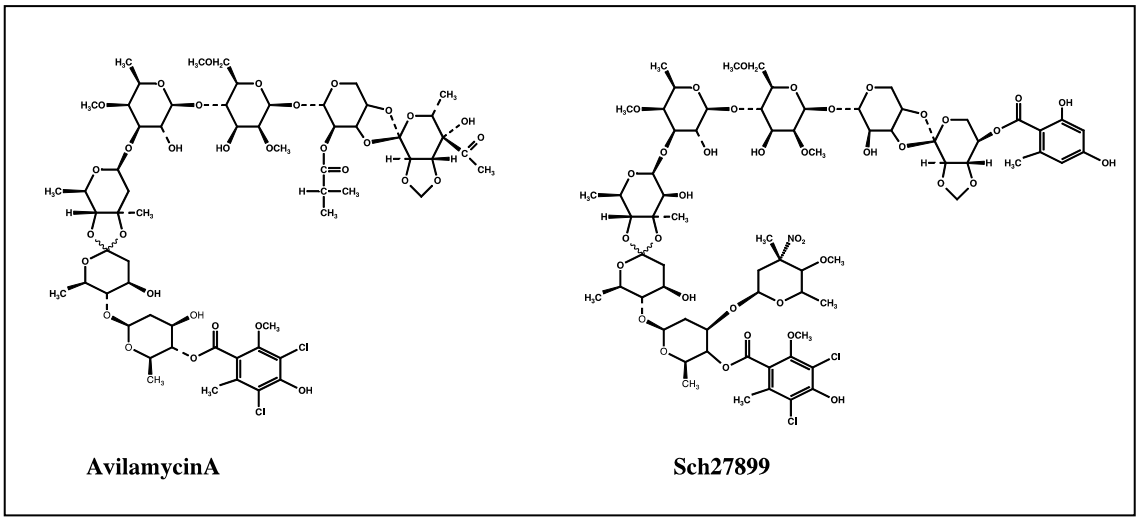


Abb. 4.33: Strukturelle Ähnlichkeit der beiden Orthosomycinantibiotika Avilamycin A und Sch27899 (Strukturformel für das Everninomycin Sch27899 nach Nakashio et al., 1995)

Mit dem Gen *aviR* wurde somit ein Resistenzgen identifiziert, dessen Genprodukt Resistenz nicht nur gegen Avilamycin selbst, sondern auch gegen andere Orthosomycine verleihen kann. Obwohl der Wirkmechanismus abhängig von der Kopienzahl des Gens ist, vermittelte das Genprodukt bereits in einer oder wenigen Kopien Resistenz in *S.lividans*. Das Resistenzgen konnte als Histidinfusionsprotein überexprimiert werden und ist damit zur biochemischen Charakterisierung in ausreichender Menge vorhanden.

5 Diskussion

5.1 Identifikation des Avilamycin-Biosynthesegenclusters

Zur Isolierung und Identifikation von Biosynthesegenclustern sind mehrere Versuchsansätze möglich. In der Arbeitsgruppe um Hopwood wurden bereits 1983 durch Komplementation Antibiotika-Biosynthesegene identifiziert und kloniert (Hopwood et al., 1983). Dazu wurden DNA-Fragmente eines Wildtypstammes zufällig kloniert und in eine Mutante transformiert, die die Fähigkeit zur Produktion des entsprechenden Antibiotikums verloren hatte. Die Identifikation des gesuchten DNA-Bereichs erfolgte über die Wiederherstellung der Antibiotika-Produktion. Nachteilig an dieser Methode ist, daß man dazu eine gut charakterisierte Mutante benötigt. Ein zweiter Ansatz beruht auf der Entdeckung, daß Antibiotika-Biosynthese-Gene und Gene für Selbstresistenz häufig eng miteinander verknüpft sind (Chater et al., 1983). Zufällige DNA-Fragmente eines Antibiotika-Produzenten aus einer Genbank werden in einen Antibiotika-sensitiven Wirt transformiert und auf Resistenz untersucht. Die DNA resistenter Klone werde auf das Vorhandensein von Biosynthesegenen geprüft. Über diese Methode konnte beispielsweise das Biosynthesegencluster für Tetracenomycin aus *Streptomyces glaucescens* isoliert werden (Motamedi et al., 1987). Ist das Selbstresistenzgen jedoch nicht im Biosynthesegencluster des gewünschten Antibiotikums lokalisiert, wie zum Beispiel im Fall des Thiostrepton-Produzenten *Streptomyces laurentii* (Smith et al., 1995), so kann diese Strategie nicht zum gesuchten Biosynthesegencluster führen. Eine dritte Methode beruht auf der Beobachtung, daß Gene mit derselben Funktion aus verschiedenen Streptomyceten-Stämmen einen hohen Konservierungsgrad aufweisen. Deshalb können bekannte Gene oder Teile daraus als heterologe Sonde zum Screenen von DNA-Banken anderer Streptomyceten verwendet werden. Daß auch diese Methode nicht absolut sicher zum gewünschten Biosynthesegencluster führt, zeigten die Experimente am Curamycin-Produzenten *Streptomyces curacoi* (Bergh et al., 1992). Mit Hilfe der Gensonden *actI-actIII* aus der Polyketidsynthase des Actinorhodin-Produzenten *Streptomyces coelicolor* (Malpartida et al., 1987) war ein Biosynthesegencluster isoliert worden. Dieses offenbarte sich jedoch bei genauerem Hinsehen vermutlich als das Biosynthesegencluster für ein Sporenpigment (Hopwood, 1997).

Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode stellt eine Weiterentwicklung der dritten Methode dar. Anstatt heterologe DNA-Sequenzen direkt als Sonde zum Screenen einer DNA-Bank

einzusetzen, wurde eine homologe Sonde mittels PCR erzeugt (Decker et al., 1996). Grundlage für die Herstellung der Sonde war die Beobachtung, daß Avilamycin 6-Desoxyhexosen enthält. In den meisten Streptomyceten, welche Antibiotika mit 6-Desoxyzuckern produzieren, wurde das Gen für eine 4,6-Dehydratase im Biosynthesegencluster gefunden (Pissowotzki et al., 1991; Bechthold et al., 1995). Aus homologen Bereichen der dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gene von *Streptomyces violaceoruber* (Tü22), *Saccharopolyspora erythraea* (NRRL 2338) und *Streptomyces griseus* N2-3-11 konnten Primer abgeleitet werden, mit denen durch PCR aus chromosomaler DNA von *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 eine homologe Sonde amplifiziert werden konnte. Diese konnte zum Screenen einer Cosmidbank eingesetzt werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß mit dem amplifizierten DNA-Stück bereits ein Teil des gesuchten Biosynthesegenclusters vorliegt. Dieses Fragment kann sequenziert werden. Darüber können bereits vor dem Beginn des Screenings Aussagen gemacht werden, ob die Methode mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zum Erfolg führt. Erhält man mehrere Fragmente in der PCR-Amplifikation (z.B. im Fall des Novobiocin-Produzenten *Streptomyces sphaeroides*, bei dem zwei verschiedene Fragmente amplifiziert wurden (Z. Wang, S. Li, persönliche Mitteilung), so kann dies ein Hinweis auf die Anzahl der zu erwartenden Cluster im Screening und auf die Struktur des Genoms im untersuchten Streptomyceten-Stamm sein. Doch auch diese Methode birgt die Gefahr von Falschpositiven in sich. Das amplifizierte Genfragment könnte aus einem Bereich außerhalb des gesuchten Biosynthesegenclusters stammen. Auch könnte die Homologie nicht hoch genug sein, um das gewünschte Genfragment zu amplifizieren oder der Biosyntheseweg im gesuchten Antibiotikabiosyntheseweg nicht über die dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase verlaufen. Im Screening identifizierte DNA-Bereiche müssen deshalb in Folgeexperimenten z.B. durch Kartierung mit bekannten Biosynthesegenen anderer Antibiotikabiosynthesegencluster, durch Inaktivierung von Genen, sowie durch Sequenzierung und Expression einzelner Gene charakterisiert werden.

5.2 Kartierung des isolierten Biosynthesegenclusters

Zur Kartierung der Cosmide, welche mit der Sonde für das PCR-Fragment des dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gens hybridisierten, wurden Restriktionskartierung sowie Southern Hybridisierungsexperimente herangezogen. Dabei konnte gezeigt werden, daß 4 Cosmide aus einem Cluster stammen, da sie ein gemeinsames Bandenmuster aufweisen und entweder mit der Sonde für den ABC-Transporter *aviABC* oder der Sonde für das Resistenzgen *aviR*

hybridisieren. Zwei Cosmide (P5 und E1A) konnten in diese Cosmidkarte nicht eingeordnet werden. Sie zeigten ein Bandenmuster, das nur in Teilen dem Muster der Cosmide F4, H4, P2 und P4 entsprach. Eine Lokalisation der Cosmide P5 und E1A im Randbereich des Biosynthesegenclusters mußte ebenfalls ausgeschlossen werden, da zwar Hybridisierung mit der Sonde für das dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gen vorlag, jedoch keine Hybridisierung mit einer der beiden Sonden *aviABC* oder *aviR* detektiert werden konnte. Die beiden Gene *aviABC* und *aviR* liegen auf entgegengesetzten Teilen des Biosynthesegenclusters (vgl. Abb. 4.5, Kapitel 4.3.5). Bei Lokalisation von P5 und E1A im Randbereich hätte eine Hybridisierung mit einer der beiden Sonden beobachtet werden müssen.

Handelt es sich also bei den beiden Cosmiden P5 und E1A um ein Artefakt oder stellen sie ein weiteres Cluster dar? Bei der Herstellung der Cosmidbank wurden die partiell verdauten Fragmente der genomischen DNA dephosphoryliert. Dies sollte eine unspezifische Ligation von nicht zusammengehörenden DNA-Fragmenten verhindern. Wurde jedoch die alkalische Phosphatase in nicht ausreichender Menge zur Dephosphorylierung der *Sau*3A-Fragmente eingesetzt, so ist eine Neukombination der Fragmente im Cosmidvektor pOJ446 durchaus möglich. Endgültigen Beweis dafür, daß es sich um ein zweites Cluster handelt und nicht doch um ein Artefakt durch Neukombination der DNA während der Erstellung der Cosmidbank würde eine Nativitätsuntersuchung der beiden Cosmide P5 und E1A liefern. Auf diese Untersuchung wurde jedoch im Verlauf der vorliegenenden Arbeit verzichtet, da das Avilamycin-Biosynthesgencluster durch die weiteren Versuche in den Cosmiden F4, H4, P2 und P4 identifiziert wurde.

Wie bereits erwähnt, beruht die Kartierung der Dehydratase-positiven Cosmide auf Restriktionsverdau und Southernhybridisierungsexperimenten. Dies bedeutet, daß die Cosmidkarte außerhalb des Bereichs zwischen der Sonde *aviABC* und der Sonde *Resistenz* aufgrund von Doppelrestriktion hergeleitet wurde. Gerade bei kleineren Fragmenten liefert diese Methode in Ermangelung passender Schnittstellen keine genauen Daten. Auch die Kartierung über Partialverdau der Cosmide und Detektion durch eine Sonde, welche im Endbereich des Cosmids hybridisiert, kann für kleine Fragmente keine Aussage liefern. Eine sichere Aussage über die exakte Anordnung dieser Fragmente kann nur die umfassende Sequenzierung ergeben. Diese Arbeit für das 55 kb große Cluster wird fortgesetzt. Die Cosmidkarte in Abb. 4.5, Kapitel 4.3.5 stellt somit auf Grundlage des derzeitigen Wissensstands einen Vorschlag zur möglichen Anordnung der Fragmente außerhalb des zentralen Bereichs zwischen *aviABC* und *aviR* dar.

5.3 AviM - *eine ungewöhnliche Polyketidsynthase*

Auf dem Cosmid F4 wurde auf einem 5,5 kb *Pst*I-Fragment das 3879 bp große Gen *aviM* identifiziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt Homologie zu einer Polyketidsynthase aus dem Pilz *Penicillium patulum*. Das Genprodukt aus *P.patulum*, eine Methylsalicylsäuresynthase (MSAS), katalysiert die Bildung von Methylsalicylsäure aus einem Acetyl-Coenyzm A und drei Malonyl-Coenzym A (Vogel et al., 1975, Beck et al., 1990). Der Sequenzvergleich zwischen den Aminosäuresequenzen der MSAS und von AviM zeigte den kolinearen Aufbau der beiden Enzyme. Wie Abbildung 5.1 zeigt, sind die katalytischen Zentren für die Ketoreduktase, die Acyltransferase und das Acyl-Carrier-Protein in derselben Anordnung im Multienzymkomplex lokalisiert. Die katalytischen Domänen für die Ketoreduktase und die Dehydratase fehlen in AviM. Diese werden jedoch bei der Biosynthese von Orsellinsäure auch nicht benötigt.

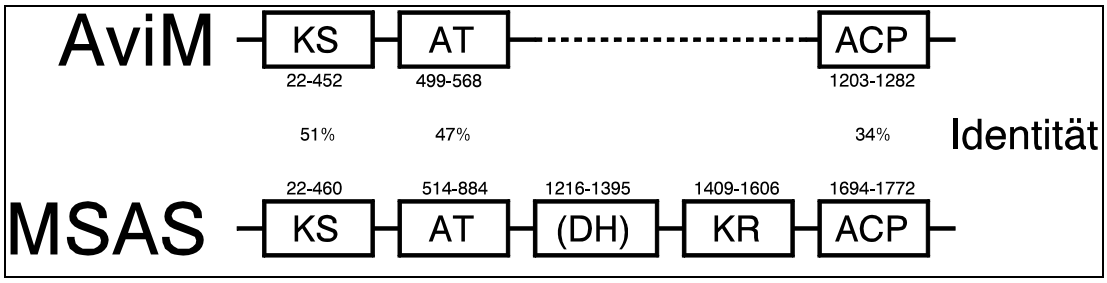


Abb. 5.1: Kolinearer Aufbau der Domänen von AviM (=Orsellinsäuresynthase) und MSAS (=Methylsalicylsäuresynthase, Sequenzdaten MSAS nach Beck et al., 1990).
(KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, DH = Dehydrogenase, KR = Ketoreduktase, ACP = Acylcarrierprotein)

Zur weiteren Absicherung der Daten aus dem Homologievergleich erfolgte die Überexpression von *aviM* in dem heterologen Wirt *S.lividans*. Die heterologe Expression erbrachte eine Produktausbeute von 70 mg/l Medium. Dies ist in der Größenordnung mit der heterologen Expression der Methylsalicylsäure aus *P.patulum* in *S.lividans* (Bedford et al., 1995) vergleichbar. Die Tatsache, daß nur Transfomanden mit Konstrukt pMSS4.3 Produktbildung zeigen, deutet darauf hin, daß der Promotor von *aviM* nicht stark genug ist, um zu einer ausreichenden Expression der Orsellinsäuresynthase zu führen, oder daß in der heterologen Expression entsprechende Regulatoren fehlen. Nur im Konstrukt pMSS4.3 ist nämlich eine Expression ausgehend vom Promotor von *lacZ* möglich. Die Aufreinigung des Produkts und Charakterisierung durch Massenspektroskopie und NMR-Spektroskopie zeigte, daß es sich bei dem Produkt um Orsellinsäure handelte. Dieses Produkt bestätigte die

Funktion von AviM als Orsellinsäuresynthase. Auch die Messung der Enzymaktivität von AviM *in vitro* untermauerte das Ergebnis.

