1. Einleitung *1*

1.1 Relevanz von Zuckern in biologischen Systemen **1**

1.2 Glycosidierte Naturstoffe **1**
1.2.1 Macrolide 1
1.2.2 Anthracycline 2
1.2.3 Polyene 2
1.2.4 Angucycline 4

1.3 Biosynthese deoxygenierter Zucker **9**

1.4 Glycosyltransferasen **9**

1.5 Streptomyceten als Naturstoffproduzenten **11**

1.6 Kombinatorische Biosynthese **11**

1.7 Glycorandomisierung **12**

1.8 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit **13**

2. Material und Methoden *14*

2.1 Puffer/Lösungen **14**
2.1.1 Puffer/Lösungen allgemein 14
2.1.2 Elektrophorese 15
2.1.3 Puffer zur Transformation von Streptomyceten 17
2.1.4 Western Blotting 17

2.2 Nährmedien **18**

2.3 Antibiotika **20**

2.4 Vektoren und Plasmide **21**
2.4.1 Vektoren 21
2.4.2 Plasmide 21

2.5 Bakterienstämme und Kultivierung **22**
2.5.1 Kultivierung von *E.coli* 22
2.5.2 Kultivierung von *Streptomyces fradiae* Tü2717 22

2.6 DNA-Isolation, -Bearbeitung und -Charakterisierung **23**
2.6.1 Plasmidisolation aus *E. coli* 23
2.6.2 Plasmidisolation aus *Streptomyces* 23
2.6.3 DNA-Fällung 24
2.6.4 Enzyme 24
2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese 24
2.6.6 DNA-Sequenzierung/rechnergestützte Sequenzauswertung 24

2.7 Herstellung/Expression hybrider Glycosyltransferase-Gene **25**

2.8 Herstellung von Genintegrations- und Geninaktivierungskonstrukten **27**
2.8.1 Herstellung des *S.fradiae*-Stammes XTC durch Genintegration 27
2.8.2 Herstellung der Geninaktivierungskonstrukte für *urdR* und *urdZ3* 27
2.8.3 Genexpressionskonstrukte zur Komplementierung der Mutanten *S.fradiae* Z3-148 und RN-435 28

2.9 Transformation **28**
2.9.1 Transformation von *E.coli* 28
2.9.2 Transformation von *Streptomyces fradiae* Tü2717 28

2.10 PCR **29**
2.10.1 Punktmutagenese in Glycosyltransferase-Genen 30
2.10.2 Genexpressionskonstrukt für *urdM* 32
2.10.3 Konstrukte für *urdGT1b* – Expression in *E.coli* 32
2.10.4 Konstrukte für *urdGT1b* – Expression in *S. fradiae* XTC 33
2.10.5 Konstrukte für *urdR* – Expression in *E.coli* 33
2.10.6 Nachweis Geninaktivierung durch PCR 34

2.10.7 Primer 35

2.11 Proteinexpression/-reinigung/-analyse 35

2.12 Analyse der Naturstoffproduktion 38
2.12.1 Isolation der Sekundärstoffe aus *Streptomyces fradiae* 38
2.12.2 Reinigung neuer Urdamycine 38
2.12.3 Dünnschichtchromatographie 39
2.12.4 Analytische Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie 39
2.12.5 Präparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie 40
2.12.6 Massenspektroskopie 41
2.12.7 Hydrolyse 42
2.12.8 Kernresonanzspektroskopie 42

2.13 Chemikalienliste 43

3. Ergebnisse 45

3.1 UrdR und UrdZ3 – Zwei Ketoreduktasen in der Urdamycin-Biosynthese 45
3.1.1 Hintergrund 45
3.1.2 Inaktivierung von *urdZ3* führt zur Produktion von Aquayamycin 46
3.1.3 Inaktivierung von *urdR* führt zur Produktion von 14 neuen Urdamycinen 48
3.1.4 Analyse neuer Urdamycine aus *S.fradiae* RN-435 51

3.2 UrdGT1b/UrdGT1c: Die Suche nach dem Spezifitätsschalter 55
3.2.1 UrdGT1b und UrdGT1c 55
3.2.2 Sequenzanalyse und Sekundärstruktur-Voraussage für UrdGT1b/1c 58
3.2.3 Herstellung des *S.fradiae*-Stammes XTC 60
3.2.4 Hybride Glycosyltransferasen: Wo ist der Schalter? 61
3.2.5 Ortsspezifisch veränderte Glycosyltransferasen: Wie groß ist der Schalter? 66
3.2.6 GT-Bibliothek: Der Schalter wird betätigt! 69
3.2.7 Analyse neuer Urdamycine 74

3.3 Proteinexpression und -reinigung 77
3.3.1 Überexpression von *urdM* 77
3.3.2 Überexpression von *urdR* 79
3.3.3 Überexpression von *urdGT1b* 81

4. Diskussion 83

4.1 Funktionsaufklärung UrdR und UrdZ3 83
4.1.1 Allgemeine Strategie 83
4.1.2 Inaktivierung *urdZ3* 83
4.1.3 Inaktivierung *urdR* 84

4.2 Substratspezifität bestimmender Bereich in UrdGT1b/UrdGT1c 86
4.2.1 Allgemeine Strategie 86
4.2.2 Urdamycine N und O 87
4.2.3 Hybride Glycosyltransferasen 87
4.2.4 GT-Bibliothek 88

4.3 Proteinexpression und-reinigung 89
4.3.1 UrdM 89
4.3.2 UrdR 89
4.3.3 UrdGT1b 90

5. Kooperationen 92

5.1 Klonierung und Expression des Oxygenase-Gens *jadF* 92

5.2 Glycosidierungsreaktionen bei Granaticin B und Actinorhodin 93

6. Anhang 96

6.1 NMR-Tabellen 96

6.2 Plasmidkarten 103

6.3. HPLC-Daten zu hybriden GTs und zur GT-Bibliothek _____ 108

6.4 Abkürzungen _____ 112

7. Literatur _____ 114

Weitgehende Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen

Faust, B., Hoffmeister, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Haag, S., Schneider, P., Decker, H., Künzel, E., Rohr, J., Bechthold, A. (2000). Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tu2717. Microbiology 146, 147-153

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

Hoffmeister, D., Ichinose, K., Domann, S., Faust, B., Trefzer, A., Dräger, G., Kirschning, A., Fischer, C., Künzel, E., Bearden, D.W., Rohr, J., Bechthold, A. (2000). The NDP-sugar co-substrate concentration and the enzyme expression level influence the substrate specificity of glycosyltransferases: cloning and characterization of deoxysugar biosynthetic genes of the urdamycin biosynthetic gene cluster. Chem. Biol. 7, 821-831

Hoffmeister, D., Ichinose, K., Bechthold, A. (2001). Two sequence elements of glycosyltransferases involved in urdamycin biosynthesis are responsible for substrate specificity and enzymatic activity. Chem. Biol. 8, 557-567

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

Hoffmeister, D., Wilkinson, B., Foster, G., Sidebottom, P.J., Ichinose, K., Bechthold, A. (2002). Engineered urdamycin glycosyltransferases are broadened and altered in substrate specificity. Chem. Biol. 9 (in Druck)

Publikation in Vorbereitung

Hoffmeister, D., Dräger, G, Marmé, D., Ichinose, K., Rohr, J., Bechthold, A. (2002). Urdamycins R-T, novel anticancer antibiotics from *Streptomyces fradiae* RN-435.

Übersichtsartikel

Bechthold, A., Domann, S., Faust, B., Hoffmeister, D., Stockert, S., Trefzer, A., Weitnauer, G., Westrich, L. (1999). Glycosidierte Naturstoffe – Perspektiven für die kombinatorische Biosynthese. Chemotherapie Journal 8, 130-135.

Hoffmeister, D., Bechthold, A. (1999). Halten wir Schritt mit den Mikroben? – Die Suche nach neuen Antibiotika. Pharmazeutische Zeitschrift Prisma 6, 185-194

Übersichtsartikel in Vorbereitung

Hoffmeister, D., Bechthold, A., Wohlleben, W. (2002). Herstellung neuer Naturstoffe durch Kombinatorische Biosynthese. BIOspektrum 8.

Vorträge

Charakterisierung eines Glycosyltransferase-Gens der Urdamycin-Biosynthese. Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Freiburg, März 1999

Identifizierung von Spezifität vermittelnden Bereichen in Glycosyltransferasen von *Streptomyces fradiae* Tü2717. VAAM-Workshop: Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten, Bonn, September 2000

Vorträge im Rahmen von EU-Projekttreffen „Engineering biosynthetic pathways to generate novel antitumor drugs“ und „Glycosylation Engineering for Novel Antibiotics“ waren:

- Deoxysugar biosynthesis in *Streptomyces fradiae* Tü2717. Tübingen, März 1999
- Identification of urdamycin glycosyltransferase sequence elements responsible for specificity. Wuppertal, Juli 2000
- Generation of glycosyltransferases altered and broadened in substrate specificity. Harpenden, UK, März 2001
- Overexpression and purification of urdamycin glycosyltransferase UrdGT1b. Dublin, Irland, November 2001

Poster

Hoffmeister, D., Wilkinson, B., Ichinose, K., Bechthold, A.: Engineering urdamycin glycosyltransferases to alter and relax their specificities. 12th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Vancouver, Canada, August 2001.

Poster im Rahmen von Kooperationen

Rix, U., Hoffmeister, D., Bechthold, A., Rohr, J.: Substrate Specificity Investigations on the JadF Oxygenase. 221st National Meeting of the American Chemical Society, San Diego, CA, USA, April 2001.

Rix, U., Hoffmeister, D., Bechthold, A., Rohr, J.: Substrate Specificity Investigations on the JadF Oxygenase. 6th US-Japan Seminar on Biosynthesis of Natural Products. Girdwood, AK, USA, Juni 2001.

Rix, U., Hoffmeister, D., Bechthold, A., Rohr, J.: Cloning, Expression, Purification and Characterization of the Oxygenase JadF. International Interdisciplinary Conference on Polyketides (Polyketides III). Chemistry, Biochemistry and Molecular Genetics. Bristol, UK, September 2001.

Publikation der DNA-Sequenzen

Die DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit erwähnten Urdamycin-Biosynthesegene sind in der GenBank hinterlegt und unter den Registrierungsnummern AF164960, AF164961 und AF269227 auf dem Server des National Center for Biological Information (NCBI) in Bethesda, MD, USA via Internet (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) zugänglich.

Zusammenfassung

Urdamycine sind Glycosid-Antibiotika. Sie werden von *Streptomyces fradiae* Tü2717 gebildet und besitzen ein angucyclisches Polyketid als Grundgerüst, das eine C-glycosidisch verknüpfte Trisaccharidkette D-Olivose-L-Rhodinose-D-Olivose besitzt, sowie einen über eine tertiäre Hydroxylgruppe O-glycosidisch gebundenen Einzelzucker L-Rhodinose. Prinzipiell läßt sich die Biosynthese solcher Verbindungen in die Phasen Polyketidsynthese einerseits und Polyketid-Modifizierung andererseits unterscheiden, dies sind z.B. Glycosidierungen. Um diese zu erforschen, auch im Hinblick auf deren gentechnische Beeinflussung, wurden folgende Experimente ausgeführt:

Durch einen Genaustausch wurden die Gene *urdR* und *urdZ3* inaktiviert. Beide sind homolog zu dNDP-Hexose-4-Ketoreduktase-Genen. Durch Inaktivierung von *urdR* (Mutante RN-435) wurden neben unglycosidierten Angucyclinen 14 neuartige, glycosidierte Urdamycine nachgewiesen, sieben davon wurden aufgereinigt. Alle glycosidierten Urdamycine enthielten keine D-Olivose. Mit D-Rhodinose und D-Amicetose wurden Zuckerbestandteile in diesen neuen Urdamycinen gefunden, die aus *Streptomyces fradiae* Tü2717 bislang unbekannt waren. Damit konnte UrdR einerseits als spezifisch zum D-Olivose-Biosyntheseweg zugehörige dNDP-2,6-Dideoxyhexose-4-Ketoreduktase identifiziert werden, andererseits wurde erstmalig dNDP-4-Keto-2,6-Dideoxyhexose als letztes gemeinsames Intermediat auf dem Biosyntheseweg zu Rhodinose und Olivose nachgewiesen. Durch das Auftreten von D-Rhodinose und D-Amicetose in den neuen Urdamycinen konnte eine Substrat-Flexibilität der beteiligten Glycosyltransferasen gezeigt werden. Es wurde demonstriert, daß Geninaktivierung im Zusammenspiel mit hinreichend unspezifischen modifizierenden Enzymen eine geeignete Strategie ist, um Naturstoff-Diversität zu erzeugen. Ebenfalls mittels Genaustausch wurde *urdZ3* inaktiviert. Hauptprodukte in der zugehörigen Mutante Z3-148 sind Aquayamycin und Urdamycinon B, es wurden keine Urdamycine mit L-Rhodinose mehr gefunden. UrdZ3 ist damit die der L-Rhodinose-Biosynthese zugehörige dNDP-2,6-Dideoxyhexose-4-Ketoreduktase.

UrdGT1b und UrdGT1c sind zwei 91% identische Glycosyltransferasen, dennoch transferieren diese Enzyme unterschiedliche Zucker auf unterschiedliche Zielsubstrate. Erstmalig wurde mit dieser Arbeit der Enyzmabschnitt beschrieben, der die Substratspezifitäten von Glycosyltransferasen (GTs) diktiert. Durch die Herstellung und Expression von hybriden GTs konnten 10 Aminosäurereste als potentiell relevant für die Spezifität ermittelt werden. Daraufhin wurde eine GT-Genbibliothek mit 2048 Mitgliedern hergestellt, in deren Genprodukten diese 10 Aminosäurepositionen zufällig und unabhängig voneinander mit der positionsäquivalenten Aminosäure aus UrdGT1b oder UrdGT1c besetzt wurden. 600 Mitglieder dieser Bibliothek wurden *in vivo* auf ihre Enzymspezifität getestet. Es wurden GTs gefunden, die entweder wie UrdGT1b oder UrdGT1c spezifisch waren, oder eine neue Spezifität aufwiesen. Außerdem wurden Enzyme gefunden, die alle möglichen Kombinationen dieser drei Spezifitäten vereinen. Die neue Aktivität führt zur Bildung von Urdamycin P, einem neuen Urdamycin mit einem ungewöhnlich verzweigten Trisaccharid. Überexpression von UrdGT1c oder UrdGT1c-artigen Hybriden in *S.fradiae* AX führte zur Bildung der neuen Urdamycine N und 12b-Derhodinosyl-Urdamycin O.

Für weitergehende Untersuchungen *in vitro* und gegebenenfalls Kristallisation wurden UrdGT1b und UrdR als 6xHistidin-Fusionsproteine löslich exprimiert und aufgereinigt. Für erstere konnte im Rahmen dieser Arbeit die Funktionalität nachgewiesen werden.

1. Einleitung

1.1 Relevanz von Zuckern in biologischen Systemen

Mit dem Begriff Zucker werden üblicherweise zunächst die Stichworte Nahrung und Energiequelle assoziiert – zurecht, sind doch Glycolyse der α-D-Glucose und nachfolgende Oxidation durch die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette die wichtigste Energiequelle einer Zelle. Speicherstoffe, gleich ob pflanzliche Stärke oder das Glycogen von Pilzen und Tieren, sind ebenfalls Zuckerhomopolymere, die bei Bedarf zum verbrennbaren Monomer, eben der α-D-Glucose bzw. ihrem 1-Phosphat abgebaut werden (Darnell *et al.*, 1990). Weiterhin bekannt ist die Rolle von Zuckerpolymeren zur zellulären Strukturgebung. Bakterien besitzen als Zellwandmaterial das Murein, ein peptidisch quervernetztes Heteropolymer aus alternierend eingebautem N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, außerdem Lipopolysaccharide als Bestandteil der äußeren Zellmembran bei gramnegativen Bakterien (Schlegel, 1992). In Pilzzellwänden findet sich das Chitin, das Homopolymer des N-Acetylglucosamin (Müller und Löffler, 1992). Pflanzen haben, dem evolutionären Druck des Stickstoffmangels folgend, dieses Atom nicht für ihr strukturgebendes Material benutzt und besitzen stattdessen β-D-Glucose, polymerisiert zur Cellulose, sowie diverse andere Zucker im Pektin (Sitte *et al.*, 1991).
Für viele andere zelluläre Funktionen sind Zucker ebenfalls essentiell, vornan steht die DNA und die RNA mit ihrem Bestandteil 2-Deoxyribose bzw. Ribose. Viele sezernierte Proteine sind glycosidiert, z.B. Serumproteine. Die Zuckeranteile sind nicht relevant für eine eventuelle katalytische Aktivität, sondern vielmehr für Faltung, Tertiärstruktur, Löslichkeit oder Lokalisation. Änderungen im Glycosidierungsmuster einer Zelle oder eines Gewebes können frühe Indikatoren für bevorstehende krankhafte Veränderungen, z.B. Krebs, sein (Dwek *et al.*, 2002). Zucker spielen für die Antigenität eine große Rolle, so basiert das menschliche Blutgruppensystem ABO auf strukturell ähnlichen, aber nicht identischen Oligosacchariden auf der Erythrocytenoberfläche. Diese geringen strukturellen Abweichungen reichen für eine Immunantwort aus, z.B. infolge einer fehlerhaften Bluttransfusion. Zucker vermitteln Erkennungsreaktionen in biologischen Systemen, so besitzen Endothelzellen Selectine, deren Liganden Saccharidstrukturen sind, z.B. um durch den Blutstrom angelieferte Granulocyten in verletztem Gewebe zu akkumulieren. Besondere Aufmerksamkeit hat das Tetrasaccharid Sialyl Lewis X gefunden, das bei verschiedenen Tumoren in abnormer Häufigkeit auftritt, an spezielle Selectine bindet und so offenbar an der Metastasenbildung beteiligt ist (Hanisch *et al.*, 1992). Die Elimination einer Vielzahl von Stoffen aus dem Körper – fettlösliche Vitamine, Steroidhormone, Bilirubin, Carcinogene, Arzneistoffe – erfolgt als wasserlösliches Glucuronid, also in glycosidierter Form (Dutton, 1980). Schließlich spielen Zucker im Sekundärmetabolismus von Pflanzen und Bakterien eine große Rolle. Im folgenden einige Beispiele für glycosidierte bakterielle Naturstoffe und die Rolle ihres Zuckeranteils für die Bioaktivität.

1.2 Glycosidierte Naturstoffe

1.2.1 Macrolide

Macrolide sind bezüglich ihres Grundgerüstes Polyketide, ihr bekanntester Vertreter ist das Erythromycin (Abb. 1), es ist ein 14-gliedriges Macrolacton und trägt O-glycosidisch gebunden an Position C-3 eine L-Mycarose und an C-5 ein D-Desosamin (Katz und Donadio, 1995, Salah-Bey et al, 1997). Erythromycin ist ein bewährtes Standardantibiotikum, in der Praxis eingesetzt zur Bekämpfung von grampositiven Infektionserregern (Mutschler, 2001). Des-N-Methyl-Erythromycin sowie die unglycosidierten Erythromycin-Vorstufen 6-Deoxyerythronolid B und Erythronolid B (Abb. 1) zeigen nur geringe bzw. keinerlei antibiotische Aktivität (Flynn *et al.*, 1954, Weymouth-Wilson, 1997). Megalomicin (Abb. 1), ein Erythromycin-Derivat, das zusätzlich

am C-6 O-glycosidisch den Zucker L-Megosamin trägt, besitzt ein dem Erythromycin vergleichbares antibakterielles Spektrum (Weinstein *et al.*, 1969), im Gegensatz zum Erythromycin zusätzlich jedoch ausgeprägte antivirale Aktivität gegen das Herpesvirus sowie antiparasitische Wirkung, z.B. gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (Alarcon, 1984, Volchegursky *et al.*, 2000). Offensichtlich entscheidet lediglich die An-oder Abwesenheit des L-Megosamin am C-6 über das Spektrum der Bioaktivität bzw. die Abwesenheit der Zucker über die Bioaktivität an sich. Es ist sicher, daß die Zucker Voraussetzung für die Bioaktivität sind (Fish und Cundliffe, 1996), dennoch ist der genaue Wirkmechanismus im letzten Detail unbekannt. Gesichert ist aber eine Interaktion der Zucker mit der 23S rRNA im Peptidyltransferase-Zentrum (Schlünzen *et al.*, 2001), vermutlich dissoziiert die Peptidyl-tRNA dadurch während der Elongationsphase vom Ribosom.

1.2.2 Anthracycline

Anthracycline sind tetracyclische, aromatische Polyketide und tragen mindestens eine Zucker (Fujiwara und Hoshino, 1983). Sie besitzen eine ausgeprägte Bioaktivität, einige Vertreter werden als Antitumor-Medikamente klinisch eingesetzt, so z.B. das Daunomycin (Abb. 1) gegen Leukämie sowie das Adriamycin (Abb. 1) zur Bekämpfung diverser solider Tumorarten. Auch hier gilt, daß die unglycosidierte Vorstufe, das ε-Rhodomycinon keine biologische Aktivität zeigt (Olano *et al.*, 1999). Daunomycin und andere Anthracyclin-Antibiotika interkalieren in DNA. Röntgen-Strukturanalysen zeigten, daß sich die Ringe B-D des Daunomycin-Moleküls in die DNA-Sequenz CGTACG zwischen C und G an beiden Seiten des Motivs einlagern und für lokale Entwindungen der DNA sorgen, während der Ring A sowie der Zucker nicht interkalieren (Moore *et al.*, 1989). Der Zucker kommt in der kleinen Furche der DNA zu liegen, dessen Hydroxyl- und Aminogruppen jedoch ragen über die Furche heraus und interagieren vermutlich mit DNA- bzw. RNA-Polymerasen, die dadurch inhibiert werden (Weymouth-Wilson, 1997). Aclacinomycin (Abb. 1) ist mit dem Daunomycin-Aglycon nah verwandt, besitzt jedoch als signifikantesten Unterschied statt eines einzelnen L-Daunosamins als Zucker ein Trisaccharid L-Rhodosamin-2´-Deoxy-L-Fucose-Cinerulose (Yang und Wang, 1994). Aclacinomycin zeigt in der praktischen Anwendung geringere Nebenwirkungen, vor allem hinsichtlich der Kardiotoxizität, als das Daunomycin. Außerdem ist Aclacinomycin zur Behandlung Daunomycin-resistenter Tumore geeignet. Nach Bindung von Aclacinomycin an DNA lagert sich das Trisaccharid in die kleine Furche der DNA ein, die 2´-Deoxy-L-Fucose bewirkt ein Einknicken der Helix in die große Furche (Yang und Wang, 1994). Diese strukturelle Verzerrung trägt zusätzlich zum Tod der behandelten Zellen bei. Daher wird für das Aclacinomycin ein anderer Wirkmechanismus angenommen als für das Daunomycin (Thorson *et al.*, 2001), d.h. wiederum erwächst der Unterschied für die Bioaktivität aus dem Glycosidierungsmuster.

1.2.3 Polyene

Die Klasse der Polyen-Antibiotika entstammt biosynthetisch ebenfalls dem Polyketid-Stoffwechsel und ist strukturell charakterisiert durch ein polyhydroxyliertes Polyen-Chromophor sowie einen O-glycosidisch gebundenen Zucker. Einige Vertreter dieser Substanzklasse sind in der Praxis gängige Antimycotika. Gut untersucht – wenn auch nicht im letzten Detail verstanden - ist der Wirkmechanismus des Amphotericin B (Abb. 1). Wie andere Polyene auch bildet es Aggregate mit Membransterolen, bevorzugt mit dem Ergosterol, dem Membransterol der Pilze. Infolge einer zylindrischen Anordnung der Polyene bilden diese Aggregate Poren in der Membran, die letztlich zum Zelltod führen. Für das Amphotericin B konnte gezeigt werden, daß sein Zucker

D-Mycosamin essentiell für die Wirksamkeit ist, da seine Aminogruppe zusammen mit der Carboxylgruppe des Aglycons als ein polarer Molekülkopf über Wasserstoffbrücken mit der Hydroxylgruppe an Position 3 des Ergosterols interagiert (Hervé *et al.*, 1989, Georgopapadakou, 1998).

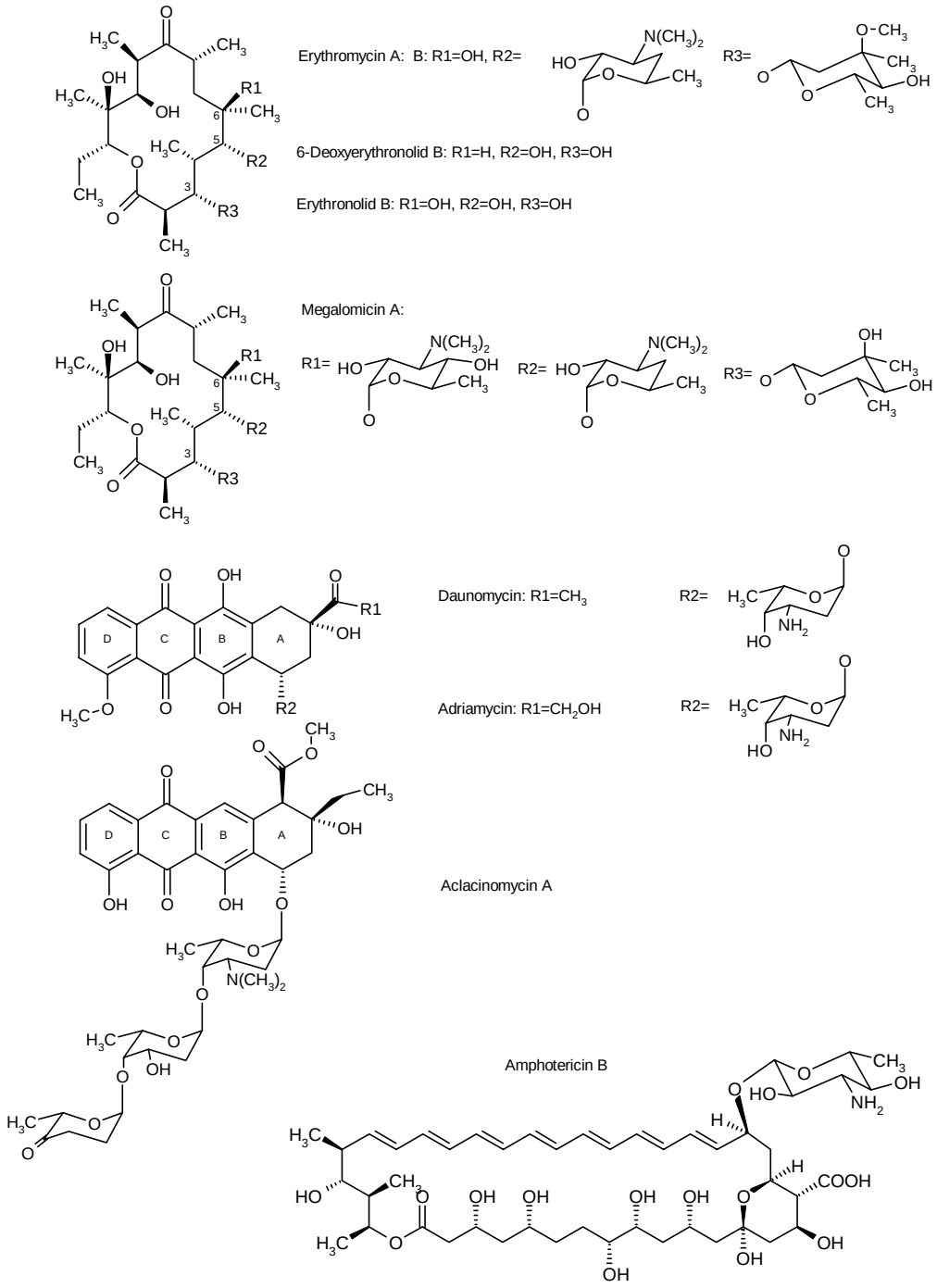


Abb.1: Glycosidierte, bioaktive Polyketide, die dem Sekundärstoffwechsel von Streptomyceten entstammen.

1.2.4 Angucycline

Angucycline sind eine große Klasse meist glycosidierter Naturstoffe und weisen eine bemerkenswerte Bandbreite bezüglich ihrer Bioaktivität auf. Prinzipiell besteht ihr Grundgerüst aus dem namensgebenden angucyclischen Polyketid, also einem Benz[a]anthracen, meist als Benz[a]anthrachinon ausgebildet. Die immense Diversität der Substanzen in der Angucyclin-Familie hält auch ungewöhnlich modifizierte Grundgerüste mit kontrahierten oder erweiteren Ringen, Heteroatomen oder durch Aminosäureanlagerung erweiterte Aglyca bereit. Für die Angucycline sind insgesamt zehn Untergruppen durch die Merkmale klassisches oder modifiziertes Grundgerüst, Anwesenheit angulärer Sauerstoffatome, sowie Anwesenheit C-glycosidisch gebundener Zucker definiert (Rohr und Thiericke, 1992, Krohn und Rohr, 1997). Die ersten in der Literatur beschriebenen Angucycline sind das Tetrangomycin und das Tetrangulol (Kunstmann und Mitscher, 1966), beide unglycosyliert (Abb. 2). Mit dem Aquayamycin (Abb. 2) wurde erstmals ein glycosidiertes Angucyclin beschrieben (Sezaki *et al.*, 1968, Sezaki *et al.*, 1970). Das Aquayamycin ist Intermediat und unter dem formal-chemischen Aspekt das Aglycon vieler glycosidierter Angucycline (Rohr *et al.*, 1993), darunter vieler Urdamycine. Es besitzt an Position C-9 eine C-glycosidisch gebundene D-Olivose, welche durch saure Hydrolyse nicht vom angucyclischen Polyketid, also dem eigentlichen Aglycon im wörtlichen Sinne, entfernt werden kann. Aquayamycin ist ein Inhibitor der Monooxygenasen Dopamin-β-Hydroxylase und Tyrosin-Hydroxylase (Nagatsu *et al.*, 1968, Ayukawa *et al.*, 1968), beides Enzyme, die in die Biosynthese von Noradrenalin aus Tyrosin involviert sind. Eine Inhibition um 50% wurde bereits bei einer Konzentration von 400 nM erzielt. In beiden Fällen spielt für die Inhibition vermutlich eine Komplexbildung mit einem Metallion als Cofaktor (bei der Dopamin-β-Hydroxylase Kupfer, bei der Tyrosin-Hydroxylase Eisen) eine zentrale Rolle. Ein potenter Inhibitor der Collagen-Prolin-Hydroxylase ist das Angucyclin P-1894B (Abb. 2, Ohta und Kamiya, 1981, Ohta *et al.*, 1984). Strukturell ist P-1894B insofern interessant, als in ihm wiederum das Aquayamycin-Grundgerüst auftaucht, jedoch zusätzlich fünf weitere Zucker: An C-9 des Angucyclins entspringt die Seitenkette D-Olivose-L-Rhodinose-L-Aculose, am C-3 trägt die tertiäre Alkoholgruppe ein Disaccharid L-Rhodinose-L-Aculose. Die tertiären Hydroxylgruppen an C-4a und C-12b sind nicht glycosidiert. Die Collagen-Prolin-Hydroxylase ist ein Schlüsselenzym in der Collagen-Biosynthese. Ihr Vorkommen und ihre Aktivität ist in Geweben mit pathologischen Formen der Fibrose erhöht. Eine Inhibition dieses Enzyms um 50% wurde bei einer Konzentration von 2.2 µM erzielt (Okazaki *et al.*, 1981). Die Inhibition ist praktisch irreversibel, d.h. im Überschuß zugegebene Cofaktoren Eisen und Ascorbinsäure haben keinen Effekt auf die Inhibition. Der Wirkmechanismus ist, im Gegensatz zur Dopamin-β-Hydroxylase und Tyrosin-Hydroxylase, hier offenbar keine Komplexbildung und keine antioxidative Wirkung gegenüber Ascorbinsäure. Sakyomicine sind strukturell relativ einfach aufgebaute Angucycline, das Grundgerüst der Hauptprodukte Sakyomicin A (Abb. 2) und C selbst trägt, über die Hydroxylgruppe an C-12b O-glycosidisch verknüpft, nur eine D-Rhodinose (Nagasawa *et al.*, 1984). Interessant ist die Bioaktivität dieser Angucycline. Neben einer antibiotischen Aktivität gegen grampositive Bakterien besitzen sie auch inhibitorische Eigenschaften gegenüber der Reversen Transkriptase, getestet für die des avianen Myeloblastosis-Virus, außerdem wurde eine Hemmung des HTLV-III gefunden (Tanaka *et al.*, 1986). Die Angucycline der PI-080-Gruppe besitzen wiederum das Aquayamycin-Gerüst und tragen zwei Saccharidseitenketten. Im Falle von PI-080 (Abb. 2) sind dies eine Kette L-Rhodinose-L-Rhodinose-L-Aculose O-glycosidisch an die tertiäre Hydroxylgruppe am C-3 gebunden, sowie D-Olivose-L-Rhodinose-L-Aculose als C-Glycosid am C-9 des Polyketids (Kawashima *et al.*, 1989). Mit einem Molekulargewicht von

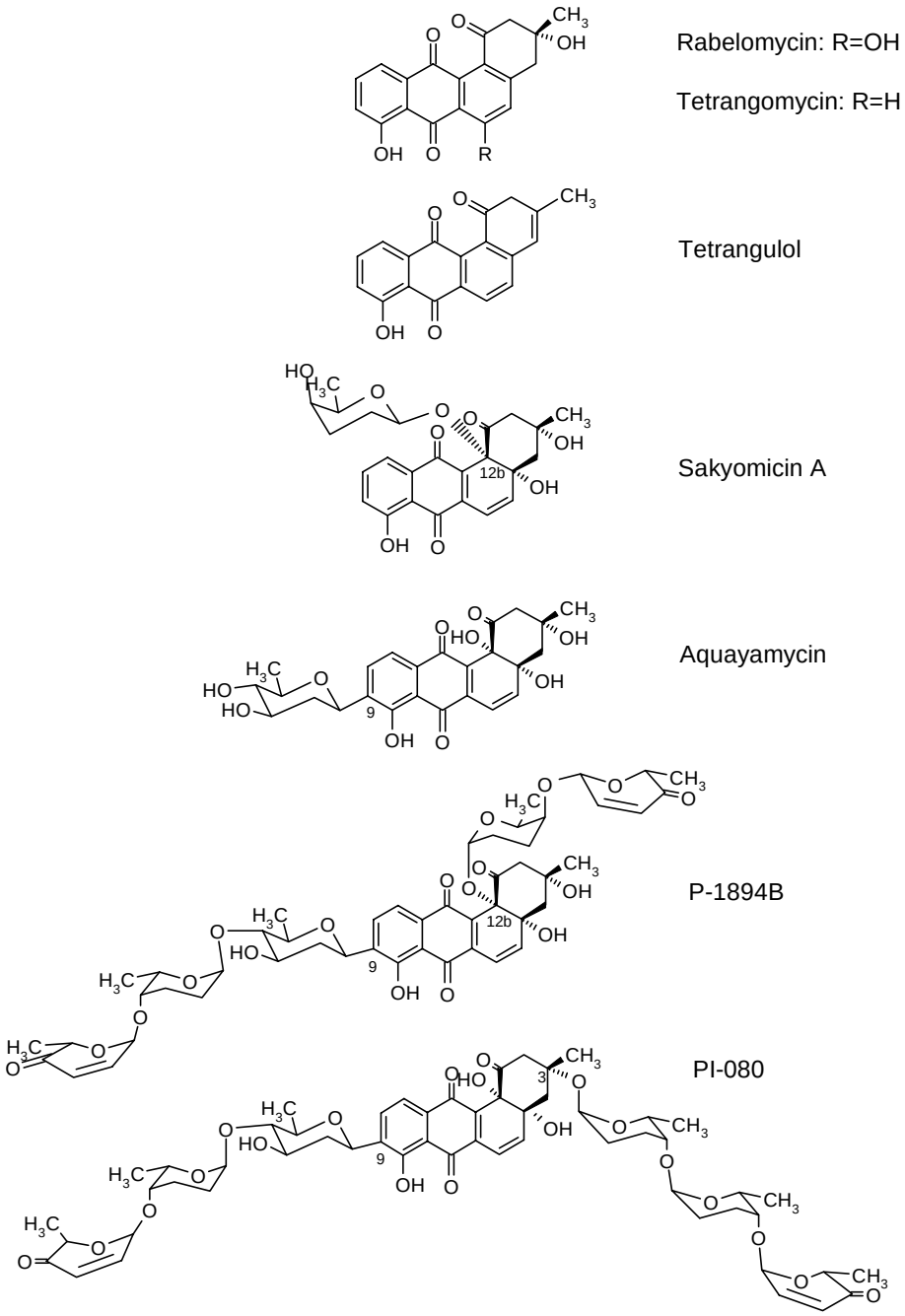


Abb. 2: Chemische Strukturen ausgewählter Vertreter der Angucycline.

> 1000 (PI-080: 1049) gehören PI-080 und seine in den Zuckerketten leicht veränderten Derivate zu den schwersten bislang beschriebenen Angucyclinen. Sie sind potente Inhibitoren der Thrombocyten-Aggregation (5µg/ml bei PI-080, Kawashima *et al.*, 1988, Rohr und Thiericke, 1992).

Eine große Gruppe glycosidierter Angucycline sind die Urdamycine (Abb. 3, Abb. 4). Sie stehen im Zentrum der vorliegenden Arbeit. Der erste Vertreter, Urdamycin A (Abb. 3) wurde 1983 entdeckt, weil der Rohextrakt des Bodenbakteriums *Streptomyces fradiae* (*S. fradiae*) Tü2717 durch intensiv gefärbte Signale in der dünnschichtchromatographischen Untersuchung auffiel. Tests ergaben zunächst keine Hinweise auf einen antimikrobiellen Effekt. Erst als die isolierten und gereinigten Einzelkomponenten untersucht wurden, fiel deren biologische Aktivität auf (Rohr, 1984). Viele Urdamycine enthalten wiederum das Aquayamycin als Teil ihres Moleküls, sind jedoch typischerweise an zwei Positionen des angucyclischen Grundgerüstes glycosidiert: an C-9

befindet sich C-glycosidisch angeheftet ein Trisaccharid D-Olivose-L-Rhodinose-D-Olivose, an C-12b befindet sich O-glycosidisch gebunden eine einzelne L-Rhodinose (Drautz *et al.*, 1986). Die natürlich vorkommenden Mitglieder der Urdamycin-Familie variieren vor allem in ihrem Aglycon. Die Urdamycine wurden in der chronologischen Abfolge ihrer Entdeckung mit einem Großbuchstaben unterschieden, zunächst waren dies die Urdamycine A bis F (Rohr, 1984). Die Strukturen von Urdamycin C und D wurden erstmals von Rohr *et al.* (1988) publiziert, die Strukturen der Urdamycine G und H von Henkel *et al.* (1989) bzw. von Rohr (1989). Im Wildtyp von *Streptomyces fradiae* Tü2717 kommen die Urdamycine A bis H (Abb. 4) vor. Hauptprodukt ist, je

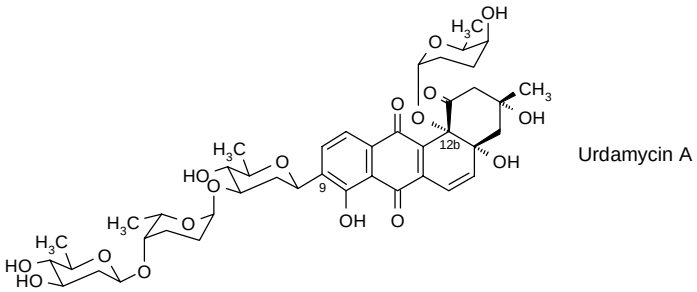


Abb. 3: Chemische Struktur des Urdamycin A.

nach Medium, das im neutralen Medium goldgelbe Urdamycin A (Abb. 3) allein oder zusammen mit dem weinroten Urdamycin C (Rohr, 1984). Die Urdamycine A, C-F und H waren umso bemerkenswerter, als sie - im Gegensatz zu vielen anderen glycosidierten Antibiotika - bezüglich der Zucker identisch waren und sich stets im Polyketid-Kern des Moleküls unterschieden (Rohr *et al.*, 1989). Durch nichtenzymatische Addition von Tyrosin an das angucyclische Grundgerüst entsteht das tiefrote, hexacyclische Urdamycin C-Typ-Aglycon, durch Addition von Tryptophan die blauvioletten, heptacyclischen D-Typ Urdamycine. Weitere Variationen entstehen durch Ausbildung eines Thioethers (E-Typ Urdamycine) oder Hydroxylierung (F-Typ Urdamycine) an Position 5. Eine nichtenzymatische Ringkontraktion im C-Typ-Aglycon, wenn sein (4-Hydroxyphenyl)-δ-lacton-System zu einem (4-Hydroxyphenyl)-furan rearrangiert wird, führt zum H-Typ-Aglycon (Rohr, 1990). Eine Ausnahme bei den natürlich vorkommenden Urdamycinen bildeten lediglich das Urdamycin B, dem die Hydroxylgruppen an Position C-4a und C-12b fehlen (dadurch bedingt das Fehlen der L-Rhodinose am C-Atom 12b und die Abweichung von typischen Glycosidierungsmuster), und das Urdamycin G, das eine verkürzte Zuckerseitenkette am C-Atom 9 besitzt und der direkte Vorläufer des Urdamycin A ist. Die biologische Aktivität der Urdamycine A-E erstreckt sich einerseits auf die antibakterielle Wirksamkeit gegen grampositive Eubakterien, andererseits auf cytostatische Eigenschaften: Die Urdamycine A und E erwiesen sich als aktivste Substanzen beim Assay mit L 1210 Leukämie-Zellen. Der IC_{50} -Wert betrug 2,84 bzw. 1,9 µmol/l. Zum Vergleich: Adriamycin, ein Daunomycin-Derivat und in der Humantherapie verbreitetes Cytostatikum besitzt in diesem Test einen IC_{50} -Wert von 38 nmol/l. (Drautz *et al.*, 1986). Weiterhin wurde eine Inhibition der Thrombocyten-Aggregation durch Kerriamycin B (identisch mit Urdamycin A) beschrieben (Omura *et al.*, 1988). Inwieweit die Zucker eine Rolle für die genannten biologischen Wirksamkeiten der Urdamycine spielen, ist bislang unbekannt.

Ein Einsatz der Urdamycine als Therapeutikum in der Human- oder Veterinärmedizin ist nicht vorgesehen, sie stellen aber für das Verständnis von Glycosidierungsreaktionen an pharmakologisch aktiven Naturstoffen ein interessantes Modell in der mikrobiologischen Grundlagenforschung dar. Durch gentechnologische Bearbeitung

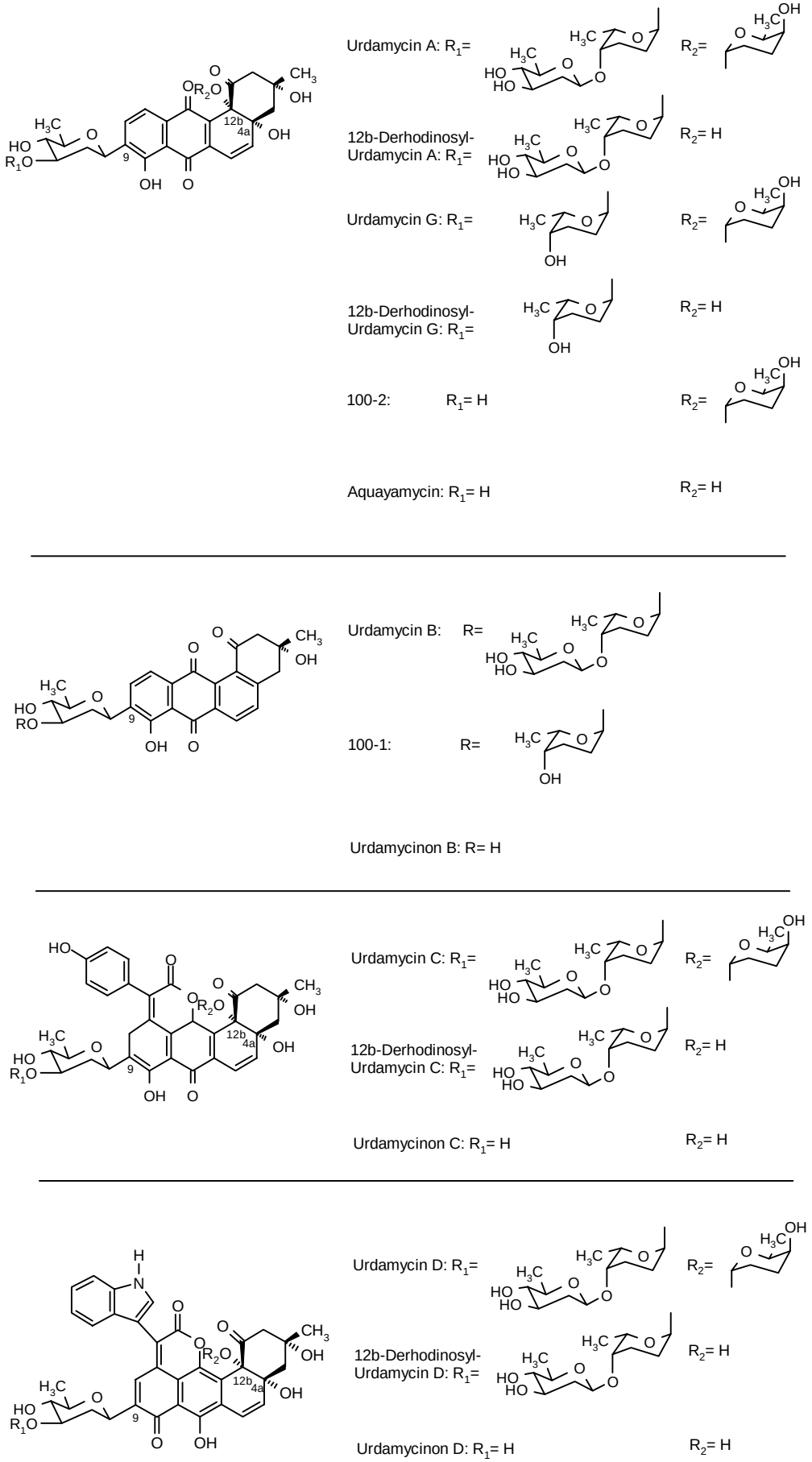


Abb. 4: Strukturformeln ausgewählter Urdamycine.

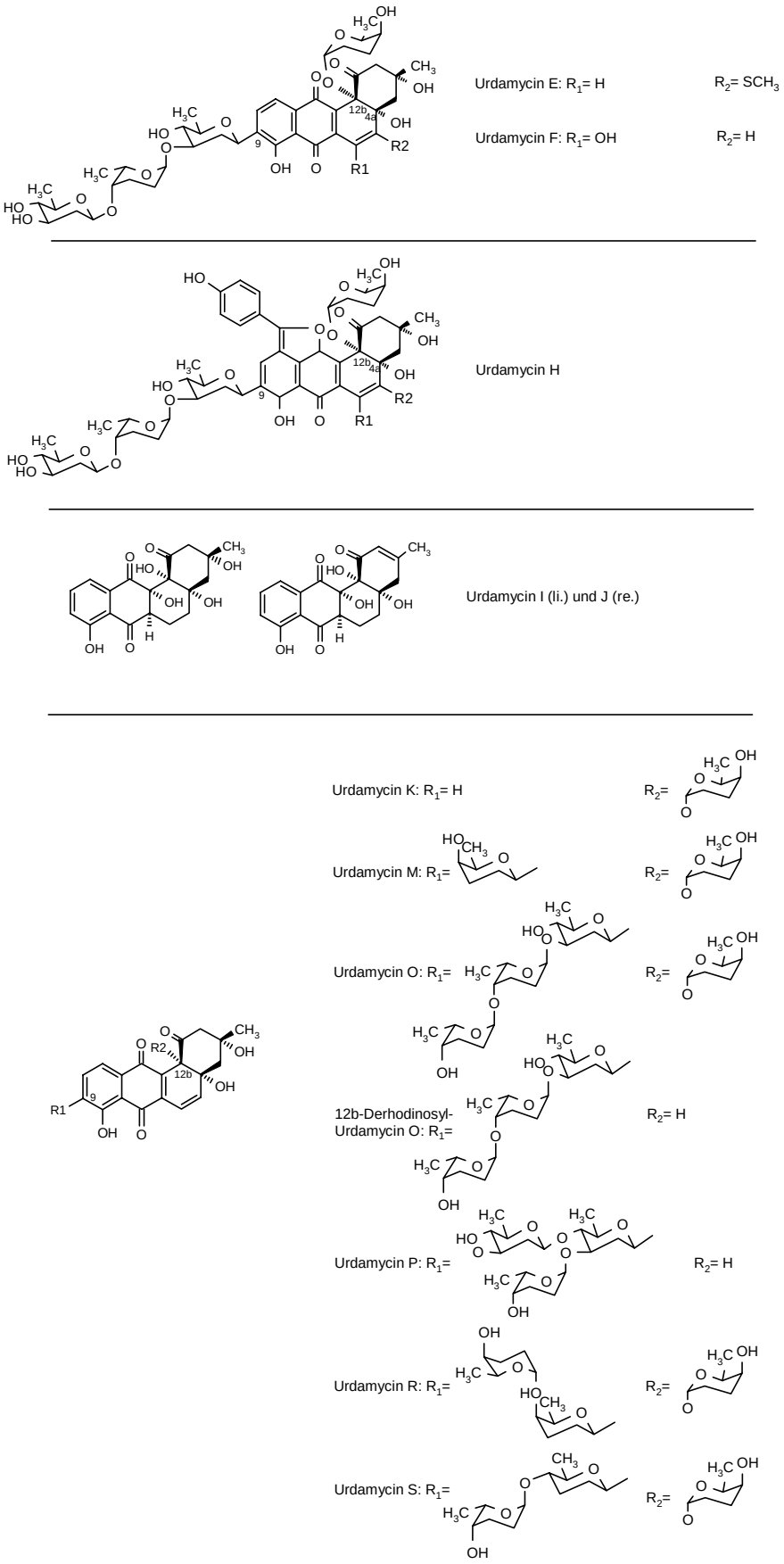


Abb. 4: Strukturformeln ausgewählter Urdamycine (Fortsetzung I). Die Urdamycine M, P, R und S, sowie 12b. derhodinosyl-Urdamycin O wurden im Rahmen dieser Arbeit erzeugt.

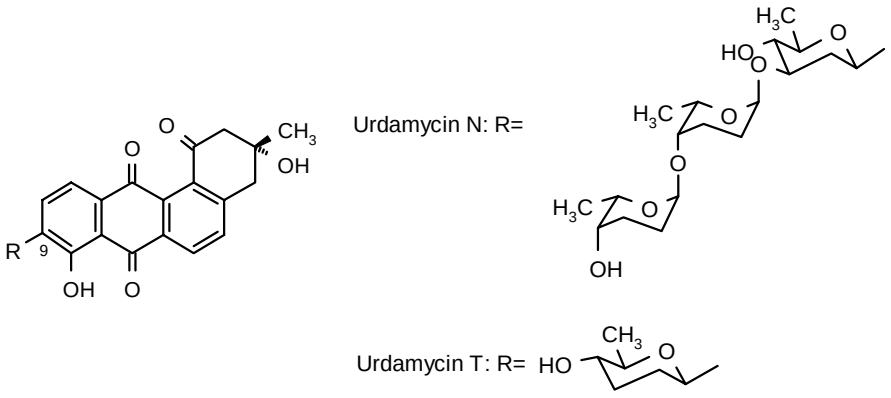


Abb. 4: Strukturformeln ausgewählter Urdamycine (Fortsetzung II).

des Produzentenstammes konnten Urdamycin-Derivate erzeugt werden, die sich im Glycosidierungsmuster unterschieden, z.B. die nichtglycosidierten Urdamycine I und J, sowie Urdamycin K (Abb. 4), welches nur eine L-Rhodinose an Position C-12b trägt (Künzel *et al.*, 1999, Faust *et al.*, 2000) oder aber die 12b-Derhodinosyl-Derivate der Urdamycine A, C, D, F und G (Hoffmeister, 1998, Trefzer *et al.*, 2000). Weitere, bezüglich der Glycosidierung neue Urdamycine sind die im Laufe dieser Arbeit entstandenen Urdamycine M-P (Hoffmeister *et al.*, 2000, Hoffmeister *et al.*, 2002) sowie Urdamycine R-T (Abb. 4).

1.3 Biosynthese deoxygenierter Zucker

Die vorgestellten Glycoside aus Streptomyceten besitzen modifizierte Hexosen, die, wie gezeigt, oftmals für die Bioaktivität der gesamten Verbindung von entscheidender Bedeutung sind. Die Verknüpfung von Primärmetabolismus hin zur Biosynthese dieser modifizierten, zum Einbau in Sekundärstoffe bestimmten Zucker stellt das Glucose-1-Phosphat dar (Kirschning *et al.*, 1997). Es ist das Ausgangsmolekül für die Biosynthese einer großen Diversität von deoxygenierten und oft zusätzlich funktionalisierten Zuckern, z.B. durch Amino-, Nitro-, Keto- oder Methylgruppen. Die Forschung an den Streptomyceten-Metaboliten sowie bakteriellen Lipopolysacchariden – ebenfalls mit Deoxyzuckern ausgestattet – ergab ein einheitliches Bild der frühen Biosyntheseschritte (Trefzer *et al.*, 1999), diese umfassen die dNDP-Glucose-Synthese aus einem Nucleotidtriphosphat und Glucose-1-Phosphat, die C-6-Deoxygenierung durch eine 4,6-Dehydratation sowie häufig eine C-2-Deoxygenierung, um zur dNDP-4-Keto-2,6-Dideoxy-Hexose zu kommen. Späte, spezifische Modifikationsschritte sind z.B. Epimerisierungen, 3-Deoxygenierungen durch eine 2,3-Dehydratation, Aminierungen und sehr häufig eine Reduktion der beim ersten Dehydratationsschritt eingeführten Ketofunktion am Atom C-4. Dieser letztgenannte späte Biosyntheseschritt wurde für die D-Olivose- und L-Rhodinose-Biosynthese im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.4 Glycosyltransferasen

So unterschiedlich die in den vorangegangen Abschnitten vorgestellten glycosidierten Verbindungen auch sind, ihnen ist doch allen gemeinsam, daß während ihrer Biosynthese enzymatisch ein modifizierter Zucker auf sie transferiert wurde. Glycosyltransferasen (GTs; E.C. 2.4.x.y.) übertragen Zucker von einem Donorsubstrat, üblicherweise ein Nucleotidzucker, auf ein Aglycon oder ein anderes Kohlenhydrat als Zielmolekül. Die Substratspezifität der GTs ist dabei der Schlüssel zur strukturellen Diversität der Glycoside (Paulson und Colley,

1989). Manche GTs sind entsprechend ihrer zellulären Funktion substratunspezifisch, z.B. hinsichtlich des Akzeptorsubstrates die im Endoplasmatischen Reticulum menschlichen Lebergewebes lokalisierte UDP-Glucuronosyltransferase UGT2B7, welche eine große Diversität an Steroiden, Retinylacetaten und ungesättigten Fettsäuren glucuronosidiert und somit für deren Elimination aus dem Körper vorbereitet (Radominska-Pandya *et al.*, 1999). Deutlich spezifischer sind die GTs, die in die Biosynthese der erwähnten Glycosid-Antibiotika aus prokaryotischen Produzenten involviert sind, jedoch sind auch bei ihnen graduelle Unterschiede in der Spezifität festzustellen (Méndez und Salas, 2001). Bislang wurde eine große Zahl an GTs aus sowohl pro- als auch eukaryotischen Organismen kloniert und charakterisiert, die Vielzahl reflektiert ihre breite Bedeutung und die Unterschiede in den Substraten. Aus mechanistischer Sicht können GTs in zwei Hauptgruppen differenziert werden, in invertierende und nichtinvertierende GTs, je nach dem, ob beim Ausbilden der glycosidischen Bindung das anomere Zentrum des Zuckers in seiner Konfiguration beibehalten oder invertiert wird. Der Mechanismus invertierender GTs (Abb. 5) folgt einerm S_N2-Mechanismus, also einer nucleophilen Substitutionsreaktion (Quirós *et al.*, 2000, Ünligil und Rini, 2000): Eine Base im katalytischen Zentrum, meist eine Asparaginsäure oder Glutaminsäure, abstrahiert das Proton der Akzeptor-Hydroxylgruppe. Daraufhin greift das entstandene Oxocarbenium-Ion als Nucleophil das anomere Kohlenstoffatom des Zuckers an, und unter Abspaltung des Nucleotiddiphosphates wird die glycosidische Bindung geschlossen.

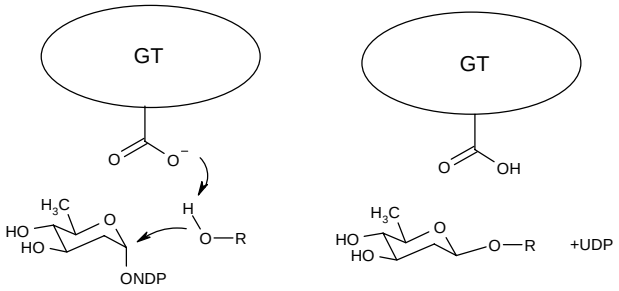


Abb. 5: Schematische Darstellung des Mechanismus einer invertierenden Glycosyltransferase. R-OH symbolisiert das Zucker-Akzeptorsubstrat mit seiner Ziel-Hydroxylgruppe.

Verschiedene GTs sind kristallisiert und ihre Struktur aufgelöst worden, so z.B. SpsA aus *Bacillus subtilis*, eine invertierende GT, die am Aufbau der Sporenhülle beteiligt ist (Charnock und Davies, 1999), die am Mureinaufbau beteiligte MurG aus *Escherichia coli* (Ha *et al.*, 2000), mehrere eukaryotische GTs sowie GtfB aus *Amycolatopsis orientalis*, die für den Glucosetransfer in der Chloroeremomycin-Biosynthese verantwortlich ist (Mulichak *et al.*, 2001). Alle Strukturen bestätigen, daß GTs aus zwei etwa gleich großen Domänen bestehen. So wurde beispielsweise für GtfB in jeder Domäne eine Kernstruktur aus parallelen β-Faltblättern, verbunden durch α-Helices, gefunden, also ein sogenanntes Rossmann-Motiv. Außer einem Linkerpeptid und einer α-Helix am äußersten C-Terminus, welche an die N-terminale Domäne reicht, sind bei GtfB Interaktionen der beiden Domänen untereinander selten. Interessanterweise sind GTs topologisch und strukturell sehr ähnlich, obwohl die Primärsequenz keinerlei Verwandtschaft vermuten läßt: so sind z.B. MurG aus *E.coli* und BGT, eine DNA-modifizierende β-Glucosyltransferase aus dem Phagen T4 (Vrielink *et al.*, 1994, Moréra *et al.*, 1999) topologisch identisch und strukturell sehr ähnlich, obwohl die Sequenzidentität nur 14% beträgt. Auch sind die beiden Domänen einer GT untereinander ähnlich (Mulichak *et al.*, 2001). Auf Sequenzvergleichen basierend wurde die CAZy (Carbohydrate-Active Enzyme) Klassifikation der GTs erstellt (Coutinho *et al.*, 1999), sie umfaßt gegenwärtig 55 GT-Familien. Die in dieser Arbeit beschriebenen GTs UrdGT1b und UrdGT1c gehören, wie alle

anderen GTs aus streptomycetalen Antibiotika-Biosynthesewegen auch, der CAZy-Kategorie I an, die invertierende GTs aus viralen, pro- und eukaryotischen Quellen enthält.

1.5 Streptomyceten als Naturstoffproduzenten

Alle genannten Metaboliten und eine riesige Diversität weiterer bioaktiver Naturstoffe entstammen dem Stoffwechsel von Arten der bereits erwähnten Bakteriengattung *Streptomyces* und nah verwandeter Gattungen. Sie sind die wichtigste Quelle für die Substanzen oder Substanzvorläufer moderner Antibiotika und Cytostatika und bieten ein reiches Reservoir an – hinsichtlich ihrer chemischer Struktur und/oder des Wirkmechanismus - neuartigen Substanzen. Etwa 70% aller bekannten bioaktiven mikrobiellen Stoffwechselprodukte werden von Streptomyceten gebildet (Gräfe, 1992, Kieser *et al.*, 2000). Die Gattung *Streptomyces* gehört zur Ordnung der *Actinomycetales* (Goodfellow *et al.*, 1984). Die Anzahl der Arten ist wegen Synonymien und Schwierigkeiten der Art-Stamm-Abgrenzung in der Literatur uneinheitlich, Williams *et al.* (1989) nennen 142 Arten basierend auf numerischer Taxonomie. Die Zahl von 3000 Stämmen innerhalb der Gattung ist vermutlich zu hoch und Resultat einer übertriebenen Taxonomie infolge patentrechtlicher Überlegungen (Anderson und Wellington, 2001). Streptomyceten sind grampositive, aerobe, terrestrische oder marine Eubakterien, global verbreitet, und besitzen einen morphologisch stark differenzierten Lebenszyklus: Zunächst wächst *Streptomyces* mit einem aus einer Spore hervorgehenden, nichtseptierten Substratmycel. Bei Änderung der Umweltbedingungen, beispielsweise bei Nährstoffmangel, bildet er über das Substrat abgehobene Lufthyphen, die als Sporophoren dienen und terminal kettenartig angeordnete Sporen abgliedern, die nach Freisetzung und Keimung den Lebenszyklus erneut initiieren (Schlegel, 1992). Streptomyceten besitzen, obwohl prokaryotisch, üblicherweise ein lineares Chromosom (Huang *et al.*, 1998). Der GC-Gehalt der DNA beläuft sich gewöhnlich auf 69 bis 78% (Bibb *et al.*, 1984). Häufig sind Gene, die zu einem Biosyntheseweg zugehörig sind, am gleichen Locus, in einem sogenannten Gencluster auf dem Chromosom angeordnet (Martin und Liras, 1989). Diese Tatsache, erstmals von Rudd und Hopwood (1979) vorausgesagt und nachgewiesen, erleichtert das Auffinden und Klonieren der Antibiotika-Biosynthesegene erheblich. Ende der 70er Jahre wurde die molekularbiologische Modifikation eines Streptomyceten erstmals erfolgreich durchgeführt (Bibb *et al.*, 1978). In den Folgejahren nahm, vor allem durch die Absicht, die Sekundärstoffproduktion zu verstehen und zu beeinflussen, die Streptomycetengenetik Aufschwung. Ein Meilenstein ist die vollständige Sequenzierung des Genoms von *S. avermitilis*, dem Produzenten des Avermectin (Omura *et al.*, 2001), sowie die unmittelbar bevorstehende Publikation des Genoms von *S. coelicolor* A3(2), dem Produzenten des Actinorhodin.

1.6 Kombinatorische Biosynthese

Aus dem zunehmenden Verständnis der Sekundärstoffproduktion und ihrer genetischen Grundlagen entstand die Kombinatorische Biosynthese (Katz und Hutchinson, 1992): Sie besteht aus der gezielten Geninaktivierung, vor allem aber aus der heterologen Expression von einzelnen mehreren Genen oder ganzen Genclustern, um Streptomycetenstämme zur Biosynthese neuartiger, gewissermaßen unnatürlicher Naturstoffe zu veranlassen. Die Gene sind im Ursprungsorganismus an der Naturstoffbiosynthese beteiligt, sie können aus phylogenetisch nah- oder entfernter verwandten Arten stammen, können native, gentechnisch modifizierte oder hybride Gene sein. Voraussetzungen für diese Experimente sind die Verfügbarkeit der Gene, die Verfügbarkeit von geeigneten transformierbaren Streptomycetenstämmen sowie Expressionsvektoren.

Die Untersuchungen zur kombinatorischen Biosynthese konzentrierten sich zunächst hauptsächlich auf die Polyketid-Biosynthese. Polyketidsynthasen (PKSs) von Typ II sind aus separaten Untereinheiten aufgebaut und

enthalten pro Untereinheit ein aktives Zentrum, welches mehrfach im Verlauf der Biosynthese am wachsenden Polyketid aktiv ist. Durch die Kombination verschiedener Untereinheiten gelang die Herstellung neuartiger aromatischer Polyketide *in vivo* (McDaniel *et al.*, 1995). Typ I-PKSs zur Macrolid-Biosynthese hingegen besitzen einen modularen Aufbau. Ein Modul katalysiert dabei die Beladung des Enzyms mit dem Startermolekül des Polyketids oder einen Verlängerungsschritt der Polyketidkette um eine C-2-Einheit und verfügt über alle dazu notwendigen enzymatischen Aktivitäten wie Acyltransferase, Ketosynthase, Ketoreduktase. So wurden durch kombinatorische Biosynthese neue Erythromycine biosynthetisiert, indem die Beladungsdomäne der Erythromycin-PKS gegen die unspezifischere der Avermectin-PKS ausgetauscht wurde (Marsden *et al.*, 1998). Ein anderes Beispiel ist der Aufbau einer kompletten artifiziellen PKS aus Modulen dreier verschiedener Ursprungs-PKS: Erythromycin, Pikromycin, Oleandomycin (Tang *et al.*, 2000). Die Anstrengungen zur kombinatorischen Biosynthese umfassen auch die Herstellung dieser streptomycetalen Metaboliten in effizienteren und besser handhabbaren Wirten als *Streptomyces* selbst. Ein großer Erfolg war beispielsweise die Herstellung von 6-Deoxyerythronolid B, also des Erythromycin-Grundgerüstes in einem *E.coli*-Stamm. Die Produktivität dieses Systems ist dabei nahezu vergleichbar mit dem eines Hochleistungsstammes des natürlichen Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* (Pfeifer *et al.*, 2001).
Obwohl die Arbeiten auf dem Polyketidsektor die kombinatorische Biosynthese dominieren, wurde auch die Möglichkeit untersucht, in die Polyketid-modifizierenden Biosyntheseschritte wie z.B. Deoxyzuckerübertragung bzw. deren Biosynthese einzugreifen. Beispiele sind die Herstellung eines 3´-O-Rhamnosyl-Erythromycin B durch heterologe Expression einer Rhamnosyltransferase aus dem Oleandomycin-Biosyntheseweg in einer Glycosyltransferase-Mutante des Erythromycin-Produzenten (Doumith *et al.*, 1999) oder die Herstellung von Megalomicin durch heterologe Expression derjenigen Biosynthesegene im Erythromycin-Produzenten, die für die Biosynthese und Übertragung des Zuckers L-Megosamin notwendig sind (Volchegursky *et al.*, 2000).

1.7 Glycorandomisierung

Eine interessante Erweiterung des Repertoires an glycosidierten Naturstoffen könnte sich aus der Glycorandomisierung ergeben, die das Problem der schwierigen chemischen Darstellbarkeit nucleotid-diphosphat-aktivierter Zucker zu umgehen versucht. Prinzipiell sind für eine Glycosidierung einer Verbindung drei Schritte nötig: Ein Zucker, meist D-Glucose-1-Phosphat muß durch *in vivo* Bildung eines Nucleotid-diphosphates aktiviert, dann modifiziert, z.B. deoxygeniert werden. Schließlich muß die Glycosyltransferase den nucleotid-diphosphat-aktivierten Zucker erkennen und übertragen. Gelänge *in vitro* die Nucleotidaktivierung mit Nucleotidylyltransferasen, die in ihrer Spezifität herabgesetzt sind, könnten die chemisch viel leichter darstellbaren Phosphate der bereits modifizierten Zucker direkt in ihre dNDP-Äquivalente umgesetzt werden, die ersten beiden Schritte – Engstellen in der kombinatorischen Biosynthese – wären umgangen. Barton *et al.* (2001) gelang, eine solche Nucleotidylyltransferase mit breiterer Substratakzeptanz durch gezielte Sequenzänderungen herzustellen. Der Erfolg dieser Strategie hängt aber nun von der Übertragbarkeit der so hergestellten aktivierten Zucker ab, d.h. von der Verfügbarkeit entsprechend unspezifischer Glycosyltransferasen.
Zusammenfassend: Zucker sind für die Bioaktivität vieler Naturstoffe unerläßlich, die Kombinatorische Biosynthese hat ihre Tauglichkeit zur Erzeugung neuer unnatürlicher Naturstoffe bewiesen, dies vor allem auf dem Gebiet der Derivatisierung der Polyketid-Aglyca, aber auch auf dem der Erzeugung der nucleotidaktivierten Zucker. Vor diesem Hintergrund entstand die vorliegende Arbeit zur Erzeugung neuer Urdamycine durch Eingriff in Zucker-Biosynthese und Herstellung unspezfischerer Glycosyltransferasen.

1.8 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

- Charakterisierung der Urdamycin-Biosynthesegene *urdR* und *urdZ3* sowie Aufreinigung neuer Urdamycine, die infolge dieser Geninaktivierungen von den Mutanten herstellt werden. Strategie war der Austausch der Wildtyp-Gene durch Allele, die in ihrem Leseraster verschoben sind.

- Bestimmung des Enzymbereichs in den Urdamycin-Glycosyltransferasen UrdGT1b und UrdGT1c, der für die Substratselektivität – sowohl hinsichtlich des Zuckerdonorsubstrates als auch des Zuckerakzeptors- verantwortlich ist. Strategie war die Herstellung und Expression hybrider GT-Gene mit verschieden großen und verschieden positionierten Anteilen von *urdGT1b* und *urdGT1c* sowie Herstellung und Expression einer Genbibliothek, basierend auf der zufälligen Durchmischung bestimmer Aminosäuren, sowie deren Expression in zwei GT-Mutanten von *S.fradiae* Tü2717.

- Überexpression und Aufreinigung von UrdGT1b und UrdR sowie Überexpression von UrdM, einer Oxygenase der Urdamycin-Biosynthese. Strategie war die Expression als N-terminales 6xHistidin- und als Glutathion-S-Transferase-UrdGT1b Fusionsprotein in *E.coli* bzw. C-terminal 6x-Histidin-Fusionsprotein in *S.fradiae* XTC. UrdR wurde als C-terminales 6x-Histidin-Fusionsprotein gereinigt. Im Falle von UrdM wurde als N-terminales 6xHistidin-Fusionsprotein überexprimiert.

2. Material und Methoden

2.1 Puffer/Lösungen

2.1.1 Puffer/Lösungen allgemein

Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser zubereitet, wenn nicht anders angegeben

TE-Puffer, pH=7,6 (Aufbewahrung von DNA)
Tris-HCl, pH=7,6 10,0 mM
EDTA (pH=8,0) 1,0 mM

TAE-Puffer, pH=8,0 (Agarose-Geleelektrophorese)
Tris-Acetat 40,0 mM
EDTA (pH=8,0) 1,0 mM

TBE-Puffer, pH=8,0 (DNA-Sequenzierung mittels Acrylamid-Gelelektrophorese)
Tris- Borat 90,0 mM
EDTA (pH=8,0) 2,0 mM

STE-Puffer, pH=8,0 (Plasmidisolation aus *E.coli*)
NaCl 100,0 mM
Tris-HCl, pH=8,0 10,0 mM
EDTA (pH=8,0) 1,0 mM

STET-Puffer, pH=8,0 (Plasmidisolation aus *E.coli*)
NaCl 100,0 mM
Tris-HCl, pH=8,0 10,0 mM
EDTA (pH=8,0) 1,0 mM
5% Triton X-100 (v/v)
Zugabe von 625µg Lysozym pro ml STET

Puffer 1 (Plasmidisolation aus *Streptomyces*)
Glucose 50 mM
Tris 25 mM
EDTA (pH=8,0) 10 mM

Puffer 2 (Plasmidisolation aus *Streptomyces*)
NaOH 0,2 M
SDS 1%

Stets frisch aus Stocklösung zubereiten

Kaliumacetat-Lösung (zur DNA-Fällung)/Puffer 3 (Plasmidisolation aus *Streptomyces*)
Kaliumacetat 3,0 M

pH=5,2 mit Eisessig

Stocklösungen zur Blau-Weiß-Selektion von *E.coli*
IPTG 20,0 mM in H_2O
X-Gal 100,0 mg/ml Dimethylformamid

Pro Agarplatte zur Selektion 20µl beider Stocklösungen zu 60µl sterilem H_2O bidest. geben, ausstreichen und trocknen lassen

1xPBS-Puffer (Proteinisolation aus *E.coli)*

NaCl	140,0 mM
KCl	2,7 mM
Na_2HPO_4	10,0 mM
KH_2PO_4	1,8 mM

pH=7.3

PreScission Protease Puffer

TRIS-HCl pH=7.0	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

Vor Benutzung auf 4°C kühlen.

Lysispuffer (Lyse von *E.coli* zur Proteinisolierung)

NaH_2PO_4	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM

pH=8.0 mit NaOH

Zellen in Lysispuffer resuspendieren, zum Einleiten der Lyse mit Lysozym 1 mg/ml supplementieren.

Waschpuffer (für Ni-NTA-Säulen)

NaH_2PO_4	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM

pH=8.0 mit NaOH

Elutionspuffer (für Ni-NTA-Säulen)

NaH_2PO_4	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

pH=8.0 mit NaOH

2.1.2 Elektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese: 0,7-2,0 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer

Gelladepuffer 1 (zur Detektion von Banden ≠ 0,5 kb)

Bromphenolblau	0,25%
Sucrose,	40,0%

in TE-Puffer, pH=7,6

Gelladepuffer 2 (zur Detektion von Banden ≠ 3,0 kb)

Xylene Cyasol FF	0,25%
Sucrose,	40,0%

in TE-Puffer, pH=7,6

Färbebad für Agarosegele

Ethidiumbromid	10,0 µg/ml

Acrylamid-Lösung für DNA-Sequenziergel

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

in TBE-Puffer, pH=8,0

Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Protein-Charakterisierung

Sammelgel (4%)

H_2O bidest.	6,1 ml
0.5 M Tris-HCl, pH=6.8	2,5 ml
10% SDS (w/v)	0,1 ml
Acrylamid 30% (w/v)	1,33 ml
10% APS (w/v)	50,0 µl
TEMED	10,0 µl

Trenngel (12%)

H_2O bidest.	3,35 ml
0.5 M Tris-HCl, pH=8.8	2,5 ml
10% SDS (w/v)	0,1 ml
Acrylamid 30% (w/v)	4,0 ml
10% APS (w/v)	50,0 µl
TEMED	5,0 µl

10% APS-Lösung stets frisch zubereiten, vor Zugabe von APS und TEMED mind. 15 Minuten entgasen.

Ladepuffer für Acrylamid-Gele

H_2O bidest.	3,8 ml
0.5 M Tris-HCl, pH=6.8	1,0 ml
10% SDS (w/v)	1,6 ml
Glycerin	0,8 ml
2-Mercaptoethanol	0,4 ml
1% Bromphenolblau (w/v)	0,4 ml

1x Laufpuffer für Acrylamid-Gele

Tris-Base	25,0 mM
Glycin	192,0 mM
SDS	3,5 mM

pH=8,3

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue G250	1,0 g
Ammoniumsulfat	60,0 g
Phosphorsäure 85%	20,0 g

H_2O bidest. ad 1000 ml

Entfärbelösung

Methanol	450 ml
H_2O bidest.	450 ml
Eisessig	100 ml

2.1.3 Puffer zur Transformation von Streptomyceten

Protoplastierungs-Puffer für Streptomyceten (Thompson *et al.*, 1982).
Jede Komponente getrennt autoklavieren, dann mischen.

Saccharose	103,0 g (ad 858 ml H_2O bidest.)
Spurenelemente	0,2% (v/v)
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-Puffer für Streptomyceten (Thompson *et al.*, 1982). Alle Komponenten getrennt autoklavieren.

PEG 1000	25,0%
Saccharose	2,5%
K_2SO_4	1,4 mM
KH_2PO_4	400,0 µM
Tris-Maleat	50,0 mM
$MgCl_2$	10,0 mM
$CaCl_2$	10,0 mM
Spurenelemente	3,0% (v/v)

Spurenelement-Lösung für Streptomyceten (Hopwood *et al.*, 1985, Kieser *et al.*, 2000)

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	740 µM
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	26 µM
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	8 µM
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	59 µM
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	50 µM
$ZnCl_3$	30 µM

2.1.4 Western Blotting

Transferpuffer

Glycin	200,0 mM
Tris	25,0 mM
Methanol	20,0 % (v/v)
SDS	0,01 % (w/v)
pH=8,3-8,4	

Ponceau-Rot S-Färbelösung
0,5% Ponceaurot S (w/v) in 0,1 % Essigsäure

2.2 Nährmedien

Für Festmedium wurde 18g/l Agar verwendet, wenn nicht anders vermerkt

LB-Medium

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
Glucose	1,0 g

Mit NaOH pH=7,3 einstellen
Leitungswasser ad 1000 ml

LBBS-Medium (LB + Betain und Sorbitol)

LB	50,0 ml
Sorbitol (1.2 M)	50,0 ml
Betain (250 mM)	0,5 ml

- Sorbitol wird als 1.2 M Stocklösung getrennt autoklaviert
- Betain wird als 250 mM Stocklösung sterilfiltriert

Beide Komponenten nach Sterilisation zugeben

NZCYM-Medium

NZCYM broth	22,0 g

Mit NaOH pH=7,0 einstellen,
H_2O bidest. ad 1000 ml

CRM-Medium

Saccharose	103,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
tryptic soybroth	20,0 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	10,12 g

Mit NaOH pH=7,0 einstellen,
Leitungswasser ad 1000 ml

Nach Autoklavieren: $CaCl_2$ in einer Endkonzentration von 10 mM steril zugeben.

R2YE-Medium
Lösungen A, B und C getrennt autoklavieren, dann steril mischen

Lösung A

Agar	24,0 g
K_2SO_4	0,25 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10,12 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	2,95 g
Glucose	10,0 g
L-Prolin	3,0 g
Casaminosäuren	0,1 g
Spurenelemente	2,0 ml

H_2O bidest. ad 500 ml

Lösung B

TES	5,73 g
Hefeextrakt	5,0 g
Saccharose	103,0 g

Mit NaOH pH=7,4 einstellen
H_2O bidest. ad 500 ml

Lösung C

KH_2PO_4	50,0 mg

H_2O bidest. ad 10 ml

HA-Medium (+ $CaCl_2$)

Glucose	4,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,15 g

Mit NaOH pH=7,4 einstellen,
Leitungswasser ad 1000 ml

NL111V-Produktionsmedium

Lab Lemco-Fleischextrakt	20,0 g
Malzextrakt	100,0 g
$CaCO_3$	10,0 g

Mit NaOH pH=7,2 einstellen,
Leitungswasser ad 1000 ml

S-Medium (+ 1% Glycin)
Lösungen A und B getrennt autoklavieren, dann mischen.

Lösung A

Pepton	4,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
$K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$	4,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
L-Glycin	10,0 g

H_2O bidest. ad 800 ml

Lösung B

Glucose	10,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g

H_2O bidest. ad 200 ml

R3-Weichagar

Saccharose	171,0 g
Glucose	10,0 g
Pepton	4,0 g
KCl	0,5 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	8,1 g
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	2,2 g
Agar	8,0 g

H_2O bidest. ad 860 ml

Nach dem Autoklavieren steril zugeben:

K_2HPO_4 (0,5%)	40,0 ml
TES 250 mM, pH=7,2	100,0 ml

2G+-Medium

Glycerin	20,0 % (v/v)
Tween 80	0,1 % (v/v)

In H_2O bidest.

2.3 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stocklösung	Konzentration im Medium
Apramycin	100,0 mg/ml H_2O	20,0 µg/ml*
Carbenicillin	50,0 mg/ml H_2O	50,0 µg/ml
Chloramphenicol	30,0 mg/ml EtOH	30,0 µg/ml
Tetracyclin	5,0 mg/ml EtOH	10,0 µg/ml
Thiostrepton	50,0 mg/ml DMSO	25,0 µg/ml*

*Zum Überschichten von Transformationsansätzen von *Streptomyces fradiae* Tü2717 wurde pro Petrischale 1,5 mg in 270 µl (bei Thiostrepton) bzw. 285 µl H_2O bidest. (bei Apramycin) verwendet.

2.4 Vektoren und Plasmide

2.4.1 Vektoren

Vektor	Größe (kb)	Resistenz-gen(e)	Charakter des Vektors	Referenz
pBSK$^-$	2,96	*bla*	Standard-Klonier- und Sequenziervektor für *Escherichia (E.) coli*	Short *et al.*, 1988, Alting-Mees und Short, 1989
pUC18	2,68	*bla*	Standard-Klonier- und Sequenziervektor für *E.coli*	Yanisch-Perron *et al.*, 1985
pUC19	2,68	*bla*	Standard-Klonier- und Sequenziervektor für *E.coli*	Yanisch-Perron *et al.*, 1985
pKC1132	3,5	*aac*(3)IV	Geninaktivierungsvektor für *Streptomyces*	Bierman *et al.*, 1992
pUWL201	6,6	*bla/tsr*	Expressionsvektor für *Streptomyces*	Doumith *et al.*, 2000
pSET152	5,5	*aac*(3)IV	Gen-Integrationsvektor für *Streptomyces*	Bierman *et al.*, 1992
pGEX6-2P	4,9	*bla*	Genexpressionsvektor für *E.coli*	AMRAD Corp. Ltd., Kew, Australien
pQE-60	3,4	*bla*	Genexpressionsvektor für *E.coli*	Qiagen Inc., Valencia CA, USA
pRSETb	2,9	*bla*	Genexpressionsvektor für *E.coli*	Schoepfer, 1993

2.4.2 Plasmide

Plasmid	Länge Insert	Vektor	kloniert in	Insert	Referenz
p2-10	7,5 kb	pUC19	*Eco*RI	Fragment des Urdamycin-Biosynthesegen-Clusters, enthält *urdM*	Faust, 2000
s5	5,2 kb	pBSK$^-$	*Sac*I	Fragment des Urdamycin-Biosynthesegen-Clusters, enthält *urdGT1b* und *urdGT1c*	Trefzer *et al.*, 2000
pR	2,3 kb	pBSK$^-$	*Pst*I	Fragment des Urdamycin-Biosynthesegen-Clusters, enthält *urdR*	Hoffmeister *et al.*, 2000
pZ3	2,0 kb	pBSK$^-$	*Pst*I	Fragment des Urdamycin-Biosynthesegen-Clusters, enthält *urdZ3*	Hoffmeister *et al.*, 2000
pUWL-GT1b	1,2 kb	pUWL201	*Mun*I/ *Bgl*II	Leserahmen und Ribosomen-Bindestelle von *urdGT1b*	Trefzer *et al.*, 2000
pUWL-GT1c	1,2 kb	pUWL201	*Mun*I/*Bgl*II	Leserahmen und Ribosomen-Bindestelle von *urdGT1c*	Trefzer *et al.*, 2000

2.5 Bakterienstämme und Kultivierung

Stamm	relevante Marker	Referenz
E.coli XL 1 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
E.coli ET12567	F$^-$, *dam*$^-$13::Tn9, *dcm*$^-$6 *hsd*M, *hsd*R, *zjj*$^-$202::Tn10, *rec*F143, *gal*K2, *gal*T22, *ara*$^-$14, *lac*Y1, *xyl*15, *leu*B6, *thi*1, *ton*A31, *rps*L136, *his*64, *tsx*78, *mtl*I, *gln*V44	MacNeil *et al.*, 1992
E.coli BL21 (DE3) x pLysS	F$^-$ *omp*T, *hsd*S$_B$(*r$_B$*-*m$_B$*), *gal*, *dcm*(DE3), pLysS (Cam^R)	Borck, 1976, Phillips, 1984
E.coli Origami (DE3)	F$^-$ *omp*T, *hsd*S$_B$(*r$_B$*-*m$_B$*), *gal*, *dcm*(DE3), *lac*Y1, *gor* 522::Tn10 (Tc^R), *trx*B::kan(DE3)	Novagen Inc., Madison WI, USA
Streptomyces fradiae Tü2717	Urdamycin A-Produzent, Wildtyp	Rohr, 1984, Drautz *et al.*, 1986
Streptomyces fradiae AX	Aquayamycin-Produzent, *urdGT1a*$^-$, *urdGT1b*$^-$, *urdInt*$^-$, *urdGT1c*$^-$	Trefzer *et al.*, 2000

2.5.1 Kultivierung von *E.coli*

E.coli-Kulturen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) in LB-Medium (siehe 2.2) stets bei 37°C über Nacht, d.h. 14-18 h inkubiert. Flüssigkulturen wurden mit 170 rpm geschüttelt. Kulturvolumen war 2 ml bzw. 5 ml pro Reagenzglas für Plasmidisolationen im Mini-Maßstab. Für Plasmidpräparationen im Midi-Maßstab wurden 100 ml-Kulturen in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen verwendet. Antibiotika wurden in der unter 2.3. beschriebenen Endkonzentration zugegeben.

Die Bedingungen zur *E.coli*-Anzucht für Proteinexpression sind in Abschnitt 2.11 für das jeweilige Protein beschrieben.

2.5.2 Kultivierung von *Streptomyces fradiae* Tü2717

Kulturen von *Streptomyces fradiae* Tü2717 wurden bei 28°C kultiviert. Zur Stammerhaltung wurde HA+$CaCl_2$-Festmedium verwendet, zur Anzucht für Protoplastierung oder Proteinexpression CRM-Flüssigmedium oder S-Medium +1% Glycin, zur Urdamycin-Produktion NL111V-Flüssigmedium (siehe 2.2). Flüssigkulturen wurden mit 170 rpm geschüttelt (in Miniatur-Kulturgefäßen bei 250 rpm). Falls erforderlich, wurde ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion zugesetzt.

Flüssigkulturen wurden inkubiert als

- 7 ml-Kulturen in Miniatur-Kulturgefäßen (30 ml Zylinder, eine Schikane) zum Screening der Genbibliothek
- 20 ml-Kulturen in 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane (Urdamycin-Produktionskulturen für Extraktion im analytischen Maßstab)
- 100 ml-Kulturen in 300 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane und Stahl-Spiralfeder am Boden (zur Anzucht für nachfolgende Protoplastierung oder zur Proteinüberexpression)
- 100 ml-Kulturen in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane, Öffnung mit steriler Watte verschlossen (Urdamycin-Produktionskulturen für Extraktion im präparativen Maßstab)

Sporensuspensionen

Sporensuspensionen von *Streptomyces fradiae* Tü2717 wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

- Eine Agarplatte mit gut sporuliertem Zellmaterial wird mit 3 ml 2G+-Medium bedeckt (siehe 2.2).
- Mit einer sterilen Impföse werden die Sporen im 2G+-Medium suspendiert
- Filtration durch sterile Watte
- Die Sporensuspension wird gevortext und 3 Minuten bei 4.000 g abzentrifugiert
- Überstand verwerfen

Das Pellet mit 1 ml 2G+-Medium resuspendieren

Lagerung der Suspension bei -20°C oder-70°C.

2.6 DNA-Isolation, -Bearbeitung und -Charakterisierung

2.6.1 Plasmidisolation aus *E. coli*

Plasmidisolation im Mini-Maßstab durch Hitze-Lysis

Aus 2 ml Übernacht-Kultur wurde mit der von Holmes und Quigley (1981) beschriebenen, leicht modifizierten Methode Plasmid-DNA isoliert. Die Modifikationen beziehen sich auf einen zusätzlichen Waschschritt mit 500 µl STE-Puffer (siehe 2.1.1) pro Kultur nach dem Pelletieren, sowie auf eine Verlängerung der Hitzeexposition von 40 auf 60 Sekunden. Außerdem wurde nach der Hitzeexposition die Probe 5-10 Minuten auf Eis gekühlt und erst dann zentrifugiert.

Plasmidisolation aus *E.coli* zur Herstellung sequenzierbereiter DNA

Zur Herstellung sequenzierbereiter DNA wurden aus je 5 ml Übernacht-Kultur von plasmidtragenden *E.coli* mittels des Wizard Plus-Kit (Promega, Madison WI, USA) gemäß den Herstellerangaben Plasmid-DNA isoliert. Die gewonnene DNA wurde in 50µl H_2O aufgenommen.

Plasmidisolation im Midi-Maßstab

Große Mengen Plasmid-DNA (100 µg oder mehr) wurden aus 100 ml Bakterienkultur unter Verwendung von Nucleobond AX-100 Säulen und -Puffern (Macherey&Nagel, Düren) gewonnen. Diese Methode basiert auf der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen und wurde durch den Hersteller modifiziert. Die gewonnene DNA wurde in 200µl TE-Puffer oder H_2O aufgenommen.

2.6.2 Plasmidisolation aus *Streptomyces*

Diese Methode beruht auf alkalischer Denaturierung der DNA und Lyse durch Lysozym- und SDS-Behandlung. Gewöhnlich ist die Methode deutlich ineffizienter als die Plasmidisolation aus *E.coli*, außerdem ist die gewonnene Plasmid-DNA verunreinigt. Es empfiehlt sich, die Plasmid-DNA zur erneuten *E.coli*-Transformation zu verwenden, um dann, z.B. zur DNA-Sequenzierung, saubere Plasmide in ausreichender Menge zu erhalten.

- 1,5 ml Flüssigkultur pelletieren
- zweifach mit Puffer 1 waschen (siehe 2.1.1)
- in 300 µl Puffer 1+ 4 mg/ml Lysozym resuspendieren und 30 min bei 37°C inkubieren
- 300 µl Puffer 2 zugeben, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 300 µl Puffer 3 zugeben, 10 Minuten auf Eis aufbewahren

- 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen und mit 500 µl Phenol waschen
- 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen und mit 0,7 VT Isopropanol fällen
- 15 Minuten bei RT stehenlassen, dann 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugieren
- Mit Ethanol 70% waschen
- DNA in 50 ml TE resuspendieren

2.6.3 DNA-Fällung

Die Fällung von DNA wurde mit Ethanol oder Isopropanol nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989) ausgeführt. Die gefällte DNA wurde in TE-Puffer oder H_2O resuspendiert.

2.6.4 Enzyme

Alle DNA-Restriktionsendonucleasen, T4-DNA-Ligase, Kalbs-Intestinal-Phosphatase, *Taq*-Polymerase, *Pfu*-Polymerase, Thermo-Sequenase, AmplitaqGold-Polymerase, T4-DNA-Polymerase, Lysozym, PreScission Protease, RNAseA sowie das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* wurden nach Herstellervorschrift verwendet.

2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde gemäß Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt, zum Einsatz kamen, je nach Bedarf, 0,7-2,0% Agarose-Gele. Längenstandard war die 1-kb Leiter (Promega). Die Gele wurden in Ethidiumbromid-Lösung für mindestens 20 Minuten gefärbt. Bei präparativen Gelen wurde eine Färbedauer von ca. 10 Minuten eingehalten. Die gefärbten Gele wurden mit einem UV-Transilluminator (Pharmacia) und einer CCD-Kamera (Eagle Eye, Stratagene, Heidelberg) dokumentiert. Wurde die Agarose-Gelelektrophorese zu präparativen Zwecken durchgeführt, wurden zur Elution der DNA aus der Agarosematrix das Nucleospin-Extract Kit (Macherey&Nagel, Düren) verwendet.

2.6.6 DNA-Sequenzierung/rechnergestützte Sequenzauswertung

Rekombinante Plasmide wurden als doppelsträngige Matrize für die nicht radioaktive Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) eingesetzt. Zur Verminderung von Kompressionen während der Sequenzierprozedur wurde anstatt dGTP für das Cycle Sequencing 7-deaza-dGTP (Mizusawa *et al.*, 1986) eingesetzt. Für das Cycle Sequencing wurde ein PCR-Gerät von Perkin Elmer GeneAmp 2400 eingesetzt, für die Reaktion wurde das „Thermo Sequenase core kit RPN 2440 with 7-deaza-dGTP“ (Amersham, Braunschweig) nach Herstellervorschrift verwendet.

Sequenziervektor waren pBluescript SK^-, pUC18 oder pUC19 (siehe 2.4.1), Sequenzierprimer waren markierte T3- oder T7, M13 forward oder reverse-Primer oder interne Primer mit spezifisch komplementärer Sequenz gegen das zu sequenzierende Insert.

Plasmide wurden mit einem automatischen Sequenzierer Molecular Dynamics Vistra 725 (Amersham-Pharmacia, Freiburg) und der Steuersoftware „Vistra 725 Sequencer“ gelesen. Die von 4base-Lab GmbH (Reutlingen) erstellten Sequenzdaten entstanden unter Verwendung von Standardprimern oder internen Primern

und eines Sequenzierers von Applied-Biosystems (Weiterstadt), Modell 377. MWG (Ebersberg/Bayern) sequenzierte mit einem LI-COR 4200 Sequenzierer.

Die Editierung und Auswertung der Sequenzdaten wurde mit dem Programmpaket DNASIS für Windows (Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA, USA), Version 2.1. und Clone Manager (Scientific & Educational Software, Durham, NC, USA) durchgeführt, Datenbankrecherchen nach Sequenzhomologien (auf Nucleotid- oder Aminosäureebene) wurden mit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.* 1990) und Advanced BLAST, Version 2.2.1 (Altschul *et al.* 1997) im Suchmodus Blastx bei nichtredundanter Recherche ausgeführt.

2.7 Herstellung/Expression hybrider Glycosyltransferase-Gene

Ausgangsmaterial zur Herstellung hybrider GT-Gene waren die Plasmide pUWL-GT1b und pUWL-GT1c (siehe 2.4.2). Durch Austausch von Restriktionsfragmenten verschiedener Länge (siehe auch Abb. 6) zwischen beiden Plasmiden wurden in Gene erzeugt, deren Sequenz sich teilweise von *urdGT1b*, teilweise von *urdGT1c* ableitet, die also hybrid bezüglich ihrer Sequenz sind, und sich ebenfalls im Expressionsvektor pUWL201 befinden. Diese im pUWL 201 vorliegenden hybriden Gene dienten ihrerseits als Basis für weitere Austausche von Restriktionsfragmenten und damit zur Erzeugung weiterer hybrider Gene.

Bezeichnung	**Herkunft der Codons**	**Herstellung**
H1	1-31: *urdGT1b;* 32-391: *urdGT1c*	Austausch des 1,1 kb *Pfl*MI-Fragmentes von pUWL-GT1c gegen das gleiche Fragment aus pUWL201-GT1b
H2	1-31: *urdGT1c;* 32-388: *urdGT1b*	Austausch des 1,1 kb *Pfl*MI-Fragmentes von pUWL-GT1b gegen das gleiche Fragment aus pUWL201-GT1c
H3	1-184: *urdGT1b;* 185-391: *urdGT1c*	Austausch des 0,65 kb *Pst*I/*Bgl*II-Fragmentes von pUWL-GT1b gegen das gleiche Fragment aus pUWL-GT1c
H4	1-184: *urdGT1c;* 185-388: *urdGT1b*	Austausch des 0,65 kb *Pst*I/*Bgl*II-Fragmentes von pUWL-GT1c gegen das gleiche Fragment aus pUWL-GT1b
H5	1-239: *urdGT1c;* 241-388: *urdGT1b**	Austausch des 0,5 kb *Bsm*I/*Xba*I-Fragmentes von pUWL-GT1c gegen das gleiche Fragment aus pUWL-GT1b
H6	1-31und 240-391: *urdGT1c*; 32-240: *urdGT1b**	Austausch des 0,5 kb *Bsm*I/*Xba*I-Fragmentes von pUWL-GT1c gegen das gleiche Fragment aus H2
H7	1-31und 241-388: *urdGT1b*; 32-239: *urdGT1c**	Austausch des 0,5 kb *Bsm*I/*Xba*I-Fragmentes von pUWL-GT1b gegen das gleiche Fragment aus H1
H8	1-184 und 241-388: *urdGT1b*; 185-239: *urdGT1c**	Austausch des 0,5 kb *Bsm*I/*Xba*I-Fragmentes von GT1H3 gegen das gleiche Fragment aus H4

* *urdGT1b* besitzt zwischen der *Pst*I- und der *Bsm*I-Restriktionsstelle ein zusätzliches Codon (Arg-Codon 227). Daher verschiebt sich die fortlaufende Numerierung der Codons ab dieser Stelle um 1, verglichen mit *urdGT1c,* dadurch entstehen scheinbare Lücken oder Überlappungen in der Zählung der Codons hybrider Gene.

Alle hybriden Gene, die nicht unter Beteiligung eines PCR-Fragmentes konstruiert wurden, befinden sich in Vektor pUWL201. Um die Korrektheit der Klonierungen durch Sequenzierung zu überprüfen, wurden sie per *Hin*dIII/*Xba*I Corestriktion aus pUWL201 ausgeschnitten und in pBSK$^-$ über die gleichen Restriktionsstellen inseriert. Ortsspezifische Aminosäurensubstitutionen wurden durch Austausch eines Restriktionsfragmentes gegen ein per PCR editiertes Äquivalent erreicht.

Bezeichnung	Herkunft der Codons	Herstellung
H9	80-82: *urdGT1c*; alle anderen: *urdGT1b*	Austausch des 1,0 kb *Xho*I/*Bgl*II-Fragmentes von pUC18-1b gegen sein per PCR editiertes Äquivalent (siehe 2.10)
H10	76, 80-82: *urdGT1c*; alle anderen: *urdGT1b*	Austausch des 1,0 kb *Xho*I/*Bgl*II-Fragmentes von pUC18-H9 gegen sein per PCR editiertes Äquivalent
H11	68-71, 80-82: *urdGT1c*; alle anderen: *urdGT1b*	Austausch des 0,25 kb *Hin*dIII/*Xho*I-Fragmentes von pUC18-H9 gegen sein per PCR editiertes Äquivalent
H12	68-71, 80-82: *urdGT1c*; alle anderen: *urdGT1b*	Austausch des 0,25 kb *Hin*dIII/*Not*I-Fragmentes von pUC18-H11 gegen sein per PCR editiertes Äquivalent
H13	52-53, 55-56, 58-62, 64, 68-71, 76, 80-82: *urdGT1c*; sonstige: *urdGT1b*	Gen komplett per PCR hergestellt
H3S	1-184, 226: *urdGT1b;* alle anderen *urdGT1c*	Austausch des 0,75 kb *Bsm*I/*Hin*dIII-Fragments von pBSK-H3 gegen sein per PCR editiertes Äquivalent
H3R	1-184, 227: *urdGT1b;* alle anderen *urdGT1c*	Austausch des 0,75 kb *Bsm*I/*Hin*dIII-Fragments von pBSK-H3 gegen sein per PCR editiertes Äquivalent
H3SR	1-184, 226-227: *urdGT1b;* alle anderen *urdGT1c*	Austausch des 0,75 kb *Bsm*I/*Hin*dIII-Fragments von pBSK-H3 gegen sein per PCR editiertes Äquivalent

Alle Gene, die unter Beteiligung eines PCR-Fragmentes konstruiert wurden, befinden sich in pUC18 (H3S/H3R/H3SR: in pBSK$^-$). Die Kontroll-Sequenzierungen der Gene wurden mittels dieser pUC18- oder pBSK$^-$-basierten Konstrukte durchgeführt, für die Expression in *S.fradiae* wurden die Gene durch *Hin*dIII/*Xba*I Corestriktion ausgeschnitten und in pUWL201 inseriert.

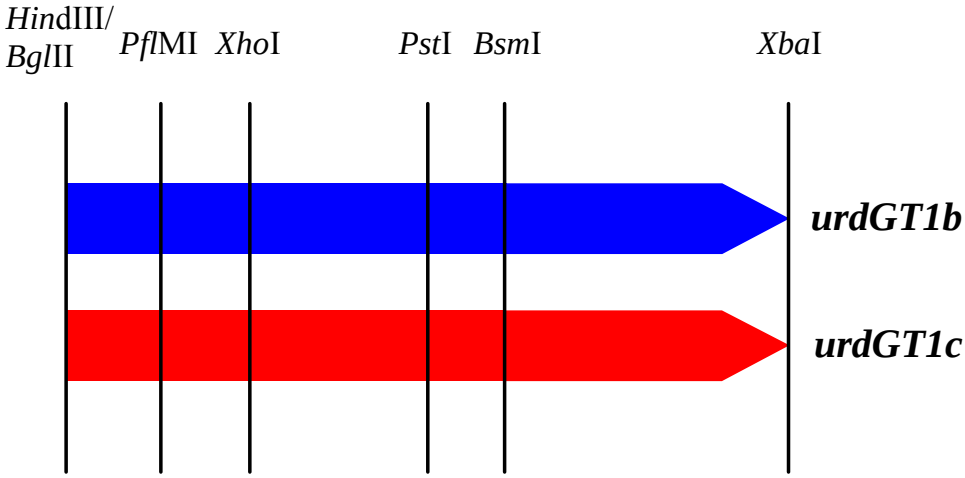


Abb. 6: Übersicht über die verwendeten Restriktionsstellen in den Genen *urdGT1b* und *urdGT1c*.

Konstruktion der Genbibliothek hybrider Glycosyltransferasen: Basis ist das hybride GT-Gen H12, zehn Codons (52-53, 55-56, 58-62, 64) stammen jedoch zufällig von *urdGT1b* oder *urdGT1c*, Codon 76 von *urdGT1c*

Bezeichnung	Herkunft der Codons	Herstellung
Bibliothek	52-53, 55-56, 58-62, 64, 68-71, 80-82: *urdGT1b* oder *urdGT1c*; 76: *urdGT1c;* alle anderen: *urdGT1b*	Gene komplett per PCR hergestellt

Auch die Bibliothek befindet sich in pUC18. Sie wurde ebenfalls in die *Hin*dIII/*Xba*I-Stellen von pUWL201 ligiert. Um alle Varianten der Bibliothek abzudecken, wurden 4.500 Klone, resultierend aus der Ligation in pUWL201, von den Transformationplatten mit 1-2 ml LB-Carbenicillin Flüssigmedium abgeschwemmt, vereinigt und fortan gehandhabt, als handele es sich um einen einzelnen *E.coli*-Klon.

2.8 Herstellung von Genintegrations- und Geninaktivierungskonstrukten

2.8.1 Herstellung des *S.fradiae*-Stammes XTC durch Genintegration

Ein *S.fradiae*-Stamm, der konstitutiv Urdamycine mit Disaccharid-Seitenkette am C-Atom 9 produziert, wurde durch Integration des Gens *urdGT1c* unter Kontrolle des *ermE*-Promotors in das Chromosom hergestellt. Die Integration erfolgt über die Anheftungsstelle des Phagen ΦC31, die sowohl auf dem Chromosom als auch im Integrationsvektor (pSET152, siehe 2.4.1) vorhanden ist. *urdGT1c* inclusive *ermE*-Promotor wurde über *Kpn*I/*Xba*I-Corestriktion aus pUWL-GT1c (siehe 2.4.2) ausgeschnitten und über die gleichen Restriktionsstellen in pUC19 inseriert. Dies ergab Plasmid pUC19-1cerm.

Aus pUC19-1cerm wurde *urdGT1c,* ebenfalls inclusive *ermE*-Promotor, über *Eco*RI ausgeschnitten und in die gleiche Stelle von pSET152 inseriert. Dies ergibt pSET-1cerm (siehe Abb. 43). *S.fradiae* AX wurde mit pSET-1cerm transformiert, einige Transformationsklone wurden auf HA+$CaCl_2$+Apramycin-Festmedium kultiviert, um weiter auf Apramycin-Resistenz zu selektieren. Ein Klon wurde weiter kultiviert und auf Sekundärstoffproduktion untersucht. Es wurden 12b-Derhodinosyl-Urdamycin G und 100-1 als Hauptprodukte gefunden. Dieser Stamm heißt *S.fradiae* XTC.

2.8.2 Herstellung der Geninaktivierungskonstrukte für *urdR* und *urdZ3*

Der Leserahmen von *urdZ*3 wurde im Plasmid pZ3 (siehe 2.4.2) durch Restriktion mit *Bsp*EI (Basen 1114-1119 des 2010bp-Inserts) und anschließender Auffüllreaktion mit der DNA-Polymerase des Phagen T4 zerstört, anschließend erfolgte die Religation. Ziel war das Einführen einer Leseraster-Verschiebung. Das derart mutierte Allel von *urdZ3* wurde sequenziert, um die Sequenzänderung zu verifizieren. Anstelle der regulären *Bsp*EI-Erkennungs- und Schnittstelle TCCGGA wurde TCCGGCCGGA gefunden, d.h. es wurden vier Nucleotide eingefügt, die Verschiebung des Leserasters ist erreicht. Das Insert des mutieren Plasmides wurde durch Restriktion mit *Pst*I ausgeschnitten und in den ebenso geöffneten und dephosphorylierten Vektor pKC1132 inseriert. Das entstandene Inaktivierungskonstrukt heißt pKCZ3 (Karte siehe Anhang, Abb. 39) und verleiht Resistenz gegen Apramycin. Durch DNA-Sequenzierung wurde die Leserasterverschiebung bestätigt.

Im Plasmid pR (siehe 2.4.2) wurde die singuläre *Spl*I-Schnittstelle (Basen 1242-1247 des 2310bp-Inserts) durch Restriktion und anschließender Behandlung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* zerstört. Das derart prozessierte 2.3 kb *Pst*I-Insert von pR wurde in die *Pst*I-Stelle von pKC1132 inseriert: dies ist das Inaktivierungskonstrukt pKCRN (Karte siehe Abb. 41). Das mutierte Plasmid pR wurde im Bereich der aufgefüllten *Spl*I-Stelle sequenziert, um die Mutation zu verifizieren. Die *Spl*I-Stelle (CGTACG) ist zwar aufgefüllt, jedoch nicht, wie theoretisch zu erwarten (CGTACGTACG), stattdessen wurde CGTGTACG gefunden.

Die irreguläre Auffüllreaktion ist durchaus positiv, denn sie sorgt für eine Verschiebung des Leserasters derart, daß dieses 18 Codons nach der Verschiebung in ein Stopcodon läuft, außerdem wird nur bei irregulärer Auffüllreaktion die *Spl*I-Stelle entfernt, so daß erwünschte Doppelcrossover per PCR leicht durch den Verlust dieser Restriktionsstelle identifiziert werden können (siehe auch 2.10.6).

2.8.3 Genexpressionskonstrukte zur Komplementierung der Mutanten *S.fradiae* Z3-148 und RN-435

Ein Konstrukt zur Komplementierung von *S.fradiae* Z3-148 wurde wie folgt hergestellt: Das 2.0 kb *Pst*I-Insert des Plasmides pZ3 (siehe 2.4.2) wurde aus dem Vektor pBSK$^-$ per Restriktion mit *Pst*I ausgeschnitten und in den Vektor pUWL201 inseriert. Dies ergab das Komplementationsplasmid pUWLZ3 (Karte siehe Anhang, Abb. 40).

Aus Plasmid pR (siehe 2.4.2) wurde per *Pst*I-Restriktion das Insert ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Pst*I geöffneten Vektor pUWL201 inseriert. Dies ergab das Komplementationsplasmid pUWLR (Karte im Anhang, Abb. 42), welches zur Transformation der *S. fradiae* Mutante RN-435 Verwendung fand.

2.9 Transformation

2.9.1 Transformation von *E.coli*

Die Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von *E.coli* XL I blue, *E.coli* ET12567 und *E.coli* Origami B (DE3) und *E.coli* BL21 (DE3) x pLysS folgte dem von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Protokoll für Calciumchlorid-kompetente Zellen.

2.9.2 Transformation von *Streptomyces fradiae* Tü2717

Zur Protoplastierung wurde *S. fradiae* Tü2717 24-36 h unter Standardbedingungen in CRM-Medium (siehe 2.2) kultiviert, 1 ml Kultur entnommen und mittels einer sterilen Insulinspritze wiederum in CRM-Medium (50-100 ml pro 300 ml-Kolben mit zwei Schikanen und Stahl-Spiralfeder) überimpft und 18-24 h weiter inkubiert.
Zur Minimierung von Restriktionen wurden für die Transformation von *S. fradiae* Tü2717 in *E.coli* ET12567 amplifizierte Plasmide verwendet.

Protoplastierung

- Ernte: Abzentrifugieren bei +4°C, 2.000 g für 5 Minuten
- Resuspendieren des Pellets in 20 ml eiskaltem P-Puffer (siehe 2.1.3), kurz sanft vortexen
- Abzentrifugieren bei +4°C, 2.000 g für 5 Minuten
- Resuspendieren des Pellets in 10 ml P-Puffer mit 3,5 mg/ml Lysozym
- Inkubation bei +37°C im Wasserbad, gelegentlich das Gefäß invertieren
- Mikroskopische Kontrolle der Protoplastierung (erstmals nach 20 Minuten, dann alle 10 Minuten)
- Stoppen der Protoplastierung nach ca. 40-50 Minuten durch Zugabe von 20 ml eiskaltem P-Puffer, in Eis lagern

Alle folgenden Schritte auf Eis:

- Filtern der Protoplasten durch sterile Watte
- Filtrat abzentrifugieren (+4°C, 850 g, 10 Minuten)
- Überstand fast vollständig verwerfen, im Rest Zellen vorsichtig resuspendieren

DNA-Denaturierung

Dieser Schritt erhöht die Integrationseffizienz bei nichtreplikativen Plasmiden, z.B. pKC1132- oder pSET152-basierten Konstrukten (Oh und Chater, 1996) und wird unmittelbar vor der Transformation der DNA in *S. fradiae* Tü2717 durchgeführt.

- 10-20 µg DNA-Lösung vorlegen (Volumen sollte 9µl nicht übersteigen)
- 2 µl 1M NaOH zugeben und kurz abzentrifugieren
- 10 Minuten bei +37°C inkubieren
- Im Eiswasser schnell abkühlen
- Neutralisieren durch Zugabe von 2µl 1 M HCl
- Bis zur Transformation auf Eis lagern

Transformation

- Zu denaturierter DNA 200µl Protoplasten-Suspension und 500µl eiskalten T-Puffer (siehe 2.1.3) zugeben
- Sanft mischen durch einmaliges Auf- und Abpipettieren mit abgeschnittener Pipettenspitze
- Verteilen des Transformationsansatzes auf zwei vorgewärmte und getrocknete R2YE-Platten (siehe 2.2)
- Überschichten mit 3 ml R3-Weichagar (siehe 2.2) pro Petrischale: den flüssigen Agar durch Neigen über die gesamte Fläche verteilen
- Inkubation 14 - 16 h bei +28°C

Selektion auf einfaches Crossover

- Pro Agarplatte 1,5 mg Antibiotikum in H_2O bidest. ausbringen
- Inkubation bei +28°C
- Überimpfen von Transformanden nach 4-6 Tagen

Kontrolle der Protoplastierung

200 µl Protoplasten und 1000 µl H_2O bzw. 200 µl Protoplasten und 1000 µl P-Puffer werden unter gleichen Bedingungen wie die Transformationsansätze inkubiert.

Kontrolle des Wachstums und der Antibiotika-Sensitivität

200 µl Protoplasten und 500 µl T-Puffer werden gemischt, gleiche Volumina ausplattiert und unter gleichen Bedingungen wie die Transformationsansätze inkubiert. Eine der Platten wird ohne das entsprechende Antibiotikum überschichtet (Wachstumskontrolle), die andere Platte mit Antibiotikum (Sensitivitätskontrolle).

2.10 PCR

Zur Herstellung von Genexpressions- oder Geninaktivierungskonstrukten, zur Punktmutagenese und zur Herstellung der Genbibliothek hybrider Glycosyltransferasegene, sowie zur Überprüfung von Integrationsereignissen im Zuge einer Geninaktivierung wurde DNA per PCR amplifiziert. Alle PCR-Reaktionen wurden mit einem PerkinElmer GeneAmp 2400 oder GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt, die PCR-Primer stammten von Amersham-Pharmacia (Freiburg). Template war linearisierte Plasmid-DNA (ca. 0,1 µg) oder chromosomale DNA, die während der PCR aus Zellen freigesetzt wurde. Das Reaktionsvolumen war 100µl, wenn nicht anders vermerkt. PCR-Produkte wurden stets sequenziert, um die Korrektheit der Amplifikation zu verifizieren.

2.10.1 Punktmutagenese in Glycosyltransferase-Genen

PCR-Fragment zur Herstellung des Gens H9

Mittels des Primers PAP (siehe 2.10.7) wurden die Codons 80-82 von *urdGT1b* so verändert, daß statt Ala-Ser-Leu nunmehr Pro-Ala-Pro codiert wird, dies sind die positionsäquivalenten Aminosäuren aus UrdGT1c. Durch diese Änderung entfällt die weiter 3´ gelegene *Xho*I-Stelle in *urd*GT1b. Zusätzlich wurde über den Primer als stille Mutation eine *Sac*II-Restriktionsstelle eingeführt.

PCR-Programm:

7´00´´ Initial	97°C
1´30´´	95°C
1´00´´	49°C
1´00´´	72°C
10´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen: *Taq*-Polymerase 2,5 U, Reaktionsvolumen: 50 µl, 2,5% DMSO, 180µM dNTP Endkonzentration, Primer: PAP und M13 reverse, Primerkonzentration: je 50pmol. Als Template diente pUC18-1b, also pUC18 mit *urd*GT1b, inseriert in *Hin*dIII/*Xba*I.

PCR-Fragment zur Herstellung des Gens H10

Mittels des Primers V (siehe 2.10.7) wurde das Codon 76 von H9 so verändert, daß statt Thr nunmehr Val codiert wird. Die durch den Primer PAP bereits früher eingeführte *Sac*II-Stelle bleibt erhalten, die durch ihn entfernte zweite *Xho*I-Stelle bleibt entfernt.

PCR-Programm:

7´00´´ Initial	97°C
1´30´´	95°C
1´00´´	62°C
1´00´´	72°C
10´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen: *Taq*-Polymerase 2,5 U, Reaktionsvolumen: 50 µl, 2,5% DMSO, 20% Glycerin, 180µM dNTP Endkonzentration, Primer: V und M13 reverse, Primerkonzentration: je 50pmol. Als Template diente pUC18-H9.

PCR-Fragment zur Herstellung des Gens H11

Mittels des Primers GPDQ (siehe 2.10.7) wurden die Codons 68-71 von H9 so verändert, daß statt Arg-Glu-Gly-Glu nunmehr Gly-Pro-Asp-Gln codiert wird. Die durch den Primer PAP bereits früher eingeführte *Sac*II-Stelle bleibt weiterhin erhalten, die durch ihn entfernte zweite *Xho*I-Stelle bleibt entfernt.

PCR-Programm:

7´00´´ Initial	97°C
1´30´´	95°C
1´00´´	61°C
0´45´´	72°C
10´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen: *Taq*-Polymerase 2,5 U, Reaktionsvolumen: 50 µl, 2,5% DMSO, 20% Glycerin, 180µM dNTP Endkonzentration, Primer: V und M13 universal, Primerkonzentration: je 50pmol. Als Template diente pUC18-H9.

PCR-Fragment zur Herstellung des Gens H12

Das Gen H11 wurde in den Codons 66 (Glycin) bzw. 67 (Leucin) mittels PCR und unter Verwendung des Primers AVR (siehe 2.10.7) einer stillen Mutagenese unterzogen (GGG→GGC bzw. TTG→CTA). Auf diese Weise entsteht in diesen Codons eine *Avr*II-Restriktionsstelle.

PCR-Programm:

7´00´´ Initial	97°C
1´00´´	95°C
1´00´´	62°C
0´40´´	72°C
7´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen: *Taq*-Polymerase 4 U, Reaktionsvolumen: 50 µl, 2,5% DMSO, 140µM dNTP Endkonzentration, Primer: AVR und M13 universal, Primerkonzentration: je 20pmol. Als Template diente pUC18-GT1bH11.

Herstellung des Gens H13 und der Bibliothek hybrider Glycosyltransferasen

Durch den Primer CON (siehe 2.10.7) wurden die Codons aller zehn für die Spezifität von UrdGT1b/UrdGT1c potentiell relevanten Aminosäuren (aa 52-53, 55-56, 58-62, 64) gleichzeitig ausgetauscht, d.h. es wurden in UrdGT1b die entsprechenden AS aus UrdGT1c eingeführt. Der Primer CON ist so gewählt, daß er nahe seines 5´-Endes die *Avr*II-Stelle enthält und in diesem Bereich mit dem entgegengesetzt orientierten Primer REV (siehe 2.10.7) komplementär ist, welcher ebenfalls die *Avr*II-Stelle besitzt. Dadurch kann per PCR in einem Schritt das gesamte, durch *Avr*II-Restriktion linearisierte Plasmid pUC18-H12 amplifiziert und die gewünschten Basenaustausche eingeführt werden. Nach der PCR liegt das Plasmid bereits mit dem veränderten Gen vor, weitere Klonierungsschritte entfallen. Es muß lediglich das PCR-Amplifikat mit *Avr*II restringiert und nachfolgend religiert werden. Der Primer CON verändert außerdem das Codon 55 (Alanin), indem er für eine stille Mutation GCA→GCC sorgt. Dadurch lauten die Codons für Gly54 und Ala55 GGCGCC, so daß eine *Bbe*I-Restriktionsstelle entsteht.

PCR-Programm:

7´00´´ Initial	96°C
1´00´´	95°C
0´50´´	56°C
4´00´´	72°C
7´00´´ Ende	72°C
35 Zyklen	

Weitere Bedingungen: *Taq*-Polymerase 4 U, Reaktionsvolumen: 50 µl, 200µM dNTP Endkonzentration, Primer: CON und REV, Primerkonzentration: je 40 pmol. Als Template diente pUC18-H12, linearisiert durch *Avr*II-Restriktion.

Identische Bedingungen wurden zur Herstellung der Bibliothek hybrider Glycosyltransferasen gewählt, jedoch wurde der Primer WOB (statt CON) verwendet. Primer WOB (siehe 2.10.7) ist wie Primer CON ebenfalls im 5´-Bereich komplementär zu Primer REV, stellt aber de facto eine Primerbibliothek dar, da elf Nucleotid-Positionen unabhängig voneinander von jeweils zwei Basen besetzt sein können, somit ergeben sich 2^{11}=2048 Varianten. Wie Primer CON verändert der Primer WOB außerdem das Codon 55 (Alanin), indem er für eine stille Mutation GCA→GCC sorgt. Dadurch lauten die Codons für Gly54 und Ala oder Asp55 GGCGMC (M=A oder C). Es muß daher in 50% der GT-Gene der Bibliothek eine *Bbe*I-Restriktionsstelle vorhanden sein.

PCR-Fragment zur Herstellung der Gene GT1H3S, GT1H3R und GT1H3SR

Mittels der Primer LHS1, LHS2 oder LHS3 wurde in H3 das Codon 226 so verändert, daß es künftig statt für Gly für Ser bzw. Arg bzw. Ser-Arg (Codons 226 und 227) codiert.

PCR-Programm:

7´00´´ Initial	97°C
1´30´´	95°C
1´00´´	49°C
1´00´´	72°C
10´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen: *Taq*-Polymerase 2,5 U, Reaktionsvolumen: 50 µl, 20% Glycerin, 180µM dNTP Endkonzentration, Primer: LHS1, LHS2 oder LHS3 und T7, Primerkonzentration: je 10 pmol. Als Template diente pBSK-H3 (pBSK-H3S zur Herstellung von pBSK-H3SR).

2.10.2 Genexpressionskonstrukt für *urdM*

Das Gen *urdM* wurde mit den Primern M1 und M2 (siehe 2.10.7) per PCR amplifiziert. Template war das Plasmid p2-10 (siehe 2.4.2). Durch die Primer wurde vor dem Initiationscodon eine *Bam*HI-Stelle, nach dem Terminationscodon eine *Eco*RI-Stelle eingeführt.

PCR-Programm:

5´00´´ Initial	96°C
1´30´´	95°C
1´00´´	65°C
2´00´´	72°C
10´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen: *Pfu*-Polymerase 2,5 U, 20% Glycerol, 180µM dNTP Endkonzentration, Primerkonzentration: je 40 pmol.

Das 2.0 kb Amplifikat wurde mit *Eco*RI und *Bam*HI restringiert, gelgereinigt und in die entsprechend geöffneten Vektoren pBSK$^-$ und pRSETb (siehe 2.4.1) inseriert. Dies ergibt die Plasmide pBSK-urdM und pRSETb-urdM (Abb. 46).

2.10.3 Konstrukte für *urdGT1b* – Expression in *E.coli*

Das Gen *urdGT1b* wurde per PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren amplifiziert, um es sowohl als Fusionsprotein Glutathion-S-Transferase-UrdGT1b, als auch als N-terminal mit einem 6xHistidin-Tag versehenen Protein in *E.coli* zu exprimieren. Für die Klonierung in pGEX6-2P (siehe 2.4.1) als *gst*-Fusion wurden mittels der Primer BGF und BGR (siehe 2.10.7) eine *Eco*RI-Stelle stromaufwärts bzw. eine *Sal*I-Stelle

stromabwärts eingeführt. Für die Insertion in pRSETb (Histidin-Tag) wurden mittels der Primer BRF und BRR (siehe 2.10.7) eine *Bgl*II-Stelle stromaufwärts bzw. eine *Eco*RI-Stelle stromabwärts eingeführt. Der PCR-Primer BRF für die Klonierung in pRSETb wurde mit einer zusätzlichen *Nde*I-Stelle versehen, so daß der für den His-Tag codierende Bereich später aus pRSETb wieder entfernt und das Protein ohne irgendwelche Modifikationen exprimiert werden kann. Die beiden Expressionsplasmide sind pRSET-1b und pGEX-1b (Abb. 44 und 47).

PCR-Programm:

5´00´´ Initial	98°C
1´10´´	95°C
1´00´´	64°C
2´00´´	72°C
7´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen: *Pfu*-Polymerase 4 U, Hotstart, 20% Glycerin, 200µM dNTP Endkonzentration, Primerkonzentration: 50 pmol. Als Template diente ein 1,9 kb *Hin*dIII/*Eco*47III-Fragment des Plasmids s5 (siehe 2.4.2).

2.10.4 Konstrukte für *urdGT1b* – Expression in *S. fradiae* XTC

Zur Herstellung eines Gens, das für UrdGT1b mit einem C-terminalen 6xHistidin-Tag codiert, wurden die Primer SP-F und SP-R (siehe 2.10.7) verwendet, ersterer führt eine *Hin*dIII-Schnittstelle, letzterer führt die sechs Histidin-Codons und eine *Xba*I-Stelle ein. Die sechs Histidin-Codons wurden (entsprechend der Codon-Verwendung im Urdamycin-Cluster) in einem Verhältnis 2:1 von CAC:CAT gewählt. Das PCR-Amplifikat wurde in pUWL201 sowie pBluescript (siehe 2.4.1) über *Hin*dIII/*Xba*I einkloniert und ergab Plasmid pUWL-GT1bHIS (Abb. 48).

PCR-Programm:

5´00´´ Initial	98°C
1´10´´	95°C
1´00´´	55°C
2´00´´	72°C
7´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen: *Pfu*-Polymerase 4 U, Hotstart, 20% Glycerin, 200 µM dNTP Endkonzentration, Primerkonzentration: 50 pmol. Template war pUWL-GT1b mit *Kpn*I linearisiert (siehe 2.4.2).

2.10.5 Konstrukte für *urdR* – Expression in *E.coli*

Das Gen *urdR* wurde per PCR amplifiziert: Für die Klonierung in pQE-60 (siehe 2.4.1) über die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Bgl*II dienen die Primer RCF und RCR (siehe 2.10.7). In pQE-60 wird das Protein mit C-terminalem 6xHis–Tag exprimiert.

PCR-Programm:

5´00´´ Initial	98°C
1´00´´	95°C
1´00´´	65°C
1´00´´	72°C
7´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen *Pfu*-Polymerase 4 U, Hotstart, 20% Glycerin, 200µM dNTP Endkonzentration, Primerkonzentration: 50 pmol. Als Template diente das Plasmid pR (siehe 2.4.2). Die Insertion des PCR-Amplifikates in pQE-60 (*Nco*I/*Bgl*II) ergab das Plasmid pQE-R (Abb.45).

2.10.6 Nachweis Geninaktivierung durch PCR

Der Nachweis auf Crossover-Ereignisse erfolgte per PCR. Nach einem einfachen Crossover befinden sich zwei Kopien des zu inaktivierenden Gens auf dem Chromosom: das Wildtyp- und das mutierte Allel. In dieser Arbeit wurden für *urdR* und *urdZ3* Leserasterverschiebungen infolge einer zerstörten Restriktionsstelle zur Inaktivierung gewählt. Wildtyp- und mutiertes Allel unterscheiden sich dann lediglich in An- bzw. Abwesenheit dieser Restriktionsstelle. Durch spezifisches Amplifizieren des zu inaktivierenden Gens vom Chromosom per PCR und nachfolgender Restriktion kann An- und/oder Abwesenheit dieser Restriktionsstelle nachgewiesen und so eine Aussage getroffen werden, ob sich nur das Wildtypallel und/oder das mutierte Allel im Chromosom befindet.

urdR-Inaktivierung

Nach Verwendung von Zellmaterial der zu untersuchenden *S.fradiae* Einfach-Crossover-Mutante R-4, des Wildtyps und Plasmid pR zur Kontrolle, sowie der Primer urdRF und urdRR (siehe 2.10.7) wird je ein 810 bp-Amplifikat erwartet. Es wurde anschließend einer Restriktion mit *Sal*I und *Spl*I unterzogen, ersteres Enzym wurde zur Kontrolle auf spezifische Amplifikation von *urdR* gewählt, durch Zerstörung einer *Sal*I-Erkennungsstelle wurde die Leserahmenverschiebung in *urdR* eingeführt.

PCR-Programm:

5´00´´ Initial	95°C
1´30´´	95°C
1´00´´	54°C
2´00´´	72°C
10´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen *Taq*-Polymerase 3 U, Reaktionsvolumen: 50 µl, 20% Glycerin, 200µM dNTP Endkonzentration, Primerkonzentration: 50 pmol. Identische Bedingungen dienten dem Nachweis des Genaustausches infolge doppelten Crossovers bei der Mutante RN-435

urdZ3-Inaktivierung

Nach Verwendung von Zellmaterial der zu untersuchenden *S.fradiae* Einfach-Crossover-Mutante Z3-14, des Wildtyps und Plasmid pZ3 zur Kontrolle, sowie der Primer urdZ3F und urdZ3R (siehe 2.10.7) wird je ein 1150 bp-Amplifikat erwartet. Es wurde anschließend einer Restriktion mit *Acc*I und *Bsp*EI unterzogen, ersteres wiederum zur Kontrolle auf spezifische Amplifikation, durch Zerstörung einer *Bsp*EI-Erkennungsstelle wurde die Leserahmenverschiebung in *urdZ3* eingeführt.

PCR-Programm:

9´00´´Initial	95°C
1´30´´	95°C
1´00´´	63°C
2´00´´	72°C
10´00´´ Ende	72°C
30 Zyklen	

Weitere Bedingungen *Taq*-Polymerase 3 U, Reaktionsvolumen: 50 µl, 20% Glycerin, 200µM dNTP Endkonzentration, Primerkonzentration: 50 pmol. Identische Bedingungen dienten dem Nachweis des Genaustausches infolge doppelten Crossovers bei der Mutante Z3-148.

2.10.7 Primer

Name	Sequenz (relevante Restriktionsstelle(n) fett)	Restriktionsstelle	Länge (nt)	T_m (°C)
PAP	5´-CGCCCG**CTCGAG**ACGCGTCCG**CCGCGG**GCG CCTGAGTCGATGGGCGGG-3´	*Xho*I/*Sac*II	48	54.7
V	5´-GAGCGCCCG**CTCGAG**GTGCGT**CCGCGG**CCGG -3´	*Xho*I/*Sac*II	31	95.3
GPDQ	5´- GGACGCAC**CTCGAG**CGGCCGCTGATCCGGCCCC AACCCGGCGACCAAC-3´	*Xho*I	48	99.6
AVR	5´-GTCTCGA**GCGGCCGC**TGATCCGGC**CCTAGG**C CGGCGACCAAC -3´	*Not*I/*Avr*II	42	95.1
CON	5´- GATCCGGC**CCTAGG**CCGGCGAGCAACTTGGCC TCCCCGTTGAACGGGGCGCCGATGCTCACCGCGTTGA GC-3´	*Avr*II	71	53.6
REV	5´-AGAGAAGG**CCTAGG**GCCGGATCAGCGGCCG CTCGAGGTGCGTCCGCGGC-3´	*Avr*II	49	97.5
WOB	5´- GATCCGGC**CCTAGG**CCGGCGASCAACWTGKCS TCCMCGTKGAACSR**GKCGCC**GAYGYTCACCGCGTTG AGC-3´	*Avr*II/*Bbe*I bei 50% der Amplifikate	71	97.1
	W=A+T, S=C+G, K=G+T, Y=C+T, R=A+G, M=A+C			
LHS1	5´-CGCCCACA**GAATGC**CCCGCATCAACGGCACCCC GTTCAACGCCAACGTACTACCGATGGTGAC -3´	*Bsm*I	63	51,4
LHS2	5´-CGCCCACA**GAATGC**CCCGCATCAACGGCACCCC GTTCAACGCCAACGTCCGACCGATGGTGAC -3´	*Bsm*I	63	51.2
LHS3	5´-CGCCCACA**GAATGC**CCCGCATCAACGGCACCCC GTTCAACGCCAACGTCCGACTACCGATGGTGAC -3´	*Bsm*I	66	50.9
M1	5´-AGGACA**GGATCC**GCATATGGTCGCGCCCTC-3´	*Bam*HI	30	66.9
M2	5´-GAGACCTCCAG**GAATTC**GATGAGCATGTTC-3´	*Eco*RI	30	62.8
BGF	5´- CAGGGA**GAATTC**CGATGCGTGTAC-3´	*Eco*RI	24	54,0
BGR	5´- ACGCCC**GTCGAC**CTGACATCACAG-3´	*Sal*I	24	57,1
BRF	5´- GCAGGG**AGATCTCATATG**CGTGTACTGATG-3´	*Bgl*II/*Nde*I	30	58,0
BRR	5´- GTACTC**GAATTC**CCGTGGGCCTGACATCAC-3´	*Eco*RI	27	61,2
RCF	5´- GGACGAC**CCATGG**ACATTGTGG-3´	*Nco*I	22	53,4
RCR	5´- CTTCGGG**AGATCT**GATACGGACGGC-3´	*Bgl*II	25	56,0
urdRF	5´- ATGTGTCA**CTGCAG**CACAGAGATCAGG-3´	*Pst*I	27	61,1
urdRR	5´- TTCAGAAAGCATCA**GAATTC**TCCCGTG-3´	*Eco*RI	27	58,1
urdZ3F	5´- GAAGAGCATC**GAGCTC**GGCGGGGACAG-3´	*Sac*I	27	67,2
urdZ3R	5´- ACCTCTTC**CTGCAG**CAGTTCCTTGCGG-3´	*Pst*I	27	64,1
SP-F	5´- TATCGAT**AAGCTT**CAATTGCAGG -3´	*Hin*dIII	23	63,9
SP-R	5´- TAGTAG**TCTAGA**TCAGTGATGGTGGTG ATGGTGCAGGCCGGCCAGCCG-3´	*Xba*I	48	89,4

2.11 Proteinexpression/-reinigung/-analyse

Bei allen Proteinexpressionen wurde die denaturierende Acrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Kontrolle der Expression und ggf. Reinigung verwendet. Durchführung entsprechend Gebrauchsanweisung für die Protein-Gelkammer (Mini-Protean II, Biorad, München). Nach dem Gellauf wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel 5-10 Minuten in Färbelösung gefärbt, anschließend in Entfärbelösung (mehrmaliger Wechsel) einige Stunden bis zum gewünschten Grad entfärbt. Das Gel wurde anschließend über Nacht in 10% Glycerinlösung aufbewahrt, dann zwischen zuvor befeuchtetem Cellophanpapier blasenfrei eingelegt, in einen Geltrocknungsrahmen eingespannt und bei Raumtemperatur drei Tage getrocknet.

Expression UrdR

Vorkultur: Von Platte wurde je eine Einzelkolonie *E.coli* XL 1 blue, transformiert mit pQE-R (siehe 2.10.5) bzw. dem leeren Vektor pQE-60 zur Kontrolle, in 100 ml LB-Flüssigmedium (Carbenicillin 50/µg/ml) unter Standardbedingungen über Nacht inkubiert.

Hauptkultur: 100 ml Hauptkultur (LB-Flüssigmedium, Carbenicillin 50/µg/ml) wurden mit 1 ml Vorkultur inokuliert und bei 37°C inkubiert. Bei OD_{600} ca. 0.5-0.6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Inkubation bei 37°C. Bei Induktion, nach 1h, 2h und 4h Inkubationsdauer wurde jeweils 1 ml Kultur entnommen und durch kurzes Zentrifugieren bei 10.000 g geerntet**.** Nach vier Stunden wurden zusätzlich die gesamten Kulturen (ca. 95 ml) geerntet.

Proteinreinigung: UrdR wurde unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Die geernteten Kulturen wurden mit Lysispuffer resuspendiert und das Protein unter nativen Bedingungen gereinigt, wie vom Hersteller des Ni-NTA-Säulenmaterials beschrieben (Qiagen, Valencia, CA, USA). Modifikationen: Auf die Beschallung mit einem Ultraschallstab wurde verzichtet, es wurde RNase A (10 µg/ml) zum Lysat gegeben.

Expression UrdM

Vorkultur: Von Platte wurde je eine Einzelkolonie *E.coli* BL21 (DE 3) x pLysS, transformiert mit pRSETb-urdM (siehe 2.10.2) bzw. dem leeren Vektor pRSETb zur Kontrolle, in 100 ml NZCYM-Flüssigmedium (Carbenicillin 50/µg/ml, Chloramphenicol 34µg/ml) unter Standardbedingungen über Nacht inkubiert.

Hauptkultur: 100 ml Hauptkultur wurden mit 1 ml Vorkultur inokuliert und bei 37°C inkubiert. Bei OD_{600} ca. 0.5-0.6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM (Endkonzentration) IPTG induziert. Inkubation bei 37°C. Bei Induktion, nach 1h, 2h und 4h Inkubationsdauer wurde jeweils 1 ml Kultur entnommen und durch kurzes Zentrifugieren bei 10.000 g geerntet**.** Nach vier Stunden wurden zusätzlich die gesamten Kulturen (ca. 95 ml) geerntet.

Expression UrdGT1b mit N-terminalem Histidin-Tag in *E.coli*

Vorkultur: Von Platte wurde je eine Einzelkolonie *E.coli* BL21 (DE 3) x pLysS, transformiert mit pRSET-1b (siehe 2.10.3) bzw. dem leeren Vektor pRSETb zur Kontrolle, in 100 ml NZCYM-Flüssigmedium (Carbenicillin 50/µg/ml, Chloramphenicol 34µg/ml) unter Standardbedingungen über Nacht inkubiert.

Hauptkultur: 100 ml Hauptkultur wurden mit 1 ml Vorkultur inokuliert und bei 37°C inkubiert. Bei OD_{600} ca. 0.5-0.6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM (Endkonzentration) IPTG induziert. Inkubation bei 37°C. Bei Induktion, nach 1h, 2h und 4h Inkubationsdauer wurde jeweils 1 ml Kultur entnommen und durch kurzes Zentrifugieren bei 10.000 g geerntet**.** Nach vier Stunden wurden zusätzlich die gesamten Kulturen (ca. 95 ml) geerntet.

Proteinreinigung: UrdGT1b sollte unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden. Vorgehen wie für UrdR beschrieben.

Expression Fusionsprotein Glutathion-S-Transferase-UrdGT1b in *E.coli*

Die *E.coli*-Stämme BL21 (DE3) x pLysS und Origami (DE3), transformiert mit pGEX-1b (siehe 2.10.3) bzw. mit dem Vektor pGEX6-2P, wurden unter folgenden Parametern für die Proteinexpression kultiviert:

Medium (Vor- und Hauptkultur)	Temperatur vor/ während Induktion (°C)	IPTG-Konzentration	$MgCl_2$	Induktionsdauer	Stamm
NZCYM	37/37	1 mM	-	4 h	BL21 (DE3) x pLysS und Origami (DE3)
NZCYM	37/28	1 mM	-	4 h	BL21 (DE3) x pLysS und Origami (DE3)
NZCYM	37/28	1 mM	5 mM	4 h	BL21 (DE3) x pLysS
NZCYM	37/28	1 mM	10 mM	4 h	BL21 (DE3) x pLysS
NZCYM	37/28	1 mM	20 mM	4 h	BL21 (DE3) x pLysS
LB-Betain/Sorb.	28/28	1 mM	-	3 h	BL21 (DE3) x pLysS
NZCYM	28/22	1 mM	5mM	3 h	BL21 (DE3) x pLysS
NZCYM	28/28	0,5 mM	10 mM	3 h	BL21 (DE3) x pLysS
NZCYM	22/13 *	100 µM	10 mM	24 h	BL21 (DE3) x pLysS
NZCYM	22/13 *	20 µM	10 mM	20 h	BL21 (DE3) x pLysS
NZCYM	22/13 *	2 µM	10 mM	24 h	BL21 (DE3) x pLysS

*Der Stamm wurde mit 1% einer Übernachtkultur angeimpft und bis auf OD_{600}=0.45 angezogen. Dann 30 Min. bei 13°C, erst dann wurde induziert.

Proteinreinigung: Das Fusionsprotein GST-UrdGT1b sollte unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden. 300 ml Kultur wurden geerntet, in 30 ml Lysispuffer resuspendiert und das Protein gereinigt, wie vom Hersteller des Glutathion-Sepharoseharzes beschrieben (Amersham-Pharmacia, Freiburg). Modifikationen: Der Aufschluß erfolgte mit einem Hochdruck-Zellaufschlußgerät (Constant Systems, Northants, UK), 0,18 mm Düse, 1,7 kbar Druck.

Proteinsequenzierung/Rechnergestützte Sekundärstruktur-Voraussage: Die 16 N-terminalen Aminosäuren von löslichem GST-UrdGT1b-Protein wurden mit einem Applied Biosystems 477A Proteinsequenzierer bestimmt. Die Arbeiten wurden von Dr. Emile Schiltz, Lehrstuhl für Biochemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, durchgeführt. Sekundärstruktur-Voraussagen für Proteine erfolgten mit der PhD-Software (Rost und Sander, 1993, Rost *et al.*, 1994, Rost und Sander, 1994) oder PSIPRED (Jones, 1999).

Expression UrdGT1b mit C-terminalem Histidin-Tag in *S.fradiae* XTC

Kultur: Von einer Transformations-Platte wurden Einzelkolonien von *S.fradiae* XTC, transformiert mit pUWL-1bHIS bzw. pUWL-GT1b zunächst in 20 ml NL111V-Flüssigmedium unter Standardbedingungen inkubiert (siehe 2.5.2) und die Urdamycine extrahiert. Nachdem festgestellt wurde, daß alle Transformanden ein identisches Urdamycin-Produktionsspektrum besitzen, also UrdGT1b auch als C-terminale 6xHistidin-Fusion funktionell ist, wurde jeweils ein UrdGT1b-HIS-exprimierender und ein UrdGT1b-exprimierender Stamm in 100 ml CRM-Flüssigmedium weiterkultiviert (44 h bei Standardbedingungen).

Ernte/Aufschluß/Proteinreinigung:

- Ernte bei 3000 g für 5 min, +4°C
- Resuspendieren der Biomasse in 20 ml Lysispuffer+10mg/ml Lysozym (siehe 2.1.1)
- 20 min auf Eis
- Aufschluß mit Constant Systems Hochdruck-Zellaufschlußgerät, 0,18 mm Düse, 1,7 kbar Druck
- Zentrifugation des Lysats bei 10.000 g für 30 min, +4°C
- Aufreinigung an der Nickelsäule nach Herstellerangabe (Qiagen, Valencia, CA, USA). Modifikationen: Es wurde 6 ml Ni-NTA-Säulenmaterial eingesetzt. Sechs Elutionen (je 500 µl Elutionspuffer mit

unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen) im Stufengradienten 125mM/250mM/500mM/500mM/1000 mM/1000mM Imidazol.

Proteinanalyse: Die 16 N-terminalen Aminosäuren von löslichem UrdGT1b-HIS wurden ebenfalls von Dr. Emile Schiltz sequenziert.

2.12 Analyse der Naturstoffproduktion

2.12.1 Isolation der Sekundärstoffe aus *Streptomyces fradiae*

Extraktion im analytischen Maßstab

1 ml Produktionskultur (5-6 d) wurden mit 1 ml Ethylacetat vesetzt, kräftig geschüttelt und 30 Minuten unter gelegentlichem Schütteln aufbewahrt. Die organische Phase wurde abgenommen, zur Trockne einrotiert und in 100 µl Methanol gelöst. Der so gewonnene Extrakt wurde für DC, HPLC sowie HPLC-MS eingesetzt.

Extraktion im präparativen Maßstab

Zur präparativen Isolation von Urdamycin-Derivaten aus *S.fradiae* RN-435 wurden mit einer 65 h alten Vorkultur 3 l bzw. 15 l Hauptkultur angeimpft und diese nach 48 h mit Celite 545 versetzt (ca. 1-2 gehäufte Löffelspatel pro 100 ml Kultur), dann wurde über eine Filterpresse das Mycel vom Medium getrennt. Das Filtrat, ca. 2,3 l bzw. ca 11 l, wurde dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt, bei schlechter Phasentrennung 20-200 ml Aceton zugegeben, die organischen Phasen vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt, anschließend wurde der Extrakt in 100 ml bzw. 500 ml Methanol resuspendiert und zur ersten Reinigung mit dem gleichem Volumen n-Pentan ausgeschüttelt. Die Pentan-Phase wurde verworfen.
Identische Bedingungen wurden zur Urdamycin P-Produktion mit *S.fradiae* XTC+GT0101 verwendet, das Gesamtvolumen der Hauptkultur war jedoch 4 l, auf den Reinigungsschritt mit n-Pentan wurde verzichtet. Rohextrakte wurden für die präparative Substanzreinigung und anschließende NMR-Analyse eingesetzt.

2.12.2 Reinigung neuer Urdamycine

Reinigung Urdamycin P

Urdamycin P wurde aus dem Rohextrakt von vier Litern Kultur in vier präparativen HPLC-Läufen (siehe 2.12.5) isoliert (durchgeführt von Graham Foster, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage, Hertfortshire, UK). Die Urdamycin P-haltigen Fraktionen wurden vereint, mit dem gleichen Volumen H_2O bidest. verdünnt und nochmals per präparativer HPLC gereinigt. Die Urdamycin P–haltige Fraktion wurde wieder mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und auf eine Isoelute Env+ 500 mg Säule (International Sorbent Technology Ltd., Dyffryn Park, Wales) readsorbiert, mit 10 ml H_2O bidest. gewaschen, mit 10 ml Methanol eluiert und anschließend im Vakuum getrocknet.

Reinigung der Urdamycine M und R-T

Für die Fraktionierung und erste Reinigung des Rohextraktes aus 15 Litern Kultur wurde eine Sephadex LH-20 Säule, 100x5 cm (Amersham-Pharmacia, Freiburg) verwendet, Laufmittel war Methanol, der Fluß 100 ml/h. Die Eluate wurden zu acht Fraktionen (A-H) vereinigt und am Rotationsverdampfer getrocknet. Die Fraktionen A, D, G und H wurden in je 1 ml Methanol aufgenommen und per präparativer HPLC einzelne Substanzen aufgereinigt.

2.12.3 Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Rohextrakt und aufgereinigten Fraktionen wurden wie folgt ausgeführt:

Stationäre Phase:	Kieselgel 60 F_{254} (Merck)
Mobile Phase:	Dichlormethan: Methanol 9:1, Chloroform: Methanol 9:1 oder Dichlormethan: Methanol: Ethylacetat 8:1:1, v/v
Trennstrecke:	15-18 cm
Aufgetragenes Volumen:	5-10 µl in Methanol gelöster Rohextrakt

2.12.4 Analytische Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Sekundärstoff- Analyse von *S.fradiae* RN-435 und Z3-148

(durchgeführt an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Pharmazeutische Biologie)

Gerät:	HPLC-Gerät: Series II, Modell 1090 (Hewlett Packard).
Säule:	Reversed Phase RP-18-Säule (ODS Hypersil, Korngröße 5 µm, 200x2,1 mm)
Injiziertes Volumen:	10µl in Methanol gelöster Rohextrakt
Fluß:	300 µl/min
Detektion:	Diodenarray, λ=200-600 nm
Laufmittel A:	H_2O (0,1% H_3PO_4, v/v)
Laufmittel B:	Acetonitril (0,1% H_3PO_4, v/v)

Linearer Gradient:

Zeit (min)	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0,1	95	5
10	90	10
20	75	25
30	70	30
40	60	40
42	58	42
43	5	95
53	95	5
60	95	5

Sekundärstoff-Analyse von *S.fradiae* RN-435, Z3-148, sowie AX und XTC nach GT-Genexpression

(durchgeführt von Prof. Dr. Koji Ichinose, The University of Tokyo, Tokyo, Japan).

Gerät:	Tosoh SC-8020 oder Hewlett Packard 1000 series
Säule:	Tosoh TSK-Gel ODS-80, 150 x 4.6 mm, 3.5µm Korngröße
Injiziertes Volumen:	10µl in Methanol gelöster Rohextrakt
Fluß:	800 µl/min
Detektion:	Diodenarray, λ=250-500 nm
Laufmittel A:	H_2O (0,5% Essigsäure, v/v)
Laufmittel B:	Acetonitril (0,5% Essigsäure, v/v)

Linearer Gradient:

Zeit (min)	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0-5	70	30
5-20	70-55	30-45
20-25	55-5	45-95
25-30	5	95
30-35	5-70	95-30

Analyse des Sekundärstoffspektrums von *S.fradiae* AX und XTC nach Expression der GT-Genbibliothek

(durchgeführt im GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage, Hertfortshire, UK)

Gerät:	Agilent HP 1100 series integrated system
Säule:	Thermoquest Hypersil HyPurity Elite C-18 (150x4.6 mm, 3µm Korngröße)
Injiziertes Volumen:	5 µl in Methanol gelöster Rohextrakt
Fluß:	1000 µl/min
Detektion:	Diodenarray, λ=190-600 nm
Laufmittel A:	10% Acetonitril in H_2O + 10mM Ammoniumacetat
Laufmittel B:	90% Acetonitril in H_2O + 10mM Ammoniumacetat

Linearer Gradient:

Zeit (min)	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	85	15
20	85-10	15-90
21	5	95
23	5	95
24	85	15
27	85	15

2.12.5 Präparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

HPLC zur Aufreinigung der Urdamycine M und R-T

(durchgeführt an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Pharmazeutische Biologie)

Gerät:	Waters 510 Pumpen und Waters 486 UV-VIS-Detektor
Säule:	Macherey&Nagel Hypersil RP-18-Säule (200x2,1 mm, 5 µm Korngröße)
Injiziertes Volumen:	pro Lauf 50 µl in Methanol gelöster vorgereinigter Extrakt
Fluß:	600 µl/min
Detektion:	λ=254 nm
Laufmittel A:	H_2O
Laufmittel B:	Acetonitril:Methanol 5:1, v/v

Linearer Gradient:

Zeit (min)	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0-5	70	30
5-8	70-60	30-40
8-9	60	40
9-11	60-50	40-50
11-19	50-0	50-100
19-22	0	100
22-23	0-70	100-30

HPLC zur Aufreinigung von Urdamycin P

(durchgeführt von Graham Foster, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage, Hertfortshire, UK)

Gerät:	Gilson 306 Pumpe und Gilson 118 UV-VIS Detektor
Säule:	Kromasil C-8 (250x 21.0 mm, 5µm Korngröße)
Injiziertes Volumen:	4x2 ml in Methanol gelöster Rohextrakt
Fluß:	15 ml/min
Detektion:	λ=254 nm
Laufmittel A:	H_2O + 10mM Ammoniumacetat
Laufmittel B:	80% Acetonitril in H_2O + 20mM Ammoniumacetat

Linearer Gradient:

Zeit (min)	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0-75	100-40	0-60
75-90	40	60

2.12.6 Massenspektroskopie

(durchgeführt von Prof. Dr. Koji Ichinose)

Gerät:	Hewlett Packard 1000 series, gekoppelt an ein Thermoquest LCQ-Massenspektroskop
Säule:	Tosoh TSK-Gel ODS-80, 150 x 4.6 mm, 3.5µm Korngröße
Injiziertes Volumen:	10µl in Methanol gelöster Rohextrakt
Ionisation:	atmospheric pressure chemical ionization (APCI), positiver und negativer Ionisationsmodus
Fluß:	800 µl/min
Detektion:	λ=254 nm
Laufmittel A:	H_2O (0,5% Essigsäure, v/v)
Laufmittel B:	Acetonitril (0,5% Essigsäure, v/v)

Linearer Gradient:

Zeit (min)	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0-5	70	30
5-20	70-55	30-45
20-25	55-5	45-95
25-30	5	95
30-35	5-70	95-30

Linearer Gradient für Urdamycin R und S:

Zeit (min)	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0-5	55	45
5-25	55-5	45-95
25-30	5	95
30-35	5-55	95-45

Eine zusätzliche Untersuchung für Urdamycin P wurde von Dr. Nicholas Taylor, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage, Hertfortshire, UK, mit einem Finnegan MAT-Massenspektroskop mit Direktinjektion der Probe und chemischer Ionisation (APCI) durchgeführt.

2.12.7 Hydrolyse

(durchgeführt im Institut für Organische Chemie der Universität Hannover)

Die Abspaltung O-glycosidisch gebundener Zucker im Urdamycin S-Molekül erfolgte durch saure Hydrolyse:

0.2 M HCl in wasserfreiem Methanol herstellen (285 µl Acetylchlorid mit 20 ml Methanol Lichrosolv vermischen). Substanz in einigen ml 0.2 M HCl in Methanol lösen, Hydrolysedauer etwa 1 h. Hydrolysefortschritt durch Entnahme einer Probe alle 15-20 min zur DC-Analyse kontrollieren. Um nach der Hydrolyse den abgespaltenen Zucker zu entfernen wird das Reaktionsgemisch zur Trockne einrotiert, in Dichlormethan gelöst und auf einer Miniatur-Kieselgelsäule gereinigt.

- Wattepfropf in den verjüngten Bereich einer Pasteurpipette
- Mit Kieselgel 60 befüllen (dieses aufgeschlämmt in Dichlormethan, im Ultraschallbad von Luftblasen befreit)
- Unter ständigem Klopfen sedimentieren lassen
- Probe (in Dichlormethan gelöst) auftragen
- Säule mit Laufmittel beladen (19:1 Dichlormethan:Methanol, v/v)
- Urdamycin-haltige Fraktionen auffangen
- Kontrolle durch DC
- Fraktionen ggf. vereinen.

2.12.8 Kernresonanzspektroskopie

Urdamycine K, M, R-T

Die ^{1}H-Spektren der Urdamycine K, M, R-T sowie Tetrangomycin wurden mit einem JEOL JNM alpha 500 bei 500 MHz, die ^{13}C-Spektren bei 125 MHz gemessen, Lösungsmittel war d_6-Aceton. Die Messungen wurden von Prof. Dr. Koji Ichinose durchgeführt.

Urdamycin N

Das ^{1}H-Spektrum des Urdamycins N wurde mit einem Varian VXR 400 bei 400 MHz gemessen, Lösungsmittel war ebenfalls d_6-Aceton. Die Messung erfolgte durch Prof. Dr. Jürgen Rohr, Medical University of South Carolina, Charleston SC, USA.

Urdamycin P

^{1}H- und ^{13}C-Spektren von Urdamycin P wurde mit einem Bruker AMX 500 bei 500 MHz vermessen, Lösungsmittel war CD_3OD. Die Messung erfolgte durch Dr. Philip J. Sidebottom, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage, Hertfortshire, UK.

Urdamycin S

^{1}H- und ^{13}C-Spektren des Hydrolyseproduktes von Urdamycin S wurde von Dr. Gerald Dräger, Universität Hannover, mit einem Bruker AMX 400 bei 400 bzw. 100 MHz gemessen, Lösungsmittel war d_6-Aceton.

2.13 Chemikalienliste

Enzyme

AmplitaqGold-Polymerase	PerkinElmer (Norwalk, CT, USA)
Kalbs-Intestinal-Phosphatase	Promega (Madison, WI, USA)
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
Lysozym	Serva (Heidelberg)
Restriktionsendonucleasen	Amersham-Pharmacia, NEB (Beverly, MA, USA), Stratagene (La Jolla, CA, USA), Promega
RNase A	QIAGEN (Hilden)
T4-DNA-Ligase	Promega
T4-DNA-Polymerase	Promega
Taq-Polymerase	Promega
Pfu-Polymerase	Promega
Thermo Sequenase	USB (Cleveland, OH, USA)

Puffer- und Medienbestandteile

Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Betain	Fluka (Taufkirchen)
Casaminosäuren	Becton Dickinson
EDTA	Serva
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Glucose	Sigma (Taufkirchen)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
HCl	Roth
Hefeextrakt	Becton Dickinson
Lab Lemco-Fleischextrakt	Oxoid (Wesel)
Lauroylsarcosin	Serva
L-Glycin	Roth
L-Prolin	Fluka
Malzextrakt	Becton Dickinson
Magermilchpulver	Nestlé (Frankfurt)
NaOH	Roth
Nutrient Broth	Becton Dickinson
NZCYM broth	Becton Dickinson
PEG 1000	Roth
Pepton	Becton Dickinson
Saccharose	Becton Dickinson , Südzucker (Mannheim)
Salze für Medien/Puffer	Merck, Fluka, Roth
SDS	Roth
Sorbitol	Fluka
TES	Roth
Tris	USB
Tris-Maleat	Roth
Tryptic Soybroth	Becton Dickinson
Trypton	Becton Dickinson
Tween 20/ Tween 80	Roth
Alle sonstigen, nicht aufgeführten Bestandteile	Merck

Organische Lösungsmittel

Aceton	Merck
Acetonitril	Merck
Chloroform	Merck
Dichlormethan	Merck
Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Ethanol	Merck, Universitätsapotheken Tübingen, Kiel, Freiburg
Ethylacetat	Merck, Universitätsapotheken Tübingen, Kiel, Freiburg

Isopropanol	Merck
Methanol	Merck, Merck, Roth
n-Pentan	Merck

Antibiotika

Apramycin	Fluka
Carbenicillin	Roth
Chloramphenicol	Fluka
Tetracyclin	Sigma
Thiostrepton	Fluka

Sonstiges

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agarose	USB
Ammoniumpersulfat	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Celite	Merck
dNTP-Mix	Promega
Ethidiumbromid	Roth
IPTG	Roth
1 kb-Längenstandard	Promega
Protein-Längenstandard	Amersham-Pharmacia
Phenol/Chloroform	Roth
Sequenziergel (gebrauchsfertig)	USB
TEMED	Roth
Triton X-100	Sigma
X-Gal	Roth
Xylene Cyasol FF	Sigma

3. Ergebnisse

3.1 UrdR und UrdZ3 – Zwei Ketoreduktasen in der Urdamycin-Biosynthese

3.1.1 Hintergrund

urdR und *urdZ3* sind zwei Leseraster unbekannter Funktion im Urdamycin-Biosynthesegen-Cluster (siehe Abb.7), deren Genprodukte Homologien zu dNDP-Hexose-4-Ketoreduktasen aufweisen. Diese Enzyme reduzieren die in der frühen Deoxyzucker-Biosynthese durch 4,6-Dehydratation entstandene Ketogruppe an C-4 zum sekundären Alkohol. Die Elektronen und Protonen stammen aus NADPH. Ketoreduktasen weisen typische Sequenzmotive auf, die sie als nucleotidbindende Enzyme identifizieren. Es sind die Motive GxGxxG nahe dem Aminoterminus und etwa 100 AS stromabwärts Yx_3Kx_3D/E, deren Rolle für die Cofaktor-Bindung nachgewiesen wurde (Rossmann *et al.*, 1974, Wierenga und Hol, 1983, Bauer *et al.*, 1992, He *et al.*, 1996). UrdR und UrdZ3 weisen beide Motive, z.T. leicht abgewandelt, auf (UrdR: ^{5}GNGFLA^{10}, ^{92}YGAHKLALE^{100}, siehe Abb. 33; UrdZ3: ^{5}GSGGFLG^{11}, ^{141}YGRTKLLGT^{149}).

Das Projekt, diese beiden Leseraster zu inaktivieren, verfolgte zwei Ziele, denn neben der reinen Charakterisierung der Enzyme sollte untersucht werden, ob durch das Fehlen der Ketoreduktasen in der Zelle Ketozucker entstehen und übertragen würden. Wenn ja, könnten Rückschlüsse auf die Substratstpezifität der beteiligten Glycosyltransferasen gezogen werden. Zur Inaktivierung von *urdR* und *urdZ3* wurde in beiden Fällen ein Konstrukt zur Mutation durch Leserahmenverschiebung hergestellt, um das jeweilige Wildtyp-Gen gegen das mutierte Allel auszutauschen (Wohlleben und Muth, 1993). Die Inaktivierungskonstrukte wurden in einen nicht-replikativen Vektor (bezüglich *Streptomyces*) kloniert. Diese Strategie erfordert zwei aufeinanderfolgende homologe Rekombinations-Ereignisse.

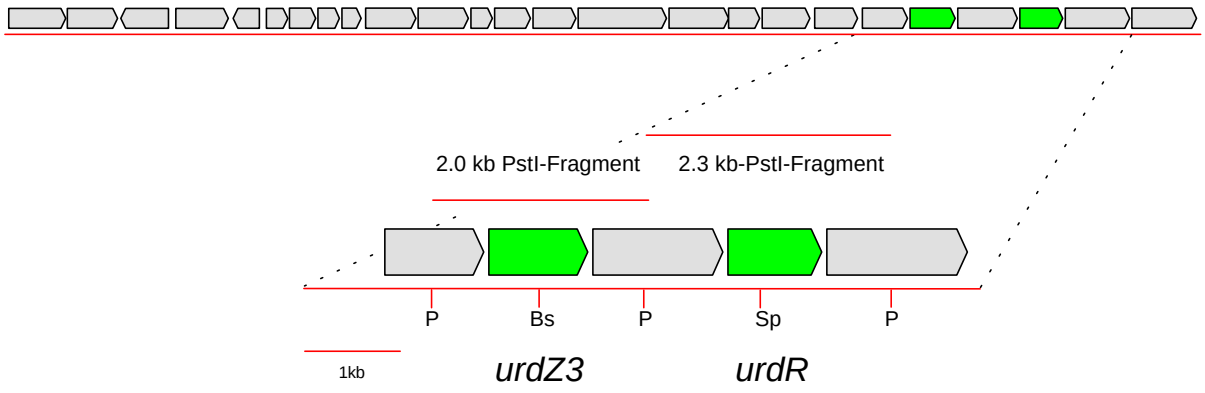


Abb. 7: Das Urdamycin-Gencluster. Die obere Zeile symbolisiert das gesamte Cluster, die Pfeile sind in Transkriptionsrichtung der jeweiligen Gene orientiert. Die Vergrößerung in der unteren Zeile gibt den Bereich mit den Genen *urdR* und *urdZ3* wieder. Die *Pst*I-Fragmente wurden zur Herstellung der Plasmide pUWLR und pUWLZ3 verwendet (siehe 2.4.2). Abkürzungen für Restriktionsstellen: Bs=*Bsp*EI, P=*Pst*I, Sp=*Spl*I.

Für jede der beiden Geninaktivierungen gliederte sich die Arbeit in folgende Schritte:

1. Herstellung des Inaktivierungskonstruktes
2. Erzeugung der Mutanten und Analyse deren Urdamycin-Produktion
3. Komplementierung und ebenfalls Analyse der Urdamycine
4. Gegebenenfalls Aufreinigung und Analyse neuer Urdamycine

3.1.2 Inaktivierung von *urdZ3* führt zur Produktion von Aquayamycin

Inaktivierung *urdZ3*

S.fradiae Tü2717 wurde mit dem Geninaktivierungskonstrukt pKCZ3 transformiert (siehe 2.8.2 und 2.9.2, sowie Abb.40). Es verleiht Resistenz gegen Apraycin. Ein apramycinresistenter Klon (Z3-14) wurde ausgewählt. Die Kultivierung zur Selektion auf ein zweites Crossover geschah prinzipiell wie in 2.5.2 beschrieben, jedoch z.T. modifiziert:

- vier aufeinanderfolgende Kultivierungen in CRM-Flüssigmedium
- anschließend zwei aufeinanderfolgende Kultivierungen auf HA+$CaCl_2$-Medium
- dann, sechsmal aufeinanderfolgend, in CRM-flüssig bei +40°C
- anschließend erneut zwei aufeinanderfolgende Kultivierungen auf HA+$CaCl_2$-Medium

Aus dem letzten Schritt wurden 40 Klone vergleichend auf Apramycin-haltiges und -freies HA+$CaCl_2$-Medium überimpft, drei Klone waren sensibel gegen Apramycin. Sie wurden per PCR auf das zweite Crossover untersucht. Das Bild der Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 8) gibt den Vergleich der Positivkontrolle (PCR mit dem Plasmid pZ3 (siehe 2.4.2) als Template), sowie chromosomaler DNA des Wildtyps als weitere Positivkontrolle, und einer der drei erhaltenen Apramycin-resistenten Klone (*S.fradiae* Z3-148) wieder.

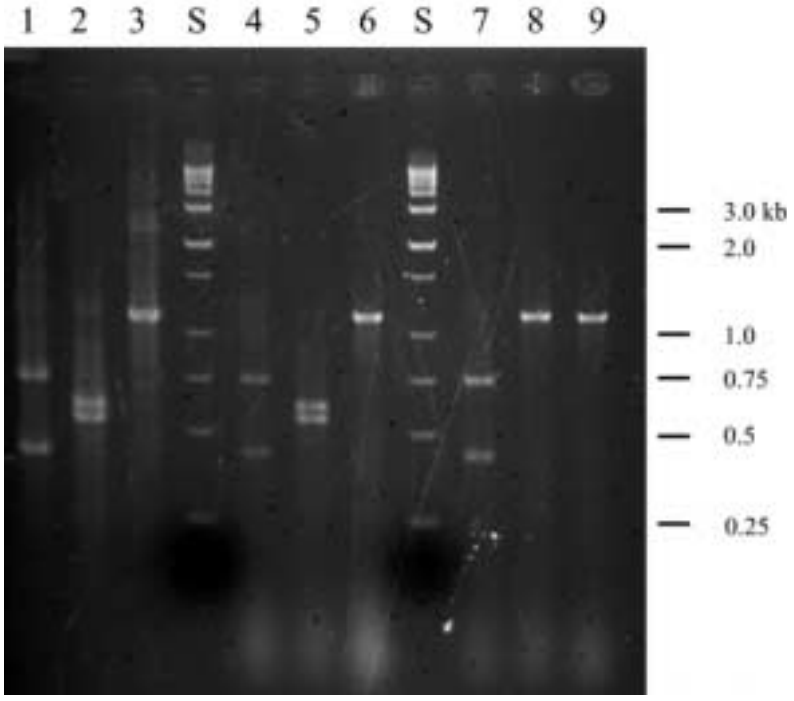


Abb. 8: Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten zum Nachweis eines Genaustausches in *S.fradiae* Z3-148. Positivkontrolle (Plasmid pZ3 als Template-DNA): Spuren 1-3 (*Acc*I-Restriktion, *Bsp*EI-Restriktion, unrestringiert). PCR mit chromosomaler DNA aus *S.fradiae* Tü2717 zur Kontrolle: Spuren 4-6 (*Acc*I-Restriktion, *Bsp*EI-Restriktion, unrestringiert). PCR mit DNA aus *S.fradiae* Z3-148 zum Nachweis der Zerstörung der *Bsp*EI-Stelle: Spuren 7-9 (*Acc*I-Restriktion, *Bsp*EI-Restriktion, unrestringiert). S: Längenstandard. Der *Acc*I-Verdau dient der Kontrolle auf spezifische Amplifikation des Gens *urdZ3*.

Restriktion	**Positivkontrolle pZ3 (1-3)**	**Positivkontrolle *S.fradiae* WT (4-6)**	***S.fradiae* Z3 -148 (7-9)**
*Acc*I	730+420	730+420	730+420
*Bsp*EI	600+550	600+550	1150
Nicht restringiert	1150	1150	1150

Tab. 1: Übersicht über die erwarteten und gefundenen DNA-Fragmentlängen zum Nachweis der Zerstörung des Leserahmens von *urdZ3*.

Das Amplifikat der Mutante kann also nicht mehr mit dem Enzym *Bsp*EI restringiert werden, da diese Stelle zum Einführen der Mutation durch Leseraster-Verschiebung zerstört wurde. Dadurch konnte der *urdZ3*$^-$-Genotyp von *S.fradiae* Z3-148 bewiesen werden.

Sekundärstoffproduktion in Mutante Z3-148

S.fradiae Z3-148 wurde zur Urdamycin-Produktion in NL 111V-Medium angezogen (siehe 2.2 und 2.5.2). Die HPLC-Analyse (siehe 2.12.4), durchgeführt an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Pharmazeutische Biologie, mit einer HP 1090 Series II, bestätigt durch Prof. Dr. Koji Ichinose, University of Tokyo, sowie LC-MS Analyse, zeigte bezüglich der Urdamycin-Produktion folgendes Ergebnis:

Stamm (mutiertes Gen)	**Retentionszeit (min)**	**UV-VIS-Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
Z3-148 *(urdZ3)*	5.59	A-Typ	486,1 (-)	Aquayamycin	13.19
	9.45	B-Typ	452,2 (-)	Urdamycinon B	12.76

Tab. 2: Details der HPLC- und LC-MS Analyse von *S.fradiae* Z3-148. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten. Abb. 12 zeigt die UV-VIS-Spektren für die Urdamycine im Vergleich.

Mit Aquayamycin und Urdamycinon B sind zwei Verbindungen als Hauptprodukte gefunden worden (siehe Abb. 9), die nur D-Olivose enthalten. Es wurden keinerlei Urdamycine, auch nicht in Spuren, gefunden, die L-Rhodinose besitzen. Daraus ergibt sich, daß die Inaktivierung von *urdZ3* spezifisch deren Biosyntheseweg unterbrach und UrdZ3 somit die dTDP-L-Cinerulose-4-Ketoreduktase ist.

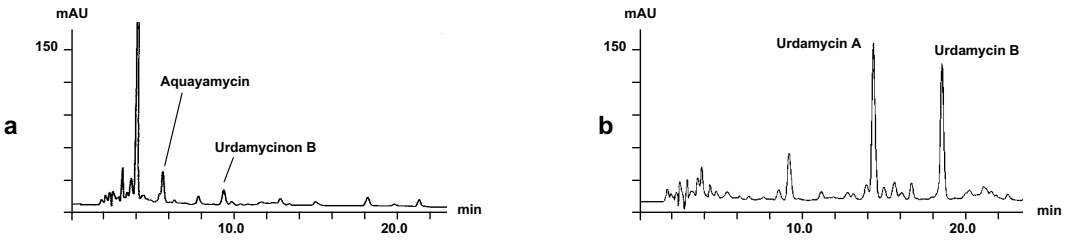


Abb. 9: HPLC-Chromatogramme von Rohextrakten aus der Mutante *S.fradiae* Z3-148 (a) und *S.fradiae* Z3-148 (b), transformiert mit pUWLZ3 (siehe 2.8.3).

Komplementierung

Die Mutante Z3-148 wurde mit dem Gen-Expressionsplasmid pUWLZ3 (siehe 2.8.3 und Abb. 40) transformiert und ihre Inhaltsstoffe per HPLC (Tübingen und Tokyo) und LC-MS (Tokyo) analysiert. Urdamycin A und B treten im Extrakt der komplementierten Mutante auf (siehe Abb. 9) und bestätigten damit den Befund, daß durch *urdZ3*-Expression tatsächlich die Mutante Z3-148 komplementiert werden kann, und somit nur das gewünschte Gen in ihr inaktiviert wurde.

Stamm (komplementiertes Gen)	**Retentions-zeit (min)**	**UV-VIS-Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
Z3-148 (*urd*Z3)	14.07 18.21	A-Typ B-Typ	844.3 (-) 696.4 (-)	Urdamycin A Urdamycin B	34.37 30.69

Tab. 3: Details der HPLC- und LC-MS Analyse von *S.fradiae* Z3-148, komplementiert mit Genexpressionsplasmid pUWLZ3 (siehe auch Abb. 9). Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten.

3.1.3 Inaktivierung von *urdR* führt zur Produktion von 14 neuen Urdamycinen

Inaktivierung *urdR*

S.fradiae Tü2717 wurde mit dem Geninaktivierungsplasmid pKCRN transformiert (siehe 2.8.2 und 2.9.2, sowie Abb. 41) und der Klon RN-4 als Einzel-Crossover-Mutante kultiviert. Die weitere Selektion wurde mit Klon RN-4 durchgeführt. Die Selektion auf ein zweites Crossover geschah wie folgt:

- RN-4 wurde zweimal aufeinanderfolgend auf HA+$CaCl_2$-Festmedium+Apramycin (siehe 2.2 und 2.5.2) inkubiert.
- Anschließend neun aufeinanderfolgende Inkubationen in CRM-Flüssigmedium ohne Antibiotikum, davon die letzten vier Passagen bei permanent +40°C, um Hitzestressbedingungen (und damit erhöhte chromosomale Rekombination) zu erzeugen.
- Erneut drei aufeinanderfolgende Inkubationen auf HA-Festmedium ohne Apramycin. Aus der letzten Kultur wurden 37 Klone vergleichend auf Apramycin-haltigem und -freiem HA-Medium überimpft, sieben Klone waren sensibel gegen Apramycin, einer davon war Klon RN-435.

Zur Bestätigung der Geninaktivierung wurde *S.fradiae* RN-435 per PCR analysiert. Das Amplifikat wurde mit *Spl*I sowie *Sal*I zur Kontrolle restringiert. Erwartetes und gefundenes Bandenmuster gibt Tab. 4 und Abb. 10 wieder. Ein aus *S.fradiae* RN-435 per PCR amplifiziertes Gen *urdR* konnte nicht mehr mit *Spl*I restringiert werden, dies bestätigt die Zerstörung dieses Leserasters. Zur Kontrolle wurde urdR auch vom Plasmid pR (siehe 2.4.2) und von chromosomaler DNA von *S.fradiae* Tü2717, also dem Wildtyp, amplifiziert.

Restriktion	**Positivkontrolle pR (1-3)**	***S.fradiae* RN-435 (5-7)**	**Positivkontrolle *S.fradiae* WT (9-11)**
*Sal*I	500+310	500+310	500+310
*Spl*I	530+280	810	530+280
Nicht restringiert	810	810	810

Tab. 4: Tab. 1: Übersicht über die erwarteten und gefundenen DNA-Fragmentlängen (in bp) zum Nachweis der Zerstörung des Leserahmens von *urdR*.

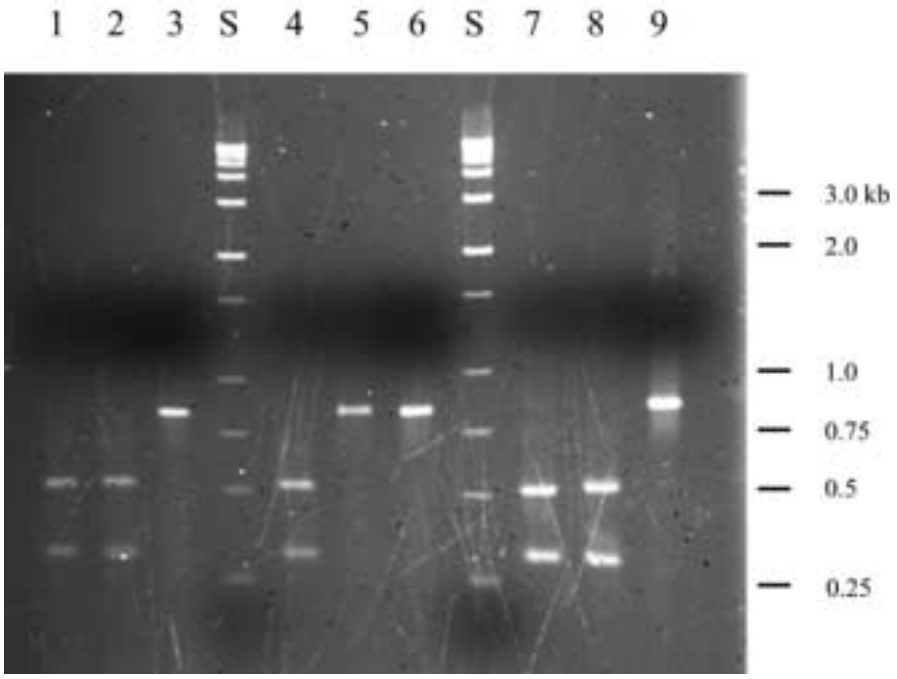


Abb. 10: Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten zum Nachweis eines Genaustausches in *S.fradiae* RN-435. Positivkontrolle mit Plasmid pR: Spuren 1-3 (*Sal*I-Restriktion, *Spl*I-Restriktion, unrestringiert). PCR mit DNA aus *S.fradiae* RN-435: Spuren 4-6 (*Sal*I-Restriktion, *Spl*I-Restriktion, unrestringiert). PCR mit DNA aus *S.fradiae* (WT) zur Kontrolle: Spuren 7-9 (*Sal*I-Restriktion, *Spl*I-Restriktion, unrestringiert). S: Längenstandard.

Sekundärstoffproduktion in Mutante RN-435

RN-435 wurde zunächst in 20 ml NL111V-Medium angezogen (siehe 2.5.2), da diese Menge zunächst als ausreichend für eine HPLC-Untersuchung (Tübingen und Tokyo) und LC-MS-Analyse (Tokyo) angenommen wurde. Vor dem Hintergrund, daß UrdZ3 zu diesem Zeitpunkt bereits eindeutig der L-Rhodinose-Biosynthese zugeordnet werden konnte, wurde UrdR (als verbleibende nichtzugeordnete putative Ketoreduktase) als dem D-Olivose-Biosyntheseweg zugehörig angesehen. Dessen Inaktivierung sollte also hauptsächlich zu einem Urdamycin führen, welches nur L-Rhodinose als Zuckerbaustein enthält, dies ist Urdamycin K (siehe Abb. 4), eventuell auch unglycosidierte Urdamycine. Der tatsächliche Befund überraschte sehr (siehe auch Tab. 5): Die unglycosidierten Substanzen Urdamycin I und J, sowie Rabelomycin dominierten, Urdamycin K war nicht eindeutig zuzuordnen, und fast hintergrundartig ohne erkennbares Maximum erstreckten sich Urdamycin A- und B-Derivate über weite Bereiche des HPLC-Laufs. Durch LC-MS Analyse konnten den A-Typ-Substanzen die Massen 584.1 und 698.2, den B-Typ-Substanzen die Massen 436.2 und 550.3 zugeordnet werden, was auf glycosidierte Verbindungen deutet. Dies sind jedoch Massen, die von denen der Urdamycine A und B und aller ihrer Intermediate abweichen. Verwunderlich war außerdem, daß diese - offenbar vier - Substanzen nicht als klare Einzelsignale in einer HPLC-Analyse auftraten, deren Parameter sich bereits bestens für Urdamycine bewährt hatten. Die unbekannten Substanzen mußten im Detail charakterisiert werden, um letztlich zu einer funktionellen Zuordnung von UrdR zu gelangen, denn die bekannten Substanzen (Urdamycin I, J, Rabelomycin) erlaubten keine Aussage über die Funktion von UrdR. Zunächst sollte die Komplementierung der Mutante RN-435 aber bestätigen, daß tatsächlich nur *urdR* zerstört wurde und nicht andere Effekte für dieses unerwartete Resultat verantwortlich sind.

Stamm (mutiertes Gen)	Retentionszeit (min)	UV-VIS-Spektrum	Masse (amu)/ Ionisation	Substanz	Peakfläche (%)
RN-435	9.34	I-Typ	358.2 (-)	Urdamycin I	21.18
(*urdR*)	11.14	J-Typ	376.2 (-)	Urdamycin J	12.44
	12.46	Rabelomycin	339.0 (+)	Rabelomycin	18.90
	ca. 11-24*	A-Typ	584.1/698.2 (-)	Unbekannt	-
	ca. 15-24*	B-Typ	436.2/550.3 (-)	Unbekannt	-

Tab. 5: Details der HPLC- und LC-MS Analyse von *S.fradiae* RN-435. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten.
*) Im genannten Retentionszeitraum existieren zahlreiche undeutliche, eher hintergrundartige Peaks, welche Urdamycin A- oder B-Typ UV-VIS-Spektren aufweisen. Einigen davon konnten eindeutig die genannten Massen zugeordnet werden.

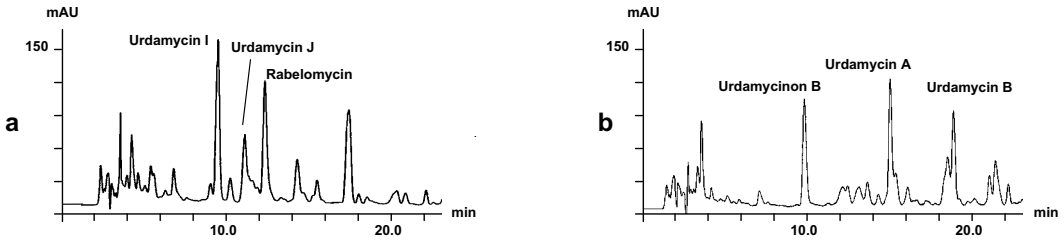


Abb. 11: HPLC-Chromatogramme von Rohextrakten aus *S.fradiae* RN-435 (a) und *S.fradiae* RN-435, transformiert mit pUWLR (b).

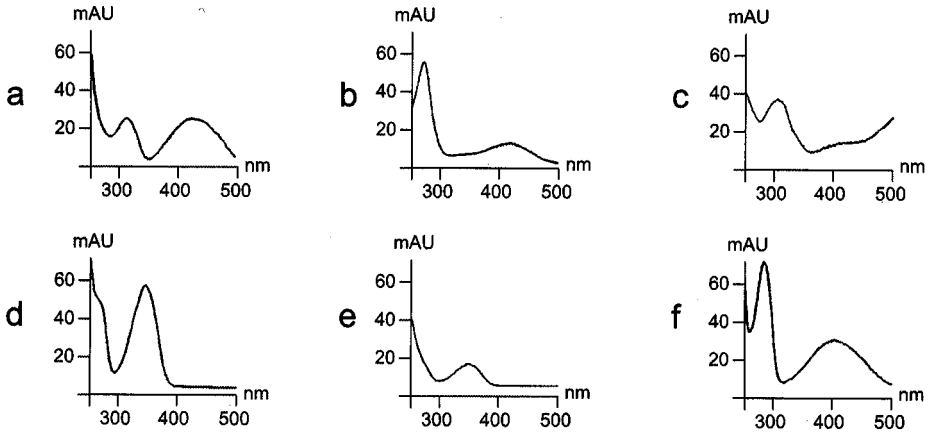


Abb. 12: UV-VIS-Spektren von Urdamycin vom A-Typ (a), B-Typ (b), C-Typ (c), Urdamycin I (d), Urdamycin J (e), sowie Rabelomycin (f).

Komplementierung

S.fradiae RN-435 wurde mit dem Plasmid pUWLR transformiert (siehe 2.8.3 und Abb. 42), in NL111V-Produktionsmedium kultiviert, die Inhaltsstoffe wurden wiederum per HPLC/LC-MS analysiert (siehe Abb. 11). Durch Expression von *urdR* wurde die Produktion von Urdamycin A und B (siehe Abb. 4) wiederhergestellt und damit die Mutation in RN-435 komplementiert. Hauptprodukt ist Urdamycinon B, welches ebenfalls D-Olivose als Molekülbestandteil enthält.

Stamm (komplementiertes Gen)	Retentions-zeit (min)	UV-VIS-Spektrum	Masse (amu)/ Ionisation	Substanz	Peakfläche (%)
RN-435 (*urdR*)	9.58	B-Typ	452.2 (-)	Urdamycinon B	21.68
	14.72	A-Typ	844.1 (-)	Urdamycin A	16.35
	18.58	B-Typ	696.3 (-)	Urdamycin B	15.60

Tab. 6: Details der HPLC- und LC-MS Analyse des Rohextraktes aus *S.fradiae* RN-435. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten.

3.1.4 Analyse neuer Urdamycine aus *S.fradiae* RN-435

Nachdem feststand, daß in *S.fradiae* RN-435 nur *urdR* inaktiviert ist, konnte die analytische Jagd auf die neuen Urdamycine beginnen: Aus 3 l NL111V-Flüssigmedium wurde Rohextrakt gewonnen (siehe 2.12.1) und über eine LH-20 Sephadexsäule vorgereinigt und fraktioniert. Die resultierenden neun Fraktionen (A-I) wiederum wurden per HPLC und LC-MS (Tokyo) qualitativ untersucht (siehe 2.12.1-2).

Fraktion	Vorläufige Substanzbezeichnung	UV-VIS-Spektrum	Masse (amu)/ Ionisation	Mögliche Struktur
A	A261	A-Typ	698.3 (-)	?
	A271	A-Typ	698.2 (-)	?
B	A20	A-Typ	584.3 (-)	?
	A23	A-Typ	584.2 (-)	?
	A239	A-Typ	584.2 (-)	?
	A249	A-Typ	584.2 (-)	?
	A261	A-Typ	698.3 (-)	?
	A271	A-Typ	698.2 (-)	?
C	A20	A-Typ	584.3 (-)	?
D	A20	A-Typ	584.3 (-)	?
	D2	A-Typ	470.5 (-)	Urdamycin K ?
	B2	B-Typ	550.3 (-)	?
E	E1	B-Typ	436.2 (-)	?
	G2	B-Typ	436.2 (-)	?
	E2	B-Typ	436.2 (-)	?
	B2	B-Typ	550.3 (-)	?
	B3	B-Typ	550.3 (-)	?
F	E1	B-Typ	436.2 (-)	?
	G2	B-Typ	436.2 (-)	?
	E2	B-Typ	436.2 (-)	?
	F1	B-Typ	436.2 (-)	?
G	Rabelomycin	Rabelomycin	338.3 (-)	Rabelomycin
	E1	B-Typ	436.2 (-)	?
	G2	B-Typ	436.2 (-)	?
	E2	B-Typ	436.2 (-)	?
H	Urdamycin I	I-Typ	376.2 (-)	Urdamycin I
	Urdamycin J	J-Typ	358.2 (-)	Urdamycin J
	Rabelomycin	Rabelomycin	338.3 (-)	Rabelomycin
	E1	B-Typ	436.2 (-)	?
	H2	B-Typ	322.2 (-)	Tetrangomycin?
I	Urdamycin I	I-Typ	376.2 (-)	Urdamycin I
	Urdamycin J	J-Typ	358.2 (-)	Urdamycin J
	E1	B-Typ	436.2 (-)	?

Tab. 7: Zusammenfassung der HPLC- und LC-MS Analyse der Fraktionen A-I, gewonnen aus Rohextrakt von *S.fradiae* RN-435. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten.

Diese Ergebnisse halfen insofern, als nun die neuen Substanzen erstmals chromatographisch klar getrennt vorlagen, außerdem wurde, gestützt auf Masse, UV-VIS-Spektrum und Retentionszeit, nun vermutlich doch das eingangs erwartete Urdamycin K (Abb. 4) gefunden. Auch bestand nun (vermeintlich) Klarheit über die Anzahl der neuen Substanzen: Sechs Urdamycine mit A-Typ-Polyketid, vier davon mit Masse 584.2 amu (Substanzen A20, A23, A239 und A249, Retentionszeiten: 14.42, 15.77, 17.92 und 18.51 min), sowie zwei mit der Masse 698.2 amu (Substanzen A261 und A271 Retentionszeiten: 23.11 und 24.38). Interessanterweise fanden sich auch vier Urdamycine mit B-Typ-Polyketid mit gleicher Masse (436.2 amu) bei unterschiedlichen Retentionszeiten (Substanzen E1, G2, E2, F1, Retentionszeiten 17.92, 19.20, 20.96, 21.76 min), plus zwei mit der Masse 550.3 amu (B2 und B3, Retentionszeiten: 25.17 und 25.82). Durch HPLC-UV/LC-MS wurden also sechs Urdamycin-Paare (jeweils A- und B-Typ-Aglycon) identifiziert, sowie mit großer Wahrscheinlichkeit das Tetrangomycin.
Zwar konnten aus dem in diesem Stadium noch weitgehend vorhandenen Rohextrakt aus der 3 L-Kultur zwei Substanzen zur Homogenität aufgereinigt werden, die Substanzmenge war aber zu gering für eine lückenlose Strukturauflärung im Rahmen einer ersten kernresonanzspektroskopischen Untersuchung, die von Prof. Dr. Koji Ichinose durchgeführt wurde. Immerhin wurde bestätigt, daß es sich um Urdamycine mit dem A-Typ-Aglycon handelt, eine L-Rhodinose an Position C-12b O-glycosidisch verknüpft ist, und C-9 ein Mono- bzw. Disaccharid aus Deoxyzuckern trägt. Die Konfusion war aber dennoch gewachsen statt beseitigt: waren die Substanzen mit gleicher Masse aber unterschiedlicher Retentionszeit nur Artefakte oder real? Wenn ja, wie sah deren genaue Struktur aus? Worin unterscheiden sie sich? Der erste theoretische Erklärungsversuch beinhaltete das Auftreten enantiomerer Trideoxyhexosen, also z.B. D- und L-Rhodinose. Aber: Alle beobachteten Effekte konnten nicht erklärt werden.
Die bis jetzt erzielten Resultate rechtfertigten den Aufwand für eine 15 l Produktionskultur, d.h. 150 Erlenmeyerkolben zur Gewinnung größerer Substanzmengen. Es wurde daher die präparative Reinigung einzelner Substanzen unternommen, um über NMR-Daten diese Fragen - und letztlich die nach der Funktion von UrdR - zu beantworten. Die Fermentationsarbeiten wurden in diesem Stadium von Dr. Ing. Uwe Theobald und Dipl.-Ing. Georg Grewe unterstützt (beide Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Abteilung Fermentation des Lehrstuhls Mikrobiologie/Biotechnologie).

Der daraus für die präparative HPLC verwendete Rohextrakt wurde wie in 2.12.1 und 2.12.2 beschrieben gewonnen und fraktioniert (Fraktionen A-H). Es gelang, aus den Fraktionen A, D, G und H die in Tab. 8 verzeichneten Substanzen durch präparative HPLC aufzureinigen (siehe auch 2.12.5).
Die Produktionsraten der einzelnen Urdamycine unterliegen Schwankungen. Die angegeben Werte sind daher als grobe Anhaltspunkte anzusehen. Rabelomycin, Urdamycine I und J sind mit ca. 5mg/l Hauptprodukte, A21 und A22 werden mit <0,5 mg/l hergestellt, A239/249/261/271 sowie D2/G2/H2 jeweils mit ca. 1,5 mg/l.

Substanz	Retentionszeit (min)	UV-VIS-Spektrum	Masse	Strukturvorschlag Aglycon/Zucker
A21	11.86	A-Typ	714.1	A-Typ Aglycon/L-Rhodinose an C-12b, Disaccharid an C-9, davon eine Dideoxyhexose, und eine Trideoxyhexose
A22	13.33	A-Typ	714.1/ 730.1	A-Typ Aglycon/L-Rhodinose an C-12b, Disaccharid an C-9, davon eine Dideoxyhexose, und eine Trideoxyhexose (Masse 714.1), A-Typ Aglycon/L-Rhodinose an C-12b, Disaccharid an C-9, zwei Dideoxyhexosen (Masse 730.1)
A239	17.71	A-Typ	584.1	A-Typ Aglycon/L-Rhodinose an C-12b, eine Trideoxyhexose an C-9
A249	19.19	A-Typ	584.1	A-Typ Aglycon/L-Rhodinose an C-12b, eine Trideoxyhexose an C-9
A261	9.25	A-Typ	698.2	A-Typ Aglycon/L-Rhodinose an C-12b, Disaccharid aus zwei Trideoxyhexosen an C-9
A271	10.49	A-Typ	698.2	A-Typ Aglycon/L-Rhodinose an C-12b, Disaccharid aus zwei Trideoxyhexosen an C-9
D2	15.86	A-Typ	470.1	A-Typ Aglycon/L-Rhodinose an C-12b oder Trideoxyhexose an C-9, wahrscheinlich Urdamycin K (Abb. 4)
G2	19.24	B-Typ	436	B-Typ Aglycon/Trideoxyhexose an C-9
H2	19.25	B-Typ	322	B-Typ-Aglycon unglycosidiert, d.h. identisch mit Tetrangomycin (Kunstmann und Mitscher, 1966)

Tab. 8: Details der HPLC- und LC-MS Analyse der gereinigten Einzelsubstanzen, gewonnen aus Rohextrakt von 15 l Kultur von *S.fradiae* RN-435. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten, außerdem jeweils ein Strukturvorschlag für das Aglycon und den Zuckeranteil. Angegeben sind die Retentionszeiten im Gradienten für HPLC-MS (siehe 2.12.6), im Fall von A261 und A271 gelten die Retentionszeiten für den für Urdamycin R und S modifizierten HPLC-Gradienten (siehe ebenfalls 2.12.6) .

Die Strukturvorschläge basieren

- Allgemein auf der Molekülmasse.
- Für das Aglycon auf dem UV-VIS-Spektrum und NMR-Daten.
- Für den Zucker an C-12b auf den ersten (unvollständigen) NMR-Daten.
- auf der Beobachtung, daß UrdGT1a, also die dNDP-L-Rhodinose: Aquayamycin-Glycosyltransferase, die den Zucker an den tertiären Alkohol an Position C-12b transferiert, sehr spezifisch arbeitet und keine Abweichungen in ihrer Substratspezifität zeigt (J.Rohr, pers. Mitteilung) Daher wird angenommen, daß der an C12-b transferierte Zucker stets L-Rhodinose ist.

NMR-Daten

Um nun das strukturelle Geheimnis der aufgereinigten neuen Urdamycine zu lüften, wurden die genannten Substanzen von Prof. Dr. Koji Ichinose durch Protonen- und ^{13}C-Kernresonanzspektroskopie untersucht (NMR-Tabellen im Anhang). Alle Strukturen konnten aufgeklärt werden, außer die des C-glycosidisch gebundenen Zuckers im Disaccharid von A271. Für dessen Strukturaufklärung wurde A271 daher hydrolysiert, und das Aglycon im chemischen Sinne (also Polyketid und C-glycosidisch gebundener Zucker) wurde von Dr. Gerald Dräger, Institut für Organische Chemie, Universität Hannover, per NMR untersucht.

A249 wird künftig als **Urdamycin M** bezeichnet (Abb.13). Es besitzt das Polyketid des Urdamycin A, sowie C-glycosidisch an C-9 gebunden eine β-D-Rhodinose als Zuckeranteil. Im Zusammenhang mit Urdamycin M wird zum ersten Mal D-Rhodinose in einem Stoffwechselprodukt eines *S.fradiae*–Stammes beschrieben. An C-12b des Polyketides befindet sich, O-glycosidisch gebunden, eine L-Rhodinose.

A261 wird künftig als **Urdamycin R** bezeichnet (Abb.13). Der Polyketid-Anteil ist identisch mit dem des Urdamycin A, auch die L-Rhodinose an C-12b. Urdamycin R trägt an C-9 des Aglycon ein C-glycosidisch gebundenes Disaccharid: β-D-Rhodinose-α (1-4)-L-Rhodinose. Das vorgenannte Urdamycin M stellt somit die Vorstufe zu Urdamycin R dar.

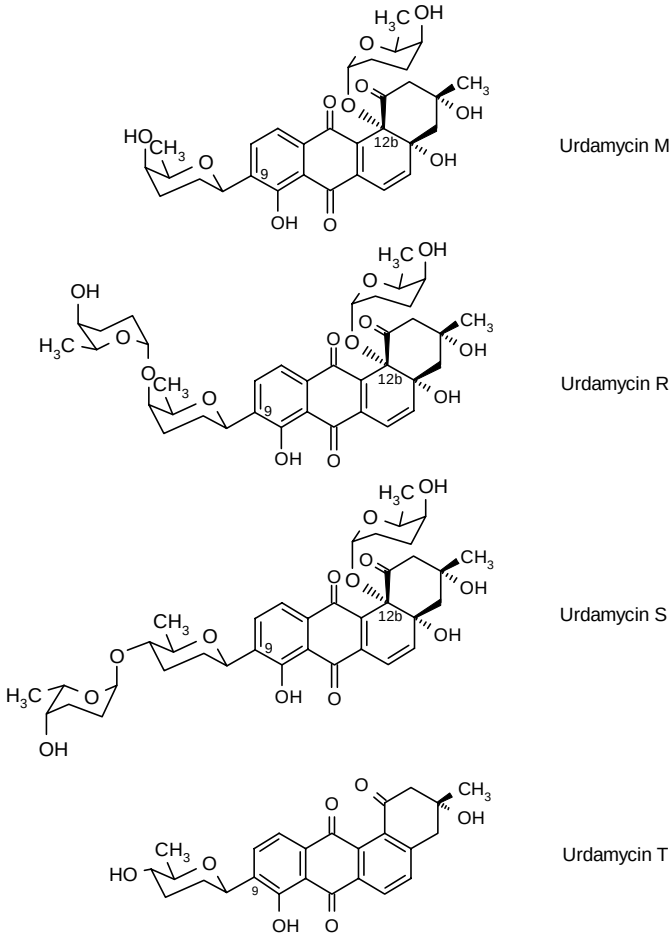


Abb. 13: Strukturformeln der neuen Urdamycine M und R-T.

A271 wird künftig als **Urdamycin S** (Abb.13) bezeichnet. Der Polyketid-Anteil ist auch hier identisch mit dem des Urdamycin A, ebenso die L-Rhodinose an C-12b. Urdamycin S trägt an C-9 des Aglycons ein C-glycosidisch gebundenes Disaccharid: β-D-Amicetose-α (1-4)-L-Rhodinose.

Substanz **D2** stellte sich als identisch mit dem bereits beschriebenen **Urdamycin K** (Abb. 4) heraus (Künzel *et al.*, 1999).

Die Verbindung **G2** heißt fortan **Urdamycin T** (Abb.13). Es besteht aus dem Polyketid des Urdamycin B, sowie einer über Position C-9 C-glycosidisch gebundenen β-D-Amicetose. Dieser Zucker ist das C-4´-Epimer der D-Rhodinose und bislang unbekannt in allen Sekundärstoffen aus *S. fradiae*-Stämmen.

H2 ist das unglycosidierte Urdamycin B-Polyketid, somit identisch mit dem von Kunstmann und Mitscher (1966) beschriebenen **Tetrangomycin** (siehe Abb. 2).

Die Strukturen von **A21** und **A22** und **A239** konnten durch LC-MS und ^{1}H-NMR partiell aufgeklärt werden. Sicher ist für alle drei Substanzen das Polyketid des Urdamycin A, die O-glycosidisch gebundene L-Rhodinose an C-12b, sowie für A21 und A22 ein Disaccharid an C-9. Dessen Monomere - eine Dideoxyhexose und eine Trideoxyhexose - bleiben aber unidentifiziert. A239 trägt einen Zucker C-glycosidisch an C-9 des Polyketids, mit großer Wahrscheinlichkeit eine β-D-Amicetose, und wäre somit die Vorstufe bzw. das 4´-Derhodinosyl-Intermediat des unten beschriebenen Urdamycin S.
Sämtliche von *S.fradiae* RN-435 produzierten Urdamycine sind also entweder unglycosidiert oder tragen die Trideoxyhexosen D-Amicetose oder Rhodinose (L- und D-konfiguriert) als Zuckerkomponenten. D-Olivose kommt infolge der UrdR-Inaktivierung nicht mehr vor, weshalb UrdR als dTDP-4-Keto-2,6-Dideoxyhexose-Ketoreduktase zu identifizieren ist.
Die ursprüngliche Frage lautete aber, ob durch Geninaktivierung neue Zucker entstehen und übertragen würden. Die Antwort lautet: ja! Zusätzlich wurde deutlich, daß GTs Unterschiede in ihrer Substratflexibilität besitzen: Statt D-Olivose findet sich D-Rhodinose oder D-Amicetose C-glycosidisch gebunden als erster Zucker in der C-9-Seitenkette, auf deren zweiter Position aber nur L-Rhodinose. Die GT für letztere Position akzeptiert offensichtlich keinen der neuartigen Zucker, sondern ist auf L-Rhodinose limitiert, überträgt diesen aber auf alle anderen genannten. Worin aber liegen die Unterschiede in der Spezifität begründet? Ist es möglich, durch Editieren der Aminosäuresequenz GTs flexibler zu machen? Ist es möglich, Spezifitäten zu kombinieren? Ist es möglich, Spezifitäten ineinander zu überführen, gibt es eine Art molekularen Schalter dafür?

3.2 UrdGT1b/UrdGT1c: Die Suche nach dem Spezifitätsschalter

3.2.1 UrdGT1b und UrdGT1c

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung bieten sich, bedingt durch ihre hohe Sequenzähnlichkeit, UrdGT1b und UrdGT1c an (Abb. 14 und 16), zwei GTs, die am Aufbau der Trisaccharid-Seitenkette der Urdamycine A und B beteiligt sind. Der Funktionsnachweis wurde früher durch Geninaktivierung und Komplementierung erbracht, außerdem zeigen Datenbankrecherchen eindeutig Sequenzhomologie zu GTs (Trefzer *et al.*, 2000).
UrdGT1b ist eine dNDP-D-Olivose:Urdamycin G-Glycosyltransferase, die den Zucker unter Ausbildung einer β(1-4)-glycosidischen Bindung auf die Hydroxylgruppe an Position C-4A des Urdamycin G transferiert (siehe Abb. 15). UrdGT1c ist eine dNDP-L-Rhodinose: 100-2 Glycosyltransferase, akzeptierende Hydroxylgruppe ist die an Position C-3´ der Substanz 100-2, die entstehende Bindung ist α(1-3)-glycosidisch (siehe Abb. 15). Beide Glycosyltransferasen besitzen hinsichtlich ihres Akzeptorsubstrates leichte Flexibilität, denn beide glycosidieren auch die 12b-Derhodinosyl-Derivate ihrer natürlichen Substrate: 12b-Derhodinosyl-Urdamycin G (12b-DUG) anstatt Urdamycin G, sowie Aquayamycin anstatt 100-2, (siehe Abb. 4). Als Akzeptorsubstrate dient außerdem das im Wildtyp vorkommende Urdamycinon B für UrdGT1c bzw. 100-1 für UrdGT1b (Abb. 4, Trefzer *et al.*, 2000). Weiterhin beweisen die Urdamycine R und S (Abb. 13), daß zumindest UrdGT1c den Zuckertransfer auch α(1-4)-

glycosidisch auf D-Rhodinose oder D-Amicetose durchzuführen vermag (anstelle α(1-3)-glycosidisch auf D-Olivose).

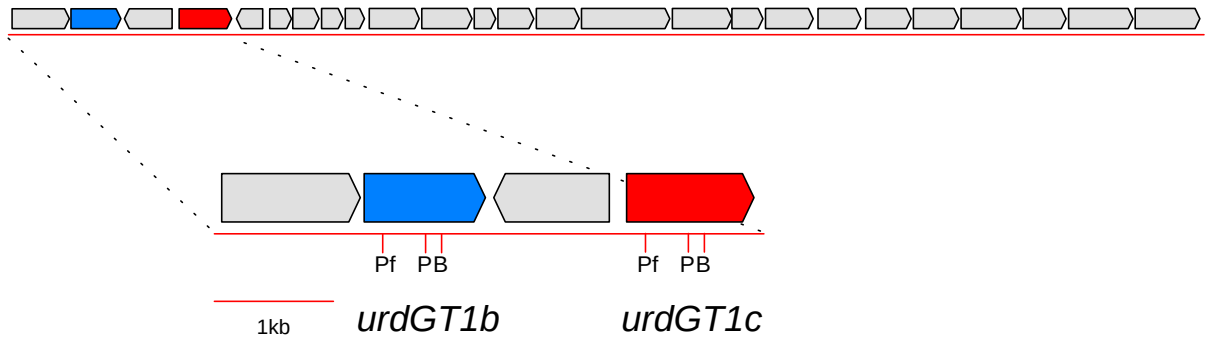


Abb. 14: Das Urdamycin-Gencluster. Die obere Zeile symbolisiert das gesamte Cluster, die Pfeile sind in Transkriptionsrichtung der jeweiligen Gene orientiert. Die Vergrößerung gibt den Bereich mit den Genen *urdGT1b* und *urdGT1c* wieder. Abkürzungen für Restriktionsstellen: B=*Bsm*I, P=*Pst*I, Pf=*Pfl*MI.

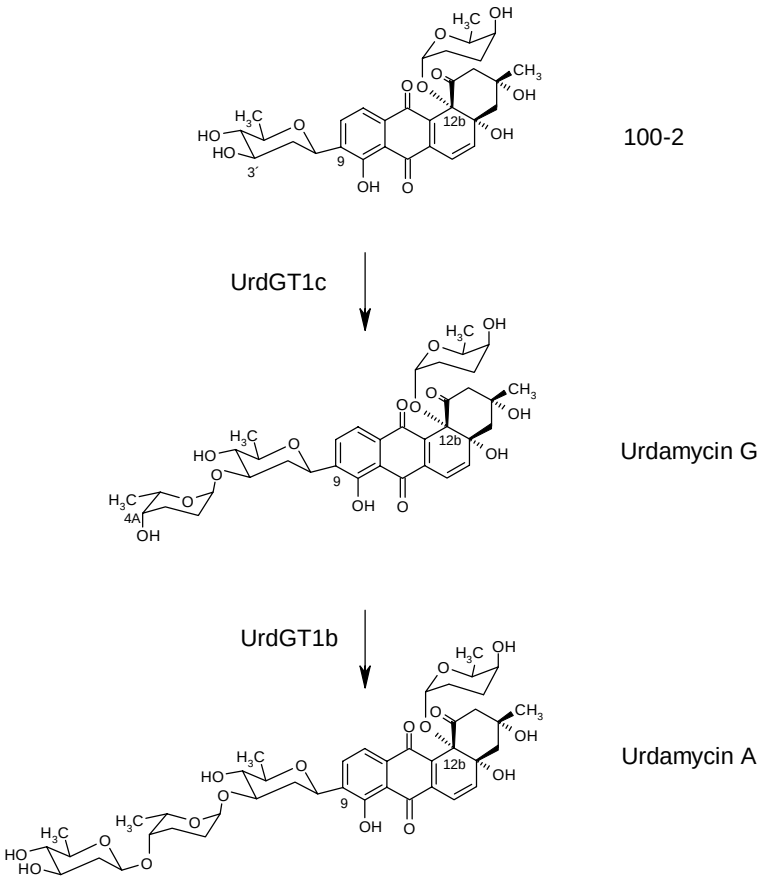


Abb. 15: Darstellung der von UrdGT1b und UrdGT1c katalysierten Schritte in der Urdamycin-Biosynthese von *S.fradiae* Tü2717.

Im Wildtyp wurde für beide GTs jedoch nie eine Abweichung von der Spezifität hinsichtlich des Zuckerdonor-Substrates oder der Regiospezifität gefunden. UrdGT1b überträgt eine 2,6-Dideoxy-D-Hexose durch Ausbildung einer β(1-4)-glycosidischen Bindung als drittes Monomer der Urdamycin-Zuckerseitenkette, während UrdGT1c eine 2,3,6-Trideoxy-L-Hexose durch Schließen einer α(1-3)-glycosidischen Bindung als zweites Element der

Saccharidkette transferiert. Für das Finden dieses Schalters sind diese GTs prädestiniert, denn trotz der funktionellen Unterschiede sind 91,5 % der Aminosäurepositionen beider Enzyme (UrdGT1b: 388 aa, UrdGT1c: 391 aa) mit identischen AS besetzt, lediglich 33 Positionen weichen ab, gaps eingeschlossen (Abb. 16).

```
                    10         20         30         40         50
URDGT1B       MRVLMMSTPA PTHFTPLVSL AWALRGSGHE VVVAGQPDVL GAVASAGLNA
URDGT1C       MRVLFLVTPS PTHFTPLVSL AWALRGAGHE VVVAGQPDVL GAVASAGLNA


                    60         70         80         90        100
URDGT1B       VNVGDWFHVD DMLVAGLREG ERPLETRPRA SLESMGGYGR VWMTHARYLV
URDGT1C       VSIGAPFNGE AKLLAGLGPD QRPLEVRPRP APESMGGYGR VWMTHARYLV


                   110        120        130        140        150
URDGT1B       GRYMEFARIY GPDLIVSDPL EYSSLLVGGV LGVPVVQQRW GVDLISGPAR
URDGT1C       GRYMEFARIY GPDLIVSDPL EYSSLLVGGV LGVPVVQQRW GVDLISGPAR


                   160        170        180        190        200
URDGT1B       AEARPGFGPL CERLGLAGLP DPAVLLDPCP PGLQAPGAEP GSPIRFVPFN
URDGT1C       AEARPGFGPL CERLGLAGLP DPAVLLDPCP PGLQAPGAEP GSPIRFVPFN


                   210        220        230        240        250
URDGT1B       GNGVVPGWLR EPRSASRPRV VVTLGSRTLA LNGVPLMRGI LRAFEELPEV
URDGT1C       GNGVVPGWLR EPRSASRPRV LVTIGG*TLA LNGVPLMRGI LRAFEELPEV

                   260        270        280        290        300
URDGT1B       EAVATVDEVF REKVGPVPAN VRMVDPVPLH LVLDGCAAVV HHGGAGTTMT
URDGT1C       EAVATVDEVF REKVGPVPAN VRMVDPVPLH LVLDGCAAVV HHGGAGTTMT


                   310        320        330        340        350
URDGT1B       AGAFGLPQLV LPQLADQFGH GDRVSEVGAG ISLDDAESQN DSHRLAVELR
URDGT1C       AGAFGLPQLV LPQLADHFGH GDRVSEVGAG ISLDDAESQN DSHRLAVELR

                   360        370        380        390
URDGT1B       RLLAEPEFAK AARALADSVR DMPAPAQVAA DLTRLAG*** *L
URDGT1C       RLLAEPEFAK AARALADSVR DMPAPAQVAA DLTRIAGVVG AL
```

Abb. 16: Die Aminosäuresequenzen der Glycosyltransferasen UrdGT1b und UrdGT1c. Abweichungen in der Primärstruktur sind mit fett gedruckten Aminosäuresymbolen verzeichnet, Lücken mit Asterisken.

Diese relativ wenigen Positionen in der Primärstruktur, oder einige davon, sind offenbar die Schalter, die Determinanten für die unterschiedlichen Substratspezifitäten beider Enzyme. Durch die hohe Ähnlichkeit der Gene *urdGT1b/urdGT1c* haben beide gemeinsame, positionsgleiche Restriktionsschnittstellen, die für die Herstellung hybrider und ortsspezifisch mutagenisierter Gene benutzt wurden (Abb. 6). Ein bereits vor Beginn dieser Arbeit hergestellter Stamm von *S.fradiae* Tü2717, 16-14, besitzt ein chromosomal lokalisiertes hybrides Gen aus den Basen 1-721 von *urdGT1b* und Basen 719-1176 von *urdGT1c*, sein Genprodukt hatte die Eigenschaften von UrdGT1b (Trefzer *et al.*, 2000). Die Strategie der Herstellung hybrider Enzyme schien daher erfolgversprechend und es war zu erwarten, daß – zumindest einige – hybride GTs funktionell und aktiv sein würden. Das Projekt gliederte sich – nach Analyse der Primär- und vorausgesagten Sekundärstruktur - in fünf Schritte:

1. Herstellung des *S.fradiae*-Stammes XTC zur Funktionsprüfung von UrdGT1b-artigen Hybriden
2. Herstellung und Expression hybrider Gene zur Eingrenzung der relevanten Bereiche
3. Herstellung und Expression ortsspezifisch mutagenisierter hybrider Gene
4. Herstellung und Expression einer GT-Genbibliothek
5. Aufreinigung und Analyse neuer Urdamycine

3.2.2 Sequenzanalyse und Sekundärstruktur-Voraussage für UrdGT1b/1c

Die Primärstrukturen von UrdGT1b/UrdGT1c wurden auf das Auftreten typischer Motive hin untersucht, außerdem wurden rechnergestützt erste Voraussagen über die Sekundärstruktur getätigt (siehe Abb. 17). Ein allgemeiner, nicht auf bakterielle GTs beschränkter Sequenzvergleich zeigt, daß die Primärstruktur der GTs sehr divers ist, einige Motive aber stark konserviert sind. Dies sind in erster Linie das hhhhDxDxh-Motiv (h=hydrophobe Aminosäure, meist Valin oder Leucin), also zwei hochkonservierte von hydrophoben Aminosäureresten flankierte Asparaginsäuren, die vermutlich bei der Koordination zweiwertiger Metallkationen eine Rolle spielen (Busch *et al.*, 1998, Wiggins und Munro, 1998), und ein sich über etwa 60 Aminosäuren erstreckendes Nucleotid-Bindemotiv mit einigen hochkonservierten Aminosäuren, darunter das Glycin-reiche Motiv hhHHGGxGT (h=hydrophobe Aminosäure), das, mit Abweichungen, auch noch in nur sehr entfernt verwandten GTs präsent ist (Ha *et al.*, 2000, Ünligil *et al.*, 2000, Mulichak *et al.*, 2001). Weiterhin weisen viele GTs pro-und eukaryotischer Herkunft das Px_5Px_3DQ-Motiv und Ex_7E-Motiv als weitere stark konservierte Aminosäurereste des Nucleotid-Bindemotivs auf (Radominska-Pandya *et al.*, 1999).

Das DxD-Motiv ist in UrdGT1b/UrdGT1c vorhanden als ^{165}GLAGLPDPA^{173}. Dies steht im Einklang mit dem Befund, daß die zweite Asparaginsäure stärker konserviert ist, da sie für die Koordination zweiwertiger Metallkationen verantwortlich ist, welche die negative Ladung des β-Phosphates neutralisieren (Ünligil *et al.*, 2000, Ünligil und Rini, 2000, Zhang *et al.*, 2001). Sehr typisch ausgeprägt ist das Glycin-reiche Motiv (^{289}VVHHGGAGT^{297} in UrdGT1b) als Bestandteil des Nucleotidbindemotivs, außerdem die Motive Px_5Px_3DQ und Ex_7E (^{307}PQLVLPQLADQ^{317} bzw. ^{348}ELRRLLAE^{355} in UrdGT1b).

Die vorhergesagten Sekundärstrukturen und ihre Abfolge stimmen in Teilbereichen mit GtfB, der einzigen, bislang kristallographisch untersuchten GT aus einer Antibiotika-Biosynthese (Mulichak *et al.*, 2001) überein. So ist die Abfolge von drei kurzen β-Faltblättern, getrennt durch zwei längere α-Helices innerhalb der ersten 60 AS für GtfB als Teil einer Rossmann-Struktur (Rossmann *et al.*, 1974) nachgewiesen. Ebenso ergibt die PhD-Strukturvoraussage für UrdGT1b lange helikale Bereiche am C-Terminus, das Motiv VVHHGG verbindet ein β-Faltblatt mit einer α-Helix, das SR-Motiv des Bereiches III in UrdGT1b/UrdGT1c liegt in einer Schleife, die auf ein kurzes β-Faltblatt folgt, alles strukturelle Eigenschaften, wie sie in GtfB gefunden wurden. Das Ergebnis der PhD-Voraussage ist daher als Modell und Basis für weitergehende strukturelle Untersuchungen geeignet.

```
Pos x 10 ....,....1....,....2....,....3....,....4....,....5....,....6

AS       MRVLMMSTPAPTHFTPLVSLAWALRGSGHEVVVAGQPDVLGAVASAGLNAVNVGDWFHVD
PHD sec   EEEEEEE       HHHHHHHHHHH   EEEEE    HHHHHHH      E      HH


Pos x 10 ....,....7....,....8....,....9....,....10...,....11...,....12

AS       DMLVAGLREGERPLETRPRASLESMGGYGRVWMTHARYLVGRYMEFARIYGPDLIVSDPL
PHD sec  HHHHHHHHH      EE  HHHHHH     EEE HHHHHE  EEEEE       EE  HH


Pos x 10 ....,....13...,....14...,....15...,....16...,....17...,....18
                                                    +++++++++
AS       EYSSLLVGGVLGVPVVQQRWGVDLISGPARAEARPGFGPLCERLGLAGLPDPAVLLDPCP
PHD sec  HHHHHHHHHH     HHHH                    HHHHHHHH


Pos x 10 ....,....19...,....20...,....21...,....22...,....23...,....24

AS       PGLQAPGAEPGSPIRFVPFNGNGVVPGWLREPRSASRPRVVVTLGSRTLALNGVPLMRGI
PHD sec                 EEE        HHHHHHHH     EEEEE          HHHHHH


Pos x 10 ....,....25...,....26...,....27...,....28...,....29...,....30
                                                          xxxxxxxxx
AS       LRAFEELPEVEAVATVDEVFREKVGPVPANVRMVDPVPLHLVLDGCAAVVHHGGAGTTMT
PHD sec  HHHH    EEEE     HHHH         EEEE    EEEE    EEEE   HHHHHHH


Pos x 10 ....,....31...,....32...,....33...,....34...,....35...,....36
               *    *   **                              *      *
AS       AGAFGLPQLVLPQLADQFGHGDRVSEVGAGISLDDAESQNDSHRLAVELRRLLAEPEFAK
PHD sec  HHHH   HHHHHHHHH     HHHHHE    EE        HHHHHHHHHHHH  HHHHH


Pos x 10 ....,....37...,....38...,....39

AS       AARALADSVRDMPAPAQVAADLTRLAGL
PHD sec  HHHHHHHHH     HHHHHHHHHHH
```

Abb. 17: Aminosäuresequenz von UrdGT1b, sowie die Sekundärstrukturvoraussage des Programms PhD. Die Voraussagen (PHD sec) beziehen sich auf α-Helices (H) oder β-Faltblatt-Strukturen (E). Mit + markiert ist das DxD-Motiv, mit x das Glycin-reiche GT-Motiv. Weitere konservierte Aminosäuren des Nucleotidbindemotivs sind mit * gekennzeichnet.

Abb. 18: Raumstruktur der Glycosyltransferase GtfB. Blau: Aminoterminale Domäne, Rot: Carboxyterminale Domäne. Gelb: Sulfatanion, gibt die vermutete Position des Pyrophosphates eines gebundenen Nucleotidzuckers an. Der nicht aufgelöste Bereich der GtfB-Struktur befindet sich in der Mitte rechts. Abbildung modifiziert nach Mulichak *et al.*, 2001.

3.2.3 Herstellung des *S.fradiae*-Stammes XTC

Eine UrdGT1b-artige Aktivität einer hybriden Glycosyltransferase hätte in keinem der vorhandenen *S.fradiae*-Stämme direkt nachgewiesen werden können. Am besten geeignet gewesen wäre *S.fradiae* AX (*urdGT1b*$^-$, *urdGT1c*$^-$, Trefzer *et al.*, 2000), allerdings hätte jedes zu untersuchende hybride Gen mit *urdGT1c* coexprimiert werden müssen – mit zusätzlichem Klonieraufwand. Um ihn zu vermeiden, wurde *S.fradiae* XTC hergestellt, welcher das Gen *urdGT1c* auf dem Chromosom enthält und dieses unter Kontrolle des *ermE*-Promotors exprimiert. Dieser Stamm basiert auf *S.fradiae* AX, besitzt also das funktionelle Glycosyltransferasegen *urdGT2*, sowie *urdGT1c*. Die Herstellung dieses Stammes erfolgte unter Verwendung des Integrationsplasmides pSET-1cerm (siehe 2.8. und Abb. 43) basierend auf dem Vektor pSET152 (Bierman *et al.*, 1992, siehe 2.4.1).

Eine Integrationsmutante, *S.fradiae* XTC, wurde in NL111V-Produktionsmedium angezogen und auf Urdamycin-Produktion hin untersucht. Sie zeigte in einer dünnschichtchromatographischen Voranalyse das identische Urdamycin-Muster wie *S.fradiae* AX-Mutante, transformiert mit pUWL-*urdGT1c* (siehe 2.4.2). HPLC und LC-MS-Untersuchungen (siehe 2.12.4), durchgeführt von Prof. Dr. Koji Ichinose, Tokyo University, Tokyo, Japan, bestätigen diesen Befund (Tab. 9): XTC produziert hauptsächlich 12b-Derhodinosyl-Urdamycin G sowie 100-1, außerdem in geringen Mengen noch Aquayamycin.

Außerdem wurde *S.fradiae* XTC zur Kontrolle mit pUWL-urdGT1b (siehe 2.4.2) transformiert und ebenfalls per HPLC und LC-MS untersucht, sowie die *S.fradiae* AX untransformiert und mit pUWL-urdGT1c (siehe 2.4.2) transformiert, um das Produktionsspektrum nach *urdGT1c*-Expression vom Plasmid versus Expression vom Chromosom zu vergleichen.

Mutante/ exprimiertes Gen	Gefundene Substanzen	Glycosidierungsmuster an C-9	HPLC-Chromatogramm
AX	Aquayamycin, Urdamycinon B	O-PK	Abb. 20 a
AX+*urdGT1c*	12b-DUG, 100-1	R-O-PK	Abb. 20 b
XTC	12b-DUG, 100-1	R-O-PK	Abb. 20 c
XTC + *urdGT1b*	12b-DUA, Urdamycin B	O-R-O-PK	Abb. 20 f

Tab. 9: HPLC- und LC-MS Analyse von Rohextrakt, gewonnen aus *S.fradiae* AX und XTC. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten. Zu UV-VIS-Spektren siehe Abb.12. Abkürzungen: PK=Urdamycin-Polyketid, O=D-Olivose, R=L-Rhodinose. Details der HPLC-Daten im Anhang.

In der mit pUWL-urdGT1b transformierten XTC-Mutante wurde die Produktion von Urdamycin B und 12b-Derhodinosyl-Urdamycin A (12b-DUA) wieder hergestellt. Damit war der Nachweis erbracht, daß das Urdamycin-Spektrum von XTC einer AX-Mutante, transformiert mit pUWL-urdGT1c, ebenbürtig ist, außerdem ist die Komplementierbarkeit mit *urdGT1b* gezeigt worden: XTC stand als System zur Untersuchung UrdGT1b-artiger hybrider GTs zur Verfügung.

3.2.4 Hybride Glycosyltransferasen: Wo ist der Schalter?

Die Primärstrukturen von UrdGT1b und UrdGT1c wurden in fünf Bereiche unterteilt (siehe Tab. 10, Abb. 6 und 19), die ausschließlich über das Vorkommen gemeinsamer Restriktionsschnittstellen in der DNA-Sequenz ihrer Gene definiert wurden. Es sind dies folgende Bereiche:

Bereich	Basen	Beginn und Ende	AS
I	1-94	Start bis *Pfl*MI	1-31
IIa	95-249	*Pfl*MI bis *Xho*I	32-83
IIb	250-552	*Xho*I bis *Pst*I	84-184
III	553-718 (721 in *urdGT1b*)	*Pst*I bis *Bsm*I	185-239 (240 in UrdGT1b)
IV	719-1176 (722-1167 in *urdGT1b*)	*Bsm*I bis Ende	240-391 (241-388 in UrdGT1b)

Tab. 10: Bereiche der GT-Gene *urdGT1b* und *urdGT1c*.

Die Unterteilung des Bereiches II in IIa und IIb wurde vorgenommen, weil in IIb perfekte Sequenzidentität herrscht, während IIa der variabelste Bereich überhaupt ist. Um die Relevanz einzelner Bereiche für die Substratspezifität der Enzyme zu bestätigen oder auszuschließen, wurden Bereiche einzeln oder in Kombination zwischen den beiden Quellenzymen UrdGT1b und UrdGT1c durch Herstellung der entsprechenden Gene getauscht (Details der Herstellung siehe 2.7):

- Das erste Hybridenpaar waren die GTs H1 und H2. Erstere besitzt Bereich I von UrdGT1b, alle anderen Bereiche stammen von UrdGT1c. Das zweitgenannte Protein ist das dazu inverse Hybrid. Dieses Paar dient also der Untersuchung des Einflusses von Bereich I auf die Spezifität.
- Das zweite Hybridenpaar waren die GTs H4 und H3. Erstere besitzt Bereiche I und II von UrdGT1c, die anderen Bereiche stammen von UrdGT1b. Das zweitgenannte Protein wiederum ist das dazu inverse

Hybrid. Mit diesem Hybridenpaar konnte also im Vergleich zum vorgenannten Paar zusätzlich die Rolle von Bereich IIa untersucht werden.

- H5 ist eine hybride GT, die die Bereiche I-III von UrdGT1c besitzt, Bereich IV stammt von UrdGT1b, um den Einfluß von Bereich IV zu prüfen. Auf die Konstruktion des inversen GT-Gens wurde verzichtet, da es im *S.fradiae*-Stamm 16-14 als chromosomal lokalisiertes Gen (GT16-14) bereits vorlag und eine UrdGT1b-artige Spezifität aufwies (Trefzer *et al.*, 2000). Diese Ergebnis war bereits ein Hinweis, daß Bereich IV nicht (oder nicht allein) für die Spezifität verantwortlich sein würde.
- Um die Relevanz der Bereiche II und III gleicher Herkunft zu prüfen, wurde das Hybridenpaar H7 und H6 generiert. Die GT H7 besitzt II und III von UrdGT1c, die Bereiche I und IV von UrdGT1b, GT H6 stellt wiederum die inverse GT dar.
- Schließlich wurde mit H8 eine GT geschaffen, die den Bereich III von UrdGT1b trug, die restliche Sequenz stammte von UrdGT1b.

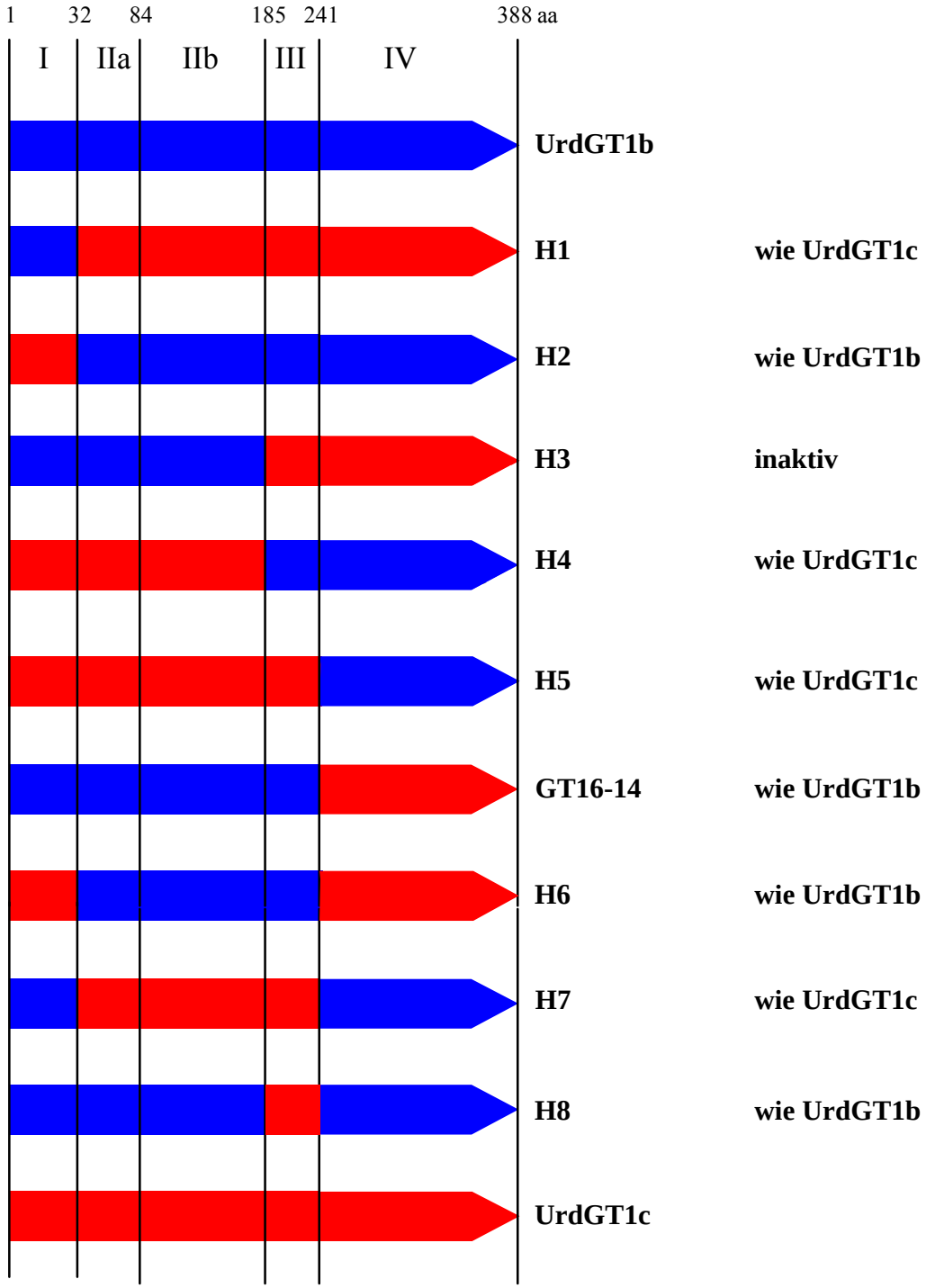


Abb. 19: Übersicht über die hybriden Glycosyltransferasen. Regionen aus UrdGT1b sind blau, solche aus UrdGT1c sind rot markiert, die Enzymregionen sind mit römischen Ziffern, die Aminosäurepositionen der Grenzen mit arabischen Ziffern gekennzeichnet.

Die Expression der Gene aller genannten GTs in den *S.fradiae*-Stämmen AX, sowie der Wildtyp-Gene *urdGT1b* und *urdGT1c* zur Kontrolle, ergab durch DC sowie HPLC und LC-MS (siehe 2.12.4 und 2.12.6) das in Tab. 11 zusammengefasste Bild hinsichtlich des Urdamycin-Produktionsspektrums (zur Kontrolle der HPLC wurde authentische Reinsubstanz von Urdamycin A verwendet). Ausgewählte Chromatogramme sind in Abb. 20 dargestellt, Details zu sämtlichen HPLC-Läufen im Anhang, Abschnitt 6.3.

Exprimiertes Gen	Gefundene Substanzen	Glycosidierungsmuster an C-9	HPLC-Chromatogramm
urdGT1c	12b-DUG, 100-1	R-O-PK	Abb. 20 b
H1	12b-DUG, 100-1	R-O-PK	Abb. 20 d
H2	Aquayamycin, Urdamycinon B	O-PK	Abb. 20 a
H3	Aquayamycin, Urdamycinon B	O-PK	Abb. 20 a
H4	12b-DUG, 100-1	R-O-PK	Abb. 20 d
H5	12b-DUG, 100-1	R-O-PK	Abb. 20 d
H6	Aquayamycin, Urdamycinon B	O-PK	Abb. 20 a
H7	12b-DUG, 100-1	R-O-PK	Abb. 20 d
H8	Aquayamycin, Urdamycinon B	O-PK	Abb. 20 a

Tab. 11: Übersicht über die durch HPLC-UV-VIS und LC-MS identifizierten Urdamycine nach Expression verschiedener hybrider GT-Gene in *S.fradiae* AX. Abkürzungen: PK=Urdamycin-Polyketid, O=D-Olivose, R=L-Rhodinose. Details der HPLC-Daten im Anhang.

Das Auftreten von 12b-DUG und 100-1 (Abb. 4), also Substanzen mit einer Disaccharidseitenkette (D-Olivose-L-Rhodinose an C-9) zeigt die Aktivität des Enzyms an, sowie die UrdGT1c-artige Spezifität des hybriden Enzyms. Die Relevanz einzelner Bereiche für die Spezifität von UrdGT1c zeigt sich nach der Untersuchung des Urdamycin-Spektrums in *S.fradiae* AX wie folgt:

Bereich I ist irrelevant, denn die hybride GT H1 ist wie UrdGT1c aktiv (trotz Bereich I aus UrdGT1b), H2 ist inaktiv (trotz Bereich I aus UrdGT1c).

Bereich III ist irrelevant, denn die hybride GT H4 ist wie UrdGT1c aktiv, obwohl die Bereiche III und IV aus UrdGT1b stammen, umgekehrt ist H3 inaktiv trotz Bereichen III und IV aus UrdGT1c.

Bereich IV ist irrelevant, denn H5 ist wie UrdGT1c aktiv (trotz Bereich IV aus UrdGT1b). Durch die Arbeiten zu *S.fradiae* 16-14 ist bekannt, daß dessen Hybride, das zu H5 inverse Enzym, nicht wie UrdGT1c arbeitet.

Bereich IIa ist der für UrdGT1c-artige Aktivität relevante Bereich: Sofern er von UrdGT1c stammt, besitzt das hybride Enzym dessen Spezifität, unabhängig davon, ob andere Bereiche (z.B: Bereich III in H7) gleichen Ursprungs sind oder nicht, wie z.B. Bereich III in H4.

Die in *S.fradiae* AX inaktiven, d.h. nicht wie UrdGT1c aktiven hybriden GT-Gene wurden mit folgendem Befund in *S.fradiae* XTC exprimiert, die Rohextrakte per HPLC und LC-MS analysiert (siehe 2.12.4. und 2.12.6).

Exprimiertes Gen	Gefundene Substanzen	Glycosidierungsmuster an C-9	HPLC-Chromatogramm
urdGT1b	12b-DUA, Urdamycin B	O-R-O-PK	Abb. 20 f
H2	12b-DUA, Urdamycin B	O-R-O-PK	Abb. 20 g
H3	12b-DUG, 100-1	R-O-PK	Abb. 20 e
H6	12b-DUA, Urdamycin B	O-R-O-PK	Abb. 20 g
H8	12b-DUA, Urdamycin B	O-R-O-PK	Abb. 20 g

Tab. 12: Übersicht über die durch HPLC-UV-VIS und LC-MS identifizierten Urdamycine nach Expression verschiedener hybrider GT-Gene in *S.fradiae* XTC. Abkürzungen: PK=Urdamycin-Polyketid, O=D-Olivose, R=L-Rhodinose. Details der HPLC-Daten im Anhang.

Das Auftreten von 12b-DUA und Urdamycin B, also Urdamycinen mit einer Trisaccharidseitenkette (D-Olivose-L-Rhodinose-D-Olivose an C-9) zeigt die Aktivität eines (in *S.fradiae* AX als inaktiv gefundenen) Enzyms in *S.fradiae* XTC an, sowie die UrdGT1b-artige Spezifität des jeweiligen hybriden Enzyms. Die gefundene Relevanz von Bereich IIa für die Spezifität von UrdGT1c gilt genauso für UrdGT1b und wird durch die Expressionsversuche in *S.fradiae* XTC bestätigt, allerdings mit einer interessanten Ausnahme: H3 ist auch in *S.fradiae* XTC inaktiv. Der Bereich IIa aus UrdGT1b in Kombination mit Bereich III aus UrdGT1c ist dann als

nicht kompatibel erkannt worden, wenn Bereich IV ebenfalls aus UrdGT1c stammt. Stammt letzterer aus UrdGT1b (dies ist beim Hybrid H8 der Fall) ist das Enzym voll funktionell.

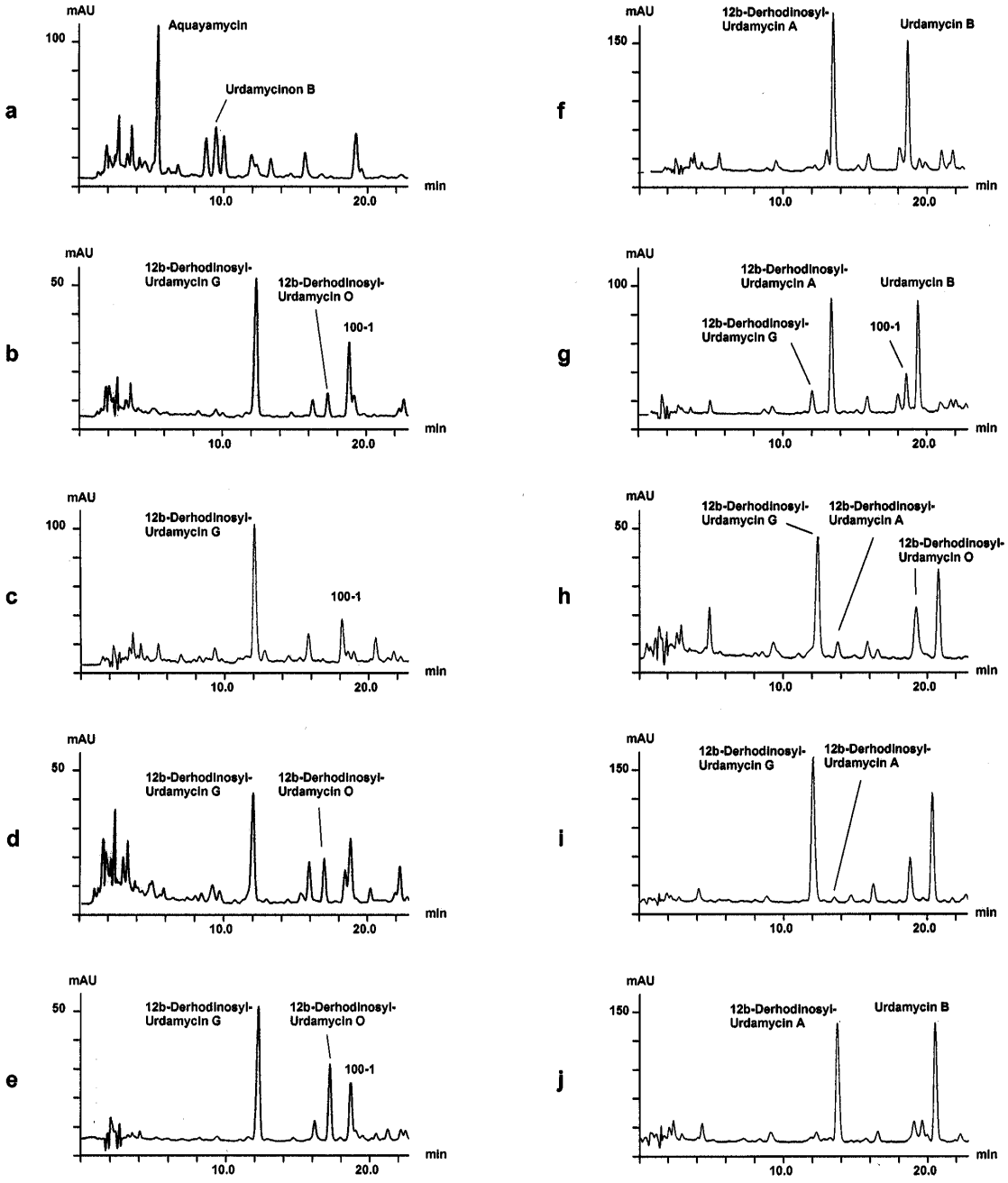


Abb. 20: Ausgewählte HPLC-Chromatogramme von Rohextrakten aus *S.fradiae* AX und XTC. a) *S.fradiae* AX untransformiert. b) *S.fradiae* AX nach Expression von *urdGT1c*. c) *S.fradiae* XTC untransformiert. d) *S.fradiae* AX nach Expression von H1. Vergleichbare Chromatogramme wurden nach Expression von H4, H7 und H5 erhalten. e) *S.fradiae* XTC nach Expression von H3. f) *S.fradiae* XTC nach Expression von *urdGT1b*. g) *S.fradiae* XTC nach Expression von H2. Vergleichbare Chromatogramme wurden nach Expression von H6, H8, H9, H10 und H11 erhalten. h) *S.fradiae* XTC nach Expression von H3S. i) *S.fradiae* XTC nach Expression von H3R. j) *S.fradiae* XTC nach Expression von H3SR.

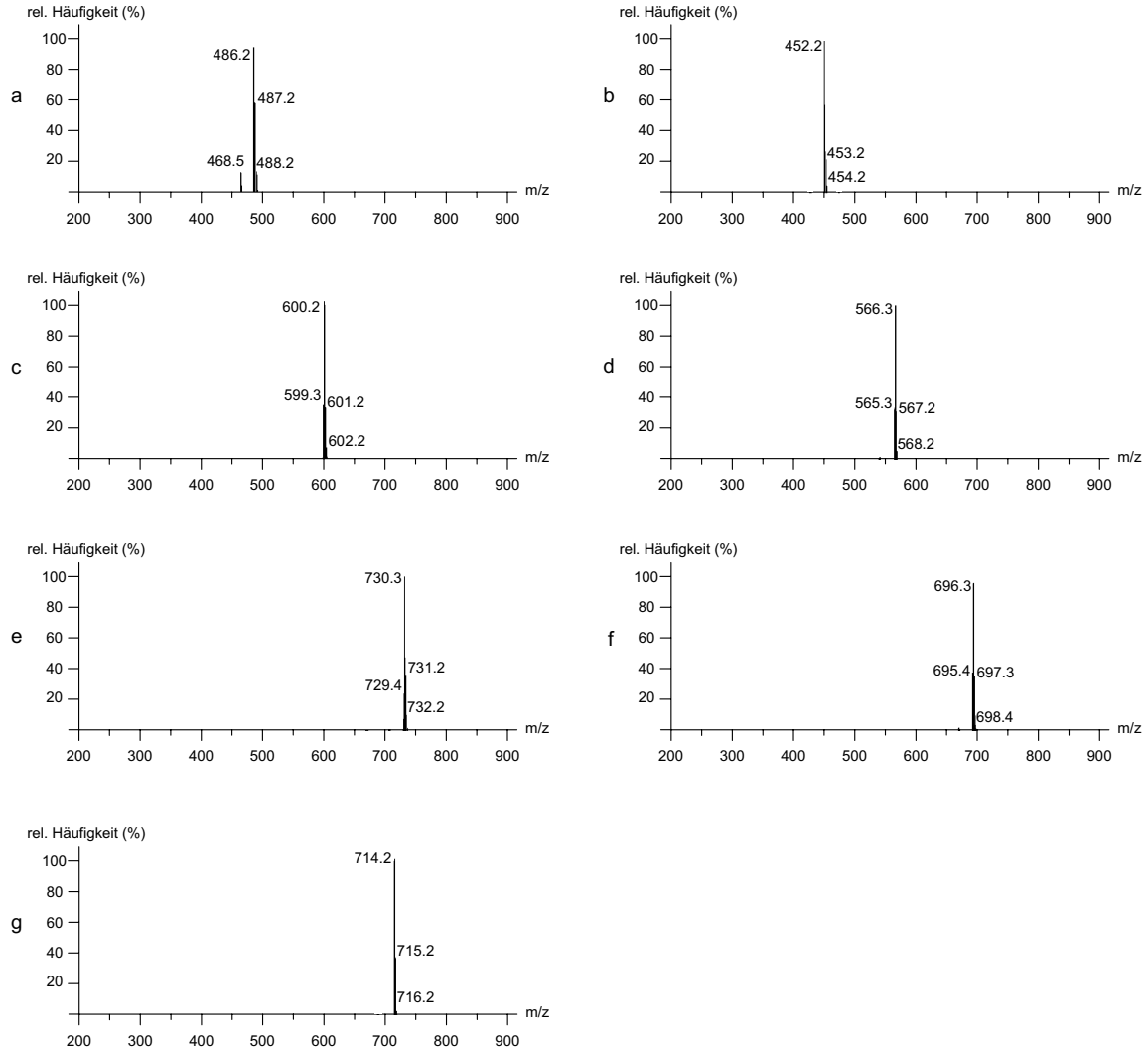


Abb. 21: Typische Massenspektren von Aquayamycin (a), Urdamycinon B (b), 12b-DUG (c), 100-1 (d), 12b-DUA (e), Urdamycin (f), sowie 12b-DUO (g). Signale mit einer relativen Häufigkeit von <5% sind nicht dargestellt. Die Spektren wurden von Prof. Dr. K.Ichinose mit einem Thermoquest LCQ-Massenspektroskop im negativen Modus und Atmosphärendruck/Chemischer Ionisation aufgenommen.

Die ursprüngliche Frage lautete, in welchem Bereich der Schalter, die Determinanten für die Substratspezifiät zu suchen seien. Die Expression der hybriden GTs zeigte, daß Bereich IIa für die Substratspezifität verantwortlich ist, während Bereich III unter bestimmten Umständen die katalytische Aktivität des Enzyms beeinflusst. Nun wurde dazu übergegangen, durch Herstellung und Expression ortsspezifisch mutagenisierter hybrider Gene die Rolle einzelner Aminosäuren in Bereich IIa und III für Spezifität bzw. generelle Aktivität zu untersuchen.

3.2.5 Ortsspezifisch veränderte Glycosyltransferasen: Wie groß ist der Schalter?

Bereich III

Das Enzym H3 (Abb. 22) arbeitet weder wie UrdGT1b noch wie UrdGT1c, ist also offenbar inaktiv (siehe Tab. 11 und 12). Die hybride GT von *S.fradiae* 16-14, GT16-14, welche sich nur an drei Positionen in Bereich III der Primärstruktur von H3 unterscheidet, ist hingegen aktiv (wie UrdGT1b): es sind Leucin vs. Valin (Pos. 221), Glycin vs. Serin-Arginin (Pos. 226 bzw. 226-227). Um die Möglichkeit auszuloten, ob das inaktive Enzym durch einen Aminosäureaustausch refunktionalisiert werden könne, wurde H3 in drei Varianten editiert. Gly226 wurde gegen seine (durch den gap bedingt) zwei Positionsäquivalente in der hybriden GT H5, Ser226 oder Arg227 ersetzt. Dies ergab die hybriden GTs H3S oder H3R. Details ihrer Herstellung sind in Abschnitt 2.7 beschrieben.

Außerdem wurden Serin und Arginin gleichzeitig eingeführt, also G226→^{226}SR^{227}. Diese hybride GT wurde H3SR genannt. Alle drei in Bereich III ortsspezifisch editierten Gene wurden in *S.fradiae* XTC exprimiert, um durch das Verhältnis von 12b-DUG (Edukt von UrdGT1b) zu 12b-DUA (Produkt) auf Wiederherstellung einer UrdGT1b-artigen Enzymaktivität zu prüfen. Tabelle 13 beschränkt sich daher auf A-Typ Urdamycine.

Kontrollen	**Retentionszeit (min)**	**Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
S.fradiae XTC untransformiert	12.14	A-Typ	600.2 (-)	12b-DUG	35.27
Exprimiertes Gen	**Retentionszeit (min)**	**Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
urdGT1b	13.60	A-Typ	730.3 (-)	12b-DUA	38.96
H3R	12.22 13.50	A-Typ A-Typ	600.2 (-) 730.3 (-)	12b-DUG 12b-DUA	37.92 2.54
H3S	12.45 13.71	A-Typ A-Typ	600.2 (-) 730.2 (-)	12b-DUG 12b-DUA	27.87 3.89
H3SR	12.38 13.79	A-Typ A-Typ	600.2 (-) 730.3 (-)	12b-DUG 12b-DUA	< 2.0 30.50

Tab. 13: Details der HPLC- und LC-MS Analyse (siehe 2.12.4 und 2.12.6) von Rohextrakt, gewonnen aus *S.fradiae* XTC untransformiert bzw. nach Expression des jeweiligen hybriden GT-Gens. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose erzielten Daten. Das UV-VIS-Spektrum von A-Typ Urdamycinen ist in Abb. 12, Chromatogramme sind in Abb. 20 c, h, i und j dargestellt.

Das Auftreten von sehr geringen Mengen 12b-DUA nach Expression von H3R oder H3S zeigt, daß durch die Editierung eine enzymatische Minimalaktivität wiederhergestellt werden konnte, das Edukt aber bei weitem überwiegt. Durch den Aminosäureaustausch G226→^{226}SR^{227} hingegen ist die volle, dem Wildtyp vergleichbare Aktivität wiederhergestellt.

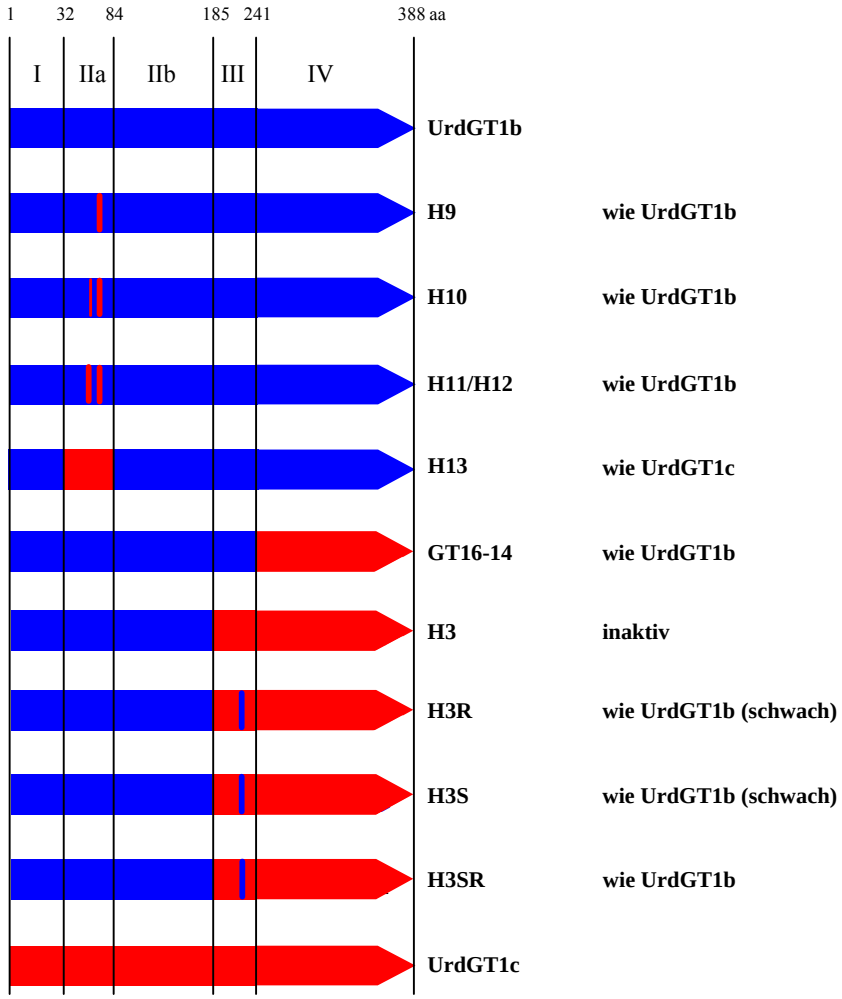


Abb. 22: Übersicht über die ortsspezifisch mutagenisierten hybriden Glycosyltransferasen. H9-13 wurden in Bereich IIa verändert, H3R, H3S und H3SR entstanden durch Editierung der Sequenz von H3 in Bereich III. Regionen aus UrdGT1b sind blau, solche aus UrdGT1c sind rot markiert, die Enzymregionen sind mit römischen Ziffern, die Aminosäurepositionen der Grenzen mit arabischen Ziffern gekennzeichnet.

Bereich IIa

Die Ergebnisse der Expression hybrider GTs (Tabellen 11 und 12) zeigte, daß die Substratspezifitäten sowohl hinsichtlich Donorzucker als auch Akzeptor im Bereich IIa, also den Aminosäurepositionen 52-82 festgelegt werden. Dieser Bereich unterscheidet sich zwischen den Quellenzymen UrdGT1b und UrdGT1c an 18 Positionen.

Um die Zahl relevanter Aminosäurepositionen weiter zu verringern, den determinierenden Aminosäuren also näherzukommen, wurden die Gene von drei Varianten von UrdGT1b hergestellt (GTs H9-11, Details in 2.7) und in *S.fradiae* XTC exprimiert. Die editierten Positionen lagen in Bereich IIa und erfolgten durch Einbau von positionsäquivalenten Aminosäuren aus UrdGT1c. Es sind dies die Austausche

- ^{80}Pro-Ala-Pro^{82} (anstelle ^{80}Ala-Ser-Leu^{82}) in GT1bH9
- Val76 und ^{80}Pro-Ala-Pro^{82} (anstelle Thr76 und ^{80}Ala-Ser-Leu^{82}) in GT1bH10
- ^{68}Gly-Pro-Asp-Gln^{71} und ^{80}Pro-Ala-Pro^{82} (anstelle ^{68}Arg-Glu-Gly-Glu^{71} und ^{80}Ala-Ser-Leu^{82}) in GT1bH11

```
UrdGT1b:    VNVGDWFHVDDMLVAGLREGERPLETRPRASL
UrdGT1c:    VSIGAPFNGEAKLLAGLGPDQRPLEVRPRPAP
H9:         VNVGDWFHVDDMLVAGLREGERPLETRPRPAP
H10:        VNVGDWFHVDDMLVAGLREGERPLEVRPRPAP
H11/12:     VNVGDWFHVDDMLVAGLGPDQRPLETRPRPAP
H13:        VSIGAPFNGEAKLLAGLGPDQRPLETRPRPAP
```

Abb. 23: Aminosäuren 51-82 von UrdGT1b, UrdGT1c, sowie den hybriden GTs H9-13. Identische AS sind schwarz, unterschiedliche rot und blau dargestellt.

Strategie war, durch das Auftreten von 12b-DUA auf Beibehaltung der UrdGT1b-artigen Enzymaktivität zu prüfen.

Exprimiertes Gen	**Gefundene Substanzen**	**Glycosidierungsmuster an C-9**	**HPLC-Chromatogramm**
urdGT1b	12b-DUA, Urdamycin B	O-R-O-PK	Abb. 20 f
H9	12b-DUA, Urdamycin B	O-R-O-PK	Abb. 20 g
H10	12b-DUA, Urdamycin B	O-R-O-PK	Abb. 20 g
H11	12b-DUA, Urdamycin B	O-R-O-PK	Abb. 20 g

Tab. 14: Übersicht über die durch HPLC-UV-VIS und LC-MS identifizierten Urdamycine nach Expression verschiedener hybrider GT-Gene in *S.fradiae* XTC. Abkürzungen: PK=Urdamycin-Polyketid, O=D-Olivose, R=L-Rhodinose. Details der HPLC-Daten im Anhang.

XTC besitzt also nach Expression der drei editierten Gene H9-H11 das gleiche Sekundärstoffmuster wie nach Expression von *urdGT1b*. Dies zeigt den UrdGT1b-artigen Charakter dieser Enzyme, und daß die ausgetauschten Aminosäuren die Spezifität nicht beeinflussen. Eine zusätzlich zur Kontrolle durchgeführte Expression dieser Gene in *S.fradiae* AX blieb ohne Auswirkungen auf dessen Urdamycin-Spektrum, die Enzyme waren nicht wie UrdGT1c aktiv. Die in diesem Abschnitt untersuchten acht AS determinierten also die Spezifität nicht, es verblieben somit noch zehn AS in Bereich IIa.

3.2.6 GT-Bibliothek: Der Schalter wird betätigt!

Nachdem die Zahl der Aminosäurepositionen auf Zehn eingeschränkt wurde (Positionen 52-53, 55-56, 58-62, 64) wurde die Konstruktion einer GT-Genbibliothek begonnen, bei deren Mitgliedern diese zehn Positionen zufällig und unabhängig mit der entsprechenden Aminosäure aus UrdGT1b oder UrdGT1c besetzt wurden. Insgesamt umfaßt die Bibliothek damit 1024 erwünschte unterschiedliche Enzyme, außerdem können, durch die Konstruktionsprozedur bedingt, zwei weitere Aminosäuren auftreten, damit erhöht sich die Zahl auf 2048. Basis für die Bibliothek war das Gen H11 (siehe Abb. 22 und 23), dessen Produkt im relevanten Bereich IIa bereits sieben AS von UrdGT1c besitzt. Primäres Ziel war, die Enzymspezifität durch den zufälligen Einbau der Aminosäuren von UrdGT1b- in UrdGT1c-artig umzuwandeln.

Vor Konstruktionsbeginn mußten drei Voraussetzungen gegeben sein:

1. Das Gen H11 mußte für eine Konstruktion der Bibliothek mit einer singulären Restriktionsschnittstelle im zu variierenden Bereich ausgestattet werden.
2. Diese stille Mutation durfte keinen Einfluß auf Expression, Aktivität und Spezifität des Enzyms besitzen.
3. Die Spezifität mußte UrdGT1c-artig werden, wenn alle zehn fraglichen Positionen gleichzeitig mit den entsprechenden Aminosäuren aus UrdGT1c besetzt sind.

Die erste und zweite Voraussetzung wurde durch Herstellung und Expression des Gens H12 erfüllt (siehe 2.7 und Abb. 22): Dieses Konstrukt stellt die Basis für den Austausch aller zehn noch potentiell für die Spezifität relevanten AS in Bereich IIa dar. In GT1b-H12 ist keine AS ausgetauscht, die Aminosäuresequenz ist mit GT1bH11 identisch. Durch eine stille Mutation wurde eine *Avr*II-Stelle eingeführt. Die Mutation betrifft die Codons 66 und 67 von GT1bH11: GGG (Gly) → GGC (Gly) und TTG (Leu) → CTA (Leu). Dadurch entsteht eine *Avr*II-Stelle CCTAGG.

Die dritte Voraussetzung wird durch H13 erfüllt (Abb. 22 und 23, Konstruktion in 2.7 beschrieben). Dieses Gen/Enzym stellt die Kontrolle für die GT-Bibliothek dar. Der Bereich IIa ist in H13 fast vollständig identisch mit dem aus UrdGT1c (Abb. 23), die restlichen Bereich stammen von UrdGT1b. Beim Austausch entsteht auf DNA-Ebene eine stille Mutation, verglichen zu *urdGT1c*, sie betrifft das Codon 55 (Alanin): Originalcodon in *urdGT1c* ist GCA, in GT1b-H13 aber GCC.

Nach Expression in *S.fradiae* XTC (H12) bzw. *S.fradiae* AX (H13) wurden die in Tab. 15 aufgeführten Urdamycin-Produktionsspektren durch HPLC und LC-MS gefunden:

Exprimiertes Gen	**Gefundene Substanzen**	**Glycosidierungsmuster an C-9**
H12	12b-DUG 12b-DUA, Urdamycin B	R-O-PK/ O-R-O-PK
H13	Urdamycinon C, Aquayamycin 12b-DUG 12b-DUC	O-PK/ R-O-PK/ O-R-O-PK

Tab. 15: HPLC- und LC-MS Analyse (siehe 2.12.4 und 2.12.6) von Rohextrakt, gewonnen aus *S.fradiae* XTC nach Expression der ortsspezifisch mutagenisierten GT-Gene H12 und H13. Abkürzungen: PK=Urdamycin-Polyketid, O=D-Olivose, R=L-Rhodinose. Details der HPLC-Daten im Anhang.

Das Auftreten von 12b-DUA und Urdamycin B nach Expression von H12 in *S.fradiae* XTC (siehe Abb. 24 a) zeigt, daß die stille Mutation in H12 das Enzym nicht beeinflusst, es weiterhin wie UrdGT1b aktiv ist. Das Auftreten von 12b-DUG und 12b-Derhodinosyl-Urdamycin C (12b-DUC) nach Expression in *S.fradiae* AX zeigt, daß nach Austausch aller 10 fraglichen AS tatsächlich eine Spezifitätsänderung hin zum UrdGT1c-artigen Charakter eintritt, d.h. eine (oder mehrere) dieser 10 AS sind offenbar der Schalter für die Spezifität. Dieser bemerkenswerte Befund begründete die Fortsetzung des Projektes durch Herstellung einer Genbibliothek, um so diesen Schalter noch genauer lokalisieren zu können. Zweitens fällt auf, daß bei H13 erstmals in der Serie der hybriden GTs das Edukt (hier also Urdamycinon C) über das Produkt (12b-DUC) überwiegt (siehe Abb. 24 b), bei den A-Typ-Substanzen überwiegt nur noch schwach das Produkt 12b-DUG, verglichen zum Edukt. Ferner fällt die starke Produktion von Urdamycin C-Typ Substanzen auf, das gelegentliche Auftreten dieses Effektes ist allerdings vom Wildtyp her bekannt (Rohr, 1984). Die in H13 geprüfte stille Mutation im Codon 55 (Alanin) hat keine Auswirkungen.

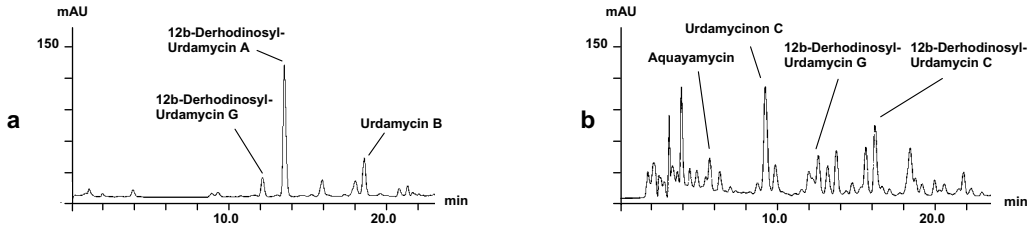


Abb. 24: HPLC-Chromatogramme von Rohextrakten aus *S.fradiae* XTC+ H12 (a) und *S.fradiae* AX+H13 (b).

Die Herstellung der GT-Genbibliothek ist in 2.10.1 beschrieben. Insgesamt bestehen 2048 Möglichkeiten, 11 Nucleotide im Bereich IIa zu kombinieren und so alle Kombinationen aus den verbleibenden 10 unterschiedlichen Aminosäuren in Bereich IIa in UrdGT1b und UrdGT1c abzudecken. Exprimiert ergeben sich ebensoviele Enzyme. Davon sind 1024 Kombinationen erwünscht, die restlichen kommen zustande, weil für den Austausch Pro56(CCG)→Trp56 (TGG) zwei benachbarte Nucleotide eines Codons unabhängig voneinander ausgetauscht werden müssen, dadurch kommen zusätzlich zwei neue Codons zustande: CGG (Arg) und TCG (Ser). Dennoch sind die Kombinationen mit Serin und Arginin nicht unerwünscht. Bewirken sie Inaktivität, treten sie – weil im Screening unauffällig - nie in Erscheinung. Im Falle einer Aktivität dieser Glycosyltransferasen zeigen sie, daß auch andere als die in den Wildtyp-Enzymen vorkommende AS auf dieser Position vom Enzym toleriert werden.

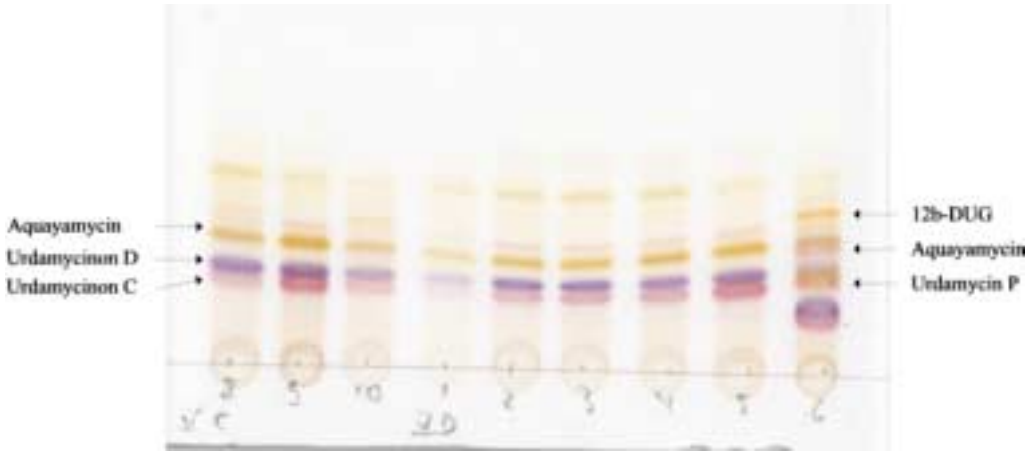


Abb. 25: Beispiel einer DC-Analyse während des Screenings der GT-Bibliothek. Probe VD6 (rechte äußere Spur) entspricht *S.fradiae* AX+GT 1322. Die blaue und rote Bande unter der des Urdamycin P sind dessen C- und D-Typ-Derivate, die als nicht-enzymatisch gebildete Folgeprodukte entstehen. Alle anderen Proben sind negativ und zeigen das Urdamycinspektrum von *S.fradiae* AX.

Mitglieder der Genbibliothek wurden sowohl in *S.fradiae* AX als auch XTC exprimiert. 210 XTC-Transformanden und 387 *S.fradiae* AX-Transformanden wurden per DC (siehe 2.12.3) voruntersucht, ein Beispiel ist in Abb. 25 wiedergegeben. Wurde ein Enzym als aktiv erkannt, d.h. eine Veränderung des Urdamycin-Musters auf der DC-Platte, wurde die Naturstoffproduktion mit HPLC verifiziert (siehe 2.12.4), das Plasmid mit dem zugehörigen Gen reisoliert, sequenziert und im jeweils anderen *S.fradiae*-Stamm exprimiert und in ihm ebenfalls die Naturstoffproduktion per DC, ggf. per HPLC untersucht .

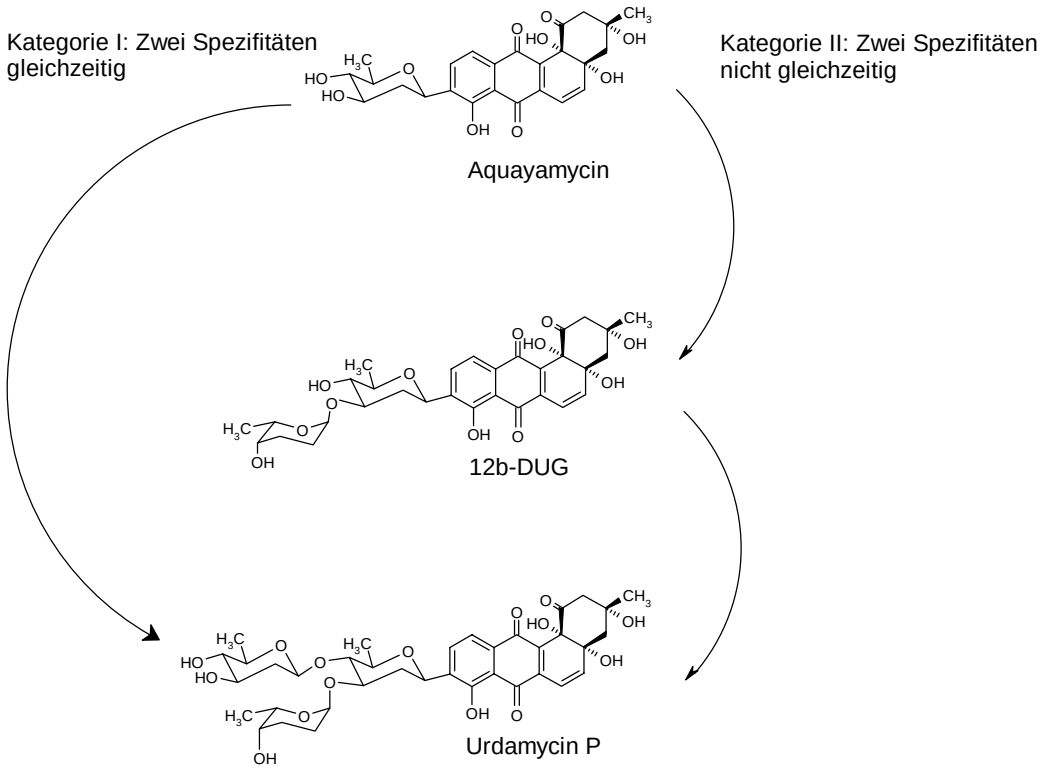


Abb. 26: Urdamycin P-Biosynthese durch GTs der Bibliothek. Kategorie I-Enzyme führen zwei Glycosyltransfers auf Aquayamycin gleichzeitig durch, als Produkt entsteht Urdamycin P. Kategorie II-Enzyme führen nur einen Glycosyltransfer gleichzeitig durch: entweder wird Aquayamycin zu 12b-DUG oder 12b-DUG zu Urdamycin P umgesetzt.

Es wurden 40 unterschiedliche, aktive GTs in der Bibliothek gefunden (entspricht 6.7% der insgesamt untersuchten Mitglieder) . Diese waren entweder wie UrdGT1b oder wie UrdGT1c aktiv oder besaßen eine neue Spezifität, die zur Bildung von Urdamycin P führte (Abb. 26). Es wurden auch alle möglichen Kombinationen dieser Spezifitäten gefunden. Außerdem wurde die GT-Kategorie „neu+UrdGT1c-Spezifität“ zweigeteilt: Kategorie I umfasst die Enzyme, die Aquayamycin direkt in Urdamycin P umsetzen können, Kategorie II-Enzyme setzen Aquayamycin in 12b-Derhodinosyl-Urdamycin G um oder (aber nicht synchron) 12b-Derhodinosyl-Urdamycin G in Urdamycin P (siehe Abb. 26). Im Anhang sind für alle aktiven GTs Details der Verhältnisse von Edukt zu Produkt, sowie die Aminosäurekombinationen im relevanten Bereich verzeichnet.

Spezifität	**Anzahl und Bezeichnung**
Wie UrdGT1b	3 GTs (2-1, 3-24, 1734)
Wie UrdGT1c	5 GTs (6-13, 1106, 1423, 1446, 1701)
neuartig aktive GTs	2 GTs (1707, 1717)
UrdGT1b+UrdGT1c	3 GTs (3-11, 1210, 1548)
neu + UrdGT1b	1 GT (0204)
neu +UrdGT1c (I)	5 GTs (0207, 1304, 1322, 1565, 1814)
neu + UrdGT1c (II)	16 GTs (3-17, 3-19, 6-19, 9-1, 0820, 1111, 1128, 1141, 1413, 1416, 1574, 1703, 1709, 1720, 1806, 1812)
neu+UrdGT1b+UrdGT1c	5 GTs (1-1, 1438, 1511, 1577, 1815)

Tab. 16: Übersicht über die Spezifitäten und Bezeichnungen der im Screening gefundenen, aktiven GTs

Für jede GT liegen für die Expression in mindestens einem der beiden Wirtsstämme quantitative HPLC-Daten vor, gewonnen aus den Peakflächen des HPLC-Chromatogramms (siehe Anhang). Betrug die Fläche des Produktes weniger als 5% der des Eduktes, wurde die GT (bzw. die jeweilige Aktivität einer GT) nicht gewertet.
Besonders interessant ist die GT 1-1. Sie setzt in *S.fradiae* AX Aquayamycin auch direkt zu Urdamycin P um, gehört formal also in die Kategorie I (neu+UrdGT1c). In der *S.fradiae* XTC setzt sie gleichzeitig 12b-DUG zu 12b-DUA und Urdamycin P um, ist somit eindeutig dreifach aktiv und wird deshalb in dieser Kategorie geführt. Die vier anderen dreifach aktiven GTs können in *S.fradiae* AX Aquayamycin nicht zu Urdamycin P umsetzen.
Die ursprüngliche Fragestellung lautete: Kann die Zahl der für die Spezifität relevanten Aminosäuren – sowohl für Donor- als auch Akzeptorsubstrat- innerhalb des Bereiches IIa weiter eingeschränkt werden? Mit den aufgeführten AS-Kombinationen läßt sich folgendes Ergebnis festhalten: Es ist nicht eine einzelne Aminosäure, die die Spezifitäten diktiert, sondern unterschiedliche Kombinationen führen zum gleichen Ergebnis. Dennoch sind Tendenzen erkennbar. Nachfolgende Aufstellung, getrennt nach Spezifitäten bzw. deren Kombination schildert die Details.

UrdGT1b-Spezifität

GTs mit UrdGT1b-Charakter (ausschließlich oder mit anderer Spezifität kombiniert) besitzen fast immer Asp60 und Met62 (11 von 12 GTs). In allen Fällen einer UrdGT1b-artigen Aktivität tritt Asn52 und das Motiv ^{58}HVD^{60} auf. Im Fall der dreifach aktiven GTs 1548 und 1815 ist jedoch das HVD-Motiv verändert: ^{58}NGD^{60} bzw. ^{58}HGD^{60}, die UrdGT1b-Aktivität in beiden GTs ist (deswegen?) sehr schwach.

UrdGT1c-Spezifität

Alle fünf L-Rhodinose transferierenden GTs besitzen Leu64. Besitzt die fragliche GT zusätzlich die neue Spezifität bzw. neue und UrdGT1b-Spezifität kombiniert, wurde fast immer Gly59 und Leu 64 kombiniert gefunden (30 von 34 GTs). Das Motiv ^{58}NGE^{60} muß nicht konserviert sein, jedoch muß entweder Asn58 und/oder Gly59 vorhanden sein. Interessant ist GT 1210. Die Kombination der Aminosäuren ähnelt stark der von UrdGT1b, trotzdem besitzt sie UrdGT1c-Aktivität:

```
UrdGT1b (WT): NV-DW-HVDDM-V
1210        : SV-DS-NVDDM-V
UrdGT1c (WT): SI-AP-NGEAK-L
```

Neue Spezifität

Mit nur zwei GTs in dieser Kategorie ist die Basis für eine eindeutige Aussage klein. Beide GTs zeigen aber die Sequenz ^{52}NVxDS^{56} und Leu64. Das Serin auf Position 56 ist offenbar nicht (oder nicht alleine) für die neue Spezifität verantwortlich, denn es existieren in Kombinationen UrdGT1c+neu auch GTs ohne Serin.

```
UrdGT1b (WT): NV-DW-HVDDM-V
Neu         : NV-DS-XXXXX-L
UrdGT1c (WT): SI-AP-NGEAK-L
```

Interessant ist GT 1707: Auch hier ähnelt die Kombination der Aminosäuren stark der von UrdGT1b. Zwei AS-Austausche (Ala und Leu) und das Ser56 genügen für eine neue Aktivität:

```
UrdGT1b (WT): NV-DW-HVDDM-V
1707        : NV-DS-HVDAM-L
UrdGT1c (WT): SI-AP-NGEAK-L
```

Aber: In doppelt aktiven GTs (neu+UrdGT1c) ist weder das Serin durchgängig, noch die Kombination Ala61 und Leu64. Dennoch ist auch dann eindeutig neue Aktivität gegeben.

Dreifache Spezifität

Die Sequenzen der dreifach aktiven GTs sind uneinheitlich, jedoch ist – als Voraussetzung für eine UrdGT1c-artige Aktivität – Asn58 bzw. Gly59 vorhanden. Das ^{58}HVD^{60}-Motiv von UrdGT1b (WT) könnte Ursache für eine relativ geringe UrdGT1b-artige Aktivität sein.

```
UrdGT1b (WT): NV-DW-HVDDM-V
1815        : NI-AW-HGDDM-V
UrdGT1c (WT): SI-AP-NGEAK-L
```

Duale Spezifität: UrdGT1b und UrdGT1c

Drei GTs gehören in diese Kategorie. Das ^{58}HVD^{60}-Motiv ist nicht bewahrt, lediglich Asp55 und Asp60 sind durchgängig. GTs 1548 (diese Kategorie) und 1701 (nur UrdGT1c- keine UrdGT1b-Aktivität) unterscheiden sich nur in Positionen 56 (Arg oder Ser) und 62 (Met oder Lys).

```
UrdGT1b (WT): NV-DW-HVDDM-V
1548        : NV-DR-NGDAM-L (UrdGT1b+UrdGT1c)
1701        : NV-DS-NGDAK-L (UrdGT1c)
UrdGT1c (WT): SI-AP-NGEAK-L
```

Duale Spezifität: neu und UrdGT1c

Diese GT-Gruppe ist am Häufigsten gefunden worden (21 von 40 GTs insgesamt). Ausgehend vom UrdGT1b-artigen Hybrid GT1b-H12 fällt es offenbar leicht, die strikte Beschränkung auf D-Olivose und eine β(1-4)-glycosidische Verknüpfung aufzuheben und L-Rhodinose mit einer α(1-3)-Verknüpfung zuzulassen.

Es ist durchgängig Asn58 und/oder Gly59 vorhanden, es tritt nie das ^{58}HVD^{60}-Motiv auf. Es ist fast durchgängig Leu64 vorhanden. Die vierte Position ist offenbar ohne Einfluß, ebenso Fehleinbauten wie Ile52 oder Phe53.

Duale Spezifität: neu und UrdGT1b

Nur eine GT zeigt diese Kombination: GT0204. Die neue Aktivität ist nur schwach ausgeprägt, die Hauptaktivität ist wie UrdGT1b. Das ^{58}HVD^{60}-Motiv ist erhalten. Interessant ist, daß eine GT mit neuer und 1c-Aktivität (GT1-1) fast identisch mit 0204 ist, jedoch statt des Valins ein Glycin enthält

```
UrdGT1b (WT): NV-DW-HVDDM-V
0204        : NI-DS-HVDDM-L (neu+UrdGT1b)
1-1         : NI-DS-HGDDM-L (neu+UrdGT1c)
UrdGT1c (WT): SI-AP-NGEAK-L
```

3.2.7 Analyse neuer Urdamycine

Durch die Arbeiten zu den hybriden GTs und der Bibliothek konnten die neuen Urdamycine N und P erzeugt werden, sowie 12b-Derhodinosyl-Urdamycin O (Abb.27, NMR-Tabellen im Anhang).

Urdamycine N und 12b-Derhodinosyl-Urdamycin O

Diese Substanzen, überwiegend 12b-Derhodinosyl-Urdamycin O (12b-DUO), treten nach Überexpression von *urdGT1c* oder *urdGT1c*-artigen hybriden GTs in *S.fradiae* AX oder *S.fradiae* XTC auf, letzterer trägt *urdGT1c* chromosomal unter der Kontrolle des *ermE*-Promotors. In *S.fradiae* XTC im untransformierten Zustand wurden keine derartigen neuen Urdamycine gefunden.

Exprimiertes Gen (Spezifität)	**Stamm**	**Retentionszeit (min)**	**Peakfläche 12b-DUO (%)**	**Hauptprodukt (Peakfläche in %)**
*urd*GT1c	AX	17.07	< 5	12b-DUG (33.55)
H1 (1c)	AX	16.76	7.79	12b-DUG (22.56)
H7 (1c)	AX	16.86	12.38	100-1 (37.09)
H2 (1b)	XTC	16.01	6.79	12b-DUA (26.82)
H3 (inaktiv)	XTC	16.72	18.95	12b-DUG (37.45)
H6 (1b)	XTC	18.41*	27.72	12b-DUA (29.01)
H9 (1b)	XTC	18.50*	4.57	12b-DUA (50.37)
H3S (1b)	XTC	18.89*	20.29	12b-DUG (27.87)
H8 (1b)	XTC	18.20*	9.27	12b-DUA (39.46)

Tab. 18 : Details der HPLC- und LC-MS Analyse für 12b-DUO (alle Signale mit A-Typ-Spektrum und Masse 714.3, siehe Abb. 12 und 21) des Rohextraktes, gewonnen aus *S.fradiae* AX oder XTC nach Expression der aufgeführten hybriden GT-Gene. Chromatographische Untersuchungen gemäß Abschnitt 2.12.4, mit (*) markierte Daten wurden mit einer HP 1000 HPLC, die nichtmarkierten mit einer Tosoh SC-8020 HPLC erzielt.

12b-DUO besitzt ein A-Typ-, Urdamycin N ein B-Typ-Polyketid. Ungewöhnlich ist das Vorhandensein zweier L-Rhodinosen in der Zuckerseitenkette, wobei die terminal stehende L-Rhodinose α(1-4)-glycosidisch an die Hydroxylgruppe von C-4 der vorhergehenden L-Rhodinose angeknüpft ist (C-4A im Urdamycin G). Dieses Trisaccharid ist nach dem für Urdamycine üblichen C-glycosidischen Modus an Position C-9 mit dem Aglycon verbunden. Für UrdGT1c oder die genannten UrdGT1c-artigen Hybriden kann somit keine Flexibilität hinsichtlich des Zuckerdonors konstatiert werden. Auch wurde bei *S.fradiae* RN-435 gezeigt, daß nur L-Rhodinose an die zweite Position im Disaccharid transferiert wird, obwohl auch D-Rhodinose und D-Amicetose verfügbar wäre. Gleichwohl ist aber Flexibilität hinsichtlich der akzeptierenden Hydroxylgruppe gegeben: entweder die an C-3´ der D-Olivose und Ausbildung einer α(1-3)-glycosidischen Bindung im Wildtyp oder aber nach Überexpression die an C-4A der L-Rhodinose und Ausbildung einer α(1-4)-glycosidischen Bindung.

Auch bei Verwendung von *S.fradiae* 16-14 (Trefzer *et al.*, 2000) als Wirt zur Überexpression von *urdGT1c* traten Urdamycine mit der ungewöhnlichen Seitenkette (D-Olivose-L-Rhodinose-L-Rhodinose) auf. Dies waren die Urdamycine N und O.

Die Strukturaufklärung der Urdamycine N und O erfolgte durch Prof. Dr. Jürgen Rohr, Medical University of South Carolina, Charleston SC, USA, 12b-DUO wurde durch HPLC-UV und LC-MS (durch Prof. Dr. K. Ichinose) identifiziert.

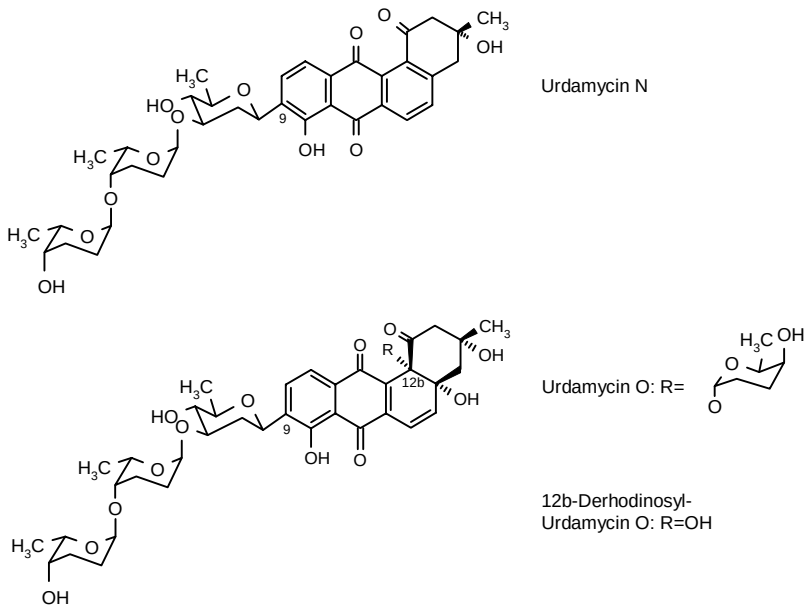


Abb. 27: Strukturformeln der neuen Urdamycine N, O und 12b-DUO.

Urdamycin P

Das bereits erwähnte Urdamycin P (zur Struktur sowie HPLC- und LC-MS-Details siehe Abb. 28) tritt bedingt durch eine neue bzw. erweiterte Regiospezifität bei einigen GTs auf, die im Bereich IIa Aminosäureaustauschen unterzogen wurden, z.B. GT1-1. Urdamycin P besitzt die Masse 730.8 amu, ein A-Typ Aglycon, und trägt ein Trisaccharid das C-glycosidisch an Position C-9 des Aglycons gebunden ist (NMR-Tabelle im Anhang). Das Trisaccharid ist, wie im Urdamycin A auch, zusammengesetzt aus zwei D-Olivosen und einer L-Rhodinose, jedoch trägt die C-glycosidisch gebundene D-Olivose zwei Zucker: sowohl die L-Rhodinose über eine α(1-3)-glycosidische Bindung als auch die D-Olivose über eine β(1-4)-glycosidische Bindung, das Saccharid ist also verzweigt und nicht mehr linear. Die Strukturaufklärung erfolgte durch Dr. Philip J. Sidebottom, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage, UK. Dort erfolgte durch Dr. Nicholas L. Taylor auch zusätzliche Massenspektroskopie.

Hybride GT	**Stamm**	**Retentionszeit (min)**	**Peakfläche Urdamycin P (%)**	**Hauptprodukt (Peakfläche in %)**
GT1-1	XTC	8.94	15.39	12b-DUG (43.98)

Tab. 19: Details der HPLC- und LC-MS Analyse des Rohextraktes, gewonnen aus *S.fradiae* XTC nach Expression des Gens GT1-1. Chromatographische Untersuchungen gemäß Abschnitt 2.12.4.

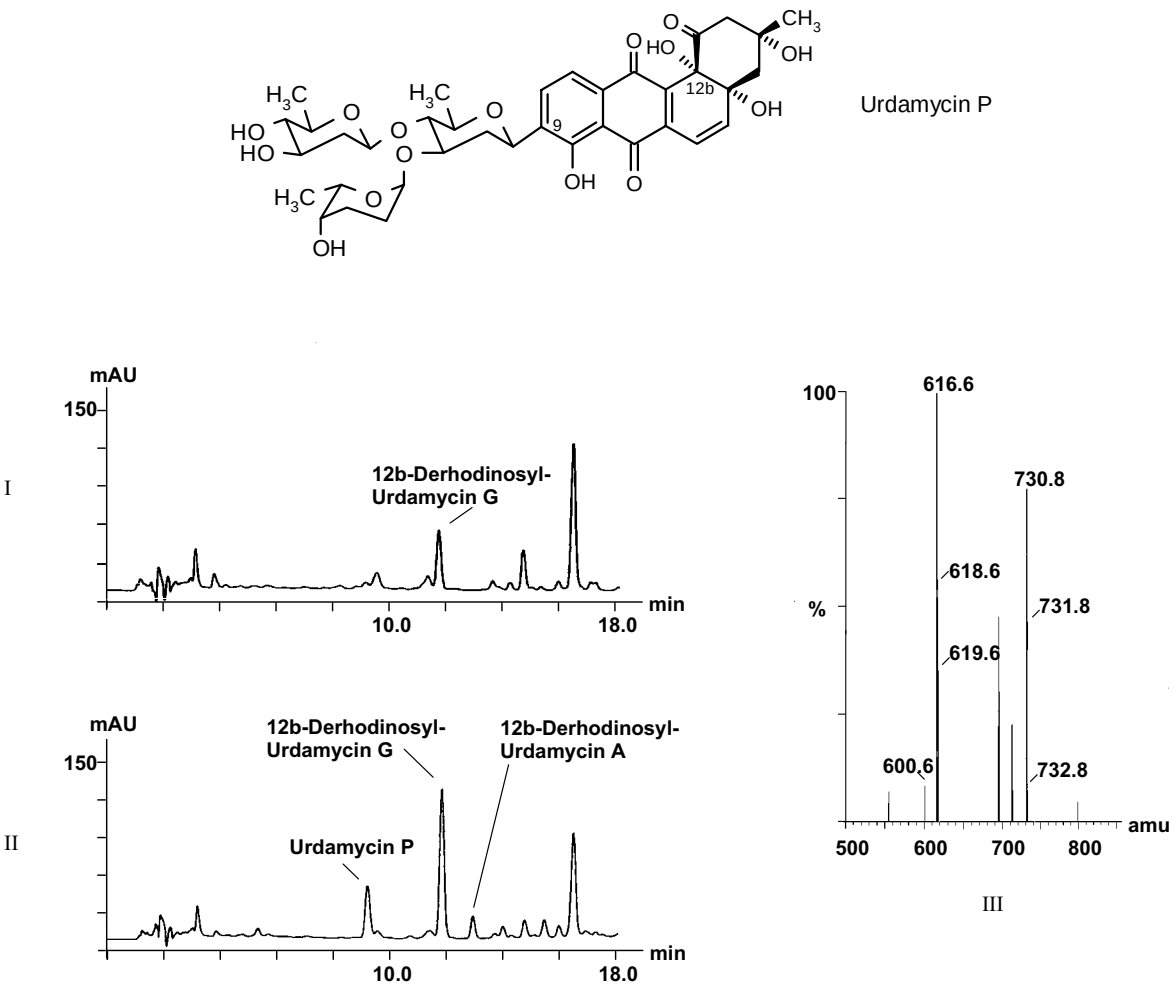


Abb. 28: Urdamycin P: Strukturformel sowie HPLC- und LC-MS-Analyse. HPLC-Chromatogramm von Rohextrakten aus *S.fradiae* XTC untransformiert (I), *S.fradiae* XTC+GT1-1 (II), sowie Massenspektrum nach chemischer Ionisation (APCI-MS) im negativen Modus (III). Das Signal bei 730.8 amu ist das des Moleküls, bei 616.6 tritt ein Artefakt durch Abspaltung der L-Rhodinose, bei 600.6 durch Abspaltung der D-Olivose auf.

3.3 Proteinexpression und -reinigung

3.3.1 Überexpression von *urdM*

Der Gebrauch der Codons in *Streptomyces* unterscheidet sich von dem von *E.coli*. Da *Streptomyces* bevorzugt GC-reiche Codons verwendet (Bibb *et al.*, 1984), sollte anhand der Expression von *urdM* als Pilotexperiment untersucht werden, inwieweit Gene aus dem Urdamycin-Biosynthesegencluster in *E.coli* überexprimiert werden könnten. Aus zwei Gründen fiel die Wahl auf UrdM: Erstens aufgrund seiner Länge - nach DNA-Sequenzdaten vorausgesagt sind 671 AS (siehe Abb. 30), kalkuliertes Molekulargewicht ist 70.5 kDa, kalkulierter isoelektrischer Punkt ist pI=6.26 - zweitens aufgrund seines ungewöhnlichen Aufbaus. Homologievergleiche ergaben Ähnlichkeiten zu Oxygenasen im N-terminalen Bereich (AS 1-383), beispielsweise zu LanM aus dem Landomycin-Cluster (Westrich *et al.*, 1999), während der C-terminale Bereich Reduktasen ähnelt (AS 414-671), z.B. LanV oder LanN (Westrich *et al.*, 1999). Geninaktivierung durch weitgehende Deletion sowie Genkomplementierung zeigte, daß UrdM die Einführung des Sauerstoffs an Position C-12b katalysiert (Faust *et al.*, 2000). Somit ist UrdM das Enzym, das für die Verzweigung der Urdamycin-Repertoires in A-Typ- und B-Typ-Polyketide verantwortlich ist. Unklar blieb, ob *urdM* tatsächlich einen durchgehenden Leserahmen darstellt und sowohl für die Oxygenase als auch die Reduktase codiert, oder ob es sich um zwei separate Proteine handelt, nach systematischer Nomenklatur wäre die Bezeichnung für die Reduktase UrdN. *E.coli* BL21(DE3) x pLysS

(siehe 2.5) wurde mit den Plasmiden pRSETb-urdM (siehe Anhang, Abb. 46, Konstruktion in Abschnitt 2.10.2 beschrieben) zur Expression eines Fusionsproteins $(His)_6$-UrdM sowie dem leeren Vektor pRSETb (siehe 2.4.1) zur Kontrolle transformiert (siehe 2.9.1). Das Produkt des Leserahmens von *urd*M wurde unter denaturierenden Bedingungen auf einem 12%-SDS-Polyacrylamid-Trenngel analysiert (siehe Abb. 29, die Methodik ist in Abschnitt 2.1.2 beschrieben).

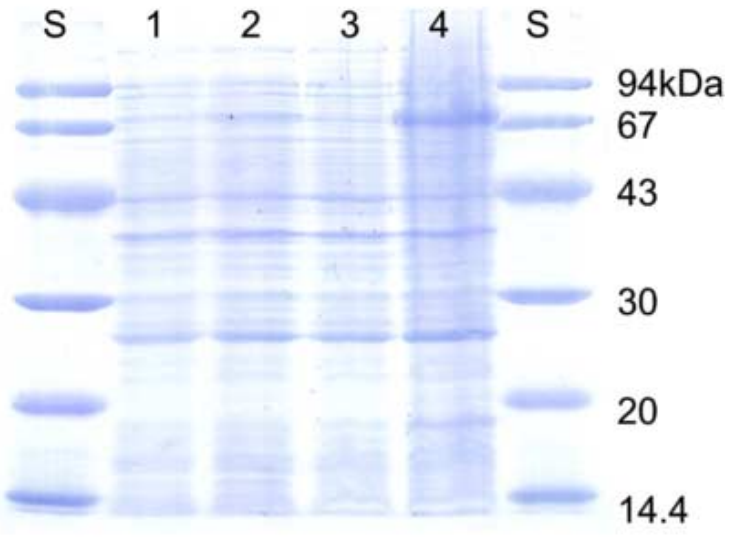


Abb 29: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Expression von pRSET-urdM sowie pRSETb (Kontrolle) in *E.coli* BL21(DE3) x pLysS. 1: Kontrolle vor Induktion, 2: *E.coli* BL21(DE3) x pLysS x pRSETb-urdM vor Induktion 3: Kontrolle nach 4h Induktion, 4: *E.coli* BL21(DE3) x pLysS x pRSETb-urdM, nach 4h Induktion. S: Proteinstandard (kDa)

Im Bereich knapp überhalb der 67.0 kDa-Bande des Standards ist beim Extrakt aus *E.coli* mit pRSETb-urdM (4h nach Induktion, siehe Spur 4) eine Bande zu erkennen, die deutlich an Intensität gewonnen hat, verglichen mit dem uninduzierten Zustand oder den Kontrollen. Das erwartete Genprodukt von *urdM* beträgt 43.5 kDa, das von *urdN* 27 kDa, zusammen also 70.5 kDa. Für keine weitere Bande im Proteingel kann nach Induktion eine Zunahme der Intensität festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt einerseits, daß *E.coli* BL21(DE3) x pLysS zur Expression auch langer streptomycetaler Gene geeignet ist, außerdem ist UrdM tatsächlich ein durchgehendes Protein mit nachgewieser Oxygenase- und Reduktasefunktion (an C-12b des Urdamycin-Polyketids).

```
        10          20          30          40          50          60
MVAPSLDVDV IVVGAGPVGL MLAGELLRTG GVRVTVLERL AEPTTESRAS MTMLTPSYEM

        70          80          90         100         110         120
ELLHERGLVE RLGPPPDAGP GHFGGIPLDL TEAGESRYAG QWKAPQIRVE AVLSTWATEL

       130         140         150         160         170         180
GAEVRRGHTV IGLVEAPDGV SVVATAPSGE RLRLSAAYIV GCDGEDSAVR RLAGFAFPGA

       190         200         210         220         230         240
DPTKELLRAD LAGIELRERR FERHPNGVAN ARRGPDGITR IMVHEFARVP GASRAPAFAE

       250         260         270         280         290         300
VRAAWARVTG EDISGAEPVW VNAFHNARRQ AARYRKGRVL LAGDAAHVQL PVGGQALNLG

       310         320         330         340         350         360
LQDAMDLGGK LAAHITGKAG EELLDTYHAG RHPVAARVLG NIEAQAQLLF GGPDVDALRA

       370         380         390         400         410         420
VFGELLGLGA ARRHLASMIS GLDGGAPTSV PRTGPDATAH PGPTRQHTPH RRTTMGKLTG

       430         440         450         460         470         480
KTALVTGSSR GIGRATAIRL AREGALVAVH CSRNREAADE TVATIEKEGG RAFSVLAELG

       490         500         510         520         530         540
VPGDVHELFL ALERGLKERT DATTLDILVN NAGVMGGVAP EEVTPELFDR LVAVNAKAPF

       550         560         570         580         590         600
FIVQRAVTLI PDGGRIINIS SGLTRFANPQ EVAYAMTKGA MDQLTLHFAK HLGSRNITVN

       610         620         630         640         650         660
SVGPGITNNG TPVFDNPEAV AQMAGYSVFN RVGEVTDVAD VVAFLAGDDA RWITGSYLDA

       670
SGAPCSAESR G
```

Abb. 30: Aminosäuresequenz von UrdM.

3.3.2 Überexpression von *urdR*

UrdR ist eine dTDP-Hexose-4-Ketoreduktase, die die Reduktion von dTDP-4-Keto-2,6-Dideoxy-D-Glucose zu D-Olivose katalysiert, also den letzten (und spezifischen) Schritt in der Biosynthese dieses Zuckers. UrdR hat ein errechnetes Molekulargewicht von MW=26.8 kDa und einen pI=6.07, das Protein umfaßt 247 AS (siehe Abb. 33). Es wurde als C-terminales 6xHis-Fusionsprotein hergestellt und aufgereinigt. Diese Arbeiten stehen in engem Zusammenhang mit Versuchen zur enzymatischen *in vitro*-Synthese nucleotidaktivierter Deoxyzucker (Butler und Elling, 1999, Amann *et al.*, 2001). Durch den Einsatz von UrdR soll der gesamte Biosyntheseweg zur D-Olivose *in vitro* rekonstruiert werden.

Die Genexpression (siehe 2.11) erfolgte in *E.coli* XL 1 blue (siehe 2.5), transformiert mit pQE-R (siehe Anhang, Abb. 45 sowie Details zur Konstruktion in 2.10.5), außerdem zur Kontrolle mit dem leeren Vektor pQE-60 (2.4.1). Die IPTG-induzierte Expression von UrdR war erfolgreich. Das Produkt des Leserahmens von *urd*R wurde unter denaturierenden Bedingungen auf einem 12%-Polyacrylamid-Trenngel analysiert (siehe Abb. 31, zur Methodik Abschnitt 2.1.2).

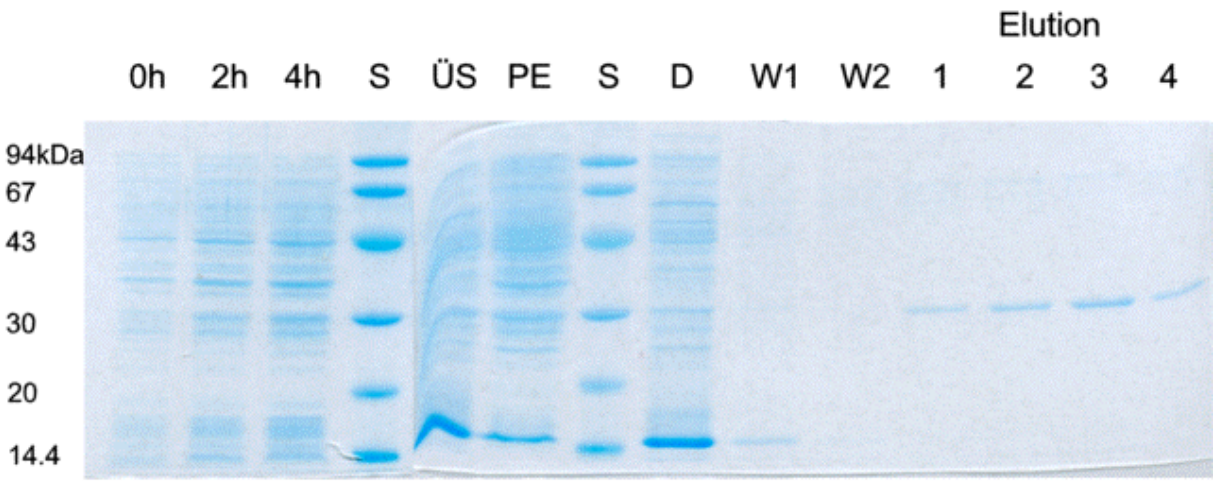


Abb 31: SDS-PAGE. Expression von pQE-R in *E.coli* XL1 blue. Analyse des Proteinmusters vor Induktion (0h), nach zwei und vier Stunden Induktion (2h bzw 4h), sowie nach Zell-Lyse im Überstand und Pellet (ÜS bzw. PE). Außerdem Kontrolle des Durchflusses der Nickelsäule (D), der Waschfraktionen (W1 und W2) sowie der Eluate (Elution 1-4). S: Proteinstandard (kDa). Die Abbildung wurde aus zwei getrennten SDS-Polyacrylamidgelen kompiliert.

Im Bereich knapp unterhalb der 30.0 kDa-Bande des Markers ist eine Bande zu erkennen, die deutlich an Intensität gewonnen hat, verglichen mit dem uninduzierten Zustand oder der Kontrolle mit pQE-60 (siehe Abb. 32). Das erwartete Genprodukt von *urd*R (mit Histidin-Tag) beträgt 28.0 kDa. Für keine weitere Bande kann nach Induktion eine Zunahme der Intensität festgestellt werden. Nach einmaliger Aufreinigung unter nativen Bedingungen konnte das Protein aus dem löslichen Überstand der Zell-Lyse praktisch zur Homogenität aufgereinigt werden, beurteilt nach dem coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gel.

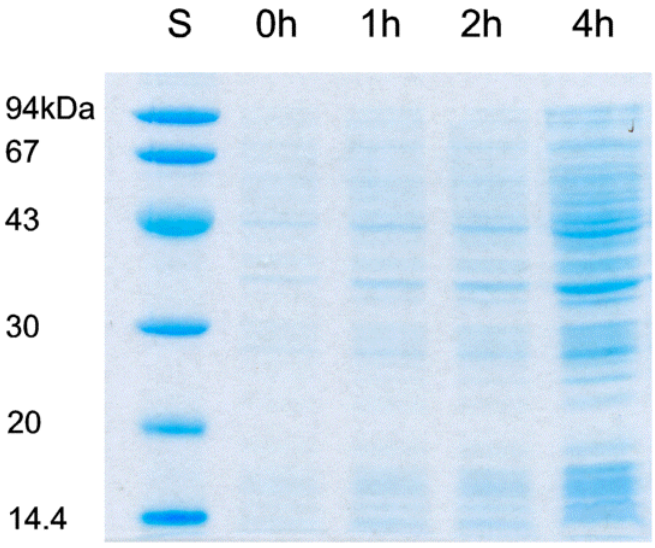


Abb 32: SDS-PAGE. Expression von pQE-60 in *E.coli* XL1 blue. Analyse des Proteinmusters vor Induktion (0h), nach einer, zwei und vier Stunden Induktion (1h, 2h bzw. 4h). S: Proteinstandard (kDa).

```
        10          20          30          40          50          60
MDIVGNGFLA RNLRPLAERH PDTVALAAGV SWASGTSDAD FAREAALLRD TAKQCAATGR

        70          80          90         100         110         120
RLLFFSTAAT GMYGLAEGPG REDTPVTPCT PYGAHKLALE ELLRDSGADH VILRLGHLVG

       130         140         150         160         170         180
PDQPEHQLLP TLVRHLREGA VRIHRGAARD LIDVSDVVTI VDCLLGLDLK AETVNVASGY

       190         200         210         220         230         240
AVPVKDIVEL LRRRLGVEAR YEFQDAGGQH VISIEKLRAL VPQVQDMGFG PDYYRRILSD

       250
FTSAVRI...
```

Abb. 33: Aminosäuresequenz von UrdR.

3.3.3 Überexpression von *urdGT1b*

UrdGT1b ist die dTDP-D-Olivose:Urdamycin G-Glycosyltransferase und eines der beiden Ausgangsenzyme für die Herstellung der GT-Genbibliothek. UrdGT1b hat ein errechnetes Molekulargewicht von MW=41.0 kDa, der kalkulierte isoelektrische Punkt beträgt pI=5.45, das Protein umfaßt 388 AS.

Expression in *E.coli*

In *E.coli* BL21(DE3) x pLysS bzw. Origami (DE3) wurde UrdGT1b durch die Konstrukte pRSET-1b als N-terminales 6xHistidin-Fusionsprotein (42 kDa) bzw. durch pGEX-1b als Fusion Glutathion-S-Transferase-UrdGT1b (67.0 kDa) exprimiert (siehe 2.10.3, Karten im Anhang, Abb. 44 und 47). Kontrollen waren die leeren Vektoren pRSETb oder pGEX6-2P (siehe 2.4.1). Aufgrund der Schwierigkeit, lösliches Protein zu erhalten, wurden die Expressionbedingungen hinsichtlich Medium, Induktionsdauer, -temperatur und –stärke sowie $MgCl_2$-Konzentration variiert. Am besten geeignet zur Herstellung löslichen Proteins war *E.coli* BL21(DE3) x pLysS x pGEX-1b in NZCYM-Medium+10 mM $MgCl_2$, bei 22°C vor, sowie 13°C während der Induktion. Diese erfolgte mit 20 µM IPTG für 20 h (siehe 2.11). Dennoch fand sich der größte Teil des überexprimierten Proteins nicht im Überstand. Es kam hinzu, daß das Fusionsprotein GST-UrdGT1b schlecht an das Glutathion-Sepharoseharz band, und somit die Ausbeute des (zumindest partiell) gereinigten Proteins sehr gering war.

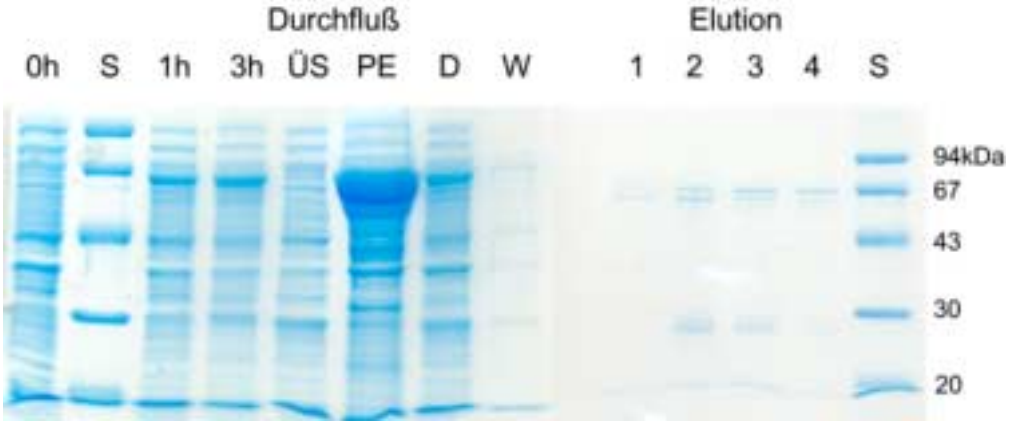


Abb. 34: SDS-PAGE. Expression von pGEX-1b in *E.coli* BL21(DE3) x pLysS. Analyse des Proteinmusters vor Induktion (0h), nach einer und drei Stunden Induktion (1h bzw 3h), sowie nach Zell-Lyse im Überstand und Pellet (ÜS bzw. PE). Außerdem Kontrolle des Durchflusses der Glutathionsäule (D), der Waschfraktion (W) sowie der Eluate (Elution 1-4). S: Proteinstandard (kDa). Die Abbildung wurde aus zwei getrennten SDS-Polyacrylamidgelen kompiliert.

Das lösliche Protein wurde ansequenziert. Obwohl Position 8 nicht eindeutig ausgewertet identifiziert werden konnte, ist die gefundene Sequenz mit der der Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* (Smith *et al.*, 1986) zweifelsfrei identisch (das entsprechende Gen wurde zur Herstellung des Vektors pGEX 6P-2 verwendet). Das Protein ist somit das gesuchte Fusionsprotein. Gefunden wurde ^{1}MSPILGYXKIKGLVQP^{16}, die ersten 20 AS der GST aus *Schistosoma japonicum* lauten ^{1}MSPILGYWKIKGLVQP^{16}.

Expression in *S.fradiae* XTC

Weiterhin wurde UrdGT1b in *S.fradiae* XTC als C-terminale 6xHistidinfusion exprimiert und per Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) aufgereinigt (siehe 2.11). Diese Expression basierte auf dem Plasmid pUWL-1bHIS, das zur Transformation eingesetzt wurde (siehe 2.10.4 und Abb. 48). Zur Kontrolle wurde *S.fradiae* XTC mit dem leeren Vektor pUWL201 (siehe 2.4.1) transformiert. Die Wahl von *S.fradiae* XTC hat gegenüber *E.coli* den prinzipiellen Vorteil, daß das durch den Histidin-Tag modifizierte Protein UrdGT1b-6HIS sofort auf Funktionalität geprüft werden kann, weil der Phänotyp (*urdGT1b*$^{-}$) zu *urdGT1b*$^{+}$ komplementiert wird: Bei Funktionalität muß also 12b-DUA im Urdamycin-Produktionsspektrum auftreten und mindestens teilweise das Edukt 12b-DUG ersetzen. Dies war der Fall. Die Herstellung von löslichem Protein und dessen Aufreinigung mittels IMAC war erfolgreich, auch konnte die Authentizität des Proteins durch Sequenzierung verifiziert werden. Die ersten 17 AS von UrdGT1b lauten: ^{1}MRVLMMSTPAPHFTPLV^{17}, gefunden wurde ^{1}MRVLMMSTPAXHFTPLV^{17}, also bis auf ein nicht eindeutig identifiziertes Prolin, welches vom Nachlauf des vorangegangenen überdeckt wurde, ist Identität gegeben (Dr. E.Schiltz, pers. Mitteilung).

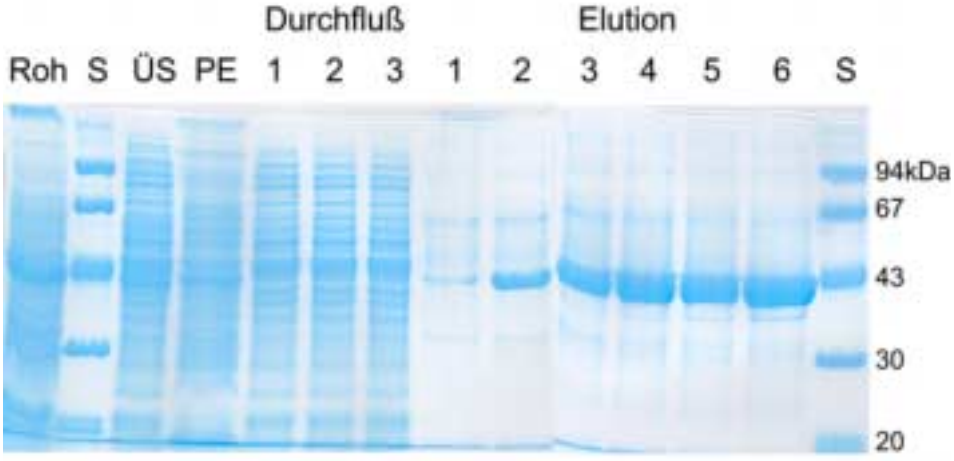


Abb. 35: SDS-PAGE. Expression von pUWL-1bHIS in *S.fradiae* XTC. Analyse des Proteinrohextraktes, gewonnen aus der lysierten Zellmasse nach 44 h Inkubationsdauer (Roh), sowie des Überstandes und Pellets (ÜS bzw. PE). Kontrolle des Durchflusses der Nickelsäule (Durchfluß 1-3), sowie der Eluate (Elution 1-6). S: Proteinstandard (kDa). Die Abbildung wurde aus zwei getrennten SDS-Polyacrylamidgelen kompiliert.

4. Diskussion

4.1 Funktionsaufklärung UrdR und UrdZ3

4.1.1 Allgemeine Strategie

Die Funktionsaufklärung für beide Enzyme erfolgte durch den Ansatz der reversen Genetik. Sie bedient sich einer bereits bekannten DNA-Sequenz, die ein offenes Leseraster unbekannter Funktion enthält. Anschließend wird spezifisch eine Inaktivierung des Leserasters vorgenommen, um durch die phänotypische Charakterisierung der Mutante Hinweise auf die Funktion des zerstörten Leserasters zu erhalten. Zum abschließenden Beweis einer Genfunktion wird die entsprechende Mutante mit einem Konstrukt komplementiert, das die Expression des WT-Gens erlaubt. Daraufhin muß wieder der WT-Phänotyp entstehen. Strategie war die Geninaktivierung durch Austausch gegen ein im Leseraster verschobenes Allel.

4.1.2 Inaktivierung *urdZ3*

Die Inaktivierung des Gens *urdZ3* ergab zweifelsfrei die spezifische Zugehörigkeit zum L-Rhodinose-Biosyntheseweg. In Kombination mit der Identifizierung von dTDP-4-Keto-2,6-Dideoxy-Glucose als letztem gemeinsamen Intermediat der D-Olivose- und L-Rhodinose-Biosynthese ergeben sich drei enzymatische Schritte – C-3-Deoxygenierung durch UrdQ, 5-Epimerisierung durch UrdZ1 sowie C-4-Ketoreduktion durch UrdZ3 (Hoffmeister *et al.*, 2000) – um von ihm zur L-Rhodinose zu gelangen (siehe Abb. 36). Die Abfolge dieser Schritte in der genannten Reihenfolge kann als sehr wahrscheinlich gelten.

- Fände die Ketoreduktion als erster Schritt vor der C-3-Deoxygenierung durch UrdQ statt, wäre die Funktion von UrdR und UrdZ3 identisch und keinem spezfischen Biosyntheseweg zugehörig, dies widerspäche den hier gefundenen Ergebnissen.
- Fände die Ketoreduktion nach der C-3-Deoxygenierung, jedoch vor der Epimerisierung statt, wäre in der Wildtyp-Zelle bereits D-Rhodinose verfügbar. Dieser Zucker wird von UrdGT2 als Substrat akzeptiert, jedoch wurde (außer in *S.fradiae* RN-435) nie ein Urdamycin gefunden, welches diesen Zucker beinhaltet. Die Abfolge von 5-Epimerisierung mit nachfolgender Ketoreduktion ist außerdem in Einklang mit den Befunden aus anderen Zucker-Biosynthesewegen, z.B. dem des dTDP-L-Epivancosamin aus dem Chloroeremomycinproduzenten *Amycolatopsis orientalis* (Chen *et al.*, 2000) oder dem für dTDP-L-Mycarose aus dem Erythromycinproduzenten *Saccharopolyspora erythraea* (Summers *et al.*, 1997, Salah-Bey *et al.*, 1998). Jedoch wurde in der Lipopolysaccharidbiosynthese des gram-negativen Bakteriums *Yersinia pseudotuberculosis* eine 2-Epimerase gefunden, die CDP-Paratose zu CDP-Tyvelose epimerisiert, obwohl die Ketoreduktion an C-4 bereits stattfand (Thorson *et al.*, 1994).

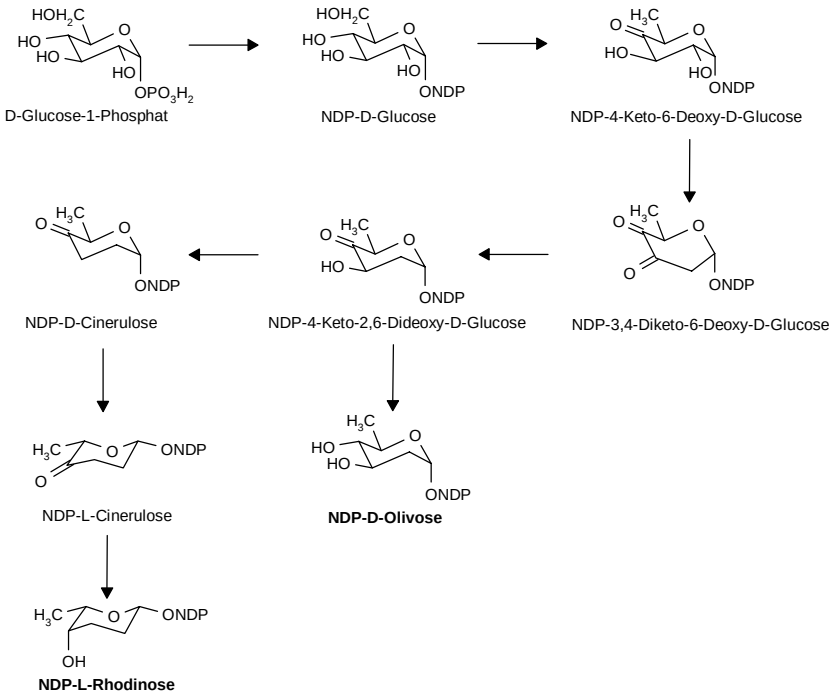


Abb. 36: Biosyntheseweg von nucleotidaktivierten Deoxyzuckern am Beispiel von D-Olivose und L-Rhodinose. Der Nachweis von NDP-4-Keto-2,6-Dideoxy-Glucose als letztem gemeinsamen Intermediat sowie der Spezifität der Ketoreduktionsschritte wurden im Rahmen dieser Arbeit erbracht.

4.1.3 Inaktivierung *urdR*

Durch Inaktivierung von *urdR* konnte dessen Produkt als spezifisch für die D-Olivose-Biosynthese zugehörige dTDP-2,6-Dideoxyhexose-4-Ketoreduktase ermittelt werden (Abb. 36). Die Konsequenz aus dieser Geninaktivierung war neben der Produktion der für *S.fradiae* bereits beschriebenen Urdamycine I, J und K sowie Rabelomycin eine große Diversität neuer Urdamycine: durch Kernresonanzspektroskopie konnten vier vollständig in ihrer Struktur aufgeklärt werden (Urdamycine M, R-T), weitere drei weitgehend (Substanzen A21, A22, A239), die Struktur von acht weiteren kann über UV-VIS-Spektren und LC-MS vorhergesagt werden. Das ebenfalls nachgewiesene Angucyclin Tetrangomycin wurde für *S.fradiae* bislang nicht beschrieben. Die Ergebnisse sind in zweifacher Hinsicht interessant:

Erstens kann durch eine Verminderung der enzymatischen Ausstattung das Potential zur Zuckerbiosynthese bzw. das Repertoire an Zuckern erweitert werden: D-Rhodinose und D-Amicetose sind in *S.fradiae* Tü2717 bislang unbekannt, zumindest D-Rhodinose ist aber als Bestandteil des Sakyomicins als Bestandteil eines Sekundärmetaboliten aus *Nocardia* spec. in Erscheinung getreten (Nagasawa *et al.*, 1984, Rohr und Thiericke, 1992). Es kann spekuliert werden, daß das Blockieren der D-Olivose-Biosynthese einen Überfluß an Rhodinose-Präkursoren erzeugt. Die D-Cinerulose-5-Epimerase UrdZ1, welche die Epimerisierung in die L-Konfiguration katalysiert, könnte in den Bereich der Substratsättigung gelangen, die Epimerisierung verläuft nicht mehr quantitativ. Auf diese Weise entstehen nach der letzten Ketoreduktion offenbar D-Rhodinose- und D-Amicetose-Moleküle, welche ebenfalls zum Glycosyltransfer herangezogen werden. Im Fall der D-Amicetose ist eine Reduktion des Ketons an C-4 der D-Cinerulose zu einer äquatorial stehenden Hydroxylgruppe erforderlich.

Diese Ergebnisse werfen neues Licht auf die Spezifität der beteiligten Enzyme, vor allem für UrdZ3 und die Glycosyltransferasen. Offenbar vermag UrdZ3 vergleichsweise unspezifisch C-4-Ketoreduktionen durchzuführen. Es sind dies die im Wildtyp übliche Reduktion des nucleotidaktivierten Zuckers L-Cinerulose zu L-Rhodinose (siehe Abb. 5), sowie nur im Stamm *S.fradiae* RN-435 D-Cinerulose zu D-Rhodinose oder D-Amicetose. Diese relaxierte Spezifität von UrdZ3 ist umso erstaunlicher, als das Enzym unter Wildtyp-Bedingungen hinreichende Spezifität besitzen muß, um nicht mit dem D-Olivose-Biosyntheseweg zu interferieren. Entscheidend ist offenbar nicht die Konfiguration des Zuckers – es werden D- und L-Zucker als Substrat akzeptiert - sondern möglicherweise die OH-Gruppe an C-3. Interessanterweise führte das umgekehrte Experiment, die zuvor beschriebene Inaktivierung von UrdZ3, nicht zu neuen Zuckern. Im Vergleich zu UrdZ3 ist also UrdR offenbar das deutlich spezifischere Enzym. Unwahrscheinlich, aber auch nicht auszuschließen, ist eine Reduktion des Ketons durch eine hinreichend unspezifische Reduktase eines anderen Stoffwechselweges,

Am C-Atom 9 des Urdamycin A bzw. B-Polyketids treten anstelle D-Olivose zwei neue Zucker auf: D-Rhodinose und D-Amicetose, an C-12b jedoch nur L-Rhodinose (im Falle des A-Typ-Aglycons). Dies bestätigt einerseits frühere Beobachtungen, daß die Glycosidierung an C-12b mit L-Rhodinose ein sehr spezifischer Transfer ist, katalysiert durch UrdGT1a (Hoffmeister, 1998). Andererseits zeigt sich der relativ unspezifische Charakter von UrdGT2, also der GT, die die C-glycosidische Bindung eines Zuckers an C-9 katalysiert. Zusammen mit dem Befund, daß UrdGT2 auch D-Mycarose zu übertragen vermag (A.Trefzer, pers. Mitteilung) scheint UrdGT2 spezifisch für D-Zucker. Hingegen spielen die Substituenten an C-3 des Zuckers (Wasserstoffe, Hydroxylgruppe äquatorial oder axial, bzw. Methylgruppe) sowie eine äquatorial bzw. axial positionierte Hydroxylgruppe an C-4 keine Rolle, so daß Mycarose, Amicetose und Olivose transferiert wird. Weiterhin bemerkenswert ist bei UrdGT2 das Spektrum an Akzeptorsubstraten, es umfaßt einerseits die Urdamycin A- und B-Typ Polyketide, aber auch andere Polyketide, z.B. Premithramycinon und dessen 4-O-Demethyl-Analogon (A.Trefzer, pers. Mitteilung) sowie Naphthazarin (Künzel *et al.*, 1999).

Im Zusammenhang mit anwendungsbezogenen Aspekten der Kombinatorischen Biosynthese haben dTDP-Hexose-4-Ketoreduktasen Aufmerksamkeit erregt. Es gelang, im Daunomycin-Produzenten *Streptomyces peucetius* dessen dTDP-Hexose-4-Ketoreduktase-Gen *dnmV* zu inaktivieren und durch andere dTDP-Hexose-4-Ketoreduktase-Gene zu komplementieren: *eryBV* aus dem Erythromycin-Produzenten oder *avrE* aus dem Avermectin-Produzenten. Dies führte zur Produktion von Epirubicin, dem 4´-Epimer des Adriamycins. Epirubicin trägt als Zucker das 4´-Epimer des L-Daunosamin, ist ebenfalls ein klinisch wichtiges Antitumor-Antibiotikum, verursacht jedoch geringere Nebenwirkungen als das Adriamycin selbst, war aber nur auf partialsynthetischem Wege und dann auch nur in minderer Ausbeute darstellbar. (Madduri *et al.*, 1998, Arcamone, 1998).

Es wurden durch HPLC und LC-MS vier Urdamycin-Paare (je A-und B-Typ-Aglycon) identifiziert, die einen Trideoxyzucker an C-9 tragen. Als Zucker wurden D-Amicetose bzw. D-Rhodinose gefunden. Ungeklärt bleiben müssen die strukturellen Details der Zucker bei zwei dieser Paare. Es erscheint möglich, daß es sich um die gleichen Zucker, allerdings aus der L-Reihe handelt. L-Rhodinose ist in *S.fradiae* RN-435 vorhanden, das Auftreten von L-Amicetose erscheint durch die nachgewiesene Flexibilität der Ketoreduktase UrdZ3 möglich. Allerdings setzt diese Spekulation voraus, daß UrdGT2 auch L-Zucker transferieren kann. Dieser Nachweis ist

bislang noch nicht erbracht worden. Immerhin wurde für eine andere, ähnlich flexible GT, ElmGT aus dem Elloramycin-Produzenten, diese Flexibilität nachgewiesen (Blanco *et al.*, 2001).

Für die Substanzen A21 und A22 ist das A-Typ Aglycon, sowie eine L-Rhodinose an Position C-12b nachgewiesen, außerdem ein Disaccharid an C-9. Mit diesen Erkenntnissen und der bei beiden Substanzen gefundenen Masse 714 kommt ein Disaccharid mit Olivose oder Amicetose als C-glycosidisch gebundenem Zucker in Betracht, zweites Monomer wäre eine Dideoxyhexose. Deren Herkunft ist - spekulativ – durch eine nicht quantitative 3-Deoxygenierung durch UrdQ und anschließender Reduktion des Ketos an C-4 des Zuckers durch UrdZ3 zu erklären, denn UrdR kommt nach Geninaktivierung für diesen Schritt nicht in Betracht. Ebenso unklar bleibt, welche GT die Dideoxyhexose auf die Trideoxyhexose überträgt.

4.2 Substratspezifität bestimmender Bereich in UrdGT1b/UrdGT1c

Die Arbeiten zu UrdGT1b/UrdGT1c zeigen, daß zehn Aminosäure-Positionen im Bereich von AS 52-64 die Substratselektivität bestimmen, daß jedoch keine Aminosäure allein verantwortlich ist. Auch wurde nachgewiesen, daß durch Veränderungen der Aminosäuresequenz an diesen zehn Positionen die Substratspezifitäten von UrdGT1b und UrdGT1c kombiniert werden können sowie eine neue Spezifität erzeugt wurde.

4.2.1 Allgemeine Strategie

Um den Spezifität vermittelnden Bereich von UrdGT1b und UrdGT1c einzugrenzen, wurden durch Konstruktion und Expression entsprechender Gene hybride GTs erzeugt (siehe Abb. 19). Diese Strategie des Kombinierens von Proteinbereichen unterschiedlicher Herkunft zu einem Enzym voller Länge wurde zwar noch nie auf GTs oder andere Enzyme aus Antibiotika-Biosynthese angewandt, schien aber durch Erfolge mit anderen Enyzmgruppen aussichtsreich und für die vorliegende Fragestellung geeignet. So wurde auf diese Weise z.B. eine Substratspezifitäts-Domäne in Dioxygenasen zur Degradation von Aromaten identifiziert (Beil *et al.*, 1998), Enzymeigengschaften wie Thermostabilität, pH-Optima oder Chaperon-artige Aktivitäten zugeordnet (Conrad *et al.*, 1995, Singh und Hayashi, 1995, Kumar und Rao, 2000).

Während die Konstruktion aller hybriden GT-Gene sowie die der ortsspezifisch mutagenisierten möglich war, ohne in den gegebenen Gebrauch der Codons einzugreifen, wurde zur Konstruktion der GT-Bibliothek ein in *Streptomyces* selten gebrauchtes Leucin-Codon eingebaut (CTA, Codon 67). Es kommt in den Wildtypgenen *urdGT1b* und *urdGT1c* nicht vor, jedoch besitzen z.B. *urdR* und *urdM* je ein solches Codon, es tritt also in Urdamycin-Biosynthesegenen auf. Ersetzt wurde das Leucin-Codon TTG, dieses ist häufiger zu finden: 10x in *urdGT1b*, 8x in *urdGT1c*. Häufigstes Leucin-Codon ist CTG (30x in *urdGT1b*, 31x in *urdGT1c*).

Ein weiterer Eingriff in den Codon-Gebrauch stellt die stille Mutation von GCA →GCC im Codon55 (Alanin) in den GTs der Bibliothek dar, in diesem Fall wurde ein seltenes gegen ein häufiges Codon getauscht. Sinn dieser stillen Mutation war das Einführen einer *Bbe*I-Restriktionsstelle (GGCGCC) für den Fall, daß über die Primerbibliothek ein Alanin-Codon generiert wird, das Gen also ein *urdGT1c*-artiges Codon an dieser Position erhält. Alternativ kann an dieser Stelle ein GAC (Asp) entstehen. Beide Codons sollten mit gleicher Wahrscheinlichkeit entstehen. Vor Beginn der eigentlichen Arbeiten zur Herstellung der GT-Genbibliothek wurde eine Probe-PCR durchgeführt und eine Stichprobe aus den resultierenden, religierten Plasmiden wurde einer *Bbe*I-Restriktion unterzogen um nachzuweisen, daß die An- bzw. Abwesenheit der *Bbe*I-Stelle gleich häufig auftritt. Aufgrund des Verhältnisses von 46:36 (anwesend:abwesend) wurde von einer ungefähren Gleichverteilung aller zu durchmischenden Codons ausgegangen.

4.2.2 Urdamycine N und O

Während der Arbeiten zur Expression hybrider GT-Gene in den *S.fradiae* Stämmen AX und XTC wurden die neuen Urdamycine N und 12b-Derhodinosyl-Urdamycin O (12b-DUO) entdeckt. Die Trisaccharidseitenketten dieser Verbindungen sind ungewöhlich, da sie als terminalen Zucker eine α(1-4)-glycosidisch gebundene L-Rhodinose besitzen, anstelle einer β(1-4)-glycosidisch gebundenen D-Olivose (siehe Abb 4). Bemerkenswert ist einerseits der Bindungsmodus: unter Wildtypbedingungen katalysiert weder UrdGT1b noch UrdGT1c eine solche Bindungsart, und UrdGT1c überträgt keine L-Hexose auf eine andere L-Hexose. Dieses Resultat war wiederum Hinweis, daß die GTs ein breiteres katalytisches Potential besitzen würden als zunächst aus den Wildtyp-Bedingungen ersichtlich ist.

Das der Biosynthese der Urdamycine N und O zugrunde liegende Prinzip ist durch das Zusammentreffen dreier Faktoren erklärbar:

- eine relaxierte Spezifität von UrdGT1c bzw. der UrdGT1c-artigen hybriden GTs
- deren hohe Kopienzahl in der Zelle aufgrund Überexpression durch den *ermE*-Promotor
- das Fehlen von UrdGT1b als Konkurrent um das Zielsubstrat

Durch die letzten beiden Faktoren könnte die der UrdGT1c offenbar inhärente relaxierte Spezifität hinsichtlich der akzeptierenden Hydroxylgruppe zum Vorschein kommen, während sie im zellulären Geschehen des Wildtyps durch die Präsenz von UrdGT1b verdeckt wird, denn letztere vermag offenbar sehr viel besser den terminalen Zucker (D-Olivose) zu transferieren. Auch bei Expression von UrdGT1b-artigen Hybriden in *S.fradiae* XTC ist das Auftreten von 12b-DUO zu beobachten. Dies ist einerseits erklärbar durch das Vorhandensein von UrdGT1c unter der Kontrolle des *ermE*-Promotors als chromosomale Integration. Andererseits ist jeweils eine UrdGT1b-artige hybride GT in der Zelle präsent, so daß der dritte genannte Faktor offenbar nicht notwendige Voraussetzung ist. Die hybriden UrdGT1b-artigen Transferasen sind möglicherweise in ihrer katalytischen Aktivität etwas herabgesetzt, so daß durch die Überexpression von *urd*GT1c deren Einfluß überwiegt.

4.2.3 Hybride Glycosyltransferasen

Die Analyse der Urdamycin-Produktion nach Expression hybrider GTs ergab einerseits, daß mit zwei Ausnahmen alle hybriden und ortsspezifisch mutagenisierten GTs aktiv waren, und daß ihre jeweiligen Produkte die Hauptprodukte waren. Hierbei dominierten – wie im Wildtyp auch – die A-Typ-Verbindungen über diejenigen mit B-Typ-Aglycon.

Die erste Ausnahme betrifft H13, also UrdGT1b mit Bereich IIa aus UrdGT1c. Bei H13 war zwar - erwartungsgemäß - UrdGT1c-artige Spezifität gegeben, die katalytische Aktivität aber soweit herabgesetzt, daß die Edukte über die Produkte dominierten. Wurde Bereich IIa mit Bereich I oder III gleicher Herkunft kombiniert, trat dieser Effekt nicht auf. Dies legt den Schluß nahe, daß die Unterschiede in der Aminosäuresequenz - obwohl nachgewiesenermaßen nicht relevant für die Substratspezifität – dennoch nicht zufällig sind und Einfluß auf die Aktivität oder Stabilität des Enzyms besitzen. Zweite Ausnahme ist H3, die einzig inaktive hybride GT.

4.2.4 GT-Bibliothek

Wichtigstes Ergebnis nach Expression der GT-Bibliothek ist, daß es keine einzelne AS gibt, welche die Substratwahl bei UrdGT1b und UrdGT1c alleine diktieren, gewissermaßen also als Spezifitätsschalter dienen würde. Stattdessen entscheiden offenbar mehrere AS und ihre Kombinationen über die Akzeptanz der Substrate, vielleicht infolge struktureller Flexibilität. Dafür spricht, daß der Bereich IIa, verglichen mit anderen GTs, in Länge und AS-Sequenz sehr variabel ist, auch weisen einzelne GTs der Bibliothek Fehleinbauten auf (z.B. Ile52 bei GT0820, oder Phe53 bei GT1806, siehe 6.3), trotzdem werden sie toleriert. Die allgemeine Festlegung der Substrate könnte geschehen durch elektrostatische oder sterische Erfordernisse oder Hindernisse beim Zugang der Substrate an das katalytische Zentrum oder eine mangelhafte Freisetzung der Produkte und infolgedessen eine Enzym-Inhibition. Durch die Sequenzänderung verloren manche GTs ihre Fähigkeit, wie UrdGT1b zu agieren, also die 4A-OH-Gruppe im Urdamycin G bzw. 12b-DUG (siehe Abb. 4) zu olivosidieren, möglicherweise durch die sterische Unmöglichkeit, das Akzeptorsubstrat korrekt zu positionieren. Dies gilt offenbar nicht für die 4´-OH-Gruppe von 12b-DUG. Hier kann der Olivosyltransfer stattfinden und resultiert in der Bildung von Urdamycin P (siehe Abb. 4). Letztliche Sicherheit bezüglich dieser Aussagen kann aber nur die Kristallisation der Enzyme mit ihren Substraten bringen.

Der häufigste Fall in den GTs der Bibliothek ist die Verschmelzung der neuen Spezifität mit der von UrdGT1c. Verglichen mit dem Ausgangsenzym, einer UrdGT1b-artigen hybriden GT bedeutet dies eine Herabsetzung der Spezifität hinsichtlich des Zuckerdonorsubstrates (nucleotidaktivierte L-Rhodinose und D-Olivose), Erweiterung der Fähigkeiten bezüglich der Bindungsart: β(1-4)- und zusätzlich α(1-3)-glycosidisch, außerdem Akzeptanz eines neuen Zielsubstrates: Aquayamycin bzw. die 4-OH-Gruppe einer D-Olivose statt Urdamycin G und der 4-OH-Gruppe einer L-Rhodinose.

Das Prinzip, wie GTs ihre Substrate selektieren, ist trotz der enormen Bedeutung dieser Enzymkategorie bislang kaum untersucht worden. Lediglich für humane ABO-Blutgruppen-GTs wurde gezeigt, daß lediglich eine einzige AS aufgrund sterischer Gründe für die Spezifität des Zuckerdonorsubstrates (UDP-D-Acetylgalactosamin bzw. UDP-D-Galactose) verantwortlich ist (Seto *et al*., 1999).

Durch die Expression der GT-Genbibliothek wurden Informationen gewonnen, welche AS-Kombinationen den Olivosyltransfer favorisieren, v.a. ^{58}HVD^{60} und Met62. Mit diesen Daten, gewissermaßen ein Fingerabdruck wurden die vier putativen GTs des Avilamycin-Genclusters (Weitnauer et al., 2001) bezüglich ihrer Sequenz untersucht. Avilamycin ist ein modifiziertes Heptasaccharid-Antibiotikum, das zwei D-Olivose-Monomere enthält. Besonders AviGT1 zeigt interssanterweise Übereinstimmungen, darunter auch Val59 und Met62, jedoch ist UrdGT1b in diesem Bereich um 10 AS kürzer. Vielleicht reflektiert diese Tatsache die insgesamt kürzere Saccharidkette des Urdamycins, die eine entsprechend kleinere substratselektierende Domäne erforderlich macht. Nachfolgend das Alignment der relevanten Bereiche von UrdGT1b und AviGT1:

UrdGT1b: ^{52}N**V**G**D**W----------H**V**DD**M**^{62}

AviGT1 : ^{52}P**V**L**D**APDMMESARLAFY**V**QA**M**^{72}

Es ist während dieser Arbeit anhand UrdGT1b und UrdGT1c erstmals gezeigt worden, in welchem Bereich sich die Spezifität von Naturstoff-GTs entscheidet, und daß durch Editieren der Aminosäuresequenz die Spezifitäten erweitert bzw. herabgesetzt werden können. Eingangs wurde die Strategie der Glycorandomisierung erwähnt, die zwar Limitationen in der Kombinatorischen Biosynthese überwinden kann, jedoch angewiesen bleibt auf GTs, die das erzeugte, randomisierte Zuckerrepertoire übertragen können. Die vorliegende Arbeit trägt bei, der Glycorandomisierung diese GTs zur Verfügung stellen zu können.

4.3 Proteinexpression und-reinigung

4.3.1 UrdM

Als Pilotexperiment für diesen Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Gens *urdM* durchgeführt. Dieses Gen bzw. sein Produkt ist ungewöhnlich wegen seiner vermutlichen Bifunktionalität als Oxygenase und Reduktase. Üblicherweise liegen Oxygenase und Reduktase in anderen Antibiotika-Biosynthesewegen als getrennte Proteine vor, z.B. in dem des Landomycin (Westrich *et al.*, 1999), auch wurde auf DNA-Ebene eine interne Ribosomen-Bindestelle und ein wahrscheinliches Startcodon für die Reduktase gefunden, andererseits sind Enyzme mit kombinierter Aktivität auch für Antibiotika-Biosynthesen beschrieben worden (Summers *et al.*, 1992, Shen *et al.*, 1995). Das Ergebnis der Expression von *urdM* zeigt eindeutig, daß es sich um einen durchgehenden Leserahmen und somit um ein Protein handelt, das die Oxygenierung des entstehenden Urdamycin-Polyketids an Position C-12b katalysiert. Es ist anzunehmen, auch vor dem Hintergrund des Aufbaus anderer Biosynthese-Gencluster, daß *urdM* sich tatsächlich aus zwei getrennten Leserahmen ableitet, welche durch genetisches Rearrangement fusionierten. Die früheren Marksteine des vermutlichen früheren Genanfangs, Ribosomenbindestelle GGAGG und das Startcodon ATG, jetzt Codon 415, blieben konserviert. UrdM (siehe Abb. 30) zeigt in seiner Oxygenase-Domäne ein klassisches Rossmann-Motiv GxGxxG (Rossmann *et al.*, 1974) am Aminoterminus (^{14}GAGPVG^{19}), außerdem sind die dem Motiv vorangehenden AS hydrophob, meist Valin oder Leucin, wie dies für Monooxygenasen typisch ist (Decker *et al.*, 1992, Orser *et al.*, 1993), außerdem ist das Ribitylbindemotiv für FAD-bindende Enzyme (Russel und Model, 1988, Yang *et al.*, 1996) und die in die Ribitbindung involvierte Asparaginsäure (sehr wahrscheinlich D284 in UrdM) im Oxygenase-Anteil von UrdM konserviert. Die Reduktase-Domäne besitzt fünf Glycine in ihren ersten 20 AS, ein perfektes Rossmann-Motiv ist nicht vorhanden, jedoch könnte der Bereich ^{427}GSSRGIG^{433} eine Variante des klassischen Motivs GxGxxG darstellen. Ein früher separates Enzym vorausgesetzt, wären die heutigen AS 427-433 in UrdM die AS 13-19 in diesem hypothetischen früheren Enyzm, also im äußersten aminoterminalen Bereich, in dem dieses Motiv typischerweise auftritt. Wie in anderen Reduktasen auch, z.B. der dNDP-Hexose-4-Ketoreduktase UrdR, liegt ca. 100-130 AS stromabwärts dieses Motivs das ebenfalls zur Cofaktorbindung benötigte Motiv Yx_3Kx_3D/E, welches in UrdM dort streng konserviert vorhanden ist (^{574}YAMTKGAMD^{582}). Nach der Publikation von UrdM (Faust *et al.*, 2000) wurde im Biosynthese-Gencluster des Rubromycin-Produzenten, *Streptomyces* spec. PGA64, das Gen *pgaM* entdeckt, dessen Produkt alle genannten Charakteristika von UrdM besitzt (Metsa-Ketala *et al.*, 2001). Diese Befunde deuten somit auf den Ursprung von *urdM* aus zwei Genen hin.

4.3.2 UrdR

UrdR ist eine dTDP-4-Keto-2,6-Dideoxy-D-Glucose-Reduktase, die spezifisch für die D-Olivose-Biosynthese in *S.fradiae* Tü2717 verantwortlich ist. Das Protein konnte als C-terminale Hexahistidinfusion in *E.coli* XL1 blue löslich exprimiert und, beurteilt anhand eines SDS-Polyacrylamid-Gels, praktisch zur Homogenität aufgereinigt werden (siehe Abb. 31). UrdR ist, verglichen mit anderen dNDP-Hexose-4-Ketoreduktasen, mit 26.8 kDa und 247 AS ein kleines Enzym: UrdZ3 besitzt 347 AS (Hoffmeister *et al.*, 2000) GraOrf22 aus der Granaticin-Biosynthese 304 AS (Ichinose *et al.*, 1998), und DnmV aus der Daunomycin-Biosynthese 307 AS (Otten *et al.*, 1997). Dennoch weist UrdR die typischen Sequenzmerkmale, wie z.B. Cofaktorbindemotiv auf.

Nach der Etablierung des Protokolls für eine Expression in löslicher Form und Aufreinigung von UrdR wurde die Expression für einen weitergehenden Einsatz im Rahmen einer enzymatischen *in vitro*-Synthese von D-Olivose im Arbeitskreis von Prof. Dr. L.Elling, Forschungszentrum Jülich, wiederholt und das Enyzm für erste

in vitro Synthesen verwendet. Obwohl die späten Schritte dieses Prozesses noch der Optimierung bedürfen, konnte dTDP-D-Olivose erzeugt sowie NADPH als obligater Cofaktor für UrdR bestätigt werden (Prof. Dr. L. Elling, persönliche Mitteilung). Außerdem wurde gezeigt, daß UrdR leichte Flexibiliät hinsichtlich des dNDP-Zuckersubstrates aufweist, nachgewiesen durch die Reduktion von dTDP-4-Keto-6-Deoxy-D-Glucose zu D-Quinovose (siehe Abb. 37). Offenbar ist also die Hydroxylgruppe an C-2 irrelevant für die Substraterkennung.

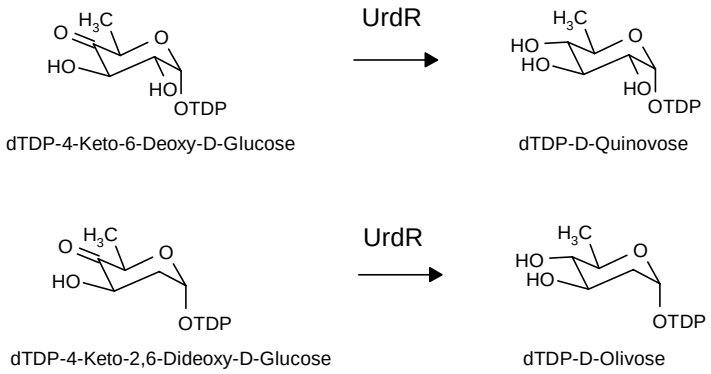


Abb. 37: *in vitro* beobachtete Ketoreduktionen mit UrdR. Lediglich die untere Reaktion von dNDP-4-Keto-2,6-Dideoxy-D-Glucose zu D-Olivose findet auch *in vivo* statt.

Das Enyzm UrdR und sein Produkt dTDP-D-Olivose ist also ein Beispiel für die prinzipielle Einsetzbarkeit von Enzymen aus der Antibiotika-Biosynthese als Werkzeuge zur Herstellung von Verbindungen, die auf traditionell chemisch-synthetischem Weg nicht darstellbar sind.

4.3.3 UrdGT1b

Ziel der Arbeiten zur Expression von UrdGT1b war die Etablierung eines Protokolls, um lösliches, aufgereinigtes Protein zu erhalten. Wirtsorganismen waren diverse *E.coli*-Stämme sowie *S.fradiae* XTC. Trotz vieler Variationen bei den Anzuchtbedingungen für *E.coli* blieb die Überexpression in *S.fradiae* XTC das klar überlegene System aufgrund folgender Vorteile:

- Menge und Löslichkeit des Proteins waren signifikant höher
- die Handhabung war einfacher, bedingt durch den Wegfall von OD-Messungen, Induktion etc.
- Die Prüfung auf Funktionalität des überexprimierten Proteins kann auf einfache Weise erfolgen
- Es existieren keine zusätzlichen artifiziellen Aminosäuren im Protein, ausgenommen die sechs Histidinreste.

Diesen Vorteilen steht entgegen, daß der Histidin-Tag des in *S.fradiae* erzeugten Proteins nicht durch eine Protease entfernt werden kann, während die in *E.coli* erzeugten Proteine dieses Vorteil bieten, wenngleich auch nach Abspaltung einige wenige AS des Fusionspartners verbleiben.
Längerfristig soll das Projekt zur Expression von UrdGT1b durch *in vitro*-Studien und Kristallisation zur Strukturaufklärung von UrdGT1b erweitert werden, insbesondere hinsichtlich der sterischen Erfordernisse des Substratspezifität vermittelnden Bereiches.

Die Kristallstruktur von GtfB, einer UDP-Glucosyltransferase der Chloroeremomycin-Biosynthese, ist publiziert (Mulichak *et al.*, 2001, siehe Abb. 18). GtfB ist, wie andere GTs auch, aus zwei Domänen aufgebaut. Die Autoren beschreiben einer flache, zum Spalt zwischen den beiden Domänen gewandte Tasche auf der

Oberfläche der N-terminalen Domäne als Bindestelle für das Zuckerakzeptorsubstrat. Im Zentrum dieser Tasche befinden sich zwei Leucin-Reste, umgeben von sechs Tyrosin- oder Phenylalanin-Resten, außerdem drei Alanin-Reste und ein Cystein. Außer Tyr110, (dies entspricht Tyr122 in GtfB) ist hingegen keiner dieser erwähnten Aminosäurereste in UrdGT1b/1c konserviert. Die erwähnten aromatischen Aminosäurereste in GtfB sind alle der Region von AS 122-190 zugehörig. Die entsprechende Region in UrdGT1b hingegen enthält hingegen, außer dem erwähnten Tyr110, nur einen weiteren Phenylalanin-Rest. Hingegen sind die AS, die während der vorliegenden Arbeit als determinierend für die Spezifität von UrdGT1b/UrdGT1c gefunden wurden, in der Arbeit zu GtfB im Hinblick auf Substraterkennung/ -spezifität nicht auffällig gewesen. Diese Aussage muß insofern betont werden, als bei GtfB (und anderen Untersuchungen zur Kristallstruktur von GTs) die Beobachtung des nucleotidgebundenen Zuckers nicht möglich war (Gastinel *et al.*, 1999, Ha *et al.*, 2000) oder nur mit dem Nucleotid und nicht dem Nucleotidzucker cokristallisiert wurde (Charnock und Davies, 1999), bzw. die Position des Zuckers durch rechnergestützte Analyse oder theoretischer Überlegungen später modelliert wurde (Vrielink *et al.*, 1994, Moréra *et al.*, 1999). Daher konnten hinsichtlich des Donorsubstrates nur Aussagen über das Nucleotid, nicht aber über seinen Zuckeranteil getroffen werden. In kinetischen Studien zu GtfB wurde Asp332 als wahrscheinliches Mitglied des katalytischen Zentrums identifiziert. Interessanterweise sind die benachbarten Aminosäurereste zwischen GtfB und UrdGT1b/1c stark konserviert: ^{327}Leu-Pro-Gln-Met-Ala-Asp-Gln^{333} in GtfB, ^{311}Leu-Pro-Gln-Leu-Ala-Asp-Gln^{317} in UrdGT1b. Abgeleitet von dieses Sequenzdaten kommt Asp316 in UrdGT1b als mögliche katalytische Base in Betracht.

GtfB weist sowohl am Ende des ersten β-Faltblattes der N-terminalen Domäne ein leicht abgewandeltes, am Ende des ersten β-Faltblattes der C-terminalen Domäne ein streng konserviertes Rossmann-Motiv auf: ^{7}TCGSRG^{12} bzw. ^{245}GFGSLG^{250}. Sequenzvergleiche zwischen GtfB und UrdGT1b/UrdGT1c zeigen, daß bei letzteren das aminoterminale Motiv gänzlich fehlt, das der C-terminalen Domäne ist rudimentär (^{223}TLGSRT^{228} in UrdGT1b, ^{223}TIGG-T^{227} in UrdGT1c), enthält aber die als kritisch erkannten Aminosäuren Ser-Arg bzw. Gly.

5. Kooperationen

Parallel zu den Experimenten dieser Promotionsarbeit wurden im Rahmen von zwei Kooperationen Projekte aus dem Bereich des Sekundärstoffwechsels von *Streptomyces*-Arten bearbeitet, die dem Thema dieser Disseration verwandt sind.

5.1 Klonierung und Expression des Oxygenase-Gens *jadF*

Jadomycin B ist ein mit D-Olivose glycosidiertes und durch ein Stickstoffatom im Grundgerüst modifiziertes Angucyclin aus *Streptomyces venezuelae* ISP5230 (Ayer *et al.*, 1991, siehe Abb. 38). Es wurde vorgeschlagen, daß Rabelomycin (Abb. 38) als Substrat für die Oxygenase JadF dient, welche dessen Ring B epoxidiert, durch Aktivität einer weiteren Oxygenase und nicht-enzymatischem Einbau von Isoleucin mit nachfolgenden Rearrangement des Polyketid-Grundgerüstes würde das Jadomycin-Aglycon entstehen (Yang *et al.*, 1996). Das Gen *jadF* lag in pJV60, einem 2.4 kb *Sac*I-Fragment des Jadomycin-Clusters, kloniert in pBSK-, vor (Yang *et al.*, 1996).

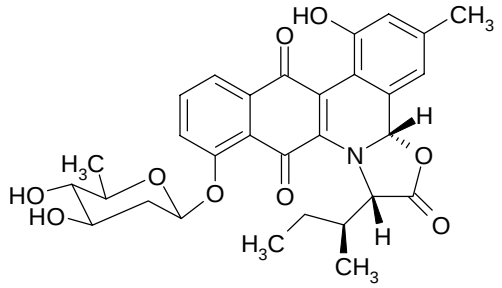
Durch Klonierung und Expression in *S.fradiae*-Stämmen sollte überprüft werden, ob JadF auch im Urdamycin-Produzenten aktiv sein kann, d.h. ein geeignetes Substrat findet. Überexpression von JadF in *E.coli* als $(His)_6$-Fusionsprotein und nachfolgende Aufreinigung ist die Grundlage für *in vitro*-Untersuchungen zur Substratspezifität und zur Verifikation des vorgeschlagenen Mechanismus.

Die Federführung des Projektes liegt bei Prof. Dr. Jürgen Rohr, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA und wird dort von Dipl.-Chem. Uwe Rix bearbeitet. Für die Kooperation wurden folgende Leistungen erbracht:

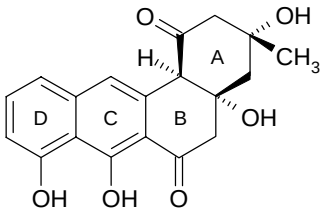
- Herstellung des Genexpressionskonstruktes pUWL201-jadF
- Expression in *S.fradiae* BF2-1, einer für die Oxygenase UrdM defizienten Stamm (Faust *et al.*, 2000)
- Erste Analyse der Naturstoffproduktion durch Naturstoffisolierung und DC-Untersuchung

Aktueller Stand des Projektes ist, daß in *S.fradiae* BF2-1 x pUWL-jadF neben Rabelomycin ein farbloses Urdamycin-ähnliches Polyketid produziert wird, die genauen strukturellen Details bedürfen noch der Aufklärung (J. Rohr, pers. Mitteilung).

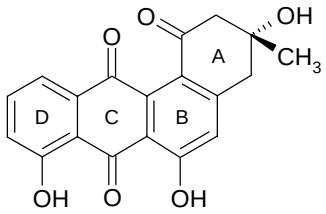
Nach Expression von *jadF* in *E.coli* und *in vitro* assays mit dem aufgereinigten Protein konnte die Bindung von Rabelomycin als wahrscheinlicher Inhibitor, nicht aber als Substrat von JadF festgestellt werden. Wirkliches Substrat ist vermutlich die Substanz UWM6 (U. Rix, pers. Mitteilung).



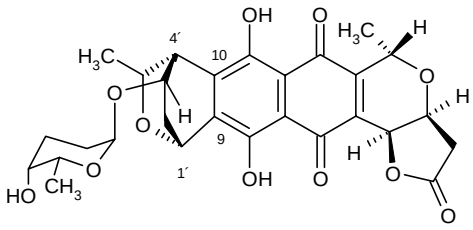
Jadomycin B



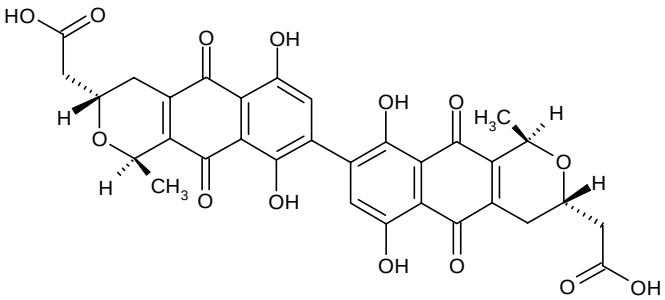
UWM 6



Rabelomycin



Granaticin B



Actinorhodin

Abb. 38: Molekülstruktur von Jadomycin B, UWM6 (Kulowski *et al.*, 1999), Rabelomycin, Granaticin B und Actinorhodin.

5.2 Glycosidierungsreaktionen bei Granaticin B und Actinorhodin

Granaticin B und Actinorhodin (siehe Abb. 38) sind zwei Vertreter der Klasse der Benzoisochromanchinon-Antibiotika. Das Grundgerüst beider Substanzen entstammt dem Polyketid-Stoffwechsel. Während Actinorhodin unglycosidiert ist, trägt Granaticin B ein Disaccharid D-Olivose-L-Rhodinose. Das Biosynthese-Gencluster des Granaticin B ist kloniert und sequenziert (Ichinose *et al.*, 1998), weist aber nur ein Gen für eine GT auf (*graorf14*). Es wäre denkbar – wenngleich äußerst ungewöhnlich – daß ein außerhalb des Genclusters liegendes GT-Gen für die zweite benötigte GT codiert. Auch ist nicht auszuschließen, daß GraOrf14 beide

Glycosidierungen durchführen kann, was wiederum eine ungewöhnlich niedrige Substratspezifität erforderte. Ferner ist denkbar, daß *graorf34*, ein Gen unbekannter Funktion, in den Glycosyltransfer involviert ist. Es wurde schon früh vorgeschlagen, daß der erste (und sehr ungewöhnliche) Glycosyltransfer von 4-Keto-2,6-Dideoxyglucose unter Ausbildung zweiter C-C-glycosidischer Bindungen (C-9 zu C-1´ und C-10 zu C-4´) ein nicht-enzymatischer Schritt ist (Snipes *et al.*, 1979), gefolgt von der enzymatischen Reduktion des Ketons an C-4´ zur D-Olivose. GraOrf14 dagegen wird als Enyzm zur Übertragung der L-Rhodinose unter Bildung einer α(1,3)-glycosidischen Bindung angesehen (Ichinose *et al.*, 1998). Der Beweis dieser Hypothese von kombiniertem enzymatischem und nicht-enzymatischem Glycosyltransfer innerhalb eines Sekundärmetaboliten wurde allerdings bislang nicht erbracht.

Durch synchrone Expression von *graorf16*, *graorf17*, *graorf26*, *graorf27*, d.h. der vier Biosynthesegene, die zur Herstellung von 4-Keto-2,6-Dideoxyglucose nötig sind, außerdem zusätzlich von *graorf14* und/oder *graorf34* soll untersucht werden, wann an das Benzoisochromanchinon-Grundgerüst D-Olivose angelagert wird. Es kann also unterschieden werden, ob die Expression der vier Gene für den Deoxyzucker alleine ausreicht (Verifikation der Hypothese), oder ob das GT-Gen *graorf14* notwendig ist (Falsifikation) oder ob *graorf34* einen Einfluß besitzt (Falsifikation). Aufgrund großer experimenteller Schwierigkeiten, den Granaticin-Produzenten *Streptomyces violaceoruber* Tü22 gentechnisch zu modifizieren, wurde eine Mutante (*actVB*$^-$) des Actinorhodin-Produzenten *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Rudd und Hopwood, 1979) als Wirt für die Genexpressionen gewählt. Weiterer Grund für die Wahl dieser Mutante war die Homologie von GraOrf34 zu ActVB, einer Flavin:NADH-Oxidoreduktase, die möglicherweise zur $FMNH_2$-Versorgung von Polyketid-modifizierenden Enzymen dient (Kendrew *et al.*, 1995). Vielleicht spielt daher GraOrf34 eine Rolle bei der Vorbereitung des Polyketids auf die nichtenzymatische Glycosidierung.

Die Federführung dieses Projektes liegt bei Prof. Dr. Koji Ichinose, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Für die Kooperation wurden folgende Leistungen erbracht:

- Amplifikation von *graorf16* (codiert für eine dTDP-1-Glucose-Synthase), *graorf17* (dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase), *graorf26* (Oxidoreduktase), *graorf27* (dTDP-4-Keto-6-Deoxyglucose-2,3-Dehydratase) per PCR. Template war das Cosmid pOJ446-22-24 (Ichinose *et al.*, 1998)
- Klonierung dieser Gene in pMun3 (Trefzer *et al.*, 2001), um eine kassettenartige Anordnung dieser vier Gene zu erzielen
- Klonierung dieser Gene in pUWL201 zur Expression der Kassette durch den *ermE*-Promotor
- Klonierung dieser Gene in pNEB193J (Yu *et al.*, 2001), um die Kassette mit dem *actI*-Promotor zu kombinieren
- Klonierung dieser Gene in pRM5 (McDaniel *et al.*, 1993) zur Expression der Kassette unter dem *actI*-Promotor in *Streptomyces coelicolor actVB*$^-$
- Amplifikation von *graorf14* (codiert für eine Glycosyltransferase), *graorf34* (unbekannte Genfunktion) per PCR
- Klonierung in pNEB193J zur Kombination der Kassette unter *actI*-Promotor mit *graorf14* und/oder *graorf34* unter dem *actIII*-Promotor
- Klonierung in pRM5 zur Expression dieser Gen-Kombinationen in *Streptomyces coelicolor actVB*$^-$

Ein erstes Pilotexperiment in Form der Expression von *graorf16*, *graorf17*, *graorf26* und *graorf 27* in *Streptomyces coelicolor* A3(2), also dem Wildtyp, zeigte eine Änderung sowohl im Wuchsverhalten und der Morphologie der Bakterienkolonien, als auch eine - wenngleich noch nicht im Detail verstandene - Änderung im Sekundärstoffspektrum (K.Ichinose, pers. Mitteilung).

6. Anhang

Nachstehend die Tabellen mit NMR-Daten der während dieser Arbeit aufgereinigten und vollständig strukturaufgeklärten Urdamycine. Für alle glycosidierten gilt, daß die NMR-Signale bezüglich der Zucker-Kohlenstoffatome C-2 und C-3 einerseits und C-4 und C-5 andererseits mit sehr großer Wahrscheinlichkeit, aber aufgrund der Komplexität nicht mit letzter Sicherheit zugeordnet werden konnten. s=Singulett, d=Dublett, t= Triplett, q= Quartett, br=verbreitert, Ha= axialer Wasserstoff, He= äquatorialer Wasserstoff.

6.1 NMR-Tabellen

	Urdamycin M	
Position	δ^{1}H (mult.; J (Hz))	δ^{13}C
1	-	202.6 s
2	3.00 (komplex, Ha) 2.61 (br d; 13, He)	54.8 t
3	-	76.2 s
4	2.33 (br d; 15, Ha) ca. 2.2 (m, He)	44.3 t
4a	-	82.7 s
5	6.95 (d; 10)	146.6 d
6	6.55 (d; 10)	117.4 d
6a	-	138.1 s
7	-	192.0 s
7a	-	114.9 s
8	-	158.0 s
9	-	140.1 s
10	8.06 (d; 8)	134.8 d
11	7.69 (d; 8)	120.1 d
11a	-	131.7 s
12	-	190.0 s
12a	-	141.1 s
12b	-	85.5 s
3-CH_3	1.22 (s)	30.6 q
1´	4.92 (br d; 11.0)	72.0 d
2´	1.1-1.8 (komplex, Ha) 1.1-1.8 (komplex, He)	24.0 t
3´	ca. 2.1 (komplex, Ha) ca. 2.1 (komplex, He)	26.9 t
4´	3.42 (br s)	67.3 d
5´	3.85 (br q; 6.5)	77.2 d
6´	1.33 (d; 6.5)	18.3 q
1C	5.36 (d; 2.0)	95.1 d
2C	1.2-2.0 (komplex, Ha) 1.2-2.0 (komplex, He)	24.6 t
3C	1.2-2.0 (komplex, Ha) 1.2-2.0 (komplex, He)	23.8 t
4C	3.65 (br s)	67.2 d
5C	3.79 (br q; 6.5)	67.8 d
6C	0.58 (d; 6.5)	16.9 q
OH-Signale	3.36, 3.62, 4.45, 5.32, 12.4	

	Urdamycin N	Urdamycin O	
Position			
	δ^1H	δ^1H	δ^{13}C
1	-	-	202.5 s
2	3.32 (1H,d, 17, Ha) 3.20 (dd, 17; 2, He)	2.85 (verd. durch Wasser, Ha) 2.52 (dd, 13; 2, He)	54.8 t
3	-	-	76.2 s
4	3.06 (d, 15, Ha) 2.87 (dd, 15; 2, He)	ca 2.00 (komplex, Ha) 2.30 (dd, 15; 1, He)	44.0 t
4a	-	-	81.8 s
5	7.58 (d, 8)	6.48 (d, 10)	146.1 d
6	7.95 (d, 8)	6.87 (d, 10)	117.2 d
6a	-	-	137.7 s
7	-	-	190.2 s
7a	-	-	115.0 s
8	-	-	157.8 s
9	-	-	138.8 s
10	8.28 (d, 8)	7.95 (d, 8)	134.1d
11	7.74 (d, 8)	7.61 (d, 8)	120.1 d
11a	-	-	132.0 s
12	-	-	183.8 s
12a	-	-	141.6 s
12b	-	-	82.9 s
3-CH_3	1.46 (s)	1.13 (s)	30.0 q
1′	4.92 (dd, 11; 1)	4.90 (dd, 11; 1)	72.0 d
2′	1.1-1.8 (komplex, Ha) 2.72 ddd (13; 5; 1, He)	ca. 1.3 (komplex, Ha) 2.70 ddd (13; 5; 1, He)	36.9 t
3′	4.00 (ddd, 12; 9; 4)	3.98 (ddd, 9; 9; 5)	68.0 d
4′	3.37 (dd, 9; 9)	3.36 (dd, 9; 9)	79.8 d
5′	3.58 (dq, 9; 6)	3.60 (dq, 9; 6)	77.0 d
6′	1.37 (d, 6)	1.39 (d, 6)	19.8 q
1A	5.02 (d, 2)	4.98 (d, 1)	92.2 d
2A	1.1-1.8 (komplex, Ha) 1.1-1.8 (komplex, He)	ca. 2.0 (komplex, Ha) ca. 1.3 (komplex, He)	23.5 t
3A	1.1-1.8 (komplex, Ha) 1.1-1.8 (komplex, He)	ca. 1.6 (komplex, Ha) ca. 2.0 (komplex, He)	26.3 t
4A	3.50 (s, br)	3.52 (s, br)	76.1 d
5A	4.23 (q, br, 6.5)	4.21 (q, br, 6.5)	74.2 d
6A	1.15 (d, 6.5)	1.15 (d, 6.5)	17.9 q
1B	5.17 (d, 2)	5.16 (d, 2)	98.1 d
2B	1.1-1.8 (komplex, Ha) 1.1-1.8 (komplex, He)	1.2-2.0 (komplex, Ha) 1.2-2.0 (komplex, He)	23.3 t
3B	1.1-1.8 (komplex, Ha) 1.1-1.8 (komplex, He)	1.2-2.0 (komplex, Ha) 1.2-2.0 (komplex, He)	26.6 t
4B	3.53 (s, br)	3.53 (s, br)	67.0 d
5B	4.34 (q, br, 6.5)	4.33 (q, br, 6.5)	68.1 d
6B	1.09 (d, 6.5)	1.08 (d, 6.5)	14.5 q
1C	-	5.30 d (2)	95.0 d
2C	-	1.2-2.0 (komplex, Ha) 1.2-2.0 (komplex, He)	23.4 t
3C	-	1.2-2.0 (komplex, Ha) 1.2-2.0 (komplex, He)	26.6 t
4C	-	3.32 (s , br)	68.3 d
5C	-	3.63 (q, br ; 6.5)	67.2 d
6C	-	0.49 (d ; 6.5)	17.0 q
OH-Signale	n.b.	3.33, 3.47, 3.55, 4.38, 5.32, 12.4	

NMR Daten für Urdamycine N und O in d_6-Aceton. ^{1}H-NMR-Signale: δ bezogen auf TMS (J in Hz). ^{13}C-NMR-Signale in d_6-Aceton.

	Urdamycin P	
Position		
	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$
1	-	n.b.
2	2.82 (d,13, Ha) 2.67 (dd, 2.5, 13, He)	52.9
3	-	77.4
4	2.04 (s)	44.5
5	6.40 (d, 9.5)	145.7
6	6.87 (d, 9.5)	117.8
7	-	n.b.
8	-	n.b.
9	-	n.b.
10	7.85 (d, 7.5)	133.9
11	7.58 (d, 7.5)	119.5
12	-	n.b.
3-CH_3	1.24 (s)	29.8
1´	4.86 (dd, 11; 1)	72.0
2´	1.29 (s, Ha) 2.59 (ddd, 2, 4.5, 12.5, He)	37.3
3´	3.91 (ddd, 4.5, 9, 11)	73.8
4´	3.37 (t, 7)	82.2
5´	3.53 (s)	77.2
6´	1.39 (d, 6)	18.7
1A	4.93 (br d, 3)	93.7
2A	2.00 (s, Ha) 1.35 (s, He)	24.5
3A	2.25 (komplex, Ha) 1.62 (komplex, He)	26.2
4A	3.52 (s)	68.1
5A	4.59 (dq, 1.5, 6.5)	66.8
6A	1.14 (d, 6.5)	17.2
1B	4.74 (dd, 2, 9.5)	100.9
2B	2.23 (s, Ha) 1.44 (dt 9.5, 12, He)	40.6
3B	3.51 (s)	71.8
4B	2.84 (t, 9)	78.3
5B	3.24 (dq, 9, 6)	73.1
6B	1.29 (d, 6)	18.3

NMR Daten für Urdamycin P in CD_3OD. ^{1}H-NMR-Signale: δ bezogen auf CHD_2OD bei 3.31 ppm. (J in Hz). ^{13}C-NMR-Signale sind aus einem 2D ^{1}H-^{13}C-Korrelationsspektrum (HMQC) abgeleitet und bezogen auf CHD_2OD bei 48.9 ppm. (n.b.= Signal nicht beobachtet).

	Urdamycin R		
Position	δ^{1}H (int.; mult.; J (Hz))	HMBC Korr.	δ^{13}C
1	-	-	202.5 s
2	2.82 (1H; d; 13, Ha) 2.53 (1H; dd; 13, 4, He)	1,3,4, 12b	54.7 t
3	-	-	76.1 s
4	2.27 (1H; br d; 14, Ha) ca. 2.2 (1H; m, He)	4a	44.1 t
4a	-		82.5 s
5	6.46 (1H; d; 10)	6a	146.4 d
6	6.86 (1H; d; 10)	4a, 12a	117.3 d
6a	-	-	138.0 s
7	-	-	189.8 s
7a	-	-	115.0 s
8	-	-	158.4 s
9	-	-	140.2 s
10	7.92 (1H; d; 7.7)	8,11a, 1´	134.4 d
11	7.62 (1H; d; 7.7)	7a, 9, 12	120.0 d
11a	-	-	131.7 s
12	-	-	183.5 s
12a	-	-	141.2 s
12b	-	-	81.7 s
3-CH_3	1.14 (3H; s)	2,4	30.2 q
1´	4.83 (1H; d; 11.0)	9	74.3 d
2´	ca. 1.9 (komplex, Ha) ca. 1.9 (komplex, He)	-	27.9 t
3´	ca. 2.0 (komplex, Ha) ca. 2.0 (komplex, He)	-	26.2 t
4´	3.34 (1H; br s)	-	67.1 d
5´	n.z.	-	76.7 d
6´	1.23 (1H; d; 6.0)	-	18.2 q
1A	4.82 (1H; br s)	-	100.5 d
2A	ca. 2.0 (komplex, Ha) ca. 2.0 (komplex, He)	-	25.6 t
3A	ca. 1.7 (komplex, Ha) ca. 1.7 (komplex, He)	-	26.9 t
4A	3.54 (1H; br s)	-	75.1 d
5A	3.96 (1H; br q; 7.0)	-	67.8 d
6A	1.06 (1H; d; 6.5)	-	17.6 q
1C	5.36 (1H; d; 3.2)	-	95.1 d
2C	ca. 1.5 (m, Ha) ca. 2.0 (m, He)	3C	24.6 t
3C	ca. 1.7 (komplex, Ha) ca. 1.7 (komplex, He)	-	23.8 t
4C	3.50 (1H; br s)	-	67.2 d
5C	3.66 (1H; br q; 6.5)	-	67.8 d
6C	0.50 (3H; d; 6.5)	5C	16.9 q

	Urdamycin S		
Position	δ^1H (int.; mult.; J (Hz))	HMBC Korr.	δ^{13}C
1	-	-	202.5 s
2	2.85 (1H; d; 12.6, Ha) 2.65 (1H; dd;12.6, 2.8He)	1,3,4	54.7 t
3	-	-	76.2 s
4	2.31 (1H; d; 14.8, Ha) 1,96 (1H; dd; 14.8, 2.8, He)	4a	44.1 t
4a	-		82.5 s
5	6.46 (1H; d; 9.7)	6a	146.4 d
6	6.86 (1H; d; 9.7)	4a, 12a	117.2 d
6a	-	-	137.9 s
7	-	-	191.9 s
7a	-	-	114.9 s
8	-	-	158.6 s
9	-	-	139.9 s
10	7.91 (1H; d; 7.8)	8,11, 1´	134.2 d
11	7.60 (1H; d; 7.8)	7a, 9	120.0 d
11a	-	-	131.8 s
12	-	-	183.4 s
12a	-	-	141.3 s
12b	-	-	81.6 s
3-CH_3	1.14 (3H; s)	2,3,4	30.2 q
1´	5.06 (1H; br dd; 11.0, 1.6)	9	64.5 t
2´	1.32-1.42 (4H; m, Ha) 2.17 (1H; dddd; 13.2, 4.0, 3.6, 1.6, He)	-	31.9 s
3´	1.32–1.42 (4H; m, Ha) 1.90 – 1.95 (1H; m, He)	-	27.2 s
4´	3.95 (1H; ddd; 10.4, 5.8, 5.2)	-	67.9 t
5´	4.41 (1H; dq; 5.8 (d), 6.7 (q))	-	73.7 t
6´	1.31 (3H; d; 6.7)	-	10.6 q
1A	4.92 (1H; br s)	-	96.7 d
2A	ca. 1.4 (m, Ha) ca. 2.0 (m, He)	-	24.6 t
3A	ca. 1.7 (komplex, Ha) ca. 1.7 (komplex, He)	-	26.2 t
4A	3.50 (1H; br s)	-	67.2 d
5A	3.96 (1H; q; 6.0)	-	75.1 d
6A	1.12 (1H; d; 6.5)	-	17.6 q
1C	5.29 (1H; d; 3.0)	5C	95.0 d
2C	ca. 1.7 (komplex, Ha) ca. 1.7 (komplex, He)	-	23.8 t
3C	ca. 1.9 (komplex, Ha) ca. 1.9 (komplex, He)	-	26.6 t
4C	3.34 (1H; br s)	-	67.1 d
5C	3.64 (1H; br q; 6.0)	-	67.8 d
6C	0.50 (3H; d; 6.5)	5C	16.9 q

	Urdamycin T		
Position	δ^1H (int.; mult.; J (Hz))	HMBC Korr.	δ^{13}C
1	-	-	196.8
2	3.05 (1H; d; 15, Ha) 2.86 (1H; dd; 15, 1, He)	1,3,4,12b	54.1
3	-	-	72.6
4	3.28 (1H; d; 12, Ha) 3.19 (1H; br d; 12, He)	2,3,4a,3-CH_3, 12b	44.7
4a	-	-	150.0
5	7.70 (1H; br d; 8)	4,6a	134.8
6	8.26 (1H; d; 8)	4a,6a, 7	129.4
6a	-	-	137.0
7	-	-	189.1
7a	-	-	115.7
8	-	-	159.3
9	-	-	139.1
10	7.90 (1H; dd; 8, 1)	11a, 8, 1´	134.5
11	7.56 (1H; d; 8)	7a, 9, 12	119.4
11a	-	-	136.6
12	-	-	183.4
12a	-	-	134.1
12b	-	-	137.0
3-CH_3	1.47 (3H; s)	1,2,3,4	30.0
1´	5.28 (1H; dd, 11; 2)	9,10,3´	64.9
2´	1.4 (1H; m; Ha) 2.2 (1H; m; He)	-	32.3
3´	1.8 (2H; m)	-	27.7
4´	3.95 (1H; ddd; 10, 5.2, 5.6)	-	74.1
5´	4.27 (1H; dq, 5.2, 7.0)	-	67.8
6´	1.32 (3H; d, 7)	4´, 5´	11.1
OH-Signale	4.15 (br), 12.2 (br), 12.7 (br)	-	-

	Urdamycin K		
Position	δ^1H (int.; mult.; J (Hz))	HMBC Korr.	δ^{13}C
1	-	-	202.5
2	2.85 (1H; d; 13, Ha) 2.52 (1H; dd; 13, 1, He)	1,3,4, 12b	54.7
3	-	-	76.2
4	2.29 (1H; d; 15, Ha) ca. 2.2 (1H; m, He)	4a	44.1
4a	-		82.6
5	6.48 (1H; br d; 9.8)	6a	146.5
6	6.86 (1H; d; 9.8)	4a, 7, 12a	117.3
6a	-	-	137.9
7	-	-	189.5
7a	-	-	115.6
8	-	-	162.2
9	7.33 (1H; d; 8.3)	-	124.7
10	7.79 (1H; dd; 7.6, 8.3)	8,11a	138.0
11	7.59 (1H; d; 7.6)	7a, 9, 12	120.0
11a	-	-	133.4
12	-	-	183.6
12a	-	-	141.2
12b	-	-	81.7
3-CH_3	1.14 (3H; s)	2,3,4	30.0
1C	5.28 (1H; d; 3.2)	2C, 5C	95.0
2C	ca. 1.5 (m, Ha) ca. 2.0 (m, He)	3C	26.2
3C	ca. 1.7 (komplex, Ha) ca. 1.7 (komplex, He)	2C, 4C	23.8
4C	3.65 (1H; br s)	-	67.1
5C	3.64 (1H; br q; 6.5)	3C	67.8
6C	0.49 (3H; d; 6.5)	4C, 5C	16.8
OH-Signale	3.35 (br), 4.37 (br), 5.23 (br),11.8 (br)	-	-

	Tetrangomycin		
Position	δ^1H (int.; mult.; J (Hz))	HMBC Korr.	δ^{13}C
1	-	-	196.8
2	3.06 (1H; d; 15, Ha) 2.86 (1H; dd; 14, 2, He)	1,3,4,12b	54.1
3	-	-	72.5
4	3.29 (1H; d; 17, Ha) 3.20 (1H; dd; 17, He)	2,3,4a,3-CH_3, 12b	44.8
4a	-	-	150.0
5	7.72 (1H; dd; 8, 1)	4,6, a	134.9
6	8.27 (1H; d; 8)	4a,6a, 7	129.4
6a	-	-	137.0
7	-	-	188.7
7a	-	-	116.4
8	-	-	162.4
9	7.29 (1H; dd; 8.5,1)	7a, 11	123.9
10	7.78 (1H; dd; 7.5, 8.5)	11a, 8	138.1
11	7.59 (1H; dd; 7.5,1)	7a, 9, 12	119.5
11a	-	-	136.6
12	-	-	183.6
12a	-	-	134.1
12b	-	-	137.0
3-CH_3	1.47 (3H; s)	2,3,4	30.2
OH-Signal	12.3 (br)	-	-

6.2 Plasmidkarten

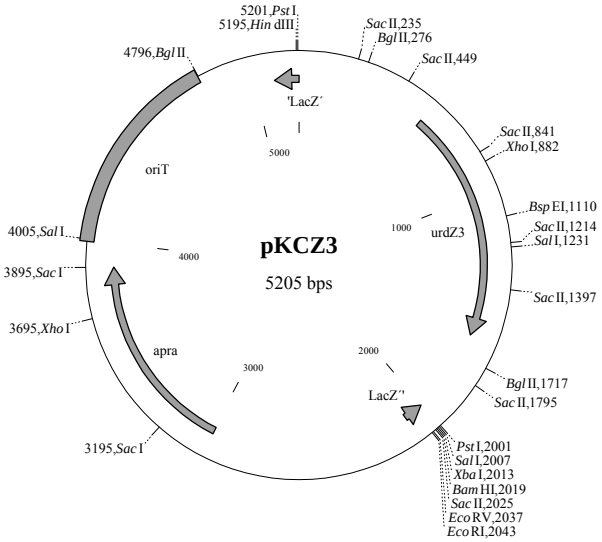


Abb. 39: Das Plasmid pKCZ3.

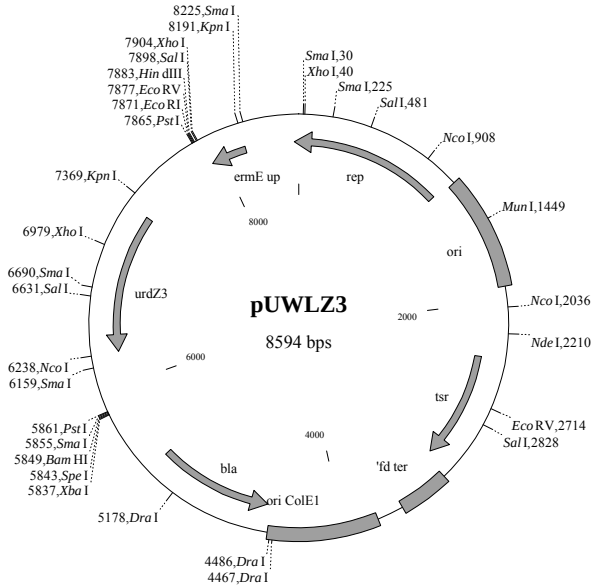


Abb. 40: Das Plasmid pUWLZ3.

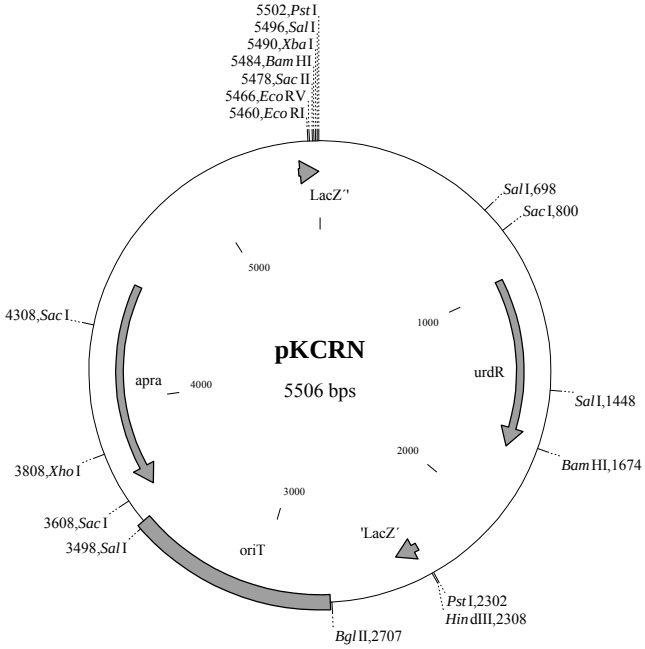


Abb. 41: Das Plasmid pKCRN.

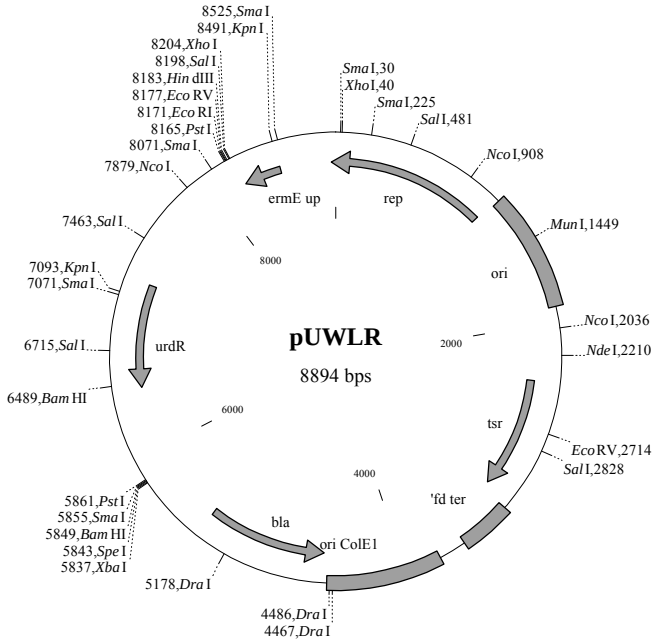


Abb. 42: Das Plasmid pUWLR.

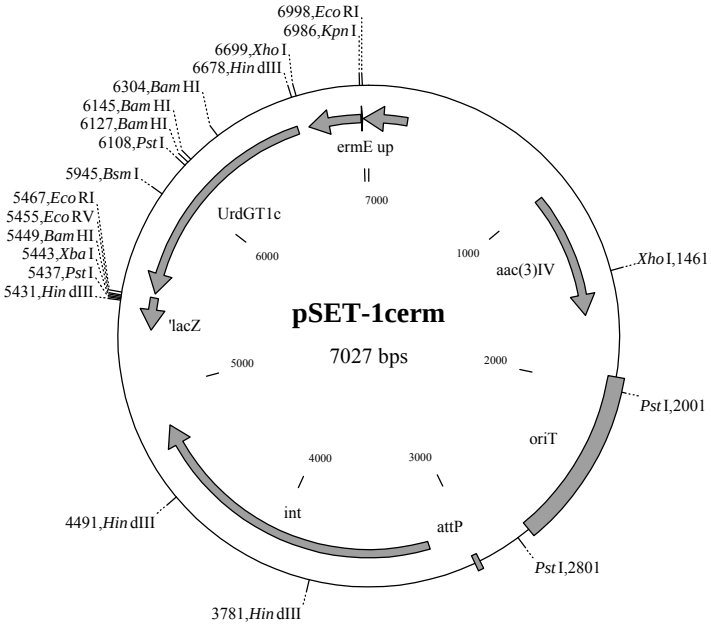


Abb. 43: Das Plasmid pSET-1cerm.

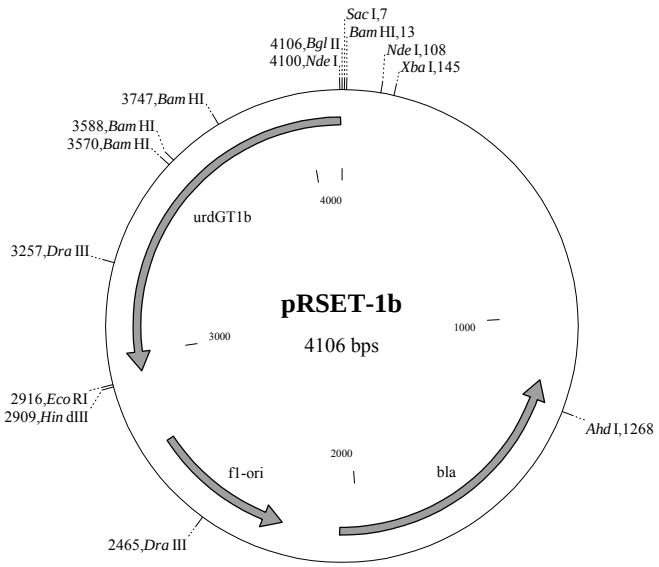


Abb. 44: Das Plasmid pRSET-1b.

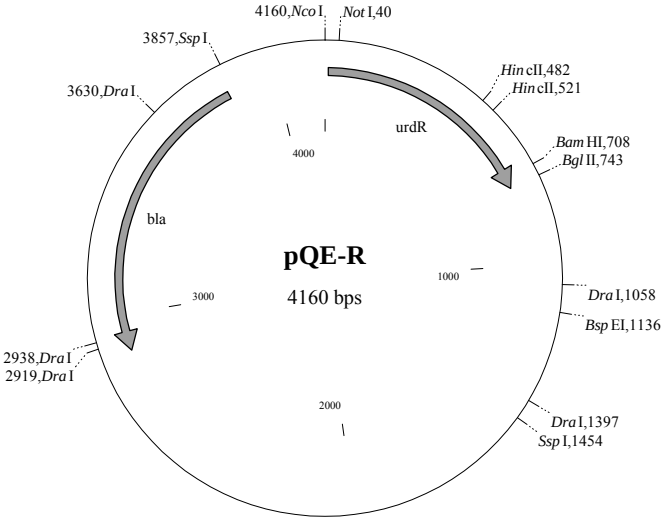


Abb. 45: Das Plasmid pQE-R.

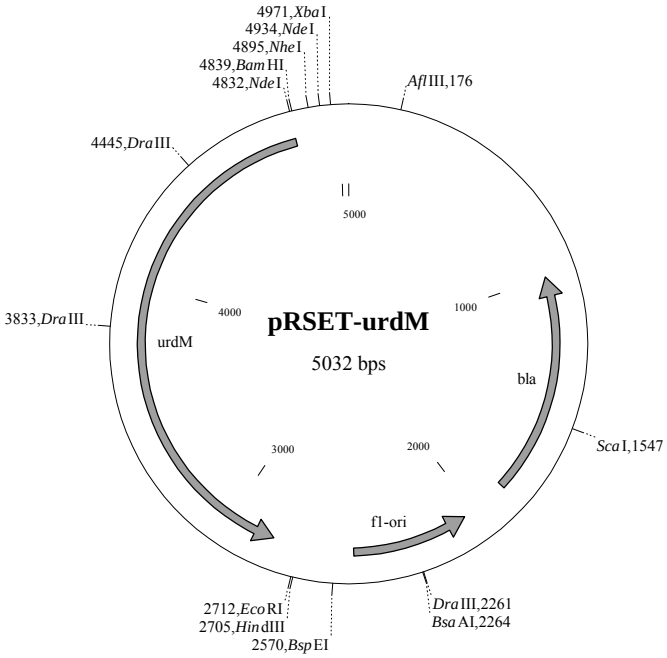


Abb. 46. Das Plasmid pRSET-urdM.

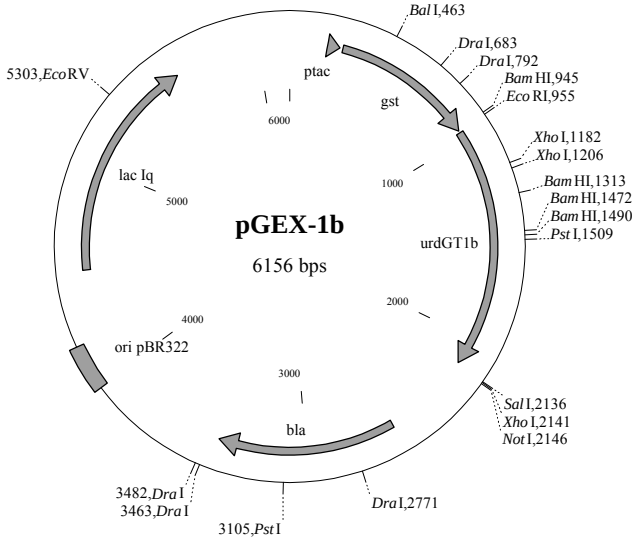


Abb. 47: Das Plasmid pGEX-1b.

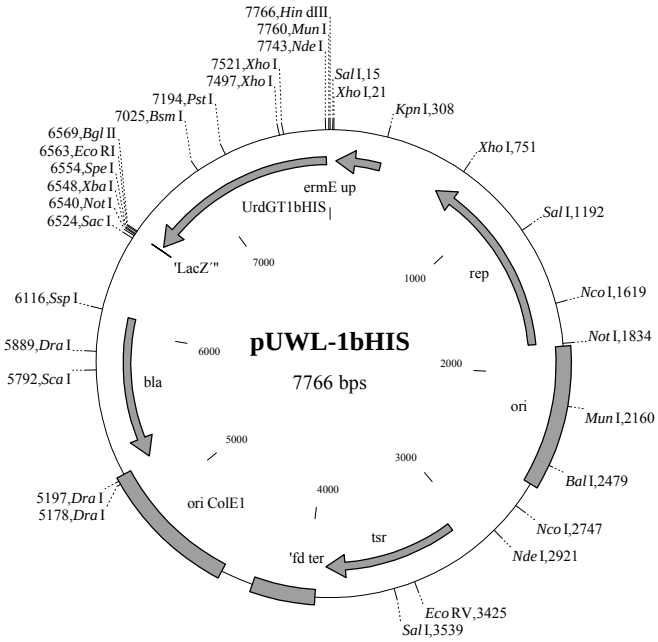


Abb. 48: Das Plasmid pUWL-1bHIS.

6.3. HPLC-Daten zu *S.fradiae*-Mutanten, hybriden GTs und zur GT-Bibliothek

Kontrollen	**Retentionszeit (min)**	**UV-VIS-Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
S.fradiae AX untransformiert	5.45 9.11	A-Typ B-Typ	486,1 (-) 452,2 (-)	Aquayamycin Urdamycinon B	22.74 11.50
Urdamycin A authent. Reinsubstanz	14.56	A-Typ	844.2 (-)	Urdamycin A	100
Exprimiertes Gen	**Retentionszeit (min)**	**UV-VIS-Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
urdGT1c	12.02 18.08	A-Typ B-Typ	600.2 (-) 566.6 (-)	12b-DUG 100-1	33.55 16.22
H1	12.07 18.48	A-Typ B-Typ	600.2 (-) 566.6 (-)	12b-DUG 100-1	22.56 13.90
H2	5.54 9.38	A-Typ B-Typ	486.1 (-) 452.2 (-)	Aquayamycin Urdamycinon B	25.67 11.87
H4	12.02 18.22	A-Typ B-Typ	600.2 (-) 566.6 (-)	12b-DUG 100-1	29.16 9.33
H3	5.42 9.23	A-Typ B-Typ	486.1 (-) 452.2 (-)	Aquayamycin Urdamycinon B	20.46 8.99
H5	11.59 17.17	A-Typ B-Typ	600.2 (-) 566.5 (-)	12b-DUG 100-1	18.94 40.19
H7	11.62 17.59	A-Typ B-Typ	600.2 (-) 566.2 (-)	12b-DUG 100-1	21.67 37.09
H6	5.44 9.25	A-Typ B-Typ	486.1 (-) 452.2 (-)	Aquayamycin Urdamycinon B	25.46 8.21
H8	5.46 9.30	A-Typ B-Typ	486.1 (-) 452.2 (-)	Aquayamycin Urdamycinon B	31.26 11.69

Details der HPLC- und LC-MS Analyse (siehe 2.12.4 und 2.12.6) von Rohextrakt, gewonnen aus *S.fradiae* AX untransformiert bzw. nach Expression des jeweiligen hybriden GT-Gens. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten. Die UV-VIS-Spektren von A- und B-Typ sind in Abb. 12, Chromatogramme in Abb. 20 dargestellt.

Mutante/ exprimiertes Gen	**Retentionszeit (min)**	**UV-VIS-Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
AX	5.45 9.11	A-Typ B-Typ	486,1 (-) 452,2 (-)	Aquayamycin Urdamycinon B	22.74 11.50
AX+*urdGT1c*	12.02 18.48	A-Typ B-Typ	600,2 (-) 566,6 (-)	12b-DUG 100-1	33.55 16.22
XTC	12.14 18.20	A-Typ B-Typ	600,2 (-) 566,6 (-)	12b-DUG 100-1	35.27 9.46
XTC + *urdGT1b*	13.60 18.91	A-Typ B-Typ	730,3 (-) 696.3 (-)	12b-DUA Urdamycin B	38.96 31.27

Details der HPLC- und LC-MS Analyse von Rohextrakt, gewonnen aus *S.fradiae* AX und XTC. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten. Zu UV-VIS-Spektren siehe Abb.12.

Kontrollen	**Retentionszeit (min)**	**Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
S.fradiae XTC untransformiert	12.14 18.20	A-Typ B-Typ	600.2 (-) 566.6 (-)	12b-DUG 100-1	35.27 9.46
Exprimiertes Gen	**Retentionszeit (min)**	**Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
urdGT1b	13.60 18.91	A-Typ B-Typ	730.3 (-) 696.3 (-)	12b-DUA Urdamycin B	38.96 31.27
H2	13.22 18.93	A-Typ B-Typ	730.3 (-) 696.3 (-)	12b-DUA Urdamycin B	26.82 23.77
H3	12.00 18.40	A-Typ B-Typ	600.2 (-) 566.6 (-)	12b-DUG 100-1	37.45 18.95
H6*	12.60 17.61	A-Typ B-Typ	730.2 (-) 696.2 (-)	12b-DUA Urdamycin B	29.01 8.14
H8*	12.42 17.47	A-Typ B-Typ	730.2 (-) 696.2 (-)	12b-DUA Urdamycin B	39.46 17.60

Details der HPLC- und LC-MS Analyse (siehe 2.12.4 und 2.12.6) von Rohextrakt, gewonnen aus *S.fradiae* XTC untransformiert bzw. nach Expression des jeweiligen hybriden GT-Gens. Aufgeführt sind die von Prof. Dr. K. Ichinose mit einer Tosoh-SC 8020 HPLC bzw. einem Thermoquest LCQ Massenspektroskop erzielten Daten. Die UV-VIS-Spektren von A- und B-Typ sind in Abb. 12 dargestellt. Die mit (*) markierten wurden mit einer HP 1000 HPLC erzielt, daher leichte Differenz in Retentionszeit (siehe auch Abb. 20 für ausgewählte Chromatogramme).

Kontrolle	**Retentionszeit (min)**	**Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
urdGT1b	12.60	A-Typ	730.3 (-)	12b-DUA	44.16
Exprimiertes Gen	**Retentionszeit (min)**	**Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
H9	12.64	A-Typ	730.2 (-)	12b-DUA	50.37
	17.60	B-Typ	696.3 (-)	Urdamycin B	20.22
H10	12.39	A-Typ	730.3 (-)	12b-DUA	39.65
	17.39	B-Typ	696.3 (-)	Urdamycin B	30.88
H11	12.45	A-Typ	730.3 (-)	12b-DUA	38.58
	17.38	B-Typ	696.3 (-)	Urdamycin B	26.37

Details der HPLC- und LC-MS Analyse (siehe 2.12.4 und 2.12.6) von Rohextrakt, gewonnen aus *S.fradiae* XTC nach Expression der ortsspezifisch mutagenisierten GT-Gene H9-H11. Die UV-VIS-Spektren von A- und B-Typ sind in Abb. 12 dargestellt. Die Chromatographie wurde mit einer HP 1000 HPLC durchgeführt (Prof. Dr. K. Ichinose).

Exprimiertes Gen	**Retentionszeit (min)**	**Spektrum**	**Masse (amu)/ Ionisation**	**Substanz**	**Peakfläche (%)**
H12	12.11	A-Typ	600.2 (-)	12b-DUG	8.94
	13.59	A-Typ	730.2 (-)	12b-DUA	58.93
	17.60	B-Typ	696.3 (-)	Urdamycin B	16.98
H13	5.65	A-Typ	486.3 (-)	Aquayamycin	3.48
	9.21	C-Typ	618.2 (-)	Urdamycinon C	21.56
	12.61	A-Typ	600.2 (-)	12b-DUG	5.33
	16.25	C-Typ	732.5 (-)	12b-DUC	11.53

Details der HPLC- und LC-MS Analyse (siehe 2.12.4 und 2.12.6) von Rohextrakt, gewonnen aus *S.fradiae* XTC nach Expression der ortsspezifisch mutagenisierten GT-Gene H12 und H13. Die UV-VIS-Spektren von A- und B-Typ sind in Abb. 12 dargestellt.

Übersicht über das Verhältnis Edukt zu Produkt der aus der Bibliothek stammenden aktiven GTs und deren Aminosäuresequenz im relevanten Bereich:

Spezifität	***S.fradiae* Wirtsstamm**	**Verhältnis Edukt:Produkt**	**Relevante AS**
UrdGT1b	XTC	12b-DUG: 12b-DUA	
2-1		10:1	NV-DP-HVDDM-V
3-24		1,45:1	NI-DR-HVDDM-V
1734		1,25:1	NI-DP-HVDDM-L
UrdGT1c	AX	Aquayamycin: 12b-DUG	
6-13		0,68:1	NI-DS-NGEDK-L
1106		1,53:1	NI-AP-HGEDK-L
1423		1,75:1	NI-AR-HVDDK-L
1446		7,2:1	NV-DR-HVDDK-L
1701		3:1	NV-DS-NGDAK-L

H13		0,63:1	SI-AP-NGEAK-L
neu	XTC	12b-DUG: Urdamycin P	
1707		7:1	NV-DS-HVDAM-L
1717		20:1	NV-DS-HVDDK-L
UrdGT1b+ UrdGT1c	AX: Aquayamycin: 12b-DUG	XTC: 12b-DUG: 12b-DUA	
3-11	9,8:1	6,6:1	NI-DW-HVDAK-L
1210	1,7:1	n.d.	SV-DS-NVDDM-V
1548	4,56:1	5,6:1	NV-DR-NGDAM-L
Neu+ UrdGT1b	XTC	12b-DUG: (12b-DUA+ Urdamycin P)	
0204		15,7: (1,0+20,4)	NI-DS-HVDDM-L
Neu+ UrdGT1c (I)	AX: Aquayamycin: 12b-DUG	X:12b-DUG: Urdamycin P*	
0207	n.d	3,19:1	SI-AS-HGDDM-L
1304	n.d	3,4:1	NI-DW-HGDAM-L
1322	0,83:1	0,84:1	NV-DS-HGEDM-L
1565	0,67:1	1,46:1	SI-AW-NGDDK-L
1814	1.46:1	1,54:1	SI-DW-HGDAM-L
Neu+ UrdGT1c (II)	AX: Aquayamycin: 12b-DUG	XTC:12b-DUG:Urdamycin P	
3-17	5,67:1	n.d.	NV-AS-NVEAM-V
3-19	6,3:1	n.d.	NV-DS-NVEAM-L
6-19	0,43:1	19,6:1	SV-AS-HGDDK-L
9-1	0,78:1	n.d.	NI-AS-HGDDM-L
0820	n.d.	1,2:1	IV-AP-NGDAM-L
1111	5,8:1	n.d.	NV-DW-HGEDK-L
1128	3,53:1	n.d.	SI-AS-NVDAM-L
1141	1,52:1	n.d.	NV-DW-NGDAM-V
1413	1,93:1	n.d.	SV-DP-HGDAK-L
1416	1,93:1	n.d.	SV-AS-HGDAM-L
1574	1,49:1	n.d.	SV-DP-HGDAM-L
1703	2,63:1	n.d.	SI-AS-HGDAM-L
1709	7,29:1	n.d.	NV-DS-HGDAM-L
1720	2,36:1	n.d.	NV-DP-HGDAM-L
1806	n.d.	4,5:1	SF-DP-NGEAM-L
1812	n.d.	6,98:1	SV-DP-NGDDM-L
Neu +UrdGT1b +UrdGT1c	AX: Aquayamycin: 12b-DUG	XTC: 12b-DUG: (12b-DUA+ Urdamycin P)	
1-1	n.d.	2,85: (0,4+1)	NI-DS-HGDDM-L
1438	0,45:1	n.d	SI-DS-NVDDM-L
1511	2,58 :1	5,2 : (0,29+1)	NV-DP-NGDDM-L
1577	1,63:1	n.d.	NI-DR-HGDAM-L
1815	3,9:1	3: (0,59+1)	NI-AW-HGDDM-V

* In *S.fradiae* XTC erscheinen diese GTs als solche der Kategorie „nur neue Aktivität“, da dieser Wirt das Zwischenprodukt dieser GTs, 12b-DUG, bereits selbst herstellt.

6.4 Abkürzungen

	Chemische Verbindungen
12b-DUA	12b-Derhodinosyl-Urdamycin A
12b-DUC	12b-Derhodinosyl-Urdamycin C
12b-DUG	12b-Derhodinosyl-Urdamycin G
12b-DUO	12b-Derhodinosyl-Urdamycin O
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
K	Guanin oder Thymin
M	Adenin oder Cytosin
N	jede Base
R	Adenin oder Guanin
S	Cytosin oder Guanin
T	Thymin
W	Adenin oder Thymin
Y	Cytosin oder Thymin
dGTP	Deoxyguanosin-5´-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNDP	Deoxynucleosid-5´-diphosphat
dNTP	Deoxynucleosid-5´-triphosphat
dTDP	Deoxythymidin-5´-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
$FMNH_2$	Flavin-Mononucleotid-Phosphat (reduziert)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (red.)
NDP	Nucleosid-5´-diphosphat
NTA	Nitriltriessigsäure
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TDP	Thymidin-5´-diphosphat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TES	N-Tris[hydroxymethyl]-2-aminoethansulfonsäure
TMS	Tetramethylsilan
TRIS	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
UDP	Uridin-5´-diphosphat
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-galactopyranosid
	Gene/Proteine
aac(3)IV	Aminoglycosid-acetyltransferase-Gen
actI	Bereich des Actinorhodin-Genclusters
actIII	Bereich des Actinorhodin-Genclusters
attP	Phagen-Anheftungsstelle
bla	β-Lactamase-Gen
*erm*E	N-6-Aminoadenin-N-Methyltransferase-Gen
gst	Glutathion-S-Transferase-Gen
GST	Glutathion-S-Transferase
lacI^q	Gen des Lactose-Operon-Repressors
lacZ	β-Galactosidase-Gen

	Sonstige Abkürzungen
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
amu	Atommassen-Einheiten
APCI	Atmosphärendruck/Chemische Ionisation
AS	Aminosäure(n)
bar	Einheit des Druckes
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
CCD	Charged Coupled Display
d	Tag(e)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
E.C.	Enzyme Commission
E.coli	*Escherichia coli*
et al.	und andere
g	Erdbeschleunigung
GT	Glycosyltransferase
h	Stunde(n)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IC_{50}	Inhibitorische Konzentration (Inhibition auf 50% der Ausgangsaktivität)
IMAC	Metall-Affinitäts-Chromatographie
kb	Kilobasen
λ	Wellenlänge
l	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie
mAU	milli-Absorptionseinheiten
min	Minute(n)
MS	Massenspektroskopie
MW	Molekulargewicht
NMR	Kern-Magnetresonanz-Spektroskopie
nt	Nucleotid(e)
OD	Optische Dichte
orf	offener Leserahmen (Nucleotidsequenz)
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKS	Polyketidsynthase
ppm	Parts per Million
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
Tab.	Tabelle
T_m	Schmelzpunkt
U	Units (Einheiten der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen
VIS	Sichtbares Licht
VT	Volumenteile
w/v	Verhältnis Gewicht zu Volumen
WT	Wildtyp

ori	Replikationsursprung
oriT	Ursprung des Transfers
tsr	Thiostrepton-Resistenz-Gen

Nicht angegeben sind die Abkürzungen der Aminosäuren, Restriktionsenzyme, sowie die Abkürzungen der Einheiten des Système Internationale.

7. Literatur

ALARCON, B., Lacal., J.C., Fernandez-Souza, J.M. Carrasco, L. (1984). Screening for new compounds with antiherpes activity. Antiviral. Res. 4, 231-243

ALTING-MEES, M.A., Short, J.M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. Nuc. Acids Res. 17, 9494

ALTSCHUL, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410

ALTSCHUL, S.F., Madden T.L., Schaffer, A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller, W., Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database programs. Nuc. Acids Res. 23, 3389-3402

AMANN, S., Dräger, G., Rupprath, C., Kirschning, A., Elling, L. (2001). (Chemo)enzymatic synthesis of TDP-activated 2,6-dideoxysugars as building blocks of polyketide antibiotics. Carbohydr. Res. 335, 23-32

ANDERSON, A. S., Wellington, E.M.H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 797-814

ARCAMONE, F.M. (1998). From the pigments of the actinomycetes to third generation antitumor anthracyclines. Biochimie 80, 201-206

AYER, S.W., McInnes, A.G., Thibault, P., Walter, J.A., Doull, J.L., Parnell, T., Vining, L.C. (1991). Jadomycin, a novel 8H-benz[b]oxazolo[3,2f]phenanthridine antibiotic from *Streptomyces venezuelae* ISP5230. Tetrahedron Lett. 32, 6301-6304

AYUKAWA, S., Takeuchi, T., Sezaki, M., Hara, T., Umezawa, H., Nagatsu, T. (1968). Inhibition of Tyrosine Hydroxylase by Aquayamycin. J. Antibiot. 21, 324-327

BARTON, W.A., Lesniak, J., Biggins, J.B., Jeffrey, P.D., Jiang, J., Rajashankar, K.R., Thorson, J.S., Nikolov, D.B. (2001). Structure, mechanism and engineering of a nucleotidylytransferase as a first step toward glycorandomization. Nat. Struc. Biol. 8, 545-551

BAUER, A.J., Rayment, I., Frey., P.A., Holden, H.M. (1992). The Molecular Structure of UDP-Galactose 4-Epimerase From *Escherichia coli* Determined at 2.5 A Resolution. Proteins 12, 372-381

BEIL, S., Mason, J.R., Timmis, K.N., Pieper, D.H. (1998). Identification of chlorobenzene dioxygenase sequence elements involved in dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene. J. Bacteriol. 180, 5520-5528

BIBB, M.J., Ward J.M., Hopwood, D.A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. Nature 274 (5669), 398-400

BIBB, M.J., Findlay, P.R., Johnson M.W. (1984). The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use in the simple and reliable identification of protein coding sequences. Gene 30, 157-166

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

BIRNBOIM, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Acids Res. 7, 1513-1523

BLANCO, G., Patallo, E.P., Brana, A.F., Trefzer, A., Bechthold, A., Rohr, J., Mendez, C., Salas, J.A. (2001). Identification of a sugar flexible glycosyltransferase from *Streptomyces olivaceus*, the producer of the antitumor polyketide elloramycin. Chem. Biol. 8, 253-263

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

BUSCH, C., Hofmann, F., Selzer, J., Munro, S., Jeckel, D., Aktories, K. (1998). A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. J. Biol. Chem. 273, 19566-19572

BUTLER, T., Elling, L. (1999). Enzymatic synthesis of nucleotide sugars. Glycoconj. J. 16, 147-159

CHARNOCK, S.J., Davies, G.J. (1999). Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. Biochemistry 38, 6380-6385

CONRAD, B., Hoang, V., Polley, A., Hofemeister, J. (1995). Hybrid *Bacillus amyloliquefaciens* x *Bacillus licheniformis* α-amylases. Construction properties and sequence determinants. Eur. J. Biochem. 230, 481-490

COUTINHO, P.M.., Henrissat, B. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", Gilbert, H.J., Davies, G., Henrissat, B., Svensson, B., eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge

DARNELL, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990). Molecular Cell Biology, 2nd ed. Scientific American Books, New York

DECKER, H., Motamedi, H., Hutchinson, C.R. (1992) Nucleotide sequences and heterologous expression of *tcmG* and *tcmP*, biosynthetic genes for tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens*. J.Bacteriol 175, 3876-3886

DOUMITH, M., Legrand, R., Lang, C., Salas, J.A., Raynal, M.-C. (1999). Interspecies complementation in *Saccharopolyspora erythraea*: elucidation of the function of *oleP1*, *oleG1* and *oleG2* from the oleandomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* and generation of new erythromycin derivatives. Mol. Microbiol. 34, 1039-1045

DOUMITH, M., Weingarten, P., Wehmeier, U.F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.-M., Piepersberg, W., Raynal, M.-C. (2000). Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. Mol. Gen. Genet. 264, 477-485

DRAUTZ, H., Zähner, H., Rohr, J., Zeeck, A. (1986). Metabolic products of microorganisms. 234. Urdamycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*. I. Isolation, characterization and biological properties. J. Antibiot. (Tokyo). 39, 1657-1669

DUTTON, G.J. (1980). Glucuronidation of Drugs and Other Compounds. CRC Press Inc., Boca Raton FL

DWEK, R.A., Butters, T.D., Platt, F.M., Zitzmann, N. (2002). Targeting Glycosylation as a Therapeutic Approach. Nat. Drug Discov. 1, 65-75

FAUST, B. (2000). Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

FAUST, B., Hoffmeister, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Haag, S., Schneider, P., Decker, H., Künzel, E., Rohr, J., Bechthold, A. (2000). Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces .fradiae* Tü2717. Microbiology 146, 147-153

FISH, S.A., Cundliffe, E. (1996). Structure-activity studies of tylosin-related macrolides. J. Antibiot. 49, 1044-1048

FLYNN, E.H., Murphy, H.W., McMahon, R.E. (1954). Erythromycin II. des-N-methylerythromycin and N-methyl-C14-erythromycin. J. Am. Chem. Soc. 77, 3104-3106

FUJIWARA, A., Hoshino, T. (1983). Anthracyclic antibiotics. Crit. Rev. Biotechnol. 3, 133-157

GASTINEL, L.N., Cambilleau, C., Bourne, Y. (1999). Crystal structure of the bovine β-4-Galactosyltransferase caclytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. EMBO J. 18, 3546-3557

GEORGOAPAPDAKOU, N.H. (1998) Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. Curr. Opin. in Microbiol. 1, 547-557

GOODFELLOW, M., Mordarski, M., Williams, S.T. (Hrsg.) (1984). The Biology of Actinomycetes. Academic Press, London

GRÄFE, U. (1992). Biochemie der Antibiotika, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, New York, Berlin

HA, S., Walker, D., Shi, Y., Walker, S. (2000). The 1.9 A crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. Prot. Sci. 9, 1045-1052

HANISCH, F.G., Hanski, C., Hasegawa, A. (1992). Sialyl Lewis(x) antigen as defined by monoclonal antibody AM-3 is a marker of dysplasia in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Cancer Res. 52, 3138-3144

HE, X., Thorson, J.S., Liu, H.W. (1996). Probing the Coenzyme and Substrate Binding Events of CDP-D-glucose 4,6-Dehydratase: Mechanistic implications. Biochemistry 35, 4721-4731

HENKEL, T., Ciesiolka, T., Rohr, J., Zeeck, A. (1989). Urdamycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*.V. Derivatives of Urdamycin A. J. Antibiot. (Tokyo). 42, 299-311

HERVÉ, M., Debouzy, J.C., Borowski, E., Cybulska, B., Gary-Bobo, C. M. (1989). The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. A ^{31}P-NMR study. Biochim. et Biophys. Acta. 980, 261-272

HOFFMEISTER, D. (1998). Diplomarbeit. Eberhard-Karls-Universität Tübingen

HOFFMEISTER, D., Ichinose, K., Domann, S., Faust, B., Trefzer, A., Dräger, G., Kirschning, A., Fischer, C., Künzel, E., Bearden, D.W., Rohr, J., Bechthold, A. (2000). The NDP-sugar co-substrate concentration and the enzyme expression level influence the substrate specificity of glycosyltransferases: Cloning and characterization of deoxysugar biosynthetic genes of the urdamycin biosynthetic gene cluster. Chem. Biol. 7, 821-831

HOFFMEISTER, D., Wilkinson, B., Foster, G., Sidebottom, P.J., Ichinose, K., Bechthold, A. (2002). Engineered urdamycin glycosyltransferases are broadened and altered in substrate specificity. Chem. Biol. (in Druck)

HOLMES, D.S, Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analyt. Biochem. 114, 193-197

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

HUANG, C.-H., Lin, Y.-S., Yang, Y.-L., Huang, S.-W., Chen, C.W. (1998). The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. Mol. Microbiol. 28, 905-916

ICHINOSE, K., Bedford, D.J., Tornus, D., Bechthold, A., Bibb, M.J., Revill, W.P., Floss, H.G., Hopwood, D.A. (1998). The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22: sequence analysis and expression in a heterologous host. Chem. Biol. 5, 647-659

JONES, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J. Mol. Biol. 292, 195-202

KATZ, L., Hutchinson, C.R. (1992). Genetic engineering of antibiotic producing organisms. Ann. Rep. in Med. Chem. 27, 129-138

KATZ, L., Donadio, S. (1995). Macrolides. In: Vining, L.C., Stuttard, C. (Eds.). Genetics and biochemistry of antibiotic production, 385-420

KAWASHIMA, A., Yoshimura, Y., Goto, J., Nakaike, S., Mizutani, T., Hanada, K., Omura, S. (1988). PI-083, a new platelet aggregation inhibitor. J. Antibiot., 41, 1913-1914

KAWASHIMA, A., Kishimura, M., Tamai, M., Hanada, K. (1989). New platelet aggregation inhibitors. Chem. Pharm. Bull. 37, 3429-3431

KENDREW, S.G., Harding, S.E., Hopwood, D.A., Marsh, E.N. (1995). Identification of a flavin:NADH oxidoreductase involved in the biosynthesis of actinorhodin. Purification and characterization of the recombinant enzyme. J. Biol. Chem. 270, 17339-17343

KIESER, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, Norwich, U.K.

KIRSCHNING, A., Bechthold, A., Rohr, J. (1997). Chemical and biochemical aspects of deoxysugars and deoxysugar oligosaccharides. Topics in Curr. Chem. 188, 1-84

KROHN, K, Rohr, J. (1997). Angucyclines: Total syntheses, new structures, and biosynthetic studies of an emerging new class of antibiotics. Topics in Curr. Chem. 188, 127-195

KULOWSKI, K., Wendt-Pienkowski, E., Han, L., Yang, K., Vining, L.C., Hutchinson, C.R. (1999). Functional Characterization of the jadI Gene As a Cyclase Forming Angucyclinones. J. Am. Chem. Soc. 121, 1786-1794

KUMAR, L.V., Rao, C.M. (2000). Domain swapping in human alpha A and alpha B crystallins affects oligomerization and enhances chaperone-like activity. J. Biol. Chem. 275, 22009-22013

KUNSTMANN , M.P., Mitscher, L.A. (1966). The structural Characterization of Tetrangomycin and Tetrangulol. J. Org. Chem. 31, 2920-2925

KÜNZEL, E., Faust, B., Oelkers, C., Weissbach, U., Bearden, D.W., Weitnauer, G., Westrich, L., Bechthold, L., Rohr, J. (1999). Inactivation of the *urdGT2* Gene, Which Encodes a Glycosyltransferase responsible for the C-Glycosyltransfer of Activated D-Olivose, Leads to Formation of the Novel Urdamycins I, J, and K. J. Am. Chem. Soc. 121, 11058-11062

MACNEIL, D.J., Gewain, K.M., Ruby C.L., Deceny, G., Gibbons, P.H., MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis using a novel integration vector. Gene 111, 61-68

MADDURI, K., Kennedy, J., Rivola, G., Inventi-Solari, A., Filippini, S., Zanuso, G., Colombo, A.L., Gewain, K.M., Occi, J.L., MacNeil, D.J., Hutchinson, C.R. (1998). Production of the antitumor drug epirubicin (4′-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*. Nat. Biotech. 16., 69-74

MARSDEN, A.F.A., Wilkinson, B., Cortés, J., Dunster, N.J., Staunton, J., Leadlay, P.F. (1998). Engineering Broader Specificity into an Antibiotic-Producing Polyketide Synthase. Science 279, 199-202

MARTIN, J.F., Liras, P. (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. Ann. Rev. Microbiol. 43, 143-206

MCDANIEL, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D.A., Khosla, C. (1993). Engineered Biosynthesis of Novel Polyketides. Science 262, 1546-1550

MCDANIEL, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D.A., Khosla, C. (1995). Rational design of aromatic natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. Nature 375, 549-554

MENDEZ, C., Salas, J.A. (2001). Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. Trends in Biotech. 19, 449-456

METSA-KETALA, M., Kantola, J., Ylihonko, K. (2001). Cloning and characterization of a silent angucycline-type gene cluster from a rubromycin B producing *Streptomyces* sp. PGA 64. Vorabpublikation der Sequenzdaten in GenBank unter der Registrierungsnummer AAK57530 auf dem Server des National Center of Biological Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov

MIZUSAWA, S., Nishimura, S., Seela, F., (1986). Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by the use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. Nuc. Acids Res. 14, 1319-1324

MOORE, M.H., Hunter W.N., d´Estaintot, B.L., Kennard, O. (1989). DNA-Drug Interactions. The crystal structure of d(CGATCG) complexed with Daunomycin. J. Mol. Biol. 206, 693-705

MORÉRA, S., Imberty, A., Aschke-Sonnenborn, U., Rüger, W., Freemont, P.S. (1999). T4 phage β-glucosyltransferase: substrate binding and proposed catalytic mechanism. J. Mol. Biol. 292, 717-730

MULICHAK, A.M., Losey, H.C., Walsh, C.T., Garavito, R.M. (2001). Structure of the UDP-Glucosyltransferase GtfB That Modifies the Heptapeptide Aglycone in the Biosynthesis of Vancomycin Group Antibiotics. Structure 9, 547-557

MÜLLER, E., Loeffler, W. (1992). Mykologie, 5. Auflage, G.Thieme Verlag, Stuttgart

MUTSCHLER, E. (2001). Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, Wiss. Verl. Ges. Stuttgart

NAGASAWA, T., Fukao, H., Irie, H., Yamada, H. (1984). Sakyomicins A, B, C and D: new quinone-type antibiotics produced by a stain of *Nocardia*. J. Antibiot. 37, 693-699.

NAGATSU, T., Ayukawa, S., Umezawa, H. (1968). Inhibition of Dopamin-β-Hydroxylase by Aquayamycin. J. Antibiot. 21, 354-357

OH, S., Chater, K.F. (1996). Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): Possible relevance to other organisms. J. Bacteriol. 179, 122-127

OHTA, K., Kamiya, K. (1981). X-Ray Crystal Structure of P-1894B, a Collagen Proline Hydroxylase Inhibitor Produced by *Streptomyces albogriseus* subspec. No.1894. J.C.S. Chem. Comm. 154-155

OHTA, K., Mizuta, E., Okazaki, H., Kishi, T. (1984). The Absolute Configuration of P-1894B, A Potent Prolyl Hydroxylase Inhibitor. Chem. Pharm. Bull. 32, 4350-4359

OKAZAKI, H., Ohta, K., Kanamaru, T., Ishimaru, T., Kishi, T. (1981). The Absolute Configuration of A Potent Porlyl Hydroxylase Inhibitor, P-1894B, Produced by a Strain of *Streptomyces*. J. Antibiot. 34, 1355-1356

OLANO, C., Lomovskaya, N., Fonstein, L., Roll, J.T., Hutchinson, C.R. (1999) A two-plasmid system for the glycosylation of polyketide antibiotics: bioconversion of ε-rhodomycinon to rhodomycin D. Chem. Biol. 6, 845-855

OMURA, S., Nakagawa, A., Fukamachi, N., Miura, S., Takahashi, Y., Komiyama, K., Kobayashi, B. (1988). OM-4842, a new platelet aggregation inhibitor from *Streptomyces*. J. Antibiot. 41, 812-813

OMURA, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahasi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98, 12215-12220

ORSER, C.S., Lange, C.C., Xun, L., Zahrt, T.C., Schneider, B.J. (1993). Cloning, sequence analysis, and expression of the *Flavobacterium* pentachlorophenol-4-monooxygenase gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 175, 411-416

OTTEN, S.L., Gallo, M.A., Madduri, K., Liu, X. Hutchinson, C.R. (1997). Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius* dnmZUV genes encoding three enzymes required for biosynthesis of the daunorubicin precursor thymidine diphospho-L-daunosamine. J. Bacteriol. 179, 4446-4450

PAULSON, J.C., Colley, K.J. (1989). Glycosyltransferases. J. Biol. Chem. 264, 17615-17618

PFEIFER, B.A., Admiraal, S.J., Gramajo, H., Cane, D.E., Khosla, C. (2001). Biosynthesis of Complex Polyketides in a Metabolically Engineered Strain of *E.coli.* Science 291, 1790-1792

PHILLIPS, T.A., Van Boegelen, R.A., Neidhardt, F.C. (1984). *lon* gene product of *Escherichia coli* is a heat shock protein. J. Bacteriol. 159, 283-287

QUIRÓS, L.M., Carbajo, R.J., Salas, J.A. (2000). Inversion of the anomeric configuration of the transferred sugar during inactivation of the macrolide antibiotic oleandomycin catalyzed by a macrolide glycosyltransferase. FEBS Lett. 476, 186-189

RALEIGH, E.A., Benner, J., Bloom, F., Braymer H.D., De Cruz, E., Dharamalingam, K., Heitman, J., Noyer-Weidner, M., Piekarowicz, A., Kretz, P.L. (1991). Nomenclature relating to restriction of modified DNA in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173, 2707-2709

RADOMINSKA-PANDYA, A., Czernik, P.J., Little, J.M., Bataglia, E., MacKenzie, P.I. (1999). Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. Drug Metab. Rev. 31, 817-899

ROHR, J. (1984). Disseration, Georg-August-Universität, Göttingen

ROHR, J., Zeeck, A., Floss, H.G. (1988). Urdamycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*. III. The structures of Urdamycins C and D. J. Antibiot. (Tokyo). 41, 126-129

ROHR, J. (1989). Urdamycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*.VI. Structure elucidation and biosynthetic investigations on Urdamycin H. J. Antibiot. (Tokyo). 42, 1482-1488

ROHR, J., Beale J.M., Floss, H.G. (1989). Urdamycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*. IV. Biosynthetic studies of Urdamycins A-D. J. Antibiot. (Tokyo). 42, 1151-1157

ROHR, J. (1990). Eine neuartige Ringkontraktion als nicht-enzymatischer Schritt der späten Urdamycin H-Biosynthese. Angew. Chem. 102, 1091-1092

ROHR, J., Thiericke, R. (1992). Angucycline group antibiotics. Nat. Prod. Rep. 9, 103-137

ROHR, J., Schönewolf, M., Udvarnoki, G., Eckardt, K., Schumann, G., Wagner, C., Beale, J.M., Sorey, S.D. (1993). Investigations on the Biosynthesis of the Angucycline Group Antibiotics Aquayamycin and the Urdamycins A and B - Results from the Structural Analysis of Novel Blocked Mutant Products. J. Org. Chem. 58, 2547-2551

ROSSMANN, M.G., Moras, D., Olson, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. Nature 250, 194-199

ROST, B., Sander, C. (1993). Prediction of protein structure at better than 70% accuracy. J. Mol. Biol. 232, 584-599

ROST, B., Sander, C., Schneider, R. (1994). PHD - an automatic mail server for protein secondary structure prediction. CABIOS 10, 53-60

ROST, B., Sander, C. (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. Proteins 19, 55-72

RUDD, B.A., Hopwood, D.A. (1979). Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Gen. Microbiol. 114, 35-43

RUSSEL, M., Model, P. (1988). Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. J. Biol. Chem. 263, 9015-9019

SAMBROOK, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning - a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press

SALAH-BEY, K., Doumith, M., Michel, J.M., Haydock, S., Cortés, J., Leadlay, P.F., Raynal, M.C. (1998). Targetted gene inactivation for the elucidation of deoxysugar biosynthesis in the erythromycin producer *Saccharopolyspora erythraea*. Mol. Gen. Genet. 257, 542-553

SANGER, F., Nicklen, S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

SCHLEGEL, H.G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York

SCHLÜNZEN, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. Nature, 413, 814-821

SCHOEPFER, R. (1993). The pRSET family of T7 promotor expression vectors for *Escherichia coli*. Gene 124, 83-85

SETO, N.O.L., Compston, C.A., Evans, S.V., Bundle, D.R., Narang, S.A., Palcic, M.M. (1999). Donor substrate specificity of recombinant human blood group A, B and hybrid A/B glycosyltransferases expressed in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 259, 770-775

SEZAKI, M., Hara, T., Ayukawa, S., Takeuchi, T., Okami, Y., Hamada, M., Nagatsu, T., Umezawa, H. (1968). Studies on a new antibiotic pigment: aquayamycin. J. Antibiot. 21, 91-97

SEZAKI, M., Kondo, S., Maeda, K., Umezawa, H., Ohno, M. (1970). The structure of aquayamycin. Tetrahedron 26, 5171-5190

SHEN, B., Summers, R.G., Wendt-Pienowski, E., Hutchinson, C.R. (1995). The *Streptomyces glaucescens tcmKL* polyketide synthase and *tcmN* polyketide cyclase genes govern the size and shape of aromatic polyketides. J.Am.Chem.Soc. 117, 6811-6821

SHORT, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988). λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with in vivo excision properties. Nuc. Acids Res. 16, 7583-7600

SINGH, A., Hayashi, K. (1995). Construction of chimeric β-glucosidases with improved enzymatic properties. J. Biol. Chem. 270, 21928-21933

SITTE, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. (1991). Strasburger – Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 33. Auflage, G.Fischer Verlag, Stuttgart Jena New York

SMITH, D.B., Davern, K.M., Board, P.G., Tiu, W.U., Garcia, E.G., Mitchell, G.F. (1986). Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonica* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione-S-transferase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83, 8703-8707

SNIPES, C.E., Chang, C.-J., Floss, H.G. (1979). Biosynthesis of the Antibiotic Granaticin. J.Am. Chem. Soc. 101, 701-706

SUMMERS, R.G., Wendt-Pienowski, E., Motamedi, H., Hutchinson, C.R. (1995). Nucleotide sequence of the *tcmII-tcmIV* region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* and evidence that the tcmN gene encodes a multifunctional cyclase-dehydratase-O-methyl transferase. J. Bacteriol. 174, 1810-1820

SUMMERS, R.G., Donadio, S., Staver, M.J., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C.R., Katz, L. (1997). Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. Microbiology 143, 3251-3262

TANAKA, N., Okabe, T., Tanaka, N., Take, Y., Inouye, Y., Nakamura, S., Nakashima, H., Yamamoto, N. (1986). Inhibition by sakyomicin A of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and proliferation of AIDS-associated virus (HTLV-III/LAV). Jpn. J. of Cancer Res. 77, 324-326

TANG, L., Fu, H., McDaniel, R. (2000). Formation of functional complexes using subunits from the picromycin, erythromycin and oleandomycin polyketide sythases. Chem. Biol. 7, 77-84

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

THORSON, J.S., Lo, S.F., Ploux, O., He, X., Liu, H.-W. (1994). Studies of the Biosynthesis of 3,6-Dideoxyhexoses: Molecular Cloning and Characterization of the asc (Ascarylose) Region from *Yersinia pseudotuberculosis* Serogroup VA. J. Bacteriol. 176, 5483-5493

THORSON, J.S., Hosted, T.J., Jiang, J., Biggins, J.B., Ahlert, J. (2001). Nature´s Carbohydrate Chemists: The Enzymatic Glycosylation of Bioactive Bacterial Metabolites. Curr. Org. Chem. 5, 139-167

TREFZER, A., Salas, J.A., Bechthold, A. (1999). Genes and enzymes involved in deoxysugar biosynthesis in bacteria. Nat. Prod. Rep. 16, 283-299

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

TREFZER, A., Fischer, C., Stockert, S., Westrich, L., Künzel, E., Girreser, U., Rohr, J., Bechthold, A. (2001). Elucidation of the function of two glycosyltransferase genes (l*anGT1* and *lanGT4*) involved in landomycin biosynthesis and generation of new oligosaccharide antibiotics. Chem. Biol. 8, 133-142, 1239-1252

ÜNLIGIL, U.M., Zhou, S., Yuwaraj, S., Sarkar, M., Schachter, H., Rini, J.M. (2000). X-ray crystal structure of rabbit *N*-acetylglucosaminyltransferase I: catalytic mechanism and a new protein superfamily. EMBO J. 19, 5269-5280

ÜNLIGIL, U.M., Rini, J.M. (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. Curr. Opin. in Struc. Biol. 10, 510-517

VOLCHEGURSKY, Y., Hu, Z., Katz, L., McDaniel, R. (2000). Biosynthesis of the anti-parasitic agent megalomicin: transformation of erythromycin to megalomicin in *Saccharopolyspora erythraea*. Mol. Microbiol. 37, 752-762

VRIELINK, A., Rüger, W., Driessen, H.P.C., Freemont, P.S. (1994). Crystal structure of the DNA modifying enzyme β-glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. EMBO J. 13, 3413-3422

WEINSTEIN, M.J., Wagman, G.H., Marquez, J.A., Testa, R.T., Oden, E., Waitz, J.A. (1969). Megalomicin, a new macrolide antibiotic complex produced by *Micromonospora*. J. Antibiot. 22, 253-258

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

WESTRICH, L., Domann, S., Faust, B., Bedford; D., Hopwood, D.A., Bechthold, A. (1999). Cloning and characterization of a gene cluster from *Streptomyces cyanogenus* S136 probably involved in landomycin biosynthesis. FEMS Microbiol. Lett. 170, 381-387

WEYMOUTH-WILSON, A.C. (1997). The role of carbohydrates in biologically active natural products. Nat. Prod. Rep., 14 (2), 99-110

WIERENGA, R.K., Hol, W.G.J. (1983). Predicted nucleotide-bindung properties of p21 protein and ist cancer-associated variant. Nature 302, 842-844

WIGGINS, C.A.R., Munro, S. (1998). Activity of the yeast *MNN1* α-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. Proc. Natl. Acad.. Sci. USA 95, 7945-7950

WILLIAMS, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G. (1989). Genus *Streptomyces* (WAKSMAN&HENRICI). In: Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 4, 2453-2492

WOHLLEBEN, W., Muth, G. (1993). *Streptomyces* plasmid vectors. In: Hardy, K.G. (Ed). Plasmids - a practical approach, second edition, 147-175

YANG, D., Wang, A.H.J. (1994). Structure by NMR of Antitumor Drugs Aclacinomycin A and B Complexed to d(CGTACG). Biochemistry 33, 6595-6604

YANG, K., Han, L., Ayer, S.W., Vining, L.C. (1996) Accumulation of the angucycline antibiotic rabelomycin after disruption of an oxygenase gene in the jadomycin B biosynthetic gene cluster of *Streptomyces venezuelae*. Microbiol. 142, 123-132

YANISCH-PERRON, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119

YU, T.-W., Müller, R., Müller, M., Zhang, X., Dräger, G., Kim, C.-G., Leistner, E., Floss, H.G. (2001). Mutational Analysis and Reconstotuted Expression of the Biosynthetic Genes Involved in the Formation of 3-Amino-5-hydroxybenzoic Acid, the Starter unit of Rifamycin Biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* S699. J. Biol. Chem. 276, 12546-12555

ZHANG, Y., Wang, P.G., Brew, K. (2001). Specificity and mechanism of metal ion activation in UDP-galactose b-galactoside a-1,3-galactosyltransferase. J. Biol. Chem. 276, 11567-11574

Danksagung

Herrn Professor Dr. Andreas Bechthold danke ich für eine freundschaftliche Betreuung und Unterstützung der Arbeit und für die Eigenschaft, im Promotionsstudenten einen gleichwertigen Partner zu sehen.

Frau Professor Dr. Irmgard Merfort danke ich für die Übernahme des Koreferates, Herrn Professor Dr. Georg E. Schulz für die Einführung in die Welt der Proteinstrukturen.

Ohne die Zuverlässigkeit, Präzision und das persönliche Engagement, mit der Prof. Dr. Koji Ichinose (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan) meine Arbeit unterstützte, wäre ich nicht so weit gekommen. Die mit ihm geführten Diskussionen machten stets aufs Neue hungrig auf Naturwissenschaft. Dafür tiefsten Dank.

Frau Monika Weber unterstützte mich hervorragend, engagierte sich für die wissenschaftliche Arbeit und sorgte für einen glänzenden Start in Freiburg. Herzlichen Dank!

Für die großartige wissenschaftliche Unterstützung und die freundschaftliche Aufnahme in die Biotransformation and Natural Product Chemistry Unit des GlaxoWellcome Medicines Research Centre, Stevenage, Hertfortshire, UK, im Juni und November/Dezember 2000 danke ich Dr. Barrie Wilkinson, Graham Foster, Dr. Phil Sidebottom, Dr. Jesús Cortés-Bargallo, Dr. Javier Alvarez-Velasco, Dr. Nick Taylor, Dr. Brian Rudd, Dr. Mike Dawson, Dr. Michaela Hajek, Gill Cathro und Dr. Richard Hall.

Herzlichen Dank an Dr. Gerald Dräger und Prof. Dr. Andreas Kirschning (Universität Hannover, Institut für Organische Chemie) für die Einladung nach Hannover, um im glühend heißen August 2001 Strukturen der neuen Urdamycine aufzuklären.

Allen Mitgliedern des EU-Projektes GENOVA vielen Dank für Diskussionen, Anregungen und wissenschaftlichen Austausch während der Projekttreffen in Tübingen, Wuppertal, Harpenden, UK, und Dublin, Irland. Besonders danke ich Prof. Dr. Peter Leadlay (University of Cambridge), Dr. Ansgar Stratmann (Universität Wuppertal) und Thomas Schumacher (Forschungszentrum Jülich).

Ich danke Prof. Dr. Jürgen Rohr, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA, für die prompten und präzisen Antworten, wenn ich mal wieder Fragen zu chemischen Sachverhalten hatte. Mit Uwe Rix arbeitete ich freundschaftlich während seines Forschungsaufenthaltes für das Jadomycin-Projekt in Kiel im Sommer 2000 zusammen, dafür herzlichen Dank, ebenso an Eva Künzel für die Reinigung des Urdamycin O.

Dank auch an viele Labor- und Arbeitskollegen in Tübingen, Kiel und Freiburg, besonders Lucy Westrich (Pharmazeutische Biologie, Tübingen), Dr. Stefan Pelzer, Dipl.-Ing. Georg Grewe und Dr. Uwe Theobald (Mikrobiologie/Biotechnologie, Tübingen), Dr. Emile Schiltz und Tanja Mosbacher (Biochemie, Freiburg) sowie Gabriele Weitnauer (Pharmazeutische Biologie, überall)

Außerdem Dank an die Weggefährten außerhalb des Labors: Matthias Hendrichs, Jochen Kassberger, Marc Weimann, Natascha und Ukko Speidel.

Für eine ganz besondere Freundschaft und für gemeinsame, wunderschöne Aktionen danke ich Martin Hager.

Ich danke den akademischen Lehrern in Tübingen, deren didaktisch gelungene Veranstaltungen mir in fester Erinnerung bleiben: den Professoren Christian Friedrich Bardele, Karl-Peter Hadeler, Achim Hager, Vera Hemleben, Ingrid Kottke, Franz Oberwinkler, Hans-Ulrich Schnitzler, Friedrich Schöffl, Hanns-Ulrich Seitz, Wilhelm Seyffert und Wolfgang Wohlleben (alle Fakultät für Biologie), aus der Fakultät für Chemie und Pharmazie Michael Hanack, Lutz Heide und Günter Jung, sowie Karlheinz Gaukler (Fakultät für Physik), und allen anderen Ambitionierten, die ich während des Studiums kennengelernt habe.

Lebenslauf/Wissenschaftliche Ausbildung

08.05.1972	Geboren in Ruit
26.05.1992	Allgemeine Hochschulreife
10/92-07/93	Pharmazie-Studium, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10/93-09/95	Biologie-Grundstudium, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10/95-10/97	Biologie-Hauptstudium, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fächer: Spezielle Botanik/Mycologie (Hauptfach), Genetik, Pharmazeutische Biologie
11/97-11/98	Diplomarbeit am Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Thema: Molekularbiologische Untersuchungen zur Glycosidierung von Polyketiden, Betreuer: Prof. Dr. Lutz Heide und Prof. Dr. Andreas Bechthold
01/99-02/00	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/00-03/01	Fortsetzung der Arbeiten am Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
04/01-11/01	Fortsetzung der Arbeiten am Institut für Pharmazeutische Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg