

**Acarbose-Metabolismus**  
**in**  
***Actinoplanes* sp. SE50/110**

Dem Fachbereich Naturwissenschaften II (Chemie / Biologie) an der Bergischen Universität  
Gesamthochschule Wuppertal vorgelegte Dissertation zur Erlangung des akademischen  
Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.).

eingereicht von  
Dipl. Biol. Holger Thomas

Wuppertal, im November 2001

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 1998 bis November 2001 an der Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal am Lehrstuhl für Chemische Mikrobiologie des Fachbereichs 9 in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Wolfgang Piepersberg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Piepersberg gilt mein besonderer Dank für die interessante Aufgabenstellung, sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und zahlreichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Altenbach gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferates und die Unterstützung bei der Suche nach möglichen Biosyntheseintermediaten der Acarbose-Biosynthese.

Herrn Dr. Block, aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Altenbach, möchte ich für die Bereitstellung des 1-*epi*-Valienols sowie die zahlreichen Diskussionen über die Acarbose-Biosynthese danken.

Bei Herrn Dr. Wehlmann und Herrn Dr. Lenz (beide BAYER AG, Wuppertal) möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die engagierte Unterstützung bei der Analyse der Kulturüberstände von rekombinanten *Streptomyces lividans* Stämmen bedanken.

Herrn Dr. U. Wehmeier und Herrn Dr. Stratmann gilt mein Dank für die stete Hilfsbereitschaft und wertvollen Tipps während dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei C. S. Zhang für die intensive Zusammenarbeit und Unterstützung innerhalb des Acarbose-Projekts. Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Piepersberg und Reineke für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den Spaß im Labor bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die mir entgegengebrachte Unterstützung.

### **Poster-Beiträge**

**Thomas, H., Stratmann, A., Diaz-Guardamino, M., Jarling, M., Zhang, C. S., Wehmeier, U., Piepersberg, W.** (2000). Molecular Investigations of the Acarbose Biosynthesis in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Poster auf dem VAAM Workshop "Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten", Universität Bonn.

**Thomas, H., Zhang, C. S., Diaz-Guardamino, M., Jarling, M., Stratmann, A., Wehmeier, U. F., Piepersberg, W.** (2001). Molecular Investigations of the Acarbose Biosynthesis in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Poster auf dem Bio-Gen-Tec Forum NRW, Köln.

## Inhalt

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>VI</b>
<b>Summary</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Gattung <i>Actinoplanes</i> .....	1
1.2 Acarbose: Struktur, verwandte Verbindungen und Wirkung.....	2
1.3 Regulation des Acarbose-Metabolismus in <i>Actinoplanes</i> sp. ....	5
1.4 Der Acarbose-Metabolismus in <i>Actinoplanes</i> sp. ....	6
1.5 Das <i>acb</i> -Gencluster aus <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 .....	12
1.6 Ziele dieser Arbeit.....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1 Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und GEM12-Phagen.....	16
2.2 Verwendete Oligonukleotide .....	21
2.3 Chemikalien, Enzyme, Reaktions-Kits, sonstige Materialien .....	23
2.4 Nährmedien .....	24
2.4.1 Medien zur Kultivierung von Actinomyceten .....	24
2.4.2 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	25
2.4.3 Medien zur Vermehrung von Bakteriophagen .....	26
2.5 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.6 Anzucht von Actinomyceten.....	27
2.6.1 Generelle Anzucht von Actinomyceten.....	27
2.6.2 Anzucht von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 für die Isolierung 27 chromosomaler DNA.....	27
2.7 Vermehrung und Stammhaltung rekombinanter GEM12-Phagen.....	27
2.8 Heterologe Expression von <i>acb</i> -Genen in <i>S. lividans</i> 66 TK23 .....	28
2.8.1 Heterologe Expression mit dem Expressionsplasmid pHTW214 .....	28
2.8.2 Heterologe Expression des <i>acb</i> -Gencluster in <i>S. lividans</i> 66 TK23 .....	28

---

2.9 Molekularbiologische Methoden .....	29
2.9.1 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	29
2.9.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Actinomyceten.....	29
2.9.3 Isolierung von pOJ446-Derivaten aus <i>S. lividans</i> 66 TK23 .....	29
2.9.4 Isolierung von GEM12-Phagen DNA aus <i>E. coli</i> LE392.....	30
2.9.5 <i>In vitro</i> Manipulation von DNA .....	30
2.9.6 Plaque-Hybridisierung von GEM12-Phagen DNA .....	31
2.9.7 DNA-DNA Hybridisierung .....	31
2.9.8 Koloniehybridisierung der Cosmid-Bank in <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	32
2.9.9 DNA-Sequenzierung .....	32
2.9.10 Transformation von <i>S. lividans</i> 66 TK23 und <i>E. coli</i> .....	32
2.9.11 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	33
2.9.12 Konstruktion einer Cosmid-Bank genomischer DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 in dem Cosmidvektor pOJ446.....	33
2.9.12.1 Partielle Hydrolyse der chromosomalen DNA aus <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 mit <i>Sau3A</i> I .....	34
2.9.12.2 Ligation der partiell hydrolysierten DNA in pOJ446 / <i>BamH</i> I.....	34
2.9.12.3 Verpackung des Ligationsansatzes und Transduktion in <i>E. coli</i> XL1-Blue .....	34
2.9.12.4 Amplifikation und Stammhaltung der Cosmidbank.....	34
2.9.13 „Southern“-Blot.....	35
2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	35
2.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.12 Herstellung zellfreier Proteinextrakte.....	36
2.13 Messung der Acarviosyltransferase <i>AcbD</i> .....	36
2.14 Nachweis der Phosphorylierung von 1- <i>epi</i> -Valienol.....	37
2.15 Nachweis der Acarbose-7-Kinase <i>AcbK</i> .....	38
2.16 Chromatografische Analyse der Kulturüberstände von <i>S. lividans</i> pOJ446 und <i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6.....	38
2.17 Dünnschichtchromatografie von Enzymsätzen.....	39
2.19 Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen.....	39

---

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1 Identifizierung des rekombinanten GEM12-Derivates $\Phi$ 52 .....	40
3.2 $\phi$ 52: Subklonierungs- und Sequenzierungsstrategie .....	41
3.3 Konstruktion einer Cosmid-Bank chromosomaler DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 .....	42
3.4 Identifizierung von rekombinanten Cosmiden, die Bereiche des <i>acb</i> -Genclusters codieren .....	43
3.4.1 Lokalisation verschiedener mit dem <i>acb</i> -Gencluster überlappender Cosmid-Klone .....	44
3.5 Analyse der DNA-Sequenz von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 auf $\Phi$ 52 .....	46
3.5.1 Das Genprodukt AcbI .....	50
3.5.2 Das Genprodukt AcbP .....	50
3.5.3 Das Genprodukt AcbR .....	51
3.5.4 Das Genprodukt AcbS .....	54
3.5.5 Das Genprodukt AcbU .....	55
3.5.6 Das Genprodukt AcbV .....	58
3.5.7 Das Genprodukt AcbW .....	58
3.5.8 Das Genprodukt AcbX .....	60
3.5.9 Das Genprodukt AcbY .....	60
3.5.10 Das Genprodukt AcbZ .....	61
3.5.11 Das Genprodukt Asp52.1 .....	63
3.5.12 Das Genprodukt Asp 52.2 .....	64
3.5.13 Das Genprodukt Asp 52.3 .....	64
3.6 Charakterisierung der rekombinanten <i>S. lividans</i> 66 TK23 Stämme mit den Cosmiden pHTWCos6 und pOJ446 .....	65
3.6.1 Phänotypische Eigenschaften von <i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6 .....	65
3.6.2 Nachweis heterolog produzierter Proteine in zellfreien Extrakten und Kultur- überständen von <i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6 .....	66
3.6.3 Nachweis der AcbD-Reaktion im Kulturüberstand von <i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6 .....	67
3.6.4 Nachweis der katalytischen Aktivität der Acarbose-7-Kinase AcbK in zellfreien Extrakten von <i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6 .....	68

---

3.6.5	Chromatografische Analyse der Kulturüberstände von <i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6 bzw. <i>S. lividans</i> 66 TK23 pOJ446 .....	70
3.6.6	Nachweis der Phosphorylierung von 1- <i>epi</i> -Valienol durch zellfreie Extrakte von <i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6 .....	72
3.7	Charakterisierung von <i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTW214 .....	74
3.7.1	Enzymatische Charakterisierung von <i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTW214 .....	75
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>77</b>
4.1	Struktur des vollständigen <i>acb</i> -Genclusters.....	77
4.2	Heterologe Expression des <i>acb</i> -Genclusters in <i>S. lividans</i> 66 TK23.....	82
4.3	Gibt es eine Regulation des Acarbose-Metabolismus in <i>Actinoplanes</i> sp. ? .....	84
4.4	Transport von Acarbose und Homologen - Die ABC-Transporter AcbHFG und AcbWXY .....	85
4.5	1- <i>epi</i> -Valienol - Ein Intermediat der Acarbose-Biosynthese? .....	87
4.6	Modell des Acarbose-Metabolismus in <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 .....	90
4.6.1	<i>De novo</i> Biosynthese von Acarbose .....	90
4.6.2	Physiologische Funktion von Acarbose und Acarbose-Homologen .....	93
4.7	Ausblick .....	96
<b>5.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>109</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung	MS	Massenspektrometrie
<i>acb</i>	potentielle Gene des <i>acb</i> -Genclusters	NDP	Nukleosiddiphosphat
<i>asp</i>	sonstige potentielle Gene aus <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	PCR	Polymerase chain reacation
ADP	Adenosindiphosphat	nkat	Nanokatal
AMP	Adenosinmonophosphat	NTP	Nukleosidtriphosphat
APS	Ammoniumpersulfat	PAA	Polyacrylamid
ATP	Adenosintriphosphat	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
As	Aminosäuren	pfu	Plaque forming unit
bp	Basenpaare	RNase	Ribonuklease
ca.	circa	Tab.	Tabelle
Ci	Curie	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
COG	Clusters of Orthologous Groups	SDS	Natriumdodecylsulfat
DC	Dünnschichtchromatografie	s. u.	siehe unten
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	Upm	Umdrehungen pro Minute
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser	UV	Ultraviolett
DNA	Desoxyribonukleinsäure	vgl.	vergleiche
DNase	Desoxyribonuklease	v/v	volume per volume
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate	w/v	weight per volume
dTDP	Desoxythymidintriphosphat		
DTT	Dithiothreitol		
E-Value	Expectation-Value		
Fru	Fructose		
Glc	Glucose		
HPAE	High Performance Aninoic Exchange		
Kap.	Kapitel		
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		
LC	Liquid chromatography		
Man	Mannose		

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die zwei bisher identifizierten Abschnitte des *acb*-Genclusters (*acbC*- und *acbV*-Subgencluster) aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 zu einem durchgehenden *acb*-Gencluster zu ergänzen und neue Biosynthesegene zu identifizieren. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Der rekombinante GEM12-Phage  $\Phi$ 52 wurde durch DNA-DNA-Hybridisierung mit Gensonden aus beiden *acb*-Subgenclustern isoliert und die DNA-Sequenz des 20,13 kb großen Inserts des Phagen  $\Phi$ 52 bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Bereiche beider Subgencluster auf dem Insert des Phagen  $\Phi$ 52 vorhanden waren. Die schon bekannten *acb*-Subgencluster und die in dieser Arbeit beschriebenen *acb*-Gene bildeten somit ein durchgehendes *acb*-Gencluster in *Actinoplanes* sp. SE50/110.
2. Basierend auf der DNA-Sequenz wurden 13 offene Leserahmen (*acbIPRSUVWXYZ*, *asp52.1*, *asp52.2* und *asp52.3*) identifiziert; dabei waren die Gene *acbI* und *asp52.3* nur partiell auf dem Insert des Phagen  $\Phi$ 52 vorhanden. Aufgrund der postulierten Funktion ihrer Genprodukte gehörten die 10 mit *acb*- bezeichneten Gene zu dem *acb*-Gencluster aus *Actinoplanes* sp. SE50/110.
3. Mit den in dieser Arbeit beschriebenen *acb*-Genen konnte der vermutlich vollständige Genbestand des *acb*-Genclusters aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 bestimmt und ein erweitertes Modell der Acarbose-Biosynthese entwickelt werden.
4. Zwischen dem *acb*-Gencluster aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 und dem partiell analysierten *acb*-Gencluster aus *Streptomyces glaucescens* GLA.O bestehen signifikante Unterschiede in der Organisation und dem Genbestand. Sie sind nur entfernt miteinander verwandt.
5. Das rekombinante Cosmid pHTWCos6 wurde durch DNA-DNA-Hybridisierung einer Cosmidbank genomischer DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit dem Gen *acbC* isoliert und für die heterologe Expression des *acb*-Genclusters in *S. lividans* 66 TK23 eingesetzt. Sein 41 kb großes Insert umfasste das gesamte *acb*-Gencluster. Die erfolgreiche Expression der *acb*-Gene wurde durch den Nachweis der Enzymaktivität der Acarviosyltransferase (AcbD), der Acarbose-7-Kinase (AcbK) sowie des AcbE-Proteins im Kulturfiltrat gezeigt. Weiterhin konnte in den Kulturüberständen von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 eine mit der Acarbose verwandte Substanz, möglicherweise das Biosyntheseintermediat Acarbose-7-phosphat, nachgewiesen werden, wodurch die Definition des *acb*-Genclusters bestätigte wurde.
6. Die Phosphorylierung des potentiellen Biosyntheseintermediates 1-*epi*-Valienol durch heterolog exprimierte *acb*-Gene konnte *in vitro* gezeigt werden. Wahrscheinlich wurde diese Reaktion durch die postulierte Cyclitol-Kinase AcbU katalysiert. Dies stützte die Vermutung, dass 1-*epi*-Valienol bzw. sein Phosphat 1-*epi*-Valienol-(7)-phosphat ein Intermediat der Acarbose-Biosynthese ist und durch eine Phosphorylierung, wahrscheinlich an der Position C-1 des Cyclitols, aktiviert wird.



## Summary

The objective of this study was to examine the structure and entire gene set of the complete *acb*-gene cluster in *Actinoplanes* sp. SE50/110.

1. The GEM12-derivative  $\Phi$ 52 was isolated by means of Southern hybridization with gene probes derived from both known subclusters of *acb*-genes. By sequencing the 20.13 kb insert of the phage  $\Phi$ 52 the gap between both *acb*-subclusters were filled. The residual parts of the contiguous *acb*-gene cluster downstream of *acbW* also could be identified.
2. In the 20.13 kb DNA-fragment, 11 complete (*acbPRSUVWXYZ*, *asp52.1* and *asp52.2*) and two incomplete open reading frames have been identified (*acbI* and *asp52.3*). All of the *acb*-genes are thought to belong to the *acb*-gene cluster. Except for the protein AcbI, a function in the metabolism of acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110 could be assigned to all Acb-proteins on the basis of amino acid sequence similarity to known proteins.
3. Based on the deduced functions of all Acb-proteins a putative model of the acarbose biosynthesis in *Actinoplanes* sp. SE50/110 was proposed.
4. Comparing the *acb*-gene clusters from *Actinoplanes* sp. SE50/110 and from *S. glaucescens* GLA.O significant differences in the organisation and the gene content were found implying that both gene clusters are only distantly related.
5. A genomic library of *Actinoplanes* sp. SE50/110 constructed in the shuttle vector pOJ446 was screened with a DNA-fragment containing the *acbC* gene. The isolated recombinant cosmid pHTWCos6 encompassed the complete *acb*-gene cluster and was used for the heterologous expression of the entire set of *acb*-genes in *S. lividans* 66 TK23. The enzymatic activities of the acarbose-7-kinase (AcbK) and the acarviosyltransferase (AcbD) were successfully detected by *in vitro* assays. The production of the  $\alpha$ -amylase AcbE was shown by an SDS-PAGE of the culture filtrate confirming the expression of the *acb*-genes. Furthermore, the recombinant strain *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 produced a new substance which was suggested to be acarbose-7-phosphate.
6. It was possible to phosphorylate 1-*epi*-valienol using cell free extracts of *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 or pHTW214. This reaction was most likely catalyzed by the putative cyclitol kinase AcbU. These results suggested that 1-*epi*-valienol or the corresponding phosphate 1-*epi*-valienol-(7)-phosphate are intermediates of the biosynthesis of acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Most likely, this intermediate becomes activated through phosphorylation at the C-1 position of the cyclitol, which would fit excellently into the proposed model of the biosynthesis of acarbose.

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Gattung *Actinoplanes*

Der in dieser Arbeit verwendete Acarbose-Produzent *Actinoplanes* sp. SE50/110 ist eine Spontanmutante von *Actinoplanes* sp. SE50 und innerhalb der Gruppe der Actinomyceten in die Ordnung *Actinomycetales* (Familie *Actinoplanaceae*) einzuordnen (FROMMMER et al., 1979). Mitglieder des Genus *Actinoplanes* verhalten sich Gram-positiv und bilden charakteristische Sporangien mit motilen Sporen aus (PARENTI AND CORONELLI, 1979; VOBIS, 1989). Bis auf wenige Ausnahmen wird von Mitgliedern der Gattung *Actinoplanes* jedoch kein Luftmyzel ausgebildet (PARENTI AND CORONELLI, 1979; BLAND AND COUCH, 1981). Ihre Zellwand enthält als gattungsspezifisches Merkmal *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure, LL-2,6-Diaminopimelinsäure und/oder Hydroxydiaminopimelinsäure sowie Glycin und entspricht somit dem Zellwandtyp II (LECHEVALIER AND LECHVALIER, 1970). Auch ist innerhalb der Peptidoglycanstruktur N-Acetylmuraminsäure durch N-Glycolylmuraminsäure substituiert, was die Unempfindlichkeit gegenüber der N-Acetylmuramidase Lysozym erklärt (VOBIS, 1989). Der GC-Gehalt genomischer DNA der Gattung *Actinoplanes* entspricht mit 70-73 mol% der für Actinomyceten typischen Größenordnung und kann für eine taxonomische Abgrenzung dieser Gattung nicht verwendet werden (FARINA AND BRADLEY, 1970). Molekularbiologische Untersuchungen der 16S rRNA bestätigten die systematische Einordnung von *Actinoplanes* sp. SE50/110, wobei die höchsten Übereinstimmungen mit Vertretern der Genera *Micromonospora* und *Frankia* vorhanden waren (MEHLING, 1995).

*Actinoplanes*-Stämme besiedeln verschiedenste Habitate und konnten aus einer Vielzahl unterschiedlicher Böden, marinen Habitaten sowie Binnengewässern isoliert werden (WILLOUGHBY, 1966; PALLERONI, 1976; PARENTI AND CORONELLI, 1979; JENSEN et al., 1991; TAKIZAWA et al., 1993). Ein gemeinsames Merkmal aller Isolate ist das Wachstum auf Pflanzenresten und fast alle untersuchten Species sind in der Lage mit Xylose und Arabinose, zwei Hauptbestandteilen pflanzlicher Zellwände, als C-Quelle zu wachsen (PARENTI AND CORONELLI, 1979).

Neben Acarbose produzieren Mitglieder dieser Gattung eine Vielzahl unterschiedlicher Sekundärmetabolite (z. B. die Antibiotika Lipiarmycin, Taitomycin, Purpuromycin, Teichomycin) und wurden vereinzelt erfolgreich für die Biotransformation eingesetzt (PARENTI AND CORONELLI, 1979; KUHNT et al., 1996; QUARTA et al., 1996; CHU et al., 1997; KIRILLOV et al., 1997).

## 1.2 Acarbose: Struktur, verwandte Verbindungen und Wirkung

Der  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Acarbose wird, neben einer Reihe strukturell verwandter Pseudooligosaccharide, von dem Bakterium *Actinoplanes* sp. produziert. Charakteristisches Strukturmerkmal dieser Verbindungen ist die Acarviosyl-Untereinheit der Acarbose. Sie besteht aus dem ungesättigten Aminocyclitol Valienamin, das N-glycosidisch mit einer 4,6-Didesoxyglucose verknüpft ist (MÜLLER et al., 1980; TRUSCHEIT et al., 1981; MÜLLER, 1989; PIEPERSBERG AND DISTLER, 1997). Daher ist Acarbose in die Gruppe der Aminoglycoside einzuordnen (PIEPERSBERG AND DISTLER, 1997). In Anlehnung an die Nomenklatur der Kohlenhydrate wird das anomere Zentrum der 4-Amino-4,6-didesoxy-D-glucose und die Position C-4 des Valienamins auch als reduzierendes bzw. nicht-reduzierendes Ende der Acarviosyl-Untereinheit bezeichnet. Im Fall der Acarbose ist die 4-Amino-4,6-didesoxy-D-glucose mit einem Maltosylrest  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpft. Sie unterscheidet sich von den übrigen, auch als Homologe der Acarbose bezeichneten, Pseudooligosacchariden durch die Anzahl  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpfter Glucosereste, welche am reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Ende der Acarviosyl-Untereinheit gebunden sind (**Abb. 1.2.1**).

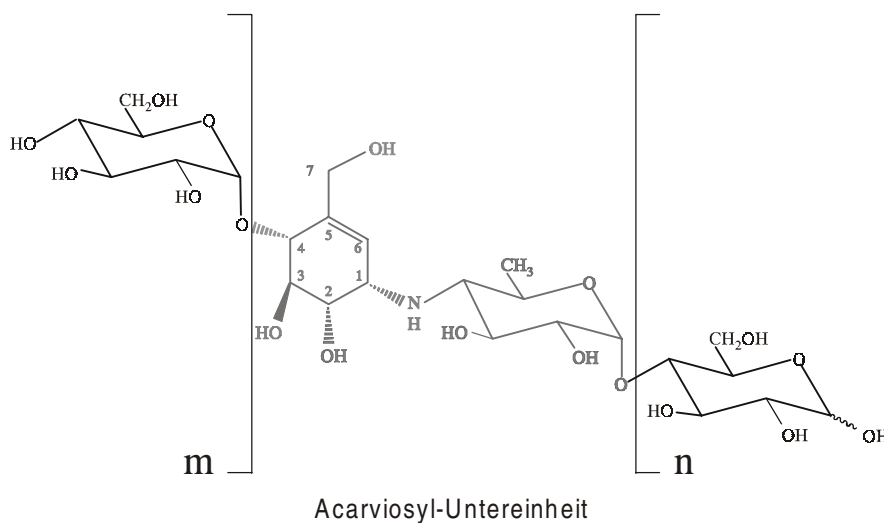
Die Anzahl der Glucosereste variiert in Abhängigkeit von den im Kulturmedium vorhandenen Kohlenstoffquellen. Mit Maltose und Glucose werden überwiegend niedere Homologe (Komponente 2 oder Acarbose; **Abb. 1.2.1**) gebildet. Hingegen nimmt durch die Zugabe geringer Mengen von Stärke in das Kulturmedium der Anteil höhermolekularer Komponenten zu (FROMMER et al., 1979; SCHMIDT et al., 1981).

Die inhibitorische Wirkung auf verschiedene  $\alpha$ -Glucosidasen verändert sich ebenfalls abhängig von der Summe der Glucosereste der Pseudooligosaccharide. Die niedermolekularen Homologen (Komponente 2 und Acarbose) inhibieren vorwiegend Maltasen und Disaccharidasen, wogegen die höhermolekularen Homologen wesentlich effizienter  $\alpha$ -Amylasen hemmen (FROMMER et al., 1979).

Essentiell für die inhibitorische Wirkung auf  $\alpha$ -Glucosidasen ist die Acarviosyl-Untereinheit der Pseudooligosaccharide. Die N-glycosidische Bindung der Acarviosyl-Untereinheit kann, im Gegensatz zu  $\alpha$ -1,4-O-glycosidischen Bindungen, durch das aktive Zentrum der  $\alpha$ -Glucosidasen nicht hydrolysiert werden (HEIKER et al., 1981; NAHOUM et al., 2000). Dabei soll die Inhibierung der  $\alpha$ -Glucosidasen auf einem kompetitiven Mechanismus basieren, der zunächst an dem Saccharase-Isomaltase Komplex aus dem Dünndarm von Ratten untersucht worden war (SIGRIST et al. 1975; HANZOET et al., 1981; SAMULITIS et al., 1987). So konnte auch gezeigt werden, dass Acarbose im Vergleich zu Saccharose eine ca. 15000 fach höhere Affinität zu einer Saccharase aufwies und mit dieser einen sehr stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex ausbildete (CASPARY UND GRAF, 1979).

Kristallographische Untersuchungen von Acarbose/ $\alpha$ -Amylase-Komplexen zeigten jedoch, dass Acarbose erst durch die Amylasen zu effizienteren Inhibitoren umgesetzt wird. So wird z. B. durch die Pankreas  $\alpha$ -Amylase des Menschen die Acarviosylglucose auf das nicht-reduzierende Ende eines zweiten Acarbosemoleküls übertragen (NAHOUM et al., 2000). Wohingegen die maltogene  $\alpha$ -Amylase Novamyl Maltose auf das nicht-reduzierende der Acarbose überträgt (DAUTER et al., 1999). Erst diese Reaktionsprodukte führten zu einer für die inhibitorische Wirkung notwendigen Positionierung der N-glycosidischen Bindung der Acarviose im aktiven Zentrum der  $\alpha$ -Glucosidasen (DAUTER et al., 1999; NAHOUM et al., 2000).

A.



B.

Name	m	n
Komponente 2	0	1
Komponente 3 (Acarbose; BAY g5421)	0	2
Komponente 4 <sup>a</sup>	1	2
Komponente 5 <sup>a</sup>	2	2
Komponente 6 <sup>a</sup>	3	2

(a) Hauptbestandteile des Isomerengemisches  $m+n=3, 4$  oder  $5$ .

#### Abb.1.2.1: Struktur der Acarbose und homologer Verbindungen.

Angegeben ist die Struktur der von *Actinoplanes* sp. produzierten Pseudooligosaccharide (A) sowie die Zusammensetzung ausgewählter homologer Verbindungen (B). m und n geben die Anzahl der Glucosereste an. Verbindungen mit  $m+n$  zwischen 1 und 30 wurden beschrieben (FROMMER et al., 1979).

Neben den sich nur in der Anzahl der Glucosereste unterscheidenden Homologen der Acarbose werden von *Actinoplanes* sp. auch noch weitere Verbindungen mit der charakteristischen Acarviosyl-Untereinheit produziert (**Tab. 1.2.1**; HEMKER, 1997). Diese Substanzen werden auch als Nebenkompenten der Acarbose bezeichnet und teilweise erst während der Aufreinigung von Acarbose gebildet (z. B. Komponente A; HEMKER, 1997).

**Tab. 1.2.1:** Struktur ausgewählter Nebenkompenten der Acarbose.

Name	Struktur <sup>a</sup>
Acarbose (Komponente 3)	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc
Komponente A	Ac-1,4-Glc-1,4- <b>Fru</b>
Komponente B	Ac-1,4-Glc-1,4- <b>(1-<i>epi</i>-Valienol)</b>
Komponente C	Ac-1,4-Glc-1, <b>1-Glc</b>
Komponente D	Ac-1,4-Glc-1,4- <b>Man</b>
Komponente 4b	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc-1,4-Glc
Komponente 4a	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc-1,4- <b>Fru</b>
Komponente 4c	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc-1, <b>1-Glc</b>

(a). Die Unterschiede zu Acarbose bzw. Komponente 4b sind fett hervorgehoben. Als Position 1 der Acarviosyl-Untereinheit wird die Position C-1 der 4,6-Didesoxyglucose bezeichnet. Ac, Acarviose; Fru, Fructose; Glc, Glucose; Man, Mannose.

Der  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Acarbose wird seit 1990 auch zur oralen Therapie des Diabetes mellitus Typ II in der Humanmedizin verwendet (BISCHOFF et al., 1990). Die Inhibierung der  $\alpha$ -Glucosidasen des Darms führt zu einer zeitlich verzögerten Freisetzung von Monosacchariden, vor allem von Glucose, aus den langkettigen Kohlenhydraten der Nahrung und somit zu einer verringerten Resorption von Monosacchariden. Hierdurch kommt es zu einer deutlichen Reduzierung des postprandialen Blutzucker- und Seruminsulinspiegels. Obwohl der Stärkeabbau durch  $\alpha$ -Amylasen von Acarbose *in vitro* nur schwach gehemmt wird, konnte dieser Effekt auch bei paralleler Gabe von Acarbose und Stärke-haltiger Nahrung nachgewiesen werden. Eine Metabolisierung der Acarbose findet hingegen nicht statt (PULS AND KEUP, 1973; PULS AND KEUP, 1974; PULS et al., 1977).

Aber auch in der biologischen Grundlagenforschung wird Acarbose eingesetzt. In der Proteinkristallographie dient Acarbose als Substratanalogon für  $\alpha$ -Glucoside und wird häufig zur Aufklärung der räumlichen Struktur des aktiven Zentrums von  $\alpha$ -Amylasen eingesetzt (DAUTER et al., 1999; NAHOUM et al., 2000).

Neben *Actinoplanes* sp. bilden eine Reihe von Streptomyceten Sekundämetabolite, die Derivate des charakteristischen C7-Cyclitols Valienamin beinhalten. Zu diesen Substanzen gehören die Amylostatine, Adiposine, Oligostatine, Trestatine und Validamycine (MUARO AND OHYAMA, 1975; NAMIKI et al., 1982a+b; OMOTO et al., 1981; YOKOSE et al., 1983). Die Validamycine wirken im Gegensatz zu den übrigen Verbindungen nicht als  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitoren, sondern sind effektive Trehalase-Inhibitoren und werden als Fungicide eingesetzt.

### 1.3 Regulation des Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp.

Bisher liegen nur wenige Informationen über die Regulation der Acarbose-Biosynthese in *Actinoplanes* sp. vor; jedoch scheinen die im Medium vorhandenen C-Quellen dabei eine Schlüsselfunktion einzunehmen. So konnte die Produktion der Acarviosyltransferase AcbD sowie der  $\alpha$ -Amylase AcbE durch Maltose und/oder Maltotriose induziert werden und war nicht durch Zugabe von Glucose reprimierbar (STRATMANN, 1997). Für eine positive Regulation durch einen Transkriptionsaktivator sprach die Identifikation einer „Maltose-Box“ upstream von *acbD*, wie sie auch für MalT abhängige Promotoren in *E. coli* beschrieben worden ist (STRATMANN, 1997; BOOS AND SHUMAN, 1998). In diesem Zusammenhang wurde auch diskutiert, dass die, in den intercistronischen Regionen zwischen *acbA/acbB* und *acbD/acbE* sowie upstream von *acbV* identifizierten, konservierten Hexanukleotide (Konsensussequenz C/ATTGCT/A) mögliche Erkennungssequenzen für einen positiven Transkriptionsregulator darstellen (STRATMANN, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Hinweise für eine Beteiligung dieser auch in *S. coelicolor* konservierten Hexanukleotidsequenz an der Substratinduktion des Maltose-Operons durch den Regulator MalR wurden bereits beschrieben (VAN WEZEL et al., 1997).

#### 1.4 Der Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp.

Der Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp. ist bisher nur partiell bekannt, basierend auf Fütterungsexperimenten, molekularbiologischen und enzymologischen Untersuchungen konnten jedoch erste Erkenntnisse gewonnen werden. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde sowohl der Ursprung der Maltosyl-Untereinheit und die Biosynthese der charakteristischen Acarviosyl-Untereinheit analysiert.

Erste Erkenntnisse über den Ursprung der Maltosyl-Untereinheit konnten durch Fütterungsexperimente mit *Actinoplanes* sp. erlangt werden. In Einbaustudien mit Isotopenmarkierter Glucose, Maltose und Maltotriose wurde nachgewiesen, dass Glucose nur in die 4-Amino-4,6-dideoxy-D-glucose der Acarviose (**Abb.** 1.2.1) und nicht in die Maltosyl-Untereinheit eingebaut wird (VAN HÜLST, 1985; MAUL et al., 1989; LEE et al., 1997). Diese scheint direkt aus freier Maltose und/oder Maltotriose gebildet zu werden (LEE et al., 1997). Im Fall der Maltotriose erfolgt der Einbau auf zwei alternativen Stoffwechselwegen: (1) Nach Abspaltung von Glucose an dem nicht-reduzierenden Ende der Maltotriose wird die resultierende Maltose mit der Acarviose verknüpft. Basierend auf diesem Mechanismus werden 60% der Acarbose gebildet. (2) Die restlichen 40% entstehen durch Verknüpfung von Maltotriose mit der Acarviose und anschließender Abspaltung von Glucose an dem reduzierenden Ende des Maltotriosyl-Restes (LEE et al., 1997). Unklar ist, ob der Einbau in die Acarbose intra- und/oder extrazellulär erfolgt. Wenngleich bisher keine Erkenntnisse über die an diesen Reaktionen beteiligten Enzymen vorliegen, ist eine Beteiligung der extrazellulären Acarviosyltransferase AcbD denkbar (HEMKER, 1997). Unter anderem konnte der AcbD-katalysierte Transfer der Acarviosyl-Untereinheit der Acarbose auf Maltotriose und Maltose *in vitro* gezeigt werden (HEMKER et al., 2001). Die Abspaltung von Glucose kann mit dieser Reaktion jedoch nicht erklärt werden.

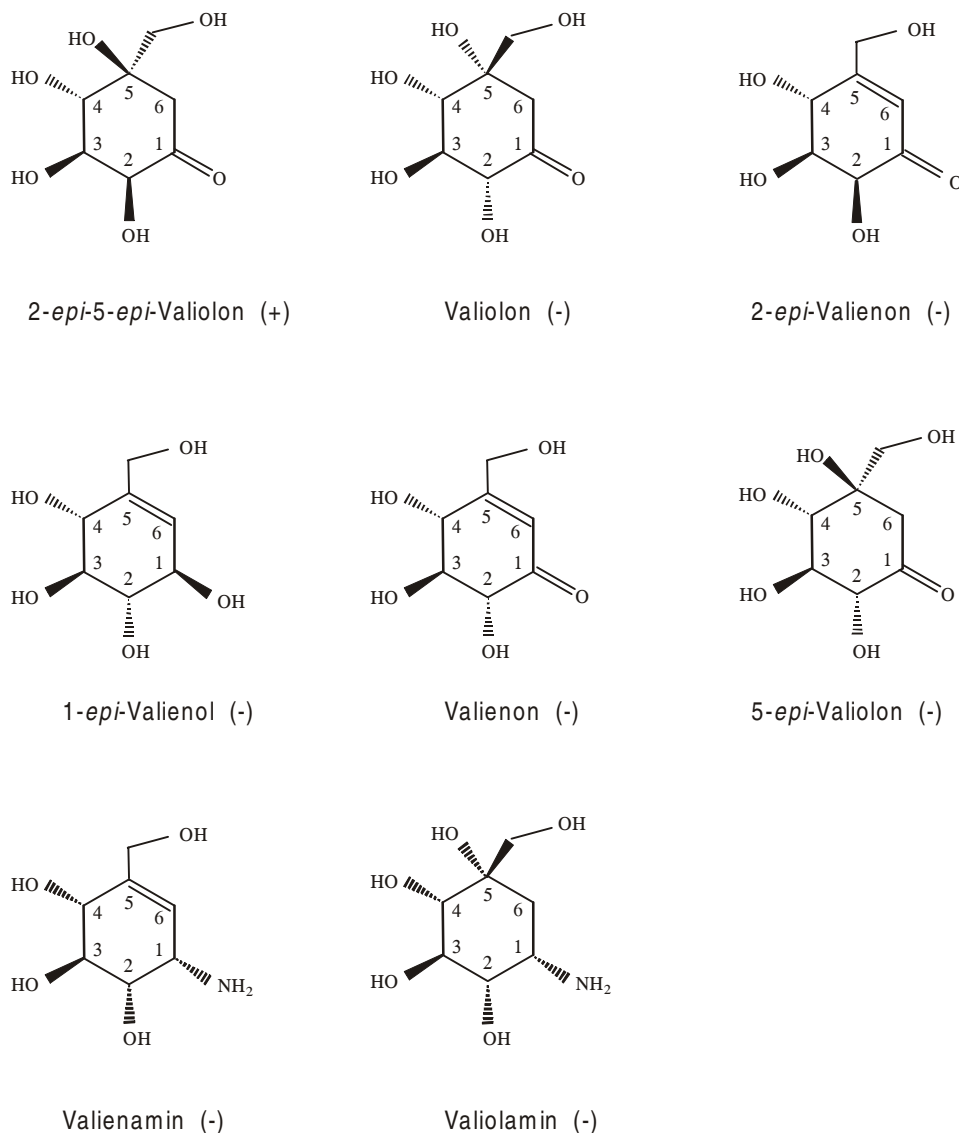
Eine alternatives Modell des Maltose-Einbaus stützt sich auf die Identifikation des Gens *acbQ* innerhalb des partiell bekannten *acb*-Genclusters, dessen Genprodukt mit Amylomaltasen verwandt ist (STRATMANN, 1997). Dabei könnte die Maltose bzw. Maltotriose intrazellulär auf das reduzierende Ende der Acarviose übertragen und gegebenenfalls ein Glucoserest der Maltotriose abgespalten werden. Diese Reaktion wäre vergleichbar mit der Metabolisierung von Maltooligosacchariden durch die Amylomaltase MalQ aus *E. coli* (BOOS AND SHUMAN, 1998; STRATMANN, 1997). Allerdings kann die alternative Abspaltung von Glucose vom reduzierenden oder nicht-reduzierenden Ende der Maltotriose mit dieser Hypothese nicht erklärt werden.

Von besonderem Interesse war die Biosynthese der zentralen, aus dem C-7 Cyclitol Valienamin und einer 6-Desoxyglucose bestehenden Acarviosyl-Untereinheit (**Kap.** 1.2). Die Biosynthese der 4-Amino-4,6-dideoxy-D-glucose entspricht wahrscheinlich dem für diese Substanzgruppe typischen dTDP-Hexose-Weg (LIU AND THORSON, 1994; KIRSCHNING et al., 1997; PIEPERSBERG AND DISTLER, 1997). Ausgehend von Glucose-1-phosphat erfolgt eine Aktivierung durch eine dTDP-D-Glucose-Synthase (AcbA) und anschließend die Dehydratisierung zu dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose katalysiert durch die dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase AcbB (STRATMANN et al., 1999). Für diese Vermutung sprach, neben dem Einbau der Isotopen-markierten Glucose in die Acarbose, die Identifikation der

korrespondierenden Gene *acbA* bzw. *acbB* innerhalb des *acb*-Genclusters und der Nachweis der Dehydratase-Reaktion in *Actinoplanes* sp. (**Kap.** 1.5; GOEKE, 1986; STRATMANN, 1999). Auch die zeitliche Korrelation dieser Enzymaktivität mit der Acarbose-Produktion in *Actinoplanes* sp. sprach für diesen Syntheseweg (GOEKE, 1986; LIEDERT, 1991). Als abschließender Schritt in der Biosynthese der 6-Desoxyhexose wurde die Transaminierung von dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose zu dTDP-4-Amino-4,6-didesoxy-D-glucose mit Glutamat als Aminodonor vorgeschlagen (LEE AND EGELKROUT, 1998; MAHMUD et al., 1999; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Diese Annahme wurde durch die Identifikation der Aminotransferase AcbV in *Actinoplanes* sp. SE50/110 gestützt (**Kap.** 1.5). Eine Transaminierung von dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose mit L-Glutamat als Aminodonor konnte mit der heterolog produzierten Aminotransferase AcbV bereits gezeigt werden (**Abb.** 1.4.2; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Hingegen ist die Transaminierung einer Vorstufe des C-7 Cyclitols der Acarviose auszuschließen, da bei Fütterungsexperimenten weder Valienamin noch das potentielle Biosyntheseintermediat Valiolamin von *Actinoplanes* sp. in Acarbose eingebaut wurden (**Abb.** 1.4.1; MAHMUD et al., 1999). Auch die Transaminierung von 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon, einer Vorstufe des C-7 Cyclitols der Acarbose und anschließende Epimerisierung an Position C-2 sowie Dehydratisierung zur Einführung der  $\Delta$ -5,6-Doppelbindung wurde aufgrund mechanistischer Betrachtungen von MAHMUD verworfen (MAHMUD et al., 1999; **Abb.** 1.2.1 und **Abb.** 1.4.1).

Eine Schlüsselreaktion in der Biosynthese des C-7 Cyclitols Valienamin ist die AcbC-katalysierte Zyklisierung von *sedo*-Heptulose-7-phosphat zu 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon (**Abb.** 1.4.2; STRATMANN et al., 1999). Dabei wurde aufgrund der signifikanten Übereinstimmungen in der Primärstruktur von AcbC und bakteriellen Dehydroquinate-Synthasen ein vergleichbarer Reaktionsmechanismus der von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen postuliert (STRATMANN et al., 1999). Weiterhin bestätigte die Inkorporation von deuteriertem 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon in die Acarbose durch *Actinoplanes* sp. die Vermutung, dass es sich um eine Vorstufe der Acarbose handelt (**Abb.** 1.4.1; MAHMUD et al., 1999). Unklar ist bisher jedoch, wann die Epimerisierung an Position C-2 sowie die Dehydratisierung zur Einführung der  $\Delta$ -5,6-Doppelbindung erfolgen. Fütterungsversuche ergaben keine Inkorporation der potentiellen Biosyntheseintermediate Valiolon, 5-*epi*-Valiolon, Valienon, 2-*epi*-Valienon und 1-*epi*-Valienol in die Acarbose durch *Actinoplanes* sp. (**Abb.** 1.4.1; MAHMUD et al., 1999; DONG, et al., 2001).





**Abb. 1.4.1:** Struktur der bisher in Fütterungsexperimenten analysierten Cyclitole. (+) erfolgreicher Einbau in Acarbose. (-) kein Einbau in Acarbose (MAHMUD et al., 1999; DONG et al., 2001).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass 2-epi-5-epi-Valiolon direkt mit der dTDP-4-Amino-4,6-dideoxy-D-glucose unter Ausbildung einer Schiff'schen Base kondensiert (MAHMUD et al., 1999). Diese soll, nach Epimerisierung an Position C-2 und Dehydratisierung zur Einführung der Doppelbindung zwischen der Position C-5 und C-6 des Cyclitols, zu der charakteristischen gesättigten C-N-C Bindung reduziert werden. Dabei sollen alle Reaktionen durch einen noch unbekanntem Enzymkomplex katalysiert werden und somit keine weiteren, freien Vorstufen des Valienamins auftreten (Abb. 1.4.2; MAHMUD et al., 1999). Hinweise auf einen derartigen Enzymkomplex konnten durch die Analyse des bisher beschriebenen Acarbose-Biosynthesegenclusters jedoch nicht gefunden werden (Kap. 1.5; STRATMANN, 1997; STRATMANN et al., 1999; HEMKER et al., 2001; DIAZ-GUARDAMINO, 2000; M. JARLING, persönliche Mitteilung).

Im Widerspruch zu diesem Biosynthesemodell stand auch das Auftreten von 1-*epi*-Valienol, einer potentiellen Vorstufe der Acarbose, zum Beginn der Acarbose-Biosynthese in *Actinoplanes* sp. (MAHMUD et al., 1999). Der frühe Zeitpunkt sprach dafür, dass es sich um eine Vorstufe des Valienamins und nicht um ein Abbauprodukt der Acarbose handelte. Außerdem liegen keine Informationen über die Umsetzung der, aus der Kondensation und den nachfolgenden Reaktionen resultierenden, dTDP-Acarviose zu Acarbose vor (MAHMUD et al., 1999).

Ebenfalls denkbar wäre ein Export von dTDP-Acarviose durch einen membrangebundenen Polyprenylcarrier und anschließenden Transfer der Acarviose auf freie Maltose, da Bacitracin und Tunicamycin die Acarbose-Produktion hemmten (SCHAPER, 1991). Dieser Transport wäre vergleichbar mit der Biosynthese des Mureins und der LPS-Antigene in Bakterien (HÖLTJE AND SCHWARZ, 1985; LENNARZ UND SCHER, 1972; RAETZ, 1996). Genetische und/oder enzymologische Belege für die Existenz eines solchen Transportmechanismus liegen jedoch ebenfalls nicht vor. Alternativ könnte dTDP-Acarviose auch durch einen spezifischen ABC-Transporter exportiert und im Kulturüberstand zu Acarbose umgesetzt werden. Ein ähnlicher Export-Mechanismus wurde schon für verschiedene Antibiotika, z. B. für den Export von Doxorubicin durch *S. peucetius*, beschrieben (GUIFOILE AND HUTCHINSON, 1991). Die bei beiden Alternativen zu fördernde Kondensation von Acarviose und Maltose könnte extrazellulär durch die Acarviosyltransferase AcbD katalysiert werden (HEMKER, 1997; HEMKER et al., 2001). Gegen beide Modelle spricht jedoch, dass weder dTDP-Acarviose noch freie Acarviose Membran-assoziiert und/oder im Kulturüberstand nachgewiesen wurden. Somit erscheint die intrazelluläre Biosynthese von Acarbose derzeit als plausibelste Alternative.

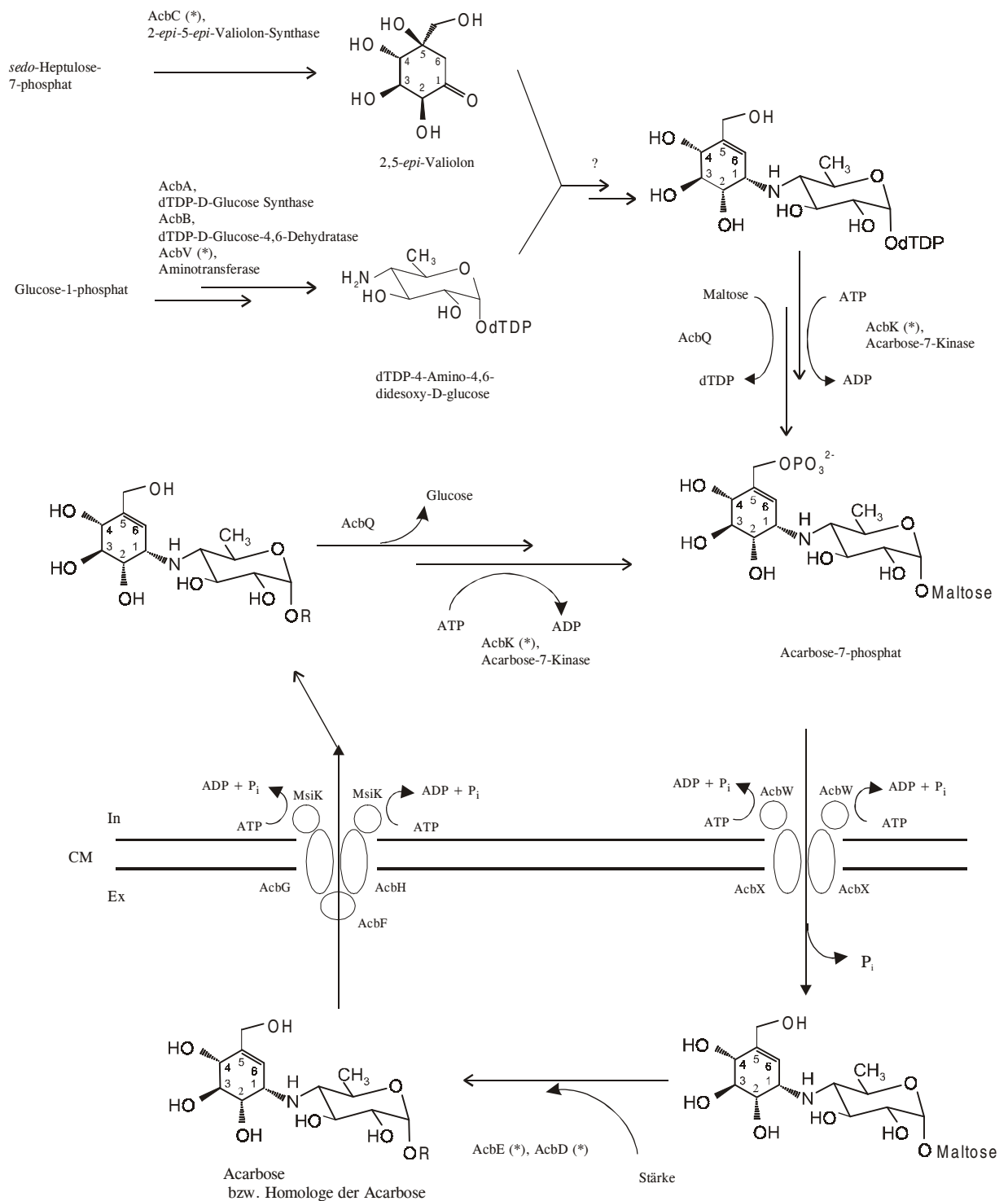
Aufgrund der Übereinstimmungen des Proteins AcbQ mit Amylomaltasen wurde vorgeschlagen, dass, möglicherweise unter Abspaltung von dTDP, Maltose AcbQ-katalysiert auf die Acarviose übertragen und somit Acarbose gebildet wird (**Abb. 1.4.2**; STRATMANN, 1997; M. JARLING, persönliche Mitteilung). Diese Reaktion soll ähnlich der Amylomaltase-Reaktion des Maltose-Stoffwechsels von *E. coli* ablaufen (BOOS AND SHUMAN, 1998; STRATMANN, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000).

Ein weiteres Indiz für die intrazelluläre Biosynthese von Acarbose war die Identifikation des intrazellulären Enzyms Acarbose-7-Kinase (AcbK), das Acarbose an der C-7 Position der Valienamin-Untereinheit phosphoryliert (**Abb. 1.4.2**; DREPPER AND PAPE, 1996; GOEKE et al., 1996) und dessen Gen im *acb*-Gencluster von *Actinoplanes* sp. SE50/110 liegt (**Kap. 1.5**; STRATMANN, 1997). Es wurde angenommen, dass Acarbose durch Phosphorylierung inaktiviert und so die Inhibierung intrazellulärer  $\alpha$ -Glucosidasen von *Actinoplanes* sp. verhindert wird (DREPPER AND PAPE, 1996). Gestützt wurde diese Hypothese durch die Charakterisierung einer Acarbose sensitiven, aber Acarbose-7-phosphat insensitiven, intrazellulären Maltase aus *Actinoplanes* sp. (DREPPER AND PAPE, 1996). In diesem Modell würde Acarbose oder Acarbose-7-phosphat durch einen spezifischen Transporter aus der Zelle transportiert. Das für ABC-Transporter typische ATP-Bindeprotein AcbW wurde als Bestandteil dieses Exporters und Beleg für eine intrazelluläre *de novo* Biosynthese der Acarbose interpretiert (**Abb. 1.4.2**; **Kap. 1.5**; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Ob Acarbose-7-

phosphat während des Exports oder erst im Kulturüberstand dephosphoryliert wird, ist bisher nicht bekannt (**Abb.** 1.4.2).

Weitgehend unbekannt ist auch die physiologische Bedeutung der Acarbose in *Actinoplanes* sp.. Die Beteiligung von extrazellulären sowie intrazellulären Proteinen am Acarbose-Metabolismus führte zu der Vermutung, dass Acarbose eine Art „Shuttle-Molekül“ darstellt, das den Import von prozessierten Oligosacchariden und somit deren Metabolisierung ermöglicht (**Abb.** 1.4.2; vgl. **Kap.** 4.6). In diesem Modell würde die Stärke durch die Acarbose-insensitive  $\alpha$ -Amylase AcbE zu kurzkettigen Maltodextrinen bzw. Maltose hydrolysiert (STRATMANN, 1997; STRATMANN et al. 1999). Die resultierenden Maltodextrine könnten anschließend, katalysiert durch die Acarviosyltransferase AcbD, auf die Acarviosyl-Untereinheit der Acarbose übertragen und die resultierende Acarbose bzw. höheren Homologen in die Zelle aufgenommen werden (STRATMANN, 1997; HEMKER et al., 2001). Allerdings kann mit dieser Reaktion die Biosynthese von Acarbose-Homologen mit Zuckerresten am nicht-reduzierenden Ende der Acarviosyl-Untereinheit nicht erklärt werden (**Abb.** 1.2.1). Als Acarbose-spezifisches Aufnahmesystem wurde der ABC-Importer AcbHGF vorgeschlagen, da die drei Proteine signifikante Übereinstimmungen mit Bindeprotein-abhängigen Kohlenhydrat-Importern aufwiesen (STRATMANN, 1997; M. JARLING, persönliche Mitteilung).

Nach Aufnahme der Acarbose bzw. Acarbose-Homologen würden diese dann, analog zur Acarbose-Biosynthese, durch die Acarbose-7-Kinase AcbK phosphoryliert und inaktiviert. Intrazellulär wurde eine Freisetzung der Glucosereste durch einen mit dem Maltose-Verwertungssystem von *E. coli* vergleichbaren Mechanismus vorgeschlagen (STRATMANN, 1997; BOOS AND SHUMAN, 1998). Gestützt wurde diese Hypothese durch die signifikanten Übereinstimmungen von AcbQ mit bakteriellen Amylomaltasen (STRATMANN, 1997; M. JARLING, persönliche Mitteilung). Das regenerierte Acarbose-7-phosphat würde schließlich wieder durch den postulierten ABC-Exporter AcbWX in den Kulturüberstand exportiert (DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Nach erfolgter Dephosphorylierung würde Acarbose dann wieder als Substrat für die Acarviosyltransferase AcbD und evtl. andere extrazelluläre Enzyme zur Verfügung stehen (**Abb.** 1.4.2).



**Abb. 1.4.2:** Modell des Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp. SE50/110.

Dargestellt ist das zu Beginn dieser Arbeit wahrscheinlichste Modell der *de novo* Biosynthese der Acarbose sowie ihre postulierte Funktion bei der Metabolisierung exogener Kohlenhydrate. Enzyme, deren Funktion bereits *in vitro* charakterisiert wurde, sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. R: Glucose oder Maltooligosaccharide; In: Intrazellulär; Ex: Extrazellulär; CM: Cytoplasmamembran.

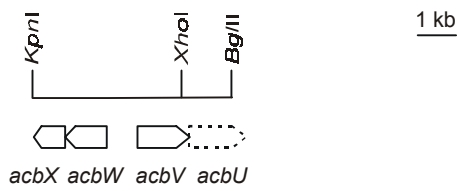
### 1.5 Das *acb*-Gencluster aus *Actinoplanes* sp. SE50/110

In bisherigen Arbeiten wurden bereits 22 Leserahmen analysiert, für die eine Beteiligung am Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp. bereits nachgewiesen oder vermutet wurde (**Tab.** 1.5.1; STRATMANN, 1997; STRATMAN et al., 1999; DIAZ-GUARDAMINO, 2000; HEMKER et al., 2001; JARLING, persönliche Mitteilung). Dabei befanden sich diese auf zwei unabhängig voneinander isolierten DNA-Fragmenten des Chromosoms von *Actinoplanes* sp. SE50/110 (**Abb.** 1.5.1). Es lagen keine Informationen darüber vor, ob diese beiden Bereiche zu einem durchgehenden Acarbose-Biosynthesegencluster (*acb*-Gencluster) gehören und in welchem Abstand sie zueinander auf dem Chromosom angeordnet sind.

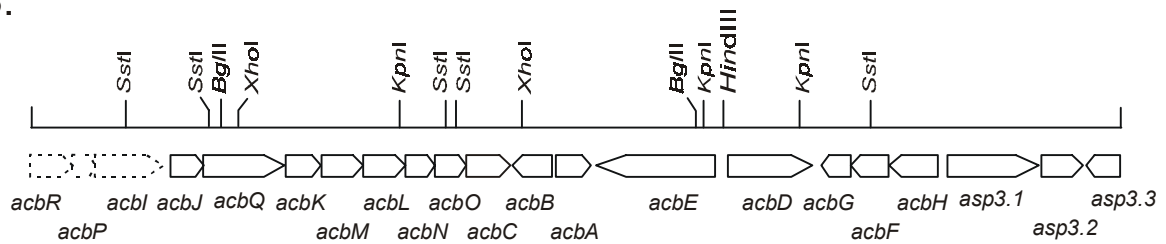
Der erste 17 kb umfassende DNA Abschnitt wurde durch DNA-Hybridisierungen mit dem Gen *strE* (dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase) aus *S. griseus* N2-3-11 identifiziert und sukzessive auf 21,8 kb erweitert (**Tab.** 1.5.1; STRATMANN, 1997; STRATMANN et al., 1999; HEMKER et al., 2001; M. JARLING, persönliche Mitteilung). Insgesamt konnten 21 Gene auf diesem DNA-Abschnitt identifiziert werden, wobei für 18 Gene eine Funktion innerhalb der Acarbose-Biosynthese vermutet wurde. Daher wurden sie als *acb*-Gencluster bezeichnet. Die Gene *acbK* und *acbD* konnten den beiden, bereits beschriebenen, Enzymen Acarbose-7-Phosphotransferase (AcbK) und Acarviosyltransferase (AcbD) zugeordnet werden (DREPPER AND PAPE, 1996; GOEKE et al., 1996; STRATMANN, 1997; HEMKER et al., 2001). Zusätzlich bestätigte die enzymologische Charakterisierung der 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon Synthase AcbC die Definition der Gene als Bestandteil des *acb*-Genclusters (STRATMAN, 1997; STRATMANN et al., 1999). Aufgrund ihrer postulierten Funktion erschien die Beteiligung der benachbarten, mit *asp* bezeichneten, Gene an der Acarbose-Biosynthese als unwahrscheinlich (**Abb.** 1.5.1 B). Sie wurden daher nicht mehr dem *acb*-Gencluster zugeordnet.

Die Identifizierung des Gens einer Aminotransferase in dem partiell analysierten Acarbose-Biosynthesegencluster von *S. glaucescens* GLA.O (DECKER, Hoechst Patent DE19622783) führte zu der Vermutung, dass ein homologes Gen auch in dem *acb*-Gencluster aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 vorhanden ist. Durch DNA-Hybridisierung mit dem Gen der Aminotransferase aus *S. glaucescens* GLA.O konnte das Aminotransferase-Gen *acbV* auf einem 5,12 kb *KpnI/BglII*-Fragment chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 lokalisiert werden (**Abb.** 1.5.1 A; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Neben dem Gen der Aminotransferase (*acbV*) wurden auf diesem Fragment auch noch die Gene *acbU*, *acbW* und *acbX* gefunden (**Tab.** 1.5.1; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Dabei wiesen die Aminotransferase aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *S. glaucescens* GLA.O 73 % identische Aminosäuren auf (DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Aufgrund dieser Übereinstimmungen und der experimentell nachgewiesenen, AcbV-katalysierten Transaminierung von dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose, wurden die Gene *acbUVWX* ebenfalls dem *acb*-Gencluster zugeordnet (DIAZ-GUARDAMINO, 2000).

A.



B.



**Abb. 1.5.1:** Schematische Darstellung der analysierten Bereiche des *acb*-Genclusters aus *Actinoplanes* sp. SE50/110.

Dargestellt sind die beiden vor Beginn dieser Arbeiten analysierten Bereiche des Chromosoms von *Actinoplanes* sp. SE50/110. Leserahmen, für die eine Funktion innerhalb der Acarbose-Biosynthese postuliert wurde sind mit *acb* bezeichnet. Sie bilden das hypothetische *acb*-Gencluster. Leserahmen für die nur partielle Sequenzinformationen zur Verfügung standen sind durch unterbrochene Linien markiert.

**Tab. 1.5.1** Analyisierte Leserahmen der *acb*-Gencluster Region aus *Actinoplanes* sp. SE50/110.

Gen	Postulierte Funktion des Genproduktes	Referenz
<i>acbX</i>	Membranprotein	1
<i>acbW</i>	ATP-Bindeprotein eines ABC-Transporters	1
<i>acbV</i>	Aminotransferase	1
<i>acbU</i>	unbekannt	1
<i>acbR</i>	unbekannt	6
<i>acbP</i>	unbekannt	6
<i>acbI</i>	unbekannt	6
<i>acbJ</i>	unbekannt	6
<i>acbQ</i>	Amylomaltase-ähnliche Funktion mit Acarbose als Substrat anstatt Maltodextrinen.	2, 6
<i>acbK</i>	Acarbose-7-Kinase	5, 7, 2
<i>acbM</i>	unbekannt	6
<i>acbL</i>	unbekannt	6
<i>acbN</i>	unbekannt	6
<i>acbO</i>	unbekannt	6
<i>acbC</i>	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -Valiolon Synthase	2
<i>acbB</i>	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase	2
<i>acbA</i>	dTDP-Glucosesynthase	2
<i>acbE</i>	$\alpha$ -Amylase	2
<i>acbD</i>	Acarviosyltransferase	4, 2
<i>acbG</i>	Membranprotein des ABC-Importers AcbHGF	2
<i>acbF</i>	Membranprotein des ABC-Importers AcbHGF	2, 6
<i>acbH</i>	Bindeprotein des ABC-Importers AcbHGF	6
<i>asp3.1</i>	Galactocerebrosidase	6
<i>asp3.2</i>	Xylanase	6
<i>asp3.3</i>	unbekannt	6

- (a) 1: DIAZ-GUARDAMINO, 2000; 2: STRATMANN, 1997; 3: STRATMANN et al., 1999; 4: HEMKER et al., 2001; 5: GOEKE et al., 1996, DREPPER AND PAPE, 1996; 6: M. JARLING, persönliche Mitteilung; 7: C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung

## 1.6 Ziele dieser Arbeit

Die Biosynthese von Acarbose in *Actinoplanes* sp. war zu Beginn dieser Arbeit nur lückenhaft verstanden. Einzelne Reaktionen konnte jedoch durch enzymologische Untersuchungen und Fütterungsexperimente mit potentiellen, Isotopen-markierten Vorstufen der Acarbose charakterisiert werden. Im Rahmen der bisherigen molekularbiologischen Untersuchungen wurden ebenfalls zwei unabhängig voneinander isolierte Bereiche des *acb*-Genclusters aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 beschrieben (**Kap.** 1.5).

Erstes Ziel dieser Arbeit war daher zu untersuchen, ob diese beiden Bereiche ein durchgehendes *acb*-Gencluster in *Actinoplanes* sp. SE50/110 bilden und in welchem Abstand sie voneinander im Chromosom angeordnet sind. In diesem Zusammenhang sollten weitere potentielle Gene des *acb*-Genclusters identifiziert und basierend auf den postulierten Enzymfunktionen ein erweitertes Modell der Acarbose-Biosynthese erarbeitet werden. Falls möglich sollte ein rekombinanter Phage aus einer vorhandenen GEM12-Phagenbank genomischer DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 isoliert werden, der den DNA-Bereich zwischen den zwei bisher beschriebenen Teilbereichen des *acb*-Genclusters abdeckt (M. JARLING, persönliche Mitteilung).

Zweites Ziel war es, den für die Acarbose-Biosynthese notwendigen Genbestand des *acb*-Genclusters festzulegen. Ein limitierender Faktor war, dass die Konstruktion von Gen-Deletionsmutanten in *Actinoplanes* sp. SE50/110 nicht durchführbar war, da kein etabliertes System zur Transformation dieses Stamms zur Verfügung stand. Somit war es nicht möglich durch die Deletion eines Gens zu überprüfen, ob es essentiell für die Acarbose-Biosynthese ist. Es sollten daher alle Gene des postulierten *acb*-Genclusters in dem heterologen Wirtstamm *S. lividans* 66 TK23 exprimiert und die erwartete Acarbose-Biosynthese nachgewiesen werden. Für dieses Vorgehen sollte eine Cosmid-Bank genomischer DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 konstruiert und ein für die heterologe Expression geeignetes rekombinantes Cosmid isoliert werden. Um das gesamte *acb*-Gencluster in den heterologen Wirtstamm *S. lividans* 66 TK23 übertragen zu können, wurde eine durchschnittliche Insertgröße der rekombinanten Cosmide zwischen 30 und 40 kb angestrebt.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und GEM12-Phagen

Tab. 2.1.1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Phänotyp, Genotyp <sup>a</sup>	Referenz
<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	Acarbose-Produzent, <i>acb</i> -Gencluster	Stammsammlung Chem. Mikrobiologie, BUGH Wuppertal
<i>Streptomyces lividans</i> 66 TK23	<i>spc-1</i>	John Innes Institute; KIESER et al., 2000
<i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6	<i>S. lividans</i> 66 TK23 transformiert mit pHTWCos6; <i>acb</i> -Gencluster, <i>asp3.1</i> , <i>asp3.2</i> , <i>aac(3)IV</i>	diese Arbeit
<i>S. lividans</i> 66 TK23 pOJ446	<i>S. lividans</i> 66 TK23; transformiert mit pOJ446; <i>aac(3)IV</i>	diese Arbeit
<i>S. lividans</i> 66 1326 pHTWCos6	<i>S. lividans</i> 66 1326 transformiert mit pHTWCos6; <i>acb</i> -Gencluster, <i>asp3.1</i> , <i>asp3.2</i> , <i>aac(3)IV</i>	A. STRATMANN, persönliche Mitteilung
<i>S. lividans</i> 66 1326 pCKM	<i>S. lividans</i> 66 1326 transformiert mit pCKM; <i>acbK</i> , <i>acbM</i> , <i>tsr</i>	C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , $\phi$ 80d, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	HANAHAH, 1983
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>f</sup> $\Delta$ M15, Tn10]	Stratagene (Niederlande)
<i>E. coli</i> LE392	<i>hsdR514</i> , <i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>lacY1</i> or $\Delta$ ( <i>lacZY</i> )6, <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>metB1</i> , <i>trpR55</i>	Promega, Mannheim

(a) relevante Merkmale sind angegeben. Für die Beschreibung der Plasmide pHTWCos6 und pOJ446 siehe Tab. 2.1.3.

Tab. 2.1.2: Rekombinante GEM12-Phagen

Rekombinante GEM12-Phagen	Beschreibung	Referenz
<i>GEM12-Phagenbank</i>	GEM12-Phagenbank genomischer DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	M. JARLING, persönliche Mitteilung
Φ102	GEM12 Derivat der Phagenbank genomischer DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	M. JARLING, persönliche Mitteilung
Φ52	20,1 kb chromosomale DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; <i>acbI<sup>p</sup></i> , <i>acbP</i> , <i>acbR</i> , <i>acbS</i> , <i>acbU</i> , <i>acbV</i> , <i>acbW</i> , <i>acbX</i> , <i>acbY</i> , <i>acbZ</i> , <i>asp52.1</i> , <i>aps52.2</i> , <i>asp52.3<sup>b</sup></i>	M. JARLING, persönliche Mitteilung; diese Arbeit

- (a) Die bereits identifizierten Gene sind angegeben (vgl. **Kap.** 3.5)  
 (b) Diese Gene sind auf dem Insert des Phagen Φ52 nur partiell vorhanden.

Tab. 2.1.3: Verwendete Plasmide

Plasmide	Charakterisierung <sup>a</sup>	Referenz
pUC57	pUC19-Derivat; <i>lacZ'</i> , <i>bla</i> , <i>ori</i> pMB1	Fermentas (St. Leon-Rot)
pUCPU21	<i>lacZ'</i> , <i>bla</i> , <i>ori</i> ColE1	U. WEHMEIER, persönliche Mitteilung
pUCBM21	<i>lacZ'</i> , <i>bla</i> , <i>ori</i> ColE1	VIEIRA AND MESSING, 1982
pBluescript KS II (-)	<i>lacZ'</i> , <i>bla</i> , <i>ori</i> ColE1	Stratagene (Niederlande)
pBluescrip SKII (+)	<i>lacZ'</i> , <i>bla</i> , <i>ori</i> ColE1	Stratagene (Niederlande)
pCR4Blunt-Topo	<i>lacZ'</i> <i>ccdb</i> , <i>ori</i> pUC, <i>bla</i> , <i>neo</i>	Invitrogen (Niederlande)
pPCR-Script Amp SK(+)	<i>ori</i> ColE1, <i>lacZ'</i> , <i>bla</i>	Stratagene (Niederlande)
pUWL218	<i>tsr</i> , <i>bla</i> , <i>ori</i> pUC18, <i>ori</i> pIJ101	WEHMEIER, 1995
pOJ446	<i>aac(3)IV</i> , <i>oriT</i> RK2, <i>ori</i> SCP2*	BIERMAN et al., 1992
p54S5	ca. 3,3 kb <i>SstI</i> -Fragment aus dem Phagen Φ54 in pUC18	M. JARLING, persönliche Mitteilung
pAS5/7	1,2 kb <i>PstI/SstI</i> -Fragment in pUC18/ <i>PstI/SstI</i>	STRATMANN, 1997
pMD418.2	2,2 kb <i>BamHI</i> -Fragment in pUC18; <i>acbV</i>	DIARZ-GUARDAMINO, 1997
pAS8/5	1,5 kb PCR-Fragment in pUC18 ( <i>acbC</i> -Gen)	STRATMANN, 1997
pHTW200	12 kB <i>SstI</i> -Fragment aus dem Phagen Φ52 in pUC57 / <i>SstI</i>	diese Arbeit
pHTW201	5,4 kB <i>SstI</i> -Fragment aus dem Phagen Φ52 in pUC57 / <i>SstI</i>	diese Arbeit
pHTW203	2,7 kB <i>SstI</i> -Fragment aus dem Phagen Φ52 in pUC57 / <i>SstI</i>	diese Arbeit
pHTW204	Religation des <i>KpnI</i> -hydrolysierten Plasmids pHTW200;	diese Arbeit

Fortsetzung

Fortsetzung Tab. 2.1.3: Verwendete Plasmide

Plasmide	Charakterisierung <sup>a</sup>	Referenz
pHTW204SRE	<i>SalI</i> -Religand von pHTW204	diese Arbeit
pHTW204_SF-I	1,6 kb <i>SalI</i> -Fragment aus pHTW204 in pUC57 / <i>SalI</i>	diese Arbeit
pHTW206	6,8 kB <i>KpnI</i> -Fragment aus pHTW200 in pUC57 / <i>KpnI</i>	diese Arbeit
pHTW207	3,2 kB <i>KpnI</i> -Fragment aus pHTW200 in pUC57 / <i>KpnI</i>	diese Arbeit
pHTW208	5,1 kB <i>KpnI/BglII</i> Fragment aus pHTW206 in pUC57 / <i>KpnI/BamHI</i>	diese Arbeit
pHTW209	1,7 kB <i>BglII/KpnI</i> Fragment aus pHTW206 in pUC57 / <i>KpnI/BamHI</i>	diese Arbeit
pHTW206/p1.5A	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p1.5A	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p1.6	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p1.7	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p2.5	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p2.8	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p4.2	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p3.6	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p5.1	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p5.2	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p5.6	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p5.3	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p4.3	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p3.1	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p3.5	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p2.4	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p3.3	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p1.5A	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p3.7	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p4.4	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p4.5	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p4.8	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p5.5	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p5.7	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit
pHTW206/p5.8	lineare Verkürzung des Plasmids pHTW206 <sup>b</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung

Fortsetzung **Tab. 2.1.3:** Verwendete Plasmide

Plasmide	Charakterisierung <sup>a</sup>	Referenz
pHTW210	4,8 kb <i>XhoI</i> -Fragment aus pHTW206 in pBluescript SK II (+) / <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pHTW214	12 kb <i>SstI</i> Insert aus pHTW200 in pUWL218 / <i>SstI</i>	diese Arbeit
pHTW218	1,28 kb <i>XhoI</i> -Fragment aus pHTWCos6 in pBluescript SK II (+) / <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pHTW219	3,38 kb <i>XhoI</i> -Fragment aus pHTWCos6 in pBluescript SK II (+) / <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pHTW 222	4,8 kb <i>XhoI</i> -Fragment aus pHTWCos6 in pBluescript SK II (+) / <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pHTW 224	<i>SphI</i> -Religand von pHTW208	diese Arbeit
pHTW 225	1,9 kb - <i>SphI</i> -Fragment aus pHTW208 in pUC57 / <i>SphI</i>	diese Arbeit
pHTW226	1,3 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pHTW208 in pUC57 / <i>SphI</i>	diese Arbeit
pHTW227	0,5 kb <i>SphI</i> -Fragment aus pHTW 208 in pUC57 / <i>SphI</i>	diese Arbeit
pHTW229	1,68 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pHTW201 in pUC57 / <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pHTW228	<i>BamHI</i> Religand von pHTW201	diese Arbeit
pHTW239.2	0,53 kb PCR Fragment in pPCR-Script Amp SK(+) (Primer HTS63 und HTS79, Template pHTWCos6 ; vgl. <b>Kap.</b> 2.9.11)	diese Arbeit
pHTW240	0,59 kb PCR Fragment in pCR4Blunt-Topo (Primer HTS67 und HTS73; Template, genomische DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; vgl. <b>Kap.</b> 2.9.11)	diese Arbeit
pHTW241	1,4 kb <i>BglII/XbaI</i> -Fragment aus pHTWCos6 in pBluescript KS II (-) / <i>BamHI/XbaI</i>	diese Arbeit
pHTW242	2,4 kb <i>BglII/SpeI</i> -Fragment aus pHTWCos6 in pUCBM21 / <i>BamHI/XbaI</i>	diese Arbeit

Fortsetzung

Fortsetzung **Tab. 2.1.3:** Verwendete Plasmide

Plasmide	Charakterisierung <sup>a</sup>	Referenz
ACHTW 1-30	Cosmidbank genomischer DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; jeweils eine Mikrotiterplatte mit 96 rekombinanten <i>E. coli</i> XL1-Blue Stämmen; (vgl. <b>Kap. 2.19.12</b> )	diese Arbeit
pHTWCos1	30-40 kb genomische DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; Bestandteil der Cosmidbank ACHTW1-30.	diese Arbeit
pHTWCos2	30-40 kb genomische DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; Bestandteil der Cosmidbank ACHTW1-30	diese Arbeit
pHTWCos3	30-40 kb genomische DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; Bestandteil der Cosmidbank ACHTW1-30	diese Arbeit
pHTWCos4	30-40 kb genomische DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; Bestandteil der Cosmidbank ACHTW1-30	diese Arbeit
pHTWCos5	30-40 kb genomische DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; Bestandteil der Cosmidbank ACHTW1-30	diese Arbeit
pHTWCos6	41 kb genomische DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110. Bestandteil der Cosmidbank ACHTW1-30	diese Arbeit
pHTWCos7	30-40 kb genomische DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; Bestandteil der Cosmidbank ACHTW1-30	diese Arbeit
pHTWCos8	30-40 kb genomische DNA von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110; Bestandteil der Cosmidbank ACHTW1-30	diese Arbeit

(a) Relevante Eigenschaften sind angegeben. *tsr*: Thiostrepton Resistenzgen

(b) Die linearen Verkürzungen wurden mit dem „Nested Deletion Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ausgehend von der *Xba*I Site eingeführt.

## 2.2 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

**Tab 2.2.1:** Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung <sup>a</sup>	Sequenz	Referenz
HTS1	CAGTGGCTGCTGTTGCTGC	diese Arbeit
HTS4	GCAGATCGAGGTACTCGTGC	diese Arbeit
HTS6	ATCGCCGACCCGCTCTTC	diese Arbeit
HTS7	TGACCGGCGAACTGGACC	diese Arbeit
HTS9	GATGCTGCTGTCCGGTTATG	diese Arbeit
HTS10	AGCACATGCACATCATCGAG	diese Arbeit
HTS11	TGTGGGGCGAACGGTTCC	diese Arbeit
HTS12	ATCAGGTCGCACTTCGGTG	diese Arbeit
HTS13	CACACCGTGGCGATGAGC	diese Arbeit
HTS14	CCGTTTCGCGCAGCTGTTCCG	diese Arbeit
HTS16	GGCCAGCTTCATCGTGCGC	diese Arbeit
HTS19	GTTCCAGGGCCTGATCGAC	diese Arbeit
HTS25	TTGGCGAGGGCTTCAAGG	diese Arbeit
HTS26	GTTGCTCATCGGGGCGAT	diese Arbeit
HTS28	CATCTGCATGATCCGGCGG	diese Arbeit
HTS29	AAGCAGTGGAAATTCGGCACC	diese Arbeit
HTS31	GTCGGGCAAGACCAGTTCG	diese Arbeit
HTS33	ATGTGACGACCTCGCGCG	diese Arbeit
HTS34	TAGGTAGGCGGAGAACGCG	diese Arbeit
HTS35	CGGCGAAGTCGATCCGCT	diese Arbeit
HTS39	ATCGTGACCTCGGGCCGT	diese Arbeit
HTS40	GTCACCGTGAGCTTGCCG	diese Arbeit
HTS41	AGGTAAC TGGTCCGGTCGG	diese Arbeit
HTS42	TGCCTCAAGACGTGTGCGG	diese Arbeit
HTS43	CGTCCAGGTCCAGGAGCAG	diese Arbeit
HTS45	TCGTGGACCCGCATGTCACC	diese Arbeit
HTS46	ACCTCTACACCGCCCGCG	diese Arbeit
HTS47	AGGCGAGCCGTAATCGCAGG	diese Arbeit
HTS48	ACATGGTCCGGTTCGTTACG	diese Arbeit
HTS49	ACCGATCACCGTACGCAATTG	diese Arbeit
HTS50	AGCTCTGGTACTCCGGGC	diese Arbeit
HTS52	ATCCACGCAACGTTCCGGTAG	diese Arbeit
HTS53	CGGTCAACGGCTCGTCCAG	diese Arbeit
HTS54	CACTGGCTTCAGCGCTGAC	diese Arbeit
HTS55	GATGCGACGGTCCCTGCTCC	diese Arbeit
HTS56	TGGCGATGTACGAGGCGAAG	diese Arbeit
HTS73	ATCAGGTAGCGGGTACCGAC	diese Arbeit
HTS51	CGGGTAGCGGTACTGCTCC	diese Arbeit
HTS58	AGGACGACGATAACCGAGGAG	diese Arbeit
HTS59	AACAGTTCTACTTCGTCTGTC	diese Arbeit
HTS60	GCAAGAGCACGTACGTGGAC	diese Arbeit
HTS61	AGGTGGAGAGCCGATACGTC	diese Arbeit
HTS62	ATCTTCGCGTTCTCCCGGG	diese Arbeit
HTS63	ACCGTGCGGATCAGCGCAC	diese Arbeit

Fortsetzung

Fortsetzung Tab 2.2.1: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
HTS67	CCGATGATCGCCACTTCCTC	diese Arbeit
HTS68	ACTACTACCTCGCCGCC	diese Arbeit
HTS69	TGCCAGCCCGTTCGATATGG	diese Arbeit
HTS71	ATCTCGTCATGGCGCTCCTC	diese Arbeit
HTS72	GCAAACCTCTTGCATCACGTGG	diese Arbeit
HTS73	ATCAGGTAGCGGGTACCGAC	diese Arbeit
HTS79	GTCGACGAACCGGTCCCTGC	diese Arbeit
HTS80	ACTACCGTCCGCCGTCCG	diese Arbeit
HTS81	GCTGCTGTCGCAGTACC	diese Arbeit
HTS82	ACCGCTACCTGGAACTG	diese Arbeit
HTS83	GGTACGTGCACCTGTTCCGG	diese Arbeit
HTS84	AGTGTCGTACCGGCGGACC	diese Arbeit
HTS85	CAGCTACGGGGTCGTCACC	diese Arbeit
HTS86	GACATGCGCCAGCGTGCC	diese Arbeit
HTS87	CCGAGCGGTACGACCTGG	diese Arbeit
HTS88	GCACACTGTGCGCACCG	diese Arbeit
HTS89	CGTCGAACTCGACCATCCC	diese Arbeit
HTS90	AGTACCGGCGGCGAAGTCGAGG	diese Arbeit
HTS93	GGTGACCTGCTGCGGTTTC	diese Arbeit
HTS94	CAGACTGAAGTCGATCAG	diese Arbeit
HTS96	ACCGTAGAGCTGGCCGAGG	diese Arbeit
HTS98	GTCGAAGGCGAGGGCTTC	diese Arbeit
HT100	GGTACGCCGGCACATCGC	diese Arbeit
HT101	TGCTGGCCGACCGCCTGG	diese Arbeit
HT102	CGCACGAGGATCTGCGCGG	diese Arbeit
HT103	CCAACGCCCTGTGCTGGC	diese Arbeit
HT104	TGCCGGATCAGCGCCGACG	diese Arbeit
HT105	CAGTGTCCCGTCCAGATCGG	diese Arbeit
HT108	GTACGACCTGGTCGAACTCG	diese Arbeit
HT109	GGGTAACGTTCGTGCGGCGC	diese Arbeit
HT110	GGCACATGAGATCGCTCAGG	diese Arbeit
HT115	GGAAGGCGCCGTACCGCC	diese Arbeit
HT111	GGCGATCCCGATGCTCATGC	diese Arbeit
HT112	CACGACGGTCACCAGGACG	diese Arbeit
HT113	GGATGGCTACCGAACGTTGC	diese Arbeit
HT114	GCCTATGGCGATCTGGGTCC	diese Arbeit
HTS774	CCCCTGGATGTAGTCCAGC	diese Arbeit
mod-up	GGTAACGCCAGGGTTTTCC	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
mod-rp	GGAATTGTGAGCGGATAACA	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

- (a) Die angegeben Primer wurden für die DNA-Sequenzierung verwendet.  
Die Primer HTS,63, HTS79, HTS67 und HTS73 wurden ebenfalls für die PCR verwendet (**Kap.** 2.9.11).

### 2.3 Chemikalien, Enzyme, Reaktions-Kits, sonstige Materialien

#### Chemikalien

Acarbose	BAYER AG, Wuppertal-Elberfeld
Agarose	Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe)
Antibiotika	Sigma (Deisenhofen), Squibb and Sons (Princeton, USA), Serva (Heidelberg)
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics (Mannheim)
Chemikalien, p.a. Qualität	Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe)
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
ATP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
dNTP	Roche (Mannheim)
$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP und $\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dCTP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Szintillationsflüssigkeit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
[U- <sup>14</sup> C]-Maltose	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Hydrolink Long Ranger	Biozym Diagnostika GmbH (Hess. Oldendorf)
Medienbestandteile	Difco (Detroit, USA), Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe)

#### Sonstige Materialien

X-Ray film Hyperfilm $\square$ P	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
DC-Platten	Merk (Darmstadt)
Hybond N+-Membran	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
96-well Mikrotiterplatten	Nunc (Wiesbaden)

#### Enzyme

Shrimp Alkaline Phosphatase	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
DNA Polymerase I Klenow Fragment	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Lysozym	Serva (Heidelberg)
Mutanolysin	Sigma (Deisenhofen)
Proteinase K	Roth (Karlsruhe)
DNase I	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase A	Sigma (Deisenhofen)
Benzonase	Merck (Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen	Life Technologies (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt)
T4 DNA-Ligase (einschl. Reaktions-Puffer)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)



### Molekularbiologische Reaktions-Kits

Advantage-GC cDNA PCR Kit	Clontech (Heidelberg)
Bradford Reagenz	BioRad (München)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Genomic-tip 100/G	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Lambda Mini Kit	Qiagen (Hilden)
<i>double-stranded</i> Nested Deletion Set	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Gigapack III XL Packaging Extract	Stratagene (Niederlande)
Thermosequenase Cy5 Dye Terminator Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Thermosequenase Cycle-Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
DIG High Prime Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
Rediprime II Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
PCR Script Amp Cloning Kit	Stratagene (Niederlande)
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen (Niederlande)

## 2.4 Nährmedien

Sämtliche Nährmedien wurden, wenn nicht anders angegeben, 20 min bei 200 kPa und 121°C autoklaviert. Hitze-empfindliche Komponenten wurden mit Sartorius-Sterilfiltern (Porengröße 0,45µm) filtriert und nach dem Abkühlen der Medien auf 50°C zugegeben. Soweit nicht anders angegeben wurde für alle Medien zweifach destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet

### 2.4.1 Medien zur Kultivierung von Actinomyceten

#### SMA-Agar (DISTLER et al., 1985)

Sojamehl	20	g/l
Mannit	20	g/l
Agar	22	g/l

#### TSB-Medium (KIESER et al., 2000)

Tryptic Soy Broth (Oxoid)	30	g/l
---------------------------	----	-----

**MD-50 Medium** (STRATMANN, 1997)

Lsg. I:	MD-50	70	g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	g
	Yeast Extract (Difco)	2	g
	ad 400ml ddH <sub>2</sub> O		
Lsg. II:	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g
	Tri-Natriumcitrat	5	g
	add 400 ml ; pH 6,8		
Lsg. III	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1	g
	FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,25	g
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2	g
	add 200 ml ddH <sub>2</sub> O		

Die drei Lösungen wurden gemischt und anschließend steril filtriert.

**NBS-Medium** (BAYER AG, Wuppertal, persönliche Mitteilung)

Glucose	10	g/l
Pepton (Difco)	4	g/l
Hefeextrakt (Difco)	4	g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	g/l

**NBS-Agar**

NBS-Medium		
Agar	20	g/l

**2.4.2 Medien zur Kultivierung von *E. coli*****LB-Medium** (MILLER, 1972)

Trypton	10	g/l
Hefeextrakt	5	g/l
NaCl	10	g/l
pH 7,2		

**LB-Agar** (MILLER, 1972)

LB-Medium		
Agar	15	g/l

**2 x TY-Medium** (Miller, 1972)

Trypton (Difco)	16 g/l
Hefeextrakt (Difco)	10 g/l
NaCl	5 g/l

**SOB-Medium** (HANAHAH, 1983)

Hefeextrakt (Difco)	5 g/l
Bacto Trypton (Difco)	20 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

nach dem Autoklavieren einstellen auf :

MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

**SOC-Medium** (HANAHAH, 1983)

SOB-Medium

nach dem Autoklavieren einstellen auf :

D-Glucose	20 mM
-----------	-------

### 2.4.3 Medien zur Vermehrung von Bakteriophagen

(modifiziert nach SAMBROOK ET AL., 1989)

**LB-MgSO<sub>4</sub>-Agar**

LB-Agar	
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

**Top-Layer**

Agarose	7 g/l
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

**LB-Maltose-Medium**

LB-Medium	
Maltose	2 g/l

## 2.5 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte submers in LB-Medium bzw. 2 x TY-Medium oder auf LB-Agarplatten (**Kap.** 2.4.2) bei 37 °C. Zur Anzucht plasmidhaltiger Stämme wurde das Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Apramycin (50 µg/ml) supplementiert. Zur Kultivierung von *E. coli* XL1-Blue wurde das Medium mit Tetracyclin (12,5 µg/ml) supplementiert. Die Stammkonservierung erfolgte in LB-Medium mit 25% (v/v) Glycerin bei -20 °C.

## 2.6 Anzucht von Actinomyceten

### 2.6.1 Generelle Anzucht von Actinomyceten

Die Anzucht von Streptomyceten erfolgte, soweit nicht explizit angegeben, in TSB-Medium (**Kap.** 2.4.1) supplementiert mit den erforderlichen Antibiotika (Apramycin: 50 µg/ml; Thiostrepton 20 µg/ml) bei 28°C und starker Durchmischung. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden die Bakterien auf SMA-Platten (**Kap.** 2.4.1) angezogen und Sporensuspensionen (KIESER et al., 2000), oder Glycerinkulturen (30% (v/v) Glycerin in dem verwendeten Medium) hergestellt. Die Kultivierung von *Actinoplanes* sp. SE50/110 erfolgte, soweit nicht explizit angegeben, submers in NBS-Medium oder auf NBS-Agarplatten bei 28°C (**Kap.** 2.4.1).

### 2.6.2 Anzucht von *Actinoplanes* sp. SE50/110 für die Isolierung chromosomaler DNA

Um die Isolierung hochmolekularer chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 zu ermöglichen, wurden 50 ml NBS-Medium mit einer stationären Vorkultur inokuliert [2% (v/v)] und für 14-16 h inkubiert (28°C, 200 upm). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt (20 min., 4000 g, 4°C) und zweimal mit eiskalter 10,3 % (w/v) Saccharose-Lösung gewaschen. Aus 50 ml Hauptkultur wurden ca. 1,4-1,8 g (Nassgewicht) Myzel erhalten und direkt zur Isolierung chromosomaler DNA eingesetzt (**Kap.** 2.9.2).

## 2.7 Vermehrung und Stammhaltung rekombinanter GEM12-Phagen

(modifiziert nach SAMBROOK ET AL., 1989)

Die Vermehrung von Derivaten des Phagen GEM12 erfolgte in dem Wirtstamm *E. coli* LE392 auf LB-MgSO<sub>4</sub>-Agarplatten (**Kap.** 2.4.3). Eine Hauptkultur von *E. coli* LE392 wurde in LB-Maltose-Medium (**Kap.** 2.4.3) bei 37 °C bis zu einer OD<sub>578</sub> = 0,5-0,6 angezogen. Anschließend wurden 0,3 ml der Bakterienkultur mit 10-100 µl Phagenlösung (10<sup>5</sup> pfu) versetzt, vorsichtig gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Phagen/*E. coli*-Gemisch wurde mit 4 ml Top-Layer (40-50 °C; **Kap.** 2.4.3) vorsichtig vermischt, sofort auf einer LB-MgSO<sub>4</sub>-Agarplatte (18 cm<sup>2</sup>) verteilt und für 16-18 h bei 37 °C inkubiert. Die Phagen eines einzelnen Plaques wurden in 100 µl SM-Puffer (50 mM Tris/HCl pH7,5; NaCl 5,8 g/l; MgSO<sub>4</sub> 2 g/l; Gelatine 0,1 g/l) resuspendiert und die restlichen Bakterien durch

Zentrifugation (4000 g, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Der Überstand wurde nach Zugabe von einem Tropfen Chloroform bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung eines Phagenstocks wurde diese Phagensuspension vermehrt und die Phagen wurden mit 3 ml SM-Puffer und 5 µl Chloroform eluiert. Anschließend wurden die restlichen *E. coli*-Zellen durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C, 10 min) sedimentiert und der Überstand auf 0,3 % Chloroform und 7 % DMSO eingestellt. Die Lagerung des Phagenstocks erfolgte bei -70 °C.

## 2.8 Heterologe Expression von *acb*-Genen in *S. lividans* 66 TK23

### 2.8.1 Heterologe Expression mit dem Expressionsplasmid pHTW214

Die rekombinanten Stämme *S. lividans* 66 TK23 pHTW214 sowie die entsprechende Negativkontrolle *S. lividans* 66 TK23 pUWL218 wurden in einer zweistufigen Fermentation in MD50-Medium (Thiostrepton, 20 µg/ml; **Kap.** 2.4.1) bei 28°C und starker Durchmischung angezogen. Es wurden 50 ml Hauptkultur in einem 500 ml Schikanekolben mit 2,5 ml einer stationären Hauptkultur inokuliert und für 55 h bei 28°C und 200 upm inkubiert. Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 g, 20 min, 4 °C) sedimentiert und zweimal mit je 30 ml eiskaltem Puffer (25 mM Tris/HCl pH 7,5) gewaschen. Die Zellen wurden bis zum Zellaufschluss bei -70 °C gelagert.

### 2.8.2 Heterologe Expression des *acb*-Gencluster in *S. lividans* 66 TK23

*S. lividans* 66 pHTWCos6 und die entsprechende Negativkontrolle *S. lividans* 66 pOJ446 wurden für die heterologe Expression des *acb*-Genclusters verwendet. Die submerse Anzucht erfolgte in einer zweistufigen Fermentation in MD50-Medium (Apramycin, 50µg/ml; **Kap.** 2.4.1). Die Hauptkultur wurde 5% (v/v) mit einer stationären Vorkultur inokuliert und bei 28°C und starker Durchmischung inkubiert. Abhängig von dem späteren Verwendungszweck variierte die Inkubationsdauer der Hauptkultur:

- (1) Für den Nachweis der Enzymaktivität von AcbK bzw. AcbD sowie der Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol wurde die Hauptkultur für 55 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (4000 g, 20 min, 4°C) und zweimal mit eiskaltem Puffer (25 mM Tris/HCl pH 7,5) gewaschen. Das Zellsediment wurde bei -70 °C gelagert. Der Kulturüberstand wurde über Nacht gegen AcbD-Puffer (25 mM Tris/HCl pH7,5; 1 mM CaCl<sub>2</sub>) dialysiert und anschließend bei -20 °C gelagert.
- (2) Für den Nachweis heterolog produzierter Acarbose und/oder Derivate der Acarbose wurde die Hauptkultur für 88 h angezogen. Die Zellen und Zelldebris wurden durch Zentrifugation sedimentiert (4000 g, 30 min, 4 °C) und der Kulturüberstand abdekantiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand bei -20 °C gelagert.

## 2.9 Molekularbiologische Methoden

### 2.9.1 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus den verwendeten *E. coli* Stämmen wurde mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Abweichend hiervon wurde die DNA von pOJ446 und Derivaten durch eine alkalische Lyse mit anschließender Isopropanol-Präzipitation der DNA (BIRNBOIM AND DOLY, 1979) oder mit Hilfe des „QIAGEN Plasmid Mega Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert.

### 2.9.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Actinomyceten

Die Isolierung chromosomaler DNA aus Actinomyceten erfolgte abhängig von dem vorgesehenen Verwendungszweck mit dem „QIAGEN Genomic-tip 100/G“ Kit oder einer modifizierten Methode nach POSPIECH UND NEUMANN (1995). Um hochreine chromosomale DNA für Southern-Blots und die PCR zu erhalten, wurde das „QIAGEN Genomic-tip 100/G“ Kit verwendet. Abweichend von dem Protokoll des Herstellers wurden die sedimentierten Bakterien in 10 ml 10,3% Saccharose resuspendiert und bei 37°C mit lytischen Enzymen sphäroplastiert [Lysozym 10mg/ml für Streptomyceten; Mutanolysin, 200 Units/mg Nassgewicht für *Actinoplanes* sp. SE50/110]. Der Grad der Sphäroplastierung wurde im Lichtmikroskop verfolgt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (4000 g, 20 min., 4 °C) und der Überstand verworfen. Alle weiteren Schritte wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Wenn die DNA für die Isolierung von Cosmid DNA aus Streptomyceten verwendet werden sollte (**Kap.** 2.9.3), wurden alle weiteren Schritte gemäß dem von POSPIECH UND NEUMANN (1995) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Zur Isolierung hochmolekularer DNA für die Konstruktion einer Cosmidbank chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 wurde eine von POSPIECH UND NEUMANN (1995) beschriebene Methode mit den folgenden Modifikationen angewandt: Es wurden ca. 1,3-1,5 g Myzel (Nassgewicht) in 15 ml 10,3 % Saccharose-Lösung aufgenommen, mit 1000 Units Mutanolysin (Sigma, Deisenhofen) versetzt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden Sphäroplasten sowie intaktes Myzel sedimentiert (10 min, 5000 g, 4 °C), in 10 ml SET-Puffer (1 % SDS; 0,6 mg ProteinaseK/ml; 3,33 mg RNaseA/ml) resuspendiert und 60 min bei 55 °C inkubiert. Nach erneuter Sedimentation von Zelldebris und intaktem Myzel (10 min, 4000 g, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und gemäß dem Originalprotokoll verfahren. Die präzipitierte DNA wurde in 10 mM Tris/HCl pH 8,5 resuspendiert und bei + 4°C gelagert.

### 2.9.3 Isolierung von pOJ446-Derivaten aus *S. lividans* 66 TK23

Zur Isolierung der Vektoren pOJ446 und pHTWCos6 aus *S. lividans* 66 TK23 wurde zuerst die Gesamt-DNA der rekombinanten *S. lividans* 66 TK23 Stämme isoliert (**Kap.** 2.9.2; POSPIECH AND NEUMANN, 1995). In einem zweiten Schritt wurde eine Trennung der chromosomalen DNA von der Cosmid DNA durch einen alkalischen Denaturierungsschritt mit anschließender Neutralisierung und Alkohol-Fällung nach KIESER et al. (2000)

durchgeführt. Die so gewonnene Cosmid DNA wurde anschließend in *E. coli* DH5 $\alpha$  oder *E. coli* XL1-Blue transformiert (**Kap.** 2.9.10), um eine problemlose Isolierung der Cosmid-DNA zu ermöglichen (**Kap.** 2.9.1)

#### 2.9.4 Isolierung von GEM12-Phagen DNA aus *E. coli* LE392

(modifiziert nach SAMBROOK ET AL., 1989; Qiagen, Hilden)

Die über Nacht auf einer LB-Agarplatte vermehrten Phagen (**Kap.** 2.7) wurden mit 2,5-5 ml SM- Puffer (**Kap.** 2.7) sowie einem Tropfen Chloroform überschichtet und für 2 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die restlichen *E. coli*-Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4000 g) sedimentiert. Der Überstand wurde mit RNase A- und DNase I-Lösung (Endkonzentration je 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von einem Volumen Fällungslösung (20 % PEG 8000, 2 M NaCl) wurden die Phagen durch Inkubation des Ansatzes für eine Stunde auf Eis gekühlt und durch anschließende Zentrifugation (10 min, 10000 g) sedimentiert. Das Präzipitat wurde in 3 ml Puffer B3 des „QIAGEN Lambda Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgenommen und alle weiteren Schritte wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

#### 2.9.5 *In vitro* Manipulation von DNA

Alle *in vitro* Manipulationen wie die Hydrolyse von DNA, gelelektrophoretische Trennung von DNA Fragmenten in Agarosegelen sowie die Ligation von DNA-Fragmenten wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller der verwendeten Enzyme oder entsprechend Standardprotokollen durchgeführt (SAMBROOK ET AL., 1989). Abweichend hiervon wurde die Ligation von DNA-Fragmenten, die durch die PCR erhalten wurden (**Kap.** 2.9.11), unter Verwendung des „PCR-Script Amp Cloning Kit“ (Stratagene, Niederlande) oder des „Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing“ (Invitrogen, Niederlande) entsprechend den Empfehlungen der Hersteller durchgeführt. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Einführung gerichteter Verkürzungen des Plasmids pHTW206 wurde mit dem „*double stranded* Nested Deletion Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit dem „Rediprime II Kit“ unter Verwendung von  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (beide Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Für die nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde das DIG High Prime Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet.

### 2.9.6 Plaque-Hybridisierung von GEM12-Phagen DNA

(SAMBROOK et al., 1989)

Nach Vermehrung der Phagen (**Kap.** 2.7) wurde die Agarplatte für 1-2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Hybond N+-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 30-60 s auf den Top-Layer gelegt. Die Membran wurde vorsichtig abgenommen, für 20 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) gelegt und anschließend für 5 min mit Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl pH 8,0) behandelt. Nach Äquilibration der Membran in 2 x SSC (**Kap.** 2.9.7) wurde sie für die DNA-DNA-Hybridisierung verwendet (**Kap.** 2.9.7).

### 2.9.7 DNA-DNA Hybridisierung

(SAMBROOK et al., 1989)

<u>Prähybridisierungspuffer</u>			<u>20 x SSC</u>	
Blocking Reagenz	0,1	% (w/v)	NaCl	175,3 g/l
N-Laurylsarcosinat	0,1	% (w/v)	Trinatrium-Citrat	88,2 g/l
SDS	0,02	% (w/v)		
Phosphat	10	mM	mit Citrat auf pH 7-7,5 einstellen	
20 x SSC	30	% (v/v)		

Die Membran (**Kap.** 2.9.6 & 2.9.8 & 2.9.13) wurden für 4 h in 300-500 ml Prähybridisierungspuffer bei 68 °C prähybridisiert. Der Prähybridisierungspuffer wurde während dieses Zeitraums 2-3 mal gewechselt. Die radioaktiv markierte Gensonde (**Kap.** 2.9.4) wurde durch Erhitzen (95 °C, 10 min) denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die Membran mit 20 ml Prähybridisierungspuffer und der denaturierten Gensonde bei 65 °C für 16 h inkubiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 30 min mit 6 x SSC/0,1 % SDS bei 65 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Abschließend wurde die Membran unter stringenten Bedingungen gewaschen. Die Pufferzusammensetzung und verwendete Waschttemperatur wurde abhängig von der verwendeten DNA-Sonde variiert (0,1-1 x SSC, 0,1 % SDS, 65-68 °C, 20 min). Der Nachweis hybridisierender DNA-Fragmente erfolgte durch Autoradiographie mit dem Hyperfilm MP-Röntgenfilm (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) bei -70 °C für 16-20h.

Alternativ wurden auch nicht-radioaktiv markierte DNA-Sonden (**Kap.** 2.9.4) für die DNA-DNA Hybridisierung eingesetzt. Abweichend von dem oben beschriebenen Vorgehen erfolgte der immunologische Nachweis hybridisierender DNA-Fragmente mit dem „DIG Nucleic Acid Detection Kit“, unter Verwendung von NTP/BCIP als Substrat. Diese Methode wurde auch für die nicht-radioaktive Dot-Blot Analyse isolierter Cosmid DNA verwendet.



### 2.9.8 Koloniehybridisierung der Cosmid-Bank in *E. coli* XL1-Blue

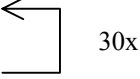
(modifiziert nach SAMBROOK ET AL., 1989)

Die Mikrotiterplatten der Cosmid-Bank (**Kap.** 2.9.12.4) wurden aseptisch auf Hybond N+-Membran repliziert und über Nacht bei 37°C auf LB-Platten (Apramycin 30 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Filter für 30 min bei Raumtemperatur in Denaturierungslösung (**Kap.** 2.9.6) inkubiert. Zur Neutralisierung wurden sie zweimal für je 5 min. in Neutralisierungslösung (**Kap.** 2.9.6) gewaschen, wobei auch die verbleibende Zellebris entfernt worden ist. Die DNA-DNA-Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten wie in **Kap.** 2.9.7 beschrieben.

### 2.9.9 DNA-Sequenzierung

(modifiziert nach SANGER et al., 1977)

Die DNA Sequenzierung wurde nach der von SANGER et al. (1977) publizierten Methode durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das „Thermosequense Cy5 Dye Terminator Kit“ oder das „Thermosequense Cycle-Sequencing Kit „ (beide Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit den in **Tab** 2.2.1 angegebenen Oligonukleotiden und den in **Tab.** 2.1.3 angegebenen Plasmiden verwendet. Abweichend von dem Protokoll des Herstellers wurden die Cycle-Parameter wie folgt modifiziert:

1.	98 °C	5 min.	
2.	95 °C	45 s	
3.	63 °C	45 s	
4.	68 °C	1 min 20 s	
5.	68 °C	1 min	

Die Analyse der Sequenzreaktionen erfolgte auf einem ALFExpress Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung eines 6 M Harnstoff/6 % „Hydrolink Long Ranger“-Gels (Biozym, Hessisch Oldendorf). Die Auswertung wurde mit der *Alfwin Software* Version 2.10.6 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und dem *Staden Package* (**Kap.** 2.19) durchgeführt. Alternativ wurden Sequenzierungen von der Fa. MWG Biotech (Ebersberg) im „Value Read“ Maßstab durchgeführt.

### 2.9.10 Transformation von *S. lividans* 66 TK23 und *E. coli*

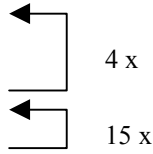

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* -Zellen erfolgte basierend auf der von HANAHAH (1983) publizierten Methode. Für die Transformation wurden 200 µl der Zellsuspension verwendet und die Transformation wurde wie von SAMBROOK et al. (1989) beschrieben durchgeführt.

Die Protoplastierung von *S. lividans* 66 TK23 wurde basierend auf der Methode von CHATER et al. (1982) und die anschließende Transformation gemäß dem von BABCOCK und KENDRICK (1988) publizierten Protokoll durchgeführt. Abweichend hiervon erfolgte die Regeneration der Protoplasten auf R5-Platten bei 28 °C (KIESER et al., 2000).

### 2.9.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR wurde das Advantage-GC cDNA PCR Kit (Clontech, Heidelberg) verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze entsprach den Empfehlungen des Herstellers, mit Ausnahme der GC-Melt Konzentration. Die GC-Melt Konzentration in den PCR-Ansätzen betrug 0,75 M. Zur Durchführung der PCR wurden die folgende Standardreaktionsbedingungen verwendet. Die Annealing Temperatur des 1. Zyklus betrug 64 °C und es wurden 4 bzw. 15 Wiederholungen im 1. bzw. 2. Zyklus durchgeführt. Das verwendete Template sowie die verwendete Primer-Kombination ist in **Tab 2.9.11.1** angegeben.

#### Standardreaktionsbedingungen für die PCR:

98 °C	5 min.		
95 °C	45 sec.		
64 °C	45 sec.		4 x
68 °C	3 min.		
95 °C	45 sec.		
68 °C	3 min.		15 x
68 °C	7 min.		

**Tab. 2.9.11.1:** Verwendete Primer-Kombinationen und Templates.

Primer	Template	Das PCR-Fragment wurde für die Konstruktion des angegebenen Plasmids verwendet
HTS63 HTS79	Φ 52	pHTW240
HTS67 HTS73	pHTWCos6	pHTW239.2

### 2.9.12 Konstruktion einer Cosmid-Bank genomischer DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 in dem Cosmidvektor pOJ446

Es wurde eine Cosmid-Bank genomischer DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 in dem *E. coli* / Streptomycceten Shuttle-Vektor pOJ446 (BIERMAN et al., 1992) konstruiert. Hierfür wurde hochmolekulare chromosomale DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 isoliert (**Kap. 2.9.2**). Anschließend wurde diese mit der Restriktionsendonuklease *Sau3A* I partiell hydrolysiert (**Kap. 2.9.12.1**), in den linearisierten Vektor pOJ446 ligiert (**Kap. 2.9.12.2**), in λ-Phagenköpfe verpackt und in *E. coli* XL1-Blue transduziert (**Kap. 2.9.12.3**). Die Amplifikation und Stammhaltung der rekombinanten *E. coli* XL1-Blue Stämme wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt (**Kap. 2.9.12.4**).

### 2.9.12.1 Partielle Hydrolyse der chromosomalen DNA aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit *Sau3A I*

Die partielle Hydrolyse von ca. 60 µg chromosomaler DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 250 µl mit 3 Units *Sau3A I* (New England Biolabs, Frankfurt) bei 37 °C und den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Um den Verlauf der Hydrolyse zu kontrollieren, wurden je 50 µl des Reaktionsansatzes nach 5, 10, 15, 20 und 25 min entnommen, 20 min. bei 68 °C inkubiert, mit Ethanol präzipitiert und die DNA in 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 resuspendiert. Die gelelektrophoretische Analyse zeigte, dass nach 5 min Inkubation die Fragmentgröße der chromosomalen DNA überwiegend oberhalb von ca. 30 kb lag (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die DNA der „5-min-Fraktion“ für die weiteren Schritte verwendet (**Kap.** 2.9.12.2).

### 2.9.12.2 Ligation der partiell hydrolysierten DNA in pOJ446 / *BamH I*

Die partiell hydrolysierten chromosomalen DNA-Fragmente der „5 min-Fraktion“ wurden in das, mit der Restriktionsendonuklease *BamH I* hydrolysierte, Cosmid pOJ446 (BIERMAN et al., 1992) ligiert. Um ein Religation des Cosmid-Vektors pOJ446 zu vermeiden, wurde dieser nach erfolgter Hydrolyse gemäß dem Protokoll des Herstellers mit der „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) dephosphoryliert. Die Phosphatase wurde anschließend durch das Erhitzen des Reaktionsansatzes für 20 min auf 68 °C inaktiviert. Zu Aufreinigung der DNA wurde diese mit Ethanol präzipitiert und in 10 mM Tris/HCl pH 8,5 resuspendiert. Für die Ligation von ca. 3 µg Cosmid-Vektor wurden ca. 2,7 µg chromosomale DNA-Fragmente und 10 Units T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt und für 20 h bei 16 °C inkubiert. Abschließend wurde die T4-DNA-Ligase für 20 min bei 68 °C Hitze-inaktiviert.

### 2.9.12.3 Verpackung des Ligationsansatzes und Transduktion in *E. coli* XL1-Blue

Die „Verpackung“ der Cosmid-DNA-Konkatemere (**Kap.** 2.9.12.2) in  $\lambda$ -Phagen wurde mit dem „Gigapack III XL Packaging Extract“ (Stratagene, Niederlande) gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 6 µl des Ligationsansatzes (**Kap.** 2.9.12.2) für die Verpackungsreaktion eingesetzt. Anschließend wurden die  $\lambda$ -Phagen in *E. coli* XL1-Blue transduziert und auf LB-Agarplatten (50 µg Apramycin/ml) ausplattiert.

### 2.9.12.4 Amplifikation und Stammhaltung der Cosmidbank

Um eine Diskriminierung innerhalb der Population rekombinanter *E. coli* XL1-Blue-Stämme durch eine positive oder negative Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch die rekombinanten Cosmide zu verhindern, wurde die Stammhaltung in Mikrotiterplatten durchgeführt. Aufgrund der geringeren Wachstumsgeschwindigkeit in der Mikrotiterplatte, erfolgte die submerse Anzucht eines distinkten Klons pro Well der Mikrotiterplatte in dem Vollmedium 2 x TY (**Kap.** 2.4.2), supplementiert mit 30 µg/ml Apramycin, für 2 Tage bei

37 °C. Anschließend wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 25 % (v/v) zugesetzt und die Dauerkulturen wurden bei –80 °C gelagert.

### 2.9.13 „Southern“-Blot

(modifiziert nach SAMBROOK ET AL., 1989)

Der Transfer von DNA aus einem Agarosegel auf die Hybond N<sup>+</sup>-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ist, anschließend an die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente, als Kapillar-Transfer durchgeführt worden. Die Denaturierung der dsDNA erfolgte während des Transfers durch den Transferpuffer (0,4 M NaOH). Anschließend an den für 16 h durchgeführten Transfer der DNA wurde die Membran in 2 x SSC (**Kap.** 2.9.7) für 30 s gewaschen.

### 2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Reagenz. (Bio-Rad, München) nach der Methode von BRADFORD (1976) durchgeführt. Als Referenzsubstanz wurde Rinderserumalbumin (BSA, NEW ENGLAND BIOLABS) verwendet.

### 2.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### SDS-Probenpuffer

SDS (20 %)	2	ml
β-Mercaptoethanol	4	ml
Glycerin	2	ml
Bromphenolblau (1 g/l)	2	ml

#### Trenngelpuffer

Tris/HCl, pH 8,8	1,5	M
SDS	4,0	g/l

#### Sammelgelpuffer

Tris/HCl, pH 6,8	0,5	M
SDS	1,0	g/l

#### SDS-Laufpuffer

Tris	30	g/l
Glycin	144	g/l
SDS	10	g/l

#### Coomassie- Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R250	0,15	%
Methanol	45	%
Essigsäure	10	%

#### Entfärbelösung

Methanol	20	%
Essigsäure	10	%

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen ist in denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach der Methode von LAEMMLI et al. (1970) durchgeführt worden. Zur Herstellung des Gels wurden Polyacrylamidkonzentrationen (Acrylamid:N,N-Bisacrylamid = 29:1) von 6 % für das Sammelgel und 8-12,5 % für das Trenngel in Sammel- bzw. Trenngelpuffer verwendet. Zur Größenbestimmung wurde alternativ der VII-L-Marker (SIGMA, Deisenhofen) oder der High-Molecular Weight

Marker (MW-SDS-200, SIGMA, Deisenhofen) verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit SDS-Laufpuffer und 1,5-12 V/cm in einer Minigel-Twin-Kammer (Biometra, Göttingen) oder der Renner Twin-Vertical-Apparatur (Renner, Darmstadt). Zur Anfärbung der Proteine wurde das Polyacrylamidgel für 30-60 min unter leichtem Schütteln in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend für 3 h bei Raumtemperatur mit Entfärbelösung behandelt.

### 2.12 Herstellung zellfreier Proteinextrakte

Für den Zellaufschluss wurden 1,5 ml Aufschlusspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,6, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 63 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1,5 mM DTT) pro 1 g Zellnassgewicht verwendet. Sollte der zellfreie Extrakt für radioaktive Enzymansätze verwendet werden, erfolgte der Aufschluss durch die zweimalige Passage einer French Press Zelle bei (American Instruments Company, Silver Spring, USA) einem internen Druck von 20000 Psi. Anschließend wurde eine Benzonase-Behandlung (1 h auf Eis, 10 units Benzonase; Merck, Darmstadt) durchgeführt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 40 min bei 119200g abgetrennt. Der Überstand wurde in N<sub>2</sub> (fl.) schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

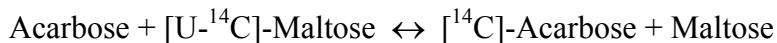
Für den nicht-radioaktiven Nachweis der Acarbose-7-Kinase wurden die Zellen durch eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Bandelin Sonoplus UW60, Spannungsquelle HD60, Bandelin, Berlin). Die Zellen wurden in einem Abstand von 20 Sekunden 3- bis 5-mal 20 Sekunden mit 70 % Intensität und 20 % Zyklus beschallt. Die Zellebris wurde durch eine Zentrifugation für 30 min bei 20000g abgetrennt. Die zellfreien Extrakte wurden ebenfalls in N<sub>2</sub> (fl.) schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

### 2.13 Messung der Acarviosyltransferase AcbD

(modifiziert nach HEMKER et al., 2001)

Für den Nachweis der Aktivität der Acarviosyltransferase (AcbD) erfolgte die Anzucht und Präparation der Kulturüberstände wie in **Kap.** 2.8.2 (1) beschrieben.

Das verwendete Testsystem basierte auf dem AcbD-katalysierten Austausch des Maltosylrests der Acarbose gegen [U-<sup>14</sup>C]-Maltose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und wurde modifiziert nach der Methode von HEMKER et al. (2001) durchgeführt.



Die Reaktion wurde in einem Reaktionsvolumen von 14 µl für 15 min. bei 30 °C durchgeführt und enthielt neben 10 µl Kulturüberstand die folgenden Bestandteile:

1 µl	1M Tris/Maleinat-Puffer pH 6,3
1 µl	Acarbose [51 mg/ml]
1 µl	Maltose [2,48 mg/ml] und 0,74 kBq [ <sup>14</sup> C]-Maltose
1 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Ethanol p.a. abgestoppt und die denaturierten Proteine durch eine Zentrifugation sedimentiert. Anschließend wurde die Acarbose durch eine Ionenaustauschchromatografie von freier Maltose getrennt. Der Überstand wurde mit 500 µl einer Dowex 50 WX 4 Suspension (H<sup>+</sup>-Form in ddH<sub>2</sub>O 50 % (v/v)) vermischt. Unter den verwendeten Bedingungen band Acarbose an das Harz und die ungebundene Maltose

konnte durch Waschen des Harzes mit ddH<sub>2</sub>O entfernt werden. Die vereinigten Waschfraktionen wurden als Maltosefraktion bezeichnet. Die gebundene Acarbose wurde durch 0,5 M NH<sub>4</sub>-Lösung eluiert und als Acarbose-Fraktion bezeichnet. Die in beiden Fraktionen enthaltene Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Szintillationszähler (Wallac 1415 DSA; Wallac, Bad Wildbach; Szintillationsflüssigkeit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Die prozentuale Austauschrate des Maltosylrestes der Acarbose gegen freie [<sup>14</sup>C]-Maltose wurde als Maß für die AcbD-Aktivität verwendet (HEMKER, 1997; HEMKER et al., 2001). Die Enzymaktivität wurde um die unspezifische Austauschrate der Negativkontrolle *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 korrigiert. Die prozentuale Gesamtaus-tauschrate (GA) ergab sich wie folgt:  $GA = 100 \times [\text{dpm Acarbose-Fraktion} / (\text{dpm Acarbose-Fraktion} + \text{dpm Maltose-Fraktion})]$ .

Die spezifische Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet (HEMKER, 1997):

$$\text{spez. Aktivität} = (\text{GA} \times \text{Maltosekonzentration} \times \text{Vf}) / (\text{t} \times \text{Proteinkonzentration})$$

Maltosekonzentration	: 500 nmol/ml
t :	: Inkubationszeit = 900 s
Proteinkonzentration	: [mg/ml]
Vf	: Verdünnungsfaktor der Probe im Test = 1,4
spez. Aktivität	: [nkat/mg Protein]

### 2.14 Nachweis der Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol

(modifiziert nach DREPPER AND PAPE, 1996; GOEKE et al., 1996; C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung)

Die Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol wurde mit dem folgenden Standardreaktionsansatz durchgeführt:

---

#### Standardreaktionsansatz

---

Tris/HCl (pH 7,5)	71,42 mM
MgCl <sub>2</sub>	7,14 mM
ATP	7,14 mM + 2 μCi γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP
1- <i>epi</i> -Valienol	14,28 mM
	(Racemat, BLOCK, 2000)
zellfreier Extrakt	9 μl
Endvolumem	14 μl

---

Die Reaktion wurde durch Zugabe des zellfreien Extraktes gestartet und die Inkubationsdauer betrug 3 h bei 30 °C. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen der Ansätze für 1 min auf 98 °C gestoppt. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt (13000 g, 20 min, RT) und 5 μl des Überstandes durch Dünnschichtchromatografie mit Lösung A als mobile Phase (**Kap.** 2.17) analysiert. Um Acarbose-7-phosphat als Referenzsubstanz zu erhalten, wurde der Standardreaktionsansatz mit zellfreiem Extrakt von *Actinoplanes* sp. SE50/110 und 7,14 mM Acarbose anstatt 1-*epi*-Valienol als Substrat durchgeführt.

### 2.15 Nachweis der Acarbose-7-Kinase AcbK

(modifiziert nach DREPPER AND PAPE, 1996; GOEKE et al., 1996;  
C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung)

Die Messung der Acarbosekinase-Reaktion (AcbK) wurde in einem nicht-radioaktiven Testsystem mit dem folgenden Standardreaktionsansatz durchgeführt:

---

#### Standardreaktionsansatz

---

Tris/HCl (pH 7,5)	71,42 mM
MgCl <sub>2</sub>	7,14 mM
ATP	10 mM
Acarbose	15 mM
zellfreier Extrakt	variabel
Endvolumem	30 µl

---

Die Reaktion wurde durch Zugabe des zellfreien Extraktes gestartet und für 16 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 98 °C für 1 min gestoppt und die denaturierten Proteine durch Zentrifugation (13 000 g, 20 min, RT) entfernt. Die Überstände wurden durch Dünnschichtchromatografie mit Lösung B als Laufmittel analysiert (**Kap.** 2.17).

### 2.16 Chromatografische Analyse der Kulturüberstände von *S. lividans* pOJ446 und *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6

Die Analyse der Kulturüberstände von *S. lividans* pHTWCos6 und *S. lividans* pOJ446 erfolgte durch HPAE-Chromatografie (High Performance Anionic Exchange) und amperometrischer Detektion der oxidierbaren Bestandteile des Kulturüberstandes. Es wurde eine Cabopac PA 1 Säule (250\*4 mm; Fa. Dionex, Idstein, Deutschland) mit einer Flußrate von 1ml /min verwendet. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Lösung A (0,05 N NaOH, CO<sub>2</sub>-frei) und Lösung B (0,05 N NaOH + 0,5 N Natriumacetat suprapur) mit folgendem Mischungsverhältnis eingesetzt: 0 min, 100% A; 10 min 92% A, 8% B; 34 min, 64% A, 36% B; 36 min, 62% A, 38% B; 39 min, 100% B; 40 min, 100 % A, 45 min, 100 % A. Die Detektion erfolgte mit einem gepulsten chemischen Detektor der Fa. Dionex, einer Messspannung von 0,1 V für 0,2 s sowie Pulsspannungen von +0,6 V für 0,08 s und -0,6 V für 0,08 s. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 20 µl und die chromatografische Trennung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Messungen wurden im Labor von Dr. J. LENZ (Bayer AG, Wuppertal -Elberfeld) vorgenommen.

Zusätzlich wurden die Proben mit einer LC-MS Kopplung analysiert. Die Trennung erfolgte durch eine „Reverse Phase“ Chromatografie und anschließender Q-TOF-Analyse. Diese Untersuchungen wurden durch die „Zentrale Forschung“ der BAYER AG in Leverkusen durchgeführt (Dr. J. LENZ, BAYER AG, persönliche Mitteilung).

### 2.17 Dünnschichtchromatografie von Enzymansätzen

Zur Analyse der Enzymansätze wurden 5-20 µl der Proben auf eine mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtete DC-Platte aufgetragen (Merck, Darmstadt). Als mobile Phase wurde alternativ Lösung A [Buttersäure : 1M NH<sub>3</sub> im Verhältnis 5:3 (v/v)] oder Lösung B [Isobuttersäure : 1 M NH<sub>3</sub> im Verhältnis 5:3 (v/v)] eingesetzt (GOEKE et al., 1996). Die Visualisierung von chemischen Verbindungen erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sowie anschließender Anfärbung mit dem Cer-Reagenz. Zur Anfärbung mit dem Cer-Reagenz wurden die DC-Platten mit einer Lösung aus Molybdätriphosphorsäure (25 mg/ml), Cer(IV)sulfat (10 mg/ml) sowie konz. Schwefelsäure (60 mg/ml) besprüht und anschließend für 5-10 min auf 120 °C erwärmt (ALBERMAN, 2001). Alternativ wurden die radioaktiv markierten Substanzen durch Autoradiografie visualisiert (Hyperfilm MP-Röntgenfilm, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Exposition für 16h bei Raumtemperatur).

### 2.19 Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen

Die Analyse der DNA-Sequenz wurde mit den Programmen Pregap4, Gap4 und Nip4 des *Staden Package* Release 2000.0 (BONFIELD et al., 1995; STADEN, 1996; <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/pubseq>) sowie dem Programm *Artemis* V4.0 (<http://www.sanger.ac.uk>) durchgeführt. Zur Identifikation von offenen Leserahmen wurde das Programm *Frameplot* eingesetzt (BIBB et al., 1984; ISHIKAWA AND HOTTA, 1999; <http://www.nih.gov/~jun/cgi-bin/frameplot.pl>). Multiple Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm *TCoffee* durchgeführt und die Ergebnisse von Hand modifiziert (NOTREDAME et al., 2000; <http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>). Paarweise Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen *Fasta 3* (PEARSON AND LIPMAN, 1988; <http://www.ebi.ac.uk>), *WU-Blast2* (<http://www.ebi.ac.uk>) sowie *Bic2* (SMITH AND WATERMAN, 1981; <http://www.ebi.ac.uk>) und der jeweiligen nicht-redundanten Sequenzdatenbank bzw. der SWISSPROT-Datenbank durchgeführt. Für den Vergleich der hypothetischen Proteine *AcbX* und *AcbY* mit den Proteinen der Datenbank wurde zusätzlich der Seg-Filter des Programms *WU-Blast2* verwendet. Die Zuordnung von Proteinen zu einem sogenannten „Cluster of Orthologous Group“ erfolgte mit dem BLASTP 2.1.2 Programm (TATUSOV et al., 2001; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>). Zur Identifikation von konservierten Proteindomänen bzw. Proteinmotiven wurde die PFAM-Datenbank (BATEMAN et al., 2000; <http://www.sanger.ac.uk>), die Interpro-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk>) und die Prosite-Datenbank (HOFMAN et al., 1999; <http://www.expasy.ch>) eingesetzt. Eine Ausnahme bildete das Protein *AcbP*; hier erfolgte die Zuordnung mit Hilfe der „Conserved Domain Database“ und dem RPS-Programm (ALTSCHUL et al., 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Zur Analyse der Transmembran-Helices wurde das Programm *TMpred* verwendet (HOFFMAN AND STOFFEL, 1993; <http://www.ch.embnet.org>). Die Definition von Signalpeptiden wurde mit dem SignalP-Server durchgeführt (<http://www.cbs.dtu.dk>; NIELSEN et al., 1997; NIELSEN AND KROGH, 1998).



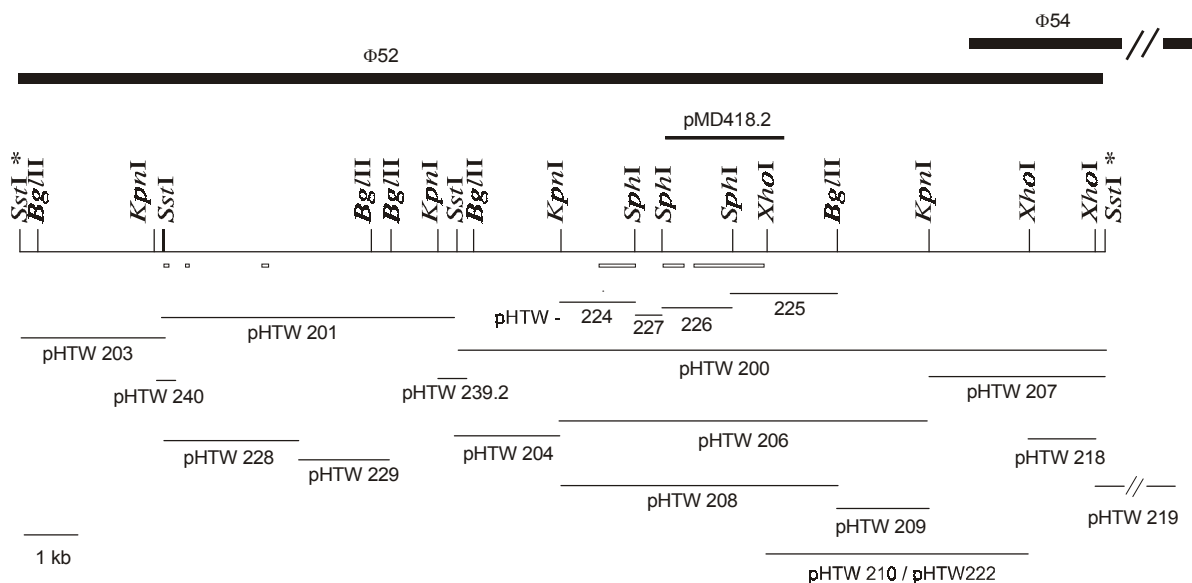
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung des rekombinanten GEM12-Derivates $\Phi$ 52

Um die Lage des von DIAZ-GUARDAMINO (2000) durch „Shot-Gun-Klonierung“ aus chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 isolierten Gens der Aminotransferase *AcbV* relativ zu den bereits bekannten Genen des Acarbose-Biosynthesegenclusters (*acb*-Gencluster) zu bestimmen und weitere bisher noch unbekannte Gene zu identifizieren, wurden Hybridisierungen mit dem 2,2 kb *Bam*HI-Insert des Plasmids pMD418.2 als Sonde durchgeführt (**Tab.** 2.1.3; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Diese ergaben sowohl mit der vollständigen GEM12-Phagenbank chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 sowie der DNA des GEM12-Derivates  $\Phi$ 52 positive Signale (**Kap.** 2.9.6, **Kap.** 2.9.7). Ein Hybridisierungssignal mit dem GEM12-Derivat  $\Phi$ 102 wurde hingegen nicht erhalten (**Tab.** 2.1.1; M. JARLING, persönliche Mitteilung). Dies widerlegte die bisher postulierte Lage von *acbV* upstream von *acbH* (**Abb.** 4.1.1; M. JARLING, persönliche Mitteilung). Neben dem der Hybridisierungssonde entsprechenden 2,2 kb *Bam*HI-Fragment konnte in einer anschließenden physikalischen Kartierung auch das von DIAZ-GUARDAMINO (2000) beschriebene 5,12 kb *Bgl*II-*Kpn*I-Fragment auf der in dem Phagen  $\Phi$ 52 inserierten DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 identifiziert werden. Parallele Hybridisierungen der hydrolysierten DNA von  $\Phi$ 52 und chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 bestätigten die identische Anordnung von *acbV* im Chromosom und  $\Phi$ 52 (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die Lage von *acbV* relativ zu den bereits bekannten Teilen des *acb*-Genclusters durch Hybridisierungen des  $\Phi$ 52 Derivates pHTW200 (**Abb.** 3.1.1; **Kap.** 2.9.7) mit dem terminalen 3,3 kb *Sst*I-Fragment des Phagen  $\phi$ 54, der einen Teil des bereits beschriebenen *acb*-Gencluster codiert, untersucht (**Tab.** 2.1.3, p54S5; M. JARLING, persönliche Mitteilung; STRATMANN, 1997). Die erhaltenen Hybridisierungssignale zeigten eine Überlappung der in den GEM12-Derivaten  $\Phi$ 54 und  $\Phi$ 52 klonierten Segmente der chromosomalen DNA von ca. 2,5 kb (Daten nicht gezeigt). Sowohl der Nachweis von *acbV* als auch die partielle Identität der Phagen  $\Phi$ 52 und  $\Phi$ 54 wurde durch die Bestimmung der kompletten DNA-Sequenz des Inserts von  $\Phi$ 52 bestätigt (**Kap.** 3.5). Eine physikalische Karte des in dem Phagen  $\Phi$ 52 integrierten 20,13 kb großen Fragments chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110, die Position von *acbV* sowie die Lage des Inserts von  $\Phi$ 52 relativ zu dem in  $\Phi$ 54 ist in **Abb.** 3.1.1 schematisch dargestellt.

### 3.2 $\phi$ 52: Subklonierungs- und Sequenzierungsstrategie

Die, in dem Phagen  $\Phi$ 52 klonierten, 20,13 kb chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 wurden auf 3 *Sst*I-Fragmenten (pHTW200, pHTW201, pHTW203; **Tab.** 2.1.3) isoliert, und die Orientierung der *Sst*I-Fragmente zueinander durch die Plasmide pHTW239.2 und pHTW240 verifiziert. Die in den Plasmiden pHTW239.2 und pHTW240 inserierte DNA wurde durch PCR mit chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 (pHTW240) oder pHTWCos6 (pHTW239.2) als Template erhalten (**Tab.** 2.1.3; . 2.9.11). Ausgehend von diesen Plasmiden wurden die in **Abb.** 3.1.1 dargestellten sowie die in **Tab.** 2.1.3 aufgeführten Subklone erstellt und in Kombination mit einer „Primer-Walking“-Strategie zur Sequenzierung des Inserts von  $\Phi$ 52 verwendet (**Kap.** 2.9.9; **Tab.** 2.2.1). Zusätzlich wurden Subklone des Cosmids pHTWCos6 benutzt, um noch vorhandene Sequenzlücken zu schließen (pHTW218, pHTW219, pHTW222; **Tab.** 2.1.3; **Kap.** 3.1.1). Die DNA-Sequenz des Inserts von  $\Phi$ 52 wurde bis auf die gekennzeichneten Bereiche doppelsträngig sequenziert (**Abb.** 3.1.1). Die einzelsträngig sequenzierten Bereiche des Plasmids pHTW200 waren identisch mit der von DIAZ-GUARDAMINO (2000) beschriebenen Sequenz des 5,12 kb *Bgl*II-*Kpn*I-Fragments chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110.



**Abb.** 3.1.1 Physikalische Karte des GEM12-Phagen  $\Phi$ 52.

Die physikalische Karte des Inserts von  $\Phi$ 52 sowie dessen Lage relativ zu dem Insert von  $\Phi$ 54 ist schematisch dargestellt. Wichtige Subklone aus  $\Phi$ 52 sowie die Lage von pMD418.2 sind angegeben. Die terminalen *Sst*I-Schnittstellen (\*) entstammen dem Polylinker des Phagen GEM12 und sind in *Actinoplanes* sp. SE50/110 nicht vorhanden. Es wurden nur die zur Konstruktion von Plasmiden verwendeten *Sph*I-Schnittstellen eingezeichnet. Einzelsträngig sequenzierte Bereiche sind durch Kästchen gekennzeichnet.

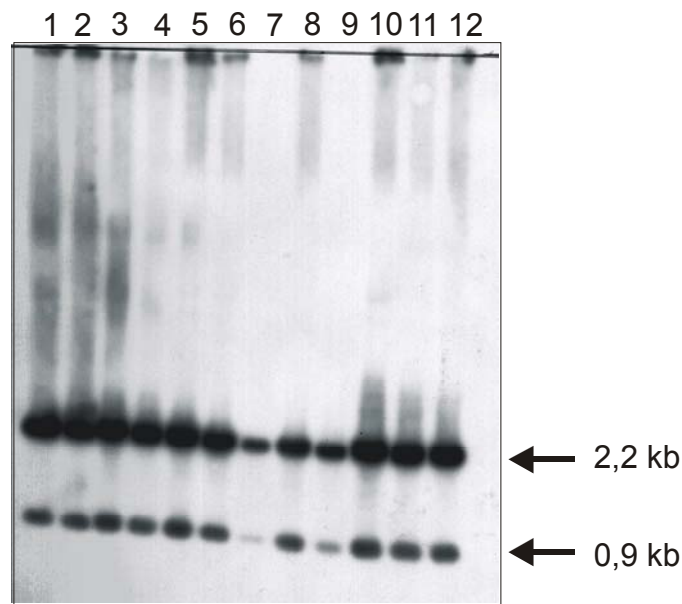
### 3.3 Konstruktion einer Cosmid-Bank chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110

Zusätzlich zu der schon vorhandenen Phagen-Genbank genomischer DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 (M. JARLING, persönliche Mitteilung) wurde eine Genbank chromosomaler DNA in dem Shuttlecosmid pOJ446 erstellt. Dieses Cosmid kann sowohl in *E. coli* als auch in *S. lividans* 66 propagiert werden (BIERMANN et al., 1992) und ermöglichte die heterologe Expression von *acb*-Genen, z. B. in *S. lividans* 66 TK23. Ziel war die Isolierung von rekombinanten Cosmiden, die das komplette *acb*-Gencluster enthielten und zur heterologen Produktion von Acarbose verwendet werden konnten.

Entscheidend für die Konstruktion einer repräsentativen Cosmid-Bank genomischer DNA war die Isolierung hochmolekularer DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110. Dies wurde durch die in **Kap.** 2.9.12 beschriebene Methode erreicht. Eine vergleichbare Effizienz bzgl. der durchschnittlichen Größe der chromosomalen DNA konnte weder bei der Verwendung von Lysozym oder einer geringeren Mutanolysin-Konzentration zur Sphäroplastierung von *Actinoplanes* sp. SE50/110 erreicht werden. Ebenso wurde bei Verwendung des Anionenaustauschers Qiatip-100 (Qiagen, Hildesheim Deutschland) eine geringere durchschnittliche Größe der genomischen DNA erhalten (Daten nicht gezeigt). Durch partielle Hydrolyse der chromosomalen DNA mit der Restriktionsendonuclease *Sau3A* I wurden nach 5 min Inkubationsdauer DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von über 25 kb erhalten. Diese wurden in den Cosmid-Vektor pOJ446 ligiert, in  $\lambda$ -Phagenpartikel verpackt und in *E. coli* XL1-Blue Zellen transduziert. Es wurden 2800 rekombinante *E. coli* XL1-Blue Stämme isoliert und in Mikrotiterplatten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zusätzlich wurden diese auf HybondN+-Membranen repliziert, kultiviert und die auf den Membranen gewachsenen Kolonien für Koloniehybridisierungen verwendet (**Kap.** 2.9.8). Um die durchschnittliche Insertgröße der rekombinanten Cosmide zu überprüfen, wurde die Cosmid-DNA aus sechs rekombinanten *E. coli* XL1-Blue-Stämmen isoliert (**Kap.** 2.9.1) und das *Bam*HI-Fragmentmuster analysiert. Alle sechs Cosmide enthielten chromosomale DNA-Fragmente von über ca. 30 kb (Daten nicht gezeigt). Bei einer Genomgröße von ca. 8 Mb und einer zugrunde gelegten durchschnittlichen Insertgröße von 32 kb ergab sich eine ungefähr 10-11 fache Abdeckung des Genoms von *Actinoplanes* sp. SE50/110 durch die rekombinanten Cosmide. Die exakte Genomgröße von *Actinoplanes* sp. SE50/110 war zwar bisher nicht bekannt, schien aber aufgrund von ersten Pulsfield-Gelelektrophorese-Analysen in dieser Größenordnung zu liegen (C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung). Eine Insertgröße von 32 kb wurde angenommen, da dies zusammen mit dem Vektor pOJ446 die für eine Verpackung in  $\lambda$ -Phagenpartikel erforderliche minimale Cosmidgröße ergab (STRATAGENE, Niederlande).

### 3.4 Identifizierung von rekombinanten Cosmiden, die Bereiche des *acb*-Genclusters codieren.

Zur Identifizierung rekombinanter Cosmide, deren Inserts mit demjenigen des Phagen  $\Phi 52$  und/oder bereits bekannten Bereichen des *acb*-Genclusters übereinstimmten, wurden „Kolonie-Hybridisierungen“ mit drei DNA-Sonden aus verschiedenen Regionen des *acb*-Genclusters und der Cosmidbank durchgeführt (**Kap.** 2.9.8; STRATMANN, 1997; STRATMANN et al., 1999; M. JARLING, persönliche Mitteilung). In Hybridisierungen von 1250 rekombinanten *E. coli* XL1-Blue-Stämmen sowohl mit einer DNA-Sonde, welche die Gene *acbFG* (pAS5/7; STRATMANN, 1997) codierte, als auch mit dem 3,2 kb Insert des Plasmids pHTW207 (**Abb.** 3.1.1) wurde jeweils ein rekombinantes Cosmid identifiziert und als pHTWCos1 (pAS5/7 als DNA-Sonde; **Abb.** 3.4.2) bzw. pHTWCos2 (pHTW207 als DNA-Sonde; Daten nicht gezeigt) bezeichnet. Da die Identifizierung von jeweils nur einem Cosmid im Widerspruch zu der ermittelten ca. 5-fachen Redundanz der von 1250 Cosmiden codierten chromosomalen DNA stand, wurde eine weitere Hybridisierung mit dem *acbC*-Gen durchgeführt (pAS8/5, STRATMANN et al., 1999). Hierfür wurden weitere 1250 rekombinante *E. coli* XL1-Blue-Stämme der Cosmidbank verwendet. Dabei wurden 6 positive Hybridisierungssignale erhalten und mit pHTWCos3 bis pHTWCos8 bezeichnet. Die Lokalisation des *acbC*-Gens auf einem 2,2 kb und einem 0,9 kb großen *Bam*HI-Fragment wurde durch eine Hybridisierung der mit *Bam*HI hydrolysierten DNA von pHTWCos3-8 nachgewiesen (**Abb.** 3.4.1; STRATMANN et al., 1999). Auch entsprach die Anzahl von sechs mit der DNA-Sonde hybridisierenden Cosmiden den theoretischen Erwartungen und bestätigte die postulierte 10-11 fache Redundanz für 2800 rekombinanten Cosmide. Weiterführende Analysen wurden mit den Cosmiden pHTWCos1 und pHTWCos6 durchgeführt.



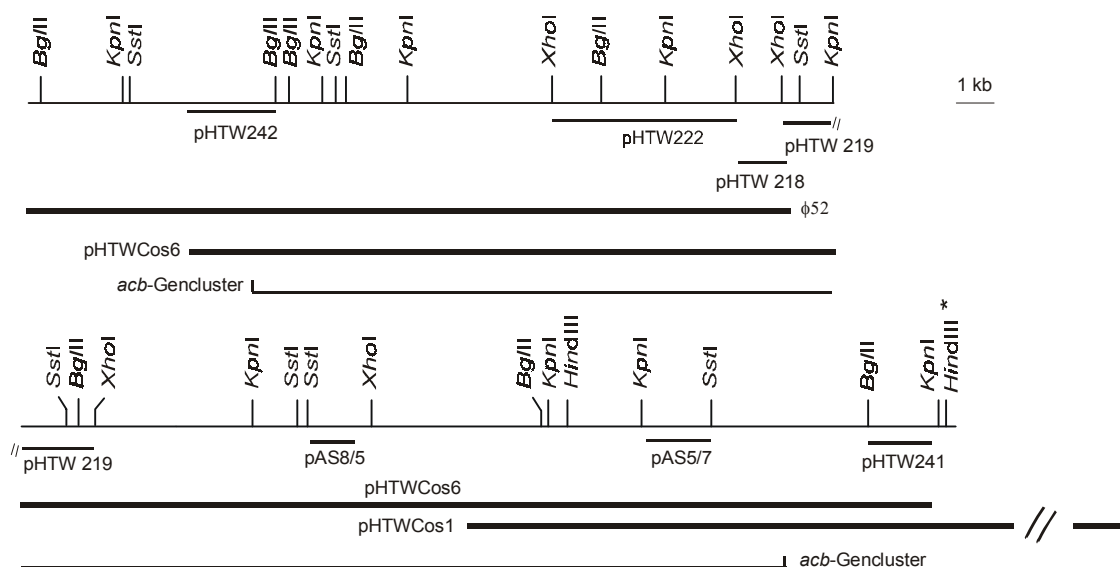
**Abb. 3.4.1:** Nachweis von *acbC* in pHTWCos3-8.

Dargestellt ist das Autoradiogramm der Hybridisierung von *Bam*HI-hydrolysiertes DNA der angegebenen Cosmide mit dem Insert von pAS8/5 (*acbC*) als Gensonde. Es wurden jeweils zwei parallele DNA-Isolationen je Cosmid durchgeführt. Die Größe der hybridisierenden *Bam*HI-Fragmente ist angegeben. Spur 1,2, pHTWCos3; Spur 3,4, pHTWCos4; Spur 5,6 pHTWCos5; Spur 7,8, pHTWCos6; Spur 9,10, pHTWCos7; Spur 11,12, pHTWCos8

### 3.4.1 Lokalisation verschiedener mit dem *acb*-Gencluster überlappender Cosmid-Klone.

Die Lage der in den Cosmiden pHTWCos1 und pHTWCos6 klonierten DNA-Segmente zueinander und relativ zu dem *acb*-Gencluster ist in **Abb. 3.4.2** dargestellt. Zugrunde gelegt wurden dabei sowohl die schon beschriebenen und sequenzierten Regionen des *acb*-Genclusters, als auch die in dieser Arbeit neu analysierten Bereiche des Phagen  $\Phi$ 52 (STRATMANN, 1997; STRATMANN et al., 1999; DIAZ-GUARDAMINO, 2000; HEMKER et al., 2001; M. JARLING, persönliche Mitteilung; **Kap. 3.5**). Eine vorläufige physikalische Kartierung des Inserts des Cosmids pHTWCos1 ergab, dass es ca. 32 kb chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. umfasste und die Analyse von ca. 21 kb unbekannter DNA upstream von *asp3.3* ermöglichte (**Abb. 4.1.1**; M. JARLING, persönliche Mitteilung). Der Beginn von pHTWCos1 wurde durch Hybridisierungen mit der schon zur Identifizierung des Cosmids verwendeten und die Gene *acbGF* enthaltenden DNA-Sonde (pAS5/7) festgelegt.

Das Cosmid pHTWCos6 enthielt insgesamt 41,14 kb chromosomale DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 und umfasste das gesamte postulierte *acb*-Gencluster. Zusätzlich zu der physikalischen Kartierung wurden die Subklone pHTW218, pHTW219, pHTW222, pHTW241 und pHTW242 zur partiellen Überprüfung der DNA-Sequenz verwendet (Abb. 3.4.2; Tab. 2.1.3). Abweichungen zwischen diesen und der bereits bekannten DNA-Sequenz wurden dabei nicht festgestellt. Die exakte Position innerhalb des *acb*-Genclusters sowie die Insertgröße wurde durch die DNA-Sequenzierung der Enden des Inserts von pHTWCos6 erhalten (pHTW241 & 242; STRATMANN, 1997; M. JARLING, persönliche Mitteilung; diese Arbeit). Die Isolierung von pHTWCos6 bestätigte im Folgenden die in dieser Arbeit vorgestellten sowie bisherige Untersuchungen zur Organisation des *acb*-Genclusters. Darüberhinaus konnte das Cosmid pHTWCos6 in Versuchen zur heterologen Expression des gesamten *acb*-Genclusters verwendet werden.



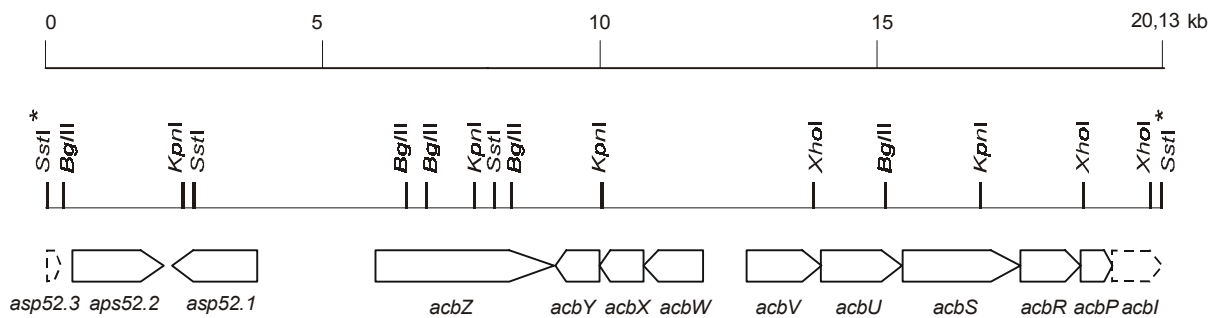
**Abb. 3.4.2 :** Anordnung der Cosmide pHTWCos6 und pHTWCos1 relativ zum *acb*-Gencluster.

Die Lage des Inserts von pHTWCos1 und pHTWCos6 relativ zum *acb*-Gencluster und benachbarten Regionen im Chromosom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 ist dargestellt. Für pHTWCos 1 wurde nur der terminale Bereich bis zur mit \* markierten *Hind*III-Site analysiert. Zusätzlich sind die Subklone von pHTWCos6 und die zur Identifikation der Cosmide verwendeten Plasmide eingezeichnet (vgl. Kap. 3.4).

### 3.5 Analyse der DNA-Sequenz von *Actinoplanes* sp. SE50/110 auf $\Phi$ 52

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten und auf dem Insert des Phagen  $\Phi$ 52 vorliegenden 20,13 kb chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Anhang dargestellt (**Kap.** 2.9.9 & 2.16). Der durchschnittliche GC-Gehalt von 72 % entsprach der für Actinomyceten zu erwartenden Zusammensetzung der DNA (BIBB, et al., 1984). Die durch eine physikalische Kartierung vorgenommene Zuordnung des, bereits vorher sequenzierten, 5,12 kb *Bgl*III/*Kpn*I-Fragments chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. 50/110 auf dem Insert des Phagen  $\Phi$ 52 konnte dabei bestätigt werden (**Kap.** 3.1; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Ebenso stimmte die partiell bekannte DNA-Sequenz des Phagen  $\Phi$ 54 mit den korrespondierenden Regionen des Phagen  $\Phi$ 52 überein (JARLING, persönliche Mitteilung).

Unter Berücksichtigung der für Streptomyceten typischen Kodonverwendung (BIBB et al., 1984; WRIGHT AND BIBB, 1992) wurden die 13 offenen Leserahmen *acbI*, *acbP*, *acbR*, *acbS*, *acbU*, *acbV*, *acbW*, *acbX*, *acbY*, *acbZ*, *asp52.1*, *asp52.2* sowie *asp52.3* identifiziert. Signifikante Abweichungen der Kodonverwendung in *Actinoplanes* sp. SE50/110 im Vergleich zu anderen höheren Actinomyceten waren nicht vorhanden (**Tab.** 3.5.2; BIBB et al. 1984). Die Gene *acbV*, *acbW*, *acbX* sowie partiell *acbU* wurden auch schon auf dem 5,12 kb *Bgl*III/*Kpn*I-Fragment nachgewiesen, und die Sequenz von *acbV* bzw. *acbX* konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Hingegen wurde der Start von *acbW* neu bestimmt und die Korrekturen in *acbU* widerlegten den Nachweis von Walker-Motiven in AcbU (DNA-Sequenz des 5,12 kb *Bgl*III/*Kpn*I-Fragments, M. DIAZ-GUARDAMINO, persönliche Mitteilung, November 1999; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Die Anordnung und Transkriptionsrichtung der Leserahmen ist in **Abb.** 3.5.1 schematisch dargestellt. Abweichend von den übrigen Leserahmen sind *acbI* sowie *asp52.3* nur partiell vorhanden und codieren für 262 bzw. 59 Aminosäuren. Wahrscheinlich bildeten die Leserahmen *acbVUSRPI* bzw. *acbWXY* jeweils ein durchgehendes Transkript, da mit Ausnahme von *acbU* und *acbS* die Start- und Stoppkodons benachbarter Gene überlappten. Eine potentielle Ribosomenbindestelle in dem für Actinomyceten typischen Abstand zum Startcodon konnte für *acbU*, *acbV*, *acbZ* und *asp52.1* identifiziert werden (**Tab.** 3.5.1; STROHL, 1992). Im Gegensatz zu *acbE* und *acbD* war der Nachweis der -10 und -35 Region von  $\sigma$ 70-Faktor abhängigen Promotoren (*E. coli*-ähnlich) in den intergenischen Region zwischen *acbV* und *acbW* bzw. *acbZ* und *asp52.1* nicht möglich (STROHL, 1992; STRATMANN, 1997). Hingegen war das konservierte und bereits upstream von *acbA*, *acbB*, *acbD*, *acbE* und *acbC* nachgewiesene Hexanucleotid C/ATTGCT/A auch upstream von *acbV* vorhanden (Anhang; STRATMANN, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Dies wurde auch in der regulatorischen Region von Genen des Stärkemetabolismus, unter anderem *malP* aus *E. coli* und *malE* aus *S. coelicolor* A3(2), nachgewiesen und könnte an der Induktion der Acarbosebiosynthese durch Maltose/Maltotriose beteiligt sein (DEBARBOUILLE et al., 1982, DANOT AND RAIBAUD, 1994; STRATMANN, 1997; VAN WENZEL et al., 1997).



**Abb. 3.5.1:** Anordnung der auf dem Phagen Φ52 identifizierten Leserahmen.

Die in dieser Arbeit identifizierten Leserahmen sowie ihre Transkriptionsrichtung ist angegeben. Die gestrichelt dargestellten Leserahmen sind nur partiell vorhanden. Die Sterne (\*) markieren die *SstI*-Schnittstellen des GEM12-Polylinkers; sie sind im Chromosom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 nicht vorhanden.

**Tab 3.5.1 :** Postulierte Ribosomenbindestellen der offenen Leserahmen *acbS*, *acbV*, *acbW*, *acbZ* und *asp52.1*.

Leserahmen	Sequenz der Ribosomenbindestelle <sup>a</sup>
<i>acbS</i>	GCCGGTCA <u>CCGGG</u> GAGAGCTGAGCAC <b>ATG</b>
<i>acbV</i>	TATCCCCTTC <u>AGGAG</u> TGACCCGTGAT <b>GTG</b>
<i>acbW</i>	CATGCCCGGCC <u>GACGG</u> ACGACCGGC <b>ATG</b>
<i>acbZ</i>	CGTCACGCCCCG <u>AGGAGG</u> GCCGCGTC <b>TTG</b>
<i>asp52.1</i>	CGACGCGGCCGA <u>ACGAG</u> GCACGGA <b>ATG</b>
16S rRNA	3' -UCUUUCCUCCACUA-5'

- (a) Die postulierte Ribosomenbindestelle ist kursiv gedruckt und die zum 3'-Ende der 16S rRNA aus *S. griseus* und *S. lividans* komplementären Nukleotide sind unterstrichen (EUNJOON et al., 1993; BIBB AND COHEN, 1982). Das Startkodon ist fett hervorgehoben.



**Tab 3.5.2 :** Kodonnutzung der identifizierten Leserahmen

Kodon <sup>a</sup>	<i>acbI</i> <sup>b,c</sup>	<i>acbP</i> <sup>b</sup>	<i>acbR</i> <sup>b</sup>	<i>acbS</i> <sup>b</sup>	<i>acbU</i> <sup>b</sup>	<i>acbV</i> <sup>b</sup>	<i>acbW</i> <sup>b</sup>	<i>acbX</i> <sup>b</sup>	<i>acbY</i> <sup>b</sup>	<i>acbZ</i> <sup>b</sup>	<i>asp52.1</i> <sup>b</sup>	<i>asp52.2</i> <sup>b</sup>	<i>asp52.3</i> <sup>b,c</sup>
TTT/ <b>F</b>	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
TTC/ <b>F</b>	9	3	13	35	10	14	11	12	18	39	12	8	2
TTA/ <b>L</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1</b>	-	-
TTG/ <b>L</b>	-	1	1	3	2	2	-	2	1	4	2	8	1
CTT/ <b>L</b>	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	4	-
CTC/ <b>L</b>	10	3	5	17	11	18	9	18	17	20	11	14	2
CTA/ <b>L</b>	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	4	-
CTG/ <b>L</b>	26	12	28	53	45	34	28	30	34	48	20	39	6
ATT/ <b>I</b>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-
ATC/ <b>I</b>	4	5	11	19	15	13	21	12	11	30	15	27	-
ATA/ <b>I</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-
ATG/ <b>M</b>	5	5	7	9	6	4	7	4	7	9	8	11	1
GTT/ <b>V</b>	1	-	-	1	1	1	-	-	1	2	2	4	-
GTC/ <b>V</b>	10	7	11	23	12	12	22	10	7	44	22	26	4
GTA/ <b>V</b>	1	-	2	3	-	2	-	2	-	-	3	2	-
GTG/ <b>V</b>	11	6	26	27	16	25	12	12	12	39	9	22	-
TAT/ <b>Y</b>	1	-	1	3	2	1	-	-	1	-	5	1	-
TAC/ <b>Y</b>	15	9	11	19	12	7	7	8	11	44	15	6	1
TAA/ <b>Z</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAG/ <b>Z</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAT/ <b>H</b>	2	-	-	1	4	1	-	-	-	2	3	2	-
CAC/ <b>H</b>	7	4	12	28	18	18	9	2	4	21	6	10	1
CAA/ <b>Q</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	3	-
CAG/ <b>Q</b>	6	7	10	23	15	8	11	6	8	39	15	13	2
AAT/ <b>N</b>	-	-	1	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-
AAC/ <b>N</b>	-	2	2	10	44	6	4	8	4	20	26	10	3
AAA/ <b>K</b>	1	1	-	1	-	1	1	-	-	3	1	1	-
AAG/ <b>K</b>	-	-	3	7	1	3	5	1	1	21	12	5	-
GAT/ <b>D</b>	1	1	2	5	3	2	3	-	-	4	-	6	-
GAC/ <b>D</b>	17	11	25	49	30	23	25	4	7	87	23	24	2
GAA/ <b>E</b>	4	3	2	8	9	8	3	-	1	4	3	2	-
GAG/ <b>E</b>	11	9	15	32	16	20	12	4	3	23	4	12	5

Fortsetzung

Fortsetzung **Tab. 3.5.2**

Kodon <sup>a</sup>	<i>acbl</i> <sup>b,c</sup>	<i>acbP</i> <sup>b</sup>	<i>acbR</i> <sup>b</sup>	<i>acbS</i> <sup>b</sup>	<i>acbU</i> <sup>b</sup>	<i>acbV</i> <sup>b</sup>	<i>acbW</i> <sup>b</sup>	<i>acbX</i> <sup>b</sup>	<i>acbY</i> <sup>b</sup>	<i>acbZ</i> <sup>b</sup>	<i>asp52.1</i> <sup>b</sup>	<i>asp52.2</i> <sup>b</sup>	<i>asp52.3</i> <sup>b,c</sup>
TCT/ <b>S</b>	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2	-
TCC/ <b>S</b>	4	3	2	5	7	6	4	3	4	16	10	6	-
TCA/ <b>S</b>	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	2	3	-
TCG/ <b>S</b>	1	3	5	8	7	9	6	6	1	12	8	6	1
CCT/ <b>P</b>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2	-	-
CCC/ <b>P</b>	8	2	6	10	13	6	3	3	3	17	7	6	-
CCA/ <b>P</b>	-	-	1	-	-	2	-	-	-	1	2	3	-
CCG/ <b>P</b>	13	8	19	37	25	18	12	12	10	50	18	17	4
ACT/ <b>T</b>	-	-	-	-	-	2	1	-	-	1	1	2	-
ACC/ <b>T</b>	5	7	16	26	20	20	15	8	17	70	38	19	3
ACA/ <b>T</b>	-	2	1	1	3	-	1	-	-	-	5	1	-
ACG/ <b>T</b>	3	3	2	9	5	7	4	3	4	16	16	8	-
GCT/ <b>A</b>	-	1	-	2	-	1	-	3	-	-	4	8	-
GCC/ <b>A</b>	22	19	23	62	39	46	22	25	11	85	41	30	2
GCA/ <b>A</b>	-	-	1	3	2	4	1	3	1	4	5	5	-
GCG/ <b>A</b>	10	5	18	26	24	17	7	18	13	42	17	45	3
TGT/ <b>C</b>	-	1	-	1	1	-	-	1	-	-	-	1	-
TGC/ <b>C</b>	-	1	2	6	2	8	1	-	2	-	12	7	-
TGA/ <b>Z</b>	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
TGG/ <b>W</b>	2	5	5	12	10	3	3	4	7	20	15	11	-
CGT/ <b>R</b>	-	3	2	5	3	3	-	2	-	8	2	4	-
CGC/ <b>R</b>	9	7	12	20	14	13	15	6	9	23	8	17	4
CGA/ <b>R</b>	-	2	1	1	3	4	1	1	-	6	-	3	-
CGG/ <b>R</b>	13	8	18	40	32	28	22	6	9	51	7	19	2
AGT/ <b>S</b>	1	-	3	1	1	-	-	1	-	2	3	1	-
AGC/ <b>S</b>	7	4	4	8	9	7	8	3	6	18	14	7	2
AGA/ <b>R</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-
AGG/ <b>R</b>	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	2	4	-
GGT/ <b>G</b>	3	1	4	7	4	6	2	4	-	15	7	13	-
GGC/ <b>G</b>	12	13	17	27	23	26	17	14	8	74	39	18	6
GGA/ <b>G</b>	2	2	4	5	1	4	2	3	-	4	1	2	-
GGG/ <b>G</b>	5	5	8	9	9	12	5	2	13	25	4	13	2

(a) Angegeben sind die Kodons sowie die entsprechenden Aminosäuren im Ein-Buchstabenkode (fett gedruckt).

(b) Die Zahlen geben die Summe der verwendeten Kodons an.

(c) Die Leserahmen sind auf dem Insert des Phagen  $\phi$ 52 nur partiell vorhanden.

### 3.5.1 Das Genprodukt AcbI

Der offene Leserahmen *acbI* ist auf dem Phagen  $\Phi 52$  nur partiell vorhanden und codiert 262 Aminosäuren. Im Vergleich zu den Übrigen neu identifizierten Proteinen konnten keine Übereinstimmungen zwischen AcbI und bekannten Proteinen nachgewiesen werden. Auch Vergleiche mit Proteindomänen bzw. Proteinmotivdatenbanken ergaben kein Ergebnis. Das Protein AcbI ist daher als Mitglied einer bisher noch unbekanntem Proteinfamilie zu charakterisieren.

### 3.5.2 Das Genprodukt AcbP

Das Genprodukt des offenen Leserahmens *acbP* konnte aufgrund des Vergleichs der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Proteindatenbanken der sehr heterogenen Gruppe der Nudix-Hydrolasen zugeordnet werden (COG 0494; **Kap.** 2.19; TATUSOV et al., 2001). Enzyme dieser Familie hydrolysieren Nukleosiddiphosphate, die über Phosphorsäureester- und/oder Phosphorsäureanhydridbindungen mit einem weiteren Molekül verbunden sind (BESSMAN et al., 1996; DUNN et al., 1999). Obwohl das charakteristische Sequenzmotiv Gx(5)Ex(7)RE(I,V,L)xEEExG(I,L,V) nur partiell in AcbP konserviert war, konnte die entsprechende Proteindomäne in der Pfam-Datenbank identifiziert werden (PF00293; **Kap.** 2.19; BATEMAN et al., 2000). Auffällig war, dass im Gegensatz zu allen übrigen Mitgliedern dieser Familie zwar der erste Glycin-Rest des Nudix-Motives (G1; Nummerierung bezogen auf das Nudix-Motiv) sowie das Ende mit der Aminosäuresequenz ELAEETGL konserviert waren, jedoch die Aminosäuren E6 und R14 nicht vorhanden waren. Auch war der Abstand zwischen dem proximalen Glycin und dem zweiten konservierten Aminosäurebereich dieses Motives mit 16 Aminosäuren um drei Aminosäuren länger als erwartet (**Abb.** 3.5.2.1).

Innerhalb der Gruppe der Nudix-Hydrolasen wies AcbP die höchsten Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz mit einer ADP-Ribose-Phosphohydrolase aus *Bacillus subtilis* auf (ADPP, Accession-Nr. P54570, EC 3.6.1.13; DUNN et al., 1999; **Abb.** 3.5.2.1). Auffällig war, dass beide Proteine mit 195 (AcbP) bzw. 185 (ADPP) Aminosäuren eine fast identische Länge aufwiesen, und über die gesamte Länge der ADPP eine Vielzahl in beiden Proteinen konservierter Aminosäuren vorhanden waren. Im Gegensatz zu AcbP lag in der ADPP auch das für Nudix-Hydrolasen charakteristische Sequenzmotiv vollständig konserviert vor (DUNN et al., 1999; **Abb.** 3.5.2.1). Zusätzlich zu dem Nudix-Motiv war ein zweiter C-terminal zu diesem gelegener konservierter Bereich in beiden Proteinen vorhanden (**Abb.** 3.5.2.1, grau hinterlegt). Das in allen bisher bekannten ADPPs konservierte und in einem Abstand von 15 Aminosäuren zum Nudix Motiv angeordnete Prolin ist in AcbP hingegen durch ein Tyrosin substituiert (**Abb.** 3.5.2.2, durch § markiert). Dies entspricht der an dieser Position für Dinukleosidpolyphosphat-Hydrolasen typischen Aminosäure (DUNN et al., 1999). Aufgrund der, trotz der aufgeführten Unterschiede, vorhandenen Gemeinsamkeiten zwischen AcbP, der Pfam-Domäne PF00293 (Nudix-Hydrolasen) und insbesondere der ADPP aus *B.*

*subtilis* war AcbP eindeutig in die Gruppe der Nudix-Hydrolasen einzuordnen. Die Substitution des in allen bekannten ADPPs hochkonservierten Prolins deutete jedoch auf ein modifiziertes Substratspektrum von AcbP im Vergleich zur ADPP hin.

```

ADPP      MKSLEEKTIAKEQIFSGKVIDLYVEDVELPNGKASKREIVKHPGAVAVLAVTDEGKIIMV
AcbP      -MTGAVRAVRSREYVRNPWMSVREDDIVHADGSPGSYGVVTKPD-YALII PRDNGLLHLV
           :   :::   :::   : :   :*   :*   :*   :*   *::   **   : :*
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

ADPP      KQFRKPLERTIVEIPAGKLEK---GEEPEYALRELEEEETGYTAKKLTKITAFYTS PGFA
AcbP      EQYRYPVGGRFWEFPQGSWPADAAGGAADLLARTELAEEETGLRAGRLTPLGRIHVAYGYA
           : * : * * :   : * : * * *   *   : * * * * * * *   * : * * :   : : * : *
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

ADPP      DEIVHVFLAEELSVLEEKRELEDEDEFVEVMEVTLEDALKLVESREYDAKTAYAIQYLQL
AcbP      SQGCHVFLAEQLTAGRSQRERTESD-MRQRAVDAAGWADLVGSGRITDAATLAAYTLIRM
           :   * * * * * : * :   : * * *   :   :   :   :   :   :   :   :

ADPP      KEALQAQK
AcbP      YDSGTRQPMPEGAESCTW
           : :   *

```

**Abb. 3.5.2.1 :** Vergleich der Aminosäuresequenz von AcbP mit einer ADP-Ribose Phosphohydrolase aus *B. subtilis*.

Die für die Gruppe der Nudix-Hydrolasen charakteristischen Aminosäuren sind in der Sequenz von ADPP fett hervorgehoben, und der in AcbP komplementäre Bereich ist unterstrichen. Ein weiterer zwischen beiden Proteinen konservierter Bereich ist grau hinterlegt. § kennzeichnet das in allen bekannten ADPPs konservierte Prolin. Identische (\*) sowie konservierte (:) Aminosäuren sind gekennzeichnet

ADPP: ADP-Ribose Phosphohydrolase aus *B. subtilis* (Accession-Nr. P54570).

AcbP : *Actinoplanes* sp. SE50/110 (diese Arbeit)

### 3.5.3 Das Genprodukt AcbR

Das aus der DNA-Sequenz abgeleitete Genprodukt von *acbR* konnte durch Vergleiche der Aminosäuresequenz mit der Pfam-Datenbank eindeutig in die Familie der Nucleotidyl-Transferasen eingeordnet werden (Pyrophosphohydrolasen, Accession-Nr. PF00483, E-Value=2.1e-27; COG 0448; BATEMAN et al., 2000; TATUSOV et al., 2001). Die Mitglieder dieser Enzym-Familie transferieren verschiedene Nucleotide auf eine Vielzahl unterschiedlicher Zuckerphosphate.

Innerhalb der Gruppe der Nucleotidyl-Transferasen wies AcbR (363 Aminosäuren) die höchsten Übereinstimmungen mit ADP-Glucose Pyrophosphorylasen (EC 2.7.7.27; **Tab.** 3.5.3.1) auf. Hierbei waren die signifikantesten Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz mit 35% identischen Aminosäuren zwischen AcbR und der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase aus *B. stearothermophilus* GlgC vorhanden (TAKATA et al., 1997). Die bakteriellen ADP-Glucose Pyrophosphorylasen aus *B. subtilis*, *S. coelicolor* A3(2), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Salmonella typhimurium* und *E. coli* (KIEL et al., 1994; MARTIN et al., 1997; COLE et al., 1998; LEUNG and PREISS, 1987; BAECKER, et al.,

1983) sowie jeweils die kleine Untereinheit der pflanzlichen ADP-Glucose Pyrophosphorylasen aus *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba* und *Solanum tuberosum* (LA COGNATA et al., 1995; TABATA, et al., 2000; VILLAND et al., 1992; WEBER et al., 1995) wiesen zwischen 28 % und 33 % identische Aminosäuren mit AcbR auf. Somit bestand kein wesentlicher Unterschied in dem Grad der Übereinstimmung zwischen AcbR und Enzymen aus nahe verwandten Mikroorganismen sowie stammesgeschichtlich weit entfernten pflanzlichen Enzymen.

**Tab. 3.5.3.1:** Vergleich bakterieller und pflanzlicher ADP-Glucose Pyrophosphorylasen mit AcbR.

Species. <sup>a</sup>	Identische Aminosäuren mit AcbR [%]
<i>B. stearothermophilus</i>	35
<i>B. subtilis</i>	31
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	31
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	33
<i>E. coli</i>	30
<i>S. typhimurium</i>	30
<i>H. vulgare</i>	28
<i>V. faba</i>	28
<i>S. tuberosum</i>	31
<i>A. thaliana</i>	28

(a) Glucose-Pyrophosphorylasen aus diesen Organismen wurden mit AcbR verglichen. Datenbank-Accession-Nr. siehe Abb. 3.5.5.2

Zusätzlich wurden zwei in ADP-Glucose Pyrophosphorylasen konservierte Regionen mit AcbR verglichen (**Abb. 3.5.3.1**). Im Gegensatz zu allen untersuchten ADP-Glucose Pyrophosphorylasen war die Aminosäure Alanin des aminoterminal gelegenen Sequenzmotivs PAV in AcbR durch ein Leucin ersetzt (**Abb. 3.5.3.1 A**). Für das Enzym aus *E. coli* wurde eine Beteiligung dieses Motivs an der allosterischen Regulation der Enzymaktivität nachgewiesen (SMITH-WHITE AND PREISS, 1992). Auch die an der Bindung des Adeninrings beteiligte Aminosäure Tyrosin war in AcbR nicht vorhanden (Position 114 in *E. coli*; KUMAR et al., 1988). Die Substratbindestelle für Glucose-1-phosphat, FxEKP, war hingegen auch in AcbR konserviert. Essentiell für die Substratbindung in der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase aus *E. coli* war die Aminosäure K194 (**Abb. 3.5.3.1 B**.; HILL et al., 1991; PREISS AND ROMEO, 1994). Auffällig war, dass AcbR innerhalb der Nucleotidyl-Transferase Familie zwar eindeutig in die Unterfamilie der ADP-Glucose Pyrophosphorylasen einzuordnen war, die Übereinstimmungen zwischen den Enzymen aus den verwandten Bakterien *S. coelicolor* A3(2) und *M. tuberculosis* H37Rv mit ca. 60% identischer Aminosäuren aber wesentlich höher waren als die Übereinstimmungen von AcbR zu diesen Enzymen (ca. 30% identische Aminosäuren, **Tab. 3.5.3.1**). Dies könnte bedeuten, dass die Substratbindeeeigenschaften, trotz des konservierten Bindemotivs, und damit auch die Funktion von AcbR nicht identisch mit derjenigen der ADP-Glucose Pyrophosphorylasen

ist. Welches Nukleosidtriphosphat als Cosubstrat von AcbR verwendet wird, lies sich basierend auf den Sequenzdaten nicht zweifelsfrei festlegen. Wenngleich die Übereinstimmungen mit den ATP verwendenden ADP-Glucose Pyrophosphorylasen am größten waren, spricht das Fehlen des konservierten und an der Bindung des Adeninrings beteiligten Tyrosinrestes gegen ATP als Cosubstrat.

## A.

```

GLGC_BAST      24 -NIAKPAVPPFGG-34
GLGC_BASU      24 -NMAKPAVSFGG-34
GLGC_SALTY     39 -KRAKPAVHFGG-49
GLGC_ECOLI     38 -KRAKPAVHFGG-48
GLGC_MYCTB     26 -DRAKPAVPPFGG-36
GLGC_STRCO     20 -ARAKPAVTFGG-30
GLGS_ARATH     109-KRAKPAVPLGA-119
GLGS_HORVU     102-KRAKPAVPLGA-112
GLG3_SOLTU     68 -RRAKPAVPMGG-78
GLGS_VICFA     97 -KRAKPAVPLGA-107
AcbR           24 -GRLKPLVPPFGG-34
                ** * :*.

```

## B.

```

GLGC_BAST      145-QADVTISVIEVPWEEASRFGIMNTNEEMEIVEFAEKPAEPK-----SNLASMG-192
GLGC_BASU      145-KADVTISVIEVGWEEASRFGIMKANPDGTITHFDEKPKFPK-----SNLASMG-192
GLGC_SALTY     160-GARCTVACMPVPIKEATAFGVMAVDESCKIIDFVEKPANP-AMLDASKSLASMG-213
GLGC_ECOLI     159-GARCTVACMPVPIEEASAFGVMAVDENDKIIIEFVEKPANPPSPNDPSKSLASMG-213
GLGC_MYCTU     145-GAGATVAGIRVPRENATAFGCIDADDSGRIRSFVEKPLEPPGTPDDPDPTTFVSMG-199
GLGC_STRCO     139-GAGVTVAGIRVPRAESPSLVIITPGSDGQTVTGFLEKPPNPPGLGHDPGCVFPPSMG-193
GLGS_ARATH     232-DADITVAALPMDEQRATAFGLMKIDEEGRIIEFAEKPKGEHLKAMKVDTTILGLD-286
GLGS_HORVU     225-DADITVAALPMDEERATAFGLMKIDEEGRIIEFAEKPKGEQLKAMVDTTILGLE-279
GLG3_SOLTU     196-GADITISSLPIDDSRASDFGLMKIDDTGRVMSFSEKPKGDDLKAMAVDTTVLGLS-250
GLGS_VICFA     220-DADITVAALPMDEKRATAFGLMKIDEEGRIIEFAEKPKGEQLKAMKVDTTILGLD-274
AcbR           151-GAALTVSYQRIDRRYVHLFGMVEFDDRNRLVSFVEKPAEPT-----SDLVFAA-198
                * *:: : : : * **

```

**Abb. 3.5.3.1:** Vergleich der Aminosäuresequenz aus zwei konservierten Bereichen bakterieller und pflanzlicher ADP-Glucose Pyrophosphorylasen mit AcbR.

Für die grau hinterlegten Aminosäuren konnte eine Beteiligung an der Bindung von Glucose-1-phosphat (B, Lysin) und an der allosterischen Regulation (A, Aminosäuren PAV) bei dem Enzym aus *E. coli* nachgewiesen werden. Identische (\*) sowie konservierte (:) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die Nummerierung bezieht sich auf die Position der ersten bzw. letzten Aminosäure in dem jeweiligen Protein.

Für die Aminosäuresequenzvergleiche wurden die ADP-Glucose Pyrophosphorylasen bzw. einzelne Untereinheiten dieses Enzymkomplexes der folgenden Bakterien und Pflanzen verwendet. In Klammern ist die Accession-Nummer für die Datenbanken Genbank oder Swissprot angegeben: GLGC\_BAST, *Bacillus stearothermophilus*, (O08326); GLGC\_BASU, *B. subtilis* (P39122); GLGC\_SALTY, *Salmonella typhimurium*, (P05415); GLGC\_ECOLI, *E. coli*, (P00584); GLGC\_MYCTB, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, (O05314); GLGC\_STRCO, *S. coelicolor* A3 (2) (P72394); GLGS\_ARATH, *Arabidopsis thaliana* (P55228); GLGS\_HORVU, *Hordeum vulgare* (P55238); GLG3\_SOLTU, *Solanum tuberosum* (P55243); GLGS\_VICFA, *Vicia faba* (P52416).

### 3.5.4 Das Genprodukt AcbS

Das aus der DNA-Sequenz abgeleitete Genprodukt von *acbS* zeigte zu keinem bekannten Protein über die gesamte Polypeptidkette (709 Aminosäuren) signifikante Übereinstimmungen. Eine Einordnung in die Familie der Glycosyltransferase Gruppe I konnte jedoch aufgrund der signifikanten Übereinstimmungen der Aminosäuren 318-512 mit der Konsensussequenz dieser Proteindomäne vorgenommen werden (Accession-Nr. PF0053, E-Value =  $4e^{-7}$ ; **Kap.** 2.19; BATEMAN et al., 2000; ALTSCHUL et al., 1997). Mitglieder dieser Enzymfamilie übertragen Nukleotid-aktivierte Kohlenhydrate auf verschiedene Akzeptormoleküle (u. a. Kohlenhydrate, Lipopolysaccharide sowie Inositolderivate). Innerhalb der Glycosyltransferasen der Gruppe I wies AcbS die höchsten Übereinstimmungen zu den hypothetischen Proteinen 2SCD46.18 bzw. SCC53.09C aus *S. coelicolor* A3(2), Rv1212c aus *M. tuberculosis* H37Rv, PH0069 aus *Pyrococcus. horikoshii* OT3, der Glykogensynthase PAB2292 aus *P. abyssii* und der UDP-N-Acetylglucosamintransferase WaaK aus *E. coli* R2 auf (**Abb.** 3.5.4.1; REDENBACH et al., 1996; COLE et al., 1998; KAWARABAYASI et al., 1998; HEINRICHS et al., 1998). Obwohl die Übereinstimmungen selbst zwischen AcbS (Aminosäuren 318-512) und den hypothetischen Proteinen der nahe verwandten Bakterien *M. tuberculosis* H37Rv und *S. coelicolor* A3(2) mit ca. 30% identischer Aminosäuren relativ gering waren, konnte sowohl in der Konsensussequenz der Glycosyltransferasen der Gruppe I als auch in den oben genannten Proteinen ein 38 Aminosäuren umfassender hochkonservierter Bereich identifiziert werden (**Abb.** 3.5.4.1). Charakteristisch für Glycosyltransferasen waren die in einem Abstand von 7-9 Aminosäuren angeordneten und wahrscheinlich an der Katalyse beteiligten Glutaminsäurereste (GEREMIA, et al., 1996; HEINRICHS et al., 1998). Demnach könnten die konservierten Aminosäuren Prolin und Serin für eine korrekte Positionierung der katalytischen Glutaminsäurereste notwendig sein. Aufgrund dieser Übereinstimmungen mit potentiellen und experimentell charakterisierten Glycosyltransferasen kann eine analoge Funktion für AcbS angenommen werden. Die Abweichungen zu Proteinen nahe verwandter Bakterien wie *S. coelicolor* A3(2) und *M. tuberculosis* H37Rv ist, vergleichbar mit AcbR, auf eine veränderte Substratbindeeeigenschaft zurückzuführen. Im Gegensatz hierzu zeigten die Aminosäuren 1-317 bzw. 513-708 von AcbS zu keinem bekannten Protein signifikante Übereinstimmungen. Dies könnte auf eine, in der Gruppe der Glycosyltransferasen und -hydrolasen häufig anzutreffende, modulare Organisation von AcbS aus mehreren Domänen bisher nicht bekannter Funktion hinweisen (HENRISSAT AND DAVIES, 2000).

		§	§
2SCD46.18	379-DWFRAASVLVMP	SYSE--SFGLVAIEAQAAGTPVLA	AAAV-415
SCC53.09C	326-DLVRSAEVACV	PSLYE--GFSLPAAEAMATGTALLATTG	-362
Rv1212c	274-EILSAATVFVC	PSVYE--PLGIVNLEAMACATAVVASDV	-310
PH0069	334-ELYGSVDFVII	PSYFE--PFGLVSLIAMCLGAIPIASSV	-370
PAB2292	304-ELYGSVDFVII	PSYFE--PFGLVALEAMCLGAIPIASAV	-360
WAAK	272-NYYRLADLVVV	PSQVE-EAFMVAVEAMAAGKPVLASQK	-309
PF00534	77-ELYKSADVFL	PSRYE--FGIVLLEAMACGLPVIATDV	-124
AcbS	408-EYARAADFCLF	PSKFEMDTFLIAQGEAMAGAVPIATAQ	-446
		** *	** * *

#### Abb. 3.5.4.1: Vergleich der in AcbS und Glycosyltransferasen konservierten Region.

Die Aminosäuren 408 bis 446 von AcbS sind im Vergleich zu korrespondierenden Bereichen der Glycosyltransferase Gruppe I Domäne (PF00534) sowie der hypothetischen Proteine 2SCD46.18 und SCC53.09C aus *S. coelicolor* A3(2) (Q9FCG5 bzw. Q9KXK2), Rv1212c aus *M. tuberculosis* H37Rv (O05313), PH0059 aus *Pyrococcus horikoshii* OT3 (O57794), der postulierten Glycogensynthase PAB2292 aus *P. abyssi* (Q9V2J8) und der N-Acetylglucosamin-Transferase WaaK aus *E. coli* R2 (AAC6959.1) dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind fett hervorgehoben, und in allen Proteinen identische Aminosäuren wurden durch einen \* markiert; § kennzeichnet die in dieser Gruppe der Glycosyltransferasen hochkonservierten Glutaminsäurereste. In Klammern ist jeweils die Accession-Nr. für die Datenbank Genebank, die EMBL- und die PFAM-Datenbank angegeben.

### 3.5.5 Das Genprodukt AcbU

Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des Leserahmens *acbU* wies ebenfalls über das gesamte Polypeptid hinweg keine signifikanten Übereinstimmungen mit bekannten Proteinen auf (AcbU, 492 Aminosäuren). Es konnte jedoch ein 38 Aminosäuren umfassender konservierter Bereich im carboxyterminalen Drittel der Sequenz identifiziert werden (Aminosäure 311-348), welcher signifikante Übereinstimmungen mit der katalytischen Untereinheit von Proteinkinasen, Aminoglycosid-Phosphotransferasen und einer 4 Proteine umfassenden Gruppe von hypothetischen Proteinen aufwies (Abb. 3.5.5.1). Innerhalb dieser Gruppe war mit 42 % konservierter Aminosäuren die Übereinstimmung mit den hypothetischen Proteinen Pep2A, Pep2B und SCL11.05C aus *S. coelicolor* A3(2) sowie Rv0127 aus *M. tuberculosis* H37Rv am höchsten (Abb. 3.5.5.1 C; SCHNEIDER et al., 2000; REDENBACH et al., 1996; COLE et al., 1998). Eine Funktion konnte bisher keinem dieser vier Proteine zugeordnet werden. Die Proteine Pep2A und Pep2B befinden sich jedoch in dem zweifach vorliegenden und mit Variationen versehenem Gencluster für den Glykogen- bzw. Stärke-Metabolismus in *S. coelicolor* A3(2) (BRUTON et al., 1995; SCHNEIDER et al., 2000). Die Übereinstimmungen mit verschiedenen Aminoglycosid-Phosphotransferasen und dem konservierten Bereich von AcbU lagen zwischen 26 und 28 % (Abb. 3.5.5.1. B.). Mit nur 18 % konservierten Aminosäuren im Bereich der analysierten 38 Aminosäuren von AcbU war die Übereinstimmung mit den drei Proteinkinasen MAPK2, CDK2 und cAPK am geringsten (DE BONDT et al., 1993, ZHANG et al., 1994, KNIGHTON et al., 1991a und b). Auffallend war, dass die Aminosäuren D166, N171 und D184 (die Nummerierung ist bezogen auf die cAMP abhängige Proteinkinase cAPK) der Proteinkinasen in allen untersuchten Proteingruppen



konserviert waren. Allerdings war die Aminosäure Asparagin-171 in AcbU durch ein Histidin und im Fall der hypothetischen Proteine Pep2A, Pep2B, SCL11.05C und Rv0127 durch ein Glutamin substituiert. Zusätzlich war der Lysinrest-168 der cAPK in den Proteinen Pep2A, Pep2B, SCL11.05C, Rv0127 und AcbU durch die Aminosäure Histidin konservativ substituiert. In der Gruppe der Aminoglycosid-Phosphotransferasen konnte jedoch an entsprechender Position keine mit Lysin verwandte Aminosäure nachgewiesen werden. Bei den aufgeführten Proteinkinasen konnte durch proteinkristallographische Untersuchungen allen vier Aminosäuren (D166, K168, N171, D184 bei der cAPK) eine Beteiligung an der Bindung von ATP bzw.  $Mg^{2+}$  und der Phosphorylgruppenübertragung zugeordnet werden. Dabei ist der Aspartatrest an Position 166 der cAPK die katalytische Aminosäure (DE BONDY et al., 1993, KNIGHTON et al. 1991b, NOBLE et al., 1999, TAYLOR et al., 1994, TAYLOR et al., 1999, ZHANG et al., 1994). Eine Beteiligung an der Katalyse wurde auch für die beiden Aspartatreste in dem konservierten Sequenzmotiv von Aminoglycosid-Phosphotransferasen postuliert (RETZLAFF et al. 1993, HEINZEL et al., 1988; **Abb.** 3.5.5.1 A, APH\_Seq). Im Gegensatz zu den Proteinkinasen war zusätzlich die Umgebung der beiden Aspartatreste in AcbU, den Proteinen Pep2A, Pep2B, SCL11.05C, Rv0127 und den Aminoglycosid-Phosphotransferasen stärker konserviert. Alle Proteine wiesen direkt vor D336 (die Nummerierung ist im folgenden auf AcbU bezogen) einen Isoleucinrest (Position 335) und an Position 313 einen Histidinrest auf. Zusätzlich kamen sowohl in AcbU als auch in den Aminoglycosid-Phosphotransferasen zwei konservierte Aspartatreste an den Positionen 343 bzw. 346 vor (**Abb.** 3.5.1. A). Eine Ausnahme bildete hier nur die Aminoglycosid-Phosphotransferase aus *S. ribosidificus* mit der Aminosäure Threonin an Stelle von D346.

Im Unterschied zu den Gruppen der Proteinkinasen und der Aminoglycosid-Phosphotransferasen war der Bereich um die Aminosäure D315 in AcbU und den hypothetischen Proteinen Pep2A, Pep2B, SCL11.05C sowie Rv0127 identisch. Weiterhin wurden konservierte Aminosäuren zwischen H320 und D336, dieser Bereich entspricht den Aminosäuren N168 bis D184 der cAPK, identifiziert. Auffällig war, dass in AcbU der Aminosäurerest H320 an Stelle der sonst in dieser Position stark konservierten Aminosäuren Asparagin oder Glutamin auftrat.

Aufgrund der dargestellten Übereinstimmungen und Unterschiede in der Aminosäuresequenz der analysierten Proteine, waren AcbU und die hypothetischen Proteine Pep2A, Pep2B, SCL11.05C sowie Rv0127 in eine neue Unterfamilie der Phosphotransferasen einzuordnen. Das charakteristische Aminosäuresequenzmotiv in der katalytischen Domäne dieser postulierten Kinase-Unterfamilie lautet: HGDLHL(G,S)(Q,H)x(L,I)Rx(2-4)(D,E)x(0-2)Wx(2,4)ID (**Abb.** 3.5.5.1 C). Es ist zu vermuten, dass AcbU ebenfalls einen Phosphorylgruppentransfer katalysiert, aber ein im Vergleich zu den Aminoglycosid- bzw. Proteinkinasen verändertes Substratspektrum besitzt.

## A.

```

KKA5_STRFR  183-VCHGDLCPNNVLLDPGTCRVTVGVIVGRLGVADRHADIA-222
KKA9_STRRI  179-VCHGDLCPNNVLLDPETHRITGLIDVGRRLRLATCHADLA-217
STRA_STRGR  197-VLHWDLHYENVAAREPEW----LAIDPEPLVG-DPGFDLW-232
STRA_STRGA  197-MLHWDLHYGNVLAAREPEW---LAIDPEPLAG-DPGFDLW-232
APHE_STRGR  186-VCHGDLCPNIVLHPETLEV-SGFIDLGRLGAAADRHADLA-225
APHA-5C     180-LCHGDLCPNNVLLDPETCRV-TGMIDVGRLGGRADRHADLA-218
Neo_Eco     186-VTHGDACLPNIMV--ENGRF-SGFIDCGRLGVADRYQDIA-222
Neo_Drm     186-VTHGDACLPNIMV--ENGRF-SGFIDCGRLGVADRYQDIA-222
AcbU        311-PSHGDLHLSHILRRQTPDGWRLCVIDLSTPAP-DPA-DPL-348
          ***      :::          **      *      *
          APh_Seq  HGDLxPxN  x (15-19)  ID

```

## B.

```

P27703 MAPK2 143-VLHRDLKPSNLLLNTTCDL---KICDFGLARVADP-DHD-177
1942965 CDK2 123-VLHRDLKPQNLLINTEGAI---KLADFGLARAF-GVPVR-157
230462 cAPK 162-LIYRDLKPENLLIDQQGYI---QVTFGFAKRVKGRWT-197
AcbU      311-PSHGDLHLSHILRRQTPDGWRLCVIDLS-TPAPDPADPL-348
          :  ** :  **          *

```

## C.

```

SC_Pep2A    322-RIHGDLHLGQVLR-AGRD--W--FVIDFEGEPSR-PLAERRSA-360
SC_Pep2B    333-RVHGDHLHGQCLR--SPDGEW--SLIDFEGEPAK-PLAERRLP-370
SCL11.05C   181-LCHGDLHLGQLIRHPAPDGPW--LLIDVDDLGTGVP-AWDLA -221
Rv0127      318-RVHGDHLHGQVLR--PES-W--LLIDFEGEPGQ-PLDERRAP-354
AcbU        311-PSHGDLHLSHILRRQTPDG-WRLCVIDLSTPAP-DP-ADPL -348
          ***** : : * : * : ** *

```

**Abb. 3.5.5.1:** Vergleich der Aminosäuresequenz eines konservierten Bereichs von AcbU mit Aminoglycosid-Phosphotransferasen, Proteinkinasen und hypothetischen Proteinen.

Die Aminosäuren 311 bis 348 von AcbU sind im Vergleich zu einem sowohl in Aminoglycosid-Phosphotransferasen (A.), verschiedenen Proteinkinasen (B.) als auch in hypothetischen Proteinen (C.) konservierten Bereich dargestellt. An der Substratbindung bzw. Katalyse beteiligte Aminosäuren der Proteinkinase sowie die korrespondierenden Aminosäuren der übrigen Proteine sind grau hinterlegt. Zusätzlich ist das in Aminoglycosid-Phosphotransferasen konservierte Sequenzmotiv APH\_Seq angegeben. Identische (\*) sowie konservierte (:) Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die in A. von dieser Regel abweichenden Aminosäuren sind fett markiert.

Für die Aminosäuresequenzvergleiche sind die folgenden Proteine verwendet worden. In Klammern ist die Accession-Nummer für die Datenbanken Genbank, EMBL, TrEMBL oder Swissprot angegeben.

- A. KKA5\_STRFR: Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase, *S. fradiae* (P00555, THOMPSON AND GRAY, 1983); KKA9\_STRRI: Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase, *S. ribosidificus* (P13250, HOSHIKO et al. 1988); STRA\_STRGR: Streptomycin-6-Phosphotransferase, *S. griseus* (P08077, DISTLER et al., 1987); STRA\_STRGA: Streptomycin-6-Phosphotransferase, *S. glaucescens* (P18622, VOEGTLI AND HUETTER, 1987); APHE\_STRGR: Streptomycin-3''-Phosphotransferase, *S. griseus* (P18150, HEINZEL et al., 1988); APHA-5C : Aminoglycosid-O-Phosphotransferase *Micromonospora chalcea*, (Q53558, SALAUZE AND DAVIES, 1991); Neo\_Eco: Neomycin-Phosphotransferase, mini-Tn5 Km, *E. coli* (AAA85506, BECK et al., 1982); Neo\_Drm: Neomycin-Phosphotransferase, *Drosophila melanogaster* (BAA78209, LUKACSOVICH et al., 2001).
- B. cAPK: cAMP-abhängige Proteinkinase, katalytische Untereinheit, *Mus musculus* (230462); CDK2, Cyclin-abhängige Kinase 2, *Homo sapiens* (1942965); MAPK2: Mitogen aktivierte Kinase 2, *Rattus norvegicus* (P27703). Referenz siehe Text.
- C. SC\_Pep2A: *S. coelicolor* A3(2) Pep2A-Protein (O70013); SC\_Pep2B: *S. coelicolor* A3(2) Pep2B-Protein (O54204); SC\_SCL11.05C: *S. coelicolor* A3(2), hypothetisches Protein SCL11.05C (Q9L1D3); Rv0127: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, hypothetisches Protein Rv0127 (O07177). Referenz siehe Text.

### 3.5.6 Das Genprodukt AcbV

Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz von AcbV (449 Aminosäuren) zeigte signifikante Übereinstimmungen zu der Konsensussequenz der Aminotransferase III Familie und AcbV war in diese Gruppe einzuordnen (Pfam-Accession Nr. PF00202; BATEMAN et al., 2000). Dabei entsprach die in dieser Arbeit bestimmte Aminosäuresequenz vollständig der von DIAZ GUARDAMINO (2000) beschriebenen Aminotransferase aus *Actinoplanes* sp. SE50/110.

### 3.5.7 Das Genprodukt AcbW

Das Genprodukt des offenen Leserahmens *acbW* konnte aufgrund der Analyse der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Proteindatenbanken sowie Proteindomänen- bzw. Proteinmotiv-Datenbanken eindeutig als ATP-Bindeprotein eines ABC-Transporters charakterisiert werden (COG 1131; TATUSOV et al., 2001). Die Aminosäuren 48-231 von AcbW (342 Aminosäuren) wiesen signifikante Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz dieser Proteinfamilie auf (PF00005, E-Value 3.8e-40; BATEMAN et al., 2000). Auch die ebenfalls charakteristischen Walker A und B Motive sowie die zwischen diesen beiden Motiven gelegene Prosite-Signatur für ABC-Transporter waren vorhanden (**Abb. 3.5.7.1 A und C; Kap. 2.19 WALKER et al., 1982; SARASTE et al., 1990; HOFMAN et al., 1999**).

**Tab. 3.5.7.1:** Vergleich von ATP-Bindeproteinen mit AcbW.

Species. <sup>a</sup>	Verglichene Aminosäuresequenz <sup>b</sup>	Identische Aminosäuren [%]
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS (SPY0518; AAK33517.1)	3-326 (1-328)	41
<i>S. coelicolor</i> A3(2) (SCE6.31C; Q9KZQ9)	63-270 (35-242)	55
<i>D. radiodurans</i> R1 (DR0205; Q9RXV1)	61-266 (37-242)	52
<i>S. peucetius</i> (DRRA; O28395)	94-307 (37-251)	36
<i>S. kasuagensis</i> M338-M1 (KasK, Q9LBX7)	33-231 (35-234)	35

- (a) In Klammern sind die Gennamen sowie die Accession-Nr. der EMBL- bzw. Genebank-Datenbank angegeben.
- (b) Aminosäuren der angegebenen Proteine, die mit AcbW verglichen worden sind. Die entsprechenden Aminosäuren von AcbW sind in Klammern aufgeführt.

A. 52 % identische Aminosäuren; 75 % ähnliche Aminosäuren

**Walker A (PS00017)**

GxxGxGKS

<i>S. pyogenes</i>	39-	AVKDLSFEVFPKGQILGFIGANGAGKSTTIKMLTGIL	-74
<i>S. coelicolor</i>	65-	AVDGLSFTVSRGEMVGYIGPNGAGKSTTIKMLTGIL	-100
<i>D. radiodurans</i>	61-	AVQDISFSIPAGEIVGYLGPNGAGKSTTIKVLGTGLL	-96
<i>Actinoplanes sp.</i>	37-	AVDDISFEVPSGVKIAIYGANGAGKSTTIKLLTGIM	-72
		** : ** : * : : * *****:***:	

B. 42 % identische Aminosäuren; 70 % ähnliche Aminosäuren

<i>S. pyogenes</i>	99-	IGAVFGQRTQLWWDLALQETYVVLKEIYDVP	-129
<i>S. coelicolor</i>	125-	IGVVFGQRTTLWWDLPLIDSYRLMHRMYRIP	-125
<i>D. radiodurans</i>	121-	LGAVFGQRTTLWWDLPVRESLELLRHVYRVP	-151
<i>Actinoplanes sp.</i>	96-	IGVVFGQRQLWWDLPVLDSFRILRHVYEV	-126
		:* ***** ***** : :: : : * : *	

C. 71 % identische Aminosäuren; 97 % ähnliche Aminosäuren

**PS00211**

LSLgQRMRA-IA-L

**Walker B**

hhhhDEPT

<i>S. pyogenes</i>	155-	RTLSLGQRMRAIAASLLHNPVFLDEPTIGLDV	-189
<i>S. coelicolor</i>	181-	RQLSLGQRMRAIAAALLHDPEVLYLDEPTIGLDV	-215
<i>D. radiodurans</i>	177-	RALSIGQRMRAIAAALLHDPELLFLDEPTVGLDV	-211
<i>Actinoplanes sp.</i>	153-	RQLSLGQRMRAEIAASLLHDPVAVFLDEPTIGLDL	-187
		* ***** : ** : * : * : * : * : * : * : * : *	

**Abb. 3.5.7.1 : Vergleich der Aminosäuresequenz hochkonservierter Bereiche potentieller bakterieller ATP-Bindeproteine mit AcbW.**

Identische Aminosäuren sind mit einem (\*), ähnliche Aminosäuren mit einem (:) gekennzeichnet. Angegeben ist der Prozentsatz identischer bzw. ähnlicher Aminosäuren der konservierten Bereiche und die Position der Aminosäuren in den Proteinen. Zusätzlich sind die Konsensussequenzen der ATP-Bindemotive Walker A und B sowie die Übereinstimmungen mit der Prosite Signatur PS00211 (ABC-Transporter) angegeben (-: keine Übereinstimmung; x: jede Aminosäure; h: hydrophobe Aminosäure). Das für die AcbW- Unterfamilie der ATP-Bindeproteine typische, konservierte Sequenzmotiv ist grau hinterlegt. Für die Analyse wurden die Proteine SPY0518 aus *S. pyogenes* M1 GAS (AAK33517.1), SCE6.31C aus *S. coelicolor* A3(2) (Q9KZQ9), DR0205 aus *D. radiodurans* R1 (Q9RXV1) und AcbW aus *Actinoplanes sp.* SE50/110 verwendet. In Klammern ist die Accession-Nr. der EMBL- bzw. Genbank-Datenbank angegeben.

Innerhalb der stark diversifizierten Gruppe der ATP-Bindeproteine wies AcbW die höchsten Übereinstimmungen mit drei hypothetischen ATP-Bindeproteinen aus *Streptococcus pyogenes* M1 GAS, *S. coelicolor* A3(2) und *Deinococcus radiodurans* R1 auf (**Tab. 3.5.7.1**; FERRETTI et al., 2001; REDENBACH et al., 1996; WHITE et al., 1999). Die signifikantesten Übereinstimmung zwischen AcbW und bereits experimentell charakterisierten Proteinen waren mit den ATP-Bindeproteinen der „Drug-Exporter“ aus *S. peuceetius* (DrrA) sowie *S. kasugaensis* M338-M1 (KasK) vorhanden (**Tab. 3.5.7.1**; GUIFOILE AND HUTCHINSON, 1991; IKENO et al., 2000). Eine analoge Funktion als ATP-Bindeprotein eines ABC-Exporters konnte auch für AcbW angenommen werden. Dabei bildeten die hypothetischen Proteine aus *S. pyogenes* M1 GAS, *D. radiodurans* R1 und *S. coelicolor* A3(2) sowie AcbW aufgrund des in den ATP-Bindeproteinen der „Drug-Exporter“ nicht vorhandenen Sequenzmotivs VFGQRxxLWWDL eindeutig eine eigenständige Unterfamilie der ABC-Exporter (**Abb.**

3.5.7.1 B). Diese Hypothese wurde zusätzlich durch eine vergleichbare Genanordnung in *Actinoplanes* sp. SE50/110, *S. pyogenes* M1 GAS, *D. radiodurans* R1 und *S. coelicolor* A3(2) gestützt (**Kap.** 3.5.8 & 3.5.9, **Abb.** 4.4.1). Benachbart zu den ATP-Bindeproteinen waren in diesen Bakterien zwei Membranproteine nachweisbar, die untereinander ebenfalls signifikante Übereinstimmungen aufwiesen (**Kap.** 3.5.8 und 3.5.9). Sie bildeten mit AcbWXY eine neue Untergruppe der ABC-Transporter mit bisher unbekanntem Substratspektrum.

### 3.5.8 Das Genprodukt AcbX

Der offene Leserahmen *acbX* codiert für ein 267 Aminosäuren langes Membranprotein (COG0842; **Kap.** 2.19) und zeigte signifikante Übereinstimmungen mit potentiellen Membranproteinen aus *S. pyogenes* M1 GAS (25% Identität mit AcbX; Accession-Nr. Q9A113, FERRETI et al., 2001), *D. radiodurans* R1 (27 % Identität über eine Länge von 180 As; Accession-Nr. Q9RXV3, WHITE et al., 1999) sowie *S. coelicolor* A3(2) (22 % Identität über die gesamte Länge von AcbX; Accession-Nr. Q9KZQ7, REDENBACH et al., 1996). Die Anzahl potentieller Transmembranhelices war mit sechs (AcbX) bzw. sechs bis sieben Helices in den übrigen Proteinen ebenfalls stark konserviert (**Kap.** 2.19, Daten nicht gezeigt). Signifikante Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz von AcbX mit anderen Membranproteinen wurden hingegen nicht gefunden.

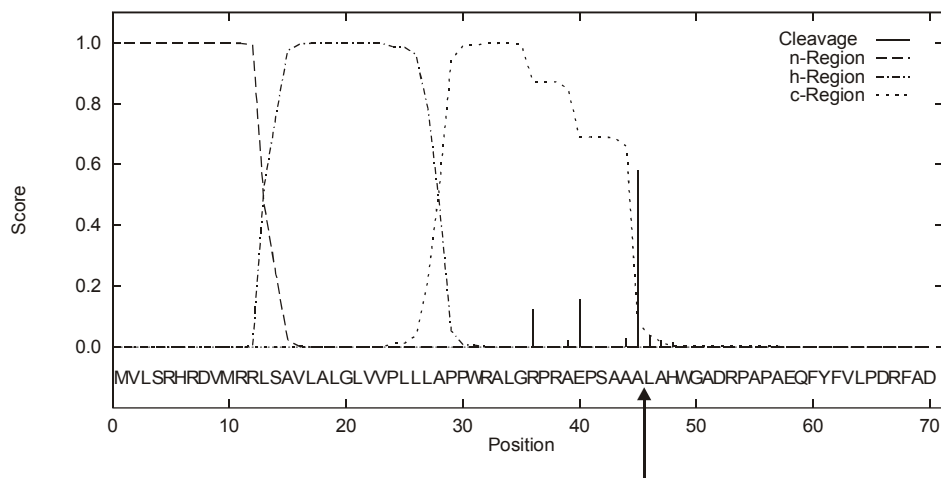
Da sowohl *acbX* als auch die Gene der oben genannten hypothetischen Proteine in direkter Nachbarschaft zu Genen für ATP-Bindeproteinen lagen, deren Genprodukte untereinander ebenfalls hohe Übereinstimmungen aufwiesen, konnten sie in eine neue Unterfamilie der ABC-Transporter eingeordnet werden. Möglicherweise bilden AcbX bzw. die hypothetischen Proteine eine von zwei Membrankomponenten dieser Transporter (**Kap.** 3.5.7 & 3.5.9).

### 3.5.9 Das Genprodukt AcbY

Der offene Leserahmen *acbY* codiert für ein 267 Aminosäuren langes Membranprotein (COG 3694; **Kap.** 2.19) und zeigte signifikante Übereinstimmungen mit potentiellen Membranproteinen aus *S. pyogenes* M1 GAS (36 % Identität über eine Länge von 219 As; Accession-Nr. Q9A112, FERRETI et al., 2001), *D. radiodurans* R1 (27 % Identität über eine Länge von 226 As; Accession-Nr. Q9RXV2, WHITE et al., 1999) sowie *S. coelicolor* A3(2) (25% Identität über eine Länge von 226 As; Accession-Nr. Q9KZQ8, REDENBACH et al., 1996). Die Anzahl potentieller Transmembranhelices war mit fünf (AcbX) bzw. fünf oder sieben Helices in den übrigen Proteinen stark konserviert (**Kap.** 2.19, Daten nicht gezeigt). Die Gene der drei hypothetischen Proteine lagen ebenso wie *acbY* benachbart zu den Genen der in **Kap.** 3.5.7 beschriebenen ATP-Bindeproteine. Daher waren sie ebenfalls in die neue Unterfamilie der ABC-Transporter einzuordnen. Sie bildeten vermutlich die zweite Membrankomponente des aus AcbWXY bzw. den entsprechenden Proteinen der anderen Bakterien bestehenden ABC-Exporters (vgl. **Kap.** 3.5.7 & 3.5.8).

### 3.5.10 Das Genprodukt AcbZ

Der offene Leserahmen *acbZ* codiert für ein 1072 Aminosäurereste langes Polypeptid, welches aufgrund seiner Primärsequenz eindeutig als extrazelluläre  $\alpha$ -Amylase charakterisiert wurde (COG 0366; **Kap.** 2.19). Abweichend von den häufig auftretenden Startkodons GTG und ATG wurde das Kodon TTG (Leucin) als Startkodon gewählt, da es im Gegensatz zu den alternativ in Frage kommenden Methionin-Kodons eine potentielle Ribosomenbindestelle aufwies (**Tab.** 3.5.1). Die ersten 45 Aminosäuren entsprachen einem typischen prokaryontischen Signalpeptid und stützten diese Wahl (**Abb.** 3.5.10.1; NIELSEN et al., 1997; NIELSEN and KROGH, 1998; **Kap.** 2.19). Das Signalpeptid wies die typische Aufteilung in eine positiv geladene n-Region, eine hydrophobe h-Region sowie die polare c-Region auf. Innerhalb der h-Region dominierten die charakteristischen Aminosäuren Alanin und Leucin (VON HEIJNE AND ABRAHMSEN, 1989). An Position -1 und -3 relativ zur Schnittstelle (zwischen Aminosäure 45 und 46) befand sich die für eine korrekte Prozessierung notwendige Aminosäure Alanin (VON HEIJNE, 1983 und 1985; SCHNEIDER AND STEPHENS, 1990).



**Abb. 3.5.10.1:** Analyse der aminoterminalen 70 Aminosäuren von AcbZ und Identifikation des Signalpeptids.

Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit (Score) jeder Aminosäure zu einer der drei charakteristischen Regionen (n-, h-, c-Region) eines Signalpeptides zu gehören. Dabei bedeuten Werte über 0,5, dass die Aminosäure zu der jeweiligen Region gehört. Cleavage gibt für jede Aminosäureposition die Wahrscheinlichkeit an, dass es sich um die Schnittstelle des Signalpeptids handelt (NIELSEN AND KROGH, 1998). Die Position der postulierten Schnittstelle des Signalpeptids von AcbZ (Aminosäure 45-46, A-L) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Der Vergleich der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz von AcbZ mit der Proteindomänendatenbank Pfam ergab signifikante Übereinstimmungen der Aminosäuren 63-521 mit der  $\alpha$ -Amylase Familie, auch Glycosylhydrolase-Familie 13 genannt (E-Value

6,5e-82, Accession-Nr. PF00128; EC 3.2.1.1; BATEMAN et al., 2000; **Kap.** 2.19). Vier innerhalb dieser Familie hoch konservierte Sequenzbereiche waren in AcbZ ebenfalls vorhanden (**Abb.** 3.5.10.2; JESPERSEN et al., 1993; JESPERSEN et al., 1991; für einen Übersichtsartikel siehe JANECK, 1997). Dargestellt sind die Regionen I-IV der TAKA-Amylase aus *Aspergillus oryzae* (WIRSEL et al., 1989; GENES et al., 1989; TADA et al., 1989; TSUKAGOSHI et al., 1989; TODA et al., 1982), einer  $\alpha$ -Amylase aus *S. lividans* (TSAO et al., 1993), der potentiellen Amylase aus *S. coelicolor* A3(2) (Accession-Nr. Q9KZ11) sowie der zweiten  $\alpha$ -Amylase des *acb*-Genclusters AcbE aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 (STRATMANN, 1997) im Vergleich zu den korrespondierenden Bereichen in AcbZ. Die fett gedruckten Aminosäuren D206, E230 und D297 (Nummerierung bezogen auf die prozessierte TAKA-Amylase) bilden die katalytischen Aminosäuren und waren in allen fünf Proteinen vorhanden. Eine Beteiligung an der Substratbindung wurde für die Aminosäuren H122, K209, H210 und H296 gezeigt (**Abb.** 3.5.10.2 markiert durch §; MATSUURA, et al., 1984; BRZOWSKI AND DAVIES, 1997). Dabei erwiesen sich die Aminosäuren K209 und H296 als typisch für Enzyme, die  $\alpha$ -1,4-Glycosidische-Bindungen hydrolysieren (MACGREGOR et al., 2001). Auffällig war, dass alle fünf Proteine an diesen Positionen übereinstimmten und nur in AcbE an der dem Histidinrest H210 entsprechenden Aminosäureposition ein Alaninrest vorlag (**Abb.** 3.5.10.2). Eine weitere Abweichung zwischen AcbE und den anderen Amylasen war in der Region IV vorhanden. Nur AcbE wies vor dem katalytischen Aspartatrest eine Insertion von zwei Aminosäuren auf (E404 u. W405, Nummerierung bezogen auf AcbE). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob die Abweichungen von AcbE in den hochkonservierten Regionen der  $\alpha$ -Amylasen für die Acarbose-Resistenz von AcbE verantwortlich sind (STRATMANN, 1997)

	I	II	III	IV
	§	§§		§
AMYA_ASPOR	116-VDVVANH	202-GLRIDTVKH	226-YCIGEVLD	292-FVE--NHD
AMY_STRLI	144-FDVITNH	275-GFRIDTVKH	309-FMFGEVYS	379-FLG--NHD
SC10B7.21C	178-FDVITNH	309-GFRIDTVKH	343-FMFGEVYS	413-FLG--NHD
AcbE_Asp	164-LDIVVNH	296-GYRLDTLKA	330-FLFGEAWS	400-HLGEWNHD
AcbZ_ASP	180-LDIIVNH	311-GYRMDTVKH	345-FMFGEVFS	415-FLG--NHD
	* **	* * ** *	**	***

**Abb. 3.5.10.2:** Vergleich konservierter Aminosäuresequenzbereiche ausgewählter  $\alpha$ -Amylasen.

Dargestellt sind vier in Mitgliedern der  $\alpha$ -Amylase-Familie (Glycosyl-Hydrolase Familie 13; Pfam-Accession-Nr. 00128) konservierte Regionen (I-IV). In allen Proteinen identische Aminosäuren sind durch \* gekennzeichnet. An der Katalyse beteiligte Aminosäuren sind fett hervorgehoben, und Aminosäuren mit einer postulierten Beteiligung an der Substratbindung sind durch § markiert. Die Nummerierung bezieht sich auf die Position der ersten Aminosäure der 4 Bereiche innerhalb des Proteins. Im Fall der Amylasen aus *S. lividans* und *Aspergillus oryzae* beziehen sich die Positionen auf das prozessierte Protein, in allen anderen Fällen auf das noch nicht prozessierte Polypeptid.

Es wurden die Amylasen aus *A. oryzae* (Taka-Amylase, AMYA\_ASPOR, Accession-Nr. P10529, P11763, Q00250), *S. lividans* (AMY\_STRLI, Accession-Nr. Q05884), *S. coelicolor* A3 (2) (SC10B7.21C, Accession-Nr. Q9KZ11) sowie AcbE\_Asp (STRATMANN, 1997) und AcbZ\_Asp (diese Arbeit) aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 verwendet.

Im Vergleich zu den meisten bekannten  $\alpha$ -Amylasen war AcbZ mit 1072 Aminosäuren ungefähr doppelt so groß wie diese. Die höchsten Übereinstimmungen waren zwischen AcbZ und den ebenfalls ungewöhnlich großen Proteinen aus *Actinoplanes* sp. (AcbE, 59% identische Aminosäuren), *S. coelicolor* A3(2) (SC10B7.21C, 52% identische Aminosäuren) und *S. lividans* (AMY, 51% identische Aminosäuren) nachweisbar. WU-Blast Analysen von Proteindatenbanken mit den carboxyterminalen 550 Aminosäuren von AcbZ ergaben zusätzlich geringere, wenn auch statistisch signifikante, Übereinstimmungen mit verschiedenen Pullulanasen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der für  $\alpha$ -Amylasen ungewöhnlichen Größe und den Übereinstimmungen mit Pullulanasen in der C-terminalen Hälfte, bestehen diese langkettigen Amylasen wahrscheinlich aus zwei distinkten Domänen mit eventuell unterschiedlicher katalytischer Funktion.

### 3.5.11 Das Genprodukt Asp52.1

Der *asp52.1* genannte Leserahmen codiert für ein 511 Aminosäuren umfassendes extrazelluläres Protein, das in die Gruppe der  $\alpha$ -Arabinofuranosidasen ( $\alpha$ -L-AFase; EC 3.2.1.55) eingeordnet werden konnte. Die ersten 36 Aminosäuren entsprachen den typischen Charakteristika eines prokaryontischen Signalpeptids mit einer hydrophilen n-Region, einer hydrophoben h-Region sowie der polaren c-Region (**Kap.** 2.19; NIELSEN et al. 1997; NIELSEN AND KROGH, 1998). Die für eine korrekte Prozessierung notwendigen, relativ zur Schnittstelle an Position -1 und -3 gelegenen Alaninreste waren ebenfalls vorhanden (VON HEIJNE, 1983 und 1985; SCHNEIDER AND STEPHENS, 1990). Die Aminosäuren 37 bis 365 von Asp52.1 wiesen nur mit vier bekannten Proteinen signifikante Übereinstimmungen auf. Neben den hypothetischen Proteinen aus *Bacillus halodurans* (31 % Identität über eine Sequenzlänge von 306 As; Accession-Nr. Q9KBQ8), *S. typhimurium* (31 % Identität über eine Sequenzlänge von 307 As; Accession-Nr. Q9L4I2) *S. coelicolor* A3(2) (33% Identität über eine Sequenzlänge von 258 As; Accession-Nr. Q9F398) beinhaltete diese Gruppe auch die bereits experimentell charakterisierte  $\alpha$ -L-AFase II aus *S. chartreusis* (32 % Identität über eine Sequenzlänge von 277 As;  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase II, Accession-Nr. P82594, MATSUO et al., 2000). In allen 5 Proteinen war das Sequenzmotiv WAPEx(5)G konserviert. Der Glutaminsäurerest ist im Fall der  $\alpha$ -L-AFase II an der Katalyse beteiligt (MATSUO et al., 2000). Weiterhin waren die Aminosäuren D146, D167, E217 und E225 in allen Proteinen konserviert und könnten ebenfalls an der Bildung einer für Hydrolasen typischen katalytischen Triade beteiligt sein (Nummerierung bezogen auf das unprozessierte Protein Asp52.1). Aufgrund der Sequenzübereinstimmungen zwischen diesen Proteinen bilden sie wahrscheinlich eine eigenständige Proteinfamilie und hydrolysieren analog zu dem Enzym  $\alpha$ -L-AFase II  $\alpha$ -1,5-verknüpfte Arabinofuranosyl-Polysaccharide bzw. -Oligosaccharide (MATSUO et al., 2000).



Im Gegensatz zu den oben genannten Proteinen wies Asp52.1 neben der aminoterminal gelegenen katalytischen Domäne carboxyterminal eine Ricin B Lectin Domäne mit den charakteristischen QxW-Motiven auf (Aminosäuren 366-511; Pfam-Accession-Nr. PF00652). Für diese Domäne wird eine Funktion in der Bindung von Kohlenhydraten postuliert, sodass eine analoge Funktion auch für Asp52.1 angenommen werden kann.

### 3.5.12 Das Genprodukt Asp 52.2

Das 552 Aminosäuren umfassende Translationsprodukt von *asp52.2* bestand aus einer aminoterminalen Transmembrandomäne sowie einer carboxyterminalen GGDEF-Domäne (COG 2199; Pfam-Accession Nr. PF00990; BATEMAN et al., 2000; **Kap.** 2.19), wobei der Aminoterminus des Proteins wahrscheinlich extracellulär lokalisiert war und die GGDEF-Domäne intracellulär vorlag. Innerhalb der ersten 348 Aminosäuren (Transmembrandomäne) konnten 9 potentielle Transmembranhelices identifiziert werden (**Kap.** 2.11; Daten nicht gezeigt). Anschließend an die Transmembranhelices wies Asp52.2 signifikante Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz der GGDEF-Domäne auf (Aminosäuren 367-523). Wenngleich die Funktion dieser Domäne nicht bekannt ist, wurde sie bisher ausschließlich in Prokaryonten nachgewiesen, und für Proteine mit dieser Domäne wird eine Beteiligung an der Signaltransduktion vermutet (BATEMAN et al., 2000). Es konnte so zwar eindeutig die GGDEF-Domäne in der Sequenz von Asp52.2 lokalisiert werden, aber eine explizite Funktionsvorhersage war nicht möglich.

### 3.5.13 Das Genprodukt Asp 52.3

Der offene Leserahmen *asp52.3* ist nur partiell auf dem Insert des  $\Phi$ 52 codiert. Dabei wiesen die aus der DNA-Sequenz abgeleiteten carboxyterminalen 59 Aminosäuren von Asp52.3 signifikante Übereinstimmungen mit vier hypothetischen Proteinen aus *S. coelicolor* A3(2) (Accession-Nr. Q9RJ38, Q9KYJ7, Q9S223, Q9X8C4), einem hypothetischen Protein aus *Corynebacterium glutamicum* (Accession-Nr. AX065255.1) und zwei hypothetischen Proteinen aus *M. tuberculosis* H37Rv auf (Accession-Nr. P71741, AAK46770). Der prozentuale Anteil identischer Aminosäuren lag zwischen 52% und 72%. Auffällig war, dass benachbart zu dem Protein SC1G8.16c aus *S. coelicolor* A3(2) (Accession-Nr. Q9KYJ7) eine postulierte „Sensor-Histidin-Kinase“ lokalisiert war und das Protein Rv2402 aus *M. tuberculosis* H37Rv (Accession-Nr. P71741) eine für DNA-bindende Proteine typisches „Helix-turn-Helix“-Motiv aufwies. Dies könnte auf eine Beteiligung an der Signaltransduktion in *Actinoplanes* sp. SE50/110 in Kombination mit dem membranständigen GGDEF-Protein Asp52.2 hindeuten. Asp52.3 würde dann als Transkriptionsregulator fungieren, der durch Asp52.2 aktiviert bzw. inaktiviert würde.

### 3.6 Charakterisierung der rekombinanten *S. lividans* 66 TK23 Stämme mit den Cosmiden pHTWCos6 und pOJ446

Um zu bestätigen, dass pHTWCos6 alle für die Biosynthese der Acarbose benötigten Gene codiert, wurde das Cosmid pHTWCos6 sowie der entsprechende Vektor pOJ446 in den heterologen Stamm *S. lividans* 66 TK23 transformiert und in dem Produktionsmedium MD50 kultiviert (**Kap.** 2.9.10 & 2.8.2). Neben dem Nachweis der extrazellulären Enzyme AcbD und AcbZ wurde zusätzlich die Enzym-katalysierte Phosphorylierung von Acarbose durch AcbK sowie die Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol durch zellfreie Extrakte von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 nachgewiesen (STRATMANN 1997; HEMKER et al., 2001; GOEKE et al., 1996, DREPPER AND PAPE, 1996; C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung)

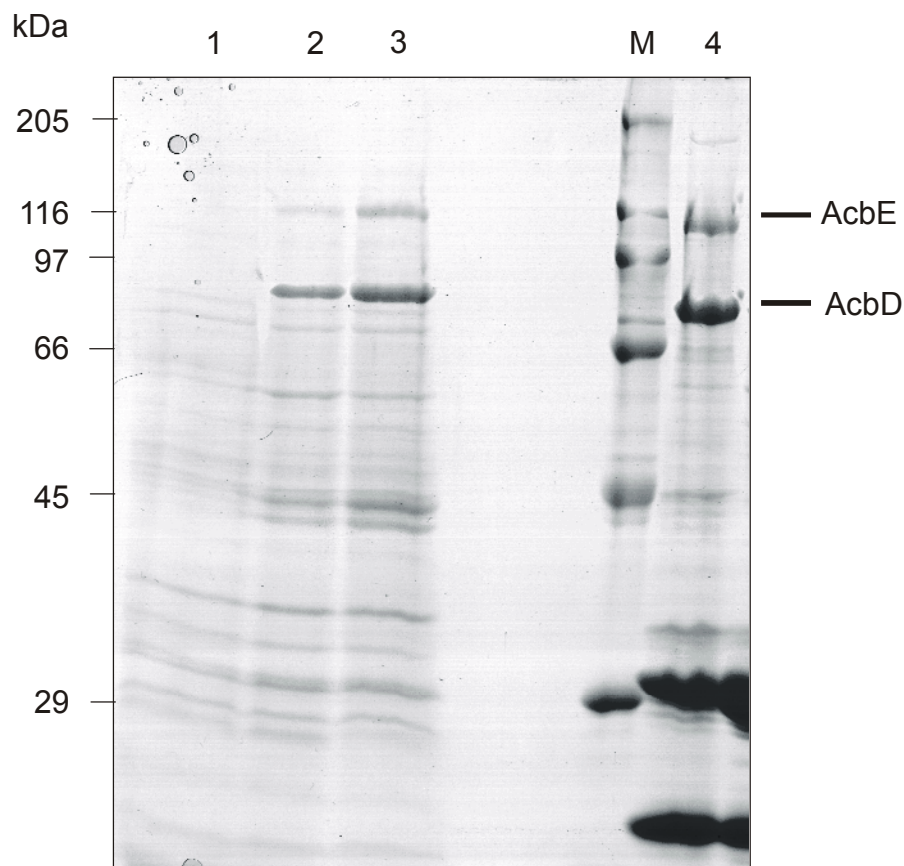
#### 3.6.1 Phänotypische Eigenschaften von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6

Nach Transformation von pHTWCos6 und pOJ446 in Sphäroplasten von *S. lividans* 66 TK23 wurden mehrere Hundert Transformanten erhalten (**Kap.** 2.8.2). Diese konnten problemlos auf verschiedenen festen Nährmedien kultiviert werden (R5Y, SMA, **Kap.** 2.4.1 & 2.8.2). Die Fähigkeit zum Wachstum bei submerser Kultivierung erwies sich für *S. lividans* 66 TK23 Stämme, die mit dem dem Cosmid pHTWCos6 transformiert worden waren, jedoch als stark eingeschränkt. Von 20 verschiedenen Transformanten, die zur submersen Kultivierung in TSB-Medium (**Kap.** 2.4.1) überimpft worden waren, konnte nur bei einem Stamm Wachstum nachgewiesen werden. Dies begann im Vergleich zu der Kontrolle *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 mit einer Verzögerung von ca. 10 Tagen. Der so erhaltene Stamm wurde als *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 bezeichnet und für alle weiteren Analysen verwendet. Im Gegensatz hierzu stand, dass der rekombinante Stamm *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 nach dieser initialen, submersen Kultivierung sowohl auf festen Medien als auch in submersen Kulturen ein mit dem Kontrollstamm vergleichbares Wachstumsverhalten aufwies, d. h. wieder Wildstamm-Phänotyp besaß. Eine Ausnahme bildete das Sporulationsverhalten auf SMA-Agarplatten. Im Gegensatz zu der Kontrolle *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 sporulierte *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 nur partiell und ca. 75 % des Myzels wies einen sogenannten „bald“-Phänotyp auf.

Um auszuschließen, dass der von dem Kontrollstamm abweichende Phänotyp durch Rekombination des Cosmids pHTWCos6 mit dem Chromosom entstanden war, wurde das Cosmid pHTWCos6 aus zwei submersen Kulturen von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 isoliert (**Kap.** 2.9.3). Unterschiede in dem Restriktionsfragmentmuster (*Xho*I bzw. *Bg*II) der isolierten Cosmide mit dem Original pHTWCos6-Plasmid waren nicht vorhanden. Der ungewöhnliche Phänotyp von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 war somit nicht auf eine Instabilität von pHTWCos6 zurückführbar.

### 3.6.2 Nachweis heterolog produzierter Proteine in zellfreien Extrakten und Kulturüberständen von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6

Zum Nachweis der im Kulturüberstand von *Actinoplanes* sp. SE50/110 dominanten Proteine AcbD und AcbE (**Abb.** 3.6.2.1, Spur 4) wurde *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 (zwei parallele Kulturen) bzw. als Kontrolle *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 in MD50 Medium kultiviert und der Kulturüberstand nach Abtrennung der Zellen analysiert (**Kap.** 2.8.2 & 2.11). Die Expression der Proteine wurde dabei durch die im Medium vorhandenen Maltodextrine induziert und erfolgte unter Kontrolle der nativen Promotoren. Im Vergleich zu dem Kontrollstamm konnten in *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 zwei zusätzliche Proteine mit einem approximativen Molekulargewicht von ca. 110 kDa und ca. 75 kDa nachgewiesen werden (**Abb.** 3.6.2.1, Spur 1,2,3). Da das Molekulargewicht des 75 kDa Protein mit dem, aus der Aminosäuresequenz berechneten, Molekulargewicht von AcbD übereinstimmte und eine erfolgreiche Sekretion von AcbD in *S. lividans* 66 bereits gezeigt worden war, war dieses Protein als AcbD zu charakterisieren (STRATMANN, 1997; HEMKER et al., 2001). Das Molekulargewicht des 110 kDa Proteins entsprach hingegen dem aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Molekulargewicht von AcbE (107 kDa) oder AcbZ (109 kDa). Eine eindeutige Zuordnung des in der SDS-PAGE identifizierten 110 kDa Proteins war aufgrund dieses geringen Größenunterschieds jedoch nicht möglich. Da in Kulturüberständen von *Actinoplanes* sp. SE50/110 die dominante Proteinbande vergleichbarer Größe durch eine Aminosäure-Sequenzierung eindeutig als AcbE charakterisiert worden war, entsprach das 110 kDa Protein wahrscheinlich ebenfalls AcbE (**Abb.** 3.6.2.1, Spur 4; STRATMANN, 1997). Ein von *Actinoplanes* sp. SE50/110 abweichendes Expressionsmuster der Gene *acbZ* und *acbE* konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, sodass ein Gemisch aus AcbE und AcbZ vorgelegen haben könnte. Im Gegensatz zu den Kulturüberständen waren in einer SDS-PAGE Analyse der zellfreien Extrakte von *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 und *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 keine Unterschiede im Proteinmuster erkennbar (**Kap.** 2.11; Daten nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass das Cosmid pHTWCos6 keine größeren Veränderungen des Expressionsmusters im heterologen Wirt *S. lividans* 66 TK23 hervorgerufen hat. Auch die Expression der *acb*-Gene, falls vorhanden, führte nicht zu sichtbaren zusätzlichen Proteinbanden.



**Abb. 3.6.2.1 :** SDS-PAGE Analyse der Kulturüberstände von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6, *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 und *Actinoplanes* sp. SE50/110. Es wurden jeweils 500  $\mu$ l der angegebenen Kulturüberstände analysiert. Die Proteine AcbD und AcbE sind markiert. Spur 1: *S. lividans* 66 TK23 pOJ446, Spur 2: *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 (Kultur 1), Spur 3: *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 (Kultur 2), Spur M: Molekulargewichtsmarker, Spur 4: *Actinoplanes* sp. SE50/110.

### 3.6.3 Nachweis der AcbD-Reaktion im Kulturüberstand von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6

Zusätzlich wurde die Enzymaktivität der Acarviosyltransferase AcbD nachgewiesen. Als Maß für die Enzymaktivität wurde der AcbD-katalysierte Austausch von [ $^{14}$ C]-Maltose gegen die Maltosyl-Untereinheit der Acarbose bestimmt (**Kap.** 2.13; HEMKER et al., 2001). In den Kulturüberständen von zwei unabhängigen Anzuchten des rekombinanten Stamms *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 war eine AcbD-Aktivität von 126 bzw. 130 nkat/mg Gesamtprotein nachweisbar. Hingegen war eine signifikant über der unspezifischen Austauschrate der Maltosyl-Untereinheit der Acarbose gegen freie Maltose liegende AcbD-Aktivität in den Kulturüberständen der Negativkontrolle *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 nicht vorhanden (**Tab.** 3.6.3.1).

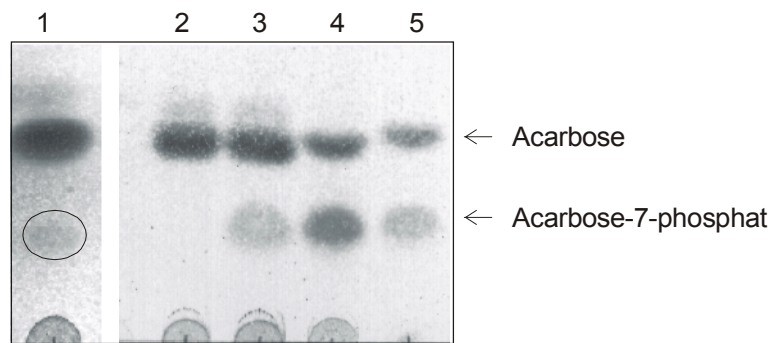
**Tab 3.6.3.1:** Acarviosyltransferase-Aktivität in Kulturüberständen von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 bzw. pOJ446

Kulturüberstand der Stämme	Acarviosyltransferase Aktivität [nkat/mg Gesamtprotein] <sup>1</sup>
<i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6 Kultur1	126
<i>S. lividans</i> 66 TK23 pHTWCos6 Kultur2	130
<i>S. lividans</i> 66 TK23 pOJ446	-

1. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte wie in **Kap.** 2.13 beschrieben (HEMKER et al., 2001).

### 3.6.4 Nachweis der katalytischen Aktivität der Acarbose-7-Kinase AcbK in zellfreien Extrakten von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6

Neben den beschriebenen extrazellulären Proteine AcbD und AcbE wurde die durch das intrazelluläre Enzym AcbK katalysierte Phosphorylierung von Acarbose zu Acarbose-7-phosphat in *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 nachgewiesen (GOEKE et al., 1996, DREPPER AND PAPE, 1996). Die Analyse der Reaktionsprodukte verschiedener Enzymansätze erfolgte durch eine Dünnschichtchromatografie und Anfärbung der Substanzen mit dem Cer-Reagenz (**Kap.** 2.14.1). Da authentisches Acarbose-7-phosphat nicht zur Verfügung stand, wurden parallel Enzymansätze mit zellfreien Extrakten von *Actinoplanes* sp. SE50/110 sowie dem rekombinanten Stamm *S. lividans* 66 TK23 pCW201KM6 (AcbK-Überproduzent; **Tab.** 2.1.1; C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung) durchgeführt und das gebildete Acarbose-7-phosphat als Referenzwert verwendet. Im Vergleich zu der Negativkontrolle *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 (**Abb.** 3.6.4.1 Spur 2) konnte in Enzymansätzen mit einem zellfreien Extrakt von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 die Produktion von Acarbose-7-phosphat nachgewiesen werden. Das Laufverhalten der zusätzlich zur Acarbose auftretenden Substanz stimmte mit dem Laufverhalten des in den Referenzansätzen gebildeten Acarbose-7-phosphats überein (**Abb.** 3.6.4.1; Spur 1,4,5). Auch bei Verwendung eines zellfreien Extraktes von *S. lividans* 66 1326 pHTWCos6 (A. STRATMANN, C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung) war die Bildung des Acarbose-7-phosphats nachweisbar (**Abb.** 3.6.4.1; Spur 3).

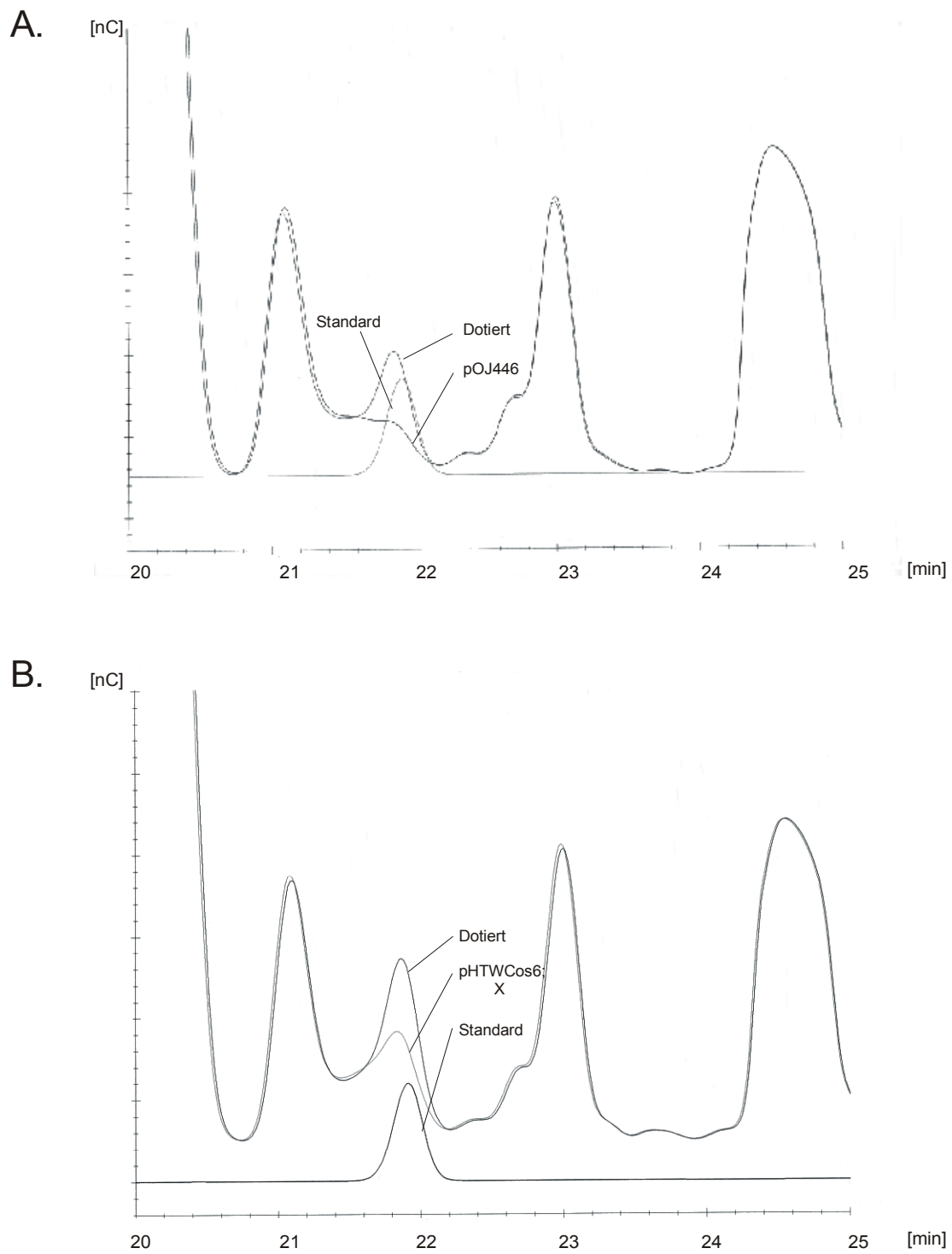


**Abb. 3.6.4.1:** Nachweis der *in vitro* Phosphorylierung von Acarbose.

Dargestellt ist die Dünnschichtchromatografie der *in vitro* Phosphorylierungs-Ansätze von Acarbose mit den angegebenen zellfreien Extrakten. Acarbose und Acarbose-7-phosphat sind markiert. Spur 1: *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6; Spur 2: *S. lividans* 66 TK23 pOJ446; Spur 3: *S. lividans* 66 1326 pHTWCos6; Spur 4: *Actinoplanes* sp. SE50/110; Spur 5: *S. lividans* 66 TK23 pCW201KM6 (C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung).

### 3.6.5 Chromatografische Analyse der Kulturüberstände von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 bzw. *S. lividans* 66 TK23 pOJ446

Zur Analyse der Kulturüberstände von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 bzw. pOJ446 wurden die rekombinanten Stämme für 88 h in MD50-Medium kultiviert (**Kap.** 2.8.2). Nach Abtrennung der zellulären Bestandteile wurden die Kulturüberstände durch HPAE-Chromatografie analysiert (High Pressure Anionic Exchange; **Kap.** 2.16). In den Kulturüberständen von drei unabhängig angezogenen Kulturen des rekombinanten Stamms *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 konnte eine im Vergleich zu der Negativkontrolle, dem Stamm *S. lividans* 66 TK23 pOJ446, zusätzlich auftretende Substanz nachgewiesen werden. Die Retentionszeit des Peakmaximums betrug 21,86 min und stimmte mit der Retentionszeit des Acarbose-Standards (21,91 min) überein (**Abb.** 3.6.5.1, B). Nach Dotierung des Überstandes von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 mit authentischer Acarbose wiesen beide Substanzen ein identisches Retentionsverhalten auf und eluierten als singulärer symmetrischer Peak. Die geringfügig erhöhte Retentionszeit der authentischen Acarbose war möglicherweise auf die biologische Matrix des Kulturüberstandes zurückzuführen. Das Peakmaximum war im Vergleich zu den einzelnen Proben erhöht und wies eine Retentionszeit von 21,85 min auf (**Abb.** 3.6.5.1, B). Die Kulturüberstände der Negativkontrolle, *S. lividans* 66 TK23 pOJ446, wiesen kein vergleichbares Signal im HPAE-Chromatogramm auf, wenngleich auch dieser Stamm Substanzen mit einer im Vergleich zu Acarbose leicht verringerten Retentionszeit produzierte und eine Basislinientrennung der dotierten Acarbose von diesen nicht möglich war (**Abb.** 3.6.5.1, A). Ebenso wie für den Stamm *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 wurde nach Dotierung der Probe mit Acarbose eine leichte Linksverschiebung des Acarbose-Standards im HPAE-Chromatogramm erhalten. Auch hier war dieses Verhalten wahrscheinlich auf die Medienbestandteile zurückzuführen. Dieses Resultat konnte in zwei unabhängigen Anzuchten reproduziert werden und stimmte mit dem Ergebnis der HPAE-Chromatografie des Kulturüberstandes von *S. lividans* 66 TK23 überein (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.6.5.1:** HPAE-Chromatogramm der Kulturüberstände von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 und pOJ446.

Dargestellt sind Ausschnitte der Chromatogramme der Kulturüberstände von *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 (A) und pHTWCos6 (B). Standard: authentische Acarbose [2 mg]; Dotiert: Kulturüberstand + Acarbose-Standard; X: markiert den in Kulturüberständen von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 zusätzlich auftretenden Peak.



Um zu verifizieren, dass es sich bei der in der HPAE-Chromatografie identifizierten Substanz um Acarbose handelte, wurden zusätzlich LC-MS Untersuchungen durchgeführt. Abweichend von den oben verwendeten Bedingungen musste für diese Untersuchungen eine „Reverse-Phase“-Säule eingesetzt werden und die Elution erfolgte im Gegensatz zur HPAE-Chromatografie nicht unter alkalischen Bedingungen (**Kap.** 2.16; Dr. J. LENZ, BAYER AG, persönliche Mitteilung). Eine Trennung der Substanzen im Kulturüberstand basierend auf den korrespondierenden Oxyanionen, wie in der HPAE-Chromatografie, war daher nicht möglich. Im Gegensatz zu der HPAE-Chromatografie konnte jedoch in keiner der analysierten Proben eine Verbindung mit der Masse und identischem Retentionsverhalten von Acarbose nachgewiesen werden. Eine Degradation möglicherweise vorhandener Acarbose durch die verwendeten Chromatografiebedingungen in der LC-MS Analyse wurde durch periodische Analyse einer Standardprobe über einen Zeitraum von 20 h ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt; Dr. J. LENZ BAYER AG, persönliche Mitteilung). Somit wurde durch Kombination von zwei unterschiedlichen Chromatographiesystemen und massenspektrometrischer Analysen der Kulturüberstände eindeutig ausgeschlossen, dass es sich bei der in der HPAE-Chromatografie neu identifizierten Substanz um Acarbose gehandelt hatte. Ein mögliches Intermediat der Acarbosebiosynthese ist Acarbose-7-phosphat, welches unter den in der HPAE-Chromatografie verwendeten Bedingungen (0,5 M NaOH) zu Acarbose hydrolysiert worden sein könnte und daher identische Trenneigenschaften wie authentische Acarbose besaß. Hingegen ist Acarbose-7-phosphat unter den Bedingungen des LC-MS Systems wahrscheinlich stabil. Dies würde das Fehlen eines der Acarbose entsprechenden Massenpeaks erklären. Ein Nachweis von Acarbose-7-phosphat mit Hilfe der LC-MS war bisher jedoch nicht möglich, da weder ein Acarbose-7-phosphat Standard noch Informationen bzgl. der Elutionszeit oder Stabilität dieser Verbindung zur Verfügung standen.

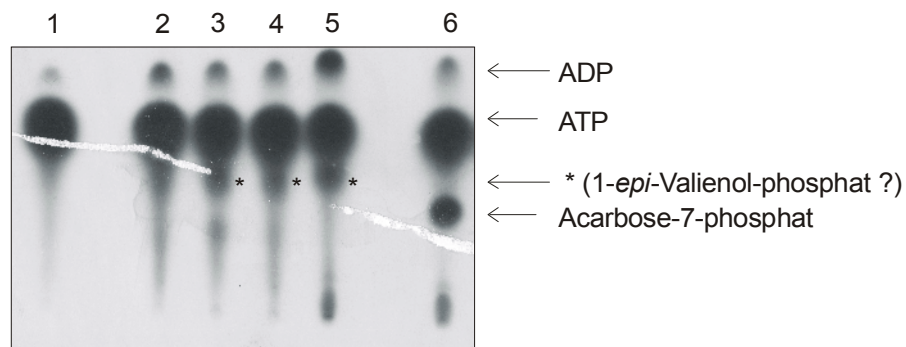
### **3.6.6 Nachweis der Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol durch zellfreie Extrakte von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6**

Aufgrund des, in der Diskussion näher erläuterten, Modells der Acarbose-Biosynthese in *Actinoplanes* sp. stellt die postulierte Phosphorylierung einer Vorstufe der Valienamin-Untereinheit an der C-1-Position des Cyclitols eine Schlüsselreaktion dar. Daher wurde untersucht, ob 1-*epi*-Valienol das Substrat für eine spezifische Phosphorylierung ist und diese durch zellfreie Extrakte von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 katalysiert wird. Für die Untersuchungen stand dabei eine racemische Mischung von 1-*epi*-Valienol zur Verfügung (BLOCK, 2000). Zum Nachweis der Phosphorylierung wurden Enzymsätze mit zellfreien Extrakten von *Actinoplanes* sp. SE50/110, *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 sowie *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 durchgeführt und die Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatografie analysiert (**Kap.** 2.14 & 2.17). Sowohl bei Verwendung des zellfreien Extrakts von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 als auch von *Actinoplanes* sp. SE50/110 war neben ATP und ADP ein zusätzliches Signal im Autoradiogramm

nachweisbar (**Abb. 3.6.6.1**; Spur 3,4,5 markiert durch einen \*), das bei Verwendung des zellfreien Extraktes der Negativkontrolle *S. lividans* 66 TK23 pOJ446 nicht auftrat (**Abb. 3.6.6.1**; Spur 1,2). Im Vergleich zu ATP wies die phosphorylierte Substanz, im Folgenden mit X bezeichnet, ein nur geringfügig erhöhtes Retentionsverhalten in der DC-Analyse auf. Damit ergab sich ein eindeutiger Hinweis, dass 1-*epi*-Valienol spezifisch durch ein *acb*-Genprodukt oder eine Kombination mehrere *acb*-Genprodukte phosphoryliert worden war. Die mögliche Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol durch zellfreie Extrakte von *Actinoplanes* sp. SE50/110 wurde, parallel zu dieser Arbeit, von C. S. ZHANG (persönliche Mitteilung) nachgewiesen und wurde hier als Referenz verwendet.

Ein möglicher Umsatz von 1-*epi*-Valienol zu Acarbose-7-phosphat wurde durch das unterschiedliche Laufverhalten der phosphorylierten Verbindung (X), vermutlich 1-*epi*-Valienol-phosphat, und des Acarbose-7-phosphats ausgeschlossen. Die Acarbose-7-phosphat-Referenz wurde wiederum durch Phosphorylierung von Acarbose mit einem zellfreien Extrakt von *Actinoplanes* sp. SE50/110 hergestellt (**Abb. 3.6.6.1**, Spur 6).

Eine mögliche Phosphorylierung und anschließende Adenylierung von 1-*epi*-Valienol konnte ausgeschlossen werden, da nur ATP und ADP jedoch nicht die, neu aufgetretene, phosphorylierte Verbindung (X; **Abb. 3.6.6.1** markiert durch \*) durch UV-Licht (254 nm) nachweisbar waren. Diese Resultate deuteten daraufhin, dass es sich bei der neu identifizierten Substanz tatsächlich um 1-*epi*-Valienol-phosphat gehandelt haben könnte. Eine genaue Charakterisierung war jedoch nicht möglich, da eine Referenzprobe nicht zur Verfügung stand.

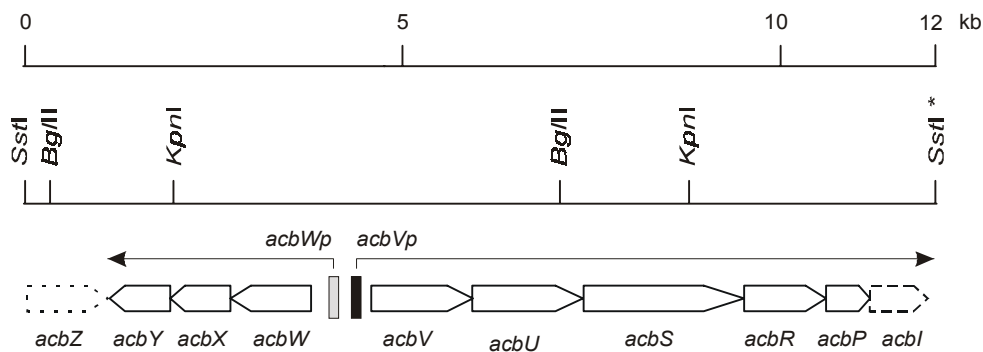


**Abb. 3.6.6.1:** Nachweis der *in vitro* Phosphorylierung durch *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6.

Dargestellt ist das Autoradiogramm der Dünnschichtchromatografie von *in vitro* Phosphorylierungsansätzen mit 1-*epi*-Valienol (Spur 1-5) und Acarbose (Spur 6). Die Positionen von ADP, ATP und Acarbose-7-phosphat sind angegeben. Die Position der in Ansätzen mit zellfreien Extrakten von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 und *Actinoplanes* sp. SE50/110 zusätzlich auftretende phosphorylierte Substanz, vermutlich 1-*epi*-Valienol-phosphat, ist durch einen Stern gekennzeichnet. Es wurden die angegebenen zellfreien Extrakte verwendet. Spur 1,2: *S. lividans* 66 TK23 pOJ446; Spur 3,4: *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6; Spur 5,6: *Actinoplanes* sp. SE50/110.

### 3.7 Charakterisierung von *S. lividans* 66 TK23 pHTW214

Aufgrund der Übereinstimmungen von AcbR und AcbS mit Enzymen die an der Aktivierung und dem Transfer von Monosacchariden auf Akzeptormoleküle beteiligt sind, wurde das in der Diskussion erläuterte Modell der Acarbose-Biosynthese aufgestellt. Dabei sollen die Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol, möglicherweise durch die postulierte Kinase AcbU und die anschließende AcbR-katalysierte Nukleotidylierung Schlüsselreaktionen der Biosynthese der Acarviosyl-Untereinheit darstellen (**Kap.** 4.6). Um diese beiden Schritte *in situ* zu ermöglichen, wurde basierend auf dem Shuttle-Plasmid pUWL218 das Expressionsplasmid pHTW214 konstruiert und in den heterologen Wirtstamm *S. lividans* 66 TK23 transformiert (**Tab.** 2.1.3 & 2.9.10; WEHMEIER, 1995). Neben *acbR*, *acbS* und *acbU* waren auch noch die Gene *acbW*, *acbX*, *acbY*, *acbV*, *acbP* und partiell die Gene *acbI* und *acbZ* auf diesem Plasmid vorhanden. Dabei bildeten *acbVUSRPI* sowie *acbWXY* jeweils eine Transkriptionseinheit und diese waren divergent zueinander angeordnet (**Abb.** 3.7.1). Die Expression der *acb*-Gene beider Transkriptionseinheiten sollte reguliert durch die postulierten Promotoren *acbWp* bzw. *acbVp* erfolgen. Diese waren vermutlich in der intercistronischen Region zwischen *acbW* und *acbV* lokalisiert..



**Abb. 3.7.1 :** Genanordnung des Inserts in pHTW214.

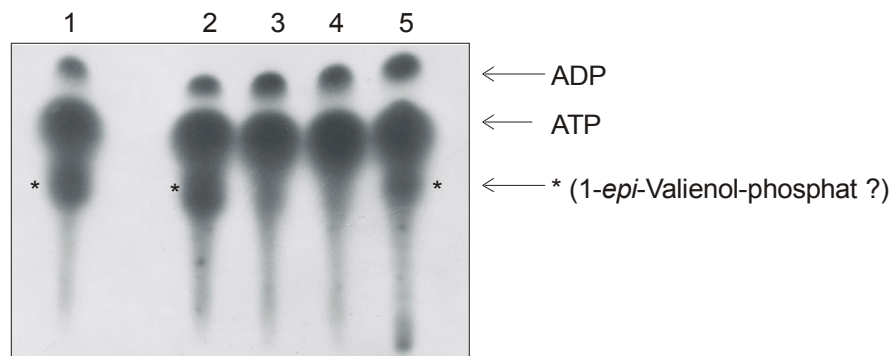
Die durch das Expressionsplasmid pHTW214 codierten Gene des *acb*-Genclusters, ihre Orientierung sowie die zwei postulierten Transkriptionseinheiten sind schematisch dargestellt. Die Transkriptionseinheiten sind als Pfeile und die korrespondierenden postulierten Promotoren als graues (*acbWp*) bzw. schwarzes (*acbVp*) Rechteck eingezeichnet. Nur partiell auf diesem DNA-Fragment vorhandene Gene sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die mit (\*) bezeichnete *SstI* Erkennungssequenz entstammt dem Polylinker des rekombinanten GEM12-Phagen Φ52.

Zur Induktion der Genexpression wurde die Anzucht von *S. lividans* 66 TK23 pHTW214 und der entsprechenden Negativkontrolle mit dem Plasmid pUWL218 in dem Acarbose-Produktionsmedium MD50-Medium, supplementiert mit 20 µg/ml Thiostrepton, durchgeführt (**Kap.** 2.8.1). Bei der SDS-PAGE Analyse der zellfreien Extrakten von *S. lividans* 66 TK23 pHTW214 waren im Vergleich zu der Negativkontrolle jedoch keine zusätzlich produzierten Proteine nachweisbar (**Kap.** 2.11; Daten nicht gezeigt). Dies entsprach den Analysen des zellfreien Extrakts von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 und war möglicherweise durch eine zu geringe Transkriptionsrate ausgehend von den postulierten Promotoren *acbWp* bzw. *acbVp* bedingt.

### 3.7.1 Enzymatische Charakterisierung von *S. lividans* 66 TK23 pHTW214

Zum Nachweis der möglichen Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol wurden Enzymansätze mit zellfreien Extrakten von *Actinoplanes* sp. SE50/100, *S. lividans* 66 TK23 pHTW214 und der entsprechenden Negativkontrolle *S. lividans* 66 TK23 pUWL218 durchgeführt (**Kap.** 2.14). Als Substrat wurde wiederum ein Racemat des 1-*epi*-Valienols verwendet und die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels Dünnschichtchromatografie (**Kap.** 2.17; BLOCK, 2000).

Bei Verwendung des zellfreien Extrakts von *S. lividans* 66 TK23 pHTW214 konnte im Vergleich zu der Negativkontrolle mit dem Plasmid pUWL218 ein zusätzliches Signal in dem Autoradiogramm identifiziert werden (**Abb.** 3.7.1.1, Spur 1,2, markiert durch \*). Ein entsprechendes Signal wurde auch bei Verwendung eines zellfreien Extrakts von *Actinoplanes* sp. SE50/110 erhalten (**Abb.** 3.7.1.1, Spur 6 \*; C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse deuteten auf eine spezifische *in vitro* Phosphorylierung des 1-*epi*-Valienols, möglicherweise zu 1-*epi*-Valienol-phosphat, hin. Katalysiert wurde diese höchstwahrscheinlich durch eines der, auf dem Expressionsplasmid pHTW214 codierten, *acb*-Genprodukte. Eine theoretisch denkbare Phosphorylierung und anschließende Adenylierung des 1-*epi*-Valienols (vergleiche **Kap.** 4.6) konnte ausgeschlossen werden, da ein Nachweis der phosphorylierten Substanz (\*) durch UV-Licht (254 nm) im Gegensatz zu ATP und ADP nicht möglich war. Eine eindeutige Charakterisierung der phosphorylierten Verbindung als 1-*epi*-Valienol-phosphat konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da eine Referenzprobe nicht zur Verfügung stand.



**Abb. 3.7.1.1 :** Nachweis der *in-vitro* Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol.

Dargestellt ist das Autoradiogramm der Dünnschichtchromatografie der *in vitro* Phosphorylierungs-Ansätze mit den angegebenen zellfreien Extrakten. Die Position der in Ansätzen mit zellfreien Extrakten von *S. lividans* 66 TK23 pHTW214 und *Actinoplanes* sp. SE50/110 zusätzlich auftretende phosphorylierte Substanz, vermutlich 1-*epi*-Valienol-phosphat, ist durch einen Stern (\*) markiert. Ebenfalls angegeben ist die Position von ATP und ADP. Spur 1,2: *S. lividans* 66 TK23 pHTW214; Spur 3,4: *S. lividans* 66 TK23 pUWL218 (Negativkontrolle); Spur 5: *Actinoplanes* sp. SE50/110.

## 4. Diskussion

### 4.1 Struktur des vollständigen *acb*-Genclusters

Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von Acarbose und ähnlichen Metaboliten wurden bisher nur in *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *S. glaucescens* GLA.O durchgeführt (STRATMANN, 1997; DECKER, HOECHST AG, Patent DE19622783, 1997; STRATMANN et al., 1999; DIAZ-GUARDAMINO, 2000; HEMKER et al., 2001; M. JARLING, persönliche Mitteilung). Die zur Identifizierung der Gencluster beider Bakterien verwendeten Strategien sowie ihre Struktur und Genbestand werden im Folgenden gegenübergestellt.

Ein erster Abschnitt des *acb*-Genclusters aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 wurde durch heterologe PCR und Hybridisierung chromosomaler DNA mit dem Gen *strE* (dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase aus *S. griseus* N2-3-11) isoliert, und ein vergleichbarer Ansatz wurde auch zur Identifizierung des Genclusters aus *S. glaucescens* GLA.O erfolgreich angewendet. (**Abb.** 1.5.1., **Abb.** 4.1.2)

In *Actinoplanes* sp. SE50/110 umfasste der mit diesem Ansatz identifizierte Bereich die Gene *acbHFGDEABCONLMKQJ* (**Tab.** 4.1.1, vgl. **Tab.** 1.5.1; STRATMANN, 1997; STRATMANN et al. 1999; HEMKER et al. 2001; M. JARLING, persönliche Mitteilung). Die Charakterisierung dieser Gene als *acb*-Gencluster wurde durch verschiedene enzymologische Untersuchungen, insbesondere die Charakterisierung der 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon Synthase AcbC, bestätigt (**Kap.** 1.4 & 1.5; DREPPER AND PAPE, 1996; GOEKE et al., 1996; STRATMANN, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000; HEMKER et al., 2001; M. JARLING, persönliche Mitteilung; C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung).

Hingegen umfasste der bisher analysierte Bereich des *acb*-Genclusters aus *S. glaucescens* GLA.O nur die fünf Gene *acbABCDE* (im Weiteren durch den Zusatz Sgl gekennzeichnet; **Tab.** 4.1.2). Die Deletion der Gene für die dTDP-Glucose-Synthase (*acbCSgl*), die dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (*acbDSgl*) und die Aminotransferase (*acbBSgl*) in *S. glaucescens* GLA.O führte zu einem Verlust der Acarbose-Produktion und bildete damit ihre hypothetische Zuordnung zu einem weiteren *acb*-Gencluster.

Beim Vergleich der Gencluster aus beiden Bakterien fiel auf, dass sowohl in *S. glaucescens* GLA.O als auch in *Actinoplanes* sp. SE50/110 Gene für eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (*acbB*, *acbDSgl*) und dTDP-Glucose-Synthase (*acbA*, *acbCSgl*) vorhanden waren, jedoch in *Actinoplanes* sp. SE50/110 kein Gen für eine Aminotransferase vorlag. Da gestützt durch die Mutantenuntersuchungen eine Beteiligung der Aminotransferase an der Acarbose-Biosynthese in *S. glaucescens* GLA.O angenommen werden konnte, wurden DNA-Hybridisierungen der genomischen DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit dem Gen *acbBSgl* als Gensonde durchgeführt und weitere *acb*-Gene isoliert. Der so identifizierte Abschnitt des *acb*-Genclusters von *Actinoplanes* sp. SE50/110 umfasste die Gene *acbUVWX* (**Tab.** 4.1.1; **Abb.** 1.5.1; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Dabei konnte das Genprodukt des Gens *acbV* enzymologisch als dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose Aminotransferase charakterisiert werden und wies signifikante Übereinstimmungen mit der Aminotransferase AcbBSgl auf

(73 % identische Aminosäuren; DECKER, HOECHST AG Patent DE19622783, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Vergleichbare Übereinstimmungen waren auch zwischen dem Genprodukt von *acbW* aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *acbASgl* aus *S. glaucescens* GLA.O vorhanden (72 % identische Aminosäuren in einem Überlapp von 240 Aminosäuren; diese Arbeit; DECKER, HOECHST AG, Patent DE19622783, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Eine Beteiligung der Gene *acbUVWX* aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 an der Acarbose-Biosynthese wurde daher postuliert (DIAZ-GUARDAMINO, 2000).

Erstes Ziel dieser Arbeit war es die beiden unabhängig isolierten Bereiche des *acb*-Genclusters (**Abb. 1.5.1**) zu einer Einheit zu ergänzen und neue potentielle Biosynthesenzyme zu identifizieren. Durch die Charakterisierung des rekombinanten Phagen  $\Phi 52$  konnte erstmals bewiesen werden, dass die beiden unabhängig isolierten Teilcluster in *Actinoplanes* sp. SE50/110 zu einem durchgehenden *acb*-Gencluster gehören (**Abb. 4.1.1**).

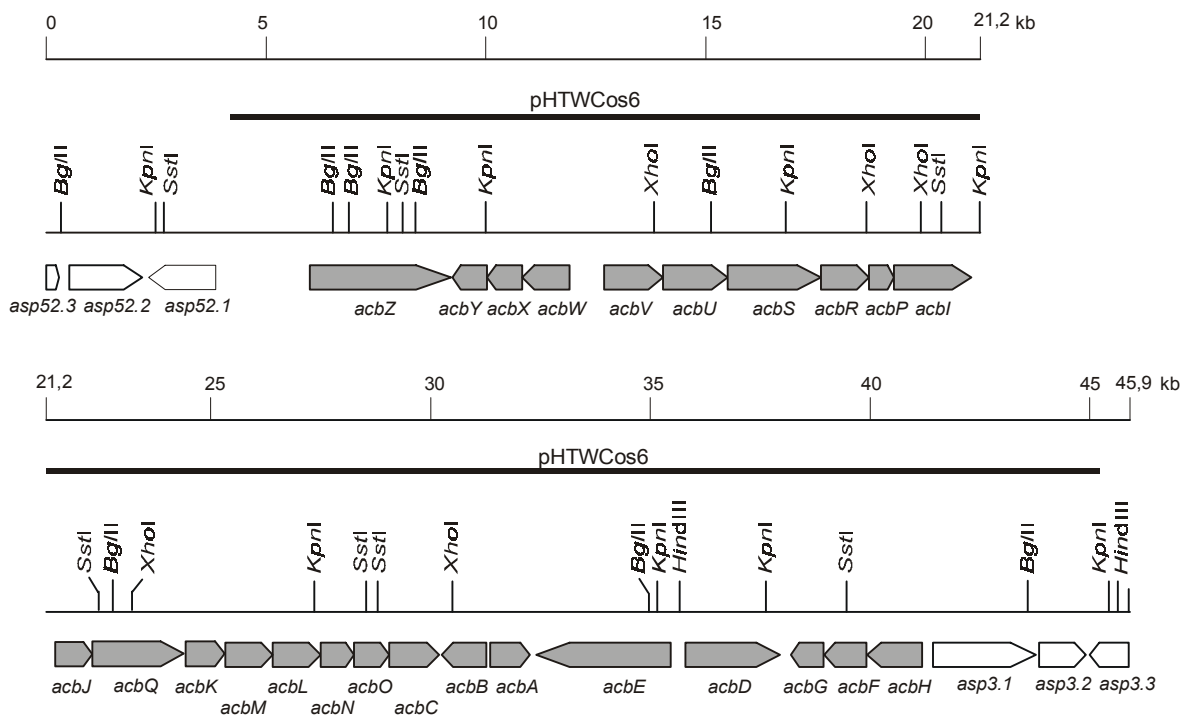
Auf der Grundlage der DNA Sequenz des Inserts des Phagen  $\Phi 52$  (20,13 kb) konnten 13 offene Leserahmen (*acbIPRSUVWXYZ*, *asp52.1*, *asp52.2* und *asp52.3*) identifiziert werden; dabei waren die Gene *acbI* und *asp52.3* auf dem in dieser Arbeit analysierten DNA-Abschnitt nur partiell vorhanden. Mit Ausnahme von *Asp52.1*, *Asp52.2* und *Asp52.3* konnte den Translationsprodukten, basierend auf Aminosäuresequenzvergleichen, eine Funktion innerhalb der Acarbose-Biosynthese zugeordnet werden (**Tab. 4.1**). So ergab sich insgesamt das folgende Bild vom notwendigen Genbestand des Acarbose-Metabolismus bzw. *acb*-Genclusters von *Actinoplanes* sp. SE50/110 (**Tab. 4.1**, **Abb. 4.1**): Alle mit *acb* bezeichneten Gene sollten, durch unterschiedliche Evidenzen gestützt, zum *acb*-Gencluster gehören. Überwiegend beruhte diese Zuordnung auf dem Vergleich der Translationsprodukte mit bekannten Proteinen und ihrer daraus abgeleiteten, postulierten Funktion innerhalb des Acarbose-Metabolismus (**Kap. 4.5 & 4.6**). Darüberhinaus wurde die Funktion der Proteine *AcbE* ( $\alpha$ -Amylase), *AcbD* (Acarviosyltransferase), *AcbK* (Acarbose-7-Kinase), *AcbC* (2-*epi*-5-*epi*-Valiolon-Synthase) und *AcbV* (Aminotransferase) enzymologisch charakterisiert (DREPPER AND PAPE, 1996; GOEKE et al., 1996; STRATMANN, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000; HEMKER et al., 2001; M. JARLING, persönliche Mitteilung; C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung). Allerdings war eine Funktionszuordnung für die Proteine *AcbI*, *AcbJ*, *AcbL*, *AcbN* und *AcbO* bisher nicht möglich. Eine Beteiligung an dem Acarbose-Metabolismus war aber aufgrund der Anordnung der Gene innerhalb des *acb*-Genclusters anzunehmen. Für die mit *asp* bezeichneten Gene war, wegen ihrer vermuteten Funktion, eine Beteiligung am Acarbose-Metabolismus nicht zu vermuten.

Die Gene des *acb*-Genclusters sind aufgrund ihrer Anordnung wahrscheinlich in neun verschiedenen Transkriptionseinheiten organisiert: *acbZ*, *acbWXY*, *acbVUSRPI*, *acbJQKMLNOC*, *acbB*, *acbA*, *acbE*, *acbD* und *acbHFG* (STRATMANN, 1997; STRATMANN et al., 1999; HEMKER et al., 2001; M. JARLING, persönliche Mitteilung; C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung; U. WEHMEIER, persönliche Mitteilung; diese Arbeit).

Im Gegensatz zu dem *acb*-Gencluster aus *S. glaucescens* GLA.O waren die Gene für die dTDP-Glucose-Synthase (*acbCSgl*, *acbA*) und die dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (*acbDSgl*, *acbB*) sowie für die Aminotransferase (*acbBSgl*, *acbV*) und das ATP-Bindeprotein *acbASgl*, *acbW*) in *Actinoplanes* sp. SE50/110 nicht direkt hintereinander und

in gleicher Orientierung angeordnet (**Abb.** 4.1.1 & 4.1.2), wiesen aber in der Aminosäuresequenz jeweils eine hohe Übereinstimmung auf (DECKER, Hoechst AG, Patent DE19622783, 1997; STRATMANN, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Auch ein mit AcbESgl vergleichbarer Transkriptionsregulator war innerhalb des *acb*-Genclusters aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 nicht vorhanden. Möglicherweise deutet die offensichtliche Variabilität in Organisation und Genbestand der beiden *acb*-Gencluster auf eine in wesentlichen Bereichen unterschiedliche Biosynthese von Acarbose und/oder Regulation der Genexpression in den beiden Bakterien hin. Anscheinend sind die beiden Gencluster nur entfernt miteinander verwandt und nicht als Ganzes durch horizontalen Gentransfer zwischen *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *S. glaucescens* GLA.O ausgetauscht worden, sodass entweder eine stark divergente oder völlig unabhängige Evolution der Gencluster angenommen werden muss. Weiterhin war es ein vorrangiges Ziel die Abgrenzung des *acb*-Genclusters durch Expression aller bekannten Biosynthesegene in dem heterologen Wirtstamm *S. lividans* 66 TK23 zu untersuchen (**Kap.** 4.2). Die notwendige Voraussetzung für die heterologe Expression aller postulierten *acb*-Gene in *S. lividans* 66 TK23 wurde durch die Konstruktion der Cosmidbank genomischer DNA von *Actinoplanes* sp. SE50/110 in dem Shuttle-Cosmid pOJ446 und die Isolierung des rekombinanten Cosmids pHTWCos6 geschaffen (**Kap.** 4.2). Das 41,1 kb große Insert des Cosmids pHTWCos6 umfasste dabei alle Gene des *acb*-Gencluster und zusätzlich die Gene *asp3.1*, *asp3.2* sowie partiell das Gen *asp3.3* (**Abb.** 4.1.1).

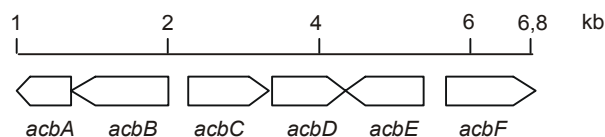




**Abb. 4.1.1:** Die chromosomale Organisation und Umgebung des postulierten *acb*-Genclusters aus *Actinoplanes* sp. 50/110.

Das *acb*-Gencluster sowie die angrenzenden Gene aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 sind schematisch dargestellt. Der durch das Cosmid pHTWCos6 abgedeckte Bereich ist angegeben. Gene, die vermutlich zum *acb*-Gencluster gehören, sind mit *acb* bezeichnet.

**A.**



**B.**

Gen	Postulierte Funktion des Genproduktes
<i>acbA</i>	ATP-Bindeprotein
<i>acbB</i>	Aminotransferase
<i>acbC</i>	dTDP-Glucose-Synthase
<i>acbD</i>	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase
<i>acbE</i>	Regulator
<i>acbF</i>	Bindeprotein eines ABC-Transporters

**Abb. 4.1.2:** Das partielle *acb*-Gencluster aus *S. glaucescens* GLA.O.

Dargestellt ist die Anordnung der Gene des *acb*-Genclusters (A) sowie die postulierte Funktion ihrer Translationsprodukte (B) (DECKER, HOECHST AG Patent DE19622783, 1997).

**Tab. 4.1.1:** Gene der *acb*-Gencluster-Region im Chromosom von *Actinoplanes* sp. SE50/110. (vgl. **Abb. 4.1.1** bzgl. der Reihenfolge und Anordnung der Gene)

Gen	postulierte Funktion des Genproduktes	Referenz <sup>a</sup>
<i>asp52.3</i>	unbekannt, Regulator ?; bisher nur der Carboxy-Terminus bekannt	1
<i>asp52.2</i>	unbekannt, Signal-Transduktion ?	1
<i>asp52.1</i>	Arabinofuranosidase	1
<i>acbZ</i>	$\alpha$ -Amylase	1
<i>acbY</i>	Membrankomponente des ABC-Exporters AcbWXY	1
<i>acbX</i>	Membrankomponente des ABC-Exporters AcbWXY	2, 1
<i>acbW</i>	ATP-Bindeprotein des ABC-Exporters AcbWXY	1, 2
<i>acbV</i>	Aminotransferase	2, 1
<i>acbU</i>	Cyclitol-Kinase	1, 2
<i>acbS</i>	NDP-Cyclitol-Transferase	1
<i>acbR</i>	NDP-Cyclitol-Synthase	1
<i>acbP</i>	NUDIX-Hydrolase	1
<i>acbI</i>	unbekannt	1, 7
<i>acbJ</i>	unbekannt	7
<i>acbQ</i>	Amylomaltase-ähnliche Funktion mit Acarbose als Substrat anstatt Maltodextrinen.	3, 7
<i>acbK</i>	Acarbose-7-Kinase	6, 8, 3
<i>acbM</i>	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -Valiolon-Kinase	8
<i>acbL</i>	unbekannt	7
<i>acbN</i>	unbekannt	7
<i>acbO</i>	unbekannt	7
<i>acbC</i>	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -Valiolon-Synthase	4
<i>acbB</i>	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase	3
<i>acbA</i>	dTDP-Glucose-Synthase	3
<i>acbE</i>	$\alpha$ -Amylase	3
<i>acbD</i>	Acarviosyltransferase	5, 3
<i>acbG</i>	Membranprotein des ABC-Importers AcbHGF	3
<i>acbF</i>	Membranprotein des ABC-Importers AcbHGF	3
<i>acbH</i>	Bindeprotein des ABC-Importers AcbHGF	3
<i>asp3.1</i>	Galactocerebrosidase	7
<i>asp3.2</i>	Xylanase	7
<i>asp3.3</i>	unbekannt	7

(a) 1: diese Arbeit; 2: DIAZ-GUARDAMINO, 2000; 3: STRATMANN, 1997; 4: STRATMANN et al., 1999; 5: HEMKER et al., 2001; 6: GOEKE et al., 1996, DREPPER AND PAPE, 1996; 7: M. JARLING, persönliche Mitteilung; 8: C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung

## 4.2 Heterologe Expression des *acb*-Genclusters in *S. lividans* 66 TK23

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Umfang des *acb*-Genclusters von *Actinoplanes* sp. SE50/110 zu bestimmen. In diesem Zusammenhang erwies es sich als problematisch, dass die Konstruktion von Gen-Deletionsmutanten in *Actinoplanes* sp. SE50/110 nicht möglich war. Somit konnte nicht überprüft werden, ob die Deletion von einzelnen *acb*-Genen zum Abbruch der Acarbose-Biosynthese und der Akkumulation postulierter Biosyntheseintermediate in *Actinoplanes* sp. SE50/110 führt. Um diese Probleme zu umgehen, wurde das komplette *acb*-Gencluster in dem heterologen Wirtstamm *S. lividans* 66 TK23 exprimiert und die erwartete Produktion von Acarbose überprüft. Voraussetzung hierfür war die Identifikation des, auf dem *E. coli*/Streptomyceten Shuttle Vektor pOJ446 basierenden, Cosmids pHTWCos6, das alle postulierten Gene des *acb*-Genclusters umfasste und auch in *S. lividans* 66 TK23 replizierte (**Kap.** 4.1; BIERMANN et al., 1992). Ein analoges Vorgehen wurde auch schon erfolgreich für die Identifizierung von Polyketid-Genclustern aus *Streptomyces* sp. WP4669 bzw. *S. rimosus* NRRL3016 und zum Nachweis der für die Nikkomycin Biosynthese essentiellen Gene eingesetzt (BORMANN et al., 1996; HONG et al., 1997).

Die Strategie, die Gene des *acb*-Genclusters, reguliert durch ihre eigenen Promotoren, in *S. lividans* 66 TK23 zu exprimieren war offensichtlich erfolgreich. Durch den Nachweis der Enzymaktivität von AcbK (Acarbose-7-Kinase), AcbD (Acarviosyltransferase) und der Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol, sowie die Identifikation der Proteine AcbD und AcbE in dem Kulturüberstand von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 wurde die Expression ausgewählter Gene des *acb*-Genclusters eindeutig gezeigt (STRATMANN, 1997; HEMKER et al., 2001; GOEKE et al., 1996, DREPPER AND PAPE, 1996). Somit erscheint die Annahme, dass auch die übrigen *acb*-Gene in *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 exprimiert worden sind, gerechtfertigt. Dies gilt vor allem für die, wahrscheinlich auf einer Transkriptionseinheit liegenden, Gene *acbJQKMLNOC*, da die Enzymaktivität von AcbK bestätigt wurde. Für eine Expression der Gene der Transkriptionseinheit *acbVUSRPI* sprach auch die vermutlich durch AcbU katalysierte Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol (**Kap.** 4.5).

Entgegen den Erwartungen konnte in den Kulturüberständen zwar keine Acarbose, aber eine mit Acarbose verwandte Substanz, möglicherweise das Biosyntheseintermediat Acarbose-7-phosphat, identifiziert werden. Neben dem in der HPAE-Chromatografie unter alkalischen Bedingungen (0,5 M NaOH) identischen Retentionsverhalten im Vergleich zu Acarbose, wird diese Vermutung auch durch Arbeiten von C. S. ZHANG (persönliche Mitteilung) gestützt. So konnte in einem radioaktiven Test eine Substanz in dem Kulturüberstand von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 durch die Acarbose-7-Kinase AcbK phosphoryliert werden, wobei das Produkt als Acarbose-7-phosphat charakterisiert worden ist (C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung). Da keine freie Acarbose in den Kulturüberständen nachweisbar war, basierte der Nachweis von radioaktivem Acarbose-7-phosphat wahrscheinlich auf einem AcbK-abhängigen Austausch der Phosphatgruppen zwischen dem kalten Acarbose-7-phosphat im Kulturüberstand und der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP. Der Export von Acarbose-7-phosphat kann gut mit dem postulierten Modell der Acarbose-Biosynthese in *Actinoplanes* sp. SE50/110 in Einklang gebracht werden (**Kap.** 4.6). In diesem Modell

würde die Inhibierung intrazellulärer  $\alpha$ -Glucosidasen durch die Phosphorylierung von Acarbose verhindert und so eine Selbstresistenz vermittelt. Erst nach erfolgtem Export des inaktiven Acarbose-7-phosphats würde dieses durch eine extrazelluläre Phosphatase zu Acarbose dephosphoryliert. Ein vergleichbarer Export- und Resistenzmechanismus wurde auch für die Streptomycinbiosynthese in *S. griseus* N2-3-11 beschrieben (WALKER, 1975; MANSOURI AND PIEPERSBERG, 1991). Das Antibiotikum wird als inaktives Streptomycin-6-phosphat exportiert und erst durch die extrazelluläre Phosphatase StrK zu dem antibiotisch wirksamen Streptomycin dephosphoryliert. Im Gegensatz zu dem *acb*-Gencluster aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 befindet sich das Gen *strK* in *S. griseus* N2-3-11 jedoch innerhalb des Streptomycin-Biosynthesegenclusters. Ob innerhalb oder außerhalb des *acb*-Genclusters ebenfalls ein Gen für eine Acarbose-7-phosphat spezifische Phosphatase in dem Genom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 vorkommt, ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise war eine zwar produzierte und exportierte Phosphatase unter den verwendeten Kulturbedingungen inaktiv. Auch die Phosphatase StrK wird z.B. durch ein geringfügiges Absinken des pH-Wertes des Kulturüberstandes inaktiviert (W. PIEPERSBERG, persönliche Mitteilung). Denkbar wäre auch eine Dephosphorylierung während des Exports, wobei diese Alternative durch den Nachweis von Acarbose-7-phosphat in dem Kulturüberstand von *Actinoplanes* sp. SE50/110 ausgeschlossen werden könnte. Eine vergleichbare Situation wurde auch bei der heterologen Expression von Polyketid-Genclustern aus *S. rimosus* NRRL 3016 und *Streptomyces* WP 4669 in *S. lividans* beobachtet (HONG et al., 1997). Dort kam es ebenfalls zu einer Akkumulation von Metaboliten, die in dem natürlichen Produzenten nur transient oder in einer wesentlich geringeren Konzentration vorkamen.

Somit konnte die in dieser Arbeit vorgenommene Definition des *acb*-Genclusters durch die heterologe Expression der *acb*-Gene in *S. lividans* 66 TK23 weitgehend bestätigt werden. Die bisherigen Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass durch die heterolog in *S. lividans* 66 TK23 exprimierten *acb*-Gene Acarbose-7-phosphat gebildet und ausgeschieden worden war. Offensichtlich sind alle für die Biosynthese von Acarbose benötigten Gene in dem *acb*-Gencluster vorhanden und werden auch durch den heterologen Wirtstamm *S. lividans* 66 TK23 produziert. Eine Ausnahme könnte dabei eine Phosphatase zur Dephosphorylierung von Acarbose-7-phosphat zu Acarbose darstellen. Ob hierfür eine spezifische Phosphatase in *Actinoplanes* sp. SE50/110 vorhanden ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

### 4.3 Gibt es eine Regulation des Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp. ?

Obwohl bisher keine detaillierten Erkenntnisse über die Art und Mechanismen der Regulation der Acarbose-Biosynthese in *Actinoplanes* sp. vorliegen, ergaben die bisherigen physiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen Hinweise auf ein mögliches Modell der Regulation.

Ein wichtiger Unterschied zu der Physiologie gut untersuchter Biosynthesen typischer Sekundärmetabolite, wie z. B. die Antibiotika-Biosynthese in Streptomyceten, ist der zeitliche Verlauf der Acarbose-Biosynthese. Sie beginnt in *Actinoplanes* sp. bereits während der exponentiellen Wachstumsphase und nicht erst zu Beginn der stationären Wachstumsphase, wie es bei fast allen Antibiotika, z. B. bei dem Streptomycin, der Fall ist (DREPPER AND PAPE, 1996; PIEPERSBERG AND DISTLER, 1997). Ein Gen für einen „Pathway“-spezifischen Transkriptionsregulator wie z.B. *strR* oder *tylS* für die Streptomycin- bzw. Tylosin-Biosynthese, die innerhalb des jeweiligen Biosynthese-Genclusters vorliegen, ist in dem *acb*-Genclusters ebenfalls nicht vorhanden (PIEPERSBERG AND DISTLER, 1997; BATE et al., 1999; diese Arbeit). Somit scheint eine Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Genexpression durch spezifische Regulatorproteine bei der Acarbose-Biosynthese nicht vorzuliegen. Dabei stimmte der frühe Beginn der Biosynthese gut mit der postulierten Funktion als Kohlenhydrat-Verwertungssystem überein (Kap. 4.6), da der Energiebedarf in der exponentiellen Wachstumsphase naturgemäß sehr hoch ist.

Hinweise auf eine mögliche Substratinduktion durch exogene Kohlenstoffquellen lieferte die erhöhte Produktion von AcbD und AcbE nach Zugabe von Maltotriose oder Maltose zum Kulturmedium (STRATMANN, 1997). Ob sich die vermutlich erhöhte Genexpression nur auf Gene des *acb*-Genclusters oder generell auf Gene, deren Genprodukte an der Metabolisierung von Kohlenhydraten beteiligt sind, erstreckte, ist jedoch nicht bekannt. Unklar ist auch, ob dieser Effekt auf eine Aktivierung der Transkription, wie es für MalT und das Maltoseverwertungssystem von *E. coli* beschrieben worden ist, oder auf eine Derepression der Transkription zurückzuführen ist (BOOS AND SHUMAN, 1998).

Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine Asp52.2 und Asp52.3 könnten an einer solchen Regulation beteiligt sein und als Zwei-Komponenten-Regulationssystem die Transkription initiieren. Denkbar ist, dass Asp52.2 als Membranprotein exogene Maltose/Maltotriose erkennt und anschließend, z. B. durch eine Phosphorylierung, den Transkriptionsregulator Asp52.3 aktiviert. Dieser müsste dann an noch zu identifizierende Erkennungssequenzen in der DNA binden und die Transkription aktivieren. Als mögliche Bindestellen kommen die, in den intercistronischen Bereichen zwischen *acbED* und *acbAB* sowie upstream von *acbV* gelegenen, konservierten Hexanukleotide in Frage (STRATMANN, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). Für diese Hypothese spricht die Identifikation der GGDEF-Domäne in der Aminosäuresequenz von Asp52.2 und von Asp52.3 mit einem potentiellen Transkriptionsregulator aus *M. tuberculosis*. Für Proteine mit der GGDEF-Domäne wird die Beteiligung an der Signaltransduktion postuliert (BATEMAN et al., 2000). Auch sind in *S. coelicolor* A3(2) die Gene eines Asp52.3-ähnlichen Proteins und einer potentiellen „Sensor-Histidinkinase“ benachbart zueinander angeordnet. Eine Beteiligung des Zwei-Komponenten-Regulationssystem PhoQ-PhoP an der Transkriptionsregulation der *mal*-Gene

wurde auch für *E. coli* gezeigt. (BOOS AND SHUMAN, 1998). Aufgrund der nur geringen Sequenzinformationen für Asp52.3 und den geringen Informationen über die Funktion der GGDEF-Domäne müssen diese Überlegungen jedoch derzeit noch als spekulativ angesehen werden.

Ein zusätzlicher Regulationsmechanismus auf Enzymebene durch die NUDIX-Hydrolase AcbP ist ebenfalls denkbar. Als übereinstimmendes Merkmal für die Mitglieder dieser sehr diversifizierten Enzymfamilie wird der Abbau von toxischen Substanzen in der Zelle und/oder akkumulierten Biosyntheseintermediaten (z. B. NDP-aktivierte Kohlenhydrate) angenommen (BESSMAN et al., 1996; DUNN et al., 1999). Innerhalb der Acarbose-Biosynthese könnte AcbP das eventuell toxische NDP-1-*epi*-Valienol hydrolysieren und so eine intrazelluläre Akkumulation verhindern, falls nicht ausreichend dTDP-4-Amino-4,6-dideoxy-D-glucose für die Kondensation dieser Substanzen zu dTDP-Acarviose zur Verfügung steht (**Kap.** 4.6). Die in zellfreien Extrakten von *Actinoplanes* sp. im Vergleich zur Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol nicht oder nur sehr schwach nachweisbare Transaminierung von dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose ist ein Indiz dafür, dass der Aminozucker limitierend für die Kondensationsreaktion sein könnte. (DIAZ-GUARDAMINO, 2000; H. G. FLOSS, persönliche Mitteilung; C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung). Auch kann spekuliert werden, dass die Produktion unterschiedlicher Homologengemische der Acarbose abhängig von den zur Verfügung stehenden C-Quellen im Medium auf die selektive Expression unterschiedlicher Glucanasen zurückzuführen ist. Die unterschiedlichen Hydrolyseprodukte könnten dann mit der Acarviosyl-Untereinheit zu den verschiedenen Homologen kombiniert werden (**Kap.** 4.6.2; FROMMER et al, 1979). Ein Hinweis auf einen derartigen Mechanismus könnte das Fehlen von AcbZ im Überstand von *Actinoplanes* sp. SE50/110 bei Anzucht in dem MD50-Medium darstellen (STRATMANN, 1997).

#### **4.4 Transport von Acarbose und Homologen - Die ABC-Transporter AcbHFG und AcbWXY**

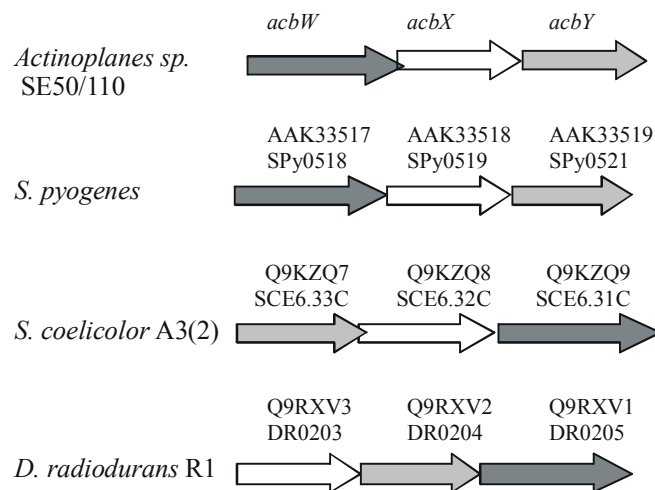
Innerhalb des *acb*-Genclusters sind die zwei zu unterschiedlichen Unterfamilien zugehörigen ABC-Transporter AcbHFG und AcbWXY codiert (STRATMANN, 1997; DIAZ-GUARDAMINO, 2000; M. JARLING persönliche Mitteilung, diese Arbeit).

Der ABC-Transporter AcbHFG war eindeutig in die Gruppe der Bindeprotein-abhängigen Importsysteme für Kohlenhydrate einzuordnen. Das für diese Gruppe charakteristische Substratbindeprotein wird durch AcbH (PF01547) und die zwei integrale Membranproteine durch AcbF bzw. AcbG (PF00528) gebildet (SCHNEIDER AND HUNKE, 1998). Ein für die Energie-Bereitstellung ebenfalls notwendiges ATP-Bindeprotein ist hingegen nicht im *acb*-Gencluster codiert. Dessen Funktion wird wahrscheinlich, wie bei den ABC-Importern für Cellobiose, Maltose und Trehalose aus *S. reticuli*, durch das unspezifische ATP-Bindeprotein MsiK erfüllt (SCHLÖSSER et al., 1997; SCHLÖSSER, 1999; SCHLÖSSER et al., 1999). Ein homologes Protein wurde auch in *Actinoplanes* sp. nachgewiesen (E. SCHNEIDER,

persönliche Mitteilung). Eine Aufnahme von Acarbose und höheren Homologen oder Oligomaltodextrinen in die Zelle durch den Importer AcbHFG kann daher angenommen werden.

Im Gegensatz zu AcbHFG sind die Membranproteine AcbXY und das ATP-Bindeprotein AcbW höchstwahrscheinlich als Komponenten eines ABC-Exporters zu charakterisieren. Die höchsten Übereinstimmungen zu experimentell untersuchten Proteinen bestanden dabei zwischen AcbW und ATP-Bindeproteinen von bakteriellen „Drug-Exportern“, unter anderem mit den ATP-Bindeproteinen der ABC-Exporters für Daunorubicin bzw. Doxorubicin aus *S. peucetius* und für Kasugamycin aus *S. kasugaensis* (DrrA, KasK; GUILFOILE AND HUTCHINSON, 1991; IKENO et al., 2000). Aufgrund der fehlenden Übereinstimmungen zwischen den Membrankomponenten der bakteriellen „Drug-Exporters“ und den Proteinen AcbXY, bildet AcbWXY jedoch eine neue Unterklasse dieser Enzymfamilie. Bisher konnten nur im Genom von *S. pyogenes* M1 GAS, *S. coelicolor* A3(2) und *D. radiodurans* R1 hypothetische ABC-Transporter identifiziert werden, die neben den höchsten Übereinstimmungen zu AcbWXY auf Aminosäureebene auch eine vergleichbare Anordnung der Gene aufwiesen (**Abb.** 4.4.1). Auffällig war auch die, in den ATP-Bindeproteinen der bakteriellen Drug-Exporters nicht vorhandene, konservierte Aminosäuresequenz VFGQRxxLWDDL der ATP-Bindeproteine dieser neuen Unterfamilie. Möglicherweise ist dieser Aminosäuresequenzabschnitt der ATP-Bindeproteine für die Substratbindung und/oder -spezifität der ABC-Exporters verantwortlich. Eine solche Beteiligung an der Substratbindung wird z. B. auch für die ATP-Bindeproteine des Oleandomycin- und Polysialylsäure-Exporters aus *S. antibioticus* bzw. *E. coli* K1 diskutiert (BUCHE et al., 1997; BLISS, et al., 1997).

Innerhalb des Acarbose-Metabolismus kann dabei ein Export von Acarbose oder einer Vorstufe, wie z.B. dTDP-Acarviose, durch AcbWXY vermutet werden. Dieser wäre nicht nur für die Sekretion der *de novo* synthetisierten Acarbose notwendig, sondern würde sich auch gut in das postulierte Modell der Metabolisierung von Kohlenhydraten einfügen (**Kap.** 4.6). Ob die Bindung der Acarviosyl-Untereinheit für die ATP-Bindeproteine der AcbW-Familie charakteristisch ist, sollte daher zukünftig untersucht werden.



**Abb. 4.4.1:** Genanordnung von ABC-Exportern der AcbWXY-Familie

Korrespondierende Gene der ABC-Transporter sind durch identische Farben gekennzeichnet. Die Anordnung und Orientierung der Gene aus *S. coelicolor* A3(2), *S. pyogenes* M1 GAS und *D. radiodurans* R1 basiert auf den Daten der Genomprojekte dieser Bakterien (Referenz vgl. **Kap.** 3.5). Angegeben ist die Accession-Nummer sowie die Identifikationsnummer des Leserahmens. Die Orientierung der Gene *acbWXY* aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 wurde in dieser Arbeit beschrieben.

#### 4.5 1-*epi*-Valienol - Ein Intermediat der Acarbose-Biosynthese?

In biochemischen Analysen zellfreier Extrakte von *Actinoplanes* sp., angezogen unter Acarbose-Produktions-Bedingungen, wurden bisher nur die zwei potentiellen Biosyntheseintermediate Valienol und 1-*epi*-Valienol nachgewiesen (MAHMUD et al., 1999). Da ein Einbau dieser Substanzen in die Acarbose bei Fütterungsexperimenten mit *Actinoplanes* sp. nicht auftrat, wurde postuliert, dass es sich um Abbauprodukte von Acarbose und nicht um Biosynthesestufen handelte. Für Valienol wurde diese Hypothese durch das Auftreten in einer späten Wachstumsphase und somit weit nach Beginn der Acarbose-Produktion gestützt (MAHMUD et al., 1999). Hingegen sprach der Nachweis von 1-*epi*-Valienol in einer frühen Wachstumsphase, dem Beginn der Acarbose-Biosynthese, für 1-*epi*-Valienol als Vorstufe des Valienamins (MAHMUD, et al., 1999). Ein weiteres Indiz war der Nachweis der *in vitro* Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol durch zellfreie Extrakte von *Actinoplanes* sp. SE50/110 (C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung) sowie durch zellfreie Extrakte von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 und *S. lividans* 66 TK23 pHTW214 (diese Arbeit). Die Tatsache, dass 1-*epi*-Valienol bei Fütterungsversuchen nicht in Acarbose eingebaut wurde, könnte durch bisher unbekannte Probleme bei der Aufnahme in die Zelle verursacht worden sein. Eine vergleichbare Situation wurde auch in Untersuchungen der Valdiamycin A Biosynthese in *S. hygroscopicus* var. *limoneus* vorgefunden. Zwar konnte das potentielle Biosyntheseintermediat Validamin in *S. hygroscopicus* var. *limoneus* Kulturen nachgewiesen werden, aber es erfolgte in Fütterungsexperimenten kein Einbau von Isotopen-markiertem Validamin in Validiamycin A (DONG et al., 2001). Es konnte jedoch *in*



*in vitro* die Transaminierung von Validol zu Validamin durch zellfreie Extrakte von *S. hygrosopicus* var. *limoneus* gezeigt werden (DONG et al., 2001). Die Hypothese, dass 1-*epi*-Valienol eine Vorstufe der Valienamin-Untereinheit der Acarbose darstellt, erscheint somit trotz der fehlgeschlagenen Fütterungsexperimente als gerechtfertigt.

Vor allem der Nachweis der *in vitro* Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol durch zellfreie Extrakte von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 bzw. pHTW214 war ein guter Hinweis auf eine Beteiligung dieser Reaktion an der Acarbose-Biosynthese und die beteiligten Enzyme. Die Phosphorylierung wird wahrscheinlich durch das Enzym AcbU katalysiert. Von den auf dem Expressionsplasmid pHTW214 vorhandenen Genen wies nur das Genprodukt AcbU signifikante Übereinstimmungen mit der katalytischen Region der Antibiotika- und Proteinkinasen auf. Dabei war die hohe Variabilität außerhalb der katalytischen Region, selbst innerhalb der AcbU-Unterfamilie, wahrscheinlich auf das sehr unterschiedliche Substratspektrum der Protein- bzw. Aminoglycosid-Kinasen sowie der hypothetischen Proteine aus *S. coelicolor* A3(2), *M. tuberculosis* H37Rv und *Actinoplanes* sp. SE50/110 (AcbU) zurückzuführen. So sind die beiden Proteine Pep2A und Pep2B wahrscheinlich am Maltodextrinstoffwechsel von *S. coelicolor* A3(2) beteiligt (SCHNEIDER et al., 2000). Dass, bezogen auf die gesamte Aminosäuresequenz, sehr geringe Übereinstimmungen im Bereich der katalytischen Aminosäuren mit der Proteinkinase cAPK der Maus für eine Charakterisierung als Kinase ausreichen, wurde erst kürzlich durch die Identifikation der Lipopolysaccharid-Kinase WaaP aus *E. coli* gezeigt (YETHON AND WHITFIELD, 2001).

Wenngleich keine experimentellen Daten über die Position und Stereochemie der Phosphorylgruppe innerhalb des 1-*epi*-Valienol-phosphats vorlagen, erscheint eine Phosphorylierung an Position C-1 des Cyclitols am wahrscheinlichsten, da die Einführung einer Phosphatgruppe an dieser Position für die nachfolgende, postulierte Nukleotidaktivierung des Cyclitols notwendig ist (**Abb.** 4.6.1). Ein Hinweis auf eine derartige Reaktionsabfolge war auch die Anordnung der Gene der potentiellen Kinase AcbU sowie des GlgC-ähnlichen Proteins AcbR auf einer Transkriptionseinheit des *acb*-Genclusters aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 (**Kap.** 4.1). Dabei war die Übereinstimmung zwischen AcbR und dem GlgC-Proteinen aus den nahe verwandten Mikroorganismen *S. coelicolor* A3(2) und *M. tuberculosis* H37Rv mit ca. 30% identischen Aminosäuren sehr viel geringer als die Übereinstimmung zwischen den GlgC-Homologen dieser beiden Bakteriengattungen (ca. 60% identische Aminosäuren). Diese Abweichungen sind wahrscheinlich in der Veränderung des Substratspektrums von Glucose-1-phosphat im Fall der GlgC-Proteine hin zu 1-*epi*-Valienol-1-phosphat für AcbR begründet. Dennoch ist anzunehmen, dass ebenso wie bei der Glykogensynthese (GlgC-Proteine) ATP das Nukleotid-Cosubstrat von AcbR darstellt (MARTIN et al., 1997). Eine vergleichbare Reaktionsabfolge wurde auch in Leberzellen des Schweins nachgewiesen. Dort erfolgt die Phosphorylierung von N-Acetylgalactosamin und die anschließende Nukleotidylierung an dem, der Position C-1 des 1-*epi*-Valienols entsprechenden, anomeren Zentrum von N-Acetylgalactosamin (PASTUSZAK et al., 1996; SZUMILO et al., 1996).

Da auf dem Expressionsplasmid pHTW214 und dem Cosmid pHTWCos6 neben *acbU* auch das Gen *acbR* vorlag, waren die Voraussetzungen für eine gekoppelte Phosphorylierung (AcbU-katalysiert) und anschließende Adenylierung (AcbR-katalysiert) von 1-*epi*-Valienol durch die zellfreien Extrakte gegeben (vgl. **Kap.** 4.6.1). Entgegen den Erwartungen konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden. Da weder AcbU noch AcbR durch eine SDS-PAGE Analyse der zellfreien Extrakten von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 bzw. *S. lividans* 66 TK23 pHTW214 nachweisbar waren, noch Referenzproben von NDP-1-*epi*-Valienol zur Verfügung standen, könnten Probleme bei der Genexpression, den verwendeten Reaktionsbedingungen (Salzkonzentration, Cosubstrat etc.) und der Analytik für das negative Ergebnis verantwortlich gewesen sein.

Aufgrund der nachgewiesenen AcbM-katalysierten Phosphorylierung von 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon, möglicherweise an Position C-7 des Cyclitols (C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung), können die dargestellten Beobachtungen zur Beteiligung des 1-*epi*-Valienols an der Acarbose-Biosynthese auch folgendermaßen interpretiert werden (vgl. **Kap.** 4.6.1): 1. 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon-7-phosphat wird durch nachfolgende Reaktionen zu 1-*epi*-Valienol-7-phosphat umgesetzt und dieses ist das „natürliche“ Substrat der potentiellen Kinase AcbU. Dann würde die Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol nur eine artifizielle *in vitro* Nebenreaktion darstellen, und das natürliche Produkt der Phosphorylierung wäre höchstwahrscheinlich 1-*epi*-Valienol-1,7-diphosphat. 2. Somit könnten die erfolglosen Versuche einer gekoppelten Phosphorylierung und Adenylierung von 1-*epi*-Valienol neben den oben genannten Gründen (Cosubstrat, Reaktionsbedingungen etc.) auch darauf beruhen, dass das wahrscheinlich gebildete 1-*epi*-Valienol-1-phosphat kein Substrat für AcbR darstellte. 3. Außerdem könnten mit dieser Hypothese die negativ verlaufenen Einbauversuche von 1-*epi*-Valienol in die Acarbose durch *Actinoplanes* sp. erklärt werden. Allerdings ist der Nachweis von 1-*epi*-Valienol in zellfreien Extrakten von *Actinoplanes* sp. schon zu Beginn der Acarbose-Biosynthese mit diesem Modell nicht zu erklären. Es muss postuliert werden, dass es sich dabei um ein Abbauprodukt des 1-*epi*-Valienol-7-phosphats oder der Acarbose gehandelt hat.

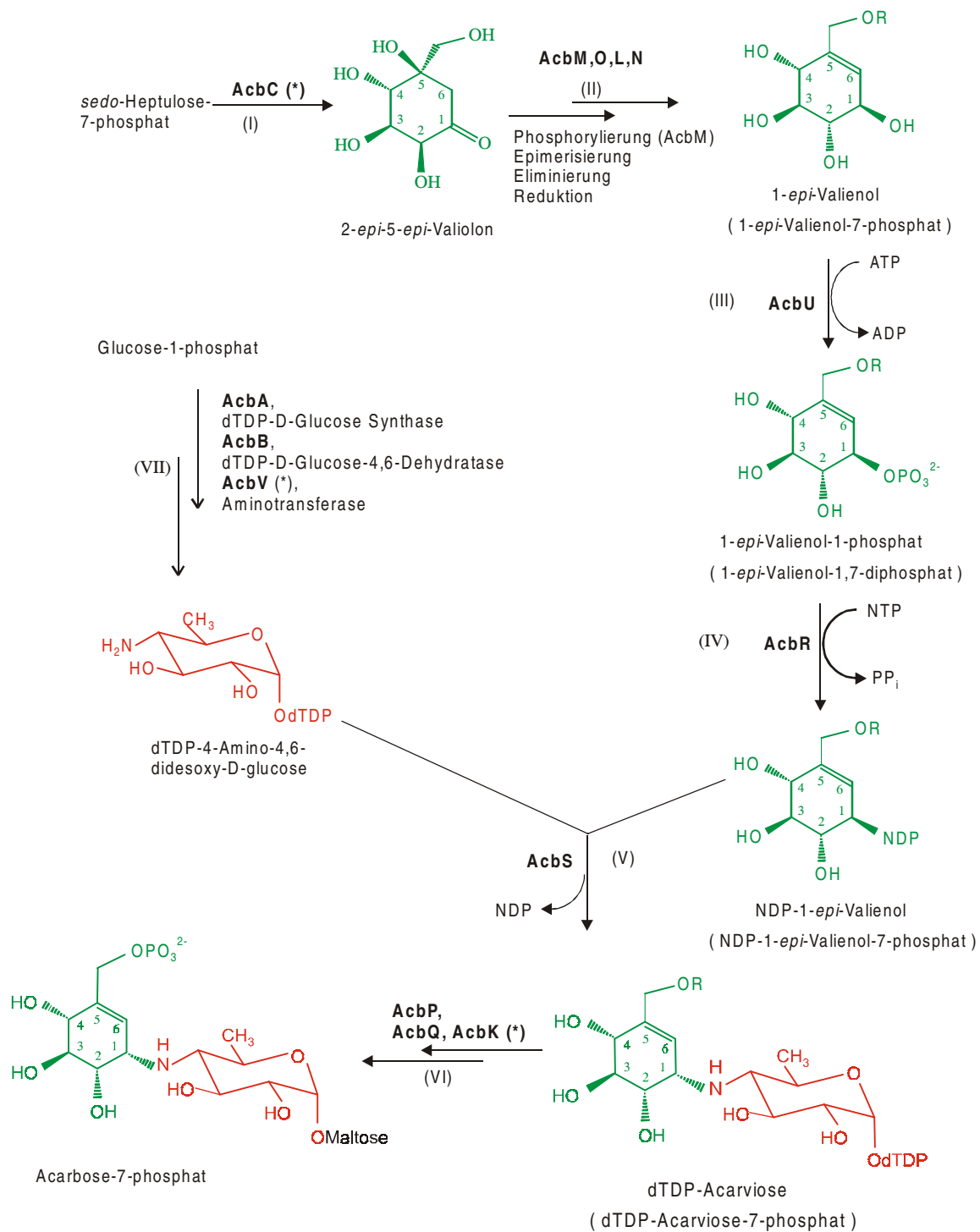
## 4.6 Modell des Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp. SE50/110

### 4.6.1 *De novo* Biosynthese von Acarbose

Die Erkenntnisse über die *de novo* Biosynthese von Acarbose in *Actinoplanes* sp. sind bisher vergleichsweise gering. Basierend auf den vorherigen und den in dieser Arbeit gewonnenen Informationen wurde ein erweitertes Modell der Acarbose-Biosynthese erstellt (**Abb.** 4.6.1). Von besonderem Interesse war dabei die Biosynthese der für die inhibitorische Wirkung auf  $\alpha$ -Glucosidasen verantwortlichen Acarviosyl-Untereinheit der Acarbose (DAVIES et al., 1997).

Die Biosynthese von dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose entspricht dem für 6-Desoxyhexosen typischen Weg (**Abb.** 4.6.1 VII; STRATMANN, 1997; LIU AND THORSON, 1994; KIRSCHNING et al., 1997; PIEPERSBERG AND DISTLER, 1997). Der Einbau des, für die N-glycosidische Bindung der Acarviose benötigten, Stickstoffs erfolgt durch die AcbV-katalysierte Transaminierung von dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose zu dTDP-4-Amino-4,6-didesoxy-D-glucose mit L-Glutamat als Aminodonor (DIAZ-GUARDAMINO, 2000).

Eine Schlüsselreaktion in der Synthese der Valienamin-Untereinheit der Acarviose ist die AcbC-katalysierte Zyklisierung von *sedo*-Heptulose-7-phosphat zu *2-epi-5-epi*-Valiolon, einer Vorstufe der Valienamin-Untereinheit der Acarviose (**Abb.** 4.6.1 I; STRATMANN et al., 1999; MAHMUD et al., 1999). Als Kondensationsmechanismus wurde die direkte Verknüpfung der Aminogruppe der dTDP-4-Amino-4,6-didesoxy-D-glucose mit der Carbonyl-Funktion des *2-epi-5-epi*-Valiolons in Form einer reduktiven Transaminierung diskutiert (MAHMUD et al., 1999). Alle weiteren Schritte bis zur vollständigen Acarbose sollten dann gebunden an einem unbekanntem Enzymkomplex erfolgen (MAHMUD et al., 1999). Gegen diese Vermutung sprachen jedoch die nachgewiesenen Phosphorylierungen von *1-epi*-Valienol sowie von *2-epi-5-epi*-Valiolon (s. u., C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung). Auch konnten bisher keine genetischen Hinweise auf einen derartigen Enzymkomplex in dem *acb*-Gencluster gefunden werden.



**Abb. 4.6.1:** Modell der *de novo* Biosynthese von Acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Erklärung siehe Text. In Klammern sind die postulierten Biosyntheseintermediate angegeben, die entstehen, wenn nicht 1-*epi*-Valienol, sondern 1-*epi*-Valienol-7-phosphat das Substrat für AcbU darstellt und die Phosphatgruppe bis zur Acarbose erhalten bleibt. R: H oder  $\text{PO}_3^{2-}$ ; (\*): Gibt Enzyme an, die bereits *in vitro* charakterisiert wurden.

Basierend auf der Identifizierung der Gene für die Kinase AcbU, die NDP-Cyclitol-Synthase AcbR, die NDP-Cyclitol-Transferase AcbS und die Aminotransferase AcbV ist eher eine Aktivierung von 1-*epi*-Valienol bzw. seines Phosphates 1-*epi*-Valienol-7-phosphat (siehe unten; vgl. **Kap.** 4.5) und nachfolgende Kondensation mit der dTDP-4-Amino-4,6-didesoxy-D-glucose analog des für die Aktivierung und den Transfer von Monosacchariden beschriebenen Mechanismus zu vermuten. (**Abb.** 4.6.1 III, IV, V; PIEPERSBERG AND DISTLER, 1997). Da bisher nur experimentelle Daten zur Phosphorylierung des 1-*epi*-Valienols vorliegen sind die folgenden, postulierten Biosyntheseintermediate basierend auf dem 1-*epi*-Valienol angegeben. Um zu verdeutlichen, dass möglicherweise sein Phosphat 1-*epi*-Valienol-7-phosphat das eigentliche Biosyntheseintermediat darstellt, sind in Klammern zusätzlich die Verbindungen ausgehend von dem 1-*epi*-Valienol-7-phosphat angegeben. Die Aktivierung von 1-*epi*-Valienol (bzw. 1-*epi*-Valienol-7-phosphat) würde dabei durch die AcbU-katalysierte Phosphorylierung des Cyclitols an Position C-1 (**Abb.** 4.6.1 III) und anschließende AcbR-katalysierte Nukleotidylierung (**Abb.** 4.6.1 IV) erfolgen.

Die Kondensation von dTDP-4-Amino-4,6-didesoxy-D-glucose mit NDP-1-*epi*-Valienol (bzw. NDP-1-*epi*-Valienol-7-phosphat) zu dTDP-Acarviose (bzw. dTDP-Acarviose-7-phosphat) würde dann durch die NDP-Cyclitol-Transferase AcbS unter Abspaltung des Nukleosiddiphosphates katalysiert (**Abb.** 4.6.1 V). Wahrscheinlich erfolgt die Inversion der Konfiguration an Position C-1 des Cyclitols während dieses Transfers, da eine Inversion bei der AcbU-katalysierten Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol (bzw. 1-*epi*-Valienol-7-phosphat) thermodynamisch ungünstig ist. Während der Nukleotidaktivierung sollte, analog zu den bisher beschriebenen NDP-Pyrophosphorylasen, die Konfiguration an Position C-1 des Cyclitols unverändert erhalten bleiben (BARTON et al., 2001). Der Transfer Nukleotid-aktivierter Kohlenhydrate unter Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum wurde dagegen für die Gruppe der Glycosyltransferasen bereits beschrieben, wodurch diese Überlegungen gestützt werden (PALCIC, 1999).

Anschließend könnte Maltose bzw. Maltotriose, die primären Quellen der Maltosyluntereinheit, katalysiert durch AcbQ auf dTDP-Acarviose (bzw. dTDP-Acarviose-7-phosphat) oder freie Acarviose (bzw. Acarviose-7-phosphat) übertragen werden (**Abb.** 4.6.1 VI; DEGEWERT et al., 1987; LEE et al., 1997). Um die Kondensationsreaktion zu ermöglichen, könnte dTDP-Acarviose (bzw. dTDP-Acarviose-7-phosphat) vor der Kondensation AcbP-katalysiert zu Acarviose (bzw. Acarviose-7-phosphat) und dTDP hydrolysiert werden. Ein Hinweis auf einen derartigen Mechanismus könnten die Übereinstimmungen von AcbP mit Proteinen der Nudix-Hydrolase Familie sein. Mitglieder dieser Enzymfamilie hydrolysieren unter anderem Nukleotid-aktivierte Monosaccharide (BESSMANN et al., 1996; DUNN et al., 1999). Denkbar wäre aber auch, dass die Kondensationsreaktion durch eine parallel ablaufende Abspaltung des dTDP thermodynamisch begünstigt würde.

Abschließend könnte Acarbose, katalysiert durch die Acarbose-7-Kinase AcbK, zu Acarbose-7-phosphat phosphoryliert werden, falls diese Phosphat-Gruppe nicht bereits in einer Vorstufe der Valienamin-Untereinheit vorhanden war. Somit würde Acarbose-7-phosphat für den Export durch den postulierten ABC-Exporter AcbWXY zur Verfügung stehen.

Bisher stehen jedoch nur wenig Informationen über die bei der Konversion von 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon zu 1-*epi*-Valienol (bzw. 1-*epi*-Valienol-7-phosphat) notwendige Epimerisierung an Position C-2, Reduktion an C-1 und Dehydratisierung zur Einführung der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 des Cyclitols zur Verfügung (**Abb.** 4.6.1 II). Der erste Schritt ist eine AcbM-katalysierte Phosphorylierung von 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon, möglicherweise an Position C-7 (**Abb.** 4.6.1. I; C. S. ZHANG, persönliche Mitteilung). Die Phosphatgruppe könnte analog zu Acarbose-7-phosphat eine Art Resistenz vermitteln und bis zum Acarbose-7-phosphat erhalten bleiben (vgl. **Kap.** 4.5). Denkbar wäre auch eine spätere Dephosphorylierung, um die parallel ablaufende Dehydratisierung zur Einführung der Doppelbindung thermodynamisch zu begünstigen. Für einen solchen Mechanismus spricht, dass eine gekoppelte Dephosphorylierung und Eliminierungsreaktion im Cyclitol auch während der Chorismatbiosynthese auftritt (Chorismatsynthase-Reaktion, E.C. 4.6.1.4). Ein Verbleib der Phosphorylgruppe im Molekül würde allerdings die negativen Resultate der Fütterungsversuche mit den verschiedenen Vorstufen des Valienamins, insbesondere des 1-*epi*-Valienols, erklären. (vgl. **Kap.** 4.5; MAHMUD et al., 1999).

Da kein mit bekannten Epimerasen verwandtes Acb-Protein gefunden wurde, könnte die Reduktion (C-1) und Epimerisierung (C-2) auch in einem Schritt, vergleichbar mit der Fucosesynthase-Reaktion in *E. coli*, erfolgen (ALBERMANN et al., 2000).

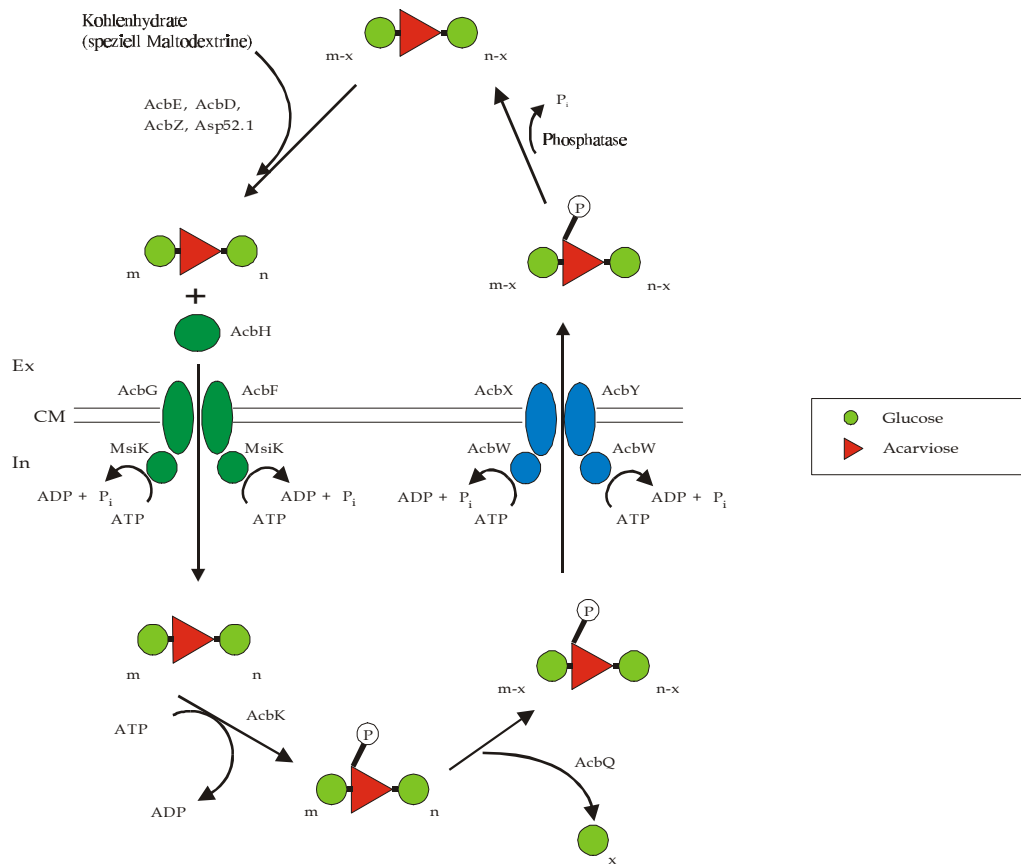
#### 4.6.2 Physiologische Funktion von Acarbose und Acarbose-Homologen

Aufgrund der komplexen Biosynthese und der Beteiligung von intra- sowie extrazellulären Enzymen am Acarbose-Metabolismus, kann eine Beteiligung von Acarbose an der Metabolisierung komplexer exogener Kohlenhydrate in dem natürlichen Habitat von *Actinoplanes* sp. angenommen werden (**Abb.** 4.6.2; STRATMANN, 1997; HEMKER et al., 2001; DIAZ-GUARDAMINO, 2000). In diesem Modell erfolgt der Abbau verschiedener Kohlenhydrate durch die im oder benachbart zum *acb*-Gencluster codierten Glucanasen (**Abb.** 4.6.2; AcbE, AcbZ, Asp52.1,) und dem folgenden AcbD-katalysierten Transfer der Acarviosyl-Untereinheit auf das nicht-reduzierende Ende der Hydrolyseprodukte (HEMKER et al., 2001). Die in Kulturüberständen von *Actinoplanes* sp. bei Anzucht auf verschiedenen C-Quellen nachweisbaren Variationen im Homologengemisch der Acarbose können in diesem Modell durch die unterschiedlichen Hydrolyseprodukte verschiedener Glucane erklärt werden (**Abb.** 4.6.2 m und n; SCHMIDT et al., 1977; FROMMER et al., 1979; HEMKER et al., 2001). Eine für dieses Zusammenspiel zu fordernde Resistenz der  $\alpha$ -Glucosidasen gegen Acarbose konnte bereits für die  $\alpha$ -Amylase AcbE gezeigt werden und ist aufgrund der hohen Identität der Aminosäuresequenz für AcbZ ebenfalls zu vermuten (STRATMANN, 1997). Gestützt wird diese Hypothese auch durch das breite Akzeptorspektrum der Acarviosyltransferase AcbD (HEMKER et al., 2001).

Nach Aufnahme der so mit zusätzlichen Glucoseresten „beladenen“ Acarbose durch den Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporter AcbFGH könnte die Abspaltung und Metabolisierung der Glycosylgruppen analog dem Maltose/Maltodextrin-Verwertungssystem von *E. coli* erfolgen (**Abb. 4.6.2**; BOOS AND SHUMAN, 1998). Ein für diesen Mechanismus notwendiges MalQ-homologes Enzym ist auch im *acb*-Gencluster vorhanden (AcbQ; STRATMANN, 1997; M. JARLING, persönliche Mitteilung).

Die Inhibierung intrazellulärer  $\alpha$ -Glucosidasen von *Actinoplanes* sp. wird wahrscheinlich durch die AcbK-katalysierte Phosphorylierung von Acarbose verhindert. Eine zwar Acarbose sensitive, aber Acarbose-7-phosphat insensitive, intrazelluläre Maltase wurde bereits in *Actinoplanes* sp. nachgewiesen (DREPPER AND PAPE, 1996; GOEKE et al., 1996; ZHANG, persönliche Mitteilungen). Bisher ist allerdings noch nicht bekannt, ob eine AcbK-katalysierte Phosphorylierung auch bei den höheren Homologen der Acarbose stattfindet. Nach erfolgtem Export durch den postulierten ABC-Exporter AcbWXY (diese Arbeit) und abschließender Dephosphorylierung von Acarbose-7-phosphat stünde Acarbose wieder als Substrat für extrazelluläre Transglycosylierungsreaktionen zur Verfügung (**Abb. 4.6.2**). Ein analoger Resistenzmechanismus und die Aktivierung des Antibiotikums durch eine extrazelluläre Phosphatase wurde auch für die Streptomycinbiosynthese beschrieben (WALKER, 1975; MANSOURI AND PIEPERSBERG, 1991; PIEPERSBERG AND DISTLER, 1997). Die für diesen Schritt zu postulierende extrazelluläre Phosphatase konnte in *Actinoplanes* sp. bisher jedoch nicht identifiziert werden. Weitere Erkenntnisse könnte die Strukturaufklärung der in Kulturüberständen von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 nachweisbaren Verbindung liefern (vgl. **Kap. 4.2**).

Für *Actinoplanes* sp. SE50/110 würde die Kombination des Abbaus exogener Kohlenhydrate mit dem Import und anschließendem Recycling des Kohlenhydrat-Shuttles (möglicherweise Acarbose) aus dem Acarviose-haltigem Metabolitengemisch mehrere Vorteile bieten: 1. Verschiedene primäre Hydrolyseprodukte könnten durch ein Importsystem in die Zelle aufgenommen werden, da der ABC-Importer wahrscheinlich spezifisch für die Acarviosyl-Untereinheit und nicht für die Glucosylseitenketten der Acarbose-Homologen (Amylostatine) ist. 2. Die Amylostatine können aufgrund ihrer inhibitorischen Wirkung durch die  $\alpha$ -Glucosidasen von konkurrierenden Mikroorganismen nicht metabolisiert werden. Auch treten keine freien primären Hydrolyseprodukte des Glucanabbaus auf, die von Nahrungskonkurrenten aufgenommen werden könnten. 3. Eine Aufnahme von Amylostatinen setzt wahrscheinlich spezifische Transportsysteme voraus, über die konkurrierende Bakterien nicht verfügen sollten. Zwar konnte Acarbose durch den Maltosetransporter von *E. coli* in die Zelle aufgenommen, aber nicht metabolisiert werden (BRUNKHORST et al., 1999). Somit ist *Actinoplanes* sp. SE50/110 in der Lage Kohlenhydrate zu metabolisieren und gleichzeitig die parallele Verwertung durch Nahrungskonkurrenten zu verhindern. Ob der hier postulierte Im- und Export von Acarbose bzw. Amylostatinen durch die genannten ABC-Transporter möglich ist, muss jedoch noch experimentell überprüft werden.



**Abb. 4.6.2:** Hypothese zur physiologischen Funktion der Acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110.

Erläuterung siehe Text. In : Intrazellulär; Ex: Extrazellulär; CM: Cytoplasmamembran; m, n und x: Anzahl der Glucosereste.



## 4.7 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse geben einen Überblick über den wahrscheinlich vollständigen Genbestand des *acb*-Genclusters, der zur Biosynthese der Acarbose (Amylostatine) notwendig ist. Basierend auf den Übereinstimmungen der Genprodukte AcbU (Kinase), AcbR (NDP-Transferase) und AcbS (NDP-Cyclitol-Transferase) mit Enzymen die an der Aktivierung und dem Transfer NDP-aktivierter Monosaccharide beteiligt sind, wurde ein neues Biosynthese-Modell der charakteristischen Acarviosyl-Untereinheit der Acarbose entwickelt. Die nachgewiesene Phosphorylierung von 1-*epi*-Valienol stützte dieses Modell und bietet direkte Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Dabei sollte vorrangig die postulierte Nukleotidylierung des phosphorylierten 1-*epi*-Valienols bzw. seines hypothetischen Phosphats, katalysiert durch AcbR, untersucht werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, ob tatsächlich ATP als Nukleotid-Cosubstrat verwendet wird. Die enzymatische Darstellung des NDP-Valienols bzw. NDP-Valienol-7-phosphats und damit einhergehend die Strukturaufklärung würde Hinweise darauf liefern, ob die postulierte Transferase-Reaktion (AcbS-katalysiert) unter Inversion oder Retention der Konfiguration am C-1 des Cyclitols erfolgen muss. Neben der Verwendung des NDP-Valienols bzw. NDP-Valienol-7-phosphats als Substrat für die Analyse der enzymatischen Funktion von AcbS, ist auch eine Verwendung in der Biokombinatorik denkbar. Möglicherweise sind AcbS und/oder bereits bekannte Glycosyltransferasen in der Lage NDP-Valienol und/oder sein Phosphat auf artifizielle Substrate (z.B. Aglyca von Macrolidantibiotika) zu übertragen und können zur Produktion biologisch wirksamer Substanzen verwendet werden.

Einen zweiten Anknüpfungspunkt für zukünftige Analysen stellt das Cosmid pHTWCos6 und der rekombinante Stamm *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 dar. Da die Konstruktion von Gen-Deletionsmutanten in *Actinoplanes* sp. SE50/110 bisher nicht möglich war, könnten einzelne Gene des *acb*-Genclusters gezielt in *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 deletiert und/oder mutagenisiert werden. Die Analyse des Produktspektrums der verschiedenen Mutanten im Vergleich zu *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 könnte zur Identifizierung bisher unbekannter Intermediate der Acarbose-Biosynthese verwendet werden. In diesem Zusammenhang muss auch noch überprüft werden, ob es sich bei der in den Kulturüberständen von *S. lividans* 66 TK23 pHTWCos6 nachgewiesenen Substanz tatsächlich um Acarbose-7-phosphat handelte. Dieses Vorgehen böte erstmalig die Möglichkeit, eine Funktionsanalyse der Genprodukte durchzuführen, für die basierend auf Datenbank-Recherchen bisher keine Funktionsvorhersage möglich war.

Weiterhin sollte die Funktion der beiden ABC-Transporter innerhalb des Acarbose-Metabolismus experimentell überprüft werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die hypothetischen ABC-Transporter der AcbWXY-Unterfamilie hinsichtlich ihres Substratspektrums und Transportmechanismus unterscheiden.

## 5. Literatur

**Albermann, C.** (2001). Neue Verfahren zur *in vitro*- und *in vivo*-Synthese Nukleotid-aktivierter Hexosen und fucosylierter Oligosaccharide mit bakteriellen Enzymen. Dissertation, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal

**Albermann, C., Distler, J. and Piepersberg, W.** (2000). Preparative synthesis of GDP- $\beta$ -L-fucose by recombinant enzymes from enterobacterial sources. *Glycobiology* **10**:875-881

**Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb, Miller, and David J. Lipman** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402

**Babcock M. J., Kendrick K. E.** (1988). Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* **170**:2802-2808

**Baecker P.A., Furlong C.E., Preiss J.** (1983). Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of *Escherichia coli* ADP-glucose synthetase as deduced from the nucleotide sequence of the *glg C* gene. *J. Biol. Chem.* **258**:5084-5088

**Barton, W. A., Biggins, J. B., Lesniak, J., Jeffrey, P. D., Jiang, J., Rajashankar, K. R., Thorson, J. S., Nikolov, D. B.** (2001). Structure, Mechanism and Active-Site Engineering of a Nucleotidyltransferase: The First Step in the Glycorandomization of Natural Product-Based Metabolites. *Nature Struct. Biol.* **8**:545-551

**Bate, N., Butler, A. R., Gandecha, A. R. and Cundliffe, E.** (1999). Multiple regulatory genes in the tylosin biosynthetic cluster of *Streptomyces fradiae*. *Chem. Biol.* **6**:617-624

**Bateman, A, Birney, E., Durbin, R., Eddy, S.R., Howe, K.L. and Sonnhammer, E.L.L.** (2000). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **28**:263-266

**Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Howe, K. L. and Sonnhammer, E. L. L.** (2000). The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Res.* **28**:263-266

**Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B. and Schaller, H.** (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* **19**:327-336

**Bessman, M. J., Frick, D. N., and O'Handley, S. F.** (1996). The MutT Proteins or „Nudix“ Hydrolases, a Family of Versatile, Widely Distributed, „Housecleaning“ Enzymes. *J. Biol. Chem.* **271**:25059-25062

**Bibb M.J and Cohen, S. N.** (1982). Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **187**:265-77

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

**Biermann, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Rao, R. N., 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. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523

**Bischoff, H., Ahr, H. J., Schmidt, D. Stoltefuß, J.** (1994). Acarbose, ein neues Wirkprinzip in der Diabetestherapie. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **11**:1119-1128.

**Bland, C. E. and Couch, J. N.** (1981). The family Actinoplanaceae. In: Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balous, A. and Schleges, H. G. (Eds.). *The procaryotes*. Vol II, Springer Verlag, New York. pp. 2004-2010

**Bliss, J. M. and Silver, R. P.** (1997). Evidence that KpsT, the ATP-binding component of an ATP-binding cassette transporter, is exposed to the periplasm and associates with polymer during translocation of polysialic acid capsule of *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol.* **179**:1400-1403

**Block, O.** (2000). Darstellung von Verbindungen vom Manumycin-Typ sowie von Zuckeranaloga aus unverzweigtem und verzweigtem *p*-Benzochinon. Dissertation, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal

**Bonfield, J.K., Smith, K.F. and Staden, R.** (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* **24**:4992-4999

**Boos, W. and Shuman, H.** (1998). Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism, and Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**:204-229

**Bormann, C., Möhrle, V., and Bruntner, C.** (1996). Cloning and Heterologous Expression of the Entire Set of Structural Genes for Nikkomycin Synthesis from *Streptomyces tendae* Tü901 in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **178**:1216-1218

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

**Brunkorst, C., Andersen, C., and Schneider, E.** (1999). Acarbose, a pseudooligosaccharide is transported but not metabolized by the maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:2612-2619

**Bruton, C.J., Plaskitt, K.A. and Chater, K.F.** (1995). Tissue-specific glycogen branching isoenzymes in a multicellular prokaryote, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **18**:89-99

**Brzozowski, A. M. and Davies, G. J.** (1997). Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0-Å resolution. *Biochemistry* **36**:10837-10845

**Buche, A., Mendez, C. and Salas, J. A.** (1997). Interaction between ATP, oleandomycin and the OleB ATP-binding cassette transporter of *Streptomyces antibioticus* involved in oleandomycin secretion. *Biochem. J.* **321**:139-144

**Caspary, W. F. und Graf, S.** (1979). Inhibition of human intestinal  $\alpha$ -glucosidase hydrolases by a new complex oligosaccharide. *Res. Exp. Med.* **175**:1-6

**Chater, K. F., Hopwood, D. A., Kieser, T. und Thompson, C. J.** (1982). Gene cloning in *Streptomyces*. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* **96**:69-95

**Chu, M., Trumees, I., Mierzwa, R., Terracciano, J., Patel, M., Loebenberg, D., Kaminski, J. J., Das, P., Puar, M. S.** (1997). Sch 54445: a new polycyclic xanthone with highly potent antifungal activity produced by *Actinoplanes* sp. *J. Nat. Prod.* **60**:525-528

**Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia, F., Badcock K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, S., Osborne J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, S., Squares, S., Squires, R., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G.** (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537-544

**Cook S. J. , McCormick F.** (1993). Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**:1069-1072

- Danot, O. and Raibaud, O.** (1994). Multiple protein-DNA and protein-protein interactions are involved in transcriptional activation by MalT. *Mol. Microbiol.* **14**:335-346
- Dauter, Z., Dauter, M., Brzozwski, A. M., Christensen, S., Borchert, T. V., Beier, L., Wilson, K. S., and Davies, G. J.** (1999). X-ray Structure of Novamyl, the Five-Domain „Maltogenic“  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus stearothermophilus*: Maltose and Acarbose Complexes at 1.7 Å Resolution. *Biochemistry* **38**:8385-8392
- Davie, G., Sinnott, M. L., and Withers, S. G.** (1997). In: Comprehensive Biological Catalysis (Sinnott, M. L., Ed.). *Academia Press*, London. pp110-209
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. and Kim, S.H.** (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**:595-602
- Debarbouille, M., Cossart, P., Raibaud, O.** (1982). A DNA-sequence containing the control sites for gene *malT* and for the *malPQ* operon. *Mol. Gen. Genet.* **185**:88-92
- Decker, H., Hoechst AG** (1997). Isolierung der Biosynthesegene für Pseudo-Oligosaccharide aus *Streptomyces glaucescens* GLA.O und ihre Verwendung. Patent DE19622783, Deutsches Patentamt
- Degwert, U., Hülst, R., Pape, H., Herold, R. E., Beale, J. M., Keller, P. J., Lee, J. P., Floss, H. G.** (1987). Studies on the biosynthesis of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose: Valienamine, a *m*-C<sub>7</sub>N unit not derived from the shikimate pathway. *J. Antibiot.* **40**:855-861
- Diaz-Guardamino, Uribe P. M.** (1997). Untersuchungen zum Einbau des Stickstoffs in die Acarviose-Einheit der Acarbose bei *Actinoplanes* sp. 50/110: die Aminotransferase AcbV. Dissertation, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal
- Distler J., Klier K., Piendl W., Werbitzki O., Böck A., Kresze G., Piepersberg W.** (1985). Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* I: Charakterization of streptomycin-idiotropic mutants. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**:145-150
- Distler, J., Braun, C., Ebert, A. and Piepersberg, W.** (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: analysis of a central region including the major resistance gene. *Mol. Gen. Genet.* **208**:204-210
- Dong, H. Mahmud, T., Tornus, I., Lee, S., and Floss, H. G.** (2001). Biosynthesis of the Validamycins: Identification of the Intermediates in the Biosynthesis of Validamycin A by *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*. *J. Am. Chem. Soc.* **28**:2733-2742
- Drepper, A. and Pape, H.** (1996). Acarbose 7-Phosphotransferase from *Actinoplanes* sp.: Purification, Properties, and Possible Physiological Function. *J. Antibiotics* **49**:664-668
- Dunn, C. A., O'Handley, S. F., Frick, D. N. and Bessman, M. J.** (1999). Studies on the ADP-ribose Pyrophosphatase Subfamily of the Nudix Hydrolases and Tentative Identification of *trgB*, a Gene Associated with Tellurite Resistance. *J. Biol. Chem.* **274**:32318-32324
- Eunjoon, K., Hongik, K., Seung-Pyo, H., Kook, H.K., Yung, H. K., Yong-Ha, P.** (1993). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA gene cluster from *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*. *Gene* **132**: 21-31.
- Farina, G. and Bradley, S. G.** (1970). Reassociation of deoxyribonucleic acids from *Actinoplanes* and other actinomycetes. *J. Bacteriol.* **102**:30-35
- Fernandez, E., Lombo, F., Mendez, C., Salas, J. A.** (1996). An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer *Streptomyces argillaceus*. *Mol. Gen. Genet.* **251**:692-698
- Fernandez-Moreno, M. A., Carbo, L., Cuesta T., Vallin, C. and Malpartida, F.** (1998). A Silent ABC Transporter Isolated from *Streptomyces rochei* F20 Induces Multidrug Resistance. *J. Bacteriol.* **180**:4017-4023

- Ferreti, J. J. et al.** (2001). Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:4658-4663
- Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D. und Truscheit** (1979). Neue Enzyminhibitoren aus Mikroorganismen. *Planta Medica, Journal of Medicinal Plant Research* **35**:195-217
- Genes M.J., Dove M.J., Seligy V.L.** (1989). *Aspergillus oryzae* has two nearly identical Taka-amylase genes, each containing eight introns. *Gene* **79**:107-117
- Geremia, R. A., Petroni, E. A., Ielpi, L and Henrissat, B.** (1996). Towards a classification of glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities: prokaryotic  $\alpha$ -mannosyltransferases. *Biochem. J.* **318**:133-138
- Goeke, K** (1986). Enzymatische Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel und zur Biosynthese des  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Acarbose bei *Actinoplanes* spec. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Goeke, K., Drepper, A. and Pape, H.** (1996). Formation of Acarbose Phosphate by a Cell-free Extract from the Acarbose Producer *Actinoplanes* sp. *J. Antibiotics* **49**:661-663
- Guilfoile, P. G. and Hutchinson, R.** (1991). A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peuceetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8553-8557
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hanks S.K. , Quinn A.M. , Hunter T.** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**:42-52
- Hanzoet, G. Pircher, H.-P. Vanni, p. Oesch, B., Semenza, G.** (1981). An example of enzyme hysteresis: the slow and tight interaction of some full competitive inhibitors with small intestinal sucrose. *J. Biol. Chem.* **256**:3703-3711.
- Heiker, F. R., Böshagen, H., Junge, B., Müller, L., Stoltefuß, J.** (1981). Studies designed to localize the essential structural unit of glycoside-hydrolase inhibitors of the acarbose type. In: Creutzfeld E. (Ed.). First international symposium on acarbose. Amsterdam. *Excerpta Medica* pp. 137-141
- Heinrichs, D. E., Monteiro, M. A., Perry, M. B., and Whitfield, C.** (1998). The Assembly System for the Lipopolysaccharide R2 Core-type of *Escherichia coli* Is a Hybrid of Those Found in *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella enterica*. *J. Biol. Chem.* **273**:8849-8859
- Heinzel, P., Werbitzky, O., Distler, J., Piepersberg, D.** (1988). A second streptomycin resistance gene from *Streptomyces griseus* codes for streptomycin-3''-phosphotransferase. Relationship between antibiotic and protein kinases. *Arch. Microbiol.* **150**:184-192
- Hemker, H., Stratmann, A., Goeke, K., Schröder, W., Lenz, J., Piepersberg, W., Pape, H.** (2001). Identification, Cloning, Expression, and Characterization of the Extracellular Acarbose-Modifying Glycosyltransferase, AcbD, from *Actinoplanes* sp. Strain SE50. *J. Bacteriol.* **183**:4484-4492
- Hemker, M.** (1997). Pseudooligosaccharide und Stärkestoffwechsel bei *Actinoplanes* sp.. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Henrissat, B. and Davies, G. J.** (2000) Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implication for Genomics. *Plant Physiology* **124**:1515-1519
- Hill, J. M., Jenkins, G. N., Rush, C. P., Turner, N. J., Willetts, A. J., Buss, A. D., Dawson, M. J. , and Rudd, B. A. M.** (1995). Revised Pathway for the Biosynthesis of Aristeromycin and Neplanocin A from D-Glucose in *Streptomyces citricolor*. *J. Am. Chem. Soc.* **117**:5391-5392

- Hill, M. A., Kaufmann, K., Otero, J., Preiss, J. (1991). Biosynthesis of bacterial glycogen. Mutagenesis of a catalytic site residue of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**:12455-12460
- Hofman, K., Bucher, P., Falquet, L. and Bairoch, A. (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**:215-219
- Hofmann, K. and Stoffel, W. (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**:166 pp.
- Höltje, J. V. and Schwarz, U. (1985). Biosynthesis and growth of the murein sacculus. In: Nanninga, N. (Ed.). *Molecular cytology of Escherichia coli*. Academic Press, London, pp. 77-119.
- Hon, W. C., McKay, G. A., Thompson, P. R., Sweet, R. M., Yang, D. S., Wright, G. D., and Berghuis, A. M. (1997). Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. *Cell* **89**:887-895
- Hong, S.-T., Carney, J. R., and Gould, S. J. (1997). Cloning and Heterologous Expression of the Entire Gene Clusters for PD 116740 from *Streptomyces* Strain WP 4669 and Tetrangulol and Tetrangomycin from *Streptomyces rimosus* NRRL 3016. *J. Bacteriol.* **179**:470-476
- Hoshiko, S. Nojiri, C., Matsunaga, K., Katsumata, K., Satoh, E. and Nagaoka, K. (1988). Nucleotide sequence of the ribostamycin phosphotransferase gene and of its control region in *Streptomyces ribosidificus*. *Gene* **68**:285-296
- Ikeno, S., Yamane, Y., Ohishi, Y., Kinoshita, N., Hamada, M., Tsuchiya, K.S., Hori, M. (2000). ABC transporter genes, *kasKLM*, responsible for self-resistance of a kasugamycin producer strain. *J. Antibiot.* **53**:373-384
- Ishikawa, J. and Hotta, K. (1999). FramePlot: a new implementation of the Frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**:251-253.
- Janecek, S. (1997).  $\alpha$ -Amylase Familie: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **67**:67-97
- Jensen, P. R., Dwight, R., Fenical, W. (1991). Distribution of Actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. and Environ. Microbiol.* **57**:1102-1108
- Jespersen, H. M., Macgregor, E.A. B., Sierks, M. R. and Svensson, B. (1991). Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.* **280**:51-55
- Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Henrissat, B., Sierks, M. R. and Svensson, B. (1993). Starch and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural feature of the catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J. Protein Chem.* **12**:791-805.
- Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., RA Otuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Nakamura, Y., Robb, T.F., Horikoshi K., Masuchi, Y., Shizuya, H., Kikuchi, H. (1998). Complete Sequence and Gene Organization of the Genome of a Hyper-thermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3". *DNA Res.* **5**:55-76
- Kiel, J. A. K. W., Boels, J. M., Beldman, G., Venema, G. (1994). Glycogen in *Bacillus subtilis*: molecular characterization of an operon encoding enzymes involved in glycogen biosynthesis and degradation. *Mol. Microbiol.* **11**:203-218
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics* (ISBN 0-7084-0623-8). Norwich: The John Innes Foundation.

- Kim, T-J. K., Park, C-S., Cho, H-Y., Cha, S-S., Kim, J-S., Lee, S-B., Moon, T-W., Kim, J-W., Oh, B-H., Park, K-H.** (2000). Role of the Glutamate 332 Residue in the Transglycosylation Activity of *Thermus* Maltogenic Amylase. *Biochemistry* **39**:6773-6780
- Kirillov, S., Vitali, L. A., Goldstein, B. P., Monti, F., Semenov, Y., Makhno, V., Ripa, S., Pon, C. L., Gualerzi, C. O.** (1997). Purpuromycin: an antibiotic inhibiting tRNA aminoacylation. *RNA* **3**:905-915
- Kirschning, A., Bechthold, A. F., Rohr, J.** (1997). Chemical and Biochemical Aspects of Deoxysugars and Deoxysugar Oligosaccharides. In: Rohr, J. (Ed.) Bioorganic Chemistry - Deoxysugars, Polyketides and Related Classes: Synthesis, Biosynthesis, Enzymes. *Top. Curr. Chem.* **188**:1-84
- Knighton D.R. , Zheng J. , Ten Eyck L.F. , Xuong N.- H. , Taylor S.S. ,Sowadski J.M.**(1991 b). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclicadenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**:414-420
- Knighton D.R. et al , Sowadski J.M.** (1991 a). Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Science* **253**:407-414
- Kuhnt, M., Bitsch, F., France, J., Hofmann, H., Sanglier, J. J. Traber, R.** (1996). Microbial biotransformation products of cyclosporin A. *J. Antibiot.* **49**:781-787
- Kumar A., Tanaka T., Lee Y.M., Preiss J** (1988). Biosynthesis of bacterial glycogen. Use of site-directed mutagenesis to probe the role of tyrosine 114 in the catalytic mechanism of ADP-glucose synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**:14634-14639
- La Cognata, U., Willmitzer, L., Mueller-Roeber, B.** (1995). Molecular cloning and characterization of novel isoforms of potato ADP-glucose pyrophosphorylase. *Mol. Gen. Genet.* **246**:538-548
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **309**:462-464
- Lechvalier, H. A. and Lechvalier, M. P.** (1970). The Actinomycetales. Veb. G. Fisher, Jena, pp. 393-405
- Lee, S. and Egelkrou, E.** (1998). Biosynthetic studies on the alpha-glucosidase inhibitor acarbose in *Actinoplanes* sp.: glutamate is the primary source of the nitrogen in acarbose. *J. Antibiot.* **51**:225-227
- Lee, S., Sauerbrei, B., Niggemann, J., Egelkrou, E.** (1997). Biosynthetic Studies on the  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Acarbose in *Actinoplanes* sp.: Source of the Maltose Unit. *J. Antibiot.* **50**:954-960
- Lennarz, W. J. and Scher, M. G.** (1972). Metabolism and function of polyisoprenol sugar intermediates in membrane-associated reactions. *Biochim. Biophys. Acta* **265**:417-441.
- Leung, P. S. and Preiss, J.** (1987). Biosynthesis of bacterial glycogen: primary structure of *Salmonella typhimurium* ADP-glucose synthetase as deduced from the nucleotide sequence of the *glgC* gene. *J. Bacteriol.* **169**:4355-4360
- Liedert** (1991). Untersuchungen zur dTDP-4,6-Glucose-Dehydratase von *Actinoplanes* sp.. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Liu, H.-w., Thorson, J. S.** (1994). Pathways and mechanism in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **48**:223-256
- Lukacovich, T., Asztalos Z., Awano, W., Baba, K., Kondo, S., Niwa, S. and Yamamoto, D.** (2001). Dual-Tagging Gene Trap of Novel Genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **157**:727-742
- MacGregor, E. A., Janecek, S., Svensson, B.** (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1546**:1-20

- MacLachlan, P. R., Kadam, S. K. and Sanderson, K. E.** (1991). Cloning, characterization, and DNA sequence of the *rfaLK* region for lipopolysaccharide synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**: 7151-7163
- Mahmud, T., Tornus, I., Egelkrou, E., Wolf, E., Uy, C., Floss, H. G., and Lee, S.** (1999). Biosynthetic Studies on the  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Acarbose in *Actinoplanes* sp.: 2-*epi*-5-*epi*-Valiolone Is the Direct Precursor of the Valienamine Moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **121**:6973-698
- Mansouri, K. und Piepersberg, W.** (1991). Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of five genes, *strFGHIK*, including a phosphatase gene. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 459-469.
- Martin, Cruz M., Schneider, D., Bruton, C. J., Chater, K. F., and Hardisson, C.** (1997). A *glgC* Gene Essential Only for the First of Two Spatially Distinct Phases of Glycogen Synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **179**:7784-7789.
- Matsuo, N., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H. and Kusakabe, I.** (2000). Purification, characterization and gene cloning of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901. *Biochem. J.* **346**:9-15
- Matsuura, Y., Kusunoki, W., Harada, M. and Kakudo, M.** (1984). Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem.* **95**:697-702
- Maul, W., Müller, L., Pfitzner, J., Rauenbusch, E., and Schutt, H.** (1989). Radiosynthesis of [<sup>14</sup>C]-Acarbose. *Arzneim.-Forsch./Drug. Res.* **39**:1251-1253
- Mehling, A., Wehmeier, U. F., Piepersberg, W.** (1995). Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. *Microbiol.* **141**:2139-2147
- Miller J. H.** (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Muaro, S. and Ohyama, K.,** (1975). New amylase inhibitor (S-AI) from *Streptomyces diastaticus* var. *amylostaticus* no. 2476. *Agr. Biol. Chem.* **39**:2271-2273
- Müller, L.** (1989). Chemistry, biochemistry and therapeutic potential of microbial  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. In: Demain, A. L., Somkuti, G. A., Hunter-Creva, J. C., and Rossmore, H. W. (eds.). Novel microbial products for medicine and agriculture. *Elsevier Science Publishers*, Amsterdam, The Netherlands
- Müller, L., Junge, B., Frommer, W., Schmidt, D., Truscheit, E.** (1980). Acarbose (BAYg5421) and homologous  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from actinoplanaceae. In: Brodbeck, U. (Ed.). Enzyme inhibitors. *Verlag Chemie, Weinheim* pp. 109-122
- Nahoum, V., Roux, G., Anton, V., Rouge, P., Puigserver, A., Bischoff, H., Henrissat, B. and Payan, F.** (2000). Crystal structures of human pancreatic  $\alpha$ -amylase in complex with carbohydrate and proteinaceous inhibitors. *Biochem. J.* **346**:201-208
- Namiki, S., Kangouri, K., Nagate, T., Hara, H., Sugita, K., Omura, S.,** (1982a). Studies on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor adiposin. II. Taxonomic studies on the producing microorganism. *J. Antibiot.* **35**:1156-1159
- Namiki, S., Kangouri, K., Nagate, T., Hara, H., Sugita, K., Omura, S.,** (1982b). Studies on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor adiposin. II. isolation and physicochemical properties. *J. Antibiot.* **35**:1234-1236.
- Nielsen, H. and Krogh, A.** (1998). Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6)*, AAAI Press, Menlo Park, California, pp. 122-130
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., Heijjne, G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**:1-6



- Noble, E. M. N., Endicott, J. A.** (1999). Chemical Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases: Insights into Design from X-Ray Crystallographic Studies. *Pharmacol. Ther.* **82**: 269-278
- Notredame, C., Higgins, D. G. and Heringa, J.** (2000). T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment. *J. Mol. Biol.* **302**:205-217
- Olano, C., Rodriguez, A. M., Medez, C. and Salas, J. A.** (1995). A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* **16**:333-343
- Omoto, S., Itoh, J., Ogino, H., Iwamatsu, K.** (1981). Oligostatin, new antibiotics with amylase inhibitory activity. II. Structures of oligostatins C, D and E. *J. Antibiot.* **34**:1429-1433
- Palcic, M. M.** (1999). Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Current Opinion in Biotechnology* **10**:616-624
- Palleroni, N. J.** (1976). Chemotaxis in *Actinoplanes*. *Arch. Microbiol.* **110**:13-18
- Parenti, F. and Coronelli, C.** (1979). Members of the genus *Actinoplanes* and their antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**:389-411
- Pastuszak, I., Drake, R., and Elbein, A. D.** (1996). Kidney N-Acetylgalactosamine (GalNAc)-1-phosphate Kinase, a New Pathway of GalNAc Activation. *J. Biol. Chem* **271**:20776-20782
- Pearson W. R. and Lipman, D. J.** (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-8
- Piepersberg, W. and Distler, J.** (1997). Aminoglycosides and Sugar Components in Other Secondary Metabolites. In: Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P. S., (Eds.). *Biotechnology*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 416 pp.
- Pospiech, A. and Neumann, B.** (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet.* **11**:217-218
- Preiss, J. and Romeo, T.** (1994). Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **47**:299-329
- Puls, W. and Keup, U.** (1973). Influence of an  $\alpha$ -amylase inhibitor (BAYd 7791) on blood glucose, serum insulin and NEFA in starch loading test in rats, dogs and man. *Diabetologica* **9**:97
- Puls, W. and Keup, U.** (1974). Recent Advances in Obesity Research: I *Proceedings of the 1st International Congress on Obesity*, October 8-11, London, Newman Publishing Ltd.
- Puls, W., Keup, U., Krause, H. P., Thomas, G., Holtmeier, F.** (1977). Glucosidase inhibition: a new approach to the treatment of diabetes, obesity and hyperlipoproteinaemia. *Naturwissenschaften* **64**:536-537.
- Quarta, C., Borgi, A., Zerilli, L. F., de Pietro, M. T., Ferrari, P., Trani, A., Lancini G. C.** (1996). Isolation and structure determination of a novel complex of the teicoplanin family. *J. Antibiot.* **49**:644-650.
- Raetz, C. R. H.** (1996). Bacterial Lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In: Neidhardt, F. C. (Ed.). *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington DC pp. 1035-1063
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., Hopwood, D. A.** (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**:77-96
- Reizer, J., Reizer, A. and Saier, M. H. Jr.** (1992). A new sub-family of bacterial ABC-type transport systems catalyzing export of drugs and carbohydrates. *Protein Sci.* **1**:1326-1332

- Retzlaff L., Mayer G., Beyer S., Ahlert J., Verseck S., Distler J., Piepersberg W.** (1993). Streptomycin production in *streptomycetes*: A progress report. In: Baltz, R. H. Hegeman, G. D. und Skatrud, P. L., (Eds.) Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics. *American Society for Microbiology*, Washington DC, pp. 183-194
- Rodriguez, A. M., Olano, C., Vilches, C., Mendez, C. and Salas, J. A.** (1993). *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. *Mol. Microbiol.* **8**:571-582
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., Cunliffe, W. J., Baumberg, S. and Wootton, J. C.** (1990). Inducible resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transporter supergene family. *Mol. Microbiol.* **4**:1207-1214
- Salauze, D. and Davies, J.** (1991). Isolation and characterisation of an aminoglycoside phosphotransferase from neomycin -producing *Micromonospora chalybeata*; comparison with that of *Streptomyces fradiae* and other producers of 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamine antibiotics. *J. Antibiot.* **44**:1432-1443
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York
- Samulitis, B. K., Goda, T., Lee, S. M., Koldovsky, O.** (1987). Inhibitory mechanism of acarbose and 1-deoxynojirmycin derivatives on carbohydrates in rat small intestine. *Drugs Exptl. Clin. Res.* **13**:517-524
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467
- Saraste, M., Sibbald, P. R., Wittinghofer A.** (1990). The P-loop: a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**:430-434
- Schaper, B.** (1991). Biochemische und physiologische Studien zur Biosynthese des  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitors Acarbose. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Westfälische Wilhelms Universität Münster.
- Schlösser, A.** (1999). MsiK-dependent trehalose uptake in *Streptomyces reticuli*. *FEMS Microbiology Letters* **184**:187-192
- Schlösser, A., Jantos, J., Hackmann, K. and Schrempf, H.** (1999). Characterization of the binding protein-dependent cellobiose transport system of *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2636-2643
- Schlösser, A., Kampers, T. and Schremp, H.** (1997). The *Streptomyces* ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport. *J. Bacteriol.* **179**:2092-2095
- Schmidt, D. D., Frommer, W., Junge B., Müller, L. Wingender W. Truscheit, E.** (1981). In: Creutzfeld, W. (Ed.): First international symposium on acarbose. Amsterdam: *Excerpta Medica*, pp. 5-15
- Schmidt, D. D., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Wingender, W., Truscheit, E.** (1977).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors: new complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* **64**:535-536
- Schneider, E. and Hunke, S.** (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transporter systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews* **22**:1-20
- Schneider, T. D. and Stephens, R. M.** (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**:6097-6100
- Schneider, D., Bruton, C.J. and Chater, K.F.** (2000). Duplicated gene clusters suggest an interplay of glycogen and trehalose metabolism during sequential stages of aerial mycelium development in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* **263**: 543-553

- Sigrist, H., Ronner, P., Semenza, G.** (1975). A hydrophobic form of the small intestinal sucrose isomaltase complex. *Biochem. Biophys. Acta* **406**:433-446
- Smith and Waterman** (1981). Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**:195-197
- Smith-White, B. J., Preiss, J.** (1992). Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J. Mol. Evol.* **34**:449-64
- Staden, R.** (1996). The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* **5**:233-241
- Stratmann, A.** (1997). Identifizierung eines Acarbose-Biosynthesegenclusters in *Actinoplanes* sp. und Charakterisierung ausgewählter Enzyme des Acarbose-Stoffwechsels. Dissertation, Chemische Mikrobiologie, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal
- Stratmann, A., Mahmud, T. Lee, S., Distler, J., Floss, H. G., and Piepersberg, W.** (1999). The AcbC Protein from *Actinoplanes* Species Is a C<sub>7</sub>-cyclitol Synthase Related to 3-Dehydroquinone Synthases and Is Involved in the Biosynthesis of the  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor Acarbose. *J. Biol. Chem.* **274**:10889-10896
- Strohl, W. R.** (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* **20**:961-974
- Szumilo, T., Zeng, Y., Pastuszak, I., Drake, R., Szumilo, H., and Elbein, A. D.** (1996). Purification to Homogeneity and Properties of UDP-GlcNac (GalNac) Pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **271**:13147-13154
- Tabata, S. et al.** (2000). Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**:823-826
- Tada S., Iimura Y., Gomi K., Takahashi K., Hara S., Yoshizawa K.** (1989). Cloning and nucleotide sequence of the genomic Taka-amylase A gene of *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **53**:593-599
- Takata, H., Takaha, T., Okada, S., Takagi, M., Imanaka, T.** (1997). Characterization of a gene cluster for glycogen biosynthesis and a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **179**:4689-4698
- Takizawa, M., Colwell, R. R., Hill, R. T.** (1993). Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. and Environ. Microbiol.* **59**:997-1002
- Tatusov, R. L., Natale, D. A., Garkavtsev, I. V., Tatusova, T. A., Shankavaram, U. T., Rao, B. S. Kiryutin, B., Galperin, M., Fedorova, N. D and Koonin, E. V.** (2001). The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* **29**:22-28
- Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E.** (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* **2**:345-355.
- Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, Xiaodong Cheng, Ten Eyck, L., Narayana, N.** (1999). Catalytic Subunit of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase: Structure and Dynamics of the Active Site Cleft. *Pharmacol. Ther.* **82**: 133-141.
- Thompson, C. J. and Gray, G. S.** (1983). Nucleotide sequence of a streptomycete aminoglycoside phosphotransferase gene and its relationship to phosphotransferases encoded by resistance plasmids. *Proc. Natl. Acad. USA* **80**:5190-5194
- Toda, H., Kondo, K., Narita K.** (1982). The complete amino acid sequence of Taka-amylase A. *Proc. Jpn. Acad., B, Phys. Biol. Sci.* **58**:208-212
- Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D., Wingender, E.** (1981). Chemie und Biochemie mikrobieller  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitoren. *Angew. Chem.* **93**:738-755.

- Tsao L.-S., Lin L.-L., Chen J.-C., Chen J.-H., Hsu W.-H.** (1993). Cloning and characterization of an alpha-amylase gene from *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1171**:255-262
- Tsukagoshi N., Furukawa M., Nagaba H., Kirita N., Tsuboi A., Udaka S.** (1989). Isolation of a cDNA encoding Aspergillus oryzae Taka-amylase A: evidence for multiple related genes. *Gene* **84**:319-327
- van Hülst, R.** (1985). Untersuchungen zur Biosynthese von Acarbose bei *Actinoplanes* sp.. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- van Wezel, G. P., White, J., Bibb, M. J., Postma, P. W.** (1997). The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* **254**:604-608
- Vieira J.und Messing J.** (1982). The pUC plasmids and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-268
- Villand, P., Aalen, R., Olsen, O.-A., Luethi, E., Loenneborg, A., Kleczkowski, L.A.** (1992). PCR amplification and sequences of cDNA clones for the small and large subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase from barley tissues. *Plant Mol. Biol.* **19**:381-389
- Vobis, G.** (1989). Section 28 Actinoplanetes. In: William, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (Eds.). Bergey's manual of systematic of bacteriology. pp. 2418-2428
- Voegtli, M. and Huetter, R.** (1987). Characterisation of the hydroxystreptomycin phosphotransferase gene (*sph*) of *Streptomyces glaucescens*: nucleotide sequence and promoter analysis. *Mol. Gen. Genet.* **208**:195-203
- von Heijne, G.** (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **133**:17-21
- von Heijne, G.** (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**:99-105
- von Heijne, G. and Abrahmsen, L.** (1989). Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* **244**:439-446
- Walker, J. B.,** (1975). ATP:streptomycin 6-phosphotransferase, *Methods Enzymol.* **43**:429-470
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J.** (1982). Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**:945-951
- Weber, H., Heim, U., Borisjuk, L., Wobus, U.** (1995). Cell-type specific, coordinate expression of two ADP-glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *Vicia faba* L. *Planta* **195**:352-361
- Wehmeier, U. F.** (1995). New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors allowing blue-white screening on XGal plates. *Gene* **165**:149-150
- White, O. et al.** (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**:1571-1577
- Willoughby, L. G.** (1966). A conidial *actinoplanes* isolate from Blelham Tarn. *J. Gen. Microbiol.* **44**:69-72
- Wirsel S., Lachmund A., Wildhardt G., Ruttkowski E.** (1989). Three alpha-amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron-exon organization. *Mol. Microbiol.* **3**:3-14
- Wright, F. and Bibb, M. J.** (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**:55-65
- Wu, J. , Dent, P. , Jelinek, T. , Wolfman, A. , Weber, M.J. , Sturgill, T.W.** (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signalling pathway by adenosine 3' ,5' - monophosphate. *Science* **262**: 065–1069

**Yethon, J. A. and Whitfield, C.** (2001). Purification and characterization of WaaP from *Escherichia coli*, a lipopolysaccharide kinase essential for outer membrane stability. *J. Biol. Chem.* **276**:5498-504

**Yokose, K., Ogawa, K., Sano, T., Watanabe, K., Maruyama, H. B., Sahara, Y.** (1983). New  $\alpha$ -amylase inhibitor, trestatins. II. Structure determination of trestatins A, B and C. *J. Antibiot.* **36**:1166-1175

**Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H. and Goldsmith, E. J.** (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**:704-711

- G R T V E A T E L F E R L L S L R N D V G M L A E E  
tcggccgaccgctcgagggcgaccgagctgttcgagcggctcctgtcgtttcgcaacgacgctcgggatgctcgccgaggag  
10 20 30 40 50 60 70 80

Y D P G S G R H L G N T P Q A F S L V G L V N A A R P  
tacgacccgggagcggccgaccctgggcaacccccgagggcgttcagcctggctcggcctggcctcaacgcccggccgccc  
90 100 110 120 130 140 150 160

L G R P Q G \* **Stopp Asp52.3**  
gctgggcccggcggcaggggtaggcgggcgacagctcgcgaccactccgctcatcccggcgtgatcatgtcgtcggctcgt  
170 180 190 200 210 220 230 240  
cgccccgctctgcagcgtggtgagggcagtagggccgactagtagcagccagca

cggtacgcccgctgtaccgctgagccgggggacccgggagaaccagggttcgggtactgcgagggtgggctcaccgcct  
250 260 270 280 290 300 310 320  
gccgatgcccggcagatggcgactcggccccctggccctcttggccaagcccatgacgcctccgacccgagtgggcgga

cgagatcttcctggacgagccgttgaccggcgctccacgtcccggcctgcagcagggcgtcgcgtcgtcgcgagccgg  
330 340 350 360 370 380 390 400  
gcgtctagaaggacctgctcggcaactggccgaggtgcagggccggagcgtcgtccgcgacgcgagcagcgtcggcc

ggacaccctggtcacccccgggctcggcgccggctggccccggtcattggccgatacccggctgatcgtcagcagctcgcgc  
410 420 430 440 450 460 470 480  
cctgtgggaccagtggggcccagcggcggcagtaaccggctatgggcccagctagcagctcgtcagcgcg

**Start Asp52.2** -> M I R R W C R L L S L I P L R  
agcgtcgcgcctcgtgtccctggccggccatctgcatgatccggcgggtggtcggctcctgtctctcataccgcttcg  
490 500 510 520 530 540 550 560  
tcgcagcgggacgcacagggaccggccggtagacg

A P P I G L A I E S R R G W K G C K D A E R Y T G Q  
cgcgcccgataggtctggcgattgagagcaggaggggtgaaagggtgcaaggacgcccggagcgggtacaccggtcagc  
570 580 590 600 610 620 630 640

R R E A T S A S S G P V C W R R V P P G A L W L V V Q  
gccgagggcgaccagcgtctcgtctggccggctcgtcgtggcggcgtgtccaccaggtcgttggctggctcgtcgcag  
650 660 670 680 690 700 710 720

A L N P G W L P N V A W I P G G V T L L L G A W A A W  
gccctgaacccccgatggctaccgaacgttgctggatcccgggcggtgctcactctgctcctcgagcgtgggcccgtg  
730 740 750 760 770 780 790 800

R I A R R G A A S A D G R R F W T Q I A I G T A L V  
cgggatcggcccggcggcgtcggcgtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
810 820 830 840 850 860 870 880

T P G A C L I N A V N T G A L P A A A A V L V V A V S  
ctccgggcccctcctcatcaacgggtcaacaccggggcgttggccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
890 900 910 920 930 940 950 960

F I A V A L L L M I G A L L R L P V A D R A R G Q A V  
ttcatcgacgtcgcctatgtgatgattggcattgctgctgctcccgctcgtgaccgcccggcggcggcggcggcggc  
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

R L G L D A A T I M V V A A T V L W E Y Q V R P M I  
ccgactcggcctcgcgcccacgatcgtgtagtgggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120

G S D P Q L R T V I G P L L V C A I C M G A V L A V V  
ggtcggaccgcaattgctacggtgatcggctcccctgctgggtgctgcccattctgcatgggcccgtcctcggcggcgtc  
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

K L M L A G T D A V S V R S L Q A L G L L V L I G A L  
aagctcatgctcggcaccgagcgggtgctcggctcggctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280

A S A L T R I L E H D A R W L G V G P L I S T V E G  
ggcttcagcgtgaccagaatcctggaacacgacgcccgtggctgggctgggtcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360

V L V V V A A G Q P P A A G A A A D R R S T F S V M P  
ttctcgtcgtgggtggcggccgggcaaccgccggcgccggctgctcggcgccgatccgccagcaccttcagcgtcatcgccg  
1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

Y V A V G V I D S L L L I H T L N G R Q N T A M V I G  
tacgtcgcgggtcggcgtcactcgcactcgcgtgctgatccacacctgaacggcgccagaacaccgcgcatgggtgatcgg  
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520

S V L V T V V V V G R Q I I A F R D N T H L I D S L  
tccgtcctgggtgaccgtcgtgggtcgtcggcggcagatcatcgcgttccgcggacaacacgcacctgatcgactcgtcgc  
1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600

R E H R R M L Q H Q A T H D P L T G L A N R A L F Y E  
gtgagcaccgtcggatgctcagcaccaggccaccatgaccctgaccggcctggccaaccggcgctgttctaagag  
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680

D V S A A C A Q H D A T V L L L D L D G F K P V N D T  
gacgtgtcagcggcctcgcgcagcaccgatgcagcggctcctgctcctggacctggacggtttcaagccggtcaacgacac  
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760

F G H A A G D A L L V E V G R R L R D T A A Q A Q R  
ctcgggtcatgcggccgcgacgcgctgctggctcagaggtggcggcgccctgaggacaccgcgcccgaagctcagcggag  
1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840

V A R L G G D E F A V L L P S S D Q D T A R T A A D R  
tggcaccgctaggcggggacgagttcgcggctgcttccgctcgtcagatcaggacacggcaccggcggcggcggcggatcgc  
1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920

I I A A L R P P I A T H G V T L P V R M S I G I A V Y  
atcatcgcggcgctcggcggccaccgatcgcgacccacggcgtcagcgtaccggctgcgatgagcatcgggatcgcggctgta  
1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000

T D G D D A E S L I R H A D L A M Y E A K R A G K N  
taccgacggcgtgacgcccggagtcctcctgatcaggcaccgccacctggcgatgtacgaggcgaagcgcggccggcaagaacc  
2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080

R H A T Y T A E G R H R I D A D A D G R L C S P L S E  
ggcaccgccacctaccgcgggagggggcgccacagaatcagcgggatgccgacggctcggctgtgcagccccctgtccggag  
2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160

A S A \* **Stopp Asp52.2**

gcttccgcctgaccgacgggggtgccgaattccaactgctttcatcatctgggtccgcaactcgggtcagccgctcggctcag  
2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240  
ggctcgcggccacggccttaaggtgacgaaagtagtagaccaggcgttgagcccagtcggcggagccagtc

gggtgctgcttgacatccggcgagcgtgtggcgacgagcagcgtcccgaccggcggggcgaagcgcagcgtacacgggtca  
2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320  
ccacgacgaactcgtaggccgctcgcgacaccgctgctcgtcgcagggcgtggccgcccgtttcgtgctagtgccagtc

**Stopp Asp52.1** \*

2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
ggctatccaactggcactagccctgcaccagcaatgccgcaatacaaggtcgcagaccgtcaacaacggctcccgtcaggt  
R Y T V T I P V H T T V A N H E L E P L Q Q R P C D V

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480  
gactgctgcccgcggcaggcgcgcctcgtcagggcgtgcagctcgtggaacggcaacggcgccaaccgctagtccatc  
S P R R G D A A S C D A V D L V K G N G R N A I L Y

2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560  
gcccatggctggccccactgtgaggtgacgaccgtgcgcaacggctcacgacaggtgtccagctacggccgcggcaggcg  
R T G V P T V S W Q Q C A N G L A T W L D I G A G D A

2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640  
gcatggcgtcaactggctcagctcgtggaacggcgacaactgtgaccactaccacatcatcgcggcggcgggtggccccact  
T G C N V S D L V K G S N V S T I T Y Y A G A V R T F

2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720  
tcgaggtgacgaccgtcgcacaacgggtcgtcagggtagggatcgcggccacggcaaccgccacggcgtcagccaccgc  
S W Q Q C S N G L S S W Q R V G T G N A T G C D T A

2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800  
aggctcctggaacggtagcagaccaactgctcggctatggccccaggggcttggccttccactgccacggcggccccgag  
D L V K G S S Q N V L R Y R T G A V P F T V T G G P D

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880  
gggcctcccgcgccactaccaccacgggctccgctggccgcacgggtccaagccccacggcagcctcaaggtcaagtgga  
G S P A T I T T G S A V P T G L N P T G D S N W N V K

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960  
accactagggcccgccatgccacggccgctcgggacgcaccggctcagcaagcgccactatctggtaggtccagagccac  
T I R A T R T G A C G Q T A S D N A H Y V M W T E T

2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040  
ggcaggccgctgcacttcttccgactactggcccggtctctcgggcaaccgcagcctcgcgacttctctcgacacga  
G D P S T F F A H H G P G F V G N A D S R Q F L A T S

3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120  
gaagaactgggtccttcaccgctagtagcccagccgcgccactcccagtcgtacggctagaacatcaggccgcaccacg  
K K V W S T A I M P D A G T L T L M G I K Y D P T T C

3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200  
tcctcgaccgcctcttccactccttcagaacggcggtacgacgtcctacacaccggaagcaactggaaccggggcctg  
S S A S F T L F T K G G H Q L I H P A E N V K A G S

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280  
cagagggtgcgcaaccacccccgctagggaccatcgccgcgccgactagcaggtccccaacgagtagccccgctactt  
T E W A N T P A A I R T A A G S I T W P N S M P A I F

3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360  
ctccgagacgaccagtggtggtccggctcatcttctttagtcaaaccggccgtagcaccgctgacggcagctacc  
L S Q Q D G V W A S Y F F Y L K G A I T A V S G D I A

3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440  
gggtcggaacaagacgtggccgctcgacgcgccccttaccatccctggtagcccagccacggcgacgagaggtcttga  
W G N N Q V P L Q A A F H Y P G M P D T G S S E L V

3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520  
tggctcgcaacgggcagcgtcgtgcccgcaccggccgcccacatcatctctatggctcggaacggcaagccccggcagctc  
V S R Q G D C C A A T G A T Y Y L Y W R K G N P G D L

3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600  
gtccacgtcaagggccgggtcccgaacgtcgtctgccaactcggccggtggccacatctgctgacacatccgcccgggc  
L H L E P A W A N C C V T S G A G T Y V V S Y A A G S

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680  
tgtcgaccactgcctccggcggaagaactgggtgctggaccaacaaggtccagcaccgcccgtccatcatcaacggcaac  
L Q T V S A A K K V V V Q N N W T T A A L Y Y N G N

t  
3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760  
atcattgggtaggtgcccagtcgcccagtcaccggccctcggtggtccaacctgcaccaccgcccggcaacggccgca  
Y Y G M W P D A G Y P A P A V L N S T T A A A T A P T

3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840  
acaacgacaattgttacaaggctaccgcccagtcaccagtagcgggtcccggctcgacgggaccggttcgcccggcct  
T A T L L T G I A A T L T M A L A L T A R A L R R P L

tccgtgcctctcgttcggccgctcgccggcggtgcaacctggaggcgaagtgtgaccgctaac

3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920  
ccagtccaacgtaaggcagggagagcaagccggcgagccgcccgcacgttggaaacctccgcttcaactggcgattg  
D P A M <- Start Asp52.1

accaggcgggtcaacggaggtcagaaacattttcgaatctttcggatggctgcgacgccatcgtgacctggggccgctc  
3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000  
tggctccgcccagttgctccagtccttgtaaaagctttagaaagcctaccgacgctgcggtagcactggagcccggcag

cgggcaccggattcccgcagcctggctgccttctcggccggtggttccctcaccagaatccgggattgttcgagtgcta  
4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080  
gcccgtggcctaagggctgctcggaccagcgaagagccggcaccgaaggagtggtcttaggcgctaacaagctcacgat

tgaccaccggggacagggcccggcgtcggcggtcctaaccgggtagatcctcgggccgagccgggtgcagcagcgttcgc  
4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160  
actggtggcccctgtccggccgagccgagcaggtattggccatctaggacgcccggctcggccacgctcgcgaagcg

gccaccgcatgaacctcgtcgggatcgaaggcagcagcaagtcgatggcatcgtcgtggccgctcgcgtgcacagagc  
4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240  
cgggtggcgtacttggagcagccctagcttccagtcgtgcttcagctaccgtagcagcaccgcccggcagcagcgtgctcgc



cacggtgacatgccccggtccacgatcaccagcgccgctccgactccaccccgtcagtcacatcggtgatcgacgtgcaa  
4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320  
gtgccactgtacgcccaggtgctagtggtcgcgccgagagctgaggtggggcgagtcaggtagccactagctgcacgctt

tcggcgaagagctggcagggccggggccgggaccggagacacccaccagcgccggtcgatgcccggctggccagccgc  
4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400  
agccgcttccctcgaccgtccgggcccggccctggcctctgtgggtggctcgcgccagctacggcgcagccggtcggg

ggaatccagccgtgtcccgtcgcgaggtccggatacggcccaggaccacgcccgtacgggcccggcgaacggcaattgct  
4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480  
ccttaggtcggcacagggcagcgtccaggcctatgcgcggtcctgggtcgggcatgcccggccgcttgccggttaacgga

caagacgtgtgctgagccgctcgaggagatgcccgtccccgggtccgggcgcggtggcgagccagggccatatacgaag  
4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560  
gttctgcacacgcccactcggcagctcctctacggccagggccaggcccggccaccgctcggctccggtatagcttgc

ggctggcaccgggtacgtacaactcagggcggggagcacgcaaccgagccgagcgggtcgaccggccaatcccgcacggcg  
4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640  
ccgaccgtggcccatgcatggtgagtcggcccccctcgtgcgttggtcggtcggcagctggccggttagggcgtcgcc

acagcggcccaggccggggcgaacaaccatccctgccccagccggcgcccaaggcggtgccacctggagatcctgctcc  
4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720  
tgtcgccgggtccggcccgttgttggtaggacgggggtcggccggggttccgcgcaggtggacctctaggacgagg

gtctcgatgcccctcggcgatcaccatcgcaaccggtccgctgggctatccgcacaccagcgcggtcgtctcgatggtgtg  
4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800  
cagagctacgggagccgctagtggttagcgtggccaggcgaccgcataggcgtgtggtcgcgccagcagagctaccacac

tcgacagtcagggctcgcgagcaggtgcatgtcgagcttgacgacctccggctccaacagcggcaggaaggccagcgaca  
4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880  
acgcgtcatgcccagcgcgtcgtccacgtacagctcgaactgctggaggccgaggttgcgcgctccttccggctcgtgt

gccggtcccacaaacatcgctcgagcgcagcgcaccgcccgggtcggtgcccggggcgagcctcaagcagcgcggac  
4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960  
cggccaggcgtggtttagcagctcgggtcgcgtggcgccacgcaccgcccggccgctggagttcgtcgcggctg

gggtgcccgcagggcagcgtcgggtgaactccagcagctatcggtaggtcgagatcgaggcgagccgtaacgcaggtc  
4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040  
cccacgcggcgggtcccgtcgcagcaccattgaggtcgtgcatagccatccagctctagctccgctcggcattagcgtccag

ctcgtgagcggccgatccgccccgggggttcttgttgatgaacaccagcgggtggcaccaccgctccgggggctgag  
5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120  
gagcagactcgcggctaggcggggccgcccgaaggaacaactacttgggtcgccaccggtggtggcgaggcccccgactc

cgatctcatgtgcccggggcggcgcacaactgggtccagctccggcaccaggtcaaccgcgcagcggcctcgaacaactgg  
5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200  
gctagagtacacgggcccgcgctggtgaccaggtcgaggcgtggtccagttggcgctcgcggagcttgttgacc

tccgggaactccagcgggatcctgcccggcccacgcgaagcgcctccgccccaccagcggcgggtatcgaggtcgac  
5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280  
aggcccttgaggtcggccctaggacggccgggtcgcgctcgcggaggcgggggtggtcggccgcccatagctccagctg

gatgggctggaacagcggctcaacggcagcgtcggccactacacgggagatgagcgcgacagactcgttccgggctcac  
5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360  
ctaccgcaccttgcgcgagttgccgtcgcagcgggtgatgtgccctctactcgcgctgtctgagcaaggccccgagtc

acacctgctgttccctctggatcacaccaccagtcggcgtccgagatggtttccgcaacttctgctgatcggctgacaccg  
5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440  
tgtggacggacaaggagacctagtgtggtgggtcagggcaggtctaccaaaggcgtgaagacgactagccgactgtgggc

gctcacctgagcactcgcgactccatggattcgaagacctgcttatcggcattcatgcctgccctgctctgtgcccga  
5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520  
cgagtggactcgtgagcgtgaggtacctaaagcttctggacgaatagccgtaagtacggacggcggagcagacacggctt

cacgaggacgacctggccagcagggacgacgataccgaggagcgcctatgacgagatcgacgaagcgttcgtgtggtgtg  
5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600  
gtgcgctcgtggaacggctgctcctgctgctatggctcctcgcggtaactgctctagctgcttcgcaagcacaccgacac

cgtgccctacagctcaagatcgaggatcgtggtgcccggcgggtgatccgcgaggtgcccggcggagctcggcgtgccc  
5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680  
gcacgggcatgtcgagttctagctcctagaccacggcccggcccaactaggcgtccacgcggccctcagacggccacgcc

cgcttccggggcggatgctgcccagtgaggcggcgtcccgcagcaagtgccttcccgcgtgacggcatcgagagacatc  
5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760  
gcgaaggcccctacgcacggctcaccgtcggcagggcgtcgttcacggaaggggcactgcccgtagctctctgtgag

gttgetggggcgctcccatcgcaacgggtgctccacagtgttaacgggtggcgacagacggcttcccggctgtttgcaa  
 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840  
 caacgacccccgcgagggtagcgttgccacgcaggtgtcacaattgccgaccgctgtctgccgaagggccgacaaaactt

gtgcttccacgtgatgcaagagtttgctagcttcgtgcggtgacgacggctggcgccatcgatgaagcgccggcc  
 5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920  
 cacgaaggtgcactacgttctcaaacgatcgaagcagccacgccaactgcggcgaccgcggtagctacttcgcgccgg

Start AcbZ -> M V L

tctccggacggcgggcgcccccgggcaccgcaccacgttccccgtcacgccccgaggagggccgctcttgggttctgt  
 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000  
 agaggcctgcccggcgggggcgccccgtggcggtggtgcaaggggcagtgcggggctcctcccggcgaga

S R H R D V M R R L S A V L A L G L V V P L L L A P P  
 cccgtcatcgcgacgtcatgctgcctgtccgctgctggcgctggcgctggctgggtggcctgctgctggcgccaccg  
 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080

W R A L G R P R A E P S A A A L A H W G A D R P A P A  
 tggcggggcgctcgccggcgccgagcggcgccgcccctggcccattggggagccgaccggcgccgacccgc  
 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160

E Q F Y F V L P D R F A D G N P K N D T G G L S G D  
 cgaacagttctacttctgctcctgcccagaccggttcgcccagcggaaccggaagaacgacaccggcggtctctccggcgacc  
 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240

R L S T G Y D P T D K G F Y H G G D I Q G V I D K L D  
 ggcctccaccgggtacgacccccaccgacaagggcttaccacggtggggacatccaggggggtgatcgacaagctggac  
 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320

Y I Q G L G T T A I W L A P V F K N R P V Q G T G A A  
 tacatccaggggctcgccaccaccgccatctggtggccccggtcttcaagaatcgccggtgcaggggaccggcgccgc  
 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400

P S A G Y H G Y W V T D F T Q V D P H F G T N A D L  
 gccttcggccggctaccacgggtactgggtcaccgacttcacccaggtcgaccgccacttcggcaccaacgcccacctca  
 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480

K R L V Q L A H R R G L K I Y L D I I V N H T A D V I  
 agcgcctggtgcagctggcacaccggcgggcgccctgaagatctacctggacatcatcgtaaccacaccgcccagctcatc  
 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560

Q N E G G K S T Y V D K A D A P Y R D S R G R P F E D  
 cagaacgagggcggaagagcagctacgtggacaagggcagcggccctaccgggacagccggggccggcgttcgagga  
 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640

H N Y A D G S R P F P K V N L Q S F P Y T P V F A S  
 ccacaactacggcgacggctcgcgccggttcccgaaggtgaacctgcagtcggtcccgtacacgcccgttctccgagcc  
 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720

P A D A T A K V P A W L N D P T M Y H N R G N S L F S  
 ccgcccagccacggcgaaggtcccggcctggctgaacgaccgaccatgtaccacaaccgcccgaattcgtgttcagt  
 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800

G E N S E Y G D H T G L D D L W T E R P E V V R G M T  
 ggggagaacagcgagtacggcgaccacaccggcctcgacgacctgtggaccgagcggcccgaagtggctccgcccacatgac  
 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880

E I Y A D W I R D A D I D G Y R M D T V K H S N I E  
 cgagatctacggcactggatcccgggacggcaccatcgacgggtaccggatggacaccgtcaagcacagcaacatcgagt  
 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960

F W Q Q F N P A I Q Q A A R R A G K P G F F M F G E V  
 tctggcagcagttcaaccggccatccagcagggcggcgacggccggcaaaccggcttcttcatgttcggcgaggtc  
 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040

F S A D Q E V E S R Y V R Q A A W P R P L D F S F Q S  
 ttcagcggcaccagggaggtggagagccgatacgtcccggcagggcctggcggcctcccctggacttctccttcagtc  
 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120

A A R T F V S G D T P A T A L A D L Y R H D D L Y T  
 ggcggcccgcacgttctcgtccggtgacacggccaccgctggccgacctttaccgacacgacgacctctacaccg  
 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200

A R D T G A G R M P T F L G N H D I G R I G S F I T T  
cccgcgacaccggggccggatgccaccttcctcggaaccacgacatcgccggatcggtctcatcaccacc  
7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280

G G A D R T S Y L R R D Q L A H E L M F L T R G Q P V  
ggcggcgccgaccgagttacctgcccggcaccagctggccacgagctgatgttcctcaccgcgggcagccggt  
7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360

V Y S G D E Q G F T G P G G D K D A R Q D M F A S R  
ggtctactccggcgacgagcagggttaccggggcgggggacaaagacgcccggcaggacatgttcgccagccgga  
7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440

A G L P R R R P D R H R P D P R E R Q L R H R A P A  
T P D Y L D D D L I G T D R T H A S D N Y D T G H P L  
cgccggactacctgacgacgacatgatcgccaccgaccggaccacgagcagaactacgacaccggggaccggctc  
7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520

Y R T I A E L G A L R K A N P A L R D G V Q I T R Y A  
taccgcaccatcgccgagctggcgcgctgcgtaaggcgaaccggcgctacgagcggcgatcaccgggtaccgc  
7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600

A P G A G I F A F S R V D P V R R Q E Y L V A V N N  
ggcggccggcgccgcatcttcggttctcccgggtcgaccgggtccgacgccaagaaacctggtcgcggtcaacaacg  
7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680

A T T A Q T A T V G T A T P G S T F T G V Y R A R Y R  
ccaccaccgacagacggccaccgtcgccaccgcccggcagcaccttaccggcgcttaccgcgcggtaccgc  
7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760

A T G S D G K L T V T V P A L S A V V Y R G G S P I A  
gccaccggctccgacggcaagctcacggtgaccgtgcccgcctgtccgcggtggttaccggggcgagcccatcgc  
7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840

V P S A R P T V R I S A P A A G A S V P S R A D L V  
ggtcccgtcgccggccaccggtgaggatcagcgcaccggcggggcggtccgtgcccgtcgggccgatctggtcg  
7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920

A D V T G D P L A T V T F A A Q A G S G P W T V I G T  
ccgagctaccggcgatccggtgcccaccggtgaccttcggcggcagggccggatccggcccgtggaccgtgatcggacc  
7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000

A R Q A P Y Q V H H D L T G L A G G V T V R Y K A V V  
gcgggcagggccccgtaccaggttaccacgacctgaccggtctggcggcgggggtaccgtgaggtacaagggcggtggt  
8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080

R D G R G R T A S S T S S L R V G T P D T H V A P E  
ccgggacggtcgcgagctaccgagctccacctcgtcgtgcccgggtcggcaccggcaccaccgctcgccgggagc  
8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160

R M V V H Y Q R P A G D Y G A W R L Y A F G D I D A S  
ggatggtggtgactaccagcggcccgggtgactacggcgcctggcggtgtacgccttcggcgacatcgacggctcc  
8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240

A Q T T Y P D G Q P F A G Q D E Y G A F A W V R L K P  
gccagaccacctaccggcagggcagccgttcggcggcaggacgagtagggcggttcgctgctgggtgagactcaagcc  
8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320

G A K N A G F V V V D G N G V K D V Q Q D R F V D P  
cggcgccaagaaccgggtttcgtcgtggtggacggcaaccggcgtcaaggacgtccagcaggaccgggttcgctgaccggg  
8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400

G R Q P E I W L K A G D A T V Y P S R Q D A T G R P D  
gccgacaaccggagatctgggtgaaagcggggcagcgcgaggtgtaccggtcccggcaggacgccaccggcggccggac  
8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480

P Q P D P K T A V L H Y R R A D G D Y T G W G L H V W  
ccgcaaccggaccgaagaccgctcctgcactaccggcggcggcagcggcactacaccggatggggcctgcacgtctg  
8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560

D G A A Q P T E W T A P L A P S G R D A Y G V T F R  
ggacggcgccggcccagcccaccgagtgagcggcggcgtggcccgtccggggcgagcgcctacggtgtacgttccggg  
8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640

V P L A D G A T G V S Y V L H A G D T K D Q P T D Q R  
tgccgctcggcagcggcgccactggggtcagctacgtcctgcacgccggtgacaccaaggaccagccgaccgatcagcgg  
8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720

I D F A A G R E V W L L D G V A E R L L P V T R R T A  
atcgacttcggcggcgccgctgaggtgtggctgctcgcacggggtggccgagcgcctgctcgggtgacccgcccggaccgc  
8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800

A G A G I D V T T S R A G W A S R D T V V W N T G V  
ggcggcgccgggatcgtggtgacgacctcgcgcggcggtggccagccgggacacgggtggtctggaacaccggtggtgg  
8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880

G S T L Q P V G G G T D G R V Y E L A Y A P V G G I T  
gcagcaccttgacggcgtcggcggtggcaccgacggcggtgtacgagctggcctacgccccggtcgggggatcacc  
8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960

V V G G E L A G A Y R T L R L T A Q R D G L T E S Q R  
gtggtcggcggggagctggtggggggcgtaccggaccctcgggtcaccgcgacgctgacggcctgaccgagaccagcg  
8970 8980 8990 9000 9010 9020 9030 9040

V R F P K L W R Y G A F R V A D A T G I R L A T A L  
agtccggttcccgaagctgtggcggtacggcgccttccgcgctcggcagcgcaccggcatccgctcggccaccggcgttgc  
9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120

R G Q V V I T E R D A S G K L L A A T G V G A A G D L  
gcggtcaggtggtgatcaccgaacgggacgcctcgggcaagctgctcggccaccgggtgtggcgccggcgggtgacctc  
9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200

T G \* **Stopp AcbZ**  
accggctgaccggagaccgggattgatcgggcgagcgcgcgggccccgatcgggtgaaccgg  
9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280  
ggcctcggccctaactagcccgcgctcgcgcccggggtagcgcacttggccagtcgaccggcccgtgta  
**Stopp AcbY** \* S G P M

9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360  
gagcatcggcgctcgggctcggccttccacggcatggggctcgtcctgcccactcgcaccactggccgctgtaggtgctg  
E Y R R L G L R F T G Y G L L V T L T T V P L M W L L

9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440  
cgccgggcccaggggcccactcgtccatcgcggtggccatccatccgcccacttgcgcttgcgctcgtgggtccactcgtgg  
P G A D G T L L Y R V P L Y A T F A F P L V W T L V

9450 9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520  
ggcgcgctggtggcccaccatctccaactcgcgccacttgagcgcactcgcaccaactggcgggtggtagtgaactc  
G R L V P H Y L N L P Y A T F E S L Q N V A V M V N L

9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600  
cgacgaccagtaggtcttgcgtgctccctccggtccttgcggaactccttccacacctagtcggcgggcgtcctggtccc  
S S T M W F S L S A L F A K L F T H I L A G G L V L P

9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680  
cgtcgttgcgctcgggtgacacgggtgccagtcaccgtccaggtagcagggcggcgccactggtgctaccgctacggccac  
L L L L W Q A V T L H L D M T G A A T V V I A I G T

9690 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760  
cggctcaggggcttgggaggcctatctccttggcaagcctgctcgcgcacatcttggccaagtggcggcctagtcct  
A L E G F G D P Y L F R E S L L A Y F P N V P R I L Y

9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840  
cgccttctcagcggccacgctggtgacgggtccggtcctaggtgctgaccagccacttctcggccaggtcggggcggc  
R F F D G T R V L Q W A L I W L Q D T F L R D L G R P

9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920  
cgtcgtccctcttgggctcgtccttgcgaggacaccgcccaggtcggcggtcggcggccttgcacatgaccttctagtg  
L L S F G L L F L A Q Q R T W G G L A P V Y Q F I V

9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000  
ggctagtcggcctagaccgctccgctaggcctactgcttcgaccgggggctactccttcaggtaggccatgcccactc  
G I L A I Q C A I R I V F S A A G I L F D M R Y A T L

10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080  
ggccacgtccgagcggggcggtgctgctggcggcactcccgctccatggccgcgccacactctgccagtaggcggctcgtg  
R H L S A G C L V A T L R L Y R R A T S V T M <-- Start AcbY  
Stopp AcbX \* G G L V

10090 10100 10110 10120 10130 10140 10150 10160  
gaggtgggacgcgtcgtggccaaggtcccggtcccggctcgtgcgcatgctcgtcatggcgggtctcgggacctgtggct  
E V R R L S R N W A L A L V G Y L L V A W L A Q V G L

10170 10180 10190 10200 10210 10220 10230 10240  
cctaccgtcggcggccttggcggcctcatcggcggctcgtcgtcggcgttggcccacagctagtccgggacctgtgcc  
I A A A G S G G S Y G G L L L R L P S D I L G Q F P

10250 10260 10270 10280 10290 10300 10310 10320  
tcgtcggcgtcgtcggcccgggtgcggcagcccttgtcgcgctcgcctcgtggaccggcgggtccttccgctgctcgg  
L L R L L R A V G D P F L A L P V V Q G A L F A V L A

10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400  
caagaactagcatgcctacggggccacaaccagcactgcttccgcccgtctgggtggctccttcaactagagcttccgct  
N K I T R I G W T N T T V F A A L G V L F N I E F A L

10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480  
cctagtggtcctcgtcgtcgcgctgcccgttgtcgtcgtccaaccgcccctcggccctcggcgtcgtcgcgttgtagcgc  
I V S L L L A V A F L L L N A P P P A P L S A F M A

10490 10500 10510 10520 10530 10540 10550 10560  
tttgccgctcgtggccccggcggcgggtcgtcgcgtgactcgcgcccagcgtccaagtggcgggtcgtcgcactcggc  
F G A L V P A G A L L A S L A A T P L N V A L C S L A

10570 10580 10590 10600 10610 10620 10630 10640  
catcaagcggcccgcctggtccctcgtggcgtacagggcgccatgtggagcggcggcgttagtagagcagctaggccaacc  
Y N A P R V L S V A I D G R Y V E G A I M E D I R N T

10650 10660 10670 10680 10690 10700 10710 10720  
acacgtcgtagggctcgtggacgcgctcgtgctacatgctccactcgacacgcttggcctcggcggcggcggcggcaggc  
H L M G L V Q A L V I Y S T L Q A F P L G A P A P G

10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800  
ggccgcatcgtccgagcgggtgctccttgtggacgttgcctccaccggcgtcggcggcactcagcggagctcgtaccagct  
G A Y V A R W L F V Q L S T A A A A T L A S L V I T S

10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880  
cgccattgcccaactgcccgcacgtcagggcgtcctccgcttggcggcgtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
R Y R T V A H L G A L A F P A Y R R A A R I M <- Start AcbX  
Stopp AcbW \* A G D G

10890 10900 10910 10920 10930 10940 10950 10960  
ccgccaactggccgagggcccggcgtggggccgcatctacggcggcgtcgtcacagaggtcctagccgagggcggcggcgtgca  
A T V P E P R S G A Y I R R L L T E L D A D P V L V D

10970 10980 10990 11000 11010 11020 11030 11040  
gagagtcagcttggccaggtcgtccttccgctagtggaagcggcggcgtggtcggcaggtggccttggcgtggccttag  
S L D F R D L L F A I V Q R A S W R D V P F E V R I

11050 11060 11070 11080 11090 11100 11110 11120  
gcccggcgtgagccggcctcaccgaggtggagcccgtcaggaagccactactacgctcggcggcggcggcggcggcggcggc  
R G S E A P T A D V E P L G E T I I R L A A A E S V S

11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11200  
cgccggcggcgtgagcttccactggcggggccacaggtggcgtcgtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
G A A Y E F T V A R T D V S R L L D R M T G Q H V I T

11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280  
agggcggcaggtcgtggc  
G R D V V L A Q D C I S T I D G I D H S T L M V T T

11290 11300 11310 11320 11330 11340 11350 11360  
gggtcaagccgcacctacaccaactagtccagggcctggcggacgaactcctggtccaggtccggcgtaccaccaagcag  
G L E A H I H N I L D R V A Q K L V L D L G I T P E D

11370 11380 11390 11400 11410 11420 11430 11440  
ctccttctggtgcccggcccagcagctcgtcgtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
L F V V A P D H L L S A A I E A R M R Q G L S L Q R V

11450 11460 11470 11480 11490 11500 11510 11520  
 ggccccacaacggctccccgggctccaggctcggccaggccttgcgcggtacaaggccagcatgtggcggacgccggtg  
 P T N G L A G L D L R D R F L R M N R D Y V A Q P V

11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600  
 agcatctgcacggcgtcctacgccttgctcagctcctggcgtctagggtgggtctcgacgaccgacccggtctctgggtg  
 E Y V H R L I R F S D L V P L D W W L Q Q R Q G F V V

11610 11620 11630 11640 11650 11660 11670 11680  
 cggctaggccggcgtgggcccacggcggccacgcccagctcggcagctgggctggggcgccaccagcccgcgt  
 G I R G A V R T R Q R H P D L G D V R V R G T T P R M

11690 11700 11710 11720 11730 11740 11750 11760  
 actacggccagctcctcaactagcaccacctgaacggcggcgaagcggggctacatccgctagaactgtggcctgccc  
 I G T L L K I T T S K G A G N A G I Y A I K V G S P

11770 11780 11790 11800 11810 11820 11830 11840  
 tggagcttcgactacagcagctgcgggctggtgcagcatggcccggctcttgtaccaagcgtcgcagcgggctctgg  
 V E F S I D D V A R V V D Y R A S F M T R L S G R L G

gcccggctcgtccgtccggcgggcatg  
 11850 11860 11870 11880 11890 11900 11910 11920  
 gccgagcggccatcgcgaacttcacgaacgactccacgagccgctgctagtaaggccagaggcaggccggcggcggc  
 P E R R Y R K F H K S L H E A V I M <- **Start AcbW**

ccgggctaccgggcatggcagctcagatgattcacggatcctcgtttctttccggaagatgtcgtggcggcaacat  
 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000  
 ggcccgcagtgggcccgtaccgctcagctctactaagtgcctaggagcaaaagggccttctacagcaccgctgtgta

tttgaatgatgattaccatcaattaaccgagtttccacaatgtcgcgcccgtctcggcagccgctatatggaagcaa  
 12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080  
 aaactttaactactaatggttagttaattggctcaaagggtgttacagcgcggccagagccgctggccgatataccttcggt

tccaacagctcggcgggaggtgtgtgcagcgggtgacaatccggcggcggccggcgcgctcgcgcccggagtgcggc  
 12090 12100 12110 12120 12130 12140 12150 12160  
 aggcttgcagcggcctcctacaacagctgccacactgttaggcgcccggcggcgcgagcggcctcagccg

cgccatcctcgttgcgaggtgctgagggcagcggccgatcgtcggtaggggagggcggctatccgctgtgcgggtg  
 12170 12180 12190 12200 12210 12220 12230 12240  
 gccggtaggagcaacaggctccacgactccccgtgcccggctagcagccatccccctcccggcagtaggcgacacgccac

cgggatcagccaagtgcgacttgatgagcattgagcggcggcactcgtcaagccgctgcccggctcctcgaatgtgaccg  
 12250 12260 12270 12280 12290 12300 12310 12320  
 gccctagtcggttcactcgttaacttacgtaacgcccgtgagcagttcggcggcagggccaggagctttacactggc

cgaacctttccgctccgatgagtgaccggcgtcataatgtgtttcgggcaacaaaccatcggcagatcctcga  
 12330 12340 12350 12360 12370 12380 12390 12400  
 gctttgaaagggcaggctatacctcactggccgagcagcgttaaaacaacaaagccgctgtttggtagcggctaggagct

tatattaccagccgcttttccgacattcggccagatgaatgcggttacagcgggaccggcgggtggggccggatgggtg  
 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480  
 atataatggtcggcggaaaaggctgaagcggctcacttacgccaatgctgcctggccgccacccccggcctaccac

ggcggggttgcggaggggcggcccgggtgaacgatgcaagaacttgcggttccaggtccagttgcgggtgccggtttca  
 12490 12500 12510 12520 12530 12540 12550 12560  
 ccgccccaaagcctccccggcggcacttgctacgttcttgaacgactttgaaagtccaggtcaacgccacggccaaagt

ccgcatagatttcgggctcagcggctcagcggctccgatccggcccggctgagtggtcggctcgtggggcgggtgag  
 12570 12580 12590 12600 12610 12620 12630 12640  
 ggcggtatctaaagcggcagtagccggagctgccaaggctaggcgggcccgactcacacggcagcagccggccacgtc

cgacggcagctcgttgaaccccgaacttcagccatctcaccggatgcccggctatccccttcaggagtgaccgct  
 12650 12660 12670 12680 12690 12700 12710 12720  
 gctgcccgtcagcgaacttgggcttgaaggctgggtagagtgccctacgcccggataggggaagtccctcactgggca

**Start AcbV ->**

M F R A G S F R H R R R D P A A V P V S R Q A D L L  
 gatggttccgagccggttcggttcgacaccggcggcgcgaccggcggcgggttccgggtgagcagcagccgacgtgct  
 12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800  
 cta

A R E S R H L A P G A S E E A A L G R R V F V E G R  
 cgcccggagtcgctcacctggctccgggagcctccgaagaggcggcgtcggcggcgggtgttcgctcagggcggc  
 12810 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880

G A T L R D A D G V E Y L D F A A G T L T Q S L G H C  
gcgcgacccctgcgcgacgcccgcggtgtggaatacctcgacttcgccgcccgtactttgaccagtcactcgggcaactgc  
12890 12900 12910 12920 12930 12940 12950 12960

H P E V V A R L T E Q A G K L W N V H D F A T A D R A  
caccgccgaggtgtgcccggctcaccgaacaggccgggaagctgtggaacgtccacgacttcgcgaccgcccgcgaccgcgc  
12970 12980 12990 13000 13010 13020 13030 13040

A L C E L L A E L L P D H L T T L A F F S T G A E V  
cgcgctctgcgaactgctcgcgcaactgtgcccaccctcaccacgctcgccttctctcgaccggcggcggaggtgg  
13050 13060 13070 13080 13090 13100 13110 13120

V E A A L R T V Q A V A E P G R N R V G A L R H G F H  
tggaggcggcactcgggacgggtccaggccgtcgcggaacccggccgcaaccgggtcggggcactcgggcaaggctccac  
13130 13140 13150 13160 13170 13180 13190 13200

G K T M G A R M L V H W D V G D Q S F A G N S V L G Y  
ggcaagacgatggcgcccgcgatgctggtgcactgggacgtggggaccagtcgttcgccggcaacagcgtgctggggta  
13210 13220 13230 13240 13250 13260 13270 13280

A P Y C Y R C P L E L S Y P S C E V R C A T L V R R  
cgccccgtactgctaccggtgcccgctggagctgagctatccgtcgtgcgaggtccgatgcgccaccctgttacgcccgc  
13290 13300 13310 13320 13330 13340 13350 13360

H I A E K P N V S A L F F E P V L G A A G V I V P P P  
acatcgccgagaaacccaacgtgagcgcctgttcttcgaaccgggtgctggcgccggccggtgatcgtgccgccaccg  
13370 13380 13390 13400 13410 13420 13430 13440

G Y W E Q I A A A C R D N G V L L V A D E V L T G G G  
ggctactgggagcagatcgcggccgctgcccgggacaacggcgtactgctggtcgccgacgaggtgctcaccggcggcgg  
13450 13460 13470 13480 13490 13500 13510 13520

R T G T F L A S E A I G V A P D L V T L A K G T A S  
ccggaccggaacctttctggccagcagggcagtcggggtcgcgccggatctggtcactggtggccaagggcaccgctccc  
13530 13540 13550 13560 13570 13580 13590 13600  
ggcctggccttgaaagaccggctcgtccgctagccccagcggggcctagaccagtgcaaccgggtcccgtggcgcaggc

G F P F A V L A G R D E V L R H P R A G L A G S T A S  
gtttcccgttcgcccgtgctcgcggggcgtgacgaggtgctgcggcatccccggggcgggctcgcgggatcgaccgctcc  
13610 13620 13630 13640 13650 13660 13670 13680

T Y A G N P L G I A A A H A T L S V I S R D R L I E Q  
acctacgcccggcaaccgctcgggatcgcggccgcccaccctctcgggtgatctcccggcaccgggtgatcgagca  
13690 13700 13710 13720 13730 13740 13750 13760

V R D L G A V L A D R L A E M H D R H P H L G D V R  
ggtccgggacctcggcgggtgctggccgaccgctggccgagatgcacgaccggcaccggcacctgggacgctgcggc  
13770 13780 13790 13800 13810 13820 13830 13840  
ccaggccctggagccgcaccgaccggctggcggaccgctctacgtgctggcctgggctggaccgctgcacgccc

G I G L L H G L E F V H D R Q S R R P A P E I A R R V  
gcatcgccgtgctcagggctcagttcgtgacgaccggcagagccggcggccggcccccggagatcgcccgggggtc  
13850 13860 13870 13880 13890 13900 13910 13920

Y T T A L D A G L R T A I G G H I I R L A P P F V I D  
tacaccgcccctcgaccggctcgtcgcaccgcatcggcgggacacatcatccggctcgcggccgcttcgctatcga  
13930 13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000

E T E L L R G L D L L D R A I T E A G R V T A \* **Stopp AcbV**  
cgagaccgagctgctgcgcggcctggacctgctggaccggggcattaccgagggccggggggtgacggc**atg**acaccccg  
14010 14020 14030 14040 14050 14060 14070 14080  
**Start AcbU -> M T P R**

P V S T I D V S L A S L L R T A D W P H E D L R G P  
gcccgtcagcagcagctgagcctcgcagcctgctgcgaccgcccactgcccgcacgagatctgcggctcccg  
14090 14100 14110 14120 14130 14140 14150 14160

G G V R I L D E A I L G P S R L L I V A A E R N P E S  
gcccgggtcgggatcctcagcagggcagcctcggcccgtcccgggtgctgatcgtcgcggccgaacggaaccccagagc  
14170 14180 14190 14200 14210 14220 14230 14240

R Y F V A V L R H D P S R E A V G D A A H D R A V V Q  
cgctacttcgctcgccggttctgcccacgatccgctcccgggagggcgtcgcgagcggccacgacgggcccgtggtcca  
14250 14260 14270 14280 14290 14300 14310 14320

A M R E R L A L P T A A G H L I V F D G D P A P F R  
ggcgatgcgcgagcggctggcactacccaccgacggcggccatctgatcgtcttcgacggtgaccccgcgccggtccggag  
14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400

A T R P F D P G W S T N A L S L A D L D G T L H I H K  
ccacccgcccgttcgaccccggtggctgaccaaagccctgctgctggccgatctggacgggacactgcacatccacaag  
14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480

A Y R L V S A A T R E P H L L R L M H R G G R T Q R W  
gcgtagcggctggtgctggccgcccacccgggaaccgcatctgctgctggcggatgatcgcggcgccggtaccagcgatg  
14490 14500 14510 14520 14530 14540 14550 14560

A G D Y H Y V E Q P S G R R Y P L G L L Y A Y A E G  
ggcggcgactaccactacgtggagcagccctccgggcccggctaccgctgggctgctctacgctatgccgaaggcg  
14570 14580 14590 14600 14610 14620 14630 14640

D S L D L P L R H S I R S M W P A L L G G T E P A G A  
acagcctcgacctgcccgtgcccacagcatccggctcgtgctggccggcgtgctggggcggcaccgaaccggcccggcgcg  
14650 14660 14670 14680 14690 14700 14710 14720

V T A A Q R S I A G E L P G V G R F L R D F H T E L A  
gtgacggccgcgacggctccatcgccggcgagctgcccggcgtcgccgggttcctcccgacttccataccgaactggc  
14730 14740 14750 14760 14770 14780 14790 14800

Q R L E P A P T F P V N A Y L R E T A E R V A A L G  
gcagcggctggaaccgcccggcggcgttcccgggtaaccgctacctcgccggagaccggcggcgggtggcgcgctgggg  
14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880

C R I S A D E R Y P R P V R E A V V A A L T G E L D Q  
gcccgatcagcggcagcaaacgttacccccggcgggtgcccggagggcgtgctgcccggcctgacccggcgaactggaccag  
14890 14900 14910 14920 14930 14940 14950 14960

A T T S A V R V P W P A G P S H G D L H L S H I L R R  
gccaccaccagcgggtgcccgggtccggtgcccggcccggcctgcccagcggcactgacactgctgcacatcctgcccg  
14970 14980 14990 15000 15010 15020 15030 15040

Q T P D G W R L C V I D L S T P A P D P A D P L G A  
gcagacaccggagcggctggcggctggtggtgatcagcctgtccacgcccggccccgacccggcggcaccgctcggcggc  
15050 15060 15070 15080 15090 15100 15110 15120

A Q S P W Q D L V A L L R G L E I F T A D E F V H Q A  
cccagtaccggtggcaggacctggtggcgtgctgcccgggctggagatcttcaccgcccagcaggttcggtcaccagggc  
15130 15140 15150 15160 15170 15180 15190 15200

A L R L G A D Q D D T C R T V L L I S A G Q T P D T P  
gccctgcccgtcggcggcaccagcagcacctgcccggaccgtgctgctgatcagtgccgggagaccccgacacggc  
15210 15220 15230 15240 15250 15260 15270 15280

G W T G S R L T A L R R M H D A A S V W A G Q V R R  
gggtggaccgggtcccggctcaccgctgcccgggatgcacgacggcggcgtcgggtggtggccggacaggtcccggga  
15290 15300 15310 15320 15330 15340 15350 15360

M L L S G Y A D G G E A A E E H P A W R I F R L R R L  
tgctgctgcccgttatgcccagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
15370 15380 15390 15400 15410 15420 15430 15440

L H E L D Y A Y A H D Q H Y H A A I N L R H V L Q T Y  
ttgcagaaactggactacgctacgcccacgaccagcactaccacggcggatcaaccttcgacacgtcctccagaccta  
15450 15460 15470 15480 15490 15500 15510 15520

Start AcbS -> M H I I E T Y F E C G G F D H R  
R P P V T G E S \* Stopp AcbU  
ccggcccgggtcaccggggagagctgagcacatgcacatcatcgagacgtacttcgaatgcccggcggcttcgaccaccgg  
15530 15540 15550 15560 15570 15580 15590 15600



F I Q G G T S V Y L W Q L S R G L A D L G H R V S I V  
ttcatccagggcgccacctcggtctatctctggcagctgtcgctggcctggccgacctgggacaccgggtctccatcgt  
15610 15620 15630 15640 15650 15660 15670 15680

T P A H G R L D D L R R L H E V E D L P G T D E Y E  
cacaccggcgccacggccgctggacgatctgcgcgggtgcacgaggtcgaggacctgcccggcaccgacgagtacgaac  
15690 15700 15710 15720 15730 15740 15750 15760

L P L V L D P R V W G E R F P A Q M D I A L R T T A H  
tgcgctggtgctcgaccgcgctgtggggcgcaacggttcccggcccagatggacatcgccctgaggaccaccggcgat  
15770 15780 15790 15800 15810 15820 15830 15840

R I R L A G V D L Y F L S N E L L D Q L P D R F Y P P  
cggatccggctggcgggctggacctgtacttctctcaacgaactgctcgatcagttgcccggaccgggtctatcccc  
15850 15860 15870 15880 15890 15900 15910 15920

Y E S K G V D L V F F K P L A Y Q V A A I R F I R S  
gtacgagagcaaggggtgatctggtctcttcaagccctcgctatcaggtggcggccatccggttcatcaggtcgc  
15930 15940 15950 15960 15970 15980 15990 16000

H F G D Q R A I V H A H E P F Y H Y L M P A A F A A D  
acttgcgtgaccagcgccgatcgtgcacgcacacgagccggttctaccactacctgatgcccggcgcctcgccgggac  
16010 16020 16030 16040 16050 16060 16070 16080

P A K H V V S T V Q S N M P I N K S V Y R A E V A R L  
ccggccaacacgtggtcagcagcgtgcagagcaacatgccgatcaacaagtcggtgtaccgggcccaggtggcggcgt  
16090 16100 16110 16120 16130 16140 16150 16160

L G F L G A P N A L P A D D P A G S R S P H T V A M  
gctcggcttctcggcgccccgaacgcgctgcccggcagatccggcccggcagccggttcgcccacaccgtggcgatga  
16170 16180 16190 16200 16210 16220 16230 16240

S Q Y Q Q L T H L H Y E Y P P D H V R V Y D L V A E H  
gccagtaccagcagctgaccacctgcactacgaatacccgccggaccacgtgcccgggtctacgacctggtggccgagcac  
16250 16260 16270 16280 16290 16300 16310 16320

A D R I D F L S P G H R D Y Y T C F A D T P F A Q L F  
gccgaccgatcgaacttctgtgcggggcaccgcgactactacacctgcttcgcccacacccggttcgcccagctggt  
16330 16340 16350 16360 16370 16380 16390 16400

A T L P V S R T V R R N A D K T F V G G C A V G D E  
cgccacctgcccgtgtgcgggacggtacggcgcaacgcggacaagacgttcgctggcggctgcccggctggtgacgagt  
16410 16420 16430 16440 16450 16460 16470 16480

W V T G E L P P V D R E K V L A G L G L D P D L P A F  
gggtgaccggcgagctgccccggtcgaccgggagaaggtgctggcgggctcggcctggaccggacctgccggccttc  
16490 16500 16510 16520 16530 16540 16550 16560

Y H N A R Y A V N H K G Q V E L I R A V D R V L S G G  
taccacaacggcggtacgggtcaaccacaagggcgaggtcgagctgatccgggcccgtgaccgggtgctgagcggcg  
16570 16580 16590 16600 16610 16620 16630 16640

V R A S F I V R C L S D A G I A D P L F H E V V A R  
cgtcggggccagcttcatcgtgcgctgcctcagcagcgggatccggaccgctcttccacgaggtggtggcccggc  
16650 16660 16670 16680 16690 16700 16710 16720

H P G R V N L E W H R V P E D Q L R E Y A R A A D F C  
accggggccgggtgaatctggagtgccaccgggtgcccggaggacctgcccggagtagccccgagcccggacttctgt  
16730 16740 16750 16760 16770 16780 16790 16800

L F P S K F E M D T F L I A Q G E A M A A G A V P I A  
ctcttcccgtccaagttcgagatggacaccttctgatgccaggggtgaggcgatggctgcccgggtgaggatccgatcgc  
16810 16820 16830 16840 16850 16860 16870 16880

T A Q L G M A H F G H V A D P L T G P D A A T A T G  
caccggccagctgggatggcgcaacttccggtcacgtgcggaccgctgaccgggcccggacggcggcagcggccaccggat  
16890 16900 16910 16920 16930 16940 16950 16960

F A V N R S F A E D D P L L V Q G L T E Q I R R A V T  
tcgccgtcaaccgctcgttcgcccaggacgatccgctgctggtccaggcctgaccgagcagatccggcggccgctcagc  
16970 16980 16990 17000 17010 17020 17030 17040

L W N E Q P G Q Y R R L S A N A V A R A R E F T W R R  
ctctggaacgagcagccccggccagtagccgcccgttgtccgccaacgcctcgccccgggcccgcgagttcacctggcggcg  
17050 17060 17070 17080 17090 17100 17110 17120

A A Q A H E A A F A G V W A G R T P R L P V G D L L  
ggcggcccaggcgcacgagggccggttcgcccgggtgtggcggccgctacccccgcctgcccgtcggtgacctgctgc  
17130 17140 17150 17160 17170 17180 17190 17200

R F G W F D E L P A D A W T L H R D E I A E V A L A H  
ggtcggctgggttcgacgagctgcccgcggacgctggacgctgcaccgcgacgagatcgcgaggtggcctggcccac  
17210 17220 17230 17240 17250 17260 17270 17280

G D A D A Y L R C R P D D L D A L A A L F E R A W A R  
ggcgacgcgacgctacgtcgctgcccggcccgcacacctgcagcccctggcggcactcttcgagcgggctggccccg  
17290 17300 17310 17320 17330 17340 17350 17360

A D F P A C A R T V E L A E E H R Q E R V P Q W R A  
ggcgactccccgcctcgcgcgacgacctagagctggcggaggacaccggcaggagcgggtgcgcgagtgccggggccc  
17370 17380 17390 17400 17410 17420 17430 17440

R L A G R G R I D R D G R L H Y R P P S A E R V E L V  
ggctcggccggc  
17450 17460 17470 17480 17490 17500 17510 17520

L P D L A E P L R G T V T V T A M A P T G D T F T G Q  
ttgcccgaacctggccgaacccctgcgcccgaacggtcaccgtgaccgagatggctccgaccggcgacaccttcaccggaca  
17530 17540 17550 17560 17570 17580 17590 17600

L P A G T R R A D L L L T L S D G R T V W D E V T A  
gctgcccggcgggaacccggcgtgcccggcctgctgctcacctcagtgacggcgaccctctgggacgaggtgacggcat  
17610 17620 17630 17640 17650 17660 17670 17680

\* **Stopp Acbs**  
S T G V R A V L L A G G E G R R M G A L G A G R L K  
gagcagggcggtacggggcgggtgctgctgcggggtggtgaggacggcggatgggagcgtcggcggcggcggcggcggcggc  
17690 17700 17710 17720 17730 17740 17750 17760

P L V P F G G A A R L I D F S L A N A R D S G L D Q V  
cgctgggtgcccgttcggggggcggcccggctgatcgactcagttcgtggccaatgcccgcgactccggcctggaccagggtg  
17770 17780 17790 17800 17810 17820 17830 17840

L L L S Q Y Q E R Q L M D D L R R T W W Q P G F R V H  
ctgctgctgctgcagtagtaccaggagcggcagctgatggacgacctcggcggcacctggggcagcgggggttcgggtgca  
17850 17860 17870 17880 17890 17900 17910 17920

F G P Y D R A Y T D G I P V E Y E P P T G P P E R G  
cttcggggcgtacgaccggcctacaccgacgggatccccgggtgagtagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
17930 17940 17950 17960 17970 17980 17990 18000

T A D A L I R K A P Y L F G P D V T E V L V Q H A D H  
ccgaggacgctgatccgcaaggccccctacctgttcggggcggatgtcaccgaggtgctgggtgacgacgcccgatcac  
18010 18020 18030 18040 18050 18060 18070 18080

V Y R F D Y R P M I A E H R A S G A A L T V S Y Q R I  
gtgtaccgttcgactaccggccgatgatcgccgagcaccgcgctccgggtgcccgttgaccgtgtcctaccagcggat  
18090 18100 18110 18120 18130 18140 18150 18160

D R R Y V H L F G M V E F D D R N R L V S F V E K P  
cgaccggcgggtacgtgcacctgttcgggatgggtcaggttcgacgaccgtaaccgtctggtctcgttcgtggagaagccccg  
18170 18180 18190 18200 18210 18220 18230 18240

A E P T S D L V F A A F C V F D A A V L H R Y L E L L  
ccgaaccgaccagcagcctgggtgttcgcccgttctcgctgttcgacgcccgggtgctgaccgctacctggaactgctg  
18250 18260 18270 18280 18290 18300 18310 18320

D G T D W Q H D I S R D V I P A M L A A G E H I R G C  
gacggcaccgactggcagcacgacatcagcccgcagctcatccccggcggatgctggcccggcggcagcacatcccgggctg  
18330 18340 18350 18360 18370 18380 18390 18400

P V P G Y W A D I G T V E R Y H E A H L S L V G T P  
ccccgtgcccggctactgggcccacatcggcaccgtcgcagcgtatcacaggccacacctgctcgtggtgggcacaccgc  
18410 18420 18430 18440 18450 18460 18470 18480

P S L A V D A M P W T V A P R T A R A L V T S A D G V  
cgtcgtgcccgtcgcagccatgcccgtggaccgtggcgcccggaccgcccgggactggtgacacccggcgcagcgtgtg  
18490 18500 18510 18520 18530 18540 18550 18560

R H S V V P A D L V N H G T V E R S V L F P A A R I G  
cggcacagtgtcgtaccggcggacactggtcaaccacggcaccgtcgcagcgcagcgtgctcttcccggcggcgcggatcgg  
18570 18580 18590 18600 18610 18620 18630 18640

P G A T V R D S V L L P G A V V P A G A E I D G A V  
gcccgccgcgcagcgtgcccgcagcgtggtgcccggcagcgtggtgcccggcggcggagatcgcagcggcgcagcgtg  
18650 18660 18670 18680 18690 18700 18710 18720

**Start AcbP -> M T G A V R A V R S R**  
V L E D G T V Q Q V T T G A R R \* **Stopp AcbR**  
tgctcgcaggaccgaccgtccagcaggtcaccaccggagcccggcgcagcggcgcagcgtcgggcccgtgcatcccgtg  
18730 18740 18750 18760 18770 18780 18790 18800

E V Y R N P W M S V R E D D I V H A D G S P G S Y G V  
agggtaccgcaaccggtggatgagcgtgcccgcagcagcaccatcgtgcacgcgcagcggctcggcggcagcgtacggggtc  
18810 18820 18830 18840 18850 18860 18870 18880

V T K P D Y A L I I P R D N G L L H L V E Q Y R Y P V  
gtcaccaaacccgattacgcgctgatcaccggcggacaacggcctgctgcacactggtggagcagcaccgctaccgggt  
18890 18900 18910 18920 18930 18940 18950 18960

G G R F W E F P Q G S W P A D A A G G A A D L L A R  
cggcgggcccgttctgggagttcccgcagggctcgtggcccggcgcagcggcggcgggctgcccgtgacactgctgcccgta  
18970 18980 18990 19000 19010 19020 19030 19040

T E L A E E T G L R A G R L T P L G R I H V A Y G Y A  
ccgagttggccgagggaccgggctgcccggcggcggcgtgacaccgctggggcgcacccagcgtcgcgtacggctacggc  
19050 19060 19070 19080 19090 19100 19110 19120

S Q G C H V F L A E Q L T A G R S Q R E R T E S D M R  
agccagggctgtcagcgtcttctgcccgaacagcctcacagcggggcgcgtctcagcgggagcgcaccgagcgcagcgtc  
19130 19140 19150 19160 19170 19180 19190 19200

Q R A V D A A G W A D L V G S G R I T D A A T L A A  
ccagcgtgcccgtggacggcggcggcgtggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
19210 19220 19230 19240 19250 19260 19270 19280

**Start AcbI -> M S F**  
Y T L L R M Y D S G T R Q P M P E G A E S C T W \* **Stopp AcbP**  
acaccctgctgcgatgtacgacagcggaaacgcagcagccatgcccgaaggagcgaatcgtgcagcgtggtgagccttcg  
19290 19300 19310 19320 19330 19340 19350 19360

A F E A L A F D V G M M R G G L A P L A W E L A R H Y  
cctcgaagccctgcctcgcagcgtagggatgatgcccggcggcgtcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
19370 19380 19390 19400 19410 19420 19430 19440

A A Q G H R S S I V T P A H G R L P Y L A E R Y D L V  
gcccggcggcaccgctcctcgcagcgtcaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
19450 19460 19470 19480 19490 19500 19510 19520

E L D Y R D E H V V P V V P D P D V W A G Q P R E L  
cgaactcgcactaccgggacgagcagcgtcgttcccgtggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
19530 19540 19550 19560 19570 19580 19590 19600

G L P L V T R A H L L R H E G V D I Y L L S D E Y L D  
gcctgcccctggtcaccgggcccacactgctgcccgcagcagggcgtcgcacatctacctgctcagcgcagcagcgtacactg  
19610 19620 19630 19640 19650 19660 19670 19680

L L P E R L Y P A G T S E G S D L A Y F K P L V F Q V  
ctgctgcccggagcggccttaccggc  
19690 19700 19710 19720 19730 19740 19750 19760

G G L R F L Q S R L A G D E P A V V Q A Y E P Y Y H  
cggcgggctgcccgttctcgcagcgtcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc  
19770 19780 19790 19800 19810 19820 19830 19840

```

Y L L P P V L A G D P R F R V M S T V A S S M P I D L
acctcctgccccgggtgctggccggcgaccgcggttccgggtgatgtccacggtggccagcagcatgccgatcgacctg
19850      19860      19870      19880      19890      19900      19910      19920

G V Y R P Q V D R L L E H F G A G T D L D R Y V E S P
ggtgtgtaccggccccaggtggaccgcctgctcagcacttcggcgccggcaccgacctggaccgctatgtggagagccc
19930      19940      19950      19960      19970      19980      19990      20000

V A A G A D H P A A T R E A A L G A A M A G Y L P T
ggtcggcgccggcgccgaccatcccgcggccaccgcgagggcgcgctgggcgcgcgatggccggatacctgccgacga
20010      20020      20030      20040      20050      20060      20070      20080

T R L S S G R R R A D Y V G L F A L I
cccggctctccagcggcgggcgggcgggccgactacgtgggcctgttcgcgctgatc
20090      20100      20110      20120      20130      2

```

### Anhang: DNA-Sequenz des Inserts des Phagen $\Phi 52$

Die in dieser Arbeit ermittelte DNA-Sequenz sowie die daraus abgeleiteten Gene und deren Aminosäuresequenz sind angegeben. Postulierte Ribosomenbindestellen sind unterstrichen. Die Sequenz des konservierten Hexanucleotids upstream von *acbV* ist sowohl fett gedruckt als auch unterstrichen. Die postulierten Signalpeptide der Proteine Asp52.1 und AcbZ sind grau hinterlegt. Die in der **Abb. 3.5.1** dargestellten terminalen *SstI*-Erkennungssequenzen (dort markiert durch den \*) sind nicht angegeben, da sie originär dem Polylinker des GEM12-Phagen entstammen.