Wie in der Einleitung unter 2.5 dargestellt, wurden die Polyketidsynthasen traditionell in modulare (z.B. Erythromycin-Biosynthese aus *Saccharoployspora erythraea,* Donadio et al., 1991) und iterative Polyketidsynthasen unterteilt. Unter den iterativen Polyketidsynthasen wurden TypI-PKS, bestehend aus einem multifunktionellen Enzym (z.B. Methylsalicylsäuresynthase aus *Penicillium patulum* (Beck et al., 1990)), und TypII-PKS, bestehend aus Einzelenzymen (z.B. Polyketidsynthasen aus dem Actinorhodin-Biosynthesegencluster von *S.coelicolor* (Malpartida et al., 1986)), unterschieden. In Prokaryoten waren bisher nur iterative PKS TypII und modulare PKS beschrieben worden. Anhand der Sequenzdaten, der Expression sowie der *in vitro* Aktivität konnte die Orsellinsäuresynthase als iterative Polyketidsynthase TypI identifiziert werden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen zum ersten Mal, daß dieser Typus auch in Prokaryoten vorkommt.

Die Identifizierung der Orsellinsäuresynthase ist darüber hinaus ein starkes Indiz dafür, daß mit dem vorliegenden Cluster tatsächlich das Biosynthesegencluster für Avilamycin aus *S.viridochromogenes* Tü57 isoliert wurde. Beweis für die Richtigkeit dieser Vermutung lieferten auch die Untersuchungen von Axel Trefzer, der im Rahmen seiner Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie 1996 eine Geninaktivierung im potentiellen Biosynthesegencluster durchführte. Durch Integration einer Erythromycinresistenzkassette in das dNDP-Glucose-4,6-Dehydratasegen durch Einfachcrossover eines nicht-replikativen Vektors verloren die Mutanten von *S.viridochromogenes* Tü57 die Fähigkeit zur Biosynthese von Avilamycin.

5.4 Ein ABC-Transporter in S.viridochromogenes Tü57

Ein weitverbreiteter Mechanismus zum Schutz eines Antibiotika-produzierenden Organismus vor seinen eigenen Produkten ist der Export. Zwei Prinzipien sind dabei verwirklicht. Einerseits gibt es einen ATP-unabhängigen Transport, sogenannte Antiporter, andererseits gibt es aktive ATP-abhängige Transportmechanismen. Die ABC-Transporter, welche durch eine ATP-Bindungsstelle sowie die konservierten Walker-Regionen (Walker et al., 1982) charakterisiert sind, lassen sich nach Anordnung der Walker-Regionen und Vorhandensein eines hydrophoben Proteins bzw. einer hydrophoben Domäne in drei Gruppen einteilen (4.5.2, Abb. 4.17, Krügel, 1997). Auf den Cosmiden H4 und P2 konnte ein DNA-Fragment

mit Homologie zu ABC-Transportergenen identifiziert werden. Die höchste Homologie wurde zu ABC-Transportern Typ1 z.B. OleC aus *S.antibioticus* (Rodriguez et al., 1993) gefunden. Der Abstand zwischen den konservierten Regionen Walker A (wA) und Walker B (wB) betrug 402 bp. Auch dies ist eine Bestätigung dafür, daß es sich bei dem Genprodukt von *aviABC* um einen ABC Transporter Typ1 handelt. Der subklonierte ABC-Transporter verlieh Resistenz bis ca. 30 µg/ml. Dies könnte ein Indiz dafür sein, daß der Transporter in erster Linie nicht als Resistenzmechanismus konzipiert ist, denn dafür gibt es den wesentlich effizienteren Mechanismus durch AviR, sondern dem reinen Export des Antibiotikums diente. Die Limitierung des Transporters sollte dann beachtet werden, wenn Hochproduktionsstämme erzeugt werden. In diesem Fall kann es zur effizienten Produktion und Downstream Processing des Antibiotikums von Vorteil sein, das Gen *aviABC* hinter einem starken Promotor im Hochproduktionsstamm überzuexprimieren oder mehrere Kopien von *aviABC* ins Genom einzubauen. Im Falle der Produktion von Hybridantibiotika durch transgene Streptomyceten ist zu beachten, daß häufig ABC-Transporter eine hohe Substratspezifität aufweisen (Salas, persönliche Mitteilung). Um also einen transgenen Produzenten tatsächlich zur Produktion eines Hybridantibiotikums einsetzen zu können, ist die Charakterisierung der Bandbreite eines ABC-Transporters von großer Bedeutung.

5.5 AviQ - eine UDP-Glucose-4-Epimerase

Resistenzgene und Exportgene sind häufig am amino- oder carboxyterminalen Ende eines Biosynthesegenclusters lokalisiert (Chater et al., 1983, Fernandez-Moreno et al., 1991). Da *aviQ* zusammen mit dem zweiten Resistenzgen *aviR* stromaufwärts der identifzierten Biosynthese-gene *aviD, aviE, aviM* und *aviN* liegt, stellte sich die Frage, ob *aviQ* noch zum Biosynthesecluster von Avilamycin gehört oder bereits einem anderen Biosynthesecluster, beispielsweise dem Leloirpathway zuzuordnen ist.

Von der Arbeitsgruppe um Hasegawa war zu Beginn der 90er Jahre das Biosynthesegencluster für Fortimicin aus *Micromonospora olivasterospora* kloniert worden. 10 Biosynthesegene, mehrere Regulatoren, sowie ein Resistenzgen waren identifiziert worden (Dairi et al., 1992). Im Folgejahr konnte von Ohta et al. (1993) durch Komplementation eine FTMKH-Epimerase (das Genprodukt von *fms11*) identifiziert werden. Das Gen *fms11* ist in enger Nachbarschaft zum Fortimicinresistenzgen *fmsO* lokalisiert. Eine vergleichbare Struktur liegt auch im Avilamycin-Biosynthesegencluster mit *aviQ* und *aviR* vor (Abb. 5.2).

Ob diese Strukturanalogie in den beiden Biosynthesegenclustern auch eine funktionelle Analogie besitzt, muß zum jetzigen Moment allerdings noch offen bleiben.

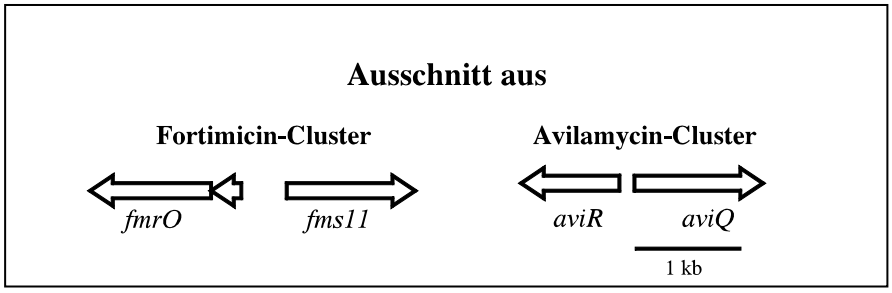


Abb.5.2.: Lokalisation des Epimerasegens und des Resistenzgens im Fortimicin-biosynthesegencluster (Ohta et al., 1993) und im Avilamycinbiosynthesegencluster.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *fmrO* zeigt Homologie zu 16S rRNA Methyltransferase, die Aminosäuresequenz von *fms11* zeigt Homologie zu einer FMKH-Epimerase.*aviQ* kodiert für eine UDP-Glucose-4-Epimerase, das Genprodukt von *aviR* verleiht Resistenz.

Die Überexpression von *aviQ* erbrachte eine funktionell aktive UDP-Glucose-4-Epimerase, die unter Testbedingungen *in vitro* UDP-Galactose zu UDP-Glucose umsetzt. In der Biosynthese von Avilamycin könnte AviQ an der Bildung der L-Fucose beteiligt sein. Einen endgültigen Beweis jedoch für die Frage, ob AviQ an der Biosynthese von Avilamycin beteiligt ist, würde nur eine Inaktivierung und die Charakterisierung von sich möglicherweise anreichernden Zwischenprodukten ergeben.

Gegen eine Beteiligung von AviQ in der Biosynthese des Sekundärmetaboliten Avilamycin spricht allerdings die Beobachtung, daß die höchsten Sequenzhomologien von AviQ zu UDP-Glucose-4-Epimerasen aus Bodenbakterien gefunden wurden.

Die Funktion der UDP-Glucose-4-Epimerase in Bodenbakterien wurden an *exoB*-Mutanten von *Rhizobium meliloti* (Leigh et al., 1988, Buendia et al., 1991) bzw. *Rhizobium leguminosarum* (Canter Cremers et al., 1990) aufgeklärt. Das Gen *exoB* zeigte Homologie zur UDP-Glucose-4-Epimerase aus *Eschericha coli.* Mutationen in *exoB* bewirkten den Verlust der Fähigkeit zur Nodulation und damit den Verlust der Infektiosität der Bodenbakterien an Pflanzen. Diese Einbuße der Infektiosität beruhte auf unvollständigen Exopolysacchariden. Den *exoB*-Mutanten fehlten in den Exopolysacchariden die Galactose-Einheiten, sowie die an Galactose geknüpften Substituenten. Auch bei Streptomyceten findet man Galactose als Bestandteil der Zellwand (Kutzner et al., 1984). So könnte AviQ der Bereitstellung von Galactose für die Zellwand über den Leloir-Pathway dienen. Im Homologievergleich von AviQ mit den UDP-Glucose-4-Epimerasen (Abb. 5.3) fallen einzelne stärker konservierte Domänen auf. Innerhalb dieser Domänen liegen die Aminosäuren $Serin_{124}$ und $Tyrosin_{149}$. Diesen beiden Aminosäuren wurde in einer Untersuchung von Thoden et al. (1996) an der

UDP-Glucose-4-Epimerase aus *E.coli* eine wichtige Rolle im katalytischen Mechanismus zugeordnet. In weiteren Domänen finden sich die Aminosäuren Asparagin$_{179}$ und Arginin$_{217}$. Zusammen mit Serin$_{124}$ und Tyrosin$_{149}$ sind diese Aminosäuren an der Glucose-Bindung beteiligt (Thoden et al., 1996). An einer weiteren Stelle fällt ein konservierter Bereich auf: in der Untersuchung von Frey (1996) war es das Histidin$_{166}$, in AviQ könnte es die Aminosäure Histidin$_{167}$ sein, die ein kovalentes Intermediat zwischen UMP und Enzym bildet. Die von Thoden und Frey untersuchte UDP-Glucose-4-Epimerase stammte aus *E.coli* und ist am Leloir-Pathway beteiligt (Frey, 1996).

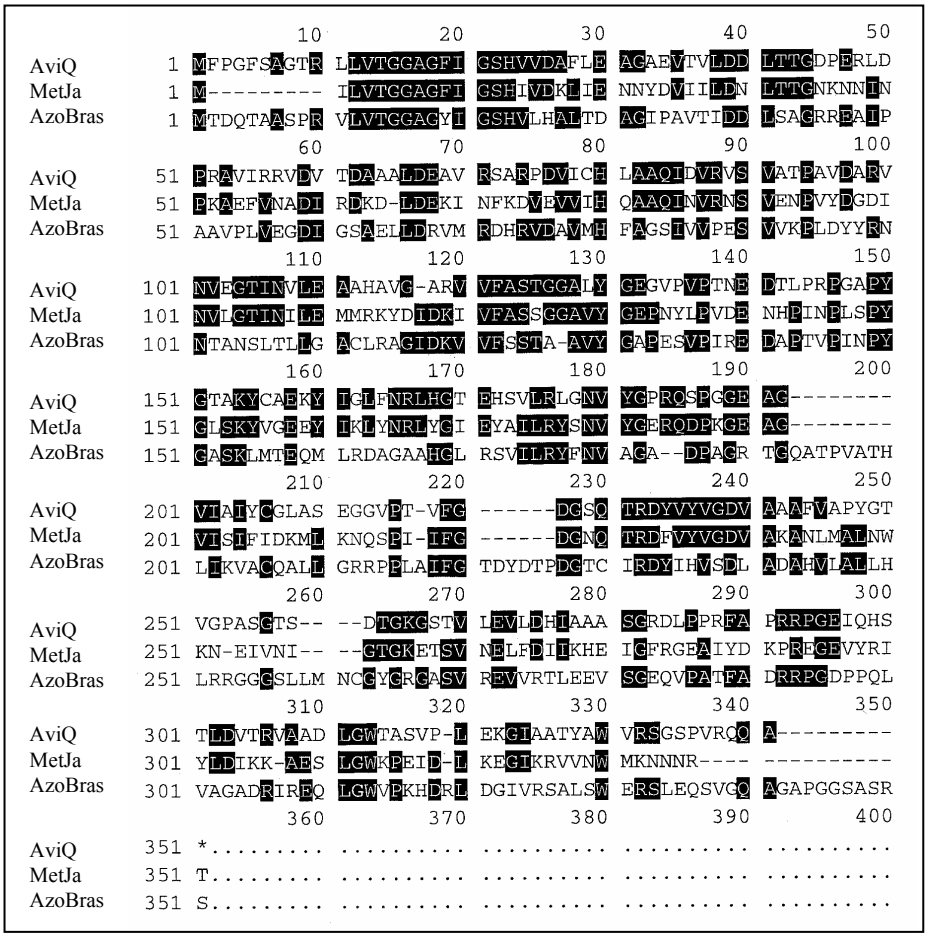


Abb. 5.3: Multiple Alignments von AviQ, der UDP-Glucose-4-Epimerase aus *S.viridochromogenes* Tü57 mit UDP-Glucose-4-Epimerasen aus *Methanococcus jannaschii (=MetJa)* und *Azospirillum brasilense (=AzoBras).* (Das Alignment wurde mit den Programm Wdnasis V2.1 mit den Standardeinstellungen gap penalty = 5, Number of top diagonals = 5, fixed gap penalty = 10, K-tuple = 2, window size = 5 und floating gap penalty = 10 durchgeführt).

5.6 Das Resistenzgen aviR

Das 3,7 kb *Bam*HI-Fragment verlieh in *Streptomyces lividans* Resistenz gegen Avilamycin. Die Funktionsanalyse der beiden offenen Leserahmen *aviR* und *aviR*II hatte gezeigt, daß AviR den Resistenzfaktor darstellt. Für die Wirkung des Resistenzfaktors konnte eine

Abhängigkeit von der Kopienzahl gezeigt werden. Auffällig war, daß Transformanden mit dem inversen offenen Leserahmen *aviR*II ein sehr schlechtes Wachstum bereits auf Thiostrepton zeigten. Dies könnte ein Indiz dafür sein, daß es sich bei dem Genprodukt von *aviR* um ein für die Zelle essentielles Protein handelt. In diesem Falle würde die Antisense-RNA von *aviR*II die mRNA von *aviR* austitrieren. Daß dies einen prinzipiellen Weg zur gezielten Ausschaltung von Genen darstellen kann, geht aus den Arbeiten von Coleman et al. (1984) hervor. Andererseits ist es ein bekanntes Phänomen, daß einzelne Genfragemente aus unbekannten Gründen das Wachstum der transgenen Organismen stören (W. Wohlleben, persönliche Mitteilung), so daß die Wachstumshemmung durch pAviRII nicht unbedingt ein Indiz für die Funktion von AviR zu sein braucht. Die Sequenzierung des Gens erbrachte keine ausgeprägte Homologie zu bekannten Resistenzgenen. Auffällig war jedoch das Motiv LX**D**XXC**GSG**. Dieses Motiv wurde in der Arbeitsgruppe um Leadlay (Haydock et al., 1991) als charakteristisches Merkmal von S-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen beschrieben, mit einer Asparaginsäure und zwei Glycinresten als konservierten Aminosäuren bei neun von 30 untersuchten Methyltransferasen. Dem konservierten Bereich wird eine Beteiligung bei der Bindung von S-Adenosylmethionin zugeschrieben. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Resistenzgens *aviR* liegt dieses Motiv zwischen Aminosäure 55 und 63. Das Motiv der konservierten Basen könnte auf die Aktivität von AviR als DNA- oder RNA-Methyltransferase hindeuten.

Ein weiteres Indiz für die Funktion von *aviR* brachte die Anordnung des Resistenzgens in Nachbarschaft zu einer UDP-Glucose-4-Epimerase. Wie in Abschnitt 5.5 dargestellt, tritt eine ähnliche Struktur auch im Fortimicin-Produzenten *Micromonospora olivasterospora* auf (Ohta et al., 1993). In diesem Fall konnte dem Genprodukt des Resistenzgens *fmrO* eine Ribosomen-modifizierende Wirkung zugeschrieben werden. In dem Stamm *Micromonospora purpurea* (Keleman et al., 1991) wurde diese Ribosomen-modifizierende Eigenschaft als 16S-rRNA-Methyltransferase identifiziert. Wie auch für AviR, so konnte bei dem Genprodukt des Resistenzgens *fmrO* keine antibiotikainaktivierende Wirkung beobachtet werden (Ohta et al., 1993). Weitere Aussagen zur Funktion des durch *aviR* vermittelten Resistenzmechanismus werden wohl die Untersuchungen mit dem überexprimierten Protein in Methyltransferase-Tests ergeben.

5.7 Kreuzresistenz zwischen dem Humanantibiotikum Sch27899 und dem "Leistungsförderer" Avilamycin

Bei der Entwicklung neuer Antibiotika gilt es vor allem darauf zu achten, daß sie nicht durch Kreuzresistenzen zu anderen Antibiotikaresistenzen entwertet werden. Wie in der Einleitung bereits dargestellt, wird derzeit von Schering-Plough, USA, mit dem Everninomycin-Derivat Sch27899 ein neues Antibiotikum entwickelt, das vor allem im Kampf gegen multiresistente, gram-positive Keime eingesetzt werden soll. Wie in Abbildung 4.33 gezeigt, sind Sch27899 und Avilamycin strukturell eng verwandt.

Die Einsatzmöglichkeiten von Sch27899 als Humantherapeutikum werden derzeit in Studien getestet (Travis, 1994, Cormican et al., 1996). Andererseits wird Avilamycin als Tierfutterzusatzstoff unter dem Handelsnamen MaxusG® von Eli Lilly vertrieben. Die Verwendung von Antibiotika in der Landwirtschaft in subtherapeutischer Dosierung birgt die Gefahr der verstärkten Resistenzentwicklung und Ausbreitung (Banbury Report, 1986). So wurde bereits 1996 im Deutschen Ärzteblatt von einer Salmonellen-Infektion eines 11 jährigen Mädchens mit Chinolon-resistenten Salmonellen berichtet. Die isolierten Salmonellen waren vermutlich in der Kälberaufzucht mit Enrofloxacin, dem einzigen in der Tiermedizin zugelassenen Vertreter der Chinolon-Familie entstanden. Das Mädchen hatte diese "Kälberstamm-Salmonellen" vermutlich mit verseuchten Nahrungsmitteln aufgenommen (Hiereth, 1996). Auch beim geplanten Einsatz von Sch27899 als Humantherapeutikum ist mit Problemen der Kreuzresistenz zu rechnen. Denn die Untersuchungen haben gezeigt, daß AviR effizient nicht nur gegen Avilamycin, sondern auch gegen das Everninomycin Sch27899 Resistenz verleihen kann. Solange jedoch das Resistenzgen in Form von lyophilisierten Zellen von *S.viridochromogenes* Tü57 im Tierfutter MaxusG® weiter verbreitet wird, besteht eine große Wahrscheinlichkeit, daß dieser Mechanismus über diverse Aufnahmemechanismen schließlich in pathogene Mikroorganismen gelangt. Damit könnte ein weiteres wirksames Antibiotikum in kurzer Zeit unwirksam werden.

6 Literaturverzeichnis

Adams, C.W., J.A. Fornwald, F.J. Schmidt, M. Rosenberg und M.E. Brawner (1988): Gene organization and structure of the *Streptomyces lividans gal* operon. J. Bacteriol., **170(1):**203-212

Adams, M.D., L.M. Wagner, T.J. Graddis, R. Landick, T.K. Antonucci, A.L. Gibson und D.L. Olender (1990): Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-1 and the LS transport system of *Escherichia coli.* J. Biol. Chem., **265(20):**11436-11443

Aharonowitz, Y. und G. Cohen (1985): Medikamente. Industrielle Mikrobiologie, Spektrum Verlag Heidelberg, 2. Aufl., S. 84-97

Alderson, G., D.A. Ritchie, C. Cappellano, R.H. Cool, N.M. Iwanowa, A.S. Huddleston, C.S. Flaxman, V. Kristufek und A. Lounes (1993): Physiology and genetics of antibiotic production and resistance. Res. Microbiol., **144:**665-672

Altenbuchner, J. und J. Cullum (1984): DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. Mol. Gen. Genet., **195 (1-2):** 134-138

Alting-Mees, M.A. und J.M. Short (1989): pBluescript II: gene mapping vectors. Nucleic Acids Res., **17(22):**9494

Altschuh, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers und D.J. Lipman (1990): Basic local alignment search tools. J. Mol. Biol., **215:**403-410

Angehrn, P. (1993): In-vitro Aktivität von Lankicidin, Tiamulin, Avilamycin A, Aborycin und Gallidermin gegen multiresistente Staphylokokken und Enterokokken. Roche-Mitteilung, 10

Banbury Report: Herausgeber: S.B. Levy und R.P. Novick (1986): Antibiotic resistance genes: Ecology, transfer, and expression. Banbury Report, Cold Spring Harbour Laboratory

Bechthold, A. und H.G. Floss (1994): Overexpression of the thiostrepton-resistance gene from *Streptomyces azureus* in *Escherichia coli* and characterization of recognotion sites of the 23 S rRNA A1067 2´-methyltransferase in the guanosine triphosphatase center of the 23S ribosomal RNA. Europ. J. Biochem., **224(2):**431-437

Bechthold, A., J.K. Sohng, T.M. Smith, X. Chu und H.G. Floss (1995): Identification of *Streptomyces violaceoruber* Tü22 genes involved in the biosynthesis of granaticin. Mol. Gen. Genet., **248:**610-620

Beck, J., S. Ripka, A. Siegner, E. Schiltz und E. Schweizer (1990): The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*: its gene structure relative to that of other polyketide synthases. Europ. J. Biochem., **192:**487-498

Bedford, D.J., E. Schweizer, D.A. Hopwood und C.Koshla (1995): Expression of a functional fungal polyketide synthase in the bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol., **177:**4544-4548

Bergh, S. und M. Uhlén (1992a): Cloning, analysis and heterologous expression of a polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces curacoi.* Biotech. Appl. Biochem., **15(1):**80-89

Bergh, S. und M. Uhlén (1992b): Analysis of a polyketide synthesis-encoding gene cluster of *Streptomyces curacoi.* Gene, **117(1):**131-136

Bibb, M.J. und S.N. Cohen (1982): Gene expression in Streptomyces: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans.* Mol. Gen. Genet., **187(2):**265-277

Bibb, M.J., G.R. Janssen und J.M. Ward (1985): Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (ermE) of *Streptomyces erythraeus.* Gene, **38:**215-226

Bierman, M., R. Logan, K. O´Brien, E.T. Seno, R. Nagaraja Rao und B.E. Schoner (1992): Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* ssp.. Gene, **116:**43-49

Birnboim, H.C. und J. Doly (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., **7(6):**1513-1523

Borck, K., J.D. Beggs, W.J. Brammar, A.S. Hopkins und N.E. Murray (1976): The construction in vitro of transducing derivatives of phage lambda. Mol. Gen. Genet., **146(2)**:199-207

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72:** 248-254

Brawner, M.E., Auerbach, J.I., Fornwald, J.A, Rosenberg, M. und D. Taylor (1985): Characterization of *Streptomyces* promoter sequences using the *Escherichia coli* galactokinase gene. Gene, **40:**191-201

Buendia, A.M., B. Enenkel, R. Koplin, K. Niehaus, W. Arnold und A. Pühler (1991): The *Rhizobium meliloti* exoZ/exoB fragment of megaplasmid 2: ExoB functions as a UDP-glucose 4-epimerase and ExoZ shows homology to NodX of *Rhizobium leguminosarum* biovar. Mol. Microbiol., **5(6):**1519-1530

Bult, C.J., O. White, G.J. Olsen, L. Zhou, R.D. Fleischmann, G.G. Sutton, J.A. Blake, L.M. Fitzgerald, R.A. Clayton, J.D. Gocayne, K.G. Kerlavage, B.A. Dougherty, J.F. Tomb, M.D. Adams, C.I. Reich, R. Overbeek, E.F. Kirkness, K.G. Weinstock, J.M. Merrick, A. Glodek, J.L. Scott, N.S.M. Geohagen, J.F. Weidman, J.L. Fuhrmann, D. Nguyen, T.R. Utterbach, J.M. Kelley, M. Borodovsky, H.P. Klenk, C.M. Fraser, H.O. Smith, C.R. Woese und J.C. Venter (1996): Complete genome sequence of methanogenic archeon *Methanococcus jannaschii.* Nature, **273(5278):**1058-1073

Buzzetti, F., F. Eisenberg, H.N. Grant, W. Keller-Schierlein, W. Voser und H. Zähner (1968): Avilamycin. Experientia, **24(4):**320-323

Calcutt, M.J. und F.J. Schmidt (1994): Gene organization in the bleomycin-resistance producer *Streptomyces verticillus.* Gene, **151(1-2)**:17-21

Canter-Cremers, H.C.J., M. Batley, J.W. Redmond, L. Eydems, M.W. Breedveld, L.P.T.M. Zevenhuizen, E. Pees, C.A. Wijffelman und B.J.J. Lugtenberg (1990): *Rhizobium leguminosarum* exoB mutants are deficient in the synthesis of UDP-glucose 4´-epimerase. J. Biol. Chem., **265(34):**21122-21127

Chater, K.F. und C.J. Bruton (1983): Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. EMBO J., **4(7):**1893-1897

Coleman, J., P.J. Green und M. Inouye (1984): The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes. Cell, **37(2):**429-436

Cormican, M.G. und R.N. Jones (1996): Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria. Enterococci, staphylococci and nonpneumococcal streptococci. Drugs, **51(Suppl.1):**6-12

Cullum, J., J. Altenbuchner, F. Flett und W. Piendl (1986): DNA amplification and genetic instability in *Streptomyces.* Biotechnol. Genet. Eng. Rev., **4:**59-78

Dairi, T., T. Ohta, E. Hashimoto und M. Hasegawa (1992): Self cloning in *Micromonosproa olivasterospora* of *fms* genes for fortimicin A (atromicin) biosynthesis. Mol. Gen. Genet., **232:**262-270

Dairi, T., T. Ohta, E. Hashimoto und M. Hasegawa (1992): Organization and nature of fortimicin A (astromicin) biosynthetic genes studied using a cosmid library of *Micromonospora olivasterospora* DNA. Mol. Gen. Genet., **236:**39-48

Davies, J. (1990): What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. Mol. Microbiol., **4(8):**1227-1232

Davies, J. (1994): Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science, **264:**375-382

Davis, N.K. und K.F. Chater (1990): Spore color in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. Mol. Microbiol., **4:**1679-1691

De Troch, P., V. Keijers und J. Vanderleyden (1994): Sequence analysis of the *Azosprillum brasilense exoB* gene, encoding UDP-glucose 4´-epimerase. Gene, **144(1):** 143-144

Decker, H., H. Motamedi und C.R. Hutchinson (1993): Nucleotide sequences and heterologous expression of *tcmG* and *tcmP* biosynthetic genes for tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens.* J. Bacteriol., **175(12):**3876-3886

Decker, H., S. Gaisser, S. Pelzer, P. Schneider, L. Westrich, W. Wohlleben und A. Bechthold (1996): A general approach for cloning and characterizing dNDP-glucose dehydratase genes from actinomycetes. FEMS Microbiol. Letters, **141:**195-201

Devereux, J., P. Haeberli und O. Smithies (1984): A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res., **15(13):** 387-395

Dodson, M., F.B. Dean, P. Bullock, H. Echols und J. Hurwitz (1987): Unwindung of duplex DNA from the SV40 origin of repilcating by T antigen. Science, **238(4829):**964-967

Donadio, S., J.B. McAlpine, P.J. Sheldon, M. Jackson und L. Katz (1993): An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90(15):**7119-7123

Donadio, S., M.J. Staver, J.B. McAlpine, S.J. Swanson und L. Katz (1991): Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. Science, **252:**675-679

Dörmann, P. und C. Benning (1996): Functional expression of uridine 5´-diphospho-glucose 4-epimerase (EC 5.1.3.2) from *Arabidopsis thaliana* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli.* Arch. Biochem. Biophys., **327(1):**27-34

Epp, J.K., M.L.B. Huber, J.R. Turner, T. Goodson und B.E. Schoner (1989): Production of a hybrid macrolide antibiotic in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces lividans* by introduction of a cloned carbomycin biosynthetic gene from *Streptomyces thermotolerans*. Gene, **85 (2):**293-302

Feitelson, J.S. und D.A. Hopwood (1983): Cloning of a *streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis. Mol. Gen. Genet., **190(3):**394-398

Fernandez E., Lombe F., Mendez C. und J.A. Salas (1996): An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer *Streptomyces argillaceus*. Mol. Gen. Genet., **251:** 692-698

Fernandez-Moreno, M.A., E. Martinez, J.L. Caballero, K. Ichinose, D.A. Hopwood und F. Malpartida (1994): DNA sequence and function of the *act*VI region of the actinorhodin biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Biol. Chem., **269(40):**24854-24863

Forth, W., D. Henschler und W. Rummel (1987): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim/Wien/Zürich, 5.Aufl., 580-714

Fukusawa, T., K. Obonai, T. Segawa und Y. Nogi (1979): The enzymes of the galactose cluster in *Saccharomyces cerevisiae.* II. Purification and characterization of uridine diphosphoglucose 4-epimerase. J. Biol. Chem., **255 (7):** 2705-2707

Frey, P.A. (1996): The Leloir patway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. FASEB J., **10(4):**461-470

Gaisser, S., A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning und A. Bechthold (1997): Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. J. Bacteriol., **179(20):**6271-6278

Gräfe, U. (1992): Biochemie der Antibiotika: Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus. Spektrum Akad. Verlag Heidelberg, Berlin, New York

Grimm, A., K. Madduri, A. Ali und C.R. Hutchinson (1994): Characterization of the *Streptomyces peuceticus* ATCC29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. Gene, **151:**1-10

Guilfoile, P. und C.R. Hutchinson (1991): A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius,* the producer of daunorubicin and doxorubicin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88:**8553-8557

Haydock, S.F., J.A.Dowson, N. Dhillon, G.A. Roberts, J. Cortes und P.F. Leadlay (1991): Cloning and sequence analysis of genes involved in erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: sequence similarities between EryG and a family of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. Mol. Gen. Genet., **230:**120-128

Heilman, W., E. Kupfer, W. Keller-Schierlein, H. Zähner, H. Wolf und H.H. Peter (1979): Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen: Avilamycin C. Helvetica Chimica Acta, **62(1):**1-6

Hellwig, B. (1998): Wie sieht die Antibiotika-Therapie der Zukunft aus? - Antibakterielle Resistenzen. DAZ, **138(12):**39-41

Hesse, M., H. Meier und B. Zeeh (1995): Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 5. Aufl., S.15

Hiereth, M. (1996): Antibiotika in der Tierhaltung: Ursachen und Wirkungen des Mißbrauchs. Dt.Ärzteblatt, **93:**A-3396-3397

Hopwood, D.A. (1997): Genetic contributions to understanding polyketide synthase. Chem. Reviews, **7:**2463-2706

Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M.Ward und H. Schrempf (1985): Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom

Hoshino, T. und K. Kose (1990): Cloning, nucleotide sequences, and identification of products of *Pseudomonas aeruginosa* PAO *bra* genes, which encode the high-affinity branched-chain amino acid transport system. J.Bacteriol., **172(10):**5531-5539

Hutchinson, C.R. (1994): Drug synthesis by genetically engineered microorganisms. Bio/Technology, **12:**375-380

Hutchinson, C.R. und I. Fujii (1995): Polyketide synthase gene maniulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. Annu. Rev. Microbiol., **49:**201-238

Hütter, R. (1962): Zur Systematik der Actinomyceten. Archiv für Mikrobiologie, **43:**23-49

Ikeda, H. und S. Omura (1990): Genetics of antibiotic-producing *Streptomyces.* Arch. Exp. Med., **64(4):**143-155

Katz, L. und S. Donadio (1993): Polyketide Synthesis: prospects for hybrid antibiotics. Annu. Rev. Microbiol., **47:**875-911

Keleman, G.H., E. Cundliffe und I. Financsek (1991): Cloning and charackterization of gentamicin genes from *Micromonospora purpurea* and *Micromonospora rosea.* Gene, **98:**53-60

Krügel, H. (1997): How microorganisms produce and survive antibiotics. BIOspektrum, Spektrum Verlag Heidelberg (Sonderausgabe 1997), 38-41

Kutzner, H.J., R.M. Kroppenstedt und F. Korn-Wendisch (1984): Methoden zur Untersuchung von Streptomyceten und einigen anderen Actinomyceten. herausgegeben von Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, 3.Aufl.

Langer, E. (1987): Vergleichende Untersuchungen zur Wirkungsweise von Avilamycin A und Everninomycin B. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Leigh, J.A. und C.C. Lee (1988): Characterization of Polysacchararides of *Rhizobium meliloti exo* mutants that form ineffective nodules. J. Bacteriol., **170(8):**3327-3332

Linton, K.J., B.W. Jarvis und C.R. Hutchinson (1995): Cloning of the genes encoding thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydratase and thymidine diphospho-4-keto-6-deoxyglucose 3,5 epimerase from the erythromycin-producing *Saccharopolyspora erythraea.* Gene **153:**33-40

Malpartida, F. und D.A. Hopwood (1986): Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol. Gen. Genet., **205:**66-73

Malpartida, F., S.E. Hallam, H.M. Kieser, H. Motamedi, C.R. Hutchinson, M.J. Butler, D.A. Sugden, M. Warren, C. McKillop, C.R. Bailey, G.O. Humphrey und D.A. Hopwood (1987): Homology between *Streptomyces* genes coding for the synthesis of different polyketides used to clone antibiotic biosynthetic genes. Nature, **325:**818

Martin, J.F. und P. Liras (1989): Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol., **43:**173-206

Matsubara, K., Ohnishi, K. und K. Kiritani (1992): Nucleotide sequences and characterization of liv genes encoding components of the high-affinity branched-chain amino acid transport system in *Salmonella typhimurium.* J. Biochem., **112(1)**:93-101

McDaniel, R., S. Ebert-Koshla, D.A. Hopwood und C. Koshla (1993): Engineered biosynthesis of novel polyketides. Science, **262 (3/12):** 1546-1550

Mertz, J.L., J.S. Peloso, B.J. Barker, G.E. Babbitt, J.L. Occolowitz, V.L. Simson und R.M. Kline (1986): Isolation and structural identification of nine avilamycins. J. Antibiotics, **39(7):**877-887

Mitsuhashi, S. (1977): R-Faktor. In: Drug resistance plasmid. University Park Press, London, Tokyo, S.1-45

Motamedi, H. und C.R. Hutchison (1987): Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84(13):**4445-4449

Nakashio, S., H. Iwasawa, F.Y. Dun, K. Kanemtisu und J. Shimada (1995): Everninomycin, a new oligosaccharide antibiotic: its antimicrobial activity, post-antibiotic effect and synergistic bacterial activity. Drugs. Exptl. Clin. Res., **221 (1):**7-16.

Nesterenko, M.V., M. Tilley und S.J. Upton (1994): A simple modification of Blum´s silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. J. Biochem. Biophys. Methods, **28(3):** 239-242

Neu, H.C. (1992): The crisis in antibiotic resistance. Science, **257:**1064-1073

Nikaido, H. (1994): Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science, **264:**382-388

Ohta, T. und M. Hasegawa (1993): Analysis of the self-defense gene (*fmrO*) of a fortimicin A (astromicin) producer, *Micromonospora olivasterospora*: comparison with other aminoglycoside-resistance encoding genes. Gene, **127:**63-69

Ohta, T., T. Dairi und M. Hasegawa (1993): Characterization of two different types of resistance genes among producers of fortimicin- group antibiotic. J. Gen. Microbiol., **139:**591-599

Olano, C., A.M. Rodriguez, C. Mendez und J.A. Salas (1995): A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus.* Mol. Microbiol., **16 (2):** 333-343

Pachaly, P. (1991): DC-Atlas. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **1. Lieferung:** 1-3

Palmer, B.R. und M.G. Marinus (1994): The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli*: a review. Gene, **143(1):**1-12

Phillips, T.A, R.A. VanBogelen und F.C. Neidhardt (1984): *lon* gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. J. Bacteriol., **159(1):**283-287

Pissowotzki, K., K. Mansouri und W. Piepersberg (1991): Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of *str*ELMB2N. Mol. Gen. Genet., **231:**113-123

Plater, R. und W. Strohl (1994): Polyketide biosynthesis: antibiotics in *streptomyces*. In: Genetic engineering of plant secondary metabolism. Plenum Press, New York ed. B.E. Ellis, Chapter 3, S. 61- 91

Prosselkov, P.V., W. Gross, A.U. Igamberdiev und C. Schnarrenberger (1996): Purification and characterization of UDP-D-galactose 4-epimerase from the red alga *Galdieria sulphurarica.* Physiol. Plant., **98(4):**753-758

Quiros et al. (1998): Mol. Microbiol., submitted

Rajgarhia, V. und W.R. Strohl (1997): Minimal *Streptomyces* sp. strain C5 daunorubicin polyketide biosynthesis genes required for aklanonic acid biosynthesis. J. Bacteriol., **179:**2690-2696

Raleigh, E.A., J. Benner, F. Bloom, H.D. Braymer, E. DeCruz, K. Dharmalingam, J. Heitman, M. Noyer-Weidner, A. Piekarowcz und P.L. Kretz (1991): Nomenclature relating to restriction of modified DNA in *Escherichia coli.* J. Bacteriol., **173:**2707-2709

Rodriguez, A.M., C. Olano, C. Vilches, C. Mendez und J.A. Salas (1993): *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of ABC-transporter superfamily. Mol. Microbiol., **8 (3):** 571-582

Rosteck jr., P.R., P.A. Reynolds und C.L. Hershberger (1991): Homology between proteins controlling *Streptomyces fradiae* tylosin resistance and ATP-binding transport. Gene, **102:**27-32

Sambrook, J.E., E.F. Fritsch und T. Maniatis (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory press

Sanchez-Andujar, B., C. Coronado, S. Philip-Hollingsworth, F.B. Dazzo und A.J. Palomares (1996): EXOB-Datenbankeintrag. Swissprot

Sanger, F.,S. Nicklen und A.R. Coulson (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl .Acad. Sci. USA, **74:**5463-5467

Schoepfer, R. (1993): The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli.* Gene, **124(1):**83-85

Schubbert, R., C. Lettmann und W. Doerfler (1994): Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. Mol. Gen. Genet., **242(5):**495-504

Sezenow, G., V. Blanc, N. Barna-Jacques, A. Friedmann, J.-L. Pernodet und M. Guerineau (1997): Complete conversion of antibiotic precursor to pristinamycin IIA by overexpression of *Streptomyces pristinaespiralis* biosynthetic genes. Nature Biotech., **15:**349-353

Sherman, D.H., F. Malpartida, M.J. Bibb, H.M. Kieser, M.J. Bibb und D.A. Hopwood (1989): Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22. EMBO J., **8:** 2717-2725

Short, J.M., J.M. Fernandez, J.A.Sorge, W.D. Huse (1988): Lambda ZAP: a bacteriophage expression vector with in vivo excision properties. Nucleic Acids Res., **16(15):**7583-7600

Smith, T.M., Y.F. Jiang, P. Shipley und H.G. Floss (1995): The thiostrepton-resistance-encoding gene in *Streptomyces laurentii* is located within a cluster of ribosomal protein operons. Gene, **164:**137-142

Sohng, J.K. und J.C. Yoo (1996): Cloning, sequencing and expression of dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase gene from *Streptomyces antibioticus* Tu99, a producer of chlorothricin. J. Biochem. and Mol. Biol., **29 (3):** 183-191

Solenberg, P.J., P. Matsushima, D.R. Stack, S.C. Wilkie, R.C. Thompson und R.H. Baltz (1997): Production of hybrid glycopeptide antibiotics *in vitro* and in *Streptomyces toyocaensis.* Chem. and Biol., **4(3):**195-202

Stockmann, M. und W. Piepersberg (1992): Gene probes for the detection of 6-deoxyhexose metabolism in secondary metabolite-producing streptomycetes. FEMS Microbiol. Letters, **90(2):**185-190

Strohl, W.R. (1992): Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. Nucleic Acids Res., **20:**961-974

Tajima, M., Y. Nogi und T. Fukusawa (1985): Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae gal7* gene. YEAST, **1:**67-77

Teuber, M., V. Perreten und F. Wirsching (1996): Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der lebensmittelmikrobiologie. Lebensmittel-Technologie, **29(5):**182-199

Thoden, J.B., P.A. Frey und H.M. Holden: Molecular structure of the NADH/UDP-glucose abortive complex of UDP-glactose 4-epimerase from *Escherichia coli*: Implications for the catalytic mechanism. Biochemistry, **35(16):**5137-5144

Thompson, C.J. , J.M. Ward und D.A: Hopwood (1982): Cloning of antibiotic resistance genes in *Streptomyces.* J.Bacteriol., **151:**668-677

Travis, J. (1994): Reviving the antibiotic miracle? Science, **264:**360-362

Trefzer, A. (1996): Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von Avilamycin A. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Vara, J., M. Lewandowska-Skarbek, Y.-G. Wang, S. Donadio und C.R. Hutchinson (1989): Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). J. Bacteriol., **171:**5872-5881

Vogel, G. und F. Lynen (1975): 6-Methylsalicylic Acid Synthetase. Methods Enzymol., **43:** 520-530

Walker, J.E., M. Saraste, M.J. Runswick und N.J. Gray (1982): Distantly related sequences in the α- and the β-subunits of the ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J., **8:**945-951

Walker, C.A. (1976): Everninomycin B - a possible site of action. XVIth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago. 27.-29. Oct. 1976, Abstract 116

Wang Y.G., L.F. Jin, X.M. Xu, X.L. Chang und Y. Zheng (1994): A genetically engineered hybrid antibiotic propionylspiramycin. Zhongguo Kangshengsu Zazhi, **19(2):**109-116

Webb, V. und J. Davies (1993): Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes? Antimicrobial Agents Chemotherapy, **37(11):**2379-2384

Weber, J.M., J.O. Leung, S.J. Swanson, K.B. Idler und J.B. McAlpine (1991): An erythromycine derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea.* Science, **252:**114-117

Weinstein, M.J., G.M. Luedemann, E.M. Cohen und G.H. Wagman (1964): Everninomycin, a new antibiotic complex from *Micromonospora carbonacea.* Antimicrobial. Agents Chemotherapy, 24-32

Westrich, L., S. Gaisser, B. Reichenstein und A. Bechthold (1997): Preparation and screening of cosmid libraries from *Streptomyces* strains using the rapid DNA ligation kit, digoxygenin labeling and detction kit from Boehringer Mannheim. Biochemica Information, **101:**30-32

Wohlleben, W. und G. Muth (1987): *Streptomyces* plasmid vectors. in: Plasmids - a practical approach, Herausgeber: K.G. Hardy, Oxford IRL-Press. 2. Aufl., 147-175

Wolf, H. (1973): Avilamycin, an inhibitor of the 30 S ribosomal subunits function. FEBS Letters, **36(2):**181-186

Wright, B. und M.J. Bibb (1992): Codon usage in the G+C rich *Strepomyces* genome. Gene, **113:**55-65

Wright, D.E. (1979): The orthosomycins, a new family of antibiotics. Tetrahedron, **35:**1207-1237

Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene, **33:**103-109

Ye, J., M.L. Dickens, R. Plater, Y. Li, J. Lawrence und W.R. Strohl (1994): Isolation and sequence analysis of polyketide synthase genes from the daunomycin producing *Streptomyces* sp. C5. J. Bacteriol., **176:**6270-6280

Zähner, H. und H.P. Fiedler (1995): The need for new antibiotics: possible ways forward. In: Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends. Soc. Gen. Microbiol. ,Herausgeber: P.A. Hunter, G.K. Darby, N.J. Russell Cambridge University Press, S. 68-84

7 Anhang

7.1 DNA Sequenzen

7.1.1 PCR-Fragment von *aviE*

```
aviE      5´- TCCCAGTACG TGCGCGAACT GGTCCGGGAC GGCGATCCGG CGCGGGTGAC 50
                S  Q  Y  V   R  E  L   V  R  D   G  D  P  A   R  V  T

aviE          CGTGCTGGAC AAGCTGACCT ACGCCGGGAA CCTGGCGAAC CTGGAGCCGG 100
               V  L  D   K  L  T  Y   A  G  N   L  A  N   L  E  P  V

aviE          TCGCCGGCCG GTACACCTTC GTGCACGGCG ACATCTGCGA TGCCAGGCTG 150
                 A  G  R   Y  T  F   V  H  G  D   I  C  D   A  R  L

aviE          CTCGCCGAGG TGGTCCCCGG CCACGATCTG GTGGTCAACT TCGCGGCCGA 200
               L  A  E  V   V  P  G   H  D  L   V  V  N  F   A  A  E

aviE          ATCGCACGTC GACCGGTCGA TCGCCGACGC GGCGCCGTTC ATACGTACCA 250
                S  H  V   D  R  S  I   A  D  A   A  P  F   I  R  T  N

aviE          ATGTGCAGGG CGTCCAGGCA CTCATGCAGG TGTGCCTGGA GGCCGGCACG 300
                 V  Q  G   V  Q  A   L  M  Q  V   C  L  E   A  G  T

aviE          GCCAGGATCG TGCAGGTCTC CACCGACGAG GTGTACGGCA GCATCGAGAC 350
               A  R  I  V   Q  V  S   T  D  E   V  Y  G  S   I  E  T

aviE          GGGCTCCTGG GACGAGGACG CGCCGATCGC CCCCAACTCG CCCTACGCGG 400
                G  S  W   D  E  D  A   P  I  A   P  N  S   P  Y  A  A

aviE          CGTCCAAGGC GGGCGGCGAC ATGGTCGCCC TCGCCTACGC CCGCACCCAT 450
                 S  K  A   G  G  D   M  V  A  L   A  Y  A   R  T  H

aviE          GGGCTGCCGG TGAGCGTGAC GCGGTGCGGC -3´                   480
               G  L  P  V   S  V  T   R  C  G
```

Abb. 7.1: Sequenz des PCR-Fragments von *aviE* , dem offenen Leserahmen, der für die dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase kodiert. Das abgebildete DNA-Fragment wurde wie unter 3.8.8 beschrieben mittels PCR aus genomischer DNA von *S.viridochromogenes* Tü57 amplifiziert, mit Digoxygenin markiert und als Sonde zur Kolonie-Hybridisierung der Cosmidbank eingesetzt (vgl. dazu 3.8.7).

7.1.2 *aviN* und *aviM*

```
          5´- GGCGCGCACC GCGCCCGCCC GTACAAAAGC GAGTTCCGTC GTTCGCTGAC 50
              GACGGTGCGG CGAATTCTGC CCGGGAAATG CCGGAGCGGG TCTAGGTGAT 100
              TCCCCTCAAG AATACCGACA AAACGCTGAC TATGATCGTC AAAAGAATGC 150
              AGATCTGTGC GCGCCGGGTC CAGTAAGCCT GAAAACAGGG AGGTGGGTTG 200
aviN          GTGCAGATAG CCGACCTGTA CATCGGTGCT CTCGGCGTCT TCGTACCGCC 250
               V  Q  I  A   D  L  Y   I  G  A   L  G  V  F   V  P  P

aviN          GTGTGTGAGC GTCGAATGGG CCGTGGAACG CGGCCTCTAT CCGGCCGAAG 300
                 C  V  S   V  E  W  A   V  E  R   G  L  Y   P  A  E  E

aviN          AGGCCGAGGC ACACGAGCTC GGCGGGGTCG CCATAGCCGG CGACGTCCCC 350
                  A  E  A   H  E  L   G  G  V  A   I  A  G   D  V  P

aviN          CCTCCGGAAA TGGCCTTGCG GGCGGCGCAG CAGGCGGTGA AGAGGTGGGG 400
               P  P  E  M   A  L  R   A  A  Q   Q  A  V  K   R  W  G

aviN          CCCGGGTACG AGCTCGAATT CGCTCCTGCT GTATGCGAGC ACCTGGCACC 450
                 P  G  T   S  S  N  S   L  L  L   Y  A  S   T  W  H  Q
```

```
aviN        AGGGCCCGGA CGGCTGGCCG CCCCAGGCAT ACCTGCAGCG GCACCTGGTG 500
              G  P  D   G  W  P   P  Q  A  Y   L  Q  R   H  L  V

aviN        GGCGGGGACA TGCTCGCCCT GGAGATCAGG CAGGGCTGCA ACGGCGTGTT 550
            G  G  D  M   L  A  L   E  I  R   Q  G  C  N   G  V  F

aviN        CAGCGCGCTG GAACTCGCCG TCGGCTACCT GCAGGCCGAT CCGAACCGCA 600
             S  A  L   E  L  A  V   G  Y  L   Q  A  D   P  N  R  T

aviN        CCAGCGCGCT GATCGTCGCC GCCGACAACT ACGGAACGCC GCTGATCGAC 650
              S  A  L   I  V  A   A  D  N  Y   G  T  P   L  I  D

aviN        CGGTGGCGGA TGGGCCCCGG CTTCATCGGC GGCGATGCGC TCCCGCCCTG 700
            R  W  R  M   G  P  G   F  I  G   G  D  A  L   P  P  W

aviN        GTGCTGCAAG CGGCCCGGCT TCGCCCGGCT CTGCTCGGTG GCCTCCAAGG 750
             C  C  K   R  P  G  F   A  R  L   C  S  V   A  S  K  G

aviN        GGCTGCCGGA GATCGAGTCG CTGCACCGCG GTGACGAGCC GTTGTTCCCG 800
              L  P  E   I  E  S   L  H  R  G   D  E  P   L  F  P

aviN        CCGAGCATCA CCCGGGGCCG TGCCACCGAC TTCAGCGCCC GTATCGGCCA 850
            P  S  I  T   R  G  R   A  T  D   F  S  A  R   I  G  Q

aviN        GCAGTTCGCC ACCCGCAGCC CCGCCTTCGT TGCGATGGCC GAGATTCAGG 900
             Q  F  A   T  R  S  P   A  F  V   A  M  A   E  I  Q  D

aviN        ACCATATGAT GGACGTGGCC GAGCGCGCCC TGGCCGGGGC CGGCATCGGG 950
              H  M  M   D  V  A   E  R  A  L   A  G  A   G  I  G

aviN        ATGGCGGACG TCGCCCGCGT CTCCTTCATG AACTATCACG CGAAGTGGTC 1000
            M  A  D  V   A  R  V   S  F  M   N  Y  H  A   K  W  S

aviN        GAGCAGTGCT GAATGGCGGC CTGGGGGGTG CCGCTGTCCC GGTCCACGTG 1050
             S  S  A   E  W  R  P   G  G  C   R  C  P   G  P  R  G

aviN        GGAATTCGGC CGGGAGATCG GCCACTTGCG GGGCCAGCGA CCATCTGCTG 1100
              N  S  A   G  R  S   A  T  C  G   A  S  D   H  L  L

aviN        TCCATGGAAC ACATCGTACG GACCGGTGAG CTCGCCCCCG GCGACCACGT 1150
            S  M  E  H   I  V  R   T  G  E   L  A  P  G   D  H  V

aviN        CCTGCAACTC GCCACGGCCC CGGGCCTGGT GGTGTCCAGC GCCGTCCTTC 1200
             L  Q  L   A  T  A  P   G  L  V   V  S  S   A  V  L  Q

aviN        AGGTTCTCGA ATCGCCGGAC TGGGACGAAT GACGCGAAGT GGTCGAGCAG 1250
              V  L  E   S  P  D   W  D  E  *

            TGCTGAATGG CGGCCTGGGG GGTGCCGCTG TCCCGGTCCA CGTGGGAATT 1300
            CGGCCGGGAG ATCGGCCACT TGCGGGGCCA GCGACCATCT GCTGTCCATG 1350
            GAACACATCG TACGGACCGG TGAGCTCGCC CCCGGCGACC ACGTCCTGCA 1400
            ACTCGCCACG GCCCCGGGCC TGGTGGTGTC CAGCGCCGTC CTTCAGGTTC 1450
            TCGAATCGCC GGACTGGGAC GA 1472
aviM        ATGATGAATA CCGGCAACGA CGAACGGAAT ATGCCCGTGA TATCCCTTGA 1523
            M  M  N  T   G  N  D   E  R  N   M  P  V  I   S  L  D

aviM        TCGCCCGGCG GACTCCCTCT CTCCGGTGGC CGTGGTCGGG ATCGGATGCC 1573
             R  P  A   D  S  L  S   P  V  A   V  V  G   I  G  C  R

aviM        GGTTCCCCGG TGGTGTCAAC TCGCCCGGCG AATTCTGGGA CCTGTTGACG 1623
              F  P  G   G  V  N   S  P  G  E   F  W  D   L  L  T

aviM        GCCGGACGCA ACACCGTCGG CGAGATGCCC CCCGACCGCT GGGAAGAGTA 1673
            A  G  R  N   T  V  G   E  M  P   P  D  R  W   E  E  Y

aviM        CCGGGACTTC GGTCCGCGGT TCGATGCGGC GCTGCGGACG GCGATTCGCT 1723
             R  D  F   G  P  R  F   D  A  A   L  R  T   A  I  R  S

aviM        CCGGCAGTTT CCTGGACGAC GACATAGCGG GTTTCGACGC CGAGTTCTTC 1773
              G  S  F   L  D  D   D  I  A  G   F  D  A   E  F  F

aviM        GGCATCTCGC CGCGCGAGGC CGAGCTGATG GACCCGCAGC AGCGCCTGAT 1823
            G  I  S  P   R  E  A   E  L  M   D  P  Q  Q   R  L  M

aviM        GCTGGAGGTG GCCTGGCAGG CACTGGAGCA CGCGGGCATC CCGCCGCACA 1873
```

```
                 L  E  V   A  W  Q  A   L  E  H   A  G  I   P  P  H  T
aviM       CCCTGGCAGG GACCGACACC GGTGTGTTCG CCGGGGTCTG CACCTACGAC 1923
             L  A  G   T  D  T   G  V  F  A   G  V  C   T  Y  D

aviM       TATGGCGCCG GACGGCTGGA AGACCTGCCG AACATCGACG CATGGACGGG 1973
           Y  G  A  G   R  L  E   D  L  P   N  I  D  A   W  T  G

aviM       GATCGGCGCG GCGGTGTGCG CCGTGTCCAA CCGCGTCTCT CACGCGCTCG 2023
            I  G  A   A  V  C  A   V  S  N   R  V  S   H  A  L  D

aviM       ACCTGCGCGG GCCCAGCCTC TCCATCGACA CCGCGTGCTC GGCCTCCCTG 2073
             L  R  G   P  S  L   S  I  D  T   A  C  S   A  S  L

aviM       GTGGCGCTGC ACACCGCCGC GCAGAGCCTG CGGCTCGGCG AGTGCACCGT 2123
           V  A  L  H   T  A  A   Q  S  L   R  L  G  E   C  T  V

aviM       GGCGCTGGCC GGGGGCGTCA ACCTGCTGGT GTCACCGGGC CAGACGATCG 2173
            A  L  A   G  G  V  N   L  L  V   S  P  G   Q  T  I  A

aviM       CCCTGGGCAC GGCCGGCGCG CTGGCGCCCG ACGGCCGGAG CAAGCCGTTC 2223
             L  G  T   A  G  A   L  A  P  D   G  R  S   K  P  F

aviM       GCCGCGTCGG CCGGACGCTA CGCCGTTGCC GCGTCGGCCG ACGGCTACGG 2273
           A  A  S  A   G  R  Y   A  V  A   A  S  A  D   G  Y  G

aviM       CCGCGGCGAG GGCTGCGGCG TGCTGGTCAT CAAGCTGCTG ACGGACGCCG 2323
            R  G  E   G  C  G  V   L  V  I   K  L  L   T  D  A  V

aviM       TACGCGACGG TGACCGGGTG CTGGCGGTGC TGCGCGGCAG CGCGTTCAAC 2373
             R  D  G   D  R  V   L  A  V  L   R  G  S   A  F  N

aviM       CAGGACGGGC GCACCAACGG CATCATGGCC CCCTGCGGGC AGGCCCAGGA 2423
           Q  D  G  R   T  N  G   I  M  A   P  C  G  Q   A  Q  E

aviM       GCACGTCATG AGGCGCGCCC TGACGGCCGC GGGCGTCGCT GCCGACACCG 2473
            H  V  M   R  R  A  L   T  A  A   G  V  A   A  D  T  V

aviM       TTGACTTCGT CGAGGCCCAC GGCACCGGTA CCCGCCTCGG CGACCCCATG 2523
             D  F  V   E  A  H   G  T  G  T   R  L  G   D  P  M

aviM       GAGATCGGCG CGATCGCCGC CGTCTACGGA CGTGACCGCT CCGGTCAGGA 2573
           E  I  G  A   I  A  A   V  Y  G   R  D  R  S   G  Q  E

aviM       GCCGTGCGCG GTCGGGTCGG TGAAGTCCAA CATCGGGCAT CTGGAGGGGG 2623
            P  C  A   V  G  S  V   K  S  N   I  G  H   L  E  G  A

aviM       CCGCCGGGGT CGCCGGGGTC ATCAAGGCGA TCCTCGCCCT CGACGAGGAC 2673
             A  G  V   A  G  V   I  K  A  I   L  A  L   D  E  D

aviM       CGGATCCCGG CCAGCCTGCT GGACGGCGAC CCGAACCCCG AGATCGACTG 2723
           R  I  P  A   S  L  L   D  G  D   P  N  P  E   I  D  W

aviM       GGCCGGCCTC GACATCCGGC TGGCGACCCG GGCCCTGCCG TGGCCCGAGC 2773
            A  G  L   D  I  R  L   A  T  R   A  L  P   W  P  E  R

aviM       GTCCGCACCC CCGCCGGGCG GCTGTGTCCG GTTTCGGCTA CGGCGGCACC 2823
             P  H  P   R  R  A   A  V  S  G   F  G  Y   G  G  T

aviM       GTGGCCCATG TGGTCCTCGA ACAGGCGCCC ACCGCGCCCG CCCGCCCCGC 2873
           V  A  H  V   V  L  E   Q  A  P   T  A  P  A   R  P  A

aviM       GCCGGAGCCG GCCGGAACCC TGTTCCCGGT GTCCGCGGCC TCCCCGGAGG 2923
            P  E  P   A  G  T  L   F  P  V   S  A  A   S  P  E  A

aviM       CGCTCCGTGA CCGCGCGGCC GCGCTCGCCG AGCGGGTCGA GGAGGGCGCT 2973
             L  R  D   R  A  A   A  L  A  E   R  V  E   E  G  A

aviM       GACCTGGCCT CGGTCGGGCA CACCCTGGCC CATCGGCAGT CCCCGCTGGT 3023
           D  L  A  S   V  G  H   T  L  A   H  R  Q  S   P  L  V
```

```
aviM        CCACCGGGCG GCCGTCGTGG CGACCGGCCG GGACGAACTG GCCGCCGGGC 3073
             H  R  A   A  V  V  A   T  G  R   D  E  L   A  A  G  L

aviM        TGCGCGCGCT GGCCACTCAG GAACCCGCGC CCGGTCTCGT CACCGGGGCC 3123
               R  A  L   A  T  Q   E  P  A  P   G  L  V   T  G  A

aviM        GCGCTGCCGG ATGCCGGCCG TCCCGTCTGG GTGTTCTCGG GTCACGGGTC 3173
            A  L  P  D   A  G  R   P  V  W   V  F  S  G   H  G  S

aviM        CCAGTGGGCC GGGATGGGCC GCGAACTGCT GGAAGCCGAG CCGGTCTTCG 3223
             Q  W  A   G  M  G  R   E  L  L   E  A  E   P  V  F  A

aviM        CCGAGGTGAT CGACGAACTG GAGCCGGTGT TCAAGGAGGA GATCGGGTTC 3273
               E  V  I   D  E  L   E  P  V  F   K  E  E   I  G  F

aviM        TCGCCCCGGC AGATGCTGCT GGAGGGCGAC CACACCGAGG TCGACGGCGC 3323
            S  P  R  Q   M  L  L   E  G  D   H  T  E  V   D  G  A

aviM        CCAGACCATG ATCTTCGCGA TGCAGCTCGG GCTCGCCGCG CTGTGGCGGT 3372
             Q  T  M   I  F  A  M   Q  L  G   L  A  A   L  W  R  S

aviM        CACGGGGCGT CGAGCCCGCC GCCGTCATCG GCCACTCGGT CGGTGAGATC 3423
               R  G  V   E  P  A   A  V  I  G   H  S  V   G  E  I

aviM        GCCGCCGCCG TCACCGCCGG GGCGCTGACC GTGACCGACG GGGCCCGGCT 3473
            A  A  A  V   T  A  G   A  L  T   V  T  D  G   A  R  L

aviM        GATCTGCCGT AGGTCGCTGC TGCTGCGCGA GGCCGCGGGG CGTGGCGCGA 3523
             I  C  R   R  S  L  L   L  R  E   A  A  G   R  G  A  M

aviM        TGGCGATGGT CAGTCTGCCC TTCGACGAGG CCGCCGAGCG GCTCGCGGGC 3573
               A  M  V   S  L  P   F  D  E  A   A  E  R   L  A  G

aviM        AATGACGCGG TGGTCGCGGC CATCGCGTCC TCGACGACGT CCACCGTGAT 3623
            N  D  A  V   V  A  A   I  A  S   S  T  T  S   T  V  I

aviM        CTCCGGTGAC CCCGGCGAGG TCGAGAAGGT CGTCGGCCGC TGGACCGACG 3673
             S  G  D   P  G  E  V   E  K  V   V  G  R   W  T  D  E

aviM        AGGGGCTGGT CGTACGGCGG GTCGCCTCCG ACGTGGCCTT CCACAGCCCG 3723
               G  L  V   V  R  R   V  A  S  D   V  A  F   H  S  P

aviM        CACATGGACC CCCTGCTCGA CCGGCTGCGC GCGGCCGCCG ACGAGCTGAG 3773
            H  M  D  P   L  L  D   R  L  R   A  A  A  D   E  L  S

aviM        TCCCAGCGCA CCGCACACGC CGCTCTACAC GACGGCGCTC GCGGACCCGC 3823
             P  S  A   P  H  T  P   L  Y  T   T  A  L   A  D  P  R

aviM        GGGCCACGGT GACCGCCGAC GGCGCGTACT GGGCGGCGAA CCTGCGCAAC 3873
               A  T  V   T  A  D   G  A  Y  W   A  A  N   L  R  N

aviM        CCGGTGCGGC TCGCCGCCGC GATCACCGCG GCGGCCGAGG ACGGCCACCG 3923
            P  V  R  L   A  A  A   I  T  A   A  A  E  D   G  H  R

aviM        GGCGTTCGTC GAGCTGTCCC CGCACCCCGT GGTCGCGCAC TCGATCCACG 3973
             A  F  V   E  L  S  P   H  P  V   V  A  H   S  I  H  E

aviM        AGACGCTGGC CGAACGCGGC GTGGAGGACG TGTTCGTCGG ACCGACGCTA 4023
               T  L  A   E  R  G   V  E  D  V   F  V  G   P  T  L

aviM        CGGCGCAACC AGCCCGAGGC CCGGACCTTC CGCGCCGCCG TGGGCGCCGC 4073
            R  R  N  Q   P  E  A   R  T  F   R  A  A  V   G  A  A

aviM        CCACTGCCAC GGCGTGAGCG TGGACTGGTC GGCGCTCCAG CCGAACGGGA 4123
             H  C  H   G  V  S  V   D  W  S   A  L  Q   P  N  G  N

aviM        ACCTCGAAGT CCTGCCGCCC TACCCCTGGC AGCACCGCCC GCTGTGGCGT 4173
               L  E  V   L  P  P   Y  P  W  Q   H  R  P   L  W  R
aviM        TCCATCGCCG GGGCGCGAGC GGCCGAGCGC GGCCACGACG TCGACTCCCA 4223
            S  I  A  G   A  R  A   A  E  R   G  H  D  V   D  S  H
```

```
aviM        CACGCTGCTG GGCACGCCCG GCGGCGTCGC GGGCAGCGAC CTGCGGCTGT 4273
              T  L  L   G  T  P  G   G  V  A   G  S  D   L  R  L  W

aviM        GGCACAGCAC GCTGGACGAC GACAGCCGCC CGTACCCGGG CAGCCACGCC 4323
              H  S  T   L  D  D   D  S  R  P   Y  P  G   S  H  A

aviM        CTCAACGGCG TGGAGATCGT CCCGGCCGCC GTGCTGGCGG TCACGTTCCT 4373
            L  N  G  V   E  I  V   P  A  A   V  L  A  V   T  F  L

aviM        GGCGGCCGGC GCCGAGGGCG AAGAGCGCCG CGCCCTCCAG GACATGACGA 4423
              A  A  G   A  E  G  E   E  R  R   A  L  Q   D  M  T  M

aviM        TGACCCACCC GGTGCTGACG GCGGGTCAGC GGCAGATCCA GGTCGTCCGC 4473
              T  H  P   V  L  T   A  G  Q  R   Q  I  Q   V  V  R

aviM        GAGGGCGAGG TGGTGCGGCT GGCCTCCCGG ACGGTCGCGG ACGCCGCCGA 4523
            E  G  E  V   V  R  L   A  S  R   T  V  A  D   A  A  D

aviM        CCCGAACCCC GCCTGGCTCG TCCATGCCGA GGCCCGGACG GCCGCGCCGG 4573
              P  N  P   A  W  L  V   H  A  E   A  R  T   A  A  P  D

aviM        ACCTCGCCGG TCTGGCGGCG CGGTCGCTGC TGGACCCGGG CGAGCACCGG 4623
              L  A  G   L  A  A   R  S  L  L   D  P  G   E  H  R

aviM        CTCGAACCGG CCGACCCCGG CCTGGTCTCC CGGCGGCTGG CCGAGGTGGG 4673
            L  E  P  A   D  P  G   L  V  S   R  R  L  A   E  V  G

aviM        CGTACCCTCG ACCGGTTTCG ATTGGAGCGT CGAGCGACTG TCCGCCGGTC 4723
              V  P  S   T  G  F  D   W  S  V   E  R  L   S  A  G  L

aviM        TCGGTGTACT GCACGCTCAG GTGCTCTCGC CCGACGCCTC GTCCTGGGCC 4773
              G  V  L   H  A  Q   V  L  S  P   D  A  S   S  W  A

aviM        CCGCTGCTGG ACGCCGTGAT GTCGATCGCG CCGGCCGCCT TCGTGGGCCT 4823
            P  L  L  D   A  V  M   S  I  A   P  A  A  F   V  G  L

aviM        CCCGCAGCTC CGCATGGTCG TGCACGTCGA CGAGATCACC GTCGACGGCA 4873
              P  Q  L   R  M  V  V   H  V  D   E  I  T   V  D  G  T

aviM        CGCCACCGGA GGCGGCGACG GTCGAGGTCG CGCTCGATCC CCGCGTCGCC 4923
              P  P  E   A  A  T   V  E  V  A   L  D  P   R  V  A

aviM        GACACCGTGC ACGCCCTGGT CACGGACGGG GAGGGACGCC CGGTGGCGAG 4973
            D  T  V  H   A  L  V   T  D  G   E  G  R  P   V  A  S

aviM        CCTGCGCGGC CTGCGCTACC CGGTGGTCGA GCAGCCGGCC GCGCCGGACA 5023
              L  R  G   L  R  Y  P   V  V  E   Q  P  A   A  P  D  T

aviM        CCGACGAGCC GGGCGGCGAC GCGGACGCGG ACGTGGTGTC GTTCGCGGGT 5073
              D  E  P   G  G  D   A  D  A  D   V  V  S   F  A  G

aviM        CTGTCGCCGG AGGAGCTGCG TTCCCGGGTG CTCGACGAGG TGCGCGAGCA 5123
            L  S  P  E   E  L  R   S  R  V   L  D  E  V   R  E  Q

aviM        GATCGCGCAG GAGATGCGAC TCGCCCCCAC GGCCCTGCAC GTTCGCCGCC 5173
              I  A  Q   E  M  R  L   A  P  T   A  L  H   V  R  R  P

aviM        CGCTGGTGGA GCAGGGGCTC GACTCGGTGA TGACGGTGGT GGTCCGCCGC 5223
              L  V  E   Q  G  L   D  S  V  M   T  V  V   V  R  R

aviM        CGGCTGGAGA AGCGCCTCGG CCGGGACGTG CCGGCCAACA TCTTCTGGAA 5273
            R  L  E  K   R  L  G   R  D  V   P  A  N  I   F  W  K

aviM        GCTGCCCACC ATCAGCGACA TCGTCGATCA CCTGACCGAA CGCCTCACGG 5323
              L  P  T   I  S  D  I   V  D  H   L  T  E   R  L  T  E

aviM        AACACCCGAC GGCGGACGGC CATGCGTCCT GAACGCACTG ACTCCGTAAC 5373
              H  P  T   A  D  G   H  A  S  *
```

Abb. 7.2: Sequenz von *aviN* (Base 201 - 1232) und *aviM* (Base 1473 - 5355)

7.1.3 Resistenz-vermittelnder Bereich

```
      5´- GGATCCGCCC CACGATCTCC GCGTGCCGCT CGAAGTCGCC TGCCAGACGG 50
          CCCAGCGTGG CAGCGGGGTC CGAGCCCAGC GTCAGAGCCT CGACGTCACC 100
          CTCGTACACG GAGGACATGA ATTCCGCTTC GGGCGGCAGC ACCGGCAGGG 150
          AGCCCGACGC GAGCGTTTCG AGCATCCGGG CCGTGAACAG CCCCGTGTCG 200
          GCCACGAGCG GGCTGACCAG CACCGGCGTG ATGACGGCCC GTCCCATCTC 250
          GGTGACGACA TGTCCGAACG GCACCGGCGG CTGGACCTCG ACGCCGCTTC 300
          AGCCGTTCCG GCTCCCGCGG AGGTGATGTC CTCGAAGCCG GGGCAGGTCT 350
          CCCCGTCCCA CCACCGCCCG CAGACCCGAA TCCGCCGCAG CCGGGCCTGT 400
          CTGGCGGCCT CCACGACCTC GATGAACGGC TTCCACCGCC CCCAGTTGCT 450
          GCCGATGTAC TGCAGCTCGT AGTCCCGCTC CGGACCGAGC TCCCGTGGAT 500
          GCCGTACCAG CTGGGGCATT CCGAAACAGG GGAAGAACTC GGCCCCGTCG 550
          GGCAAGGGGC CCGTCAACTT GGGCTGCAGG ACGAGGTCGC TGAGCGCGGA 600
          GTAGAGCCGT CGCCAATTCT CGATCGAGTG GGTGCCGACG GAGCTGTCGT 650
          CGGCGGTGGC GACACCGCCC AAGTGGCCGT CAGAAATCGA TTATCAGGCG 700
          CCGGTCCCTG GGAAACGAGC AGGCCAGTTC GATCTGCTCG TCCGACAGAT 750
          ACTGCCGGGC CTCGAACATG AACACAAGAT GTGTTCCCCA GCGCACGTCC 800
          GGCTCCACCG GAAGATGCCG CGGGATCTGC TCGTCCATCC GCGAAAGCGC 850
          GCCGCTGACC CGGACCTCAC AGCCCGCTTC ACCCGCCGCC TCCACATAGG 900
          CGGCAACGGT CTGGCTGAAT CCCGCCTGCC AATGAAGATT CCCGGCTACG 950
          AGCACCCGGG CTTCCGCCAT TCCGCCCTCC CAAGGACACA CCTGTAGCCA 1000
          CCACTGGCGC TGTGAGTCTA GGGAAAAGGA ACTGGGGAAA CACTGGTGAA 1050
          AACACTGGAG AAAACACTGG GGACAAAATT CAGCCGGGAC CGCTGCTCAG 1100
aviR                                          3´-CTG GCGACGAGTC
                                                           *
aviR      CCCGGACGGA GGTCGTGCAG CCGACGGGCC TGGTCATGCC GGCTCGCCCA 1150
           P  G  A   E  L  V  D   A  A  R   V  L  V   A  S  R  T
aviR      CGGCTAGAAG TCGGCGAGGT CCCGGAAATG CCCTCGGTGG CCCTAGAATG 1200
             G  I  K   L  R  E   L  A  K  V   P  A  V   P  I  K
aviR      CCGACGCCAG CCACTGCCGC TAGTGGCGTA CGCGCCCGTC GCGGCTGCGC 1250
          R  S  R  D   T  V  A   I  V  A   H  A  P  L   A  S  A
aviR      TCGCTCGCGT CGTCCCGGGC GGTGGCCGAC GCGCCCGTGG ACGGGAAGGG 1300
           L  S  R   L  L  A  R   W  R  S   R  P  C   R  G  K  G
aviR      TCACGCACGC GAGGGCATGC CGTCCAGCCG GTCGTGCTGT AGCCCGCGCC 1350
             T  R  A   S  G  Y   P  L  D  A   L  V  V   D  P  A
aviR      TGGGCCGCTC CTGCCGCCTG TCGCGTGCGC CTAGCTTCTG CAGGCGCCAC 1400
          S  G  A  L   V  A  S   L  A  R   P  D  F  V   D  A  T
aviR      GCCTACCGCG TGCCGTCGCG TGGCGGGAGG CGGCAGTCCG CGAGGGCGTC 1450
           R  I  A   C  P  L  A   G  G  E   A  T  L   R  E  R  L
aviR      GGCCGCCCGC CGGACGCGCC GGAGGTCTAT CCTCCCGAAC GGCTTTGCGA 1500
             R  R  A   A  Q  A   A  E  L  Y   S  P  K   G  F  R
aviR      GCGAGACGAG TGCGGCAAGC TCGAGCGCGC GCCAGTCGGG CCGGCCGCTC 1550
          E  S  Q  E   R  R  E   L  E  R   A  T  L  G   A  P  S
aviR      TCGTCCCGCT CTAAGAAGCG GCGCTCGAGG TCGCCCCGCC CCAGGTGTAG 1600
           L  L  A   L  N  K  A   A  L  E   L  P  A   P  D  V  D
aviR      CCTCCGCTAG TGGACGGCGT CGCTCGCGGC CACGTCGTCG GGGTCGTGGC 1650
             S  A  I   V  Q  R   L  S  R  R   H  L  L   G  L  V
aviR      AGTCCTCCAT TGGCGACGGC GTCGTGCCCA GGGTGTCGCA GTGGCCTGGC 1700
          T  L  L  Y   G  S  G   C  C  P   D  W  L  T   V  P  G
aviR      AGCGGCCCCT CCGCCCGCTC CCGGGCGACC TTCTAGAGCC AGCGGTCCGC 1750
           D  G  P   L  R  A  L   A  R  Q   F  I  E   T  A  L  E
```

```
aviR        CTGCCCCTTC CGCCCCATTG GGCCGCGCCT CACCTCGTGC TGTGGCGTCC 1800
              V  P  F   A  P  Y   G  P  A  S   H  L  V   V  G  C
                                                      5´-CGCACTCACC 1850
aviR        GCTCTAGCCT TGACAGCTAG GCGAGGTGCC GCACCGCCAT GCGTGAGTG- 5´
            A  L  D  S   S  D  I   R  E  V   A  H  R  Y   A  S  V

            TGTCCACTCC CCAGTACTTC GGAACCGCCT CCGTCGCAGC CCTGAAGCGA 1900
            TCATAGTGCC GCGGCCCCGG CCGGGGAAGC TCCCAGCTGC CGCCGGACAC 1950
            ACAGGTCACC GGCGCCTCCG GGGCTGTCGG TCGTCCCAGG TGAAGCCGGG 2000
            CGGTCGGCGC GGTCACCGCC CAAATCTCTG AGGTTTTCCC GAATGTGCCC 2050
            CGACCTACGA TTGCCGCACT CCGATGCCGT AGTTGCGAGG AAGGGCGGGC 2100
aviQ        CATGTCCATG TTCCCGGGGT TCTCAGCCGG AACACGTCTG CTGGTGACCG 2150
                  M   F  P  G  F   S  A  G   T  R  L   L  V  T  G

aviQ        GAGGGGCGGG CTTCATCGGC TCGCACGTGG TCGACGCCTT CCTGGAGGCC 2200
              G  A  G   F  I  G   S  H  V  V   D  A  F   L  E  A

aviQ        GGGGCCGAGG TCACCGTGCT GGACGACCTG ACCACCGGTG ACCCGGAACG 2250
            G  A  E  V   T  V  L   D  D  L   T  T  G  D   P  E  R

aviQ        TCTGGACCCA CGTGCGGTCA TCCGTCGCGT CGACGTGACC GATGCCGCCG 2300
             L  D  P   R  A  V  I   R  R  V   D  V  T   D  A  A  A

aviQ        CCCTGGACGA GGCCGTGCGG TCGGCGCGCC CCGACGTCAT CTGCCATCTC 2350
              L  D  E   A  V  R   S  A  R  P   D  V  I   C  H  L

aviQ        GCGGCCCAGA TCGACGTCCG GGTCTCGGTG GCCACACCGG CCGTCGACGC 2400
            A  A  Q  I   D  V  R   V  S  V   A  T  P  A   V  D  A

aviQ        GCGGGTCAAC GTCGAGGGCA CGATCAACGT GCTGGAAGCG GCGCACGCCG 2450
             R  V  N   V  E  G  T   I  N  V   L  E  A   A  H  A  V

aviQ        TCGGGGCGCG GGTCGTGTTC GCCTCCACCG GCGGGGCGCT CTACGGGGAA 2500
              G  A  R   V  V  F   A  S  T  G   G  A  L   Y  G  E

aviQ        GGCGTTCCGG TCCCGACGAA CGAGGACACG CTGCCCAGGC CGGGGGCGCC 2550
            G  V  P  V   P  T  N   E  D  T   L  P  R  P   G  A  P

aviQ        CTACGGCACG GCCAAGTACT GCGCGGAGAA GTACATCGGC CTGTTCAACC 2600
             Y  G  T   A  K  Y  C   A  E  K   Y  I  G   L  F  N  R

aviQ        GGCTGCACGG AACCGAGCAC AGCGTGTTGC GGCTCGGCAA CGTGTACGGG 2650
              L  H  G   T  E  H   S  V  L  R   L  G  N   V  Y  G

aviQ        CCCCGGCAGA GCCCGGGCGG TGAGGCGGGC GTCATCGCCA TCTACTGCGG 2700
            P  R  Q  S   P  G  G   E  A  G   V  I  A  I   Y  C  G

aviQ        GCTGGCCTCC GAGGGCGGAG TGCCCACGGT GTTCGGCGAC GGTTCGCAGA 2750

             L  A  S   E  G  G  V   P  T  V   F  G  D   G  S  Q  T

aviQ        CCCGTGACTA CGTGTACGTC GGCGACGTCG CCGCGGCGTT CGTCGCGCCG 2800
              R  D  Y   V  Y  V   G  D  V  A   A  A  F   V  A  P

aviQ        TACGGCACCG TCGGCCCGGC GTCTGGAACA TCGGACACGG GCAAGGGGAG 2850
            Y  G  T  V   G  P  A   S  G  T   S  D  T  G   K  G  S

aviQ        CACGGTGCTG GAGGTCCTCG ACCACATCGC CGCCGCCTCC GGGCGCGACC 2900
             T  V  L   E  V  L  D   H  I  A   A  A  S   G  R  D  L

aviQ        TGCCTCCCCG TTTCGCGCCC CGCCGGCCGG GCGAGATCCA GCACAGCACC 2950
              P  P  R   F  A  P   R  R  P  G   E  I  Q   H  S  T

aviQ        CTGGACGTCA CTCGTGTCGC CGCCGATCTG GGCTGGACCG CGTCCGTCCC 3000
            L  D  V  T   R  V  A   A  D  L   G  W  T  A   S  V  P

aviQ        GCTGGAGAAA GGCATCGCCG CCACCTACGC CTGGGTCCGT TCCGGTTCGC 3050
             L  E  K   G  I  A  A   T  Y  A   W  V  R   S  G  S  P

aviQ        CCGTCCGGCA GCAGGCATGA CTAACTTGCG CAGGCGCAGC AGGAGTCCGT 3100
              V  R  Q   Q  A  *

            GGCCGACGCC GATCGCGGTG GCGGCCCCGT ACACGCAGAA CAGCAGTGGT 3150
            GTGCAGCGCG ACTCCGGCGC GGTGCGGTGC CGGGTCAGCT CCTTGCGGAG 3200
```

```
TCCCGCCGCC GACTGGTGCC GTCGCGCCTC CGAACGCACC CTGCCAGTAG 3250
GCCCGGCGCA GGAGGTAGCG AGGGTGAGCC GGCCGGGGTC GACATCGTGG 3300
ACGACCGCGT GCTCGGGCAG CAGGCAGCTC GCGCGCACCC GCCTCCTTCA 3350
TCAGCGCGAT GAAGGAGGTG TCCTCACCGG ACTGCAGGTT GACGCCGGTG 3400
CGGCTCAGGT CCAGGTCGAA GGTGAGGCCC TGGCGGCGCG CGAAGTCGGC 3450
GTCGACGCCC ATGCAGGCGC CCCAGATCTT GATGTCCCCG CGGTCGCGGT 3500
GCCAGCCGAC GAGGTGGAAC TGCCCCGAGG ACAGGAACCA GGGCAGCCGG 3550
CGGAGCTCTC GCGGCGGTCG CAGCCGCGCA CCGACCACGT GCGCCCCGGC 3600
GCGGAACGCG GCGCGGACGG CGTCCACGGC GGAGGCCTCC AGCCGCACGT 3650
CGTCGTCCAC GAACAGCACG TGCCGGTCGG CCCATTCCCG CAGCACCGTG 3700
TTACGGGACG CCGACAGCCC TCGCGTGGCC CCCAGGATCC -3´        3740
```

Abb. 7.3: Resistenz-vermittelnder Bereich mit *aviR* (Base 1094 - 1851, invers) und *aviQ* (Base 2107 - 3120). Der offene Leserahmen *aviR*II befindet sich zwischen Base 1048 und 1908 (abgeleitete Aminosäuresequenz nicht angegeben).

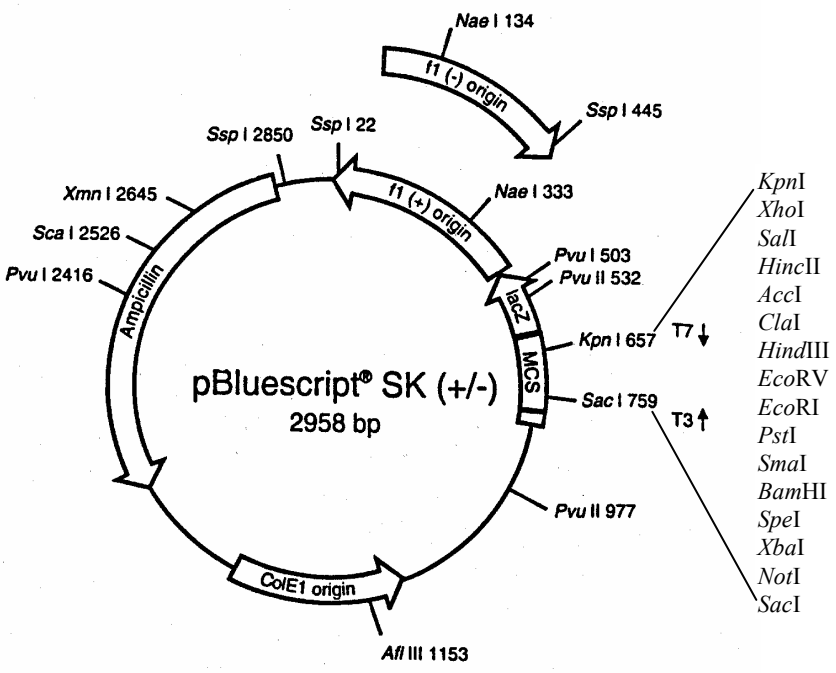
7.1.4 PCR-Fragment von *aviABC*

```
aviABC   5´- GAATTCGGGC CCAACGGCGC CGGCAAGACC ACCGCCGTAC GCATCCTGAG 50
             E  F  G  P   N  G  A   G  K  T   T  A  V  R   I  L  S

aviABC       CACCCTGCTC AAGCCGGACG GCGGCCGTGC CCTGGTGGCC GGCCTCGATG 100
              T  L  L   K  P  D  G   G  R  A   L  V  A   G  L  D  V

aviABC       TGACCCGCGA GGCCGCCGAG GTGCGCCGGA ACATCGGCGT CACCGGCCAG 150
                T  R  E   A  A  E   V  R  R  N   I  G  V   T  G  Q

aviABC       TACCCGGCGG TCGAGGAGAT CCTGACCGGC CGCGAGAACC TGGAGATGTG 200
             Y  P  A  V   E  E  I   L  T  G   R  E  N  L   E  M  W

aviABC       GGGCCGCCTC TACCACGTGG GCCGCAGGGA GGCGCAGCGC CGTACGGAAG 250
              G  R  L   Y  H  V  G   R  R  E   A  Q  R   R  T  E  E

aviABC       AACTGCTGGA GCAGTTCGAC CTGACCGAGG CCGCCGACAA GCGGCTCAAG 300
                L  L  E   Q  F  D   L  T  E  A   A  D  K   R  L  K

aviABC       CACTACTCGG GCGGTATGCG GCGCAGGCTC GACCTGGCCG CCGGATTCTT 350
             H  Y  S  G   G  M  R   R  R  L   D  L  A  A   G  F  F

aviABC       CACCGTGCCC AAGGTGCTCT TCCTGGACGA ACCCACCACC GGCCTCAAGC 400
              T  V  P   K  V  L  F   L  D  E   P  T  T   G  L  K  L

aviABC       TT -3´                                                402
```

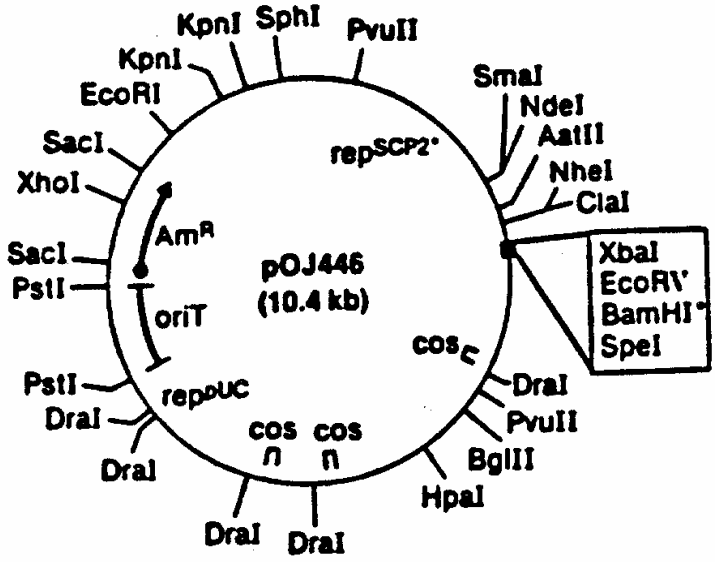
Abb. 7.4: Fragment aus *aviABC*, welches mittels PCR aus genomischer DNA von *S.viridochromogenes* Tü57 amplifiziert wurde (vgl. 3.8.8). Das abgebildete DNA-Fragment wurde mit Digoxygenin markiert und als Sonde zur Identifizierung des ABC-Transportergens auf den Dehydratase-positiven Cosmiden verwendet (vgl. 3.8.7).

7.2 Vektoren

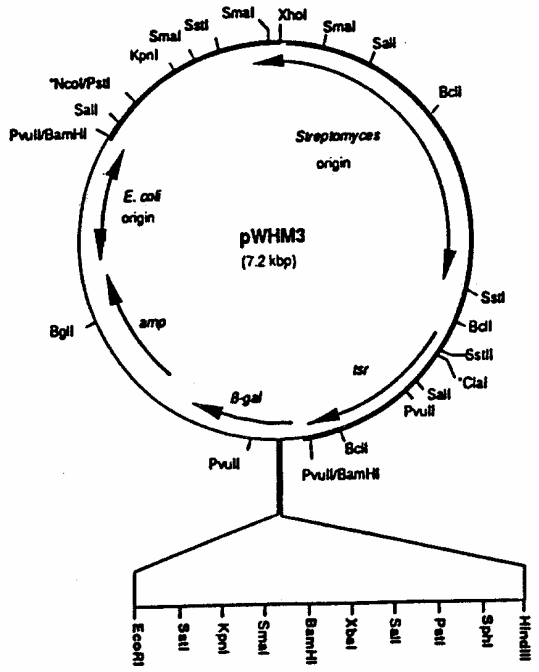
7.2.1 pBluescript-SK$^-$ (Stratagene)



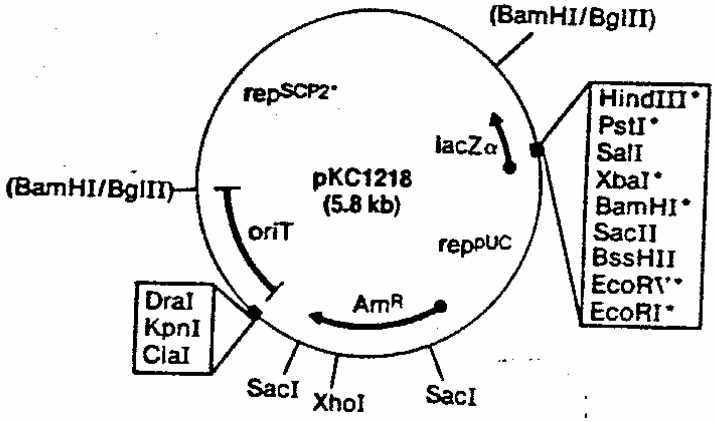
7.2.2 pOJ446 (Biermann et al., 1992)



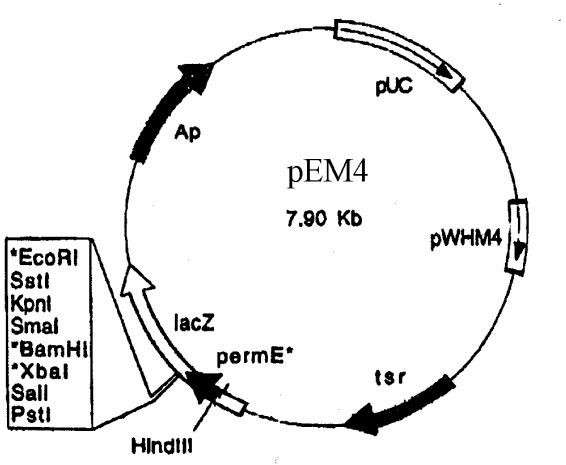
7.2.3 pWHM3 (Vara et al., 1989)



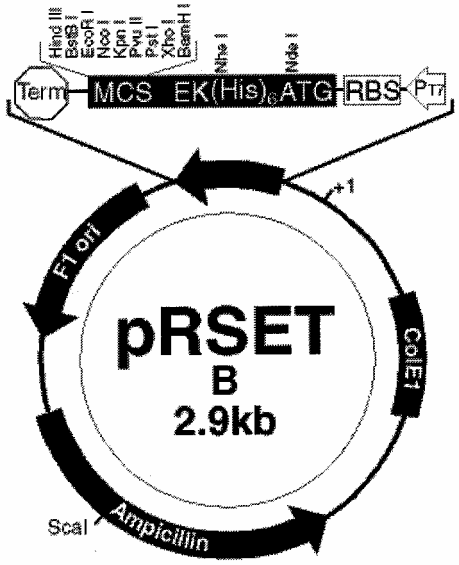
7.2.4 pKC1218 (Bierman et al., 1992)



7.2.5 pWHM4* =pEM4 (Quiros et al., 1998)



7.2.6 pRSETb (Invitrogen)



8 Herzlichen Dank ....

all denen, die mich im Verlauf meiner Doktorarbeit unterstützt haben:

☺ Meinem Doktorvater Prof. Dr. L. Heide danke ich sehr für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie durchzuführen. Darüber hinaus möchte ich mich für die übertragene Verantwortung beim Gerätekauf und bei der Organisation und Leitung von Lehrveranstaltungen bedanken.

☺ Meinem fachlichen Betreuer PD Dr. A. Bechthold danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die zahlreichen Diskussionen. Seinem Engagement verdanke ich die Einführung in die Welt der Streptomyceten. Danken möchte ich Herrn Dr. Bechthold auch für die Übernahme des Koreferats.

☺ Bei Sigrid Stockert möchte ich mich für die gewissenhafte und engagierte Mitarbeit am Avilamycin-Projekt bedanken. Meinen Labor- und Arbeitskollegen Agnes, Anne, Axel, Bettina, Dirk, Emmanuel, Felix, Gabriele, Lucy, Marion, Mark, Moni, Robert, Silvie, Shuming, Susanne, Susanne und Zhaoxin danke ich für die angenehme Atmosphäre und die aufmunternden Worte im Teeraum.

☺ Mein besonderer Dank gilt Frau Lörcher, die zu jeder Zeit mit Rat und Hilfe bei allen kleineren und größeren Kataströphchen zur Seite stand.

☺ Dank auch an alle aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. W. Wohlleben, die mit Tips, Restriktionsenzymen und Diskussionen hilfreich zur Seite standen. Prof. Dr. H. Zähner möchte ich herzlich für die Überlassung des Stammes *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 danken, sowie für zahlreiche Hintergrundinformationen zur Antibiotikaforschung.

☺ Prof. Dr. J. Salas von der Universidad de Oviedo danke ich für die unkomplizierte Art, die Klonierung des ABC-Transporters in seinen Labors in Spanien durchzuführen. Allen spanischen Kollegen, besonders Gloria, Felipe und Laura danke ich für ihre spontane Gastfreundschaft.

☺ PD Dr. A. Kirschning von der Technischen Universität Clausthal danke ich für die Erstellung der Spektren zur Strukturaufklärung der Orsellinsäure.

☺ Allen Mitgliedern im EU-Projekt "Novel Antitumor Drugs" danke ich für die interessanten Gespräche während und am Rande der Projekttreffen in Finnland, Spanien und Deutschland.

☺ Dr. H. Poth und Frau Gappisch von der Biotechnologie-Agentur Baden-Württemberg (BTA) und Dr. T. Reiß, Fraunhofer Institut für Systemtechnik und Innovationsforschung (ISI) danke ich für das mir entgegengebrachte Verständnis bezüglich meiner Doppelbelastung, gleichzeitig eine Doktorarbeit fertigzustellen und an einer neuen Arbeitsstelle tätig zu werden.

☺ ganz besonders danke ich jedoch meinen Eltern, Großeltern und Bernhard für ihre materielle und moralische Unterstützung während der vergangenen Jahre!

Ich danke meinen akademischen Lehrern in:

Stuttgart:

Frau Prof. Diekert, Prof. Knackmus, Prof. Kull, Prof. Mattes, Prof. Mundry,

Prof. Pfitzenmeier, Prof. Reuß, Prof. Scheurich, Prof. Schmidt-Kastner, Prof. Wolf

Swansea:

Dr. Lovitt, Dr. Jones

Tübingen:

Prof. Wohlleben, Prof. Zähner

9 Lebenslauf

Name: Sibylle Gaisser
Anschrift: Wangener Weg 7, 73760 Ostfildern
Geburtsdatum: 03. 11. 1968
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1975 - 1979	Grundschule in Stuttgart und Ostfildern
1979 - 1988	Otto-Hahn-Gymnasium in Ostfildern, Abitur: Mai 1988

Hochschulausbildung:

10/1988 - 4/1994	Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart und Universität Freiburg Hauptfächer: Industrielle Genetik, Bioverfahrenstechnik Nebenfächer: Technische Biochemie, Molekularbiologie, Biochemie Diplomarbeit: "Enzymatische Regulation der Shikonin-Biosynthese in Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon"* bei Prof. Dr. L. Heide an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg.
10/1991 - 08/1992	Einjähriger Forschungs- und Studienaufenthalt am University College of Swansea, Großbritannien mit folgenden Schwerpunkten 1. Grundlagen der Betriebswirtschaftslehre 2. Forschungsprojekt: Bildung von Geschmacksstoffen während des Brauvorgangs mit einer untergärigen Hefe 3. Design-Projekt: Produktion von Subtilisin als Zusatz für Waschmittel durch Fermentation und Downstream Processing mit *Bacillus licheniformis*
07/1994 - 09/1994	Forschungs- und Studienaufenthalt in Japan bei Mitsui Sekka, Iwakuni.
10/1994 - 08/1998	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. L. Heide und PD Dr. A. Bechthold.

Preise und Auszeichnungen:

1982 - 1987	Fünfmalige Teilnahme am Wettbewerb "Jugend forscht" mit zahlreichen Auszeichnungen auf Landesebene. 1. Bundessieger mit dem Thema "Entwicklung von Modelltests zur Bewertung von Hautschutzpräparaten" im Jahr 1987
1988 - 1994	Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes