

**Acarbose als Carbophor:  
Biochemische Charakterisierung Acarbose-resistenter  
 $\alpha$ -Glucosidasen und ihre Bedeutung für die Produzentenstämme**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)



Bergische Universität Wuppertal  
Chemische Mikrobiologie im Fachbereich C  
–Mathematik und Naturwissenschaften–

vorgelegt von  
Dipl. Biol. Nadine Merettig

Wuppertal  
November 2009

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20100200

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20100200>]



First people say it isn't true

Then people say it's true but not of importance

Finally they say it's true and important but not new

Peter Greenberg, ASM News 63

meinen Eltern

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>II</b>
<b>Summary</b> .....	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Gattungen <i>Actinoplanes</i> sp. und <i>Streptomyces</i> sp.....	1
1.2 Acarbose, Struktur und pharmakologische Bedeutung.....	4
1.3 Die Acarbose-Biosynthese-Gencluster von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 und <i>S. glaucescens</i> GLA.O.....	8
1.4 Die Acarbose-Biosynthese.....	11
1.5 Acarbosemetabolismus in <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 und <i>S. glaucescens</i> GLA.O...	15
1.6 Stärke und amylolytische Enzyme.....	17
1.7 Ziel dieser Arbeit.....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1 Material.....	21
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	21
2.1.2 Bakterienstämme.....	24
2.1.3 Vektoren und rekombinante Plasmide.....	25
2.1.4 Oligonukleotide.....	29
2.1.5 DNA-Längen- und Proteingrößenstandard.....	32
2.1.6 Medien.....	33
2.1.6.1 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	33
2.1.6.2 Medien zur Anzucht von Actinomyceten.....	36
2.1.7 Lösungen und Puffer.....	42
2.1.8 Antibiotika und Medienbestandteile.....	46
2.2 Zellbiologische Methoden.....	47
2.2.1 Anzucht von <i>E. coli</i> .....	47
2.2.2 Anzucht von Actinomyceten.....	47
2.2.3 Herstellung von Dauerkulturen und Sporensuspensionen.....	47
2.2.3.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	48
2.2.3.2 Herstellung und Transformation von <i>Streptomyces</i> sp. Protoplasten.....	48
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	49
2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	49
2.3.1.1 Allgemeine PCR-Bedingungen.....	49
2.3.1.2 RT-PCR.....	49
2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	50
2.3.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	50
2.3.4 Restriktion von Plasmid-DNA.....	50

2.3.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	50
2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten.....	50
2.3.7 Isolation von Plasmid-DNA.....	50
2.3.8 Isolation von Gesamt-RNA aus Streptomyceten.....	51
2.3.9 DNA Sequenzanalyse.....	51
2.3.9.1 Computeranalyse von Sequenzdaten.....	51
2.3.10 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> und <i>S. lividans</i> .....	52
2.3.10.1 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter der Kontrolle des T7-Promotors..	52
2.3.10.2 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> unter der Kontrolle des Promotors PrhaBAD.....	52
2.3.10.3 Heterologe Genexpression in <i>S. lividans</i> .....	53
2.4 Biochemische Methoden.....	54
2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten.....	54
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	54
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
2.4.4 Western-Blot und Immundetektion.....	54
2.4.5 Proteinreinigung.....	55
2.4.6 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Glycosylhydrolasen (GH13).....	55
2.4.6.1 Nachweis der enzymatischen Aktivität auf Stärkeplatten.....	56
2.4.6.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität durch Papierchromatographie.....	56
2.4.6.3 Nachweis der $\alpha$ -Amylase Aktivität durch Starch Azure.....	56
2.4.6.4 Nachweis der $\alpha$ -Amylase Aktivität durch Dinitrosalicylsäure.....	56
2.4.6.5 Glucose (GO) Assay.....	57
2.4.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von AcbQ.....	57
2.4.7.1 Herstellung der Acarbiosen-Homologen durch die AcbD-Reaktion.....	57
2.4.7.2 Phosphorylierung der Acarbiosen-Homologen durch die AcbK-Reaktion.....	58
2.4.7.3 Umsatz der Acarbose-Homologen durch AcbQ.....	58
2.4.7.4 Nachweis der AcbQ-Aktivität durch MacConkey-Platten.....	58
2.4.8. Affinitätschromatographie.....	59
2.4.9 Dünnschichtchromatographie (DC) .....	60
2.4.10 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) .....	61
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
3.1 Analyse der sekretierten Enzyme des Acarbosemetabolismus aus <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110.....	62
3.1.1 Charakterisierung des AcbZ Proteins aus <i>Actinoplanes</i> sp. ....	64
3.1.1.1 Optimierung der heterologen <i>acbZ</i> -Expression in <i>E. coli</i> und <i>S. lividans</i> .....	64
3.1.1.2 Analyse der $\alpha$ -Amylaseaktivität des AcbZ Proteins durch Starch Azure Enzymtests.....	66
3.1.1.3 Analytische Bestimmung von Carbohydraten durch HPLC-ECD.....	68

3.1.1.3.1 Bestimmung der $\alpha$ -Amylaseaktivität von <i>Bacillus</i> sp.....	70
3.1.1.3.2 Bestimmung der $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbZ.....	71
3.1.1.3.3 Bestimmung der Pullulanaseaktivität von <i>B. acidopullulyti</i> .....	73
3.1.1.3.4 Bestimmung der Pullulanaseaktivität von AcbZ.....	74
3.1.2 Charakterisierung des AcbE Proteins aus <i>Actinoplanes</i> sp.....	77
3.1.2.1 Optimierung der heterologen <i>acbE</i> -Expression.....	77
3.1.2.2 Charakterisierung des AcbE Proteins.....	79
3.1.2.2.1 Analyse der $\alpha$ -Amylaseaktivität des AcbE Proteins.....	79
3.1.2.2.2 Analyse der Pullulanaseaktivität von AcbE.....	80
3.1.3 Synthese der Acarbose-Homologen durch das AcbD Enzym.....	82
3.1.3.1 Überproduktion des AcbD Proteins.....	82
3.1.3.2 Nachweis der Enzymaktivität des AcbD Proteins durch DC.....	83
3.1.3.3 Nachweis der Enzymaktivität von AcbD durch HPLC-ECD.....	84
3.1.4 Phosphorylierung der Acarbose-Homologen durch das AcbK Enzym.....	89
3.1.4.1 Überproduktion von AcbK.....	89
3.1.4.2 Nachweis der Aktivität von AcbK durch nicht-radioaktiv-markierte Substrate..	90
3.1.4.3 Nachweis der Aktivität des AcbK Enzyms mit radioaktiv-markierte Substraten.....	91
3.1.4.4 Analyse der Phosphorylierung von Acarbose und der höheren Acarbose- Homologen mittels HPLC-ECD.....	92
3.1.5 Charakterisierung des AcbQ Protein.....	96
3.1.5.1 Überproduktion AcbQ.....	96
3.1.5.2 Analyse der Aktivität des AcbQ Proteins durch HPLC-ECD.....	97
3.1.5.3 Weitere Analysen zur Enzymaktivität von AcbQ: Umsatz von Maltooligosacchariden.....	102
3.2 Analyse Sekretierter Enzyme des Acarbosemetabolismus aus <i>S. glaucescens</i> .....	106
3.2.1 Charakterisierung des GacZ1 Proteins aus <i>S. glaucescens</i> .....	108
3.2.1.1 Überproduktion von GacZ1.....	108
3.2.1.1 HPLC-ECD-Analyse der $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacZ1.....	109
3.2.1.3 HPLC-ECD-Analyse der Pullulanaseaktivität von GacZ1.....	112
3.2.2 Charakterisierung des GacE2 Proteins aus <i>S. glaucescens</i> .....	114
3.2.2.1 Überproduktion von GacE2.....	114
3.2.2.2 Analysen zu der Aktivität des GacE2 Proteins.....	115
3.2.2.3 Analyse der Acarviosyltransferaseaktivität von GacE2.....	119
3.2.3 Charakterisierung des GacE1 Proteins aus <i>S. glaucescens</i> .....	120
3.2.3.1 Überproduktion von GacE1.....	120
3.2.3.2 Analysen zur Enzymaktivität des GacE1 Proteins.....	121
3.2.4 Charakterisierung des Gaim Proteins aus <i>S. glaucescens</i> .....	127
3.2.4.1 Überproduktion von Gaim.....	127
3.2.4.1 Analyse zur Aktivität des Gaim Proteins.....	127

<b>4. Diskussion</b> .....	<b>130</b>
4.1 Die Optimierung der heterologen Überexpression im genetischen Kontext.....	130
4.2 Die extrazellulären, amylytischen Enzyme der Acarboseproduzentenstämme <i>Actinoplanes</i> sp. und <i>S. glaucescens</i> .....	132
4.3 Die Enzymaktivitäten der extrazellulären, amylytischen Enzyme der Acarboseproduzentenstämme <i>Actinoplanes</i> sp. und <i>S. glaucescens</i> .....	137
4.4 Die intrazellulären, maltolytischen Enzyme der Acarboseproduzentenstämme <i>Actinoplanes</i> sp. und <i>S. glaucescens</i> .....	141
4.4.1 Die Acarbose-4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ von <i>Actinoplanes</i> sp.....	141
4.4.2 Die $\alpha$ -Glucosidase GacE1 von <i>S. glaucescens</i> .....	143
4.5 Die Bedeutung der Ergebnisse im Rahmen des bestehenden Modells zum Acarbosemetabolismus von <i>Actinoplanes</i> sp. und <i>S. glaucescens</i> .....	144
<b>5. Ausblick</b> .....	<b>148</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>149</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>161</b>
<b>Erklärung</b> .....	<b>162</b>



## Abkürzungsverzeichnis

A	Acarbose
Abb.	Abbildung
ABC	<i>engl.: ATP-binding cassette</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APR/ <i>apr</i>	Apramycin
APS	Ammoniumpersulfat
AS/ <i>aa</i>	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>engl.: bovine serum albumine</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>engl.: enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G2/Mal	Maltose
G3	Maltotriose
G4	Maltotetraose
G5	Maltopentaose
G6	Maltohexaose
G7	Maltoheptaose
GC	Guanin, Cytosin
Glc	Glucose
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kB	kilo Basen DNA
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
MBP	Maltosebindeprotein
MW	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
orf	<i>engl.: open reading frame</i>
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>engl.: polymerase chain reaction</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
WT	Wildtyp
X-Gal	5'-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-1-Galactopyranosid

Das Pseudotetrasaccharid Acarbose ist seit 1990 als kompetitiver Inhibitor intestinaler  $\alpha$ -Glucosidasen (Glucobay<sup>TM</sup>/Precose<sup>TM</sup>) in der medizinischen Anwendung bei der Therapie von Diabetes mellitus Typ-2. Charakteristisch für die Struktur der Acarbose ist die Acarviosyleinheit, bei der Valinamin und Desoxyglucose N-glycosidisch verknüpft sind; des Weiteren ist an die Acarviosyleinheit ein Maltosylrest gebunden. Der Inhibitoreffekt beruht auf der irreversiblen Bindung zwischen dem Enzym und der Acarviosyleinheit. Neben dem Acarbose-Biosynthese-Gencluster aus dem Gram-positiven Bakterium *Actinoplanes* sp. SE50/110 (ATCC 31044) (acb-Gencluster, Y18523), konnte in unserer Arbeitsgruppe ein weiteres Acarbose-Biosynthese-Gencluster aus *Streptomyces* sp. GLA.O (DSM 40716) (gac-Gencluster, AM409314) identifiziert werden. Sowohl im acb- als auch im gac-Gencluster sind neben den Genen, die für Enzyme der Acarbose-Biosynthese codieren, weitere Gene, die für ein Export- und Importsystem sowie für katabole Enzyme codieren, vorhanden. Die außergewöhnliche Proteinausstattung und auch der Befund, dass Maltose und Maltotriose als Induktoren der Synthese einiger Schlüsselenzyme des Acarbosemetabolismus fungieren, führten zu der Annahme eines Carbophor-Modells, welches die physiologische Bedeutung der Acarbose im Ökosystem der Produzentenstämme erklärte als einen integrierten intra- und extrazellulären hoch entwickelten Stärkemetabolismus, in dem Acarbose, neben der Inhibitorfunktion gegenüber Nahrungskonkurrenten zusätzlich, analog den Eisen-Siderophoren, eine Carbophor-Funktion als Kohlenhydrat-bindendes und -importierendes Molekül übernimmt. I

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Charakterisierung der extra- und intrazellulären amylytischen Enzyme der Acarboseproduzentenstämme *Actinoplanes* sp. und *Streptomyces* sp.. Die Optimierung der Proteinproduktion erfolgte in dem  $\alpha$ -Amylase-defizienten Stamm *S. lividans* TK24M2. Die biochemische Charakterisierung der Produkte, resultierend aus den Enzymtests, sowie die Charakterisierung der Kulturüberstände wurde mit einer, in dieser Arbeit entwickelten und etablierten neuen Methode zur Analyse von Maltooligosacchariden durch HPLC-ECD Analytik, durchgeführt. Die Enzyme AcbZ und AcbE aus *Actinoplanes* sp. sowie GacZ1 und GacE2 aus *S. glaucescens* konnten eindeutig als Acarbose-resistente, extrazelluläre  $\alpha$ -Amylasen identifiziert werden. Die Enzyme wurden auf ihre Substratspezifität analysiert und es zeigte sich, dass neben Stärke auch Pullulan von diesen Enzymen degradiert werden kann. Somit wurde bestätigt, dass *Actinoplanes* sp. und *Streptomyces* sp. in Gegenwart von Acarbose mithilfe dieser Enzyme in der Lage sind, Stärke und Pullulan zu hydrolysieren. Die intrazelluläre 4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ aus *Actinoplanes* sp. katalysiert die Deglucosylierung der intrazellulären phosphorylierten Acarbose-Homologen und hydrolysiert ebenso auch langkettige Maltodextrine. Die nur in *S. glaucescens* sp. vorkommende intrazelluläre  $\alpha$ -Glucosidase GacE1, ist auch Acarbose-resistent und katalysiert, analog zu AcbQ die Hydrolyse von Stärke und langkettigen Maltodextrinen. Das Carbophor-Modell konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die erzielten Daten eindeutig belegt werden.

The pseudotetrasaccharide acarbose has been used since 1990 as a  $\alpha$ -glucosidase inhibitor (Glucobay<sup>TM</sup>/Precose<sup>TM</sup>) for an efficient treatment of diabetes type II. The characteristic structure of acarbose consists of an acarviosyl-core. This pseudodisaccharide in which valinamine and a 6-deoxy-glucose are linked via an N-glycosidic bond is attached to a maltose unit. The inhibitory effect of acarbose on  $\alpha$ -glucosidases is based on the interactive binding of the enzymes to the acarviosyl-core. In addition to the well known acarbose biosynthesis gene cluster from *Actinoplanes* sp. SE50/110 (ATCC 31044) (*acb* gene cluster, Y18523), recently, a second gene cluster from *Streptomyces glaucescens* GLA.O (DSM 40716) (*gac* gene cluster, AM409314) was identified. The *acb* and the *gac* gene cluster both encode enzymes for the acarbose-biosynthesis as well as additional genes encoding for export and import systems and catabolic enzymes. The exceptional protein equipment and the finding that maltose and maltotriose were identified as inducers of the key enzyme production, lead to the proposal of a carbophor-model. This carbophor-model defines the physiological impact of acarbose inside the ecological system of the producer strains as an integrated intra- and extra cellular acarbose/starch metabolism, in which acarbose acts as an inhibitor for competitors in nutrition and in addition as a catcher for carbohydrates.

The exploratory focus of this dissertation was the characterization of the amylolytic enzymes of the producer strains *Actinoplanes* sp. and *Streptomyces glaucescens* GLA.O. The production of the proteins of interest was improved using the  $\alpha$ -amylase deficient strain *S. lividans* TK24M2. The biochemical characterization and the analysis of the pattern of the hydrolysates obtained with the different enzymes were determined by a new HPLC method, which was developed and established for analyzing oligosaccharides. The enzymes AcbZ and AcbE from *Actinoplanes* sp. and GacZ1 and GacE2 from *S. glaucescens* were clearly identified as acarbose-resistant extra cellular  $\alpha$ -amylases. The substrate specificities of the enzymes were characterized and it was shown that the enzymes were able to degrade starch and pullulan even in the presence of acarbose. The acarbose insensitive cytoplasmatic 4- $\alpha$ -glucanotransferase AcbQ from *Actinoplanes* sp. catalyzes the deglycosylation of the intra cellular phosphorylated acarbose-homologous and also hydrolyzes longer maltodextrines. The intra cellular  $\alpha$ -glucosidase GacE1, which is present only in *S. glaucescens* GLA.O, is also acarbose-resistant and catalyzes the hydrolysis of starch and maltodextrines. The data obtained close a further gap of the carbophor-model and finally proof the function of acarbose being the first carbophor.

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Gattungen *Actinoplanes* sp. und *Streptomyces* sp.

Die Bakterien der Gattung *Actinoplanes* sp. und *Streptomyces* sp. sind systematisch in die Abteilung der Actinobacteria und in die Ordnung der Actinomycetales einzuordnen. Die Actinomyceten verhalten sich Gram-positiv, sind meist strikt aerob und zeichnen sich durch ein filamentöses Wachstum unter Bildung eines Substratmycel aus (Waksman & Henrici, 1943). Sie stellen einen wesentlichen Bestandteil der Bodenmikrobiözönose dar und nur wenige Arten leben aquatisch. Innerhalb der Ordnung Actinomycetales kommt es zur Ausbildung charakteristischer Formen und Strukturen, die zur Klassifikation der Gattung herangezogen werden können. Die Gattung *Streptomyces* sp. zeichnet sich durch einen charakteristischen Lebenszyklus aus, der mit dem Auskeimen der Sporen auf festem Nährboden beginnt. Ausgehend von einem Substratmycel kommt es zur morphologischen Differenzierung zu einem Luftmycel, ausgelöst z. B. durch Nährstoffmangel. An den Enden der Lufthyphen entstehen durch Septierung, artspezifisch geformte Sporophore. Durch Abschnürung werden dann die Konidien, die der Verbreitung dienenden Sporen, freigesetzt (Kieser *et al.*, 2000). Charakteristisch für die Gattung *Actinoplanes* sp. ist, dass ein verzweigtes Substratmycel gebildet wird und selten ein Luftmycel. *Actinoplanes* sp. kommt sowohl im aquatischen als auch im terrestrischen Habitat vor. Die meist beweglichen Sporen entstehen in Sporangien. Die Sporen werden aus einem reifen Sporangium, z. B. durch den Kontakt mit Wasser entlassen und beginnen umgehend sich aktiv fortzubewegen (Parenti & Coronelli, 1979). Ein weiteres gattungsspezifisches Merkmal ist die Unempfindlichkeit gegenüber der N-Acetylmuramidase Lysozym, bedingt durch die Substitution innerhalb der Peptidoglycanstruktur von N-Acetylmuraminsäure durch N-Glycolylmuraminsäure (Vobis, 1989). Des Weiteren besteht die Zellwand aus *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure, LL-2,6-Diaminopimelinsäure und/oder aus Hydroxy-diaminopimelinsäure sowie Glycin und gehört somit zum Zellwandtyp II (Lechevalier & Lechevalier, 1970). Zur näheren phylogenetischen Stammbaumanalyse der Ordnung der *Actinomycetales* wurden 16S rRNA-Vergleiche durchgeführt (Embley & Stackebrandt, 1994; Mehling *et al.*, 1995). Diese führten zu der taxonomischen Einordnung von *Actinoplanes* sp. in eine eigene Gattung sowie die Einordnung in die Familie der Micromonosporaceae; die höchste Übereinstimmung weist *Actinoplanes* sp. mit *Frankia* sp. und *Micromonospora chalcea* auf (Wellington *et al.*, 1992; Mehling *et al.*, 1995a, b; Tamura & Hatano, 2001).

Über 90% der aus dem Boden isolierten Actinomyceten gehören zu der Gattung der Streptomyceten, die unter anderem für den typischen Erdgeruch verantwortlich sind, der auf die Bildung und Sekretion von Geosmin zurückzuführen ist (Gerber & Lechevalier, 1965). Die ökologische Bedeutung der Actinomyceten liegt vor allem in der Kompostierung organischer Abfälle. Die Bakterien sind in der Lage die Maximierung der Nutzbarmachung des Nahrungsangebotes, durch eine Vielzahl an

sekretierten hydrolytisch aktiven Enzymen, wie z. B. Proteasen, Peptidasen, Ligninasen, und Lipasen umzusetzen (Parenti & Coronelli, 1979; Piepersberg, 1993). Ebenso sind Actinomyceten Produzenten wertvoller bioaktiver Naturstoffe. Zwei Drittel der meisten Antibiotika, die in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, sind Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. Das breiteste Spektrum an industriell produzierten Wirkstoffen weisen dabei die Streptomyceten auf (Piepersberg, 1993; Kieser *et al.*, 2000). Dabei seien die wichtigsten Stoffgruppen erwähnt: Aminoglycosid-Antibiotika (AGA), wie z. B. Streptomycin (Jones *et al.*, 1944; Waksman, 1965), Makrolid-Antibiotika wie z. B. Erythromycin (Woodward, *et al.*, 1981), Glycopeptid-Antibiotika wie z. B. Teicoplanin (Bardone, *et al.* 1978), Tetracycline sowie Chloramphenicol. Viele Actinomyceten sind zur Synthese strukturell verschiedener Naturstoffe, die über unterschiedliche Biosynthesewege aufgebaut werden, befähigt. So produziert *S. glaucescens* neben Hydroxystreptomycin auch Tetracenomycine, ein Gemisch lipophiler Antibiotika, deren Hauptkomponente Tetracenomycin C darstellt (Hütter, 1967; Weber *et al.*, 1979). Es werden aber auch weitere Wirksubstanzen wie z. B. Cytotoxine, Immunsuppressiva, antivirale Stoffe, Antihelminthika, Fungizide, Herbizide; aber auch Sekundärmetabolite wie z. B. Pigmente (Melanin) oder das Biotinbindende Protein Streptavidin (Williams, *et al.*, 1986; Hofmann, 1980; Piepersberg *et al.*, 2002) von Actinomyceten produziert. Auch die Gattung *Actinoplanes* sp. ist als Produzent antibakterieller wirksamer Sekundärmetabolite, wie z. B. Teicoplanin, Purpuromycin und Friulimicin B bekannt (Bardone *et al.*, 1978; Rambelli *et al.*, 1989; Schneider *et al.*, 2009). Auch der hitze- und säurestabile  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Acarbose konnte aus der Kulturbrühe von verschiedenen Vertretern der Gattung *Actinoplanes* sp. zuerst isoliert werden (Schmidt *et al.*, 1977).

Über die Bedeutung der Sekundärmetabolite für die Produzentenstämme und deren Umwelt ist bisher wenig bekannt, dahingegen ist die pharmazeutische Wirksamkeit der Substanzen weiterhin von großem Interesse. Die chemische Ökologie von Actinomyceten ist durch die Interaktion mit anderen Organismen durch Sekundärmetabolite, die wahrscheinlich als chemische Signale zur Koordination von Reaktionen auf die Umwelt wirken, gekennzeichnet. Die Sekundärmetabolite könnten dabei der chemischen Kommunikation dienen und eine wesentliche Rolle bei der Informationsweitergabe zwischen verschiedenen Zellen einer Art und auch zwischen verschiedenen Organismen innerhalb einer Biozönose spielen (Piepersberg *et al.*, 2002). Da es vor allem in der späten Wachstumsphase der Actinomyceten zur Produktion von Sekundärmetaboliten kommt, die antibiotisch bzw. fungizid wirksame Metabolite darstellen, könnten diese zum Schutz vor Nahrungskonkurrenten während der Sporulation oder der späten Sporenkeimung gebildet werden (Chater & Merrick, 1979; Piepersberg *et al.*, 2002). Eine weitere Annahme ist, dass die Sekundärmetabolite, z. B. der Antibiotikabiosynthese bzw. der Exopolysaccharidsynthese, möglicherweise der (intergenerischen) Zell-Zell-Kommunikation (*quorum sensing*) dienen könnten (Piepersberg, 1992, 1993, 2002; Schauder & Bassler, 2001). Oftmals leben Actinomyceten mit Pflanzen in Symbiose, während einige

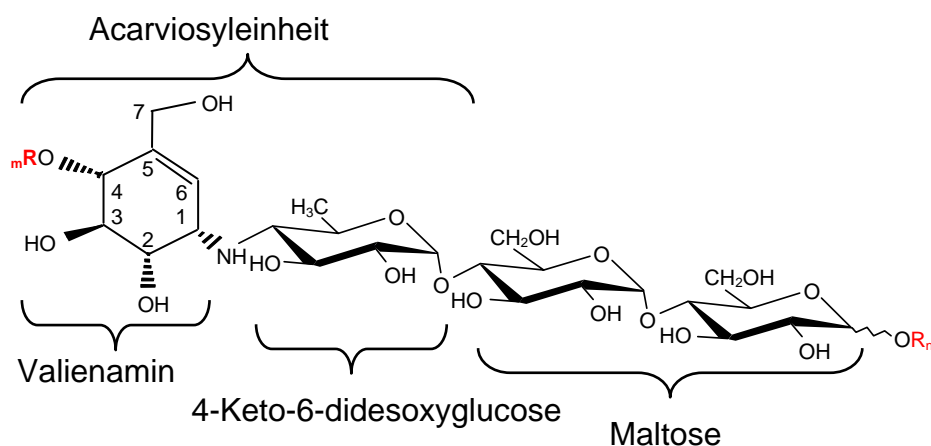
Streptomyceten auch in Symbiose mit Blattschneiderameisen des Tribus Attini leben, die sich die antibakterielle oder fungizide Wirkung bestimmter Stoffwechselprodukte der Streptomyceten zunutze machen (Cameron *et al.*, 1999; Haeder *et al.*, 2009). Darüber hinaus interagieren Actinomyceten mit anderen Mikro- und Makroorganismen. Streptomyceten sind nur selten Krankheitserreger; die Stämme *S. somaliensis* und *S. sudanesis* sind humanpathogen, während *S. scabies* phytopathogen wirkt und den sogenannten „Kartoffelschorf“ verursacht.

Eine Besonderheit der Actinomyceten stellt das lineare Chromosom dar (Dharmalingam & Cullum, 1996; Kolsto, 1997; Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2008). An dem 5'-Ende des Chromosoms befinden sich kovalent gebundene Proteine (Lin *et al.*, 1994; Pandza *et al.*, 1997) sowie zwei terminal invertierte Sequenzen (TIRs), die eine Größe zwischen 24 und 550 Kb aufweisen können (Lezhava *et al.*, 1995). Über Wechselwirkungen dieser Proteine mit den TIR-Sequenzen werden die beiden Enden verknüpft, sodass das Chromosom circulär erscheint (Dharmalingam & Cullum, 1996). Die Replikation erfolgt, ausgehend von dem Replikationsstart (*oriC*) in der Mitte des linearen Chromosoms (Core-Region) bidirektional (Zakrzewska-Czerwinska & Schrempf, 1992; Musialowski *et al.*, 1994; Redenbach *et al.*, 1996). Die Gene des Primärstoffwechsels sind zentral in Nähe des *oriC* angeordnet, während sich die Gencluster für Sekundärmetabolite eher an den terminalen Bereichen des linearen Chromosoms befinden (Martin & Liras, 1989; Malpartida & Hopwood, 1984). Treten Deletionen an beiden Telomeren auf, kann das Chromosom durch Rekombination geschlossen werden, dabei ist eine Replikation weiterhin möglich (Redenbach *et al.*, 1993). Die Genome der *Streptomyceten* sind genetisch relativ instabil; bei 0,1% der Sporen konnten Mutationen nachgewiesen werden (Leblond & Decaris, 1994). Die genetische Instabilität kann zu einem veränderten Phänotyp führen, sodass es unter anderem zu Ausbildung von Antibiotika-Resistenzen, zur Änderung der morphologischen Differenzierung oder zur Änderung der Produktion von Sekundärmetaboliten kommen kann (Volf & Altenbuchner, 1998). Der horizontale Gentransfer trägt ebenso dazu bei, dass es zum Austausch genetischer Informationen über, z. B. Antibiotika-Biosynthesewege kommt (Volf & Altenbuchner, 1998; Piepersberg *et al.*, 2002).

Die genomische DNA der Actinomyceten zeichnet sich durch einen sehr hohen GC-Gehalt aus; dieser liegt bei *Actinoplanes* sp. bei 70-73% und bei *Streptomyces* sp. bei durchschnittlich 72% (Farina & Bradley, 1970; Wright & Bipp, 1992). Erste Analysen der genomischen DNA des Stammes *Actinoplanes* sp. SE50/110, der in dieser Arbeit verwendet wurde, weisen einen GC-Gehalt von 71,9% auf, das Genom umfasst 9,2 Mb (ca. 8100 Gene) und liegt wahrscheinlich auch linear vor (Wehmeier, persönliche Mitteilung). Die Genome von *S. coelicolor* A3(2), *S. avermitilis* MA-4680 und *S. griseus* IFO 133350 sind mittlerweile vollständig sequenziert und mit einer Größe von 8-10 Mb etwa doppelt so groß, wie das von *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2008).

## 1.2 Acarbose, Struktur und pharmakologische Bedeutung

Das Pseudotetrasaccharid Acarbose wurde Ende der 1960er erstmals als Produkt des Stammes *Actinoplanes* sp. aus der Bodenprobe einer Kaffeeplantage in Kenia isoliert und identifiziert (Schedel, 2006). Charakteristisch für die Struktur der Acarbose ist die Acarviosyleinheit, die als Pseudodisaccharid aus dem ungesättigten Aminocyclitol Valienamin N-glycosidisch mit einer 4,6-didesoxyglucose verknüpft ist (Müller *et al.*, 1980; Piepersberg & Distler, 1997). Die 4-Amino-4,6-didesoxyglucose ist mit einem Maltosylrest  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verbunden. Acarbose zählt aufgrund seiner Struktur zu den Aminoglycosid-Antibiotika, ist antibiotisch allerdings nicht aktiv (Wehmeier & Piepersberg, 2002). Acarbose stellt eine neue Wirkstoffklasse der Enzyminhibitoren dar.



**Abb. 1.1: Struktur der Acarbose.** In Anlehnung an die Nomenklatur der Kohlenhydrate werden das anomere Zentrum der 4-Amino-4,6-dideoxyglucose bzw. der Glucose und die Position C-4 des Valinamins auch als reduzierendes ( $R_n$ ) bzw. als nicht-reduzierendes Ende ( $R_m$ ) der Acarviosyleinheit bezeichnet. Die höheren Homologen setzen sich aus weiteren Zuckerresten zusammen, dabei kann die Summe der Reste  $R_n$  und  $R_m$  Werte zwischen 1 und 30 annehmen.

Acarbose wird weltweit zur Therapie des Diabetes mellitus Typ-2 als orales Antidiabetikum (Glucobay<sup>®</sup>) eingesetzt (Wehmeier & Piepersberg, 2004). Als kompetitiver Hemmer von Hydrolasen inhibiert Acarbose die  $\alpha$ -Glucosidasen, vornehmlich Maltasen und Saccharasen im Bürstensaum des Darmepithels, vermindert die intestinale Glucoseaufnahme und bewirkt über die verzögerte Resorption der Glucose, eine Reduktion des postprandialen Blutzuckerspiegels (Puls & Keup, 1973; Bischoff, 1994). Acarbose greift somit nur indirekt in die Glucoseaufnahme ein; Acarbose selbst weist eine Resorptionsquote von <2% auf (Lüllmann *et al.*, 2006). Die bisher beobachteten Nebenwirkungen (Meteorismus, Borborygmus, Diarrhöe) entstehen durch das Verbleiben von Oligosacchariden im Darm und deren Vergärung (Lüllmann & Hein, 2006). Acarbose greift wirksam in den pathologischen Glucosestoffwechsel ein, um somit nebenwirkungsarm dem

Fortschreiten der Erkrankung mit frühzeitiger Entwicklung von diabetischen Folgeschäden entgegenzutreten.

Durch Acarbose werden hauptsächlich Hydrolasen inhibiert, die  $\alpha$ -1,4-glycosidische Verbindungen spalten, da die N-glycosidische Bindung der Acarviosyleinheit im Gegensatz zu den  $\alpha$ -1,4-O-glycosidischen Bindungen durch das aktive Zentrum der  $\alpha$ -Glucosidasen nicht hydrolysiert werden kann (Brayer *et al.*, 2000). Das Pseudotetrasaccharid simuliert den Übergangszustand der Spaltung eines Oligosaccharides und wird deshalb auch als *transition-state-analogue* bezeichnet. Acarbose agiert somit als *Prodrug*. Die Bindung an das Enzym (Enzym-Inhibitor-Komplex) ist stärker als bei natürlichen Substraten, was letztlich zur Inhibierung führt (Habermehl, 2008).

Bestimmte  $\alpha$ -Amylasen, z. B. die  $\alpha$ -Amylase des Pankreas des Menschen (HPA) oder die maltogene  $\alpha$ -Amylase Novamyl generieren aus Acarbose effizientere Inhibitoren. So wird z. B. Acarviosylglucose auf das nicht-reduzierende Ende eines zweiten Acarbosemoleküls übertragen oder eine weitere Maltoseeinheit wird mit dem nicht-reduzierende Ende der Acarbose verknüpft (Nahoum *et al.*, 2000).

Die Wirkungsweise der Acarbose als Inhibitor von  $\alpha$ -Glucosidasen wurde vor allem durch kristallografische Studien aufgeklärt (Qian *et al.*, 1994; Gilles *et al.*, 1996; Machius *et al.*, 1996). Die Hemmung der humanen  $\alpha$ -Amylase und der  $\alpha$ -Amylasen aus *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* sowie die der  $\alpha$ -Amylase aus der Bauchspeicheldrüse des Schweines (PPAII) wurde bereits gezeigt (Müller, 1986; Truscheidt *et al.*, 1981; Brayer *et al.*, 2000; Kagawa *et al.*, 2003). Heute findet Acarbose weitere Anwendung in der Strukturbiologie; aufgrund der Ausbildung von sehr stabilen Enzym-Inhibitor-Komplexen kann Acarbose zur Aufklärung der Kristallstrukturanalyse von  $\alpha$ -Glucosidasen eingesetzt werden (Dauter *et al.*, 1999; Nahoum *et al.*, 2000). Acarbose kann ebenso zur Reinigung von  $\alpha$ -Glucosidasen als Ligand in der Affinitätschromatografie eingesetzt werden (Ono & Smith, 1986; Tessier *et al.*, 1996).

Neben einer Reihe von Acarbose-Derivaten, die sich in der Anzahl der am reduzierenden ( $R_n$ ) oder nicht-reduzierenden ( $R_m$ ) Ende der Acarviosyleinheit bzw. an dem Maltosylrest verknüpften Glukoseeinheiten unterscheiden, produziert *Actinoplanes* sp. auch Komponenten mit Variationen des terminalen Zuckerrestes (Fruktose, Mannose) und der Art der terminalen glycosidischen Bindung (-1,1-; s. Tab. 1.1) (Hemker *et al.*, 2001). Die Komponente C (s. Tab. 1.1) spielt in der industriellen Produktion eine wesentliche Rolle, da selbst durch hoch entwickelte Verfahren, das gereinigte Endprodukt weiterhin 2% an Verunreinigung enthält (Wehmeier & Piepersberg, 2002).

Die Anzahl der Zuckerreste variiert in Abhängigkeit von der vorhandenen Kohlenstoffquelle und kann Werte zwischen eins und 30 annehmen. In Maltose und Glucose-haltigem Medium werden die niedermolekularen Homologen gebildet, während bei dem Zusatz schon geringer Mengen von Stärke der Anteil an höhermolekularen Komponenten zunimmt (Frommer *et al.*, 1979; Schmidt *et al.*,



1977). Die Acarbose-Produktion ist positiv durch Maltooligosaccharide reguliert, während Glucose sich negativ auswirkt (Frommer *et al.*, 1975, 1977a + b; Rauenbusch & Schmidt, 1978; Stratmann, 1997).

Das Wirkspektrum der Acarbolederivate gegenüber den intestinalen  $\alpha$ -Glucosidasen ist abhängig, von der Anzahl der Glucosereste an der Acarviosyleinheit. Die niedermolekularen Homologen, z. B. Komponente 2 und Acarbose, zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, Disaccharidasen zu inhibieren, während die höher molekularen Komponenten wesentlich effizienter  $\alpha$ -Amylasen hemmen (Müller *et al.*, 1980). Nicht betroffen sind hingegen die Enzyme Trehalase, Lactase, Isoamylase,  $\beta$ -Amylase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Galactosidase und Pullulanase sowohl mikrobieller als auch pflanzlicher Herkunft.

**Tab. 1.1: Acarbose, Acarbose-Homologe und Derivate (Hemker *et al.*, 2001)**

Bezeichnung	Struktur
Acarbose (Komponente 3)	Acarviosyl-1-4-Glc-1-4-Glc
Komponente A	Acarviosyl-1-4-Glc-1-4- <b>Fru</b>
Komponente B	Acarviosyl-1-4-Glc-1-4- <b>(1-<i>epi</i>-Valienol)</b>
Komponente C	Acarviosyl-1-4-Glc-1-4- <b>1-Glc</b>
Komponente D	Acarviosyl-1-4-Glc-1-4- <b>Man</b>
Komponente 2	Acarviosyl-1-4-Glc
Komponente 3 (Acarbose)	Acarviosyl-1-4-Glc-1-4-Glc
Komponente 4a	Acarviosyl-1-4-Glc-1-4-Glc-1-4- <b>Fru</b>
Komponente 4b	Acarviosyl-1-4-Glc-1-4-Glc-1-4- <b>Glc</b>
Komponente 4c	Acarviosyl-1-4-Glc-1-4-Glc-1-4- <b>1-Glc</b>

Die strukturellen Unterschiede zur Acarbose sind fett gekennzeichnet. Als Position 1 wird die Position C-1 der 4,6-didesoxyglucose der Acarviosyleinheit bezeichnet. Glc = Glucose; Fru = Fructose; Man = Mannose.

Das Cyclitol Valienamin ist ebenso Bestandteil des Antibiotikums Validamycin A aus *S. hygrosopicus var. limoneus* (Iwasa *et al.*, 1970; Mahmud & Floss, 2001). Validamycin wurde in der Literatur als erster Glucosidaseinhibitor mit einem C7-Cyclitol beschrieben (Iwasa *et al.*, 1970). Weitere Sekundärmetabolite, die Derivate des C7-Cyclitols Valienamin darstellen, sind z. B. Amylostatine, Adiposine, Oligostatine, Trestatine (Murao, 1975; Murao & Ohyama, 1975; Namiki *et al.*, 1982; Omoto *et al.*, 1981; Yokose *et al.*, 1983).

Validamycin A inhibiert im Gegensatz zu den übrigen Verbindungen 1,1-glycosidische Bindungen spaltende Enzyme (Junge *et al.*, 1980). Anwendung findet Validamycin A vor allem als Pflanzenschutzmittel gegen den Pilz *Rhizoctonia solani*, es wirkt aber auch als Insektizid. In beiden Fällen beruht die Wirkung auf der Inhibierung von Trehalasen (Asano *et al.*, 1990; Piepersberg, 1997; Mahmut *et al.*, 2007). Das Screening von Kulturüberständen verschiedener Actinomyceten führte zur Identifizierung weiterer  $\alpha$ -Glucosidaseinhibitoren, die in ihrer Struktur Ähnlichkeit zur Acarbose aufweisen. Aus *S. dimorphogenes* sp. wurden, z. B. die Trestatine A-C

isoliert, die als Gemeinsamkeit zur Acarbose ein bis drei Acarviosyleinheiten aufweisen und im Weiteren aus endständigen Trehaloseresten bestehen (Watanabe *et al.*, 1984). Die Trestatine wirken allerdings nur auf Trehalasen inhibierend. Zwei weitere mögliche  $\alpha$ -Amylaseinhibitoren, die eine Strukturähnlichkeit zu Oligosacchariden aufweisen und die Acarviosyleinheit innehaben, wurden aus dem Kulturmedium von *S. coelicoflavus* ZG0656 isoliert (Geng *et al.*, 2007).

Die Optimierung der Acarboseproduktion des Wildstammes *Actinoplanes* sp. durch klassische Mutation und die Auswahl höher produzierender Mutanten ermöglichte es, die Produktausbeute an Acarbose um das 500-Fache im Vergleich zum Wildtyp zu steigern (Schedel, 2006). Mittlerweile wird Acarbose mit einem Hochleistungsstamm, der auf *Actinoplanes* sp. SE50/110 (ATCC 31044) zurückgeht, in einem Fermentationsmaßstab von 80000 l produziert, dabei liegt die optimale Menge des Endproduktes bei 20-30 g/l (Wehmeier, persönliche Mitteilung). Das Medium besteht aus einem Stärkehydrolysat von >10%. Die großtechnische Fermentation von Acarbose ist als *Fed-Batch*-Prozess etabliert und dauert inklusive der Aufarbeitung etwa zwei bis drei Wochen. Die Isolierung des Wirkstoffes aus der Fermentationslösung erfolgt mit spezifischen Chromatographieverfahren und liefert ein hochreines Produkt (Schedel, 2006). Mit Glucobay wurden von Bayer HealthCare, Wuppertal-Elberfeld im vergangenen Jahr in Deutschland 35 Millionen Euro umgesetzt; weltweit lag der Umsatz bei 287 Millionen Euro.

### 1.3 Die Acarbose-Biosynthese-Gencluster von *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *S. glaucescens* GLA.O

Bis Anfang 1990 war wenig über die Sekundärmetabolit-Biosynthesegene von Actinomyceten bekannt und es existierten bis dahin auch keine Sequenzdaten von *Actinoplanes* sp.. Mithilfe des dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gens *strE* aus *S. griseus* (DSM 40236), das erfolgreich als heterologe Gensonde eingesetzt wurde, konnten Dehydratasegene in Actinomyceten detektiert werden (Stockmann & Piepersberg, 1992). Da die Syntheseschritte für diesen Zucker in allen Biosynthesen identisch sind, wurde angenommen, dass homologe Gene auch im *acb*-Gencluster vorkommen. So konnte auch durch die *strE* Gensonde über Hybridisierung im Chromosom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 das *acbB* Gen identifiziert werden, das für eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase der Acarbose-Biosynthese codiert (Stratmann, 1997). Da die Produktion von Sekundärmetaboliten meist in Genclustern organisiert ist, wurden die benachbarten DNA-Sequenzen kloniert, sequenziert und analysiert. Dabei wurde das *acb*-Gencluster aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 (Y18523) identifiziert (Stratmann, 1997; Wehmeier, 2003; Wehmeier & Piepersberg, 2004) (Abb. 1.2).

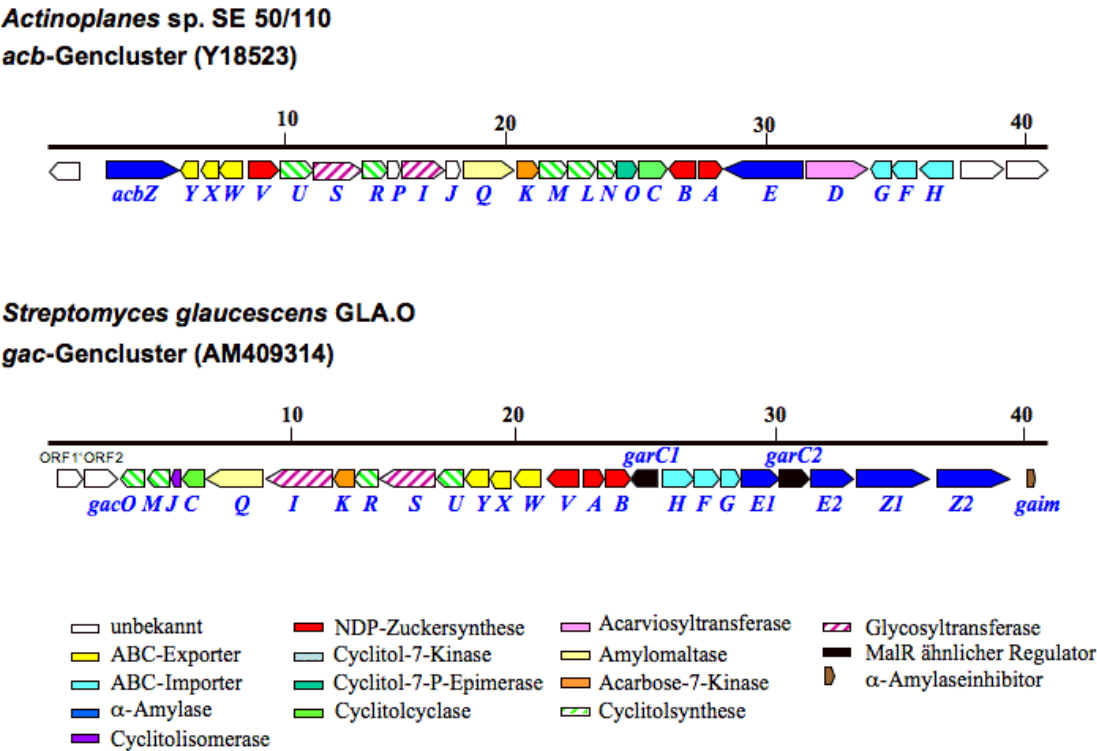
Das *acb*-Gencluster umfasst 25 Gene und setzt sich aus acht Transkriptionseinheiten zusammen, von denen drei als Operons agieren. Die Gene *acbVUSRPIJQKMLNOC* codieren Proteine, die, bis auf AcbQ und AcbK in die Acarbose-Biosynthese involviert sind. Das Gen *acbV* codiert wahrscheinlich für eine Aminotransferase vom Typ III. AcbS und AcbI gehören zu der Familie der Glycogen- und Saccharosesynthasen, während AcbR wahrscheinlich an der NDP-Polyol-Synthese beteiligt ist (Wehmeier & Piepersberg, 2004). Den Genprodukten AcbU, AcbP und AcbJ konnte bislang keine Funktion eindeutig zugewiesen werden. Die Gene *acbM*, *acbL*, *acbO* und *acbC* codieren die Enzyme 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon-7-Kinase, 2-*epi*-Valiolon-7-Phosphat-1-Reduktase, 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon-7-Phosphat-2-Epimerase und die C7-Cyclitolcyclase (2-*epi*-5-*epi*-Valiolon-Synthase) (Stratmann, 1997, *et al.* 1999; Zhang *et al.*, 2002, 2003). Bei dem AcbN Genprodukt handelt es sich wahrscheinlich um eine Oxidoreduktase, die die Reaktion zu 1-*epi*-Valiolon-7-Phosphat katalysiert. Das AcbQ Genprodukt weist signifikante Ähnlichkeit zu einer 4- $\alpha$ -Glucanotransferase (Amylomaltase) aus *S. coelicolor* A3(2) auf. AcbQ ist wahrscheinlich am intrazellulären Maltooligosaccharidmetabolismus beteiligt. Das *acbK* Gen codiert für die Acarbose-7-Kinase.

Die Gene *acbA* und *acbB* sind an der 6DOH-Synthese beteiligt und liegen benachbart, allerdings divergent orientiert als Transkriptionseinheit im Gencluster vor. Auch die Gene *acbD* und *acbE*, die für die Acarviosyltransferase und eine  $\alpha$ -Amylase codieren, sind divergent orientiert. Die Transkription steht wahrscheinlich unter der Kontrolle eines Reg1-ähnlichen Proteins, das mit einem sogenannten DS-Element (*dyad symmetry element*) interagiert (Virolle & Gagnat, 1994; Wehmeier & Piepersberg, 2004). Die Hexanucleotidsequenz 5' C/ATTGCT/A 3', die eine mögliche

Erkennungssequenz für positive Transkriptionsregulatoren der MalR-Familie darstellt (Schlosser *et al.*, 2001), findet sich in den intercistronischen Bereichen zwischen den Genen *acbA-acbB* und *acbD-acbE*. Eine deutliche Übereinstimmung mit Consensus-Sequenzen der -35 und -10 Regionen der *E. coli*  $\sigma^{70}$ -ähnlichen Promotoren ist upstream der Gene *acbD* und *acbE* vorhanden. Eine mögliche RBS konnte ebenfalls upstream des *acbD* Gens identifiziert werden (Stratmann, 1997). Maltose-Boxen sind bei MalT-abhängigen Promotoren in *E. coli* beschrieben worden, deren Transkription positiv reguliert ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression durch Maltoligosaccharide induziert wird (Stratmann, 1997, Wehmeier 2004; Wehmeier & Piepersberg, 2004).

Die für zwei ABC-Transportsysteme codierenden Gene *acbWXY* und *acbFGH* stellen zwei weitere Operons des *acb*-Genclusters dar. Die Proteine AcbFGH sind typische Vertreter der Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporter, allerdings wie bei Gram-positiven Bakterien üblich, ohne ATP-hydrolysierende Einheit. Es konnte gezeigt werden, dass das AcbH Protein Acarbose bindet (Brunkhorst *et al.*, 2005).

Das *acbZ* Gen codiert für eine  $\alpha$ -Amylase, die wahrscheinlich, ebenso wie AcbE und AcbD in den extrazellulären Acarbosemetabolismus involviert ist. Diese Enzyme besitzen die typischen N-terminalen Signalpeptid-Motive sekretierter Proteine und zeigen signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen der Familie 13 der Glycosidhydrolasen auf.



**Abb. 1.2: Die Acarbose-Biosynthese-Gencluster aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *S. glaucescens* GLA.O.** Beide Cluster enthalten Gene sowohl für die intrazelluläre Acarbose-Biosynthese als auch für die Carbophor-Funktion der Acarbose. Das Modell führt zu einem intra- und extrazellulären Acarbosemetabolismus (Rockser & Wehmeier, 2009).

Bei einem Screening nach  $\alpha$ -Amylaseinhibitoren aus verschiedenen Organismen wurde entdeckt, dass auch *S. glaucescens* GLA.O (DSM 40716) Acarbose und homologe Substanzen produziert. Durch Hybridisierung wurden fünf Gene identifiziert, die möglicherweise Teil eines Acarbose-Genclusters darstellen könnten (Decker, 1996). Um zu klären, ob *S. glaucescens* GLA.O ebenfalls über ein Acarbose-Biosynthese-Gencluster verfügt, wurde eine genomische Cosmidbank mit heterologen Gensonden des *acb*-Genclusters von *Actinoplanes* sp. SE50/110 analysiert. Es konnte ein Zweites Acarbose-Biosynthese-Gencluster in *S. glaucescens* GLA.O identifiziert und sequenziert werden (AM 409314) (Rockser & Wehmeier, 2009). Das *gac*-Gencluster umfasst 29 Gene, von denen 25 in die Biosynthese und den Metabolismus der Acarbose und der homologen Substanzen involviert sind (s. Abb. 1.2). Das *gac*-Gencluster weist hohe Ähnlichkeit zu dem *acb*-Gencluster aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 auf. Die Genprodukte der Gene *gacO* bis *gacB* sind vor allem in die Biosynthese der Acarbose involviert, dabei sind die Gene *gacVWXYZUSRKIQCJMO* und *gacAB* divergent als Transkriptionseinheit orientiert. Die Gene *gacQ* bis *gacV* weisen signifikante Ähnlichkeit zu Genen des *acb*-Genclusters aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 auf, dabei zeigen die Proteine GacUSR und GacI die höchste Übereinstimmung (Rockser & Wehmeier, 2009). Auf das *garC1* Gen folgt ein weiteres Operon, das die Gene *gacHFG1GarC2E2Z1Z2* und *gacGaim* umfasst. Die Gene *garC1* und *garC2* codieren wahrscheinlich für Regulatoren; homologe Gene kommen im *acb*-Gencluster nicht vor. Ebenso konnten die Gene *gacFGH* und *gacWXY*, die für homologe ATP-abhängige Transportsysteme codieren, identifiziert werden. Des Weiteren wurden im *gac*-Gencluster aus *S. glaucescens* GLA.O vier Sequenzen identifiziert, die für Enzyme der Familie 13 der Glycosidhydrolasen codieren. Die Genprodukte GacZ1 und GacZ2 gehören zu den langkettigen  $\alpha$ -Amylasen, während das Protein GacE2 eine kurzkettige  $\alpha$ -Glucosidase repräsentiert. Diese drei Proteine besitzen ein typisches N-terminales Signalpeptid-Motiv sekretierter Enzyme. GacE1 wurde als cytoplasmatisches Enzym charakterisiert und gehört ebenfalls zur Familie 13 der Glycosidhydrolasen. Unmittelbar an das *gacZ2* Gen schließt sich das *gaim* Gen an. Das Gaim Protein stellt wahrscheinlich einen peptidischen  $\alpha$ -Amylaseinhibitor dar (Rockser & Wehmeier, 2009).

## 1.4 Die Acarbose-Biosynthese

Der Biosyntheseweg der Acarbose ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Durch Fütterungsexperimente, molekularbiologische und enzymologische Untersuchungen, wurden entscheidende Schritte der Acarbose-Biosynthese aufgeklärt (Stratmann, 1997, *et al.* 1999; Lee *et al.*, 1998; Diaz-Guardamino, 2000; Hemker *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002, 2003; Brunkhorst *et al.*, 2005; Rockser & Wehmeier 2009).

Die Biosynthese des Cyclitols beginnt mit der Cyclisierung von *sedo*-Heptulose-7-Phosphat zu 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon katalysiert durch die Dihydrochinasäure-Synthase-ähnliche Cyclase AcbC (Stratmann *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000) (Abb. 1.3). Die Acarbose-Kinase AcbM katalysiert die Phosphorylierung des 2-*epi*-5-*epi*-Valiolons an Position C-7 (Zhang *et al.*, 2000). Die Kinase-Reaktion stellt den entscheidenden Unterschied im Vergleich der Acarbose-Biosynthese zu der Validamycin A-Biosynthese dar. Alle nachfolgenden Schritte der Acarbose-Biosynthese in *Actinoplanes* sp. verlaufen an einem phosphorylierten Cyclitol, während in der Validamycin A-Biosynthese, das nach der Cyclisierung erhaltene 2,5-*epi*-Valiolon erst modifiziert und dann phosphoryliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass Cyclitol-Derivate nur in phosphorylierter Form von *Actinoplanes* sp. enzymatisch umgesetzt werden (Zhang *et al.*, 2000), während Fütterungsversuche bei *S. hygroscopicus* 5008 mit verschiedenen Cyclitolen erfolgreich waren (Dong *et al.*, 2000). Die Enzyme AcbO, AcbL, AcbN, AcbU und AcbR sind an der weiteren Synthese des Valienamins bis zu NDP-1-*epi*-Valienol-1,7-Diphosphat beteiligt.

Die Biosynthese der 4-Amino-4,6-dideoxyglucose entspricht dem für diese Substanzgruppe typischen dTDP-Hexose-Weg (Piepersberg & Distler, 1997). Beginnend mit der Synthese von dTDP-Glucose aus Glucose-1-Phosphat durch AcbA, folgt die Dehydratisierung zu dTDP-4-Keto-6-Desoxy-Glucose durch AcbB (Stratmann *et al.*, 1999). Die Transaminierung der dTDP-4-Keto-6-Desoxy-Glucose zu dTDP-4-Amino-4,6-dideoxyglucose wird durch AcbV katalysiert; dabei dient L-Glutamat als Aminodonor (Diaz-Guardamino, 2000). Die Acarviosyleinheit entsteht durch den Transfer der dTDP-4-Amino-4,6-dideoxyglucose aus der aktivierten Vorstufe auf das Cyclitol katalysiert durch AcbS. Bisher ist nicht geklärt, welches Enzym die Verknüpfung der Maltosyleinheit mit der Acarviosyleinheit katalysiert. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Isotopen-markierte Glucose nur in die 4-Amino-4,6-dideoxyglucose der Acarviosyleinheit eingebaut wird (Van Hülst, 1985; Lee *et al.*, 1997). Die Maltosyleinheit scheint direkt aus freier Maltose oder aus Maltotriose gebildet zu werden (Lee *et al.*, 1997).

Acarbose liegt während der Synthese bis hin zum Export phosphoryliert vor, sodass intrazelluläre Enzyme nicht inhibiert werden; außerhalb der Zelle ist Acarbose dephosphoryliert (Drepper & Pape, 1996; Goeke *et al.*, 1996; Wehmeier & Piepersberg, 2004). Die Rephosphorylierung an Position C-7 des Valienamins der Acarbose, die aus der Metabolisierung durch das Carbophor resultiert, wird durch die Kinase AcbK katalysiert (s. Abb. 1.3).

## Biosynthese und Metabolisierung der Acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110 bzw. in *S. glaucescens* GLA.O

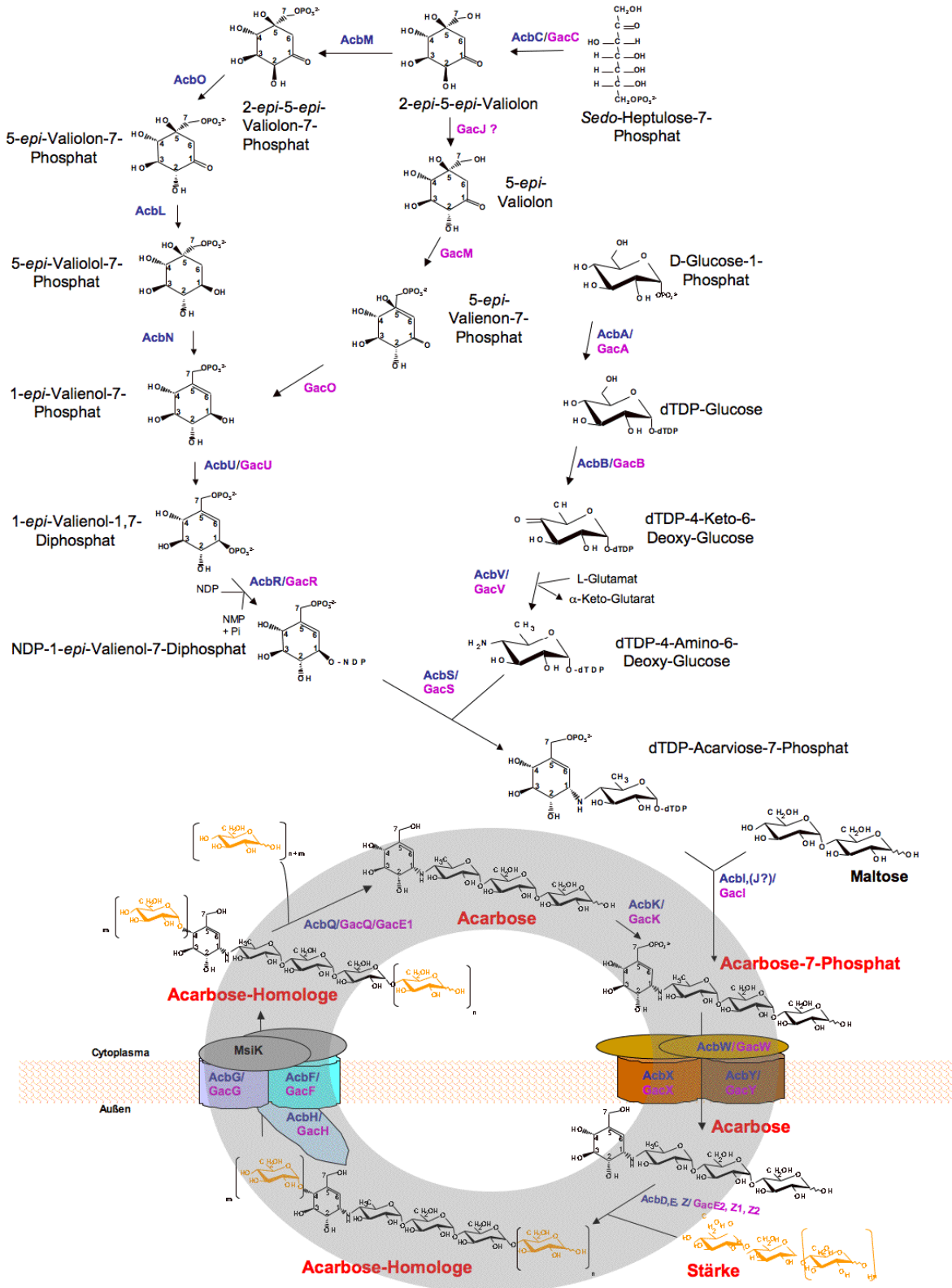


Abb. 1.3: Modell des Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *S. glaucescens* GLA.O. Die Acarbose-Biosynthese (intrazellulär) und die Metabolisierung der Acarbose (extrazellulär) ist für *Actinoplanes* sp. (Blau) und *S. glaucescens* (Pink) gezeigt (Rockser & Wehmeier, 2009).

Die Biosynthese der Acarbose in *S. glaucescens* GLA.O unterscheidet sich im Vergleich zu der in *Actinoplanes* sp. SE50/110. In der Abbildung 1.4 sind die ersten Schritte der Acarbose-Biosynthese bzw. der Validamycin A-Biosynthese von *Actinoplanes* sp. SE50/100, *S. glaucescens* GLA.O und *S. hygrosopicus* 5008 vergleichend dargestellt.

Die ersten Schritte der Acarbose-Biosynthese von *S. glaucescens* GLA.O sind wahrscheinlich vergleichbar mit den ersten Schritten der Validamycin A-Biosynthese aus *S. hygrosopicus* var. *jingangensis* 5008 bzw. *S. hygrosopicus* var. *limoneus* (Bai *et al.*, 2006; Mahmud *et al.*, 2007).

In *S. glaucescens* GLA.O wird wahrscheinlich die Reaktion von 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon, resultierend aus der Cyclisierung von *sedo*-Heptulose-7-Phosphat zu 5-*epi*-Valiolon durch die Epimerase GacJ katalysiert. Die Reaktion der Epimerisierung an Position C-2 zu 5-*epi*-Valiolon findet sowohl in *S. glaucescens* GLA.O als auch in *S. hygrosopicus* 5008 statt. Anschließend erfolgt die Reaktion zu Valiolon-7-Phosphat, katalysiert durch die Phosphotransferase GacM. Darauf folgt die durch GacO katalysierte Reaktion zu 1-*epi*-Valienol-7-Phosphat (Rockser & Wehmeier, 2009) (s. Abb. 1.4). Die weitere Synthese der Acarbose in *S. glaucescens* verläuft vom 1-*epi*-Valiolon-7-Phosphat analog zu dem in *Actinoplanes* sp. vorkommenden Biosyntheseweg.

In der Validamycin A-Biosynthese kommt es zur Abspaltung der 5-OH-Gruppe vom 5-*epi*-Valiolon, sodass Valienon entsteht. Katalysiert durch die Kinase ValC erfolgt die Phosphorylierung dann in Position C-7 zu Valienon-7-Phosphat (Minagawa *et al.*, 2007). Die Kinasen AcbM und ValC, die eine Ähnlichkeit von 30% aufzeigen, unterscheiden sich daher in der Substratspezifität (Mahmut *et al.*, 2007).



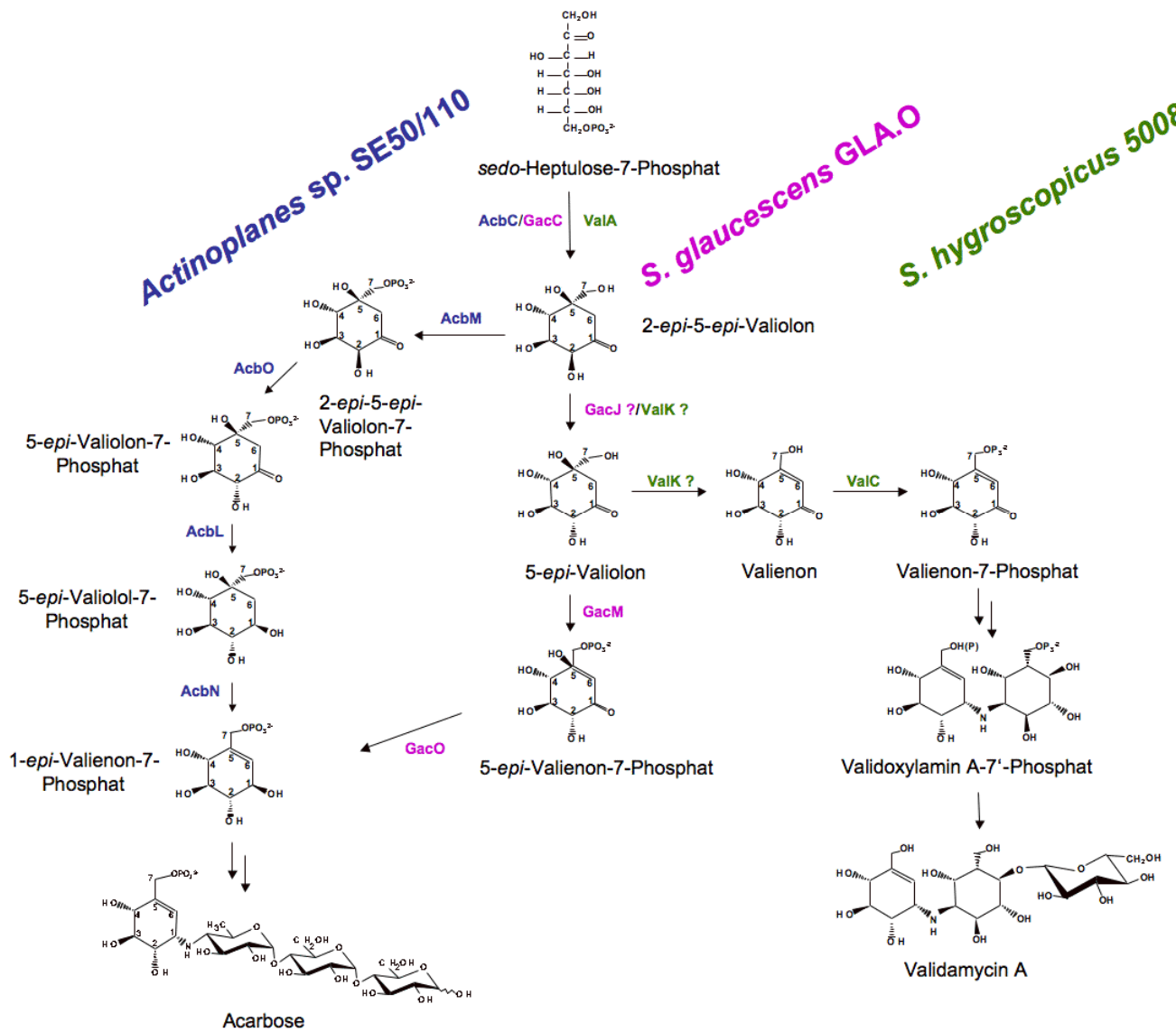


Abb. 1.4: Erste Schritte der Acarbose- und der Validamycin A-Biosynthese. Vergleichend sind die ersten Schritte der Acarbose-Biosynthese von *Actinoplanes sp. SE50/110* und *S. glaucescens* zur Validamycin A-Biosynthese von *S. hygroscopicus var. jinggangensis* 5008 dargestellt (Rockser & Wehmeier, 2009; Mahmut et al., 2006, 2007).

## 1.5 Acarbosemetabolismus in *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *S. glaucescens* GLA.O

Neben den Genen, die für Enzyme der Acarbose-Biosynthese codieren, sind auch Gene im *acb*- und *gac*-Gencluster vorhanden, die für ein ABC-Export- und Importsystem sowie für katabole Enzyme codieren. Diese für einen Sekundärstoffwechsel ungewöhnliche Proteinausstattung und der Befund, dass Maltose und Maltotriose als Induktoren der Synthese einiger Schlüsselenzyme des Acarbosemetabolismus fungieren, ließen die Annahme eines Carbophor-Modells entstehen. Eine Erklärung der möglichen physiologischen Bedeutung der Acarbose im Ökosystem der Produzentenstämme führte somit zu dem Modell eines integrierten intra- und extrazellulären hoch entwickelten Stärkemetabolismus, in dem Acarbose analog den Eisen-Siderophoren, eine Carbophor-Funktion als Kohlenhydratbindendes und -importierendes Molekül übernimmt und gleichzeitig als Inhibitor gegenüber Nahrungskonkurrenten fungiert (Piepersberg *et al.*, 2002; Wehmeier & Piepersberg, 2004) (s. Abb. 1.3).

Die Acarbose stellt das exportierte Endprodukt der Acarbose-Biosynthese dar. Während der Synthese bis zum Export, der vermutlich durch das dephosphorylierende ABC-Transportsystem AcbWXY katalysiert wird, bleibt Acarbose in Position C-7 phosphoryliert und besitzt keine enzymhemmende Wirkung, sodass intrazelluläre Enzyme geschützt bleiben (Drepper & Pape, 1996; Wehmeier & Piepersberg, 2004). Die extrazelluläre Acarviosyltransferase AcbD katalysiert in Gegenwart von Acarbose die Übertragung von Maltodextrinen bzw. Maltose auf Acarviose, sodass es zur Synthese der Acarbose-Homologen kommt (Stratmann, 1997; Hemker *et al.*, 2001; Wehmeier & Piepersberg, 2004; Leemhuis *et al.*, 2005; Wehmeier & Rockser, unveröffentlicht). Die Acarviosyl-Akzeptoren werden unter anderem durch die extrazelluläre Acarbose-insensitive  $\alpha$ -Amylase AcbE aus Stärke und andere  $\alpha$ -1,4-Glucanen bereitgestellt, während extrazelluläre, maltolytische Enzyme und die Maltoseaufnahmesysteme von Nahrungskonkurrenten im Habitat durch Acarbose und seine Homologen inhibiert werden (Stratmann, 1997; *et al.*, 1999; Brunkhorst *et al.*, 1999; Wehmeier 2004). Wahrscheinlich stellt AcbZ eine weitere Acarbose-insensitive, extrazelluläre  $\alpha$ -Amylase dar, die ebenfalls an der Erschließung von Kohlenstoffquellen beteiligt ist. Die Acarbose und die homologen Substanzen werden vermutlich über das ABC-Importsystem AcbHFG-MsiK<sub>2</sub> aufgenommen (Brunkhorst *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass die Deglucosylierung der Acarbose-Homologen analog dem Maltosemetabolismus in *E. coli* durch die Amylomaltase AcbQ katalysiert wird (Stratmann, 1997; Boos & Shuman, 1998; Wehmeier & Piepersberg, 2004). Die Acarbose-7-Kinase AcbK katalysiert dann wiederum die Bildung, der als Inhibitor inaktiven und zum Export markierten Form der phosphorylierten Acarbose (Drepper & Pape, 1996; Hemker *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2002). Auch die im *gac*-Gencluster aus *S. glaucescens* GLA.O codierte Proteinausstattung wird dem Carbophor-Modell gerecht. Die Enzyme

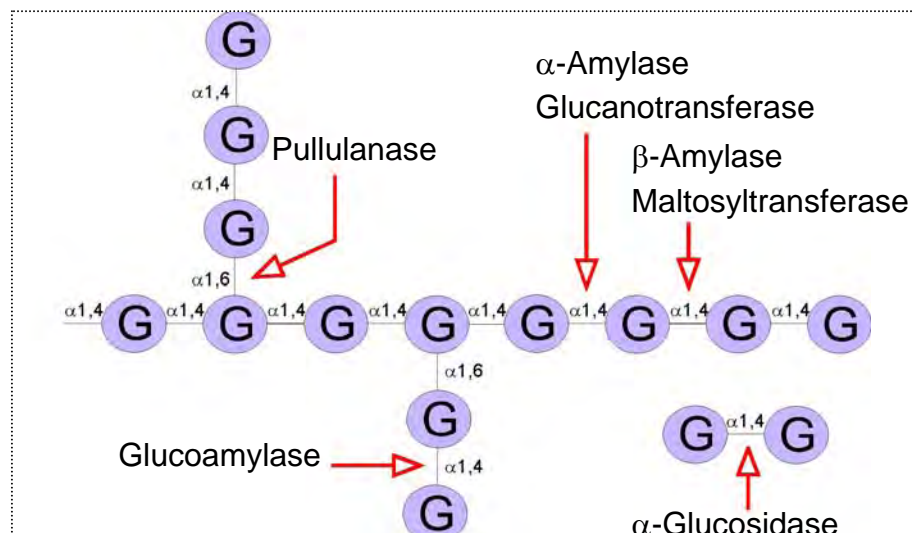
GacWXY könnten das Exportsystem darstellen, da die codierten Proteine zur Familie der ABC-Exporter gehören. Als extrazelluläre Acarbose-insensitive  $\alpha$ -Glucosidasen sind die Enzyme GacZ1, GacZ2 und GacE2 postuliert (Rockser & Wehmeier, 2009). Allerdings konnte bisher keinem Genprodukt des *gac*-Genclusters eine Acarviosyltransferaseaktivität zugeordnet werden. Es wird angenommen, dass *S. glaucescens* GLA.O neben Acarbose ein anderes Sekundärmetabolit-Spektrum als *Actinoplanes* sp. SE 50/110 aufweist (Rockser & Wehmeier, 2009). Die Enzyme GacHFG stellen das ATP-abhängige ABC-Importsystem dar. Erste Bindestudien zu dem GacH Protein belegen eindeutig, dass Acarbose über den Maltosyl-Rest an das Enzym gebunden ist, während AcbH sich wahrscheinlich zu GacH durch eine Substratspezifität unterscheidet (Schneider & Licht, unveröffentlicht, persönliche Mitteilung). Das GacQ Protein katalysiert vermutlich die Freisetzung der Dextrine und der Acarbose aus den importierten Pseudooligosacchariden. *S. glaucescens* GLA.O besitzt zusätzlich eine intrazelluläre  $\alpha$ -Glucosidase GacE1, die ebenfalls an dieser Reaktion beteiligt sein könnte. Die Inaktivierung der Acarbose durch Reposphorylierung könnte durch GacK katalysiert werden. Acarbose weist somit eine Bifunktionalität auf. Über eine Inhibierung extrazellulärer Hydrolasen  $\alpha$ -1,4-glycosidischer Bindungen von Nahrungskonkurrenten im Habitat hinaus übernimmt Acarbose wahrscheinlich eine weitere Rolle bei der Sicherung von Kohlenstoffquellen im Habitat. Das Pseudotetrasaccharid sowie die Acarbose-Derivate haben das Potenzial die Aktivität von  $\alpha$ -Glucosidasen und Maltodextrin-Importsystemen von Nahrungskonkurrenten bereits im mikromolaren Konzentrationsbereich zu inhibieren. Es konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -Amylaseaktivität von *B. subtilis* in Gegenwart von *Actinoplanes* sp. inhibiert wird, wenn beide Stämme auf einer Stärkeplatte inkubiert werden (Rockser & Wehmeier, unveröffentlicht); des Weiteren wird das Bindeprotein abhängige Maltose-Importsystem von *E. coli* durch Acarbose blockiert (Brunkhorst *et al.*, 1999). Durch die Carbophor-Funktion der Acarbose sind die potenziellen Produzenten fähig, die Energieressourcen im Habitat optimal nutzbar zu machen (Wehmeier & Piepersberg, 2004). Aufgrund der niedrigen Affinitäten im millimolaren Bereich des ABC-Transportsystems sowie der Acarviosyltransferase AcbD wird angenommen, dass die Carbophor-Funktion gegenüber dem effektiven Hemmcharakter der Acarbose im Ökosystem von *Actinoplanes* sp. als sekundär betrachtet werden kann (Hemker *et al.*, 2001; Brunkhorst, 2005). Möglicherweise dient das Carbophor vielmehr einem Recycling der Pseudooligosaccharide, sodass die Energie überschüssig exportierter Moleküle dem Produzenten wieder zugeführt wird. Der Reimport der Acarbose und der Homologen könnte auch dazu beitragen, über den Mechanismus des *quorum sensing*, Auskunft über die Populationsdichte möglicher Nahrungskonkurrenten zu erhalten (Schauder & Bassler, 2001; Piepersberg, 1992, 1993, 2002).

## 1.6 Stärke und amylolytische Enzyme

Polysaccharide stellen eine heterogene Gruppe zusammengesetzter Polymere von unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung dar. Grundbausteine sind dabei jeweils Monosaccharidreste, die über glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Das Makromolekül Stärke ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> ist ein Polysaccharid, das sich aus zwei Komponenten zusammensetzt: die lineare, nur aus  $\alpha$ -1,4-D-Glucoseeinheiten bestehende Amylose und das verzweigte Amylopektin, das  $\alpha$ -1,6- und  $\alpha$ -1,4-Bindungen aufweist (Martin & Schmith, 1995; Ball & Morell, 2003) (s. Abb. 1.5). Pullulan ist ein  $\alpha$ -1,4-;  $\alpha$ -1,6-Glucan, bestehend aus Maltotrioseeinheiten und wird durch hydrolytische Stärkespaltung von dem Pilz *Aureobasidium pullulans* produziert (Bender *et al.*, 1959; Catley, 1980). Weitere Polysaccharide sind das  $\alpha$ -1,4-Glucan Glycogen, die  $\beta$ -1,4-Glucane wie Cellulose und Chitin sowie die Pentosane Xylan und Arabinan.

Zur extrazellulären Nutzung der Glucane müssen zunächst amylolytisch wirksame Enzyme wie, z. B.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen und Glucoamylasen sekretiert werden; der Kohlenhydrat-Katabolismus beginnt dann mit der Aufnahme der aus der hydrolytischen Spaltung resultierenden Abbauprodukte, wie Glucose, Maltose und Maltodextrine (Vihinen & Mäntsälä, 1989; Pandey *et al.*, 2000).

In der Abbildung 1.5 sind mögliche hydrolytische Spaltungen von glycosidischen Bindungen im Stärkemolekül, die durch Enzyme katalysiert werden können, exemplarisch dargestellt.



**Abb. 1.5: Mögliche enzymatische Angriffspunkte bei der Hydrolyse von Stärke.** Dargestellt ist ein Ausschnitt eines Stärkemoleküls. G = Glucose.

Die molekulare Erkennung von Kohlenhydraten durch Proteine ist hochspezifisch, obwohl die Dissoziationskonstanten aufgrund der bei Kohlenhydrat fehlenden hydrophoben Gruppen nur im millimolaren oder mikromolaren Bereich liegen. Die hohe Spezifität dieser schwachen Bindung ist die Folge zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen und der Koordination von Metallatomen als Brücke zwischen Saccharid und Rezeptorprotein (Wong *et al.*, 2006).

Die Enzyme, die an der Katalyse von Stärke und weiteren Polysacchariden beteiligt sind, werden in der großen  $\alpha$ -Amylase-Superfamilie, Clan H (GH 13, 70, 77) und innerhalb dieser, in der Unterfamilie der Glucosidhydrolasen (GH 13) zusammengefasst (Svensson, 1994; Janecek, 1997; Coutinho & Henrissat, 1999). Gemeinsam ist diesen Enzymen, dass sie Sequenzhomologien, hochkonservierte katalytische Domänen sowie konservierte Spaltmechanismen der glycosidischen Bindung besitzen (MacGregor *et al.*, 2001). Das aktive Zentrum der Enzyme der Familie GH 13 umfasst die stark konservierten Regionen I-IV mit den entsprechenden Konsensussequenzen (Qian *et al.*, 1994; Janecek & Bateman, 1996; Janecek *et al.*, 1997). Die charakteristischen Aminosäuren sind verantwortlich für Substratbindung und die Katalyse der Hydrolyse-Reaktion. Die systematische Einteilung der  $\alpha$ -Amylase-Superfamilie erfolgte anhand der Substrat-, Produkt- und Reaktions-Spezifität der Enzyme; es sind bisher 30 Enzymtypen bekannt (Kuriki *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000; MacGregor *et al.*, 2001; Oslancova & Janecek, 2002; Stam *et al.*, 2005). Als Gemeinsamkeit besitzen die offensichtlich verschiedenen Enzymklassen den katalytischen *Double-Displacement*-Mechanismus, der den Aufbau des Substrat-Enzym-Komplexes sowie dessen Abbau umfasst. Die Enzymklassen unterscheiden sich dabei nicht in der Reaktion, sondern nur in der Wahl des Akzeptor-Moleküls; bei der Hydrolyse stellt Wasser den Akzeptor dar, bei Transferase-Reaktionen wird eine Hydroxylgruppe als Akzeptor gewählt (Davies & Wilson, 1999; Uitdehaag *et al.*, 1999; Stam *et al.*, 2005).

Im *acb*- und *gac*-Gencluster konnten die Genprodukte AcbE und AcbZ sowie GacZ1, GacZ2, GacE1 und GacE2 eindeutig der Familie GH 13 zugeordnet werden. In der Tabelle 1.2 sind die Ergebnisse des Homologievergleiches der Proteine von den Produzentenstämmen gezeigt (Rockser & Wehmeier, 2009).

Im Folgenden sind einige Mitglieder der Familie aufgeführt und beschrieben:

Amylasen (EC 3.2.1.1, EC 3.2.1.2, EC 3.2.1.3) zeichnen sich durch die Endohydrolyse von  $\alpha$ -1,4-glycosidischen Bindungen in Polysacchariden aus, dabei variieren die Produkte von Maltotriose bis Maltoheptaose. Pullulanasen (EC 3.2.1.41) hydrolysieren  $\alpha$ -1,6-glycosidische Bindungen in Pullulan, Amylopectin und Glycogen sowie in den Abbauprodukten von Amylopectin und Glycogen, den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Grenzdextrinen.  $\alpha$ -Glucosidasen (EC 3.2.1.3, EC 3.2.1.20, EC 3.2.1.45) spalten 1,4- bzw. 1,6-glycosidische Bindungen vom terminalen, nicht-reduzierenden Ende in Polysacchariden bzw. Oligosacchariden, die z. B. aus dem Stärkeabbau durch Amylasen resultieren. 4- $\alpha$ -Glucanotransferasen (EC 2.4.1.25) gehören zur Gruppe

der Hexosyltransferasen und umfassen die ehemalige Gruppe der Amylomaltasen (EC 2.4.1.3). 4- $\alpha$ -Glucanotransferasen katalysieren eine  $\alpha$ -1,4-Glucan-Hydrolyse und übertragen dann die entstandenen Glycosylreste an eine neue Position im Akzeptormolekül, üblicherweise einen Alkohol.

**Tab. 1.2: Homologievergleich der Proteine aus der Familie 13 der Glycosidhydrolasen von *Actinoplanes* SE 50/110 und *S. glaucescens*.**

Genprodukt aa	Identität/Ähnlichkeit	Identität/Ähnlichkeit zu Genprodukten aus dem <i>gac</i> - bzw. <i>acb</i> -Gencluster
AcbZ 1103 aa	53%/65% zu Pullulanase aus <i>S. sviveus</i> ATCC 29083, YP_002 204104.1, 1801 aa	52%/64% zu GacZ2
AcbQ 698 aa	53%/66% zu 4- $\alpha$ -Glucanotransferase aus <i>S. avermitilis</i> MA-4680, NP_826568, 740 aa	58%/67% zu GacQ
AcbE 1038 aa	45%/60% zu $\alpha$ -Amylase/Dextrinase aus <i>S. coelicolor</i> A3(2), NP_626477.1, 1798 aa	21%/31% zu GacE1
AcbD 724 aa	42%/59% $\alpha$ -Cyclodextrin-Glycosyltransferase aus <i>Thermoanaerobacterium thermo-sulfurigenes</i> , AAB00845.1, 710 aa	
GacQ 699 aa	60%/68% zu 4- $\alpha$ -Glucanotransferase aus <i>S. avermitilis</i> MA-4680, NP_826568, 740 aa	58%/67% zu 4- $\alpha$ -Glucano-transferase AcbQ, 698 aa
GacE1 560 aa	70%/78% zu $\alpha$ -Glucosidase aus <i>S. avermitilis</i> MA-4680, NP_827157, 616 aa	21%/31% zu AcbE, 1038 aa
GacE2 569 aa	71%/81% zu $\alpha$ -Amylase aus <i>S. venezuelae</i> , P22998, 569 aa	23%/35% zu Acarviosyltransferase AcbD, 724 aa
GacZ1 1046 aa	58%/73% zu Pullulanase aus <i>S. avermitilis</i> MA-4680, NP_827157, 1806 aa	48%/61% zu $\alpha$ -Amylase AcbZ, 1103 aa
GacZ2 1111 aa	59%/79% zu Pullulanase aus <i>S. avermitilis</i> MA-4680, NP 827157, 1806 aa	52%/64% zu $\alpha$ -Amylase AcbZ, 1103 aa
Gaim 113 aa	48%/65% zu $\alpha$ -Amylaseinhibitor aus <i>S. avermitilis</i> MA-4680, NP_822072, 119 aa	

## 1.7 Ziel dieser Arbeit

Die biologische Funktion der Acarbose für die Produzentenstämme *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *S. glaucescens* GLA.O wurde als Carbophor-Modell beschrieben (Piepersberg *et al.*, 2002; Wehmeier & Piepersberg, 2004; Rockser & Wehmeier, 2009). Die extrazellulären Enzyme AcbE und AcbD aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 konnten bereits durch erste Analysen charakterisiert werden (Stratmann, 1997, 1999; Hemker *et al.*, 2001). Die Untersuchungen hatten ergeben, dass *Actinoplanes* sp. Acarbose-insensitive, extrazelluläre  $\alpha$ -Glucanohydrolasen bzw. Glucanotransferasen produziert und so in der Lage ist Acarbose-Homologe zu generieren. Im Verlauf dieser Arbeit konnte in unserer Arbeitsgruppe ein Zweites Gencluster zur Acarbose-Biosynthese, das *gac*-Gencluster aus *S. glaucescens* GLA.O identifiziert werden (Rockser & Wehmeier, 2009). Es wurde postuliert, dass etwa ein Drittel aller Proteine, für die das *acb*- bzw. *gac*-Gencluster codiert, in den postulierten Carbophor-Metabolismus involviert sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die amylolytischen Enzyme der Acarbose-Produzentenstämme, die eine neue und bisher unbekannte Unterfamilie der Glucosidhydrolasen der Familie 13 repräsentieren, näher untersucht, um so deren Bedeutung für das Carbophor-Modell zu klären.

Es sollten die extrazellulären  $\alpha$ -Amylasen AcbE und AcbZ sowie das homologe Enzym GacZ1 aus *S. glaucescens* im Detail charakterisiert werden. Des Weiteren sollten enzymologische Untersuchungen der postulierten Acarbose-4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ, die große Ähnlichkeit zu der Amylomaltase-Familie aufweist, Aufschluss über den intrazellulären Acarbosemetabolismus geben. Den Analysen des AcbQ Proteins ging voraus, dass geeignete Substrate vorhanden waren. Die Substrate mussten durch die AcbD- und die AcbK-Reaktion zu erst synthetisiert werden. Die  $\alpha$ -Glucosidase aus *S. glaucescens* sollte ebenso in Hinblick auf Acarbose-Insensitivität und Substratspezifität analysiert werden.

Als Nebenaspekt dieser Arbeit ergab es sich, dass eine neue Methode zur Analyse von Maltooligosacchariden durch die HPLC-ECD Analytik entwickelt und etabliert werden sollte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Chemikalien:

Acarbose	Bayer Healthcare AG, Wuppertal
Adenosin 5'-Triphosphat (ATP)	Amersham/GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Agarose	Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich, München
Casamino Acids	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Cerestar-Medium	Bayer Healthcare AG, Wuppertal
Chemikalien p. a. Qualität	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, München
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Desoxynucleosidtriphosphat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
DC-Alufohlen Kieselgel 60 F254	Macherey-Nagel, Düren



D-Glucose (Monohydrat)	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
MacConkey Base Agar	Oxoid Ltd., Cambridge, UK
Maltose (Monohydrat)	Sigma-Aldrich, München
Malto-Oligosaccharide	Sigma-Aldrich, München
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden Sigma-Aldrich, München
Pullulan	Sigma-Aldrich, München
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, München
Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Trypticase Soja Broth	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Weiterhin verwendete, hier jedoch nicht aufgeführte Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „pro analysi“ und wurden von den Firmen, Difco, Gibco-BRL, Merck, Serva, Sigma-Aldrich oder Roth bezogen.

### Enzyme:

$\alpha$ -Amylase <i>Bacillus</i> sp.	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
$\alpha$ -Glucosidase	Sigma-Aldrich, München
DNA Polymerase I Klenow Fragment	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNase I	Sigma-Aldrich, München
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Pullulanase <i>Bacillus acidopullulyti</i>	Sigma-Aldrich, München
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
RNase A	Sigma-Aldrich, München

Shrimp Alkaline Phosphatase	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
iProof DNA-Polymerase	Biorad, München
Vent DNA-Polymerase	Biorad, München
Platinum® <i>Pfx</i> DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>TaqBead</i> <sup>TM</sup> Hot Start Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
Go <i>Taq</i> ® Flexi DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
BioTherm DNA-Polymerase	Genecraft, Köln

Kits:

Bradford Reagenz	BioRad, München
Roti®-Nanoquant	Roth, Karlsruhe
DNA-Purification Kit	Genscript, New Jersey, USA
Gel-Extraktions Kit	Genscript, New Jersey, USA
AccepTor Vector Kit	Novagen, Darmstadt
Long Range PCR Kit	Qiagen, Hilden
D-Glucose (GO) Assay Kit	Sigma-Aldrich, München
Fast Start High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim

## 2.1.2 Bakterienstämme

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1</i> $\lambda$ <i>gyrA96 relA1</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> JM109	e14 <sup>-</sup> ( <i>mcrA</i> <sup>-</sup> ) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) <i>supE44 relA1</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) [F <sup>'</sup> <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>f</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	<i>E. coli</i> JM109, $\lambda$ (DE3)	Promega, Heidelberg
<i>E. coli</i> JM109(DE3)pRare	<i>E. coli</i> JM109(DE3), <i>cam</i> , tRNA-Codons: AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA	Novagen, Bad Soden
<i>E. coli</i> ET12567	F <sup>-</sup> <i>dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR recF143 zj201::Tn10 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl glnV44</i>	Oh and Chater, 1997
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm gal</i> $\lambda$ (DE3)	Studier & Moffat, 1986
<i>E. coli</i> BL21(DE3)Origami	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm gal</i> $\lambda$ (DE3) <i>trxB gor kan</i>	Novagen, Bad Soden
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ Prophage-T7 RNA Polymerasegen pLysS <i>cat</i>	Novagen, Bad Soden
C41(DE3)	Derivat von BL21(DE3) <i>amtB</i> <sup>+</sup>	Miroux&Walker, 1996
C43(DE3)	Derivat von C41(DE3) <i>amtB</i> <sup>+</sup>	Miroux&Walker, 1996
CB39	MC4100 <i>malQ::Tn10</i>	Decker <i>et al.</i> , 1993
<i>E. coli</i> ArcticExpress™ (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm<sup>+</sup> endA Hte</i> (Tet <sup>r</sup> ) [ <i>cpn10 cpn60 Gent<sup>r</sup></i> ] $\lambda$ (DE3)	Stratagene, Amsterdam, NL
<i>E. coli</i> Rosetta™ <sub>2</sub> (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm<sup>+</sup> lacY1</i> pLysS/RARE ( <i>argU argW ilex glyT leuW proL Cm<sup>r</sup></i> ) $\lambda$ (DE3)	Novagen, Bad Soden
NovaBlue	<i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>K12</sub> <sup>-</sup> m <sub>K12</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF</i> [ <i>proA+B+lac<sup>f</sup>ZDM15::Tn10</i> ]	Novagen, Bad Soden

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
<b>Escherichia coli</b>		
<i>E. coli</i> Able® C	<i>E. coli</i> C <i>lac</i> ( <i>LacZ</i> $\omega$ -) [ <i>Kan</i> <sup>r</sup> <i>McrA</i> - <i>McrCB</i> - <i>McrF</i> - <i>Mrr</i> - <i>HsdR</i> ( <i>r</i> <sup>K</sup> - <i>m</i> <sup>K</sup> -)] [ <i>F</i> ' <i>proABlacIqZ</i> $\Delta$ <i>M15 Tn10</i> ( <i>Tet</i> <sup>r</sup> )]	Stratagene, Amsterdam, NL
<b>Actinomyceten</b>		
<i>Actinoplanes</i> sp. 50/110	Acarbose-Produzent, WT	ATCC 31044
<i>Actinoplanes</i> sp. 223/29	Acarbose-Überproduzent	Bayer Healthcare AG, Wuppertal
<i>S. glaucescens</i> Gla.0	Wildtyp, 5'-Hydroxystreptomycin-Produzent	ETH22794, Ono et al., 1983
<i>S. lividans</i> 66 1326	Actinorhodin, Prodigiosin SLP2 <sup>+</sup> , SLP3 <sup>+</sup>	Kieser et al., 2000
<i>S. lividans</i> 66 TK23	Actinorhodin, <i>spc</i> -1, SLP2 <sup>-</sup> , SLP3 <sup>-</sup>	Kieser et al., 2000
<i>S. lividans</i> 66 TK24M2	$\alpha$ -Amylase Mutante	Tsao et al., 1993

### 2.1.3 Vektoren und rekombinante Plasmide

Tab. 2.2: Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Herkunft
pAC11	<i>cam lacI T7-<math>\Phi</math>10p lacO s10-leader p15A-ori</i>	Wehmeier und Rockser, unveröffentlicht, 2008
pAC16	<i>cam lacI T7-<math>\Phi</math>10p lacO s10-leader p15A-ori</i>	Wehmeier und Rockser, unveröffentlicht, 2008
pAC2775	<i>cam rha<sub>p</sub> rrb His-Tag ColE1-ori</i>	Wehmeier und Rockser, unveröffentlicht, 2008
pET11a	<i>bla lacI T7-<math>\Phi</math>10p lacO s10-leader ColE1-ori</i>	Studier et al., 1990
pET11dP	<i>bla lacI T7-<math>\Phi</math>10p lacO s10-leader ColE1-ori</i>	Wehmeier und Hammes, unveröffentlicht
pET16b	<i>bla lacI T7-<math>\Phi</math>10p lacO s10-leader His-Tag ColE1-ori</i>	Studier et al., 1990

Vektor	Eigenschaften	Herkunft
pGP1-2	<i>kan</i> P <sub>L</sub> -T7 gene1 λ Cl857 p15A-ori  pACYC177-Derivat, enthält Fragment des T7 <i>l</i> -Gens unter Kontrolle des induzierbaren λ <i>PL</i> -Promotors und das Gen für den Hitze-sensitiven λ Repressor cl857	Tabor und Richardson, 1985
pHM8a	<i>hyg ermE<sub>p</sub></i> mini-circle ColE1- <i>ori</i>	Motamedi et al., 1995
pIJ4123	<i>kan tsr redD tipA<sub>p</sub></i> His-Tag pIJ101- <i>ori</i>	Murakami et al., 1989
pIJ6021	<i>kan tsr tipA<sub>p</sub></i> pIJ101- <i>ori</i>	Murakami et al., 1989
pJOE2702	<i>bla rha<sub>p</sub> rrb</i> ColE1- <i>ori</i>	Volff et al., 1996
pJOE2775	<i>bla rha<sub>p</sub> rrb</i> His-Tag ColE1- <i>ori</i>	Volff et al., 1996
pMALp2T	<i>bla lacI</i> M13 MalE-Tag ColE1- <i>ori</i>	Shinsukeet al., 2004
pQE60	<i>bla lacI T5-Φ10<sub>p</sub> rrmBT1</i> His-Tag ColE1- <i>ori</i>	Qiagen, Hilden
pQE9	<i>bla lacI T5-Φ10<sub>p</sub> rrmBT1</i> His-Tag ColE1- <i>ori</i>	Qiagen, Hilden
pSTBlue1	<i>bla kan T7-Φ10<sub>p</sub></i> ColE1- <i>ori</i>	Novagen, Bad Soden
pSUTNESLB10	<i>cat T7<sub>p</sub> groESL</i> ( <i>S. griseus</i> ) P15A- <i>ori</i>	Pöhling, 1997
pUC18/19	<i>bla lacZ'</i> ColE1- <i>ori</i>	Vieira und Messing, 1982
pUCBM21	<i>bla lacZ'</i> ColE1- <i>ori</i>	Roche, Mannheim
pUCPU21	<i>bla lacZ'</i> ColE1- <i>ori</i>	Wehmeier und Hammes
pUWL201	<i>bla tsr ermE<sub>p</sub></i> ColE1- <i>ori</i> pIJ101- <i>ori</i>	Doumith et al., 2000
pUWL201PW	<i>bla tsr ermE<sub>p</sub></i> ColE1- <i>ori</i> pIJ101- <i>ori</i>	Doumith et al., 2000
pUWL218/219	<i>bla tsr lacZ'</i> ColE1- <i>ori</i> pIJ101- <i>ori</i>	Wehmeier, 1996
pUWLHis	<i>bla tsr ermE<sub>p</sub></i> ColE1- <i>ori</i> pIJ101- <i>ori</i>	Wehmeier, unveröffentlicht
pUWLSK/KS	<i>bla tsr ermE<sub>p</sub> lac<sub>p</sub> T3p T7-Φ10<sub>p</sub></i> ColE1- pIJ101- <i>ori</i>	Wehmeier, 1995

Tab. 2.3: Verwendete und neukonstruierte Plasmid/Cosmide

Plasmid/Cosmid	Konstruktion
<b><i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 <i>acb</i>-Gen-Cluster</b>	
cos6.2	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 <i>acb</i> -Gen-Cluster in cos6.2
pAS11	<i>acbE</i> in pUWL219 (Stratmann, 1997)
pUWLKSZVO2	Fusion pUWLKS: <i>NheI/SstI-SstI/XhoI</i> mit <i>acbZ</i> aus <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110
pET16bacbQ	PCR-Produkt <i>acbQ NdeI/HindIII</i> in pET16b
pJOE2702acbQ	PCR-Produkt <i>acbQ NdeI/HindIII</i> in pJOE2702
pT7-7acbQ	PCR-Produkt <i>acbQ NdeI/HindIII</i> in pT7-7
pHM8aacbQ	PCR-Produkt <i>acbQ NdeI/HindIII</i> in pHM8a
pUWL201PWacbQ	<i>acbQ NdeI/ApoI</i> bzw. <i>EcoRI</i> Fragment aus pET16b
pUCPU21acbZ	PCR-Produkt <i>acbZ NdeI/ApaI</i> in pUCPU21
pSTBlue1acbZHis	PCR-Produkt <i>acbZ</i> mit amplifiziertem His-Tag <i>NdeI/HindIII</i> in pSTBlue1
pAC11acbZHis	<i>acbZ NdeI/HindIII</i> Fragment aus pSTBlue1 in pAC11
pUWL201PWacbZHis	<i>acbZ NdeI/HindIII</i> Fragment aus pSTBlue1 in pUWL201PW
pUWLHisacbZHis	<i>acbZ NdeI/HindIII</i> Fragment mit amplifiziertem His-Tag aus pSTBlue1 in pUWLHis
pUWL201PWacbEHis	PCR-Produkt <i>acbE</i> mit amplifiziertem His-Tag <i>NdeI/HindIII</i>
pAC11acbEHis	<i>acbEHis NdeI/HindIII</i> Fragment aus pUWL201PWacbEHis in pAC11
<b><i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 <i>acb</i>-Gen-Cluster</b>	
pAC16acbHis	<i>acbEHis NdeI/HindIII</i> Fragment aus pUWL201PWacbEHis in pAC16
pUWL201PWacbE	PCR-Produkt <i>acbE</i> ohne Signalsequenz <i>NdeI/HindIII</i> in pUWL201PW
pAC11acbE	<i>acbE NdeI/HindIII</i> Fragment aus pUWL201PWacbE in pAC11
pAC16acbE	<i>acbE NdeI/HindIII</i> Fragment aus pUWL201PWacbE in pAC16
<b><i>S. glaucescens</i> GLA. O <i>gac</i>-Gen-Cluster</b>	
cos2	<i>S. glaucescens</i> GLA. O <i>gac</i> -Gen-Cluster von <i>gacH</i> bis <i>garC</i>

Plasmid/Cosmid	Konstruktion
cos26	<i>S. glaucescens</i> GLA. O <i>gac</i> -Gen-Cluster von <i>gacH</i> bis <i>gaim</i>
pUWLKSgac	<i>S. glaucescens</i> GLA. O <i>gac</i> -Gen-Cluster
pUWL218gacE1H	<i>gacE1</i> <i>EcoRI/HindIII</i> Fragment aus pUWLKSgac
pUWLHisgacE1	PCR-Produkt <i>gacE1</i> <i>NdeI/BamHI</i>
pUCPU21gacE1	<i>gacE1</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUWLHisgacE1 in pUCPU21
pET16bgacE1	<i>gacE1</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUWLHisgacE1 in pET16b
pJOE2702gacE1	<i>gacE1</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUWLHisgacE1 in pJOE2702
pAC16gacE1	<i>gacE1</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUWLHisgacE1 in pAC16
pAC11gacE1	<i>gacE1</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUWLHisgacE1 in pAC11
pSTBlue1gacE2 A	PCR-Produkt <i>gacE2</i> mit Signalsequenz <i>NdeI/BamHI</i> in pSTBlue1
pSTBlue1gacE2 B	PCR-Produkt <i>gacE2</i> mit Signalsequenz <i>NcoI/BamHI</i> in pSTBlue1
pUCPU21gacE2oSP I	PCR-Produkt <i>gacE2</i> ohne Signalsequenz <i>NdeI/HindIII</i> in pUCPU21
pUCPU21gacE2oSP II	PCR-Produkt <i>gacE2</i> ohne Signalsequenz <i>NdeI/BamHI</i> in pUCPU21
pUCPU21gacZ1	PCR-Produkt <i>gacZ1</i> <i>NdeI/HindIII</i> in pUCPU21
pET16bgacZ1	<i>gacZ1</i> <i>NdeI/HindIII</i> Fragment aus pUCPU21gacZ1 in pET16b
pUWL201PW gacZ1	<i>gacZ1</i> <i>NdeI/HindIII</i> Fragment aus pUCPU21gacZ1 in pUWL201PW
pUCPU21gacQ	PCR-Produkt <i>gacQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> in pUCPU21
pAC2775gacQ	<i>gacQ</i> <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pUCPU21gacQ in pAC2775
pSTBlue1gaim	PCR-Produkt <i>gaim</i> <i>BspHI/BamHI</i> in pSTBlue1
<b><i>S. glaucescens</i> GLA. O <i>gac</i>-Gen-Cluster</b>	
pUWLHisgaim	<i>gaim</i> <i>BspHI/BamHI</i> Fragment aus pSTBlue1gaim in pUWLHis
pQE60gaim	<i>gaim</i> <i>BspHI/BamHI</i> Fragment aus pSTBlue1gaim in pQE60
pSTBlue1gaimoSP	PCR-Produkt <i>gaim</i> ohne Signalsequenz <i>NdeI/BamHI</i> in pSTBlue1
pUWLHisgaimoSP	<i>gaim</i> ohne Signalsequenz <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pSTBlue1gaimoSP in pUWLHis
pMALp2TgaimoSP	<i>gaim</i> ohne Signalsequenz <i>NdeI/BamHI</i> Fragment aus pSTBlue1gaimoSP in pMALp2T

## 2.1.4 Oligonucleotide

Tab. 2.4: verwendete Oligonucleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<b>Heterologe Primer für die Amplifikation der <i>Actinoplanes</i> sp. Gene*</b>	
<b><i>acbZ</i>-Primer</b>	
acbZFor	GCGGCCA <u>CATATG</u> AAGCGCCGG
acbZForoSP	CGGGCGTCG <u>CATATG</u> CCGGCCGGC
acbZRev	<u>CAAGCTT</u> CCCGGTCTCCGGTCAG
acbZRevHis	<u>AAGCTT</u> CAATGATGATGATGATGATGGCCGGTGAGGTCACC
acbZFor+100	CGGTGCGTCCACAGTGTTAAC
acbZRev+100	CTGGGGTACGGCACCTTC
acbZ_KpnI_For	GGGCGGTACCGCCG
acbZ_KpnI_Rev	CGGCGGTACCGCCC
<b><i>acbE</i>-Primer</b>	
acbEFor	GGGTCC <u>CATATG</u> GATGAAAG
acbEForoSP	GCGCAG <u>CATATG</u> CGCCGCCGGAC
acbERev	CGGCGAGGGCACGC <u>AAGCTT</u> GC
acbERevHis	<u>AAGCTT</u> CAATGATGATGATGATGATGCCAGCGGACTCCGGTCACC
acbEFor+100	GCTGTAGCCCAGATCATAGATC
acbERev+100	CAGTACCTGCTGGCTCTG
acbE_ApaI_For	GACGGGGCCCGTACC
acbE_ApaI_Rev	GGTACGGGGCCCGTC
<b><i>acbQ</i>-Primer</b>	
acbQFor	CT <u>CATATG</u> ACCACCACGACGG
acbQF2	CGAAAGGCAAG <u>GAATTC</u> ATGACCACCACG
acbQF3	GCCTG <u>CCATGG</u> CCACCAC
acbQRev	GGTCA <u>AAGCTT</u> CAGGGTGTGGTGG
acbQRev-Stop	GT <u>AAGCTT</u> GCGCGAGGTGCGGGTGT



acbQREco	GAAAGG <u>GGATCC</u> TCAGCGAGG
<b>Heterologe Primer für die Amplifikation der <i>S. glaucescens</i> Gene*</b>	
<b><i>gacE1</i>-Primer</b>	
gacE1For	CACAGGCAGGAAC <u>CATATG</u> ACCC
gacE1For2	CAGGAAAT <u>TCATG</u> ACCCAGTAC
gacE1Rev1	CC <u>AAGCTT</u> CCCGTTGAGC
gacE1Rev2	GGG <u>GGATC</u> CTCACACCGCC
gacE1RevHis	<u>GGATCC</u> ATGATGATGATGATGATGCACCGCCCAC
<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
<b>Heterologe Primer für die Amplifikation der <i>S. glaucescens</i> Gene*</b>	
<b><i>gacE2</i>-Primer</b>	
gacE2For	CAGGAGGAC <u>CATATG</u> GCCAAC
gacE2For2	CAGGAGGAAC <u>CCATG</u> GCC
gacE2Rev	GTAGTC <u>AAGCTT</u> TCTCGATC
gacE2Rev2	GGCGGT <u>GATCC</u> GTTG
gacE2RevHis	GGGCGGC <u>GATCC</u> GCCGGCGATGATGATGATGATGATGGCCGCGC
gacE2Rev-Stop	GCGGTTCA <u>AAGCTT</u> GCCGC
<b><i>gacZ1</i>-Primer</b>	
gacZ1For	GAAGAAAGGCC <u>CATATG</u> ACCCG
gacZ1oSPFor	CTCCCGCG <u>CATATG</u> GCGCCTCCAC
gacZ1Rev	GTCCGGGA <u>AAGCTT</u> CCTTCGGTC
gacZ1RevHis	GAAGGAACCGACAAGC <u>ATCATCATCATCATTGAAAGCTTCC</u>
gacZ1Rev-Stop	CGCGCCGG <u>AAGCTT</u> GTCCG
<b><i>gacZ2</i>-Primer</b>	
gacZ2For1	CGGCGGG <u>CATATG</u> CCACGGCC
gacZ2For2	GGGG <u>CCATGG</u> CACGGCC
gacZ2oSPFor1	GACCC <u>CATATG</u> ACCGCGGCGCCCG
gacZ2oSPFor2	GACCG <u>CCATGG</u> CCGCGGCG

gacZ2Rev	CACGA <u>AAGCTT</u> GCCCCGTGC
gacZ2RevHis1	GATCCG <u>AAGCTTTCAATGATGATGATGATGATGATG</u> GCGCGTGAAC
<b><i>gaim</i>-Primer</b>	
gaimFor	GAAGT <u>CATATG</u> CACCGTTTCTGTATTC
gaimFor1oSP	CACGCC <u>CATATG</u> CAGGAGGGCGCGG
gaimFor2oSP	GAAGTG <u>CATGA</u> ACCGTTTCTG
gaimRev1	CCCGC <u>GGATC</u> CTCAGGCGC
gaimRev2	CCCGC <u>AAGCTT</u> TCAGGCGCTCGATCG
gaimRev-Stop	GG <u>GGATCC</u> GCGCTCGATC
<b><i>gacQ</i>-Primer</b>	
gacQRev-Stop	CTCAGCT <u>GGATCC</u> AGTCCGTG
gacQRevHis	GGCCCTTGCTCAGCTATGATGATGATGATGATG <u>GGATCC</u> AGTCCGTG
<b>RT-PCR Primer</b>	
garC1RTF	ATGACCATGCGGCTCGC
garC1RTR	GCAGGCGCTCACGCGT
gacHRTF	ATGCGGCGTGGCATTGC
gacHRTR	GGTCGGACCACCTTCC
garC2RTF	GTGACCCTGCCCCTCA
garC2RTR	ACGCCTGCACCAGCGC
gacE2RTF	ATGGCCAACAAGACCGTG
gacE2RTR	TCGAAGTCCGACATGGTC
gacFRTF	ATGGCTGTCGAGACCGG
gacFRTR	AGGTCGCGGGGATGTG
gacGRTF	GTGACCGACACGACTTC
gacGRTR	ACACGCCGATCAGCGTG
gacE1RTF	ATGACCCAGTACCTTGCC
gacE1RTR	ACGTCGACGATCACGCG

PHRT 16 S RNA	CTTCTTCTGCAGGTACCGTCA
PART 16 S RNA	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA

Primer für die Sequenzierreaktion	
universal primer	GTAAAACGACGGCCAGT
reverse primer	GAAACAGCTATGACCATG

\*Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide für die PCR-Reaktionen sind in Tab. 2.4 aufgeführt. Sie wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Fett geschriebene Basen kennzeichnen Basenaustausche, um Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen einzufügen, diese sind unterstrichen dargestellt.

## 2.1.5 DNA-Längen- und Proteingrößenstandard

Tab. 2.5: Marker

Name	Bezugsquelle
1 kb DNA Leiter	Roche, Mannheim
1 kb Plus DNA Leiter	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Roti-Mark 10-150 kDa PLUS	Roth, Karlsruhe
Broad Range Molecular Weight Marker	Promega GmbH, Mannheim
Prestained Broad Range	New England Biolabs, Schwalbach

## 2.1.6 Medien

### 2.1.6.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

#### Autoinduktionsmedium (Studier, 2005)

1% NZ-Amine

0,5% Hefeextrakt

pH 7; nach Abkühlen Zugabe sterilfiltrierter Lösungen:

##### **50x L-Lösung:**

12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

12,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

50 mM NH<sub>4</sub>Cl

5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

##### **50x Z-Lösung:**

0,2% Lactose

0,05% D-Glucose

0,5% Glycerin

0,2 ml/l Spurenelemente (1000x)

#### LB-Medium (Luria Bertani) (Miller, 1972)

10 g/l Trypton

10 g/l NaCl

5 g/l Hefeextrakt

pH 7

#### LB-Betain/Sorbitol-Medium (Chen *et al.*, 1999)

LB-Medium

2,5 mM Betain

1 M D-Sorbitol

#### LB-Agar (Miller, 1972)

LB-Medium

15 g/l Agar

pH 7

#### MacConkey Agar (MacConkey, 1905)

30 g/l MacConkey Agar Base supplementiert mit 1%iger C-Quelle

**Fortsetzung 2.1.6.1 Medien zur Anzucht von *E. coli***

**Minimal-Medium**

**Lösung A**

53,13 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ dH}_2\text{O}$   
115 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
26,4 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

**Lösung B**

1 ml/l HCL  
36 mg/l  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   
7,4 mg/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   
13,5 mg/l  $\text{ZnCl}_2$   
147 mg  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ dH}_2\text{O}$

Es wurden 10 ml von Lösung B in 890 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  (eventuell mit 18 g Agar zur Herstellung von Platten supplementiert) sowie 100 ml Lösung A getrennt von einander autoklaviert und nach Abkühlen vereinigt.

**M9-Minimalmedium (Sambrook & Russel, 2001)**

6 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
3 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
0,5 g/l NaCl  
pH 7,4; nach Abkühlen Zugabe sterilfiltrierter Lösungen:  
(10 ml/l) D-Glucose (40%)  
(1 ml/l)  $\text{MgSO}_4$  (1 M)  
(1 ml/l)  $\text{FeSO}_4$  (4,2 g/l)  
(1 mg/l) Thiamin

**Rich LB-Medium (Richter & Loewen, 1982)**

20 g/l Trypton  
5 g/l NaCl  
10 g/l Hefeextrakt  
2 ml/l Glycerin  
50 mM K- $\text{PO}_4$ -Puffer pH 7,2

**SLANT Medium (Miller, 1972)**

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
5 ml/l Glycerin (20%)

**Fortsetzung 2.1.6.1 Medien zur Anzucht von *E. coli***

**SLANT 50/50 Medium (Miller, 1972)**

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
500 ml/l Glycerin (20%)

**SOB (Hanahan, 1983)**

20 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
0,58 g/l NaCl  
0,19 g/l KCl  
nach Abkühlen Zugabe von:  
10 ml/l  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  (1M)  
10 ml/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (1M)

**SOC (Hanahan, 1983)**

3,6 g/l D-Glucose zu SOB

**Spurenelemente-Lösung (1000x) (Studier, 2005)**

20 mM  $\text{CaCl}_2$   
10 mM  $\text{MnSO}_4$   
10 mM  $\text{ZnSO}_4$   
2 mM  $\text{CoCl}_2$   
2 mM  $\text{CuCl}_2$   
2 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
2 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   
2 mM  $\text{NiCl}_2$

Von jeder Komponente wurde zunächst eine 0,1 M oder 1 M Stammlösung angesetzt.

**TB-Medium (Tartoff & Hobbs, 1987)**

12 g/l Trypton  
24 g/l Hefeextrakt  
4 ml/l Glycerin  
nach Abkühlen:  
2,31 g/100 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
12,54 g/100 ml  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

**2YT-Medium (Sambrook & Russel, 2001)**

16 g/l Trypton  
10 g/l NaCl  
10 g/l Hefeextrakt

Sämtliche Medien wurden ausschließlich mit Milli Q-Wasser angesetzt und durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C sterilisiert.

### 2.1.6.2 Medien zur Anzucht von Actinomyceten

#### Acarbose-Produktionsmedium (Rockser & Wehmeier, 2009)

##### Lösung I

70 g Cere-Star  
5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
2 g Hefeextrakt  
ad 400 ml  $\text{dH}_2\text{O}$

##### Lösung II

1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
5 g Tri-Na-Citrat  
ad 400 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  pH 7

##### Lösung III

1 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
0,24 g  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
2 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
ad 200 ml  $\text{dH}_2\text{O}$

Alle drei Lösungen sind zu vereinen und sterilzufiltrieren.

#### Acarbose-Produktionsmedium (Soo Shin, 2003)

##### Vorkultur-Medium

1,8% Glycerin  
1,8% Dextrin  
2% Sojabohnenmehl  
0,2%  $\text{CaCO}_3$   
pH 7 (1N NaOH)

##### Fermentations-Medium

3% D-Glucose  
14% Maltose  
4% Sojabohnenmehl  
0,7% Hefeextrakt  
0,3% NZ Amin  
0,3%  $\text{CaCO}_3$   
0,06%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
pH 8 (1N NaOH)

**Fortsetzung: 2.1.6.2 Medien zur Anzucht von Actinomyceten**

**Medium zur Sekretion extrazellulärer Enzyme (Handbook of Amylases and related Enzymes, 1988)**

1,2% lösliche Stärke  
0,75% CH<sub>3</sub>COONH  
0,2% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,05% MgSO<sub>4</sub>  
0,05% KCl  
0,04% Pepton  
0,001% FeSO<sub>4</sub>

**Minimal-Medium (Hodgson, 1982)**

2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
5 g Difco-Casaminoacids  
0,6 g MgSO<sub>4</sub>  
50 g PEG6000  
1 ml Spurenelement-Lösung  
ad 800 ml dH<sub>2</sub>O, Aliquots a 80 ml  
nach Abkühlen:  
15 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KHPO<sub>4</sub>-Puffer (0,1 M) pH 6,8  
2,5 ml C-Quelle (20%)

**Minimual-Medium (Kieser *et al.*, 2000)**

L-Asparagine  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
MgSO<sub>4</sub>  
FeSO<sub>4</sub>  
pH 7-7,2  
nach Abkühlen:  
1% C-Quelle



**Fortsetzung: 2.1.6.2 Medien zur Anzucht von Actinomyceten**

**Minimal-Medium (Neumann, 1995)**

5,75 g Tris  
1 g NaCl  
2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,5 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,2 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
0,1 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
ad 894 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,2 (20% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Aliquots a 89,4 ml, nach Abkühlen:  
Spurenelement-Lösung (1000x)  
5 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 M pH 7,2)  
100 ml Asparaginsäure (10% pH 7,2)

**MNS-Minimalmedium mit Spurenelement-Lösung (Neumann, 1995)**

5,7 g/l TrisHCl  
1 g/l NaCl  
2 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,5 g/l K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0,2 g/l MgSO<sub>4</sub>  
0,1 g/l CaCl<sub>2</sub>  
0,34 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,2 (20% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), nach Abkühlung:  
10 ml Spurenelement-Lösung und 0,5% einer C-Quelle

**M65-Medium (DSMZ, Braunschweig)**

4 g/l D-Glucose  
4 g/l Hefeextrakt  
10 g/l Malzextrakt  
2 g/l CaCO<sub>3</sub>

**NBS-Medium (Bayer Healthcare AG, Wuppertal)**

40 g/l Saccharose  
10 g/l D-Glucose  
4 g/l Pepton  
4 g/l Hefeextrakt  
0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>  
2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
4 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**NBS-Agar (Bayer Healthcare AG, Wuppertal)**

NBS-Medium  
15 g/l Agar

**Fortsetzung: 2.1.6.2 Medien zur Anzucht von Actinomyceten**

**R2YE-Medium (Kieser *et al.*, 2000)**

103 g Saccharose  
10 g D-Glucose  
10,12 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
0,25 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$   
0,1 g Casaminoacids  
5 g Hefeextrakt  
ad 980 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , nach Abkühlen:  
1 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5%)  
8 ml  $\text{CaCl}_2$  (3,68%)  
1,5% L-Prolin (20%)  
10 ml TES (5,73% pH 7,2)  
0,2 ml Spurenelement-Lösung  
0,5 ml NaOH (1 N)

**R2YE-Agar (Kieser *et al.*, 2000)**

R2YE-Medium  
15 g/l Agar

**R5-Medium (Kieser *et al.*, 2000)**

103 g/l Saccharose  
10 g/l D-Glucose  
0,25 g/l  $\text{K}_2\text{SO}_4$   
10,12 g/l  $\text{MgCl}_2$   
0,1 g/l Casaminoacids  
2 g/l Spurenelement-Lösung (1000x)  
5 g/l Hefeextrakt  
5,73 ml TES  
nach Abkühlen:  
1 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5%)  
0,4 ml  $\text{CaCl}_2$  (5 M)  
1,5 ml L-Prolin (20%)  
0,7 ml NaOH (1 N)

**SMA-Agar (Distler *et al.*, 1985)**

20 g/l Sojabohnenmehl  
20 g/l Mannitol  
20 g/l Agar  
ad Leitungswasser

**Fortsetzung: 2.1.6.2 Medien zur Anzucht von Actinomyceten**

**SPMR-Medium (Babcock & Kendrick, 1988)**

Saccharose  
5 g/l D-Glucose  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l  $MgCl_2$   
20 ml/l TES (1 M) pH 7,6  
2 ml Spurenelement-Lösung (1000x)  
nach Abkühlen:  
2 ml  $CaCl_2$  (5 M)

**SPMR-Agar (Babcock & Kendrick, 1988)**

SPMR-Medium  
15 g/l Agar

**Spurenelement-Lösung (1000x) (Kieser *et al.*, 2000)**

1 g/l  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$   
1 g/l  $FeSO_4 \times 7 H_2O$   
1 g/l  $MnCl_2 \times 4 H_2O$   
1 g/l  $CaCl_2$  anhydrous

**Stärke-Medium (Wehmeier & Rockser, unpublished)**

0,5 g/l  $(NH_4)_2SO_4$   
0,5 g/l  $K_2HPO_4$   
0,2 g/l  $MgSO_4$   
0,01 g/l  $FeSO_4$   
0,1% Stärke

**TSB-Medium (Kieser *et al.*, 2000)**

30 g/l Trypton Soya Broth (Oxoid)

**TSB/PEG5000-Medium (Babcock & Kendrick, 1988)**

30 g/l Trypton Soya Broth (Oxoid)  
0,5% Glycin  
5 mM  $MgCl_2$

**TSB-Agar (Kieser *et al.*, 2000)**

TSB-Medium  
15 g/l Agar

### **Fortsetzung: 2.1.6.2 Medien zur Anzucht von Actinomyceten**

#### **YEME-Medium (Kieser *et al.*, 2000)**

3 g/l Hefeextrakt  
5 g/l Pepton  
3 g/l Malzextrakt  
10 g/l D-Glucose  
34%, 10%, 4% Saccharose  
nach Abkühlen:  
1 ml/l MgCl<sub>2</sub> (1 M)  
5 ml/l Glycine

#### **YEME-Agar (Kieser *et al.*, 2000)**

YEME-Medium  
15 g/l Agar

#### **YMA-Medium (Kieser *et al.*, 2000)**

1% Hefeextrakt  
1% Malzextrakt  
3% lösliche Stärke

Sämtliche Medien wurden, wenn nicht anders erwähnt mit Milli Q-Wasser angesetzt und durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C sterilisiert.

## 2.1.7 Lösungen und Puffer

### Zur Isolierung von Plasmid-DNA

**Alkalische Lyse Lösungen** (modifiziert nach Birnboim & Doly, 1979)

**Lösung I**

50 mM D-Glucose  
50 mM Tris-HCl pH 8  
10 mM EDTA pH 8

**Lösung II**

1% (w/v) SDS  
200 mM NaOH

**Lösung III**

3 M Kaliumacetat  
1,8 M Ameisensäure

**STET-Puffer** (Sambrook & Russel, 2001)

80 g/l Saccharose  
50 ml/l Triton-X  
50 mM Tris-HCl pH 8  
50 mM EDTA pH 8

### Herstellung und Transformation von Protoplasten

**P-Puffer** (Chater *et al.*, 1982)

103 g Saccharose  
0,25 g  $K_2SO_4$   
2,02 g  $MgCl_2$   
ad 800 ml  $dH_2O$ , Aliquots a 80 ml, nach Abkühlen:  
1 ml  $K_2HPO_4$  (0,5%)  
10 ml  $CaCl_2$  (3,68%)  
10 ml TES (5,73%) pH 7,2

**T-Puffer** (Babcock & Kendrick, 1988)

25 ml Saccharose (10,3%)  
1 ml  $K_2SO_4$  (2,5%)  
75 ml  $dH_2O$   
0,2 ml Spurenelemente-Lösung  
ad 100 ml  $dH_2O$ , Aliquots a 9,3 ml, nach Abkühlen:  
0,2 ml  $CaCl_2$  (5 M)  
0,5 ml TM-Puffer

**TM-Puffer** (Kieser *et al.*, 2000)

1 M Tris, der pH 8 wurde mit Maleinsäure eingestellt

### Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook & Russel, 2001)

#### **TAE-Puffer (50x)**

242 g/l Tris-HCl pH 8  
57,1 ml/l Eisessig  
0,4 g/l EDTA

#### **DNA-Ladungspuffer (10x)**

0,5 g/l Saccharose  
160 mM EDTA pH 8  
0,5 mg/ml Bromphenol Blau  
0,5 mg/ml Xylene Cyanol

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Schägger & von Jagow, 1987)

#### **Probenpuffer (10x)**

4% (w/v) SDS  
12% (w/v) Glycerin  
Tris-HCl pH 6,8  
50 mM 2-Mercapthoethanol  
0,01% (w/v) Serva Blue G

#### **49,5%T/3%C PAA-Lösung**

480 g/l Acrylamid  
15 g/l N-N Bisacrylamid

#### **Gel-Puffer**

3 M Tris-HCl pH 8,4  
0,3% (w/v) SDS

#### **Anoden-Puffer**

0,2 M Tris-HCl pH 8,9

#### **Kathoden-Puffer**

0,1 M Tris  
0,1 M Tricin  
0,1% (w/v) SDS

#### **Kolloidale-Coomassie-Färbung**

##### Lösung 1

5% (w/v) Brilliant Blue G-250 in dH<sub>2</sub>O

##### Lösung 2

2% (w/v) Ortho-Phosphorsäure  
10% (v/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
2% von Lösung 1 in Lösung 2

#### **Coomassie-Färbe-Lösung**

20 ml Methanol  
80 ml Coomassie-Färbung

**Fortsetzung: 2.1.7 Lösungen und Puffer**

**Western-Blotting und Immunodetektion**

**TBS (20x)**

3 M NaCl  
200 mM Tris-HCl pH 7,5

**TBSTT (10x)**

5 M NaCl  
200 mM Tris-HCl pH 7,5  
2% (v/v) Triton-X 100  
0,5% (v/v) Tween-20

**Block-Lösung**

3% (w/v) BSA in TBS

**Blotting-Puffer**

48 mM Tris-HCl pH 7,5  
39 mM Glycine  
20% Methanol

**Colorimetrische Detektion**

120 µl NBT  
120 µl BCIP  
500 µl AP Puffer (20x)  
ad 10 ml dH<sub>2</sub>O

**Zellaufschluss-Puffer**

**Puffer A**

50 mM Tris-HCl pH 7,5  
1 mM DTT  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
3 mM 2-Mercaptoethanol

**Puffer B**

150 mM NaCl  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
50 mM Tris-HCl pH 7,5  
5% Glycerin  
1 mg/ml Lysozym

**Puffer zur Proteinreinigung**

**Wasch-Puffer**

20 mM Tris-HCl pH 7,5  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
250 mM NaCl  
10-50 mM Imidazol

**Elutions-Puffer**

siehe Wasch-Puffer  
250 mM Imidazol

**Fortsetzung: 2.1.7 Lösungen und Puffer**

**Puffer zur Proteinreinigung unter native Bedingungen**

**Lyse-Puffer**

50 mM Na-PO<sub>4</sub>-Puffer pH 8  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol

**Wasch-Puffer**

siehe Lyse-Puffer  
20 mM Imidazol

**Elutions-Puffer**

siehe Lyse-Puffer  
250 mM Imidazol

**Puffer zur Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen**

**Lyse-Puffer (B)**

10 mM Tris-HCl pH 8  
100 mM Na-PO<sub>4</sub>-Puffer  
8 M Harnstoff

**Wasch-Puffer (C)**

siehe Lyse-Puffer pH 6,3

**Elutions-Puffer (E)**

siehe Lyse-Puffer pH 4,5

**Dialyse-Puffer**

10 mM Tris-HCl pH 8  
100 mM Na-PO<sub>4</sub>-Puffer

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden ausschließlich mit Milli Q-Wasser angesetzt und für Arbeiten mit DNA, RNA und für Kulturmedien durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C sterilisiert. Für Arbeiten mit RNA wurden diese zuvor mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt.



## 2.1.8 Antibiotika und Medienbestandteile

Tab. 2.6:

Antibiotikum	Endkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ampicillin (Amp)	100
Apramycin (Apra)	25-50
Chloramphenicol <sup>1</sup> (Cam)	25
Gentamicin (Genta)	20
Hygromycin B (Hyg)	25-50
Kanamycin (Kan)	50
Nalidixinsäure	40
Rifampicin <sup>2</sup> (Rif)	400
Tetracyclin <sup>1</sup> (Tet)	25
Thiostrepton <sup>3</sup> (Thio)	25-50
Tobramycin (Tob)	10
Medienbestandteile	Endkonzentration
IPTG	0,2 mM
L-Rhamnose	0,2%
X-Gal <sup>2</sup>	0,5 mM

<sup>1</sup> in 30% Ethanol, <sup>2</sup> in DMF, <sup>3</sup> in DMSO.

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Anzucht von *E. coli*

Die verschiedenen Stämme und Transformanten wurden durch Ausstriche von Dauerkulturen bzw. Ausstriche von Transformationsansätzen auf LB-Agar-Platten angezogen. Zur Selektion wurde das Medium mit verschiedenen Antibiotika supplementiert (Tab. 4.6). Von diesen Platten erfolgte zunächst die Inokulation von 2-5 ml Flüssigmedium im Glasröhrchen zur Vorkultivierung der Zellen bei 37°C ÜN. Die Hauptkulturen (10-500 ml) wurden in Glaskolben unter guter Belüftung bei 250 rpm in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Das Wachstum wurde durch Messung der Optischen Dichte bei 595 nm an einem Spektralphotometer verfolgt.

### 2.2.2 Anzucht von Actinomyceten

Die Kultivierung von Streptomyceten, *Actinoplanes* sp. SE50/110 und SN223/29 erfolgte aus Sporen- bzw. Mycelsuspension auf SMA-Agar-Platten unter dem entsprechenden Selektionsdruck. Die Platten wurden 48-72 h bei 30°C im Brutschrank bebrütet. Die Inokulation von Flüssigmedium fand, wenn nicht anders erwähnt, direkt in einer Hauptkultur von 10-1000 ml in Schikanekolben bei starker Belüftung bei 190 rpm und 28°C für 96-120 h statt.

### 2.2.3 Herstellung von Dauerkulturen und Sporensuspensionen

*E. coli* Stämme wurden in 10 ml SLANT-Medium im Glasröhrchen bei 37°C ÜN kultiviert. Die stationäre Übernachtskultur wurde bei 5000g sedimentiert, in 2 ml SLANT 50/50-Medium resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung von Sporensuspensionen wurden die Stämme und Transformanten von *Streptomyces* sp. zur Sporulation auf SMA-Platten ausgestrichen. Die Sporen wurden von dem Substratmycel mit einer sterilen Impföse gelöst und mit einer 20%igen Glycerin-Lösung (v/v) von der Platte gespült. Die Sporensuspension wurde durch sterile Watte filtriert und bei -20°C gelagert. Plasmid tragende Stämme wurden stets unter entsprechendem Selektions-druck kultiviert.

Um eine Mycelsuspension von *Actinoplanes* sp. herzustellen wurde dieser auf SMA-Platten kultiviert, das Mycel wurde mit einer sterilen Impföse gelöst und in 20%iger Glycerin-Lösung (v/v) aufgenommen.

### 2.2.3.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden nach Hanahan (1983) oder mittels der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Sambrook and Russel, 2001) hergestellt. Die Transformation erfolgte analog zu Sambrook and Russel (2001). In den Transformationsansatz wurden 100 µl Zellsuspension und 0,01-1 µg DNA eingesetzt. Die Zellen wurden in SOC- oder LB-Medium regeneriert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Zur Blau/Weiß-Selektion wurden die Platten zusätzlich mit X-Gal und/oder IPTG versetzt.

### 2.2.3.2 Herstellung und Transformation von *Streptomyces* sp. Protoplasten

Die Protoplastierung und Transformation von *S. lividans* erfolgte nach der Methode von Babcock und Kendrick (1988), wobei die Zellen in TSB-PEG8000 bei 28°C 24-36 h angezogen wurden. Das Mycel wurde durch Zentrifugation bei 3000g sedimentiert, zweifach in 10,3% Saccharose-Lösung gewaschen und in P-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 37°C etwa 10-60 min inkubiert bis mikroskopisch die Protoplastierung der Zellen ersichtlich war. Nach Zugabe von weiteren 5 ml P-Puffer wurde die Zellsuspension durch sterile Watte filtriert, bei 3000g sedimentiert und in 1 ml P-Puffer resuspendiert. Die Protoplasten wurden zu 100 µl aliquotiert, ÜN bei -20°C verwahrt und dann bei -80°C gelagert oder direkt zur Transformation eingesetzt.

Zur Transformation wurden die Protoplasten schnell bei RT aufgetaut und bei 4000g 7 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in P-Puffer resuspendiert, mit 100 µg Plasmid-DNA und 200 µl T-Puffer/PEG versetzt und behutsam gemischt. Nach der weiteren Zugabe von 1 ml P-Puffer wurden die Zellen auf SPMR-Platten zur Regeneration ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. War die Regeneration nach 12-36 h ersichtlich, wurden die Platten mit 2 ml P-Puffer und dem entsprechenden Antibiotikum überschichtet, umso die Zellen unter dem entsprechenden Selektionsdruck zu kultivieren.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### 2.3.1.1 Allgemeine PCR-Bedingungen

Sämtliche PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) unter Verwendung der unter 2.1. aufgeführten DNA-Polymerasen durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt in einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammen: 50-100 ng Template (Cosmid-DNA bzw. Plasmid-DNA), 50 pmol je Primer, 0,2 mM dNTP-Lösung, 1x PCR-Puffer, 10% DMSO und 2,5 U DNA-Polymerase. Die "Annealing"-Temperatur der Primer wurde mithilfe des Programms PrimerX ([www.primerx.com](http://www.primerx.com)) berechnet. Nach der Reaktion wurde der Ansatz zur Analyse und Reinigung der amplifizierten DNA-Fragmente auf ein Agarosegel aufgetragen.

Tab. 2.2.1:

Wiederholungen	Temperatur	Zeit	Reaktionsschritt
	98°C	3 min	Start-Denaturierung
5 x	95°C	30 sec	Denaturierung I
	55-60°C	1 min	Primer- <i>annealing</i> I
	72°C	1 min/kbp	Elongation I
35 x	95°C	30 sec	Denaturierung II
	60-65°C	1 min	Primer- <i>annealing</i> II
	72°C	1 min/kbp	Elongation II
	72°C	10 min	Endsynthese
	10°C	∞	Lagerung

*Taq*-DNA-Polymerase wurde nach der Start-Denaturierung zugefügt.

#### 2.3.1.2 RT-PCR

Die RT-PCR umfasst die Reverse Transkription (RT) von RNA mittels sequenzspezifischer Primer und anschließender PCR zur Amplifikation der DNA-Sequenzen. Die RT-PCR Reaktion wurde mithilfe des "OneStep RT-PCR Kits" (Qiagen, Hilden), gemäß den Angaben des Herstellers angesetzt. Zwei weitere Reaktionen wurden ohne Reverse Transkriptase bzw. RNA-Template als Negativkontrollen durchgeführt. Die RNA-Proben wurden so auf DNA-Kontamination geprüft. Zur weiteren Kontrolle wurde 16S rRNA mit den Primern PHRT und PART amplifiziert (Tab. 2.4).

### 2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Methode von Sambrook & Russel (2001) in einer horizontalen Flachbettkammer. Dafür wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet, die mit TAE-Puffer unter Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gegossen wurden. Die durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Moleküle wurden anschließend auf dem Transilluminator mit parallel aufgetrennten DNA-Längenstandards verglichen (Tab. 4.5).

Um die Ethidiumbromidfärbung zu umgehen, wurden die PCR-Produkte alternativ in Methylenblau-Lösung (0,04% in dH<sub>2</sub>O) 30 min gefärbt und in dH<sub>2</sub>O entfärbt.

### 2.3.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels des "Gelextraction Kit" (Genscript, NJ, USA). Das gewünschte Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und gemäß nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1/10 des Probenvolumens in einem Kontrollgel aufgetrennt und im Vergleich zum DNA-Längenstandard abgeschätzt.

### 2.3.4 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde gemäß den Herstellerangaben, im empfohlenen Puffer und dem entsprechenden Temperaturoptimum für das jeweilige Enzym durchgeführt. In der Regel betrug die Inkubationszeit 1-3 h.

### 2.3.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zum Teil wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende der hydrolysierten DNA mittels alkalischer Phosphatase entfernt, umso die Ligation von Vektor und DNA-Fragment zu begünstigen. Dazu wurde hydrolysiertes Vektor mit alkalischer Phosphatase und dem dazugehörigen Puffer versetzt und 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert.

### 2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten und linearisiertem Vektor erfolgte mittels T4-DNA-Ligase. Das Verhältnis von Vektor zu DNA betrug 1:3. Die Ligation wurde, gemäß den Herstellerangaben ÜN bei 16°C durchgeführt.

### 2.3.7 Isolation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde aus stationären 1,5 ml *E. coli* Kulturen gewonnen. Die Isolation der DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse nach Birnboim & Doly (1979) oder wurde mithilfe des "Miniprep Kits" (Genscript, NJ, USA) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Plasmidisolation aus Streptomycceten wurde analog zur alkalischen Lyse durchgeführt, dabei wurde Lösung I zusätzlich mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und die Inkubationszeit verlängert.


### 2.3.8 Isolation von Gesamt-RNA aus Streptomyceten

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte aus 2 ml Flüssigkultur. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und mit "RNAprotect Bacteria Reagent"-Lösung (Qiagen, Hilden) behandelt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde mithilfe des "RNeasy Total RNA Kits" (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers präpariert und, nach zusätzlicher einstündiger DNase I-Spaltung bei 37°C, bei -20°C gelagert.

### 2.3.9 DNA Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der nicht-radioaktiven Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mithilfe des A.L.F.Express-Sequenzierers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung eines 6 M Harnstoff/6% "HydroLink Long Ranger"-Gels (Biozym, Hessisch Oldendorf). Für die Sequenzreaktion wurde das "Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit" (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) sowie Oligonucleotide (Tab. 2.4) und Plasmide (Tab. 2.3) verwendet. Folgendes Programm wurde für die Sequenzierreaktion verwendet:

Tab. 2.2.9:

Wiederholungen	Temperatur	Zeit
30 x 	98°C	5 min
	95°C	10 sec
	58°C	45 sec
	68°C	1 min 20 sec
	68°C	1 min

Alternativ wurde die DNA-Sequenzierung von der Firma GATC-Biotech (Konstanz) durchgeführt.

#### 2.3.9.1 Computeranalyse von Sequenzdaten

Die durch Sequenzanalyse erhaltenen Daten wurden zunächst mit dem Programm "Alfwin Software Version 2.10.6" (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgearbeitet. Für die Datenbank-Recherche in den Datenbanken EMBL, SwissProt, TrEMBL und TrEMBL\_NEW wurden die Programme BLAST (Altschul *et al.*, 1990) und omniBLAST benutzt. Das "Alignment" von zwei oder mehreren DNA- oder Proteinsequenzen wurde mithilfe der Programme BLAST2sequences ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Tatusova & Madden, 1999) und ClustalW ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt.

Zur Identifizierung von Signalpeptiden wurden die Programme SignalP ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) (Nielsen *et al.*, 1997), SignalPeptidePrediction ([http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot\\_analysis/Signal.html](http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html)) und Clone Manager5, zur Planung von Klonierungen und Restriktionen und zur Suche nach offenen Leserastern, genutzt.

### 2.3.10 Heterologe Genexpression in *E. coli* und *S. lividans*

#### 2.3.10.1 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter der Kontrolle des T7-Promotors

Zur heterologen Protein-Produktion wurden Expressionsstämme von *E. coli*, die das Gen für die DNA-abhängige-RNA-Polymerase des Phagen T7 unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors besitzen, mit entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert (Studier *et al.*, 1990). Der T7 $\Phi$ 10-Promotor des Bakteriophagen T7 wird durch die T7-RNA-Polymerase abgelesen (Tabor & Richardson, 1985). Die Expression des T7-RNA-Polymerasegens wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,4 oder 1,0 mM) bzw. Lactose (0,2-0,4%) induziert. Für die heterologe Überexpression plasmidcodierter Gene wurden entsprechende Flüssigmedien bei 595 nm zu einer Optischen Dichte (OD) von 0,1 mit der Vorkultur angeimpft und dann bei einer OD<sub>595nm</sub> von 0,5-1,0 induziert. Bei Verwendung des pGP1-2 Vektors wurde die Expression des T7-RNA-Polymerasegens durch Hitze bei 42°C für 30 min induziert. Die Zellen wurden dann weiter bei 30°C mit Rifampicin kultiviert. Diese Möglichkeit der heterologen Genexpression wurde genutzt, um in dem *E. coli* Stamm CB39 (Amylomaltase Mutante) die putative Amylomaltase AcbQ aus *Actinoplanes* sp. zu produzieren. Es wurden 1,5 ml der Kultur zentrifugiert, das Sediment ohne Überstand wurde bei -20°C gelagert, der Überstand wurde bis zur weiteren Analyse bei 4°C verwahrt.

#### 2.3.10.2 Heterologe Genexpression in *E. coli* unter der Kontrolle des Promotors P<sub>rhaBAD</sub>

Die Vektoren pJOE2702, pJOE2775 und pAC2775 wurden für die Genexpression unter der Kontrolle des L-Rhamnose induzierbare Promotors P<sub>rhaBAD</sub> (Egan und Schleif, 1993) verwendet. Zur heterologen Überexpression konnten die in Tab. 2.1 genannten *E. coli* Stämme eingesetzt werden. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 0,2-0,4% (w/v) steriler L-Rhamnose bei einer OD<sub>595</sub> von 0,4-0,5.

Im Besonderen wurden verschiedene Expressions-Protokolle mit *E. coli* Expressionsstämmen durchgeführt. Die Plasmid tragende Stämme wurden stets unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert.

Tab. 2.2.10:

Expressionsprotokoll bzw. Medium	Beschreibung
LB- und TB-Medium	Die Expressionskultur wurde mit einer stationären Vorkultur inokuliert und bei folgenden Temperaturen kultiviert: 37°C, 28°C, 20°C oder 12°C. Die Induktion erfolgte bei OD <sub>595</sub> von 0,5.
Betain-Sorbitol	Die Expressionskultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und ÜN bei 28°C bzw. 37°C inkubiert. Die Induktion erfolgte dann bei OD <sub>595</sub> von 0,5, die Kultur wurde ÜN bei folgenden Temperaturen kultiviert: 37°C, 28°C, 20°C oder 12°C.

Fortsetzung: Tab.2.2.10:

Expressionsprotokoll bzw. Medium	Beschreibung
Autinduktionsmedium	Die Expressionskultur wurde mit einer stationären Vorkultur inokuliert oder die Expressionskultur wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und ÜN bei 37°C inkubiert. War die OD <sub>595</sub> von 0,5 erreicht, wurden die Zellen induziert und weitere 24 h bei folgenden Temperaturen kultiviert: 37°C, 28°C, 20°C oder 12°C.
ArcticExpress	Die Expressionskultur wurde mit einer stationären Vorkultur inokuliert, war die OD <sub>595</sub> von 0,5 erreicht, wurde die Kultur für ca. 15 min auf 12°C gekühlt und induziert. Alternativ wurde die Expressionskultur bis zu einer OD <sub>595</sub> von 0,5 bei 12°C oder 20°C kultiviert, dann wurde induziert und weitere 24 h bei 12°C inkubiert.
pGP1-2 und Expressionsplasmid	Die Expressionsplasmide wurden bei 30°C in pGP1-2 tragende DH5 $\alpha$ , JM109 oder CB39 transformiert. Die Kultur wurde bei 30°C bis zum Erreichen einer OD <sub>595</sub> 0,5 kultiviert. Die Induktion fand bei 42°C für 15-30 min statt. Zur weiteren Optimierung wurde die Kultur mit Rifampicin angezogen, da die T7-RNA-Polymerase nicht gehemmt wurde. Die Kultur wurde dann weiter bei 30°C oder 37°C inkubiert.

### 2.3.10.3 Heterologe Genexpression in *S. lividans*

Die heterologe Genexpression unterliegt in den pUWL-Plasmiden (Doumith *et al.*, 2000; Blaesing *et al.*, 2005) sowie im Vektor pHM8a (Motamedi *et al.*, 1995) der Kontrolle des konstitutiven Promotors  $P_{ermE^*}$  (Bibb *et al.*, 1985). *S. lividans* Stämme wurden mit den Plasmiden (Tab. 2.2 bzw. Tab. 2.3) transformiert und in verschiedenen Medien bei 28°C für 24-96 Stunden kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Die Zellen wurden zur Trennung von Sediment und Überstand zentrifugiert, um die sekretierten Enzyme zu analysieren. Das Mycel wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C und der Überstand bei 4°C gelagert.

Das auf dem Thiostrepton-induzierbaren  $P_{tipA}$  Promotor (Murakami *et al.*, 1989) basierende Expressionssystem der pIJ-Vektoren (Takano *et al.*, 1995) wurde zur Expression in *S. lividans* 1326 und TK64 benutzt. Das System wird mit 20  $\mu$ g/ml Thiostrepton induziert. Die Kulturen wurden in verschiedenen Medien bei 28°C für 24-96 h angezogen. Die Probenentnahme erfolgt zu verschiedenen Zeitpunkten. Auch hier wurden Sediment und Überstand zur Analyse herangezogen.



## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zellsuspensionen von *E. coli* sowie aus Actinomyceten Kulturen wurden pelletiert und in Zellaufschluss-Puffer (siehe 2.1.7) resuspendiert. Anschließend wurden diese stets auf Eis gekühlten Zellsuspensionen durch kurze Ultraschall-Behandlung (bei *E. coli*: drei Zyklen a 15 sec, bei Actinomyceten: drei Zyklen a 30-60 sec) aufgeschlossen. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurden die erhaltenen Rohextrakte fraktioniert, dabei wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Bestandteilen wie Zelltrümmer, nicht aufgeschlossene Zellen und Einschlusskörperchen durch Zentrifugation bei 15000g, 4°C für 30 min getrennt. Die verschiedenen Fraktionen wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese vergleichend analysiert. Proteinextrakte aus dem Überstand wurden durch Konzentratoren (Vivascience, Stonehouse, U.K.) verdichtet, wobei sich das Ausschluss-Molekulargewicht nach dem Protein richtete (50 kDa bzw. 100 kDa). Denaturierend wurden die Proteine aus dem Überstand mit 20% TCA-Lösung irreversibel gefällt, mit Aceton gewaschen und ebenfalls durch SDS-PAGE analysiert.

### 2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte wurde mit dem Bradford-Reagenz (Roth, Karlsruhe) nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Die Eichgerade wurde mit BSA erstellt und bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen.

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinextrakten unter denaturierenden Bedingungen fand in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der Methode von Schägger & von Jagow (1987) statt. Diese enthielten im Sammelgel 4% T/3% C. Je nach Probe wurden 8%ige bzw. 15%ige Trenngele verwendet, die zusätzlich noch 13,3% Glycerin enthielten. Um die Polymerisation zu starten wurden Ammoniumpersulfat und TEMED in einer Endkonzentration von 0,05% und 0,005% zugesetzt. Der Gellauf erfolgte in Kathoden- und Anoden-Puffer, bei einer Spannung von 80-150 V. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen an 2x Probenpuffer versetzt und mit dem Protein-Standard (Tab. 4.5) 5 min bei 95°C denaturiert. Die Gele wurden in Coomassie-Lösung für 2 h oder ÜN gefärbt und in dH<sub>2</sub>O entfärbt.

### 2.4.4 Western-Blot und Immundetektion

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der Semi-Dry-Methode (Kyhse-Anderson, 1984) auf Hybond P-Membran (Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert. Dabei wurde ein kontinuierliches Puffer-System (Lihme *et al.*, 1986) verwendet, bei dem nur die in Blotpuffer getränkten Lagen Whatman-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) zwischen zwei Elektroden einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München) als Pufferreservoir dienen. Zwischen den Elektroden wurde ein homogenes elektrisches Feld erzeugt, worin die Proteine bei einer Stromstärke von 250 mA für 25 min aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf Hybond P-Membran übertragen wurden. Die Membran wurde in 3% BSA in TBS-Puffer für 1 h oder ÜN rotierend inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu

sättigen. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 min mit TBST-Puffer und einmal in TBS-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem monoklonalen His-Tag Antikörper (Novagen, Bad Soden) in einer 1:1500 Verdünnung in BSA-TBS-Puffer für 1 h bei RT. Durch erneutes Waschen wurde überschüssiger erster AK entfernt, daraufhin wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (Anti-Maus-IgG Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase, Novagen, Baden Soden) 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion/Exposition erfolgte mit NBT/BCIP-Lösung (Roche, Mannheim).

### 2.4.5 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung erfolgte über immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). Die Anreicherung wurde unter denaturierenden oder wahlweise unter nativen Bedingungen über das C-terminale 6x His-Tag (pJOE2775, pET22) oder ein N-terminales 10x His-Tag (pET16, pAC16 und pUWLHis) über Ni-NTA-Säulchen (Qiagen, Hilden) oder im "Batch"-Verfahren mit Ni-NTA-Agarose (Sigma-Aldrich, München) durchgeführt. Die Reinigung über Ni-NTA-Säulchen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Für das "Batch"-Verfahren wurde die Ni-NTA-Agarose mit 1 Vol. dH<sub>2</sub>O gewaschen und bei 5000g, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde mit 10 Vol. des Lyse- bzw. Wasch-Puffers äquilibriert. Die Agarose wurde dann mit dem Proteinextrakt 15-60 min bei 4°C rotierend inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Ni-NTA-Agarose mehrfach mit 10 Vol. Wasch-Puffer gewaschen. Zur Elution wurden 2 Vol. Elutions-Puffer zugesetzt und für 30-120 min oder ÜN rotierend inkubiert. Das Eluat wurde durch Zentrifugation erhalten und gegebenenfalls durch Konzentratoren verdichtet. Erfolgte die Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen, wurde anschließend zur Renaturierung und Entsalzung eine Dialyse der Proben ÜN bei 4°C in Dialysepuffer (siehe 2.7) durchgeführt. Der Gehalt an Fusionsprotein wurde durch Gelanalyse und Proteinbestimmung ermittelt.

### 2.4.6 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Glycosylhydrolasen (GH13)

Die Enzymaktivität von  $\alpha$ -Amylasen (EC 3.2.1.1) kann aufgrund der Abnahme des Substrats Amylose oder aufgrund der Zunahme des Produkts Maltotriose bzw. Maltose gemessen werden. Die Abnahme der Amylose kann mit der Jod-Stärke-Reaktion qualitativ erfasst werden, während die Zunahme der Spaltprodukte mit der 3,5-Dinitrosalicylsäure quantitativ gemessen werden kann.

Bei der Hydrolyse polymerer Zucker durch Glucosidasen (EC 3.2.1.-) werden Monomere gebildet, sodass sich die reduzierenden Enden der Zucker vervielfachen. Die Hydrolyse der Polymere kann sich bis zur D-Glucose bzw. Maltose vollziehen. Die Messung erfolgt dann durch die 3,5-Dinitrosalicylsäure-Methode.

Die Enzyme, die für folgende enzymatische Nachweis-Reaktionen eingesetzt wurden, resultierten aus zellfreien Rohextrakten, aus zum Teil konzentrierten Überständen oder aus einer Proteinreinigung. Die Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 25 mM Tris-HCl (pH7,5), 10 mM Maltooligosaccharide bzw. 0,5-1% Stärke oder Pullulan, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 µg/ml Enzym. Alle Tests wurden parallel in Gegenwart von 0,1-1 mM Acarbose durchgeführt.

als Referenz wurde die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität von *Bacillus* sp. bzw. die Pullulanase-Aktivität von *Bacillus acidopullulyticus* überprüft.

### 2.4.6.1 Nachweis der enzymatischen Aktivität auf Stärkeplatten

Stärke-Agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) wurde zusätzlich mit 1g/l löslicher Stärke (Sigma-Aldrich, München) und gegebenenfalls mit 0,1% Maltose supplementiert. Der Einfluss von Acarbose auf die Aktivität wurde untersucht, indem parallel Platten zusätzlich mit 0,1-1 mM Acarbose versetzt wurden. Die Stärkeplatten wurden mit Enzymen ÜN bei 37°C bzw. 28°C inkubiert. Um die  $\alpha$ -Amylase Aktivität im Stärke-Agar sichtbar zu machen, wurden 2 ml Lugolsche-Lösung ( $I_2/KI$ ) auf die Platten gegeben. Die Jod-Stärke-Reaktion beruht auf dem Einbau von Polyjodid in die Kettenmoleküle der Stärke. Diese Verbindung absorbiert langwelliges Licht, daher wird nur blaues Licht reflektiert.

### 2.4.6.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität durch Papierchromatographie

Whatman-Papier 3MM (Whatman Ltd., Maidstone, England) wurde mit 1%iger Stärkelösung besprüht und bei RT getrocknet. Parallel wurde die Stärkelösung mit 0,1-1mM Acarbose supplementiert. Die Enzyme wurden direkt auf das Whatman-Papier gebracht und bei 28°C oder 37°C für 4 h oder ÜN inkubiert. Die Detektion erfolgte in einer Chromatographiekammer mit elementarem Jod.

### 2.4.6.3 Nachweis der $\alpha$ -Amylase Aktivität durch Starch Azure

Die  $\alpha$ -Amylase Aktivität wurde kolorimetrisch durch „Starch Azure“ (Sigma-Aldrich, München) determiniert (Rinderknecht *et al.*, 1967). Der Farbstoff Remazol Brilliant Blue R ist kovalent an Stärke gebunden und wird durch hydrolytische Spaltung der Stärkemoleküle durch Aktivität der  $\alpha$ -Amylase frei und kann bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen werden. Die Enzymatische Aktivität (U) ist definiert als die  $OD_{595}$ -Zunahme um 1,0/h bei 37°C.

Es wurden 0,06 g „Starch Azure“ in 10 ml Puffer (20 mM  $KHPO_4$ , pH 7,5; 50 mM NaCl) gelöst, 1 min bei 95°C inkubiert und bei 5000g 5 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer resuspendiert. Der Starch-Azure-Puffer wurde mit 0,1-1 U Enzymlösung versetzt und bei 250 rpm bei 37°C ÜN inkubiert. Anschließend wurde der Test bei 12000g für 5 min zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde bei 595 nm gemessen. Der Proteingehalt der Extrakte wurde nach Bradford bestimmt.

### 2.4.6.4 Nachweis der $\alpha$ -Amylase Aktivität durch Dinitrosalicylsäure

Das Prinzip des Enzymtests (modifiziert nach Miller, 1959) beruht auf der zeitabhängigen Zunahme der Menge an freien reduzierenden Zuckern durch die Umwandlung der  $\alpha$ -1,4- in eine  $\alpha$ -1,1-glycosidische Bindung. Die reduzierenden Hemi-Acetalgruppen reagieren mit dem Farbreagenz 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS). Dabei wird 3,5-Dinitrosalicylsäure zu 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure reduziert. Die Konzentration der gebildeten Nitroaminosalicylsäure ist äquivalent zur Enzymaktivität und kann photometrisch bei 540 nm erfasst werden. Mithilfe einer Verdünnungsreihe (0-3 mM) der Zucker (Glucose bzw. Maltose) wurden entsprechende Eichgeraden erstellt.

Das DNS-Reagenz wurde wie folgt hergestellt: 0,2 g 3,5-Dinitrosalicylsäure und 5 g Kalium-Natrium-Tartrat wurden mit 2 ml 2 M NaOH versetzt und mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Der Citratpuffer (pH 6,9) hatte ein Gesamtvolumen von 220 ml und bestand aus 1,8 ml 1 M Na<sub>3</sub>-Citrat sowie 1,75 ml 0,2 M Citrat-Säure. Als Stärkelösung wurde stets lösliche Stärke, nach Zulkowsky (Merck, Darmstadt) supplementiert mit 1 mM Ca<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, verwendet. Nur diese Stärke ist direkt löslich, andere Präparate lösen sich nur unter Erhitzen, wodurch sich sehr hohe Leerwert-Extinktionen ergeben. Der Reaktionsansatz setzt sich aus 500 µl 1%iger Stärkelösung und 500 µl Citratpuffer zusammen und wurde für 10 min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach Abkühlen auf RT durch die Zugabe des Enzyms gestartet. Nach einer Inkubation (von 5 min bis ÜN) bei 30°C bzw. 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe des gleichen Volumens an DNS-Reagenz gestoppt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation der Ansätze bei 95°C. Nach Abkühlung der Proben wurden 900 µl dH<sub>2</sub>O zugesetzt. Zur Quantifizierung des freigesetzten Zuckers wurden die Proben bei 540 nm gemessen.

### 2.4.6.5 Glucose (GO) Assay

Das „Glucose (GO) Assay Kit“ (Sigam-Aldrich, München) dient der quantitativen, enzymatischen Bestimmung von Glucose (Bergmeyer *et al.*, 1974). Glucose wird durch das Enzym Glucoseoxidase zu D-Gluconsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert. In Gegenwart von Peroxidase und Wasserstoffperoxid wird o-Dianisidin oxidiert und dann durch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stabilisiert. Der Farbumschlag von Braun zu Pink ist proportional der Glucosekonzentration und wird bei 540 nm gemessen.

Der Reaktionsansatz setzte sich zu einem Gesamtvolumen von 100 µl wie folgt zusammen: 50 µl einer 1%igen Stärkelösung, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Natriumacetat; 10% Enzym (v/v), ad dH<sub>2</sub>O. Der Enzymtest wurde bei 30°C bzw. 37°C 4 h oder ÜN inkubiert. Zur quantitativen Bestimmung der Glucose wurden 100 µl des Ansatzes mit 200 µl „Assay“-Reagenz 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 µl 12 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und bei 540 nm vermessen.

### 2.4.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von AcbQ

Die Aktivität der putativen Acarbose-4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ wurde mittels radioaktiv-markierter Substanzen untersucht. Die Phosphorylierung der Acarbofen-Homologen fand mit radioaktivem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP statt, sodass die Möglichkeit bestand den Abbau der Homologen durch die Trennung per Dünnschichtchromatographie und anschließender Detektion auf Hybond MP-Röntgenfilmen (Amersham Biosciences, Freiburg) und Röntgenverstärkerfolien in Exponierboxen bei RT nachzuweisen.

#### 2.4.7.1 Herstellung der Acarbofen-Homologen durch die AcbD-Reaktion

Die potentiellen Substrate für AcbQ wurden durch enzymatische Reaktionen mit der Acarviosyl-Transferase AcbD (Hemker *et al.*, 2000; Leemhuis *et al.*, 2005) produziert. AcbD katalysiert die Übertragung der Acarviosyl-Einheit von Acarbose auf verschiedene Maltooligosaccharide (Maltotriose bis Maltoheptaose), sodass die Acarbose-Homologen gebildet werden.

Die Acarviosyl-Transferase-Reaktion durch AcbD setzte sich wie folgt zusammen: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Acarbose, 10 mM Maltooligosaccharide und 10 µg/ml Enzym wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei 30°C für 3 h oder ÜN inkubiert (Rockser & Wehmeier, 2009). Es wurden auch radioaktiv-markierte Substrate, wie Glucose, Maltose und Acarbose verwendet. Die Analyse wurde sowohl mittels Dünnschichtchromatographie (DC) als auch durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) durchgeführt.

### 2.4.7.2 Phosphorylierung der Acarbosen-Homologen durch die AcbK-Reaktion

Die durch die AcbD-Reaktion entstandenen Acarbose-Homologen wurden durch die enzymatische Reaktionen mit der Acarbose-7-Kinase AcbK phosphoryliert (Zhang *et al.*, 2002). Zur Herstellung der phosphorylierten Acarbose-Homologen enthielten die Reaktionsansätze 25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 10 mM Acarbose bzw. 10 mM Acarbose-Homologe sowie 10 µg/ml Enzym. Um [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-markierte Acarbose-Homologe zu erhalten wurden Reaktionsansätze verwendet, die 10 mM ATP und 2 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (2 mCi/ml, ~3,0 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielten. Die Enzymtests wurden bei 30°C für 3 h oder ÜN inkubiert. Die Analyse wurde sowohl mittels Dünnschichtchromatographie (DC) als auch durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) durchgeführt.

### 2.4.7.3 Umsatz der Acarbose-Homologen durch AcbQ

Die AcbQ-Reaktion wurde mit den Maltooligosacchariden und den Acarbose-Homologen ± [<sup>32</sup>P], durchgeführt. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (v/v) Substrat (aus der AcbD- bzw. aus der AcbD- und AcbK-Reaktion) und 10 µg/ml Enzym. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 30°C.

Die Analysen der Produkte aus der Acarviosyl-Transferase-Reaktion, der Phosphorylierungs-Reaktion und der Abbau-Reaktion durch AcbQ wurden sowohl mittels Dünnschichtchromatographie (DC) als auch durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) durchgeführt.

### 2.4.7.4 Nachweis der AcbQ-Aktivität durch MacConkey-Platten

Die MacConkey Methode (modifiziert nach A. T. MacConkey, 1905) bietet die Möglichkeit durch einen pH-Wert-abhängigen Farbumschlag des Indikators Neutralrot die metabolische Substratverwertung von Gram-negativen Bakterien zu analysieren. Zucker wird von  $\beta$ -Galactosidasen in Glucose und Galaktose gespalten, der pH-Wert sinkt und die Bakterien erscheinen als rote Kolonien auf der MacConkey-Platte. Liegt der pH-Wert unter 6,8 findet ein Farbumschlag von Neutralrot statt, bei einem pH 8 ist der Farbumschlag Gelb. MacConkey-Platten wurde verwendet, um die Substratspezifität von AcbQ aus *Actinoplanes* sp. in *E. coli* CB39 Zellen zu analysieren. Dieser Stamm ist Amylomaltase defizient (*malQ*<sup>-</sup>), sodass durch Transformation mit AcbQ analysiert werden sollte, ob die Möglichkeit zur Komplementation durch die Amylomaltase AcbQ aus *Actinoplanes* sp. gegeben sei. Die

MacConkey-Platten wurden mit je 1% Maltose, 1% Glucose und  $\pm 1$  mM Acarbose versetzt sowie mit den Induktoren IPTG bzw. L-Rhamnose.

#### 2.4.8. Affinitätschromatographie

Mittels der Affinitätschromatographie sollte AcbQ aus zellfreiem Rohextrakt isoliert und angereichert werden. Die Trennung erfolgte im „Batch“-Verfahren und basiert auf der spezifischen Affinität zwischen Enzym und Substrat (Vretblad, 1974).

Als stationäre Phase wurde Epoxy aktivierte Sepharose 6B, ein Gel aus quer vernetzter Agarose (Mbiotech, Korea) verwendet, an die zuvor verschiedene Cyclodextrine gebunden wurden. Die Säulenmatrix enthält somit kovalent gebundenes Substrat, an das AcbQ spezifisch bindet und von der es spezifisch eluiert werden kann.

Die Sepharose (Mbiotech, Korea) wurde in 12 Vol. dH<sub>2</sub>O bei 28°C ÜN inkubiert und anschließend 10 min bei 2500g zentrifugiert. Die Sepharose wurde in 0,1 M NaOH resuspendiert. Je 300 mg  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin wurden in 0,1 M NaOH gelöst; die Sepharose wurden mit den Cyclodextrinen ÜN bei 45°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde dreifach 10 min mit dH<sub>2</sub>O, dann mit Glucose-Lösung (12 mg/ml), und erneut dreifach 10 min mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Cyclodextrin-Sepharose-Lösungen wurde dann mit 50 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 6,9 für 2 h inkubiert. Der zellfreie Rohextrakt wurden in 400  $\mu$ l 50 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 6,9 aufgenommen, zusätzlich wurden 3 mg/ml BSA zugesetzt. Der Elutionspuffer enthielt 10 mg/ml Cyclodextrin-Lösung in 50 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 6,9. Die Analyse der Eluate erfolgte mittels Dinitrosalicylsäure, die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt und zusätzlich wurden die Eluate durch SDS-PAGE analysiert.

#### 2.4.9 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie ist eine Form der Verteilungschromatographie zwischen einer hydrophilen (stationären) und einer hydrophoben (mobilen) Phase. Mit dieser einfachen und schnellen Methode lassen sich Mono- und Oligosaccharide, wie sie bei hydrolytischer Spaltung oder bei Transferreaktionen auftreten, auftrennen und anhand eines geeigneten Standards bestimmen und detektieren. Als stationäre Phase dienen mit Kieselgel beschichtete Aluminium-Folien (Kieselgel 60 F254, Merck, Darmstadt). Als mobile Phase wurden folgende Laufmittel verwendet:

Tab. 2.10.1

Laufmittel zur Trennung der Acarbosen-Homologen	Zusammensetzung	Volumenanteil
Laufmittel A:	1-Butanol Ethanol dH <sub>2</sub> O	5 3 2
Laufmittel B:	Isobuttersäure 1N NH <sub>3</sub> dH <sub>2</sub> O	5 3 2

Laufmittel zur Trennung der Acarbosen-Homologen	Zusammensetzung	Volumenanteil
Laufmittel C:	1-Propanol Ethylacetat dH <sub>2</sub> O	6 1 3
Laufmittel D:	1-Propanol Nitromethan dH <sub>2</sub> O	5 3 2

Die Enzymtests zur Bestimmung der Aktivität von Glycosylhydrolasen als auch zur Bestimmung der Aktivität von AcbQ wurden bei 95°C für 3 min inkubiert und bei 12000g, 5 min bei RT zentrifugiert. Zur Identifizierung der gebildeten Produkte wurden Acarbose (A), Glucose (G1), Maltose (G2), Maltotriose (G3), Maltotetraose (G4), Maltopentaose (G5), Maltohexaose (G6), Maltoheptaose (G7, jeweils 10 mM) sowie Stärke- und Pullulan-Lösung (0,5-1%) als Standards verwendet. Je 2 µl Standardlösung und je 3-6 µl Probe wurden auf die DC-Folien aufgetragen. Zur Sättigung der Dampfphase wurden die Chromatographiekammern vor Benutzung mehrerer Stunden bei RT mit dem Laufmittel inkubiert. Die Detektion erfolgte durch folgende Entwicklungsreagenzien und anschließender Hitzebehandlung:

Tab. 2.10.2:

Zum Nachweis von Zuckern	
Cer-Reagenz	2,5 g Phosphomolybdänsäure 1 g Cer(IV)-Sulfat 6 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
Anilin-Reagenz	1 g Anilin 1 g Diphenylamin 100 ml Aceton
Naphthylen-Reagenz	0,3% N-(1-naphthyl)ethylendiamine 0,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Zum Nachweis von Aminen	
Ninhydrin-Reagenz	300 mg Ninhydrin 100 ml Ethanol

#### 2.4.10 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die Analyse der gebildeten Reaktionsprodukte aus der Hydrolyse der Edukte durch die Glycosylhydrolasen als auch die Analyse der phosphorylierten Acarbose-Homologen sowie deren Abbauprodukte erfolgte durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie.

Die Reaktionsansätze wurden 5 min bei 95°C inkubiert und für 15 min bei 15000g zentrifugiert, um die denaturierten Proteine zu sedimentieren. Die Proben wurden über eine CarboPac PA200 Anionentauscher Säule (250 x 4 mm Dionex, Idstein) gekoppelt an die CarboPac1 Säule getrennt. Die Elution wurde mit Eluent-Puffer A (0,1 M NaOH) und Eluent-Puffer B (0,6 M Na-Acetat, 0,1 M NaOH) unter folgendem Gradienten durchgeführt: 0 min, 3% Puffer B; 20 min, 30% B; 30 min, 100% B; 30-35 min 100% B; 35 min, 3% B; 35-47 min 3% B, 47 min Laufende. Die Detektion erfolgte mittels eines Elektrochemischen Detektors (ECD50, Dionex) mit einer Au-Arbeits Elektrode und einer Ag/AgCl Referenzelektrode, deren Sensitivität bis zu 300 nC betrug. Folgendes Pulse-Programm wurde verwendet: +0.1 Volt (0-0.40 s); -2.0 Volt (0.41-0.42 s); +0.6 Volt (0.43-0.44 s); -0.1.Volt (0.44-0.45 s). Die Chromatogramme wurden mit der DIONEX Chromeleon 6.2-Software ausgewertet.

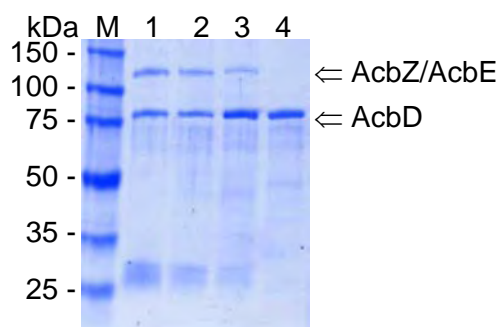


### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Analyse der sekretierten Enzyme des Acarbose-Metabolismus aus *Actinoplanes* sp. SE 50/110

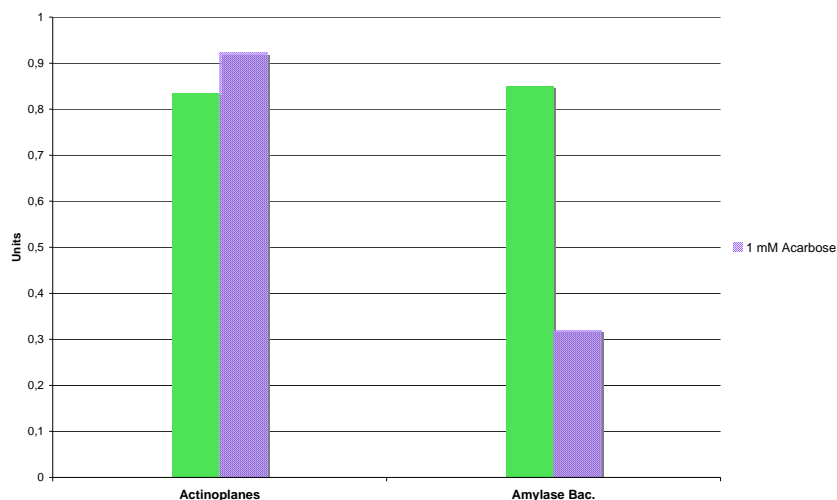
Das 25 *acb*-Gene umfassende **Acarbose-Biosynthese-Gencluster** von *Actinoplanes* sp. (Stratmann, 1997; Wehmeier & Piepersberg, 2004) besitzt zehn potenzielle Gene, die in den Acarbose-Metabolismus involviert sind. Die Gene *acbZ*, *acbE* und *acbD* codieren für sekretierte Proteine der Familie 13 der Glycosidhydrolasen, die unter anderem an der Synthese der höheren Acarbose-Homologen beteiligt zu sein scheinen.

Schon eine Analyse des Überstandes von *Actinoplanes* sp. SE 50/110 per SDS-PAGE zeigte, dass in Cerestar-Medium, einem Stärke-Hydrolysat, die Sekretion verschiedener Proteine induziert wurde (Abb. 3.1). Im Vergleich zu anderen Kulturmedien war die Produktion dieser sekretierten Proteine entweder nicht nachweisbar oder nur sehr schwach. Bei den sekretierten Proteinen handelt es sich den abgeleiteten Proteingrößen nach vermutlich um die  $\alpha$ -Amylasen AcbZ (111,7 kDa) oder AcbE (109,5 kDa). Zudem konnte auch durch ein spezifisches Antiserum ein weiteres Protein als AcbD (75 kDa), die Acarviosyltransferase im Überstand identifiziert werden.



**Abb. 3.1: Überstand aus der Anzucht von *Actinoplanes* sp. SE 50/110.** Die Proben des Überstandes aus der Anzucht bei 30°C in Cerestar-Medium wurden zu verschiedenen Zeitpunkten per SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde anschließend gefärbt. Die erhaltenen Fraktionen wurden zu je 30  $\mu$ l in der SDS-PAGE eingesetzt. Spur 1: 24 h, Spur 2: 48 h, Spur 3: 72 h, Spur 4: 96 h, Spur M: Molekulargewichtsmarker Broad Range Marker 10-225 kDa (Promega, Mannheim); es ist ein Ausschnitt des Markers zu sehen, der die Banden von 25 bis 150 kDa umfasst (s. 2. Material und Methoden).

Ein Starch Azure Enzymtest (s. 2. Methoden) wurde mit 100  $\mu$ l des Überstandes der Anzucht von *Actinoplanes* sp. SE 50/110 bei 30°C in Cerestar-Medium durchgeführt. Die nachgewiesene Aktivität der  $\alpha$ -Amylase von 0,8 U wurde nicht durch 1 mM Acarbose gehemmt (s. Abb. 3.2). Zur Kontrolle diente die  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp., die durch Acarbose deutlich inhibiert wurde.



**Abb. 3.2:  $\alpha$ -Amylaseaktivität (Starch Azure Enzymtest).** Vergleich der Aktivität der Enzyme des Überstandes von *Actinoplanes* sp. SE 50/110 und der  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. (1 U)  $\pm$  1 mM Acarbose.

Es wurde theoretisch 1 U  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. im Enzymtest eingesetzt, die Aktivität ohne Acarbose lag dann bei realen 0,85 U, mit Acarbose betrug die Aktivität nur noch 0,32 U, somit ist die  $\alpha$ -Amylase um 62% inhibiert. Die Aktivität des Überstandes von *Actinoplanes* sp. SE 50/110 wurde auf 0,84 U ohne Acarbose und auf 0,92 U mit Acarbose bestimmt.

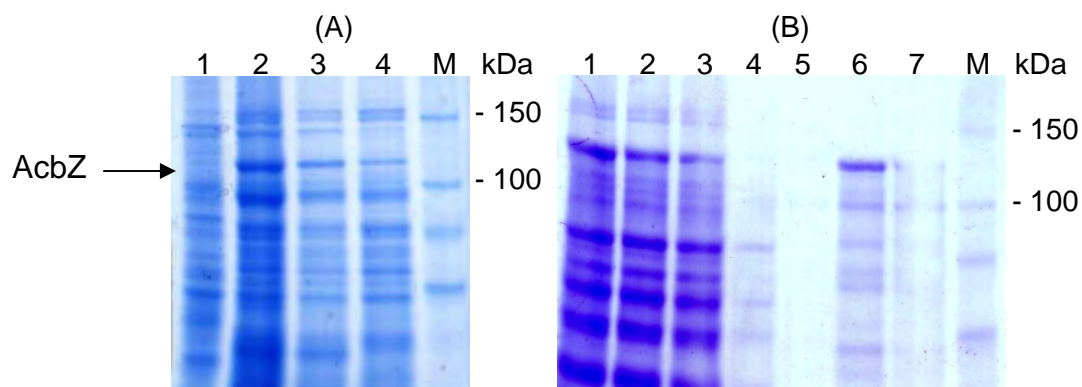
Durch diesen ersten Test konnte gezeigt werden, dass im Überstand einer Acarbose-Produktion induzierenden Kulturlösung von *Actinoplanes* sp. eine Acarbose-resistente Amylaseaktivität vorhanden ist. Daraus wurde die Arbeitshypothese hergeleitet, dass diese Aktivität im *acb*-Gencluster des Stammes codiert wurde. Es wurde daher vermutet, dass die Aktivitäten in Gegenwart von Acarbose wahrscheinlich auf AcbE und/oder AcbZ zurückzuführen waren. Die Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht und charakterisiert.

### 3.1.1 Charakterisierung des AcbZ Proteins aus *Actinoplanes sp.*

#### 3.1.1.1 Optimierung der heterologen *acbZ*-Expression in *E. coli* und *S. lividans*

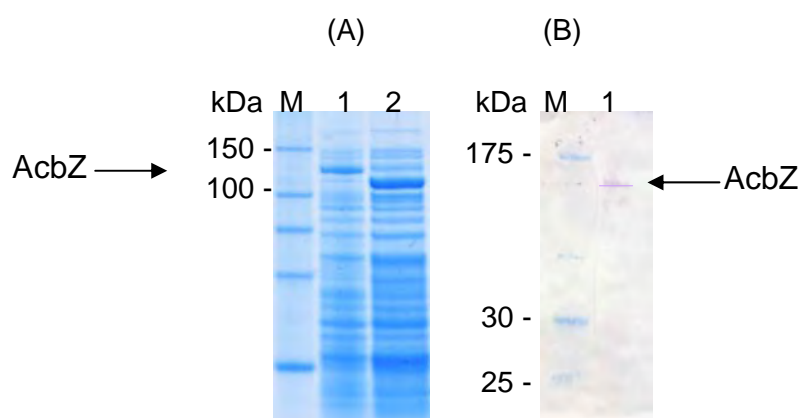
Es wurden verschiedene Expressionsstämme, wie z. B. *E. coli* JM109(DE3), *E. coli* BL21(DE3) Origami zur Proteinproduktion verwendet. Die Optimierung der heterologen Produktion erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) unter Verwendung des pAC16*acbZ* Plasmids unter der Kontrolle des Laktose/IPTG induzierbaren  $p_{T7}$  Promotors, das mit dem *acbZ* Gen ohne die Signalpeptid-codierende Sequenz (s. Abb. 3.3), N-Terminal an das 10x His-Tag fusioniert wurde (N-His-AcbZ). Die theoretisch berechnete Proteingröße von AcbZ ohne Signalpeptid beträgt 111,7 kDa und stimmt mit der Proteingröße des produzierten AcbZ Proteins überein (s. Abb. 3.4)

Die *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden in LB-Medium bei 37°C kultiviert und die Dauer der IPTG-Induktion betrug 4 h (s. 2.9.10). Zellfreier Rohextrakt sowie die Fraktionen aus der Nickel-NTA-Affinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE (s. 2.10.3) analysiert. Die Proteinkonzentration ist nach 4 h Induktion am größten und konnte durch eine verlängerte Induktionsdauer nicht weiter erhöht werden.



**Abb. 3.4: Produktion und Reinigung des N-His-AcbZ-Fusionsproteins in *E. coli* BL21(DE3)pAC16*acbZ*.** (A) AcbZ Produktion ohne Signalsequenz bei 37°C in LB-Medium; die Dauer der Induktion betrug 4 h. Es wurden je 15  $\mu$ l aufgetragen. Spur 1-4: zellfreier Rohextrakt, Spur 1: (Kontrolle) zellfreier Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)pAC11, Spur 2: AcbZ nach 4 h Induktion, Spur 3: AcbZ nach 2 h Induktion, Spur 4: AcbZ nach 30 min Induktion. (B) Die Reinigung erfolgte über eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. Spur 1: : zellfreier Rohextrakt, Spur 2: Durchlauf, Spur 3-4: Waschschrte, Spur 5-7: Elutionen. Es wurde je 10  $\mu$ l der einzelnen Fraktionen im 8%igen SDS-PAGE eingesetzt. Spur M: Molekulargewichtsmarker Roti-Mark 10-150 kDa Plus, (Roth, Karlsruhe); es ist ein Ausschnitt des Markers zusehen, der die Banden von 60 bis 150 kDa umfasst (s. Material Tab. 2.5).

Zur heterologen Expression des Gens *acbZ* in *S. lividans* TK24 M2 wurde die DNA mit den Primern *acbZ*For und *acbZ*RevHis (s. Tab 2.4) per zwei-stufiger PCR bei den Annealing Temperaturen von 55°C und 60°C amplifiziert. Das entstandene Konstrukt pUWL201PWacbZ wurde in *S. lividans* TK24 M2 Protoplasten transformiert. Zur Expression wurden die Zellen anschließend in Cerestar-Medium bei 30°C für 96 h kultiviert. Das *acbZ* Gen steht dabei unter der Kontrolle des konstitutiven  $p_{ermE^+}$  Promotors (s. 2.9.11). Das gebildete Protein lag als Fusionsprotein mit C-Terminal gekoppelten 6x His-Tag vor (C-His-AcbZ). Die Analyse des Proteins im Überstand wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 3.5 (A)). Die Reinigung des Proteins erfolgte unter Verwendung einer Nickel-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen, dazu wurden 100 ml des Überstandes der Proteinproduktion mit einer Ni-NTA-Matrix bei 8°C für 2 h rotierend inkubiert. Das gebundene Fusionsprotein wurde nach entsprechenden Waschschrritten durch Zugabe von 250 mM Imidazol eluiert (s. 2.10.5). Die erhaltene Eluatfraktion konnte nachfolgend in einem Western Blot als schwaches Signal detektiert werden (s. Abb. 3.5 (B)).



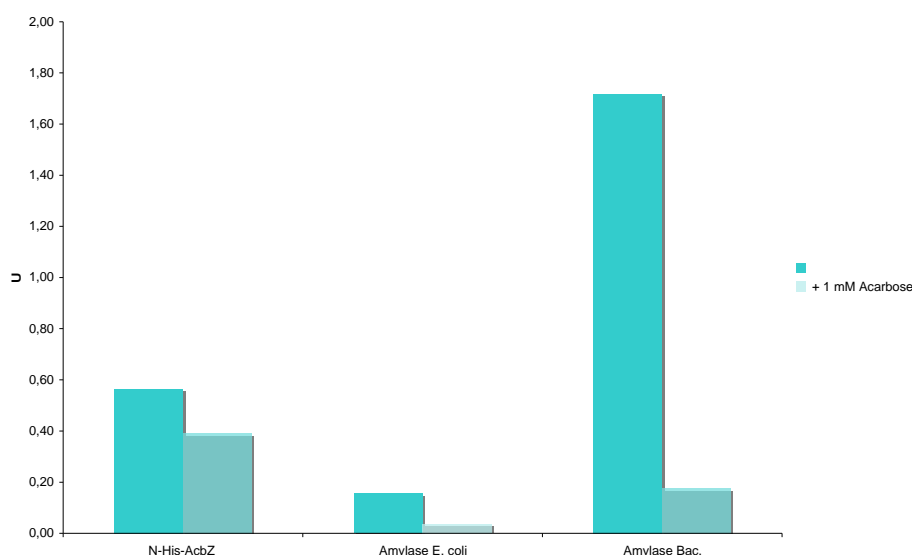
**Abb. 3.5: Produktion von C-His-AcbZ in *S. lividans* TK24 M2 pUWL201PWacbZ sowie Western Blot Analyse.** (A) Expression von TK24 M2 pUWL201PWacbZ bei 30°C in Cerestar-Medium für 96 h: Spur M: Roti-Mark (s. Abb. 3.4), Spur 1: C-His-AcbZ (111,7 kDa), zum Vergleich Spur 2: AcbE (109,5 kDa), Analyse der Fraktionen im 8%igen SDS-PAGE, es wurden je 15  $\mu$ l aufgetragen. (B) Western Blot Analyse, Spur M: Broad Range prestained Marker (NEB, Schwalbach) 7 – 175 kDa; es ist ein Ausschnitt der Banden des Markers von 25, 30 und 175 kDa gezeigt. Spur 1: Elution von AcbZ der Ni-NTA-Reinigung.

AcbZ wurde in der  $\alpha$ -Amylase Mutante *S. lividans* TK24 M2 produziert, um so die Hintergrundaktivität des Expressionsstammes auszuschließen. Alternativ zu einer Proteinreinigung konnten die Proteinextrakte des Überstandes daher auch über Konzentratoren (Ausschluss-Molekulargewicht 100 kDa) angereichert und für die nachfolgenden Enzymtests eingesetzt werden. Es wurden maximal 20% (v/v) dieser Proteinextrakte in Enzymtests eingesetzt.

### 3.1.1.2 Analyse der $\alpha$ -Amylaseaktivität des AcbZ Proteins durch Starch Azure Enzymtests

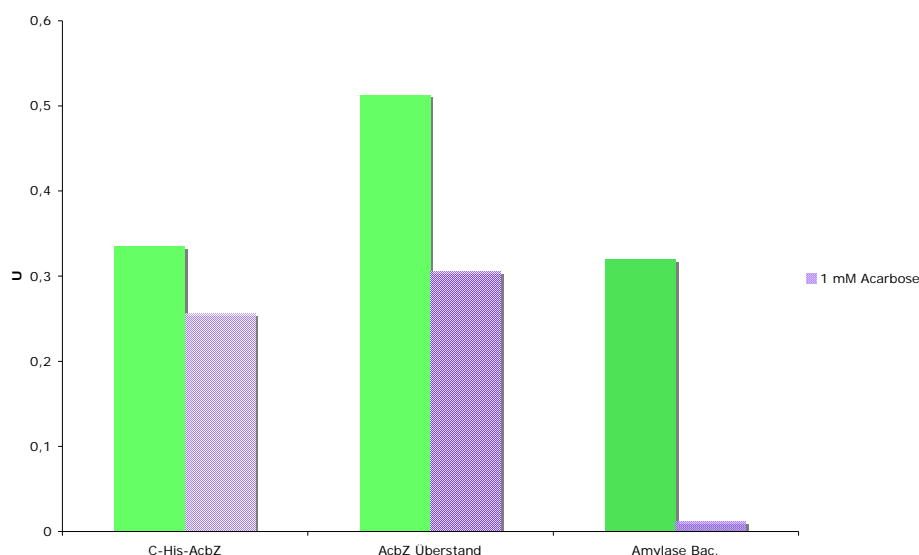
Die hydrolytische Aktivität von AcbZ, das in *E. coli* BL21(DE3) (N-His-AcbZ) als auch in *S. lividans* TK24 M2 (C-His-AcbZ) produziert wurde, konnte zuerst durch den Starch Azure Enzymtest nachgewiesen (s. 2.10.6.3) werden.

Die  $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbZ wurde bestimmt, ebenso wie der mögliche Einfluss des  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Acarbose auf die Aktivität von AcbZ. Zur Kontrolle wurde vergleichend die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp., auch in Gegenwart von Acarbose analysiert. Der zellfreie Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) wurde ebenfalls auf seine hydrolytische Aktivität ( $\pm 1$  mM Acarbose) untersucht, um so eine Hintergrundaktivität der periplasmatischen  $\alpha$ -Amylase MaIS aus *E. coli* bei der Proteinproduktion von AcbZ in *E. coli* BL21(DE3)pAC16acbZ und der sich anschließenden Reinigung auszuschließen. In der Abbildung 3. 6 ist ein Vergleich der  $\alpha$ -Amylaseaktivitäten von N-His-AcbZ aus *E. coli*, des periplasmatischen Enzyms MaIS aus *E. coli* und *Bacillus* sp. gezeigte. Die Aktivität von AcbZ betrug 0,56 U und in Gegenwart von Acarbose nahm diese leicht ab auf 0,39 U. AcbZ wurde somit nicht inhibiert. Während die Aktivität von MaIS, resultierend aus dem zellfreien Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)pAC16 (in der Abbildung 3.6 als Amylase *E. coli* bezeichnet), von 0,15 U auf 0,04 U und die der  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. von 1,72 U auf 0,18 U stark zurückgingen (in der Abbildung als Amylase Bac. benannt). MaIS wurde somit um 73% und die  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. um fast 90% gehemmt.



**Abb. 3.6:** Analyse der  $\alpha$ -Amylaseaktivität des AcbZ Proteins von *E. coli* BL21(DE3). Die  $\alpha$ -Amylaseaktivität wurde von dem durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten N-His-AcbZ, aus der Anzucht von *E. coli* BL21(DE3)pAC16acbZ bei 37°C in LB-Medium, die Dauer der Induktion betrug 4 h, analysiert. Vergleichend wurde die Aktivität von MaIS aus dem zellfreien Rohextrakt von *E. coli* (Amylase *E. coli*) untersucht. Die Anzucht erfolgte analog zu der von *E. coli* BL21(DE3)pAC16acbZ. Zur Kontrolle wurde die  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. (Amylase Bac.), mit einer theoretisch berechneten Aktivität von 1 mU im Test eingesetzt. Als Substrat diente Starch Azure; zusätzlich wurden alle oben aufgeführten Proben mit 1 mM Acarbose versetzt. Die Inkubation der Proben erfolgte ÜN bei 37°C.

Die Aktivität des gereinigten AcbZ Proteins aus *S. lividans* TK24 M2 pUWL201PWacbZ wurde auf 0,34 U und in Gegenwart von 1 mM Acarbose auf 0,27 U bestimmt. Der konzentrierte Überstand aus der Anzucht von *S. lividans* TK 24 M2 pUWL201PWacbZ wurde mit 10% (v/v) im Enzymtest eingesetzt, die Aktivität dieses Überstandes wurde auf 0,5 U ohne Acarbose und auf 0,31 U mit Acarbose bestimmt. Die Acarbose scheint auf die Aktivität des gereinigten AcbZ Proteins kaum Einfluss zu nehmen. Wie erwartet zeigte sich, dass die  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. um 93% inhibiert wurde (s. Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: Analyse der  $\alpha$ -Amylaseaktivität des AcbZ Proteins von *S. lividans* TK24 M2.** Die Anzucht von TK24 M2 pUWL201PWacbZ erfolgte bei 30°C in Cerestar-Medium für 96 h. Zur Analyse wurde das durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigte C-His-AcbZ eingesetzt (s. Abb. 3.5). Die  $\alpha$ -Amylaseaktivität des gereinigten C-His-AcbZ Proteins sowie das durch Konzentration des Überstandes von TK24 M2 pUWL201PWacbZ mit einem Ausschluss MW von 100 kDa angereichert AcbZ Protein, wurden untersucht. Die  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. (Amylase Bac.) wurde zur Kontrolle mit einer theoretisch berechneten Aktivität von 1 mU eingesetzt. Die Inkubation der Proben erfolgte ÜN bei 37°C, Substrat Starch Azure  $\pm$  1 mM Acarbose.

Der Vergleich zwischen den Aktivitäten des produzierten AcbZ Proteins aus *E. coli* (N-His-AcbZ) und *S. lividans* (C-His-AcbZ) zeigt keine erkennbaren Unterschiede; die Wahl des Expressionssystems ist somit unerheblich für die Proteinproduktion. Grundsätzlich ist AcbZ im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Amylasen aus *Bacillus* sp. und zu MaIS aus *E. coli* nicht inhibiert.

Somit kann angenommen werden, dass es sich bei AcbZ um eine der sekretierten  $\alpha$ -Amylasen aus *Actinoplanes* sp. handelt, die dazu beitragen kann, in Gegenwart von Acarbose Stärke zu hydrolysieren (vgl. Abb. 3.2).

### 3.1.1.3 Analytische Bestimmung von Carbohydraten durch HPLC-ECD

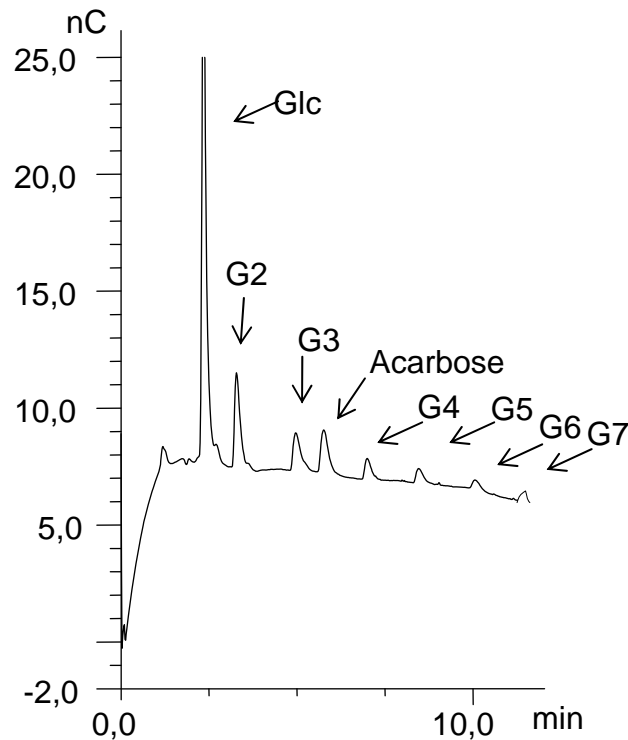
Die Methode der Wahl, um verschiedenste Carbohydrate und Maltooligosaccharide zu trennen und diese zu bestimmen, stellt die Technik der High-Performance-Liquid-Chromatographie dar. Durch eine Anionentauscher-Säule besteht die Möglichkeit nicht-derivatisierter Carbohydrate und Maltooligosaccharide zu trennen und auch kleinste Mengen mittels elektrochemischer Detektion (ECD) zu quantifizieren.

Die HPLC-ECD Methode nutzt die schwache Acidität der Carbohydrate, die durch die Hydroxylgruppe vermittelt wird; dabei stellt die anomere Hydroxylgruppe, die mit der höchsten Säurestärke dar. Im stark alkalischen Milieu sind die Hydroxylgruppen teilweise oder vollständig deprotoniert und liegen negativ geladen vor, sodass diese elektrochemisch detektiert werden können. Die aus der hydrolytischen Spaltung von Stärke oder Pullulan resultierenden Maltooligosaccharide konnten über eine CarboPac PA200 Anionentauscher-Säule getrennt und durch einen Elektrochemischen Detektor mit einer Au-Arbeits Elektrode und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode registriert werden. Die Empfindlichkeit der Elektrode liegt bei 300 nC. Dabei werden Maltooligosaccharide mit niedrigem Molekulargewicht eher von der Säule eluiert als höher verzweigte Dextrine, da diese eine größere negative Ladung, bedingt durch die Anzahl der Hydroxylgruppen, aufweisen. Um die Methode der HPLC-ECD-Analytik in dieser Arbeit weiter zu entwickeln und zu optimieren, wurden verschiedenste Parameter wie z. B. der Gradient, die Konzentrationen der Eluenten und die Dauer der Äquilibration der Säule variiert.

Ein typisches Chromatogramm ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Diese zeigt die Trennung eines Maltooligosaccharid-Standards, der sich aus Glucose, Maltose, Maltotriose, Acarbose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose und Maltoheptaose zusammensetzt. Die Retentionszeiten der einzelnen Zucker variieren dabei geringfügig (s. Tab. 3.1), wobei die obige Abfolge der Zucker die Eluation von der Säule darstellt. Das Integral der Fläche entspricht der Molarität der Maltooligosaccharide. Die Fläche der Peaks entspricht hier der Konzentration von 1,25 nM.

Tab. 3.1: Messdaten der HPLC-ECD-Analyse des Maltooligosaccharid-Standards

Maltooligosaccharid	Peak	Retentionszeit (min)	Fläche (nC*min)
Glucose	Glc	2,4	20
Maltose	G2	3,8	10,9
Maltotriose	G3	6,5	5,9
Acarbose	A	7,1	6,1
Maltotetraose	G4	8,2	3,6
Maltopentaose	G5	9,85	2,8
Maltohexaose	G6	11,4	2,8
Maltoheptaose	G7	13,3	2,5



**Abb. 3.8: Trennung verschiedener Maltooligosaccharide und Acarbose per HPLC-ECD (je 1,25 nM) (s. Tab. 3.1).** Es wurden die Maltooligosaccharide Glc bis G7 und Acarbose in einem Ansatz per HPLC-ECD analysiert. Die x-Achse gibt den zeitlichen Verlauf der Messung wieder, während sich die y-Achse auf das Integral der Fläche der Peaks bezieht und in nC\*min angegeben wird. Die Retentionszeiten sowie die Flächen der Peaks finden sich in der Tabelle 3.1 wieder. Glc: Glucose, G2: Maltose, G3: Maltotriose, G4: Maltotetraose, G5: Maltopentaose, G6: Maltohexaose; G7: Maltoheptaose; A: Acarbose.

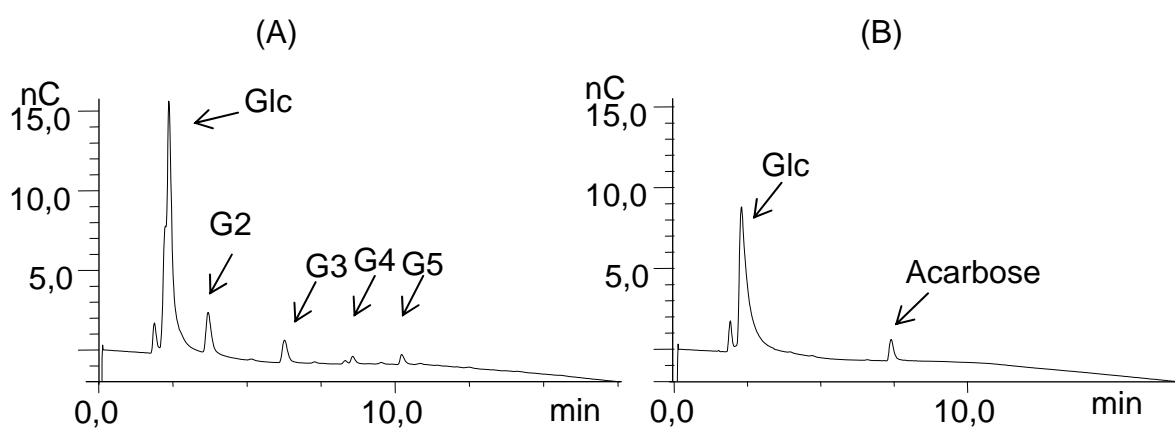
Somit war der Nachweis der Maltooligosaccharide durch die Methode der HPLC-ECD gegeben. Die Methode konnte durch weitere Analyse der Aktivität der Enzyme der Familie 13 der Glycosidhydrolasen aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 und *S. glaucescens* sowie zur Analyse der Kontrolle wie z. B. die  $\alpha$ -Amylaseaktivität von *Bacillus* sp. und die Pullulanaseaktivität von *Bacillus acidopullulyti* herangezogen werden.

Die Substrate Stärke und Pullulan wurden wie erwartet nicht detektiert.



### 3.1.1.3.1 Bestimmung der $\alpha$ -Amylaseaktivität von *Bacillus* sp.

Die Analyse durch die HPLC-ECD Methode des Enzymtest zur Aktivität der  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus* sp., die als Kontrolle diente, zeigte, dass das Substrat Stärke durch 1 mU Enzym in die Maltooligosaccharide, G2, G3, G4 und G5 abgebaut wird (Abb. 3.9 (A)). Dabei sind die Hauptprodukte der Spaltung G2 und G3. In Gegenwart von 0,1 mM Acarbose wurde die  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus* sp. vollständig gehemmt (Abb. 3.9 (B)). Der Peak, der eine identische Retentionszeit wie die Glucose aufweist, spiegelte wahrscheinlich nicht nur die Detektion der Glucose wieder. Dabei handelte es sich unter anderem auch um Salze und Pufferbestandteile des Enzymtests, die gemeinsam mit der Glucose von der Säule eluiert wurden. In der Tabelle 3.2 sind die zu der Abbildung 3.9 zugehörigen Retentionszeiten und Flächen der Peaks aus der Messung zur  $\alpha$ -Amylaseaktivität von *Bacillus* sp. aufgeführt.



**Abb. 3.9:** HPLC-ECD-Analyse der  $\alpha$ -Amylaseaktivität (1 mU) von *Bacillus* sp.. (A) Substrat 0,5% Stärke, (B) Substrat 0,5% Stärke + 0,1 mM Acarbose, Inkubation ÜN bei 37°C. (Details zu Abk. s. Abb. 3.8)

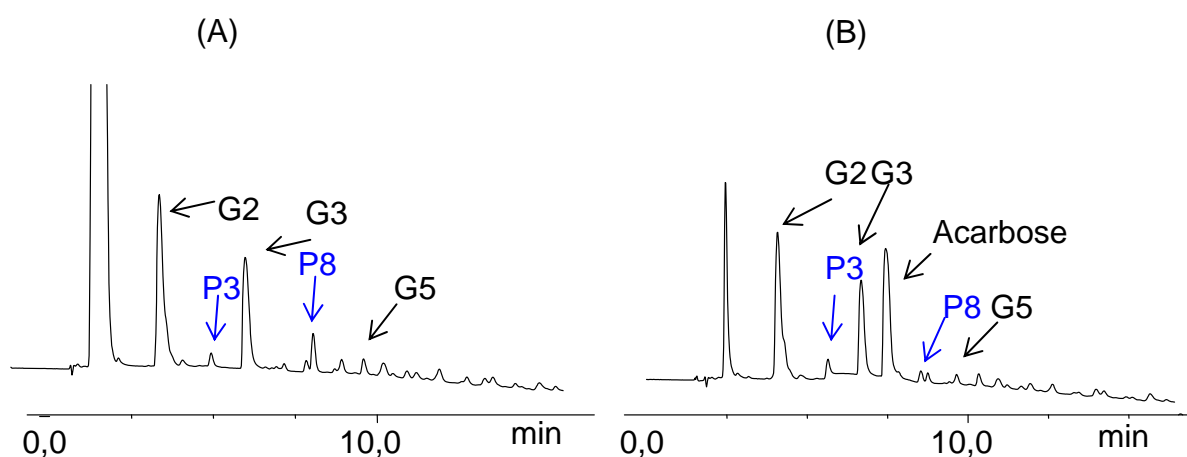
**Tab. 3.2:** Messdaten der HPLC-ECD-Analyse zur  $\alpha$ -Amylaseaktivität von *Bacillus* sp.

Retentionszeit (min)	Peak	Fläche (nC*min)	
		(A) ohne Acarbose	(B) mit 1 mM Acarbose
2,37	Glc	3,76	1,81
3,68	G2	0,505	-
6,27	G3	0,254	-
7,4	Acarbose	-	0,225
8,32	G4	0,016	-
10,22	G5	0,013	-
11,4	G6	-	-
13,3	G7	-	-

### 3.1.1.3.2 Bestimmung der $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbZ

Die Analyse zur  $\alpha$ -Amylaseaktivität des aus dem Überstand durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten C-His-AcbZ Proteins aus *S. lividans* TK24 M2 pUWL201PWacbZ ist in Abbildung 3.10 gezeigt.

AcbZ spaltete Stärke vor allem in G2, G3 und ein unbekanntes Produkt P4 (s. Abb. 3.10 (A)) und wurde durch 1 mM Acarbose nicht inhibiert (s. Abb. 3.10 B). AcbZ ist somit Acarbose-resistent. Des Weiteren wurden Substanzen, die in der Abbildung bzw. in der Tabelle 3.3 als Peak P3, P4, P7 und P8 benannt sind, detektiert. Die Retentionszeiten waren nicht mit denen der Standard Maltooligosaccharide identisch und stellten somit neue Produkte aus der hydrolytischen Spaltung der Stärke durch AcbZ dar. In Anwesenheit von Acarbose nahm die Fläche der Maltotriose deutlich ab, ebenso für den Peak P8. Allerdings nahm P4 in Gegenwart von Acarbose um 51% zu. Da keine Referenzsubstanzen vorhanden waren, bestand nicht die Möglichkeit die Peaks P3, P4, P7 und P8 Substanzen zu zuordnen.



**Abb. 3.10: HPLC-ECD-Analyse zur  $\alpha$ -Amylaseaktivität des gereinigten C-His-AcbZ Proteins aus *S. lividans* TK24 M2pUWL201PWacbZ.** Es wurden 30  $\mu$ g gereinigtes Enzym AcbZ im Enzymtest eingesetzt. (A) Als Substrat diente 0,5% Stärke, (B) Substrat 0,5% Stärke und 1 mM Acarbose. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C. (s. Abb 3.8). Im Enzymtest wurden 30  $\mu$ g des gereinigten AcbZ Proteins eingesetzt (s. 2.10.6).

**Tab. 3.3: Messdaten der HPLC-ECD-Analyse zur  $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbZ.**

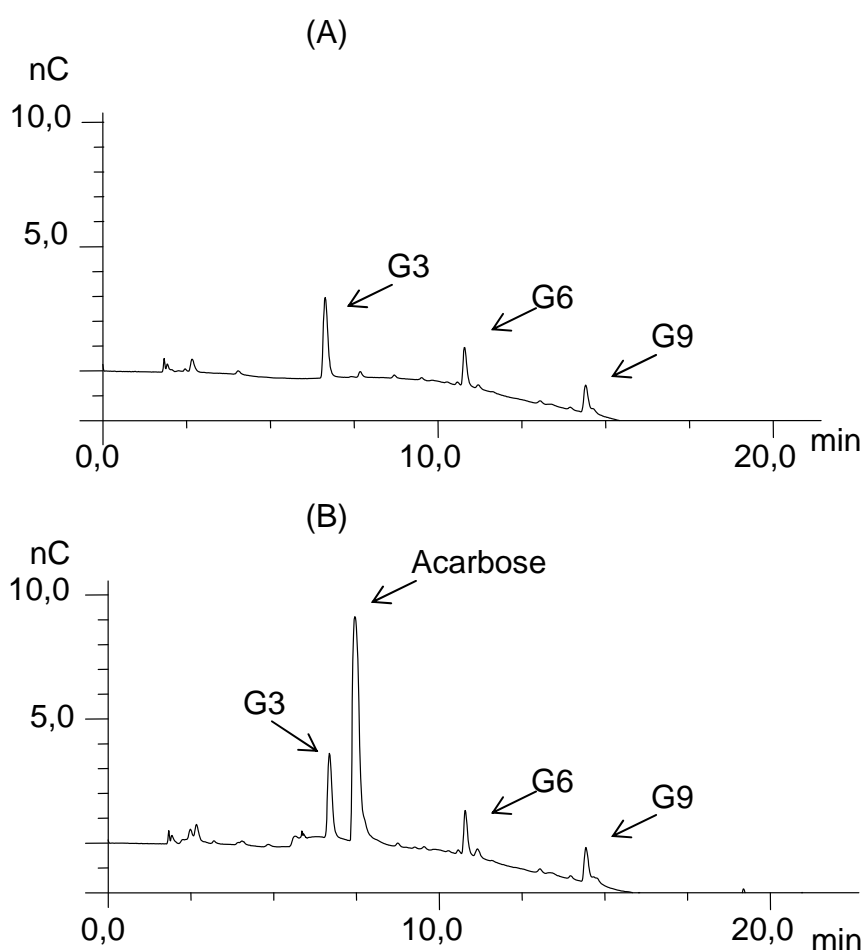
Retentionszeit (min)	Peak	Fläche (nC*min)	
		(A) ohne Acarbose	(B) mit 1 mM Acarbose
2,47	Glc	3,146	1,892
4,08	G2	3,512	2,856
5,67	P3	0,129	0,195
6,70	G3	2,128	1,582
7,43	Acarbose	-	2,659
8,57	P7	0,092	0,097
8,78	P8	0,394	0,079
9,65	G5	0,112	0,101

Im Vergleich zur  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus* sp. zeigte sich, dass AcbZ Stärke weitaus differenzierter hydrolysierte bzw. eventuell modifizierte. Die Hauptprodukte waren wie bei *Bacillus* sp. G2 und G3; ohne Acarbose wurde P8 als weiteres Produkt gebildet, in Gegenwart von Acarbose trat als weiteres Hauptprodukt P4 neben G2 und G3 auf.

Grundsätzlich bleibt zu erwähnen, dass die  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus* sp. schon in Gegenwart von 0,1 mM Acarbose völlig gehemmt wurde, während die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase AcbZ mit 1 mM Acarbose nicht beeinträchtigt wurde.

### 3.1.1.3.3 Bestimmung der Pullulanaseaktivität von *B. acidopullulyti*

Um zu klären, ob auch Pullulan und die aus der Spaltung durch die Pullulanase resultierenden Abbauprodukte mit der Methode der HPLC-ECD nachweisbar sind, wurde zur Referenz ein Enzymtest mit der Pullulanase aus *Bacillus acidopullulyti* durchgeführt. Als Substrat diente Pullulan, das erstmals aus *Pullularia pullulans* isoliert wurde; Pullulan stellt kein Substrat für  $\alpha$ -Amylasen dar. Im Enzymtest wurde das Enzym mit einer theoretisch berechneten Aktivität von 1 U eingesetzt. Das typische Abbaumuster von Pullulan durch Pullulanasen, besteht aus Maltotriose-Einheiten (G3, G6, G9). In der Abbildung 3.10 ist gezeigt, dass die HPLC-ECD Methode auch zur Detektion der Spaltprodukte aus Pullulan geeignet war. Das Enzym spaltete Pullulan auch in Gegenwart von Acarbose in die Hauptprodukte G3, G6 und G9. Maltononaose wurde dabei durch Extrapolation identifiziert (s. 2.10.6), da die Retentionszeiten der Maltooligosaccharide in Abhängigkeit von der Anzahl der Glucose-Einheiten zunahm, konnte davon ausgegangen werden, dass bei einer Retentionszeit von 14,43 min G9 von der Säule eluiert wurde.



**Abb. 3.11: HPLC-ECD-Analyse zur Pullulanaseaktivität von *B. acidopullulyti* (1 mU).** (A) Als Substrat wurde 0,5% Pullulan eingesetzt. (B) Substrat 0,5% Pullulan und 1 mM Acarbose. Die Inkubation des Tests erfolgte für 5 h bei 37°C. (s. Abb. 3.8).

In Tabelle 3.4 sind die Retentionszeiten und die Flächen der Produkte aus der hydrolytischen Spaltung von Pullulan durch die Aktivität von *B. acidopullulyti* aufgeführt.

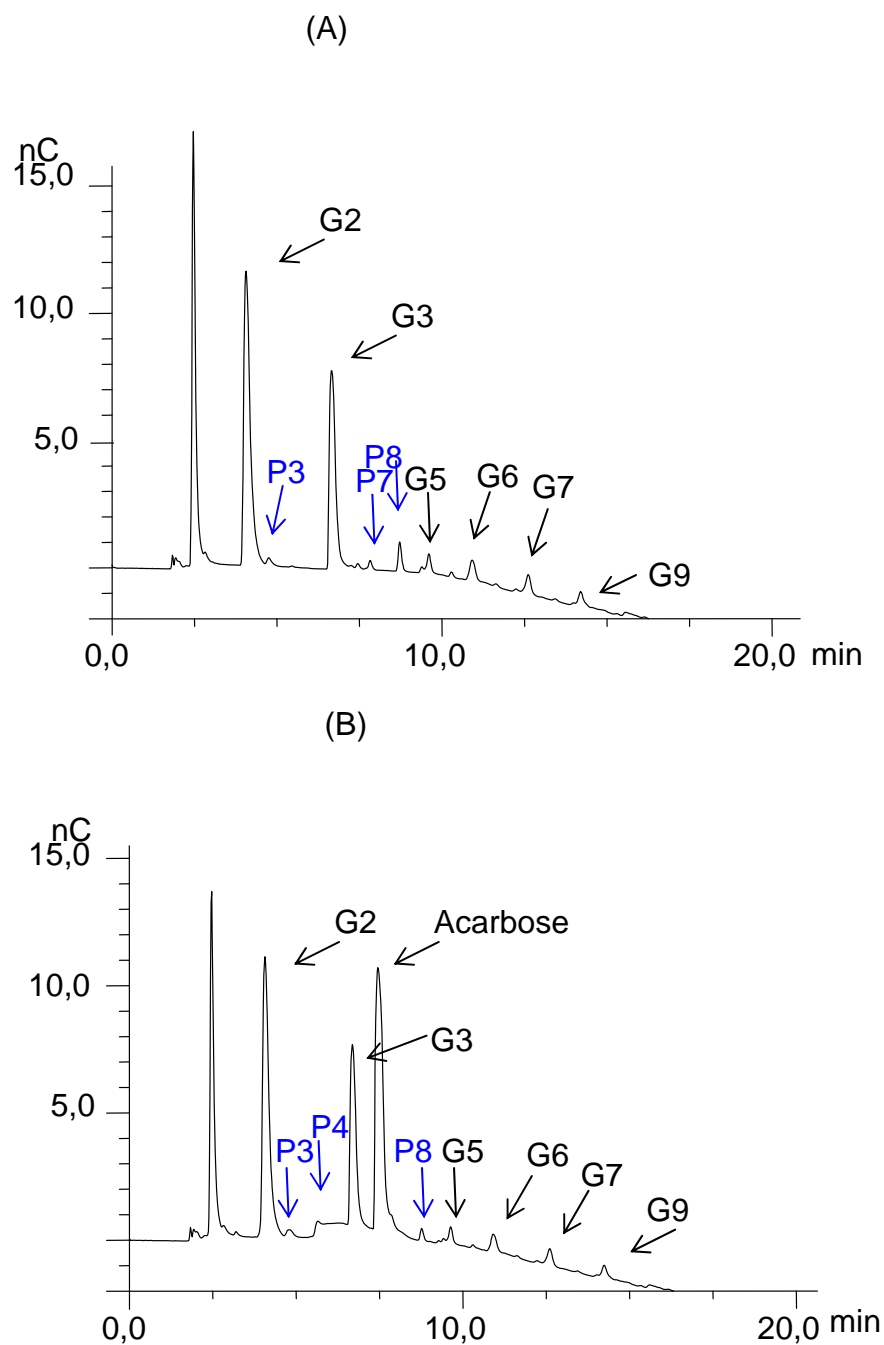
**Tab. 3.4: Messdaten der HPLC-ECD-Analyse zur Pullulanaseaktivität von *B. acidopullulyti*.**

		Fläche (nC*min)	
Retentionszeit (min)	Peak	(A) ohne Acarbose	(B) mit 1 mM Acarbose
6,63	G3	0,521	0,538
7,45	A	-	2,223
10,78	G6	0,202	0,218
14,43	G9	0,155	0,164

### 3.1.1.3.4 Bestimmung der Pullulanaseaktivität von AcbZ

Im Sequenzvergleich wurden zwei Pullulanase-Domänen in der Aminosäuresequenz von AcbZ identifiziert (s. Diskussion). Die vermutete Pullulanaseaktivität wurde daher ebenfalls getestet. Wie in 3.1.3.2 gezeigt werden konnte, sind die Spaltprodukte von Pullulan durch HPLC-ECD detektierbar.

Die HPLC-ECD-Analyse des Enzymtests zur Pullulanaseaktivität von AcbZ, zeigte eindeutig (Abb. 3.12 (A) und (B)), dass das Enzym auch in der Lage war, Pullulan abzubauen. Die Hauptprodukte der Pullulan Spaltung durch AcbZ sind G2, G3 und G6. Das für die Pullulanase von *B. acidopullulyti* typische Abbaumuster von Pullulan zu G3, G6 und G9 ist nicht deutlich zu erkennen, da AcbZ sowohl Pullulanase- als auch  $\alpha$ -Amylaseaktivität besitzt. Die Produkte G3, G6 und G9, die aus der Hydrolyse des Pullulans resultierten, stellten somit neue Substrate für die  $\alpha$ -Amylase AcbZ dar und wurden wiederum abgebaut. Das in Abbildung 3.12 dargestellte Produktspektrum spiegelt somit die Bifunktionalität des Enzyms AcbZ wieder. Weitere Produkte des Pullulanabbaus waren Maltotetraose, Maltopentaose und Maltoheptaose. Ohne Acarbose setzte AcbZ aus Pullulan ein weiteres Produkt (Peak 7) mit einer Fläche von 0,034 nC\*min frei, das eine Retentionszeit von 7,82 min aufweist. Auch wird ein Peak mit einer Fläche von 0,016 nC\*min und mit gleicher Retentionszeit wie Acarbose, detektiert. In Anwesenheit von Acarbose ist es möglich, dass die oben erwähnten Peaks auch vorhanden sind, allerdings durch die hohe Konzentration der Acarbose nicht detektiert werden konnten. Ein weiteres Produkt (Peak 4) wird bei einer Retentionszeit von 5,65 min detektiert und tritt mit einer Fläche von 0,055 nC\*min nur in Gegenwart von Acarbose auf. Die Retentionszeiten aller Peaks sind in der Tabelle 3.5 aufgeführt.



**Abb. 3.12: HPLC-ECD-Analyse zur Pullulanaseaktivität des gereinigten Enzyms C-His-AcbZ aus *S. lividans* TK24 M2 pUWL201PWacbZ.** (A) Als Substrat wurde 0,5% Pullulan eingesetzt. (B) Substrat 0,5% Pullulan und 1 mM Acarbose. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C. (s. Abb. 3.8). Das eingesetzte Protein AcbZ resultierte aus der Reinigung des Überstandes durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus der Anzucht von *S. lividans* TK24 M2 pUWL201PWacbZ in Cerestar-Medium, bei 30°C für 96 h. Es wurden 30 µg Enzym im Test eingesetzt (s. 2. 10.6).

Tab. 3.5: Messdaten der HPLC-ECD-Analyse zur Pullulanaseaktivität von AcbZ.

Retentionszeit (min)	Peak	Fläche (nC*min)	
		(A) ohne Acarbose	(B) mit 1 mM Acarbose
2,47	Glc	2,021	1,664
4,07	G2	2,610	2,449
4,75	P3	0,039	0,054
5,65	P4	-	0,055
6,65	G3	1,651	1,442
7,45	A	0,016	2,724
7,82	P7	0,034	-
8,72	P8	0,134	0,054
9,60	G5	0,071	0,070
10,92	G6	0,154	0,130
12,62	G7	0,121	0,111
14,20	P8	0,088	0,070

Die Messungen der  $\alpha$ -Amylase- und der Pullulanaseaktivitäten des AcbZ Enzyms, zeigten im Vergleich, dass das Hauptprodukt der Hydrolyse jeweils G2 war. Durch die  $\alpha$ -Amylaseaktivität entstanden aus Stärke weiterhin G3 und P8; mit Acarbose trat ebenfalls G3 als zweites Hauptprodukt, die nächste größte Fläche machte der Peak P4 aus, während P8 mit Acarbose um 80% reduziert war.

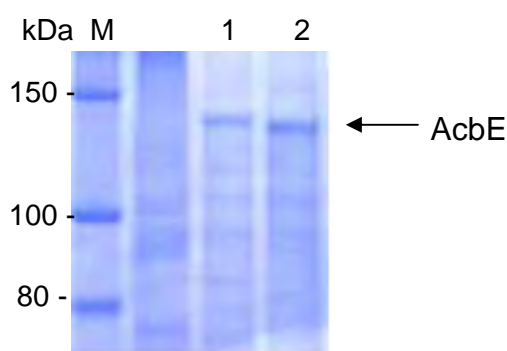
Pullulan wurde durch AcbZ in die Hauptprodukte G2, G3 und G6 gespalten. Ohne Acarbose im Test folgte der Peak P8 mit der größten Fläche. P8 konnte auch schon bei der Spaltung von Stärke detektiert werden. In Gegenwart von Acarbose folgt als nächste große Fläche die der G7.

### 3.1.2 Charakterisierung des AcbE Proteins aus *Actinoplanes* sp.

#### 3.1.2.1 Optimierung der heterologen *acbE*-Expression

Das native AcbE Protein (109,5 bzw. mit Signalsequenz 112,6 kDa) wird von *Actinoplanes* sp. SE50/110 sekretiert. Erste Analysen zur Charakterisierung von AcbE wurden bereits 1997 von A. Stratmann durchgeführt (Stratmann, 1997). Das von A. Stratmann konstruierte Plasmid pAS11 (s. Tab. 4.3) wurde in dieser Arbeit ebenfalls verwendet und analysiert. AcbE wurde durch einen Sequenzvergleich der Familie der  $\alpha$ -Amylasen (EC 3.2.1.1) zugeordnet und weist die charakteristischen Aminosäuren der aktiven Zentren von Enzymen aus der Familie 13 der Glycosidhydrolasen in den konservierten Regionen I-IV auf (s. Diskussion Tab. 4.1). AcbE gehört zu den langkettigen  $\alpha$ -Amylasen.

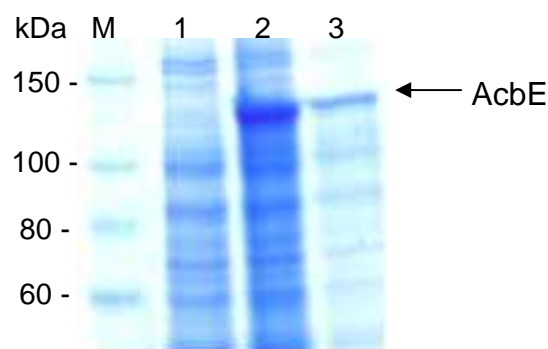
Es wurden verschiedene *E. coli* Expressionsstämme, wie z. B. BL21(DE3), JM109(DE3), JM109(DE3)pRare, BL21(DE3)pLysS zur Proteinproduktion verwendet. Das Expressionssystem wurde in *E. coli* so gewählt, dass in dem pAC16acbE Plasmid das *acbE* Gen ohne die Signalpeptid-codierende Sequenz fusioniert wurde (N-His-AcbZ). Das Protein AcbE konnte so als Fusionsprotein mit N-terminal gekoppelten His-Tag produziert werden. Die *E. coli* Zellen wurden in einem Mischmedium, bestehend aus 50% LB-Medium und 50% *E. coli* Minimalmedium (s. 2.6.1) bis zum Erreichen einer OD<sub>595</sub> nm von 0,5 bei 37°C kultiviert, anschließend dann bei 28°C angezogen und ÜN induziert (s. 2.9.10). Die Produktion wurde mit SDS-PAGE überprüft. Die anschließende Reinigung des N-His-AcbE Proteins erfolgte mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen und wurde ebenfalls mittels SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: Produktion von AcbE in *E. coli* BL21(DE3)pAC16acbE.** Die Anzucht der Zellen nach der Induktion erfolgte bei 28°C ÜN in einem Mischmedium bestehend aus LB- und Minimalmedium. Es wurden die Elutionsfraktionen aus der Ni-NTA-Affinitätschromatographie elektrophoretisch im 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel wurde anschließend gefärbt. Spur M: Molekulargewichtsmarker Roti-Mark (s. Abb. 3.4) Spur 1: Zum Vergleich N-His-AcbZ aus *E. coli* (s. 3.1.1, und Abb. 3.4), Spur 2: N-His-AcbE. Es wurden je 15 µl der Fraktionen aufgetragen.



Es wurde angestrebt das AcbE Protein in Streptomycceten mit seiner Signalsequenz zu produzieren, sodass die Sekretion des Proteins in das Kultur-Medium stattfinden sollte. Zur Proteinproduktion wurden Zellen von *S. lividans* TK24 M2pUWL201PWacbE in Cerestar-Medium oder in 3%igem Trypton-Medium mit 0,5% Cerestar bei 28°C für 96 h kultiviert. Die Analyse des Überstandes wurde durch SDS-PAGE durchgeführt. Die Überproduktion des AcbE Proteins ist sowohl in der Abbildung 3.14 Spur 2, als auch in der Abbildung 3.15, Spur 2, deutlich zu erkennen. Da es nicht gelang ein AcbE-Fusionsprotein mit His-Tag erfolgreich in nachweisbaren Mengen zu produzieren, wurde der Überstand aus der Anzucht von *S. lividans* TK24 M2pUWL201PWacbE in 3%igem Trypton-Medium mit 0,5% Cerestar durch Konzentratoren mit einem Ausschluss-MW von 100 kDa eingeeengt (Abb. 3.15, Spur 3). Dieser sollte das native AcbE Protein enthalten.



**Abb. 3.15: Produktion von AcbE in *S. lividans* TK24 M2pUWL201PWacbE.** Die Anzucht der Zellen erfolgte in 3%igem Trypton-Medium mit 0,5% Cerestar. Spur M: Molekulargewichtsmarker Roti-Mark (s. Abb. 3.4), Spur 1: Kontrolle *S. lividans* TK24 M2pUWL201PW, Spur 2: Überproduktion von AcbE in TK24 M2pUWL201PWacbE, Spur 3: Überproduktion von AcbE in TK24 M2pUWL201PWacbE nach Anreicherung durch Konzentration. Es wurden je 15 µl der Fraktionen aufgetragen und im 10%igen SDS-PAGE getrennt.

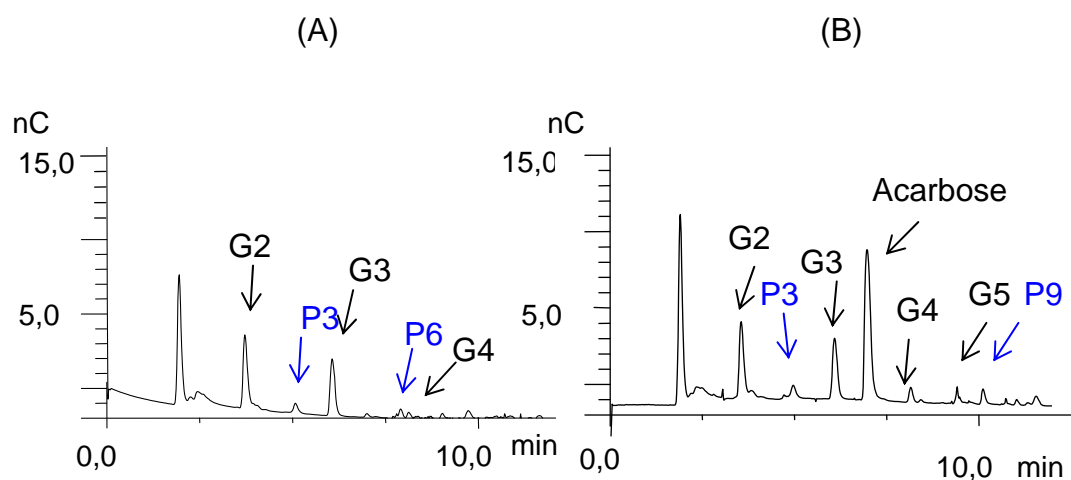
### 3.1.2.2 Charakterisierung des AcbE Proteins

Das gereinigte in *E. coli* produzierte N-His-AcbZ Protein erwies sich im Enzymtest als nicht aktiv. Die biochemische Charakterisierung des AcbE Proteins erfolgte daher mit dem nativen Protein, das in der  $\alpha$ -Amylase Mutante *S. lividans* TK24 M2 pUWL201PWacbE produziert wurde.

#### 3.1.2.2.1 Analyse der $\alpha$ -Amylaseaktivität des AcbE Proteins

Der erste Nachweis der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbE wurde durch Stärkeplatten erbracht. In der Abbildung 3.2.2: (Nachweis der  $\alpha$ -Amylase Aktivität von GacE1 und AcbE auf Stärkeplatte) ist ersichtlich, dass der Abbau der Stärke auf Stärkeplatten durch AcbE auch in Gegenwart von Acarbose stattfand, während *S. lividans* TK24 M2 unter diesen Bedingungen die Stärke im Agar nicht hydrolysieren konnte. Dieses Ergebnis wurde als Indiz für eine erfolgreiche Proteinproduktion und zusätzlicher Hinweis gewertet, dass das produzierte Enzym Acarbose-resistent ist.

Die weitere Analyse erfolgte durch HPLC-ECD mit Stärke als Substrat. Es zeigte sich, dass die Hauptprodukte der Stärke-Spaltung durch AcbE vor allem G2 und G3 waren. Auch wurde die Enzymaktivität nicht durch Acarbose gehemmt (Abb. 3.16 (A) und (B)). Es wurden ebenso wie bei der Analyse der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbZ auch bei AcbE Abbauprodukte detektiert (Peak 3, 6 und 9), deren Zuweisung zu keinem der eingesetzten Standards möglich war. Auch wurde in dem Ansatz ohne Acarbose ein Peak bei der charakteristischen Retentionszeit der Acarbose detektiert. Der gemessene Peak P3 vergrößert sich in Anwesenheit von Acarbose. Auch die als G3 und G4 detektierten Peaks weisen in Gegenwart von Acarbose eine größere Fläche auf. Des Weiteren konnten mit Acarbose die Peaks G5 sowie P9 gemessen werden.



**Abb. 3.16: HPLC-ECD-Chromatogramm zur  $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbE aus *S. lividans* TK24 M2pUWL201PWacbE.** Die Anzucht erfolgte in 3%igem Trypton-Medium mit 0,5% Cerestar. Es wurden 10  $\mu$ g/ml Enzym im Test eingesetzt als Substrat diente in (A) 0,5% Stärke und in (B) 0,5% Stärke + 1 mM Acarbose. Die Inkubation fand ÜN bei 37°C statt.

Tab. 3.6: Retentionszeiten und Fläche der Peaks die aus der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbE resultierten.

Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)	
		(A) ohne Acarbose	(B) mit 1 mM Acarbose
2,45	Glc	0,172	0,013
3,72	G2	0,740	0,660
5,08	P3	0,089	0,183
6,70	G3	0,578	0,618
7,00	A	0,024	1,858
7,90	P6	0,084	-
8,12	G4	0,039	0,115
9,38	G5	-	0,101
10,08	P9	-	0,119

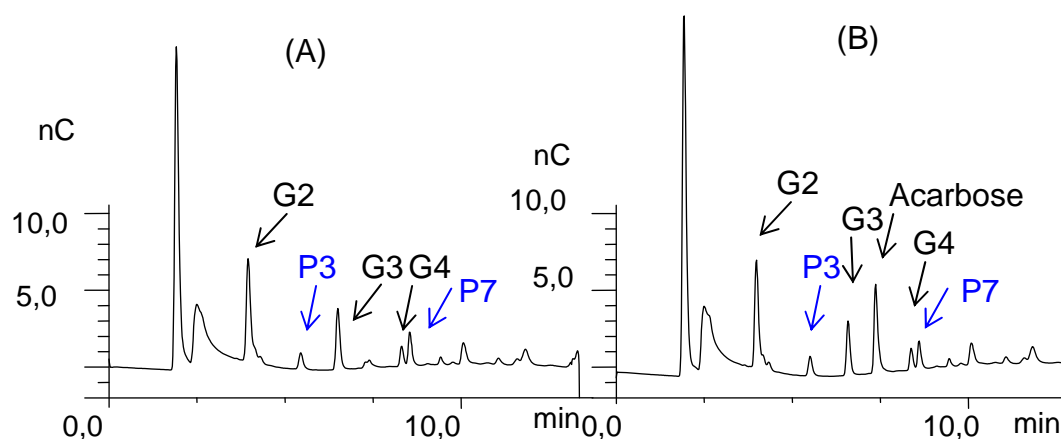
Das erhaltene Spaltmuster von AcbE weist spezifische Produkte auf, die nicht bei der Hydrolyse von Stärke durch AcbZ detektiert wurden, wie z. B. P3, P6 und P9.

### 3.1.2.2.2 Analyse der Pullulanaseaktivität von AcbE

Da in AcbE auch zwei Pullulanase-Domänen detektiert wurden (siehe Einleitung), sollte die mögliche Pullulanase-Aktivität ebenfalls nachgewiesen werden. Die Analyse der Enzymtests zur Pullulanaseaktivität von AcbE erfolgte mittels HPLC-ECD.

Auch Pullulan wurde durch das AcbE Enzym in Maltooligosaccharide gespalten (Abb. 3.17 (A) und (B)), allerdings zeigte das Chromatogramm, dass sich das Produktspektrum etwas anders zusammensetzte, als in der Analyse der Kontrolle mit der Pullulanase von *B. acidopullulyti*. AcbE spaltete Pullulan auch in die höheren Maltooligosaccharide, wie z. B. Maltotetraose (s. Abb. 3.12). Des Weiteren konnten zusätzliche Peaks gemessen werden, die nicht in den Messungen mit AcbZ vorkamen. Mit AcbE entstand P3 sowohl mit als auch ohne Acarbose.

Auffällig ist auch die Substanz P7, die direkt nach der Maltotetraose eluierte und nur in Anwesenheit von Acarbose auftrat. Möglicherweise könnte sie ein Derivat der Acarbose darstellen (siehe Diskussion). Die Chromatogramme mit AcbZ und Pullulan als Substrat  $\pm$  Acarbose wiesen einen ähnlichen „Doppel“-Peak bei der Retentionszeit von 9,6 min auf.



**Abb. 3.17: HPLC-ECD-Analyse der Pullulanaseaktivität von AcbE.** Die Anzucht erfolgte in 3%igem Trypton-Medium mit 0,5% Cerestar. Es wurden 10 µg/ml Enzym im Test eingesetzt als Substrat diente in (A) 0,5% Stärke und in (B) 0,5% Stärke + 1 mM Acarbose. Die Inkubation fand ÜN bei 37°C statt.

**Tab. 3.7: Messdaten zur Pullulanaseaktivität von Acb.E**

Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)	
		(A) ohne Acarbose	(B) mit 1 mM Acarbose
2,50	Glc	1,461	1,686
3,95	G2	1,091	0,906
5,45	P3	0,148	0,168
6,50	G3	0,525	0,424
7,40	A	0,091	0,748
8,32	G4	0,126	0,132
8,60	P7	-	0,186

Vergleicht man die Messungen in denen die heterolog produzierten sekretierten Enzymen AcbZ und AcbE von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Pullulan hydrolysierten, fällt auf, dass durch beide Enzyme G2 und G3 als Hauptprodukte generiert wurden. Die Retentionszeiten und Flächen der detektierten Peaks finden sich in der Tabelle 3.7 wieder.

Das erhaltene Spaltmuster von Pullulan durch AcbE spiegelte scheinbar auch eine Mischung der beiden Aktivitäten (Pullulanase und  $\alpha$ -Amylase) von AcbE wieder. Die für Pullulanasen typischen Abbauprodukte wie Maltohexaose und Maltononaose traten in den Ansätzen mit AcbE nicht auf, da diese durch die ebenfalls vorhandene  $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbE wahrscheinlich weiter zu kürzeren Maltooligosacchariden abgebaut wurden.

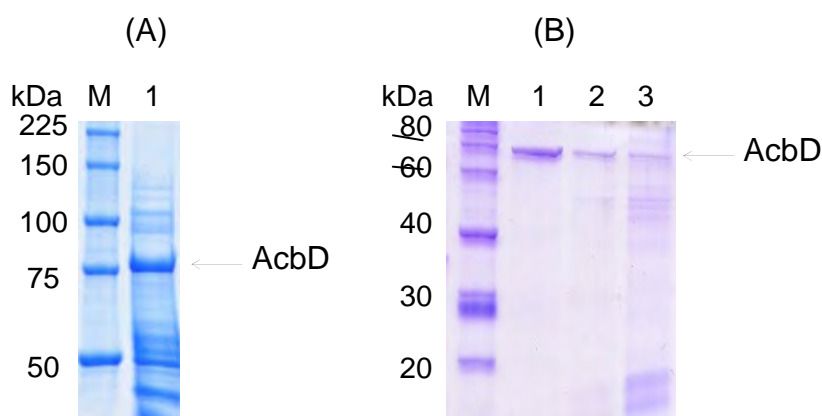
### 3.1.3 Synthese der Acarbose-Homologen durch das AcbD Enzym

#### 3.1.3.1 Überproduktion des AcbD Proteins

Die von *Actinoplanes* sp. sekretierte Acarviosyltransferase (ATase) AcbD katalysiert die Transglycosylierungs-Reaktion, bei der die höheren Acarbose-Homologen synthetisiert werden (Hemker *et al.*, 2001). Es handelt sich um eine Kondensations-Reaktion bei der Acarviosin an die 4'-Hydroxyl-Gruppe der Maltooligosaccharide gebunden wird. Die Acarbose stellt dabei den Acarviosyl-Donor da und die Oligosaccharide, die durch die extrazellulären  $\alpha$ -Amylasen AcbE und AcbZ bereitgestellt werden können, den Acarviosyl-Akzeptor.

Die Synthese der höheren Acarbose-Homologen wurde in dieser Arbeit angestrebt, um diese in der sich anschließenden AcbK-Reaktion zu phosphorylieren. Die phosphorylierten Homologen sollten als potenzielles Substrat für die putative Acarbose-4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ getestet werden (s. 3.1.7)

AcbD wurde, wie bereits zuvor beschrieben, in *S. lividans* TK23 pUWL201PW-AT (Leemhuis *et al.*, 2005) und in *S. lividans* TK24 M2 überproduziert. Die Anzucht erfolgte in Cerestar-Medium für 72 h bei 28°C. In der Abbildung 3.18 (A) ist die Produktion von AcbD im Kulturüberstand von *S. lividans* TK24 M2 per SDS-PAGE dokumentiert. In der Abbildung 3.18 (B) ist das Ergebnis der Reinigung des Proteins über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie dargestellt.

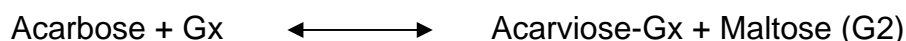


**Abb. 3.18: Produktion von AcbD in *S. lividans* TK24 M2 pUWL201PW-AT. (A) Analyse des Kulturüberstandes.** Spur M: Molekulargewichtsmarker, Broad Range (s. Abb.3.1), Spur 1: 30  $\mu$ l Überstand der Anzucht in Cerestar-Medium bei 28°C, 72 h. Die Analyse des Überstandes wurde im 8%igen SDS-PAGE durchgeführt. (B) Reinigung des Überstandes aus der Anzucht von *S. lividans* TK24 M2 pUWL201PW-AT durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Spur M: Molekulargewichtsmarker Roti-Mark (s. Abb. 3.4), Spur 1 und 2: Elutionen, Spur 3: Durchlauf; es wurden je 10  $\mu$ l der Fraktionen aufgetragen. Die Analyse der Proben erfolgte im 15%igen SDS-PAGE.

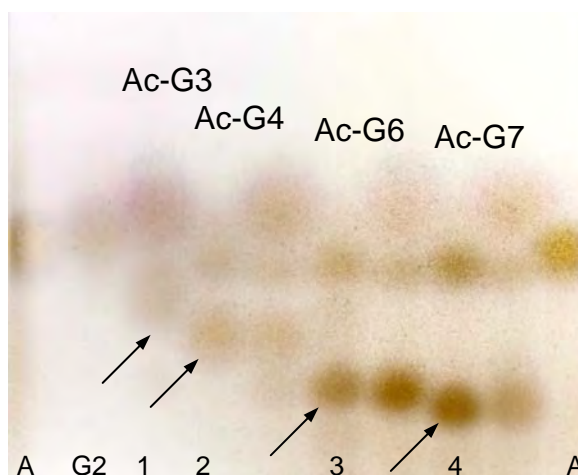
### 3.1.3.2 Nachweis der Enzymaktivität des AcbD Proteins durch DC

Die Aktivität von AcbD wurde wie in (2.10.) beschrieben mit gereinigtem AcbD Protein bestimmt; alle Enzymtests wurden bei 30°C ÜN inkubiert und anschließend mit DC analysiert.

Dem Test liegt die Austausch-Reaktion der Maltosyl-Einheit der Acarbose durch ein Maltooligosaccharid (Gx) zugrunde, sodass es zur Synthese der höheren Acarbose-Homologen kommt und Maltose freigesetzt wird.



In der Abbildung 3.19 ist die Trennung der Produkte aus den AcbD-Enzymtests zur Synthese der höheren Acarbose-Homologen durch AcbD mittels DC dargestellt. Als Akzeptor-Substrate wurden Maltotriose, Maltotetraose, Maltohexaose sowie Maltoheptaose verwendet. Die aus der Reaktion hervorgegangenen Produkte sind Acarviosyl-Maltotriose (Ac-G3), Acarviosyl-Maltotetraose (Ac-G4), Acarviosyl-Maltohexaose (Ac-G6) und Acarviosyl-Maltoheptaose (Ac-G7) und sind in der Abbildung durch Pfeile markiert. Als Referenz wurden Acarbose und Maltose, die durch die Kondensation der Substrate aus der Acarbose freigesetzt wird, ebenfalls auf die DC aufgebracht. Es ist zu erkennen, dass sich der Retentionsfaktor der Produkte mit der Zunahme um je eine Glucose-Einheit verkleinert. Es ergibt sich ein Sägezahn-Muster. Da die Methode der DC nicht geeignet war, um die Produkte ausreichend voneinander zu trennen, wurde eine weitere Analyse durch HPLC-ECD angestrebt.

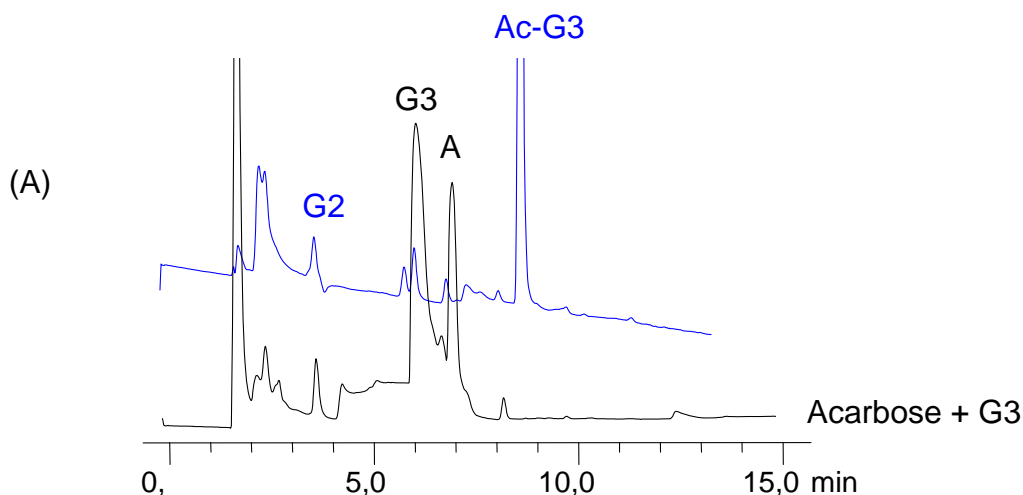


**Abb. 3.19: Enzymatische Synthese der Acarbose-Homologen durch AcbD.** Der Test wurde wie im Text beschrieben durchgeführt, die Analyse der AcbD-Reaktion wurde durch DC geführt. Ac-G3 bis Ac-G7 stellen die Produkte aus der Acarviosyl-Transfer-Reaktion dar. Spur A: Acarbose, Referenz; Spur G2: Maltose, Referenz; Spur 1: Ac-G3, Acarviosyl-Maltotriose; Spur 2: Ac-G4, Acarviosyl-Maltotetraose; Spur 3: Ac-G6, Acarviosyl-Maltohexaose; Spur 4: Ac-G7, Acarviosyl-Maltoheptaose. Als Substrat wurde jeweils Acarbose mit Maltotriose, Maltotetraose, Maltohexaose und Maltoheptaose verwendet. Das Enzym AcbD resultierte aus der Reinigung (s. Abb. 3.18 (B)). Der Test wurde bei 30°C ÜN inkubiert. Es wurden je 5 µl der Proben auf die DC aufgetragen, Visualisierung erfolgte wie unter 2. Material und Methoden beschrieben.

### 3.1.3.3 Nachweis der Enzymaktivität von AcbD durch HPLC-ECD

Der Nachweis der AcbD Aktivität konnte ebenfalls durch die Methode der HPLC-ECD erbracht werden. Die Enzymtests setzten sich analog zu 3.1.5.1 zusammen. In den Abbildungen 3.20 A bis E sind die Acarviosyl-Transformations-Reaktionen für Acarbose und die Maltooligosaccharide Maltotriose (G3) bis Maltoheptaose (G7) durch AcbD dargestellt. Der HPLC Lauf des jeweiligen Substrates ist als schwarzes Chromatogramm gezeigt, die Analyse des entsprechenden Enzymtests in dem das höhere Acarbose-Homolog synthetisiert wurde, ist vergleichend als weiteres Chromatogramm in Blau überlagert.

Die Abbildung 3.20 (A) zeigt die Analyse der Umsetzung der Substrate Acarbose und Maltotriose durch AcbD zu Acarviosyl-Maltotriose (blaues Chromatogramm). Die Substrate (G3 und A) wurden durch die Acarviosyl-Transformation fast vollständig umgesetzt und nur ein neues Produkt entstand. Es handelt sich daher um die Acarviosyl-Maltotriose. Die aus der Verknüpfung von Acarviose und Maltotriose frei werdende Maltose-Einheit der Acarbose konnte ebenso detektiert werden. Auffällig ist, dass der Peak, der eine identische Retentionszeit wie die Glucose aufweist, eine enorm große Fläche von 1,201 nC\*min im Vergleich zu den anderen Messungen (B-E) hat. Auch die Fläche der Acarbose von 0,277 nC\*min scheint hier eher außergewöhnlich groß zu sein (s. Tab. 3.8 (A)).



**Abb. 3.20 (A): HPLC-ECD Chromatogramm zum Nachweis der Synthese von Acarviosyl-Maltotriose durch AcbD.** Der Enzymtest setzte sich wie unter 2.Material und Methoden beschrieben zusammen und wurde per HPLC analysiert (s. 2.10). Das schwarze Chromatogramm stellt die Analyse der Substrate Acarbose und Maltotriose dar. Das blaue Chromatogramm zeigt, dass nur ein Produkt, die Acarviosyl-Maltotriose (Ac-G3) entstanden war.

Tab. 3.8 (A): Retentionszeiten/Flächen der Substrate Acarbose und Maltotriose sowie des Enzymtests mit AcbD.

Kontrolle: G3 + A*			AcbD + G3 + A*		
Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)	Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)
2,40	Glc	0,209	2,47	Glc	1,201
3,90	G2	0,122	3,83	G2	0,231
6,43	G3	10,102	6,32	G3	0,164
7,37	Acarbose	4,335	7,12	Acarbose	0,277
			8,95	Ac-G3	3,238

\* Die Daten aus der Tabelle 3.8 (A) beziehen sich bei der Kontrolle auf die Messung der Referenz-Substanzen, die in Abb. 3.20 (A) in schwarz dargestellt sind. Die Daten der Messung des Enzymtests (Abb. 3.20 (A), blaues Chromatogramm), in der Tabelle blau dargestellt, beziehen sich auf die Umsetzung der Substrate aus der Kontrolle durch AcbD. Acarviosyl-Maltotetraose (Ac-G4) wurde durch AcbD aus Acarbose und Maltotetraose synthetisiert. In der Abbildung 3.20 (B) ist das neue Produkt Ac-G4 gezeigt. Maltotetraose ist weiterhin als Peak mit einer Fläche von 1,225 nC\*min detektiert worden, und wurde somit nicht vollständig als Substrat umgesetzt. Des Weiteren konnte Maltose gemessen werden (s. Tab. 3.8 (B)).

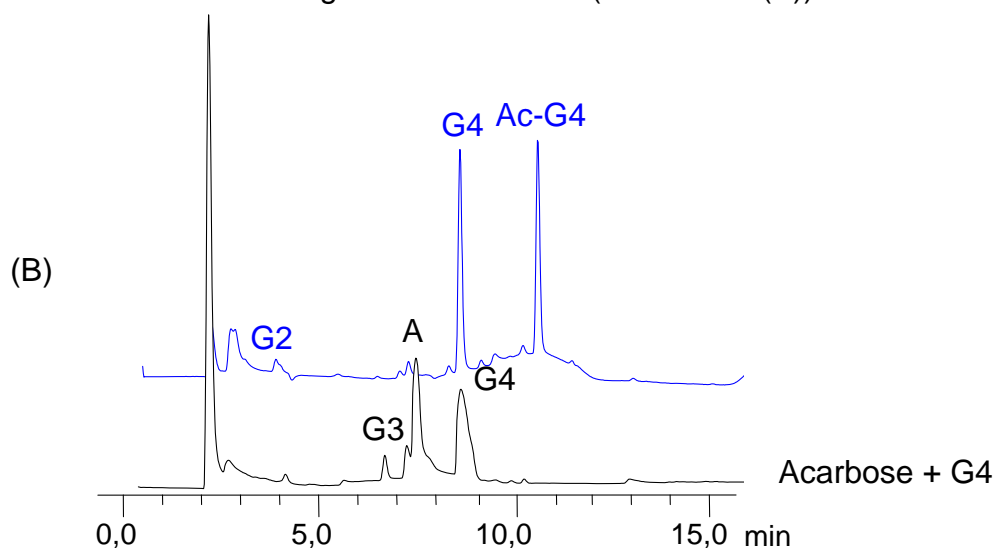


Abb. 3.20 (B): HPLC-ECD Chromatogramm zum Nachweis der Synthese von Acarviosyl-Maltotetraose durch AcbD. Der Enzymtest setzte sich wie oben beschrieben zusammen und wurde per HPLC analysiert (s. 2.10.9). Das schwarze Chromatogramm stellt die Analyse der Substrate Acarbose und Maltotetraose dar. Das blaue Chromatogramm zeigt, dass ein Produkt, die Acarviosyl-Maltotetraose (Ac-G4) entstanden ist.

Tab. 3.8 (B): Retentionszeiten/Flächen der Substrate Acarbose und Maltotetraose sowie des Enzymtests mit AcbD.

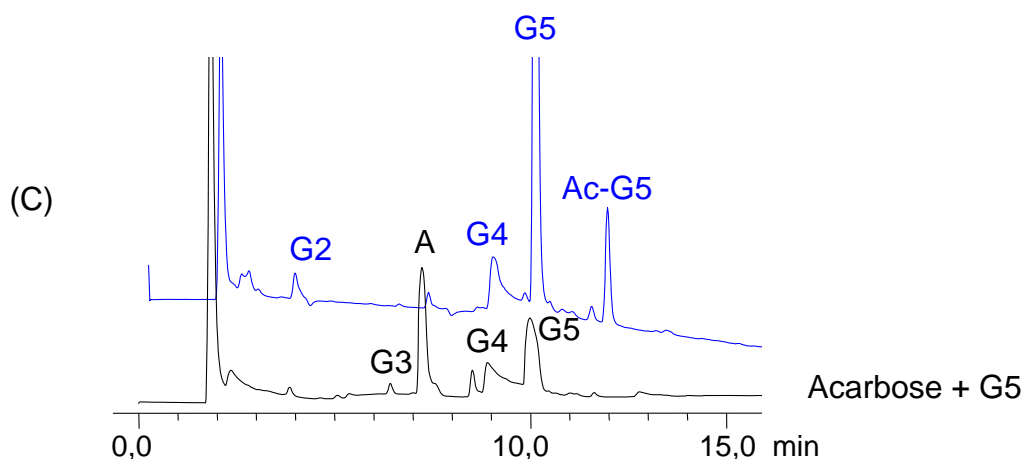
Kontrolle: G4 + A*			AcbD + G4 + A*		
Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)	Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)
2,38	Glc	0,623	2,42	Glc	0,253
3,92	G2	0,111	3,63	G2	0,173
6,50	G3	0,563	7,27	A	0,142



Kontrolle: G4 + A*			AcbD + G4 + A*		
Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)	Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)
7,12	Acarbose	0,684	8,67	G4	1,225
8,55	G4	5,709	10,78	Ac-G4	1,202

\* s. Tab. 3.8 (A)

In der Abbildung 3.20 (C) ist die enzymatische Synthese von Acarviostyl-Maltopentaose (Ac-G5) durch AcbD aus Acarbose und Maltopentaose dargestellt. Es entstand das erwartete Produkt, die Acarviostyl-Maltopentaose. Weiterhin wurde das Substrat Maltopentaose detektiert. Die aus der Transfer-Reaktion resultierende Maltose wurde ebenso angezeigt. Des Weiteren traten in der Kontrolle der Substrate Acarbose und Maltopentaose bereits die Maltooligosaccharide Maltotriose und Maltotetraose auf. Möglicherweise war das auf die mangelnde Reinheit bzw. die Instabilität der Substrate zurückzuführen. Die Maltotetraose wurde ebenso im Enzymtest mit AcbD detektiert, während die Maltotriose nicht auftrat (s. Tab. 3.8 (C)).



**Abb. 3.20 (C): HPLC-ECD Chromatogramm zum Nachweis der Synthese von Acarviostyl-Maltopentaose durch AcbD.** Der Enzymtest setzte sich wie unter 2.10.7.1 beschrieben zusammen und wurde per HPLC analysiert (s. 2.10.9). Das schwarze Chromatogramm stellt die Analyse der Substrate Acarbose und Maltopentaose dar. Das blaue Chromatogramm zeigt, dass ein neues Produkt, die Acarviostyl- Maltopentaose (Ac-G5) entstanden ist.

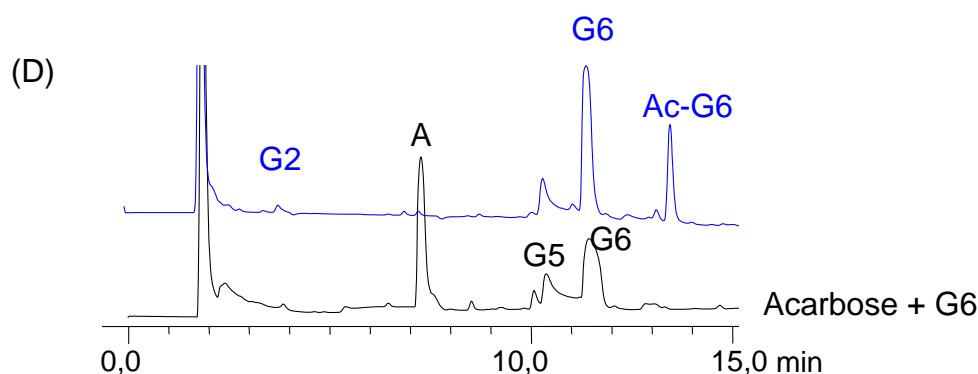
**Tab. 3.8 (C): Retentionszeiten und Flächen der Substrate Acarbose und Maltopentaose sowie des Enzymtests mit AcbD.**

Kontrolle: G5 + A*			AcbD + G5 + A*		
Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)	Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)
2,42	Glc	0,820	2,67	Glc	0,268
3,93	G2	0,144	3,88	G2	0,309
6,57	G3	0,247	7,42	Acarbose	0,097
7,38	Acarbose	5,546	8,2	G4	0,691
8,70	G4	0,659	9,89	G5	4,897

Kontrolle: G5 + A*			AcbD + G5 + A*		
Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)	Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)
9,91	G5	5,008	12,17	Ac-G5	0,864

\* s. Tab. 3.8 (A)

Die Abbildung 3.20 (D) zeigt, dass durch die Umsetzung der Substrate Acarbose und Maltohexaose durch AcbD die Acarviosyl-Maltohexaose (Ac-G6) entstanden war. Das Substrat Maltohexaose trat weiterhin auf, während die Acarbose mit 0,082 nC\*min kaum mehr im Enzymansatz vorhanden war. Die freigesetzte Maltose wurde detektiert. Auch hier wurde das um eine Glucoseeinheit kleinere Maltooligosaccharid, die Maltopentaose sowohl bei der Messung der Substrate als auch im Enzymtest nachgewiesen (s.3.8 (D)).



**Abb. 3.20 (D): HPLC-ECD Chromatogramm zum Nachweis der Synthese von Acarviosyl-Maltohexaose durch AcbD.** Der Enzymtest setzte sich wie unter 2.10.7.1 beschrieben zusammen und wurde per HPLC analysiert (s. 2.10.9). Das schwarze Chromatogramm stellt die Analyse der Substrate Acarbose und Maltohexaose dar. Das blaue Chromatogramm zeigt, dass ein neues Produkt, die Acarviosyl- Maltohexaose (Ac-G6) entstanden ist.

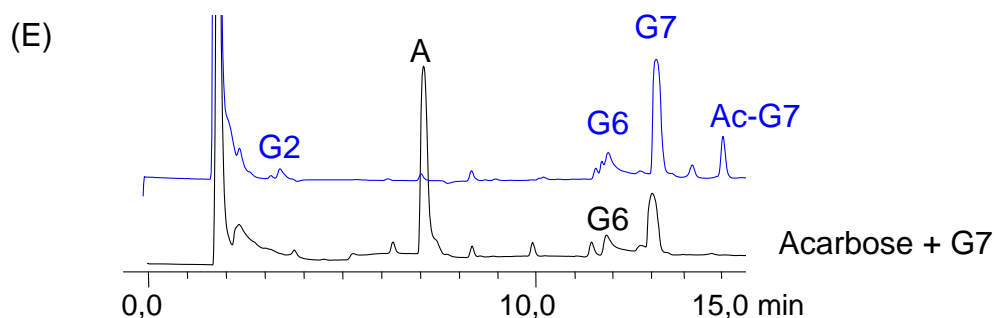
**Tab. 3.8 (D): Retentionszeiten/Flächen der Substrate Acarbose und Maltohexaose sowie des Enzymtests mit AcbD.**

Kontrolle: G6 + A*			AcbD +G6 + A*		
Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)	Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)
2,45	Glc	0,563	2,58	Glc	0,058
3,93	G2	0,087	3,88	G2	0,284
7,42	Acarbose	5,474	7,43	Acarbose	0,082
10,28	G5	1,145	10,31	G5	1,204
11,67	G6	4,756	11,68	G6	3,132
			13,80	Ac-G6	2,385

\* s. Tab. 3.8 (A)

Acarviosyl-Maltoheptaose (Ac-G7) wurde durch das AcbD Enzym aus Acarbose und Maltoheptaose synthetisiert. In der Abbildung 3.20 (E) ist das Produkte Ac-G7 gezeigt. Maltoheptaose ist weiterhin als Peak mit einer Fläche von 1,692 nC\*min

detektiert worden, und wurde somit nicht vollständig als Substrat umgesetzt. Des Weiteren wurde die Maltose angezeigt (s. Tab. 3.8 (E)).



**Abb. 3.20 (E): HPLC-ECD Chromatogramm zum Nachweis der Synthese von Acarviosyl-Maltoheptaose durch AcbD.** Der Enzymtest setzte sich wie unter 2.10.7.1 beschrieben zusammen und wurde per HPLC analysiert (s. 2.10.9). Das schwarze Chromatogramm stellt die Analyse der Substrate Acarbose und Maltoheptaose dar. Das blaue Chromatogramm weist, das neue Produkt, die Acarviosyl- Maltoheptaose (Ac-G7) nach.

**Tab. 3.8 (E): Retentionszeiten und Flächen der Substrate Acarbose und Maltoheptaose sowie des Enzymtests mit AcbD.**

Kontrolle: G7 +A*			AcbD + G7 +A*		
Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)	Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)
2,45	Glc	0,824	2,50	Glucose	0,184
3,92	G2	0,101	6,35	G2	0,233
7,37	Acarbose	5,366	7,22	Acarbose	0,124
11,45	G6	0,770	11,42	G6	0,873
13,47	G7	4,204	13,33	G7	3,692
			15,07	Ac-G7	0,696

\* s. Tab. 3.8 (A)

Somit lieferten die HPLC-ECD Läufe dasselbe Ergebnis wie die Analysen der Produkte durch DC. Entsprechend der Anzahl der Glucoseeinheiten in den Substratmolekülen erhöhte sich auch die Retention in beiden Trennmethode, sodass von einer jeweils aktiven Transferreaktion ausgegangen werden kann.

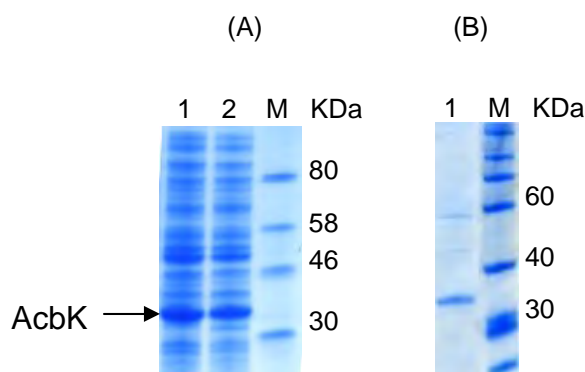
Die eingesetzten Substrate wurden nach der Inkubation mit AcbD weiterhin detektiert und wurden somit nicht vollständig umgesetzt. Auffällig war auch, dass bei der Synthese von Acarviosyl-Maltopentaose und Acarviosyl-Maltoheptaose der jeweilige Produkt-Peak im Vergleich zu den anderen Produkten (Ac-G3, Ac-G4 und Ac-G6) eine relativ kleine Fläche aufwies, während der Substrat-Peak im Enzymtest weiterhin eine große Fläche, vergleichbar der Fläche der Kontroll-Messung (G5 + A und G7 + A) zeigte. Die Acarviosyl-Maltopentaose hatte nur eine Fläche von 0,864 nC\*min, der Umsatz an G5 im Enzymtest betrug lediglich 2%. Gleiches gilt auch für die Acarviosyl-Maltoheptaose, deren Fläche 0,696 nC\*min betrug, während der Umsatz von G7 mit Acarbose durch AcbD sich immerhin auf 12% belief. Der Umsatz von G3 zu Ac-G3 betrug 98%, der von G4 zu Ac-G4 79% und der von G6 zu Ac-G6 immer noch 34%.

### 3.1.4 Phosphorylierung der Acarbose-Homologen durch das AcbK Enzym

#### 3.1.4.1 Überproduktion AcbK

AcbK wurde benötigt, um phosphorylierte Acarbose sowie die phosphorylierten, höheren Acarbose-Homologen zu synthetisieren, die potentielle Substrate für das Enzym AcbQ darstellen könnten.

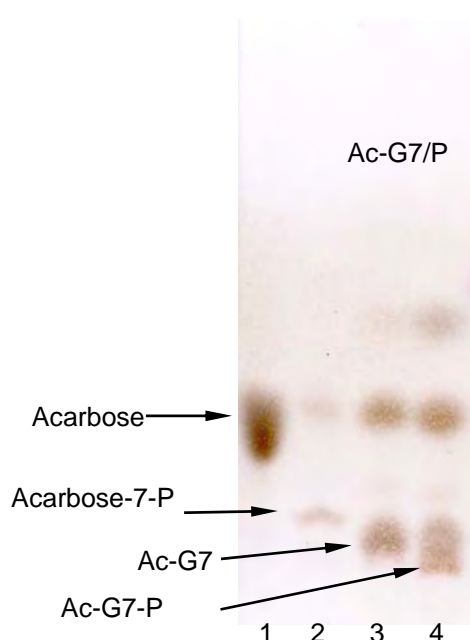
Die Überproduktion des Gens *acbK*, das für die Acarbose-7-Kinase kodiert, wurde bereits zuvor beschrieben (Zhang *et al.*, 2002; 2003; Leemhuis *et al.*, 2005). Die Expression von *acbK* wurde in dieser Arbeit mit dem Konstrukt pET16bacbK in dem *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) optimiert, wie bereits von Rockser und Wehmeier (2009) beschrieben. Die Anzucht erfolgte bei 37°C in LB-Medium und die Dauer der IPTG-Induktion betrug 3 h. Das *acbK* Gen wurde N-terminal an das 10x His-Tag des pET16b Plasmids fusioniert (N-His-AcbK), um so eine spätere Reinigung des Proteins über die Nickel-NTA-Affinitätschromatographie durchzuführen. Die theoretisch berechnete Proteingröße von AcbK (33,4 kDa) stimmt gut mit der des produzierten Proteins überein (s. Abb. 3.21 (A)). Das Ergebnis der Reinigung des AcbK Proteins ist in der Abbildung 3.21 (B) gezeigt.



**Abb. 3.21: AcbK Produktion mit *E. coli* BL21(DE3)pET16bacbK.** (A) Kontrolle der Proteinexpression, Spur M: Molekulargewichtsmarker Broad Range (s. Abb. 3.5), Spur 1: Gesamtzellextrakt aus *E. coli* BL21(DE3)pET16bacbK, Spur 2: lösliche Fraktion aus Spur 1. Es wurden je 10 µl der Fraktionen im 10%igen SDS-PAGE analysiert. Das AcbK Protein ist mit einem Pfeil markiert. (B) Reinigung des His-AcbK Proteins über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Spur M: Molekulargewichtsmarker Roti-Mark (s. Abb. 3.4), Spur 1: Elution von AcbK. Es wurden je 5 µl der Fraktionen auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen.

### 3.1.4.2 Nachweis der Aktivität von AcbK durch nicht-radioaktiv-markierte Substrate im Enzymtest

Die Enzymtests setzten sich wie zuvor beschrieben zusammen (Rockser & Wehmeier, 2009). Die Aktivität von AcbK wurde sowohl mit zellfreiem Rohextrakt als auch mit gereinigtem Protein nachgewiesen (s. 2.10.7.2). Zur Kontrolle wurde der zellfreie Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Als Substrate für AcbK dienten Acarbose sowie die höheren Acarbose-Homologen, die zuvor durch die Acarviosyl-Transferase AcbD synthetisiert wurden (s. 3.5). Der Nachweis von Acarbose-7-P und der phosphorylierten höheren Acarbose-Homologen wurde mittels DC geführt.



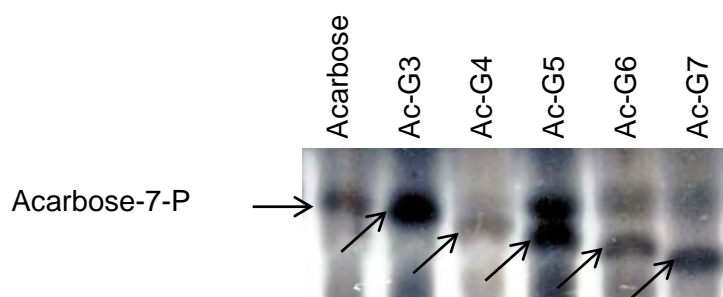
**Abb. 3.22: Phosphorylierung von Acarbose und der höheren Acarbose-Homologen durch AcbK.** Die Acarbose-Homologen wurden zuvor durch die Acarviosyl-Transferase AcbD synthetisiert (s. 3.5, Ac = Acarviose-Einheit, G7 = Maltoheptaose, P = Phosphat). Spur 1: Acarbose (Referenz); Spur 2: Acarbose-7-P; Spur 3: Ac-G7 (Referenz); Spur 4: Ac-G7-Phosphat. Die Trennung des Reaktionsgemisches (es wurden je 6  $\mu$ l aufgetragen) erfolgte auf einer DC-Folie (s. 2.10.8).

Exemplarisch ist die Phosphorylierung von Ac-G7 in der Abbildung 3.22 dargestellt und die Substrate und Produkte sind durch Pfeile markiert. Das Produkt Acarbose-7-P ist deutlich zu erkennen; da Acarbose nicht vollständig phosphoryliert wurde, ist das Substrat auch noch als schwache Bande sichtbar. Im Vergleich zu der Acarbose ( $R_f$ -Wert: 0,38) wies Acarbose-7-P ( $R_f$ -Wert: 0,22) einen kleineren Retentionsfaktor auf. Der relative Retentionsfaktor ( $R_{st}$ -Wert) von A-7-P betrug etwa 0,57. Acarbose lag wiederum unvermeidbar in jedem Enzymtest als zweites potentielles Substrat in den Ansätzen vor, bedingt dadurch, dass Acarbose durch AcbD nie vollständig umgesetzt wurde, war die Auswertung dieser Tests erschwert. Eine Zuordnung war nicht möglich, da sich die Retentionswerte von Acarbose-7-P und den Acarbose-Homologen kaum unterschieden. Es wurde die weitere Charakterisierung der Produkte durch radioaktiv-markierte Substrate angestrebt.

### 3.1.4.3 Nachweis der Aktivität des AcbK Enzyms durch Enzymtests mit radioaktiv-markierte Substraten

Die AcbK-Reaktion wurde mit den verschiedenen Substraten (s. 3.5) und mit  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP als Phosphat-Donor durchgeführt. Ziel war es dabei die Acarbose und die Acarbose-Homologen durch die Phosphorylierung radioaktiv zu markieren, um so die Detektion der aus dem Enzymtest resultierenden Produkte zu erleichtern. Durch die  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -Markierung wurden daher nur die  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markierten Produkte nach Exposition auf einem Röntgenfilm visualisiert.

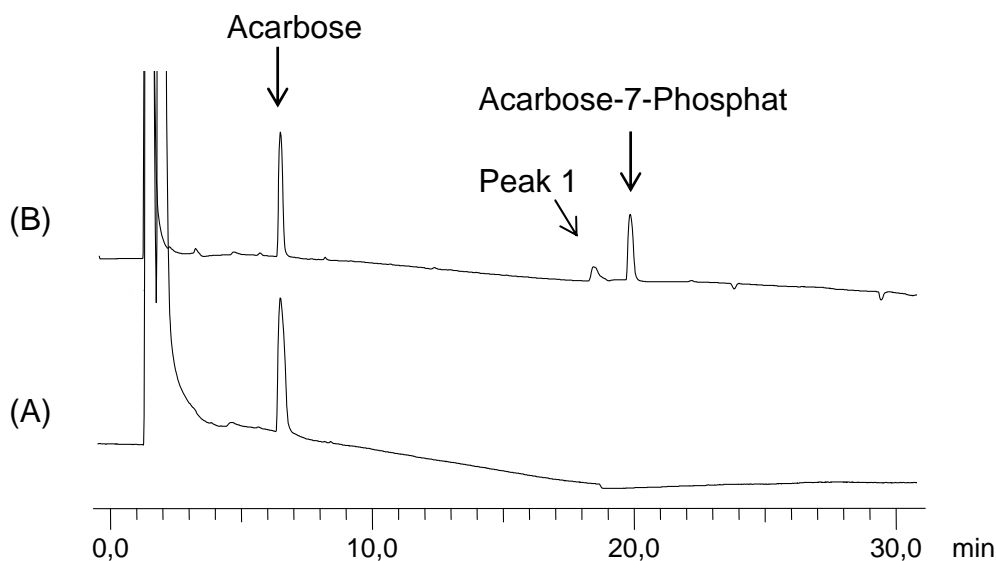
In der Abbildung 3.23 ist eine eindeutig Produktbande bei allen Enzymtests auf dem Röntgenfilm detektiert worden, die Acarbose-7-P darstellt. Des Weiteren ist die Kinase-Reaktion für die Substrate Acarviosyl-Maltotriose bis Acarviosyl-Maltoheptaose (Ac-G3 - Ac-G7) gezeigt. Die entstandenen Produktbanden Acarbose-7-P sowie Ac-G3-P bis Ac-G7-P sind durch Pfeile markiert. Es ergibt sich in Abhängigkeit von der Länge der erhaltenen Produkte ein typisches Bandenmuster; durch jede weitere Glucoseeinheit erhöhte sich die Retention.



**Abb. 3.23:**  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -radioaktiv-markiertes Acarbose-7-P und die  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -phosphorylierten höheren Acarbose-Homologen. Spur 1: Acarbose-7-P; Als Substrat für AcbK dienen Acarbose und die Acarbose-Homologen Ac-G3 bis Ac-G7. Die Pfeile markieren die phosphorylierten höheren Acarbose-Homologen. Die Trennung des Enzymtests (es wurden 3  $\mu\text{l}$  aufgetragen) erfolgte mittels DC (s. 2.10.8).

### 3.1.4.4 Analyse der Phosphorylierung von Acarbose und der höheren Acarbose-Homologen mittels HPLC-ECD

In der Abbildung 3.24 sind zwei HPLC-Chromatogramme zum Vergleich übereinander abgebildet; Abbildung 3.24 (A) zeigt den Verlauf der Messung der Referenzsubstanz Acarbose; die Analyse des Enzymtests in dem durch AcbK A-7-P generiert wurde, ist in der Abbildung 3.24 (B) dargestellt. In den AcbK Ansätzen wurde Acarbose bei der charakteristischen Retentionszeit von 7,1 min detektiert. Es konnten dabei zwei weitere Peaks detektiert werden. Der Peak mit der Retentionszeit von 21,1 min aufgrund der Größe seiner Fläche relativ zum Acarbose-Peak als Acarbose-7-P definiert wurde. Die Acarbose, die zur Referenz diente und mittels HPLC-ECD vermessen wurde, wies eine Fläche von 6,289 nC\*min auf; die Analyse der Substanzen aus der AcbK-Reaktion ergab folgende Flächen: Acarbose 3,665; Peak 1 0,793 und Acarbose-7-P 2,363 nC\*min. Die Flächen der detektierten Peaks nach der AcbK-Katalyse ergaben somit in der Summe die Fläche des eingesetzten Substrates. Dabei wurde Acarbose nicht vollständig durch AcbK phosphoryliert.



**Abb. 3.24: HPLC-ECD Analyse der Phosphorylierung von Acarbose.** (A) Messung von Acarbose zur Referenz (10 mM), (B) Messung der AcbK Kinase-Reaktion mit 10 mM Acarbose, Inkubation ÜN bei 30°C.

Analog zu der Phosphorylierung der Acarbose zu Acarbose-7-P wurden, die mit Hilfe von AcbD produzierten höheren Acarbose-Homologen ebenfalls in den AcbK-Tests eingesetzt. In der Abbildung 3.25 sind die HPLC-ECD Chromatogramme der AcbK-Tests mit den höheren Acarbose-Homologen vergleichend dargestellt.

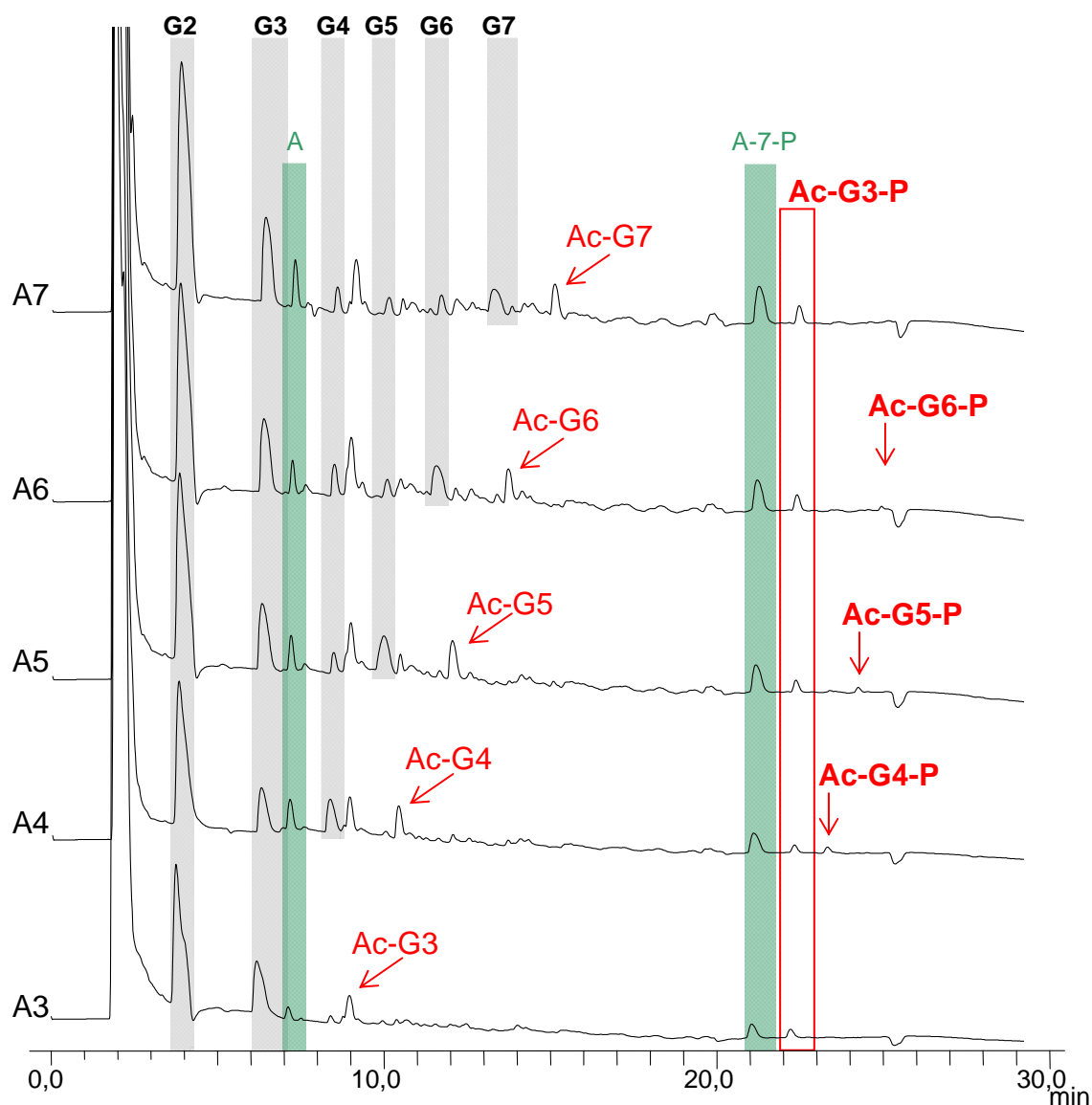
Die Retentionszeiten waren für die phosphorylierten höheren Acarbose-Homologen (s. 3.1.3) gegenüber der von Acarbose-7-P deutlich verlängert und wurden somit mit

der Anzahl der Glucose-Einheiten größer, was auch bei der Analyse der Tests mittels DC zu beobachten war (s. 3.1.4.2).

Die entstanden Produkte Ac-G3-P, Ac-G4-P, Ac-G5-P und Ac-G6-P sind in der Abbildung durch Pfeile markiert. Ein Ac-G7-P Produkt konnte jedoch unter den gewählten Bedingungen ohne Änderung der HPLC-ECD Einstellungen nicht mehr detektiert werden. Ac-G3-P trat in allen Messungen auf, während Ac-G4-P nur bei dem Ansatz dargestellt in der Abbildung 3.25 A4 detektiert werden konnte; Ac-G4-P ist in der Abbildung 3.25 A4 durch einen Pfeil bei 23,28 min markiert. Sowohl bei der in der Abbildung 3.25 A5 als auch bei der in der Abbildung 3.25 A6 dargestellten Messung, konnte ein weiteres Produkt eluiert werden, wahrscheinlich Ac-G5-P. Es konnte ein weiterer Peak, wahrscheinlich Ac-G6-P auch bei der Messung in der Abbildung 3.25 A6 und A7 detektiert werden; Auch Peak Ac-G6-P ist in der Abbildung 3.25 A6 durch einen Pfeil markiert dargestellt. In allen Tests wurde Acarbose wahrscheinlich nicht vollständig mit den entsprechenden Maltooligosacchariden durch AcbD umgesetzt, so dass Acarbose zusätzlich zu den synthetisierten höheren Acarbose-Homologen auch als Substrat von AcbK erkannt und phosphoryliert wurde. Acarbose-7-P wurde in allen Messungen detektiert und konnte somit als Kontrolle der Kinase-Reaktion herangezogen werden.

In allen Testansätzen konnte jedoch die Maltose, die durch die Austausch-Reaktion freigesetzt wurde, detektiert werden. Auch wurde jeweils die Maltotriose nachgewiesen, was auf deren Beimischung in den Akzeptor-Substraten zurückzuführen war. G3 war somit auch als Acarviosyl-Akzeptor verfügbar, sodass Ac-G3 auch in allen Ansätzen (A3-A7) phosphoryliert vorlag. Ac-G3-P findet sich in jeder Messung wieder. In den Ansätzen mit längeren Maltooligosacchariden waren auch Ac-G4 und Ac-G5 nachweisbar, wenn G5, G6 und G7 bzw. G6 und G7 als Akzeptor-Substrate fungierten (s. Tab. 3.9).





**Abb. 3.25: Phosphorylierung von Acarviosyl-Maltotriose bis Acarviosyl-Maltoheptaose (A3 bis A7) durch AcbK.** Die Chromatogramme der Analyse der Tests in denen die Substrate Ac-G3 bis Ac-G7 (durch AcbD synthetisiert, s. 3.1.5.2) eingesetzt wurden. Das unterste Chromatogramm (A3) stellt die Messung des Enzymtests mit Acarbose und Maltotriose als Substrat sowohl nach der Acarviosyl- als auch nach der Kinase-Reaktion dar. Es folgt darüber die Analyse des Tests mit Acarbose und Maltotetraose (A4) als Substrat nach der AcbD- und der AcbK-Reaktion; des Weiteren schließen sich aufsteigend die entsprechenden Analysen der Tests mit Acarbose und Maltopentaose (A5), mit Acarbose und Maltohexaose (A6) und zum Schluss mit Acarbose und Maltoheptaose (A7). Die grau-unterlegten Peaks stellen die Substrate Maltotriose (G3) bis Maltoheptaose (G7) dar; Acarbose (A) und A-7-P sind grün-unterlegt. Die Acarbose-Homologen sind mit Pfeilen markiert. Die Produkte aus der AcbK-Reaktion sind ebenfalls mit Pfeilen gekennzeichnet und als Ac-G4-P bis Ac-G7-P bezeichnet bzw. Ac-G3-P ist rot-umrandet, da es in allen weiteren Test detektiert werden konnte. Ein weiteres Produkt, das durch die AcbD-Reaktion entstand, stellt die Maltose (G2) dar und ist in der Abbildung ebenfalls grau-unterlegt. Die Retentionszeiten und die Flächen der detektierten Peaks sind in der Tabelle 3.9 aufgeführt.

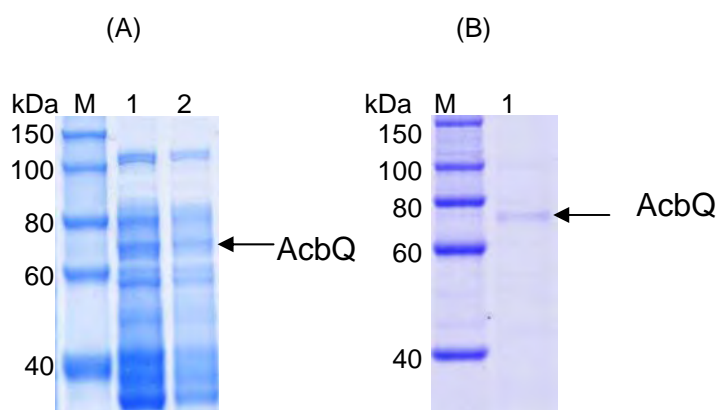
Tab. 3.9: Retentionszeiten/Fläche der phosphorylierten Acarbose und der höheren Acarbose-Homologen

Peak	Ret. Time (min)	Fläche (nC*min)				
		Ac-G3-P	Ac-G4-P	Ac-G5-P	Ac-G6-P	Ac-G7-P
G2	3,87	6,453	9,189	13,244	16,742	18,394
G3	6,40	2,244	2,196	3,857	4,891	5,431
A	7,28	0,247	0,925	0,987	1,017	1,524
G4	8,57	-	1,520	0,610	1,179	0,890
Ac-G3	8,95	0,882	1,187	1,737	2,528	1,792
Ac-G4	10,58	-	1,024	0,395	0,468	0,312
G5	10,12	-		2,184	0,696	0,705
Ac-G5	12,02			1,628	-	-
G6	11,68	-	-	-	2,254	0,784
G7	13,27	-	-	-	-	1,742
Ac-G6	13,80	-	-	-	1,404	-
Ac-G7	15,08	-	-	-	-	1,473
<b>A-7-P</b>	<b>21,22</b>	<b>0,510</b>	<b>1,016</b>	<b>1,404</b>	<b>1,999</b>	<b>2,549</b>
<b>Ac-G3-P</b>	<b>22,43</b>	<b>0,219</b>	<b>0,268</b>	<b>0,394</b>	<b>0,644</b>	<b>0,733</b>
<b>Ac-G4-P</b>	<b>23,28</b>	-	<b>0,226</b>	-	-	-
<b>Ac-G5-P</b>	<b>24,57</b>	-	-	<b>0,144</b>	-	<b>0,036</b>
<b>Ac-G6-P</b>	<b>25,10</b>	-	-	-	<b>0,151</b>	<b>0,062</b>

### 3.1.5 Charakterisierung des AcbQ Proteins

#### 3.1.5.1 Überproduktion AcbQ

Das im Acarbose-Biosynthese-Gencluster vorkommende *acbQ* Gen (2097 bp) codiert für die putative cytoplasmatisch lokalisierte Acarbose-4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ (75 kDa). Die heterologe Überexpression des *acbQ*-Gens in *E. coli* BL21(DE3) erfolgte unter der Verwendung des pET16b Plasmids, das die Produktion des Proteins ermöglicht (N-His-AcbQ). Die optimale Produktion an cytosolischem AcbQ Protein (N-terminales 10x His-Tag-Protein) wurde mit *E. coli* BL21(DE3)pET16bacbQ erzielt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer  $OD_{595nm}$  von 1,0 bei 37°C inkubiert, die Expression des *acbQ* Gens wurde durch 0,4 mM IPTG induziert und die Zellen wurden dann anschließend bei 15°C für 65 h kultiviert. Der Gesamtzellextrakt sowie die lösliche Fraktion wurden nachfolgend einer SDS-PAGE unterzogen. AcbQ besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 75 kDa, dieses entspricht der Größe des produzierten Proteins und ist in der Abbildung 3.26 (A) mit einem Pfeil markiert dargestellt. Das Ergebnis der Reinigung des N-His-AcbQ-Fusionsproteins ist in Abbildung 3.26 (B) gezeigt.



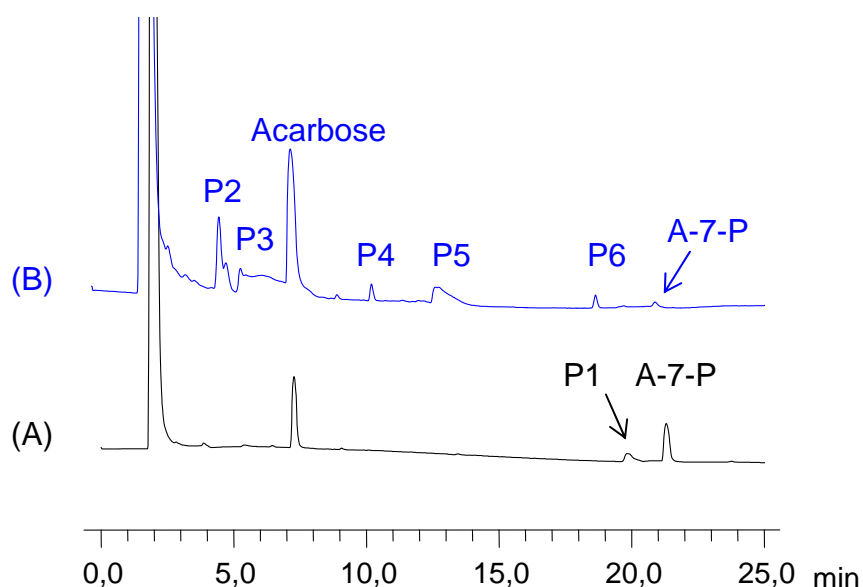
**Abb. 3.26: Produktion von AcbQ in *E. coli* BL21(DE3)pET16bacbQ.** (A) Expression von *E. coli* BL21(DE3)pET16bacbQ in LB-Medium bei 15°C für 65 h (s. 2.10), Spur 1: Gesamtzellextrakt, Spur 2: lösliche Fraktion von Spur 1; (B) Reinigung von His-AcbQ über Ni-NTA-Affinitätschromatographie, Spur 1: Elution; M: Marker: 10-150 Roti-Mark. Die Analyse der Proben erfolgte in einem 10%igen SDS-PAGE. Es wurden je 10  $\mu$ l der Fraktionen aufgetragen.

Wie in 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben wurden die potentiellen Substrate für AcbQ durch die Acarviosyl-Transferase AcbD und die Kinase AcbK synthetisiert. Die Enzymtests setzten sich wie unter 2.10.7.3 beschrieben zusammen. Die ersten Analysen zur Aktivität von AcbQ erfolgten per DC. Dazu wurden die Acarbose-Homologen und die phosphorylierten Acarbose-Homologen verwendet. Es zeigte sich allerdings, dass die Methode der DC aufgrund der schlechten Trennung der Substrate, nicht geeignet war. Auch die Verwendung der [ $^{32}$ P]- oder [ $^{14}$ C]-markierten Substrate (s. 3.15 und 3.16) erbrachte keine interpretierbaren Ergebnisse. Letztlich wurden die Testergebnisse durch die Analyse mittels HPLC-ECD verifiziert.

### 3.1.5.2 Analyse der Aktivität des AcbQ Proteins durch HPLC-ECD

In der Abbildungen 3.27 sind zwei HPLC-Chromatogramme zum Vergleich übereinander dargestellt; Abb. 3.27 (A) zeigt die Messung des aus der AcbK-Reaktion entstandenen Acarbose-7-P als Referenz. Die Abbildung 3.27 (B) gibt den Verlauf des Umsatzes von Acarbose-7-P als wieder.

Das Substrat A-7-P wurde in der HPLC-ECD nur noch mit einer kleinen Fläche detektiert. Somit setzt das Enzym A-7-P als Substrat um. Der Peak der Acarbose verzeichnete eine leichte Zunahme an Fläche, so dass aus der Reaktion mit dem Substrat A-7-P unter anderem wieder Acarbose hervorgeht. Des Weiteren konnten zusätzliche Peaks (P2 bis P6) gemessen werden, deren Zuordnung aus Mangel an Referenzsubstanzen nicht gegeben war. Die Peaks P2 und P5 stellten die Hauptprodukte dieser Reaktion dar. Vor dem Acarbose-Peak konnte P3 gemessen werden. Die Peaks P4 und P5 eluierten später von der Säule. Peak P1, der bei der Messung der Referenz angezeigt wurde, trat nach Inkubation des Reaktionsgemisches nicht mehr auf.



**Abb. 3. 27: HPLC-ECD-Chromatogramm zum Nachweis der Aktivität von AcbQ auf Acarbose-7-P.** Die Proben wurden wie unter 2.10.9 beschrieben analysiert. (A) Messung der Referenzsubstanz A-7-P; (B) Analyse des Enzymtests mit AcbQ und A-7-P. P1-P6 stellten die zusätzlich detektierten Peaks dar. Das Auftauchen der Peaks P2-P6 war auf die Aktivität von AcbQ zurückzuführen.

Analog wurden die phosphorylierten höheren Acarbose-Homologen als Substrate für AcbQ eingesetzt. In der Abbildung 3.28 sind diese Umsätze gezeigt. Die dazugehörigen Messdaten sind in der Tabelle 3.10 ersichtlich. Aufgrund der Vielzahl der detektierten Peaks, werden im weiteren Verlauf nur die Peaks erwähnt und dargestellt, die von der Messung der Referenz abweichen.

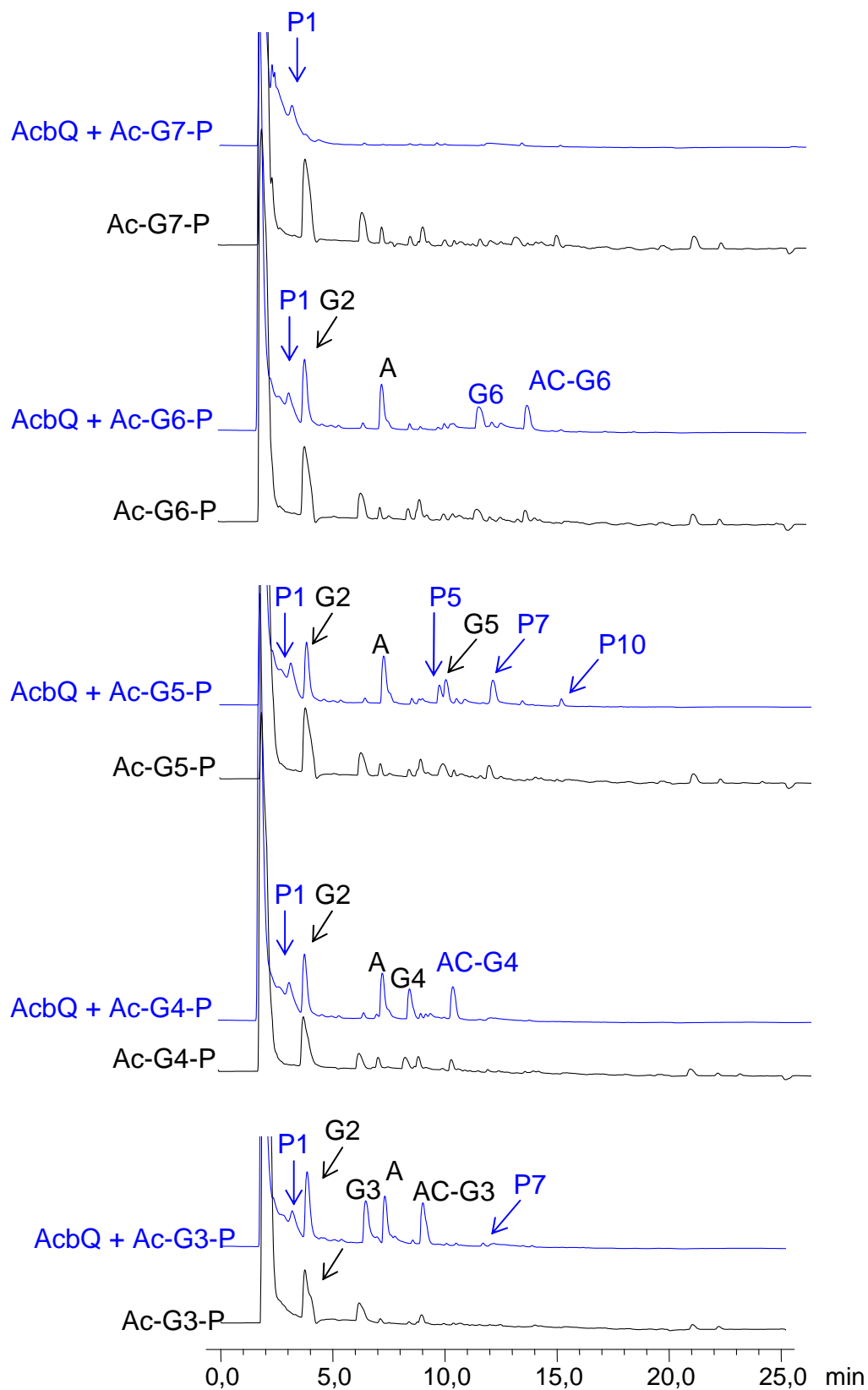
Die Substrate Ac-G3-P und A-7-P konnten nach der Reaktion nicht mehr detektiert werden. Die Acarbose war mit AcbQ deutlich erhöht, ebenso wie die Acarviosyl-

Maltotriose. Durch die AcbQ katalysierte Reaktion nahmen auch G3, G4 und G6 zu. Es konnten zwei weitere Peaks detektiert werden, die hier als P1 und P2 benannt sind. P2 trat bei allen Messungen der Ac-G4- bis Ac-G7-P auf (s. Abb. 3.28 (AcbQ + Ac-G3-P), Tab. 3.11).

Auch der Umsatz von Ac-G4-P und allen höheren Homologen mit AcbQ lieferte ein analoges Bild: (1) die phosphorylierten Substanzen wurden restlos umgesetzt; (2) die zwei neuen entstandenen Peaks P1 und P7 traten auf; (3) des Weiteren traten Maltose und das jeweilige höhere Maltooligosaccharid (G3-G6) befreit vom Acarviosyl-Rest, neu auf.

Die Acarbose-4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ ist in der Lage die phosphorylierten, höheren Acarbose-Homologen als Substrate umzusetzen. Charakteristisch scheinen dabei die Peaks P1 und P7 zu sein, die bei allen (Ausnahme P7 bei Ac-G7-P) Messungen auftraten. Während die Phosphate nicht mehr detektiert werden konnten. Die Acarbose und die unphosphorylierten Acarbose-Homologen (Ac-Gx) wurden allerdings mit einer vergrößerten Fläche, im Vergleich zu den Substraten, gemessen. Wahrscheinlich beruht dies auf der Tatsache, dass die Methode nicht sensitiv genug ist, um die phosphorylierten Substrate nachweisen zu können. Bei jedem der eingesetzten Substrate traten individuell Peaks auf, die als spezifische Produkte aus dem Umsatz mit AcbQ angesehen werden können.

Im Vergleich zu der Messung des Acarbose-7-P mit den Ac-Gx-P zeigt sich, dass P1 und P7 spezifische Produkte aus der Reaktion mit den Acarbose-Homologen zu sein scheinen, da diese bei A-7-P nicht gemessen wurde. Die Hauptprodukte aus der Reaktion mit Acarbose-7-P und AcbQ finden sich allerdings auch nicht in der Messung der Homologen wieder.



**Abb. 3.28: HPLC-ECD-Chromatogramme zum Nachweis der Aktivität von AcbQ.** Als Substrate dienten Ac-G3-P bis Ac-G7-P. Die Chromatogramme sind vergleichend überlagert dargestellt. Das schwarze Chromatogramm zeigt jeweils die Messung des Substrates Ac-Gx-P als Referenz, dann folgt darüber die Analyse des Tests mit AcbQ + Ac-Gx-P (in blau).

Tab. 3.10: Retentionszeiten/Flächen zu den HPLC-Chromatogrammen der Abb. 3.28.

Peak	Ret.time (min)	Fläche (nC*min)					
		A-7-P	AcbQ + A-7-P	Ac-G3-P	AcbQ + Ac-G3-P	Ac-G4-P	AcbQ + Ac-G4-P
P1	3,18	-	-	-	1,4	-	1,7
G2	3,87	-	-	6,5	5,6	9,2	4,8
P2	4,42	-	-				
P3	4,65	-	-				
X2		-	1,8				
P4	5,38	-	-				0,1
X3	5,58	-	0,4				
G3	6,4	-	-	2,2	3,6	2,2	0,3
A	7,28	3,7	4	0,3	3,5	0,9	3,7
G4	8,57	-	-		0,1	1,5	2,6
Ac-G3	8,95			0,9	3,9		0,2
P5	9,8	-	-				
G5	10,12	-	-				
X4	10,5	-	0,2				
Ac-G4	10,6	-	-			1	2,8
P6	10,93						
G6	11,68	-	-		0,2		
Ac-G5	12,02						
P7	12,18	-	-		0,3		0,8
P8	12,6	-	-				
X5	12,88	-	1				
G7	13,27	-	-				
P9	10,5						
Ac-G6	13,8	-	-				
Ac-G7	15,08	-	-	-	-	-	-
P10	15,23						
X6	18,9	-	0,2				
X1	19,83	0,8	-	-	-	-	
A-7-P	21,22	2,4	0,4	0,5	-	1	
Ac-G3-P	22,43	-	-	0,2	-	0,3	
Ac-G4-P	23,28	-	-	-	-	0,2	
Ac-G5-P	24,57	-	-	-	-	-	

Fortsetzung Tab. 3.10: Retentionszeiten/Flächen zu den HPLC-Chromatogrammen der Abb. 3.28.

Peak	Ret.time (min)	Fläche (nC*min)					
		Ac-G5-P	AcbQ + Ac-G5-P	Ac-G6-P	AcbQ + Ac-G6-P	Ac-G7-P	AcbQ + Ac-G7-P
P1	3,18		2	-	1,7	-	1,3
G2	3,87	13,2	4,5	16,7	5,2	18,4	0,1
P2	4,42			-	-	-	0,2
P3	4,65		0,1	-	0,1	-	-
X2							-
P4	5,38		0,1	-	0,1	-	-
X3	5,58						-
G3	6,4	3,9	0,2	4,9	0,3	5,4	0,1
A	7,28	1	4,4	1	3,8	1,5	0,03
G4	8,57	0,6	0,3	1,2	0,3	0,9	0,1
Ac-G3	8,95		0,4				
P5	9,8	0,4	0,9	-	0,1	-	0,1
G5	10,12	2,2	1,4	0,7	0,2	0,7	0,1
X4	10,5						-
Ac-G4	10,6		0,2	-	0,4	-	-
P6	10,93		0,4				
G6	11,68			2,3	2,3	0,8	0,7
Ac-G5	12,02	1,6					
P7	12,18		2,2	-	0,2	-	-
P8	12,6			-	0,4	-	-
X5	12,88						-
G7	13,27			-	-	1,7	0,2
P9	10,5		0,2				
Ac-G6	13,8			1,4	2,3	-	-
Ac-G7	15,08	-	-	-	-	1,5	0,1
P10	15,23		0,4				
X6	18,9						-
X1	19,83						-
A-7-P	21,22	1,4		2	-	2,6	0,02
Ac-G3-P	22,43	0,4		0,6	-	0,7	0,01
Ac-G4-P	23,28						
Ac-G5-P	24,57	0,1					



### 3.1.5.3 Weitere Analysen zur Enzymaktivität von AcbQ: Umsatz von Maltooligosacchariden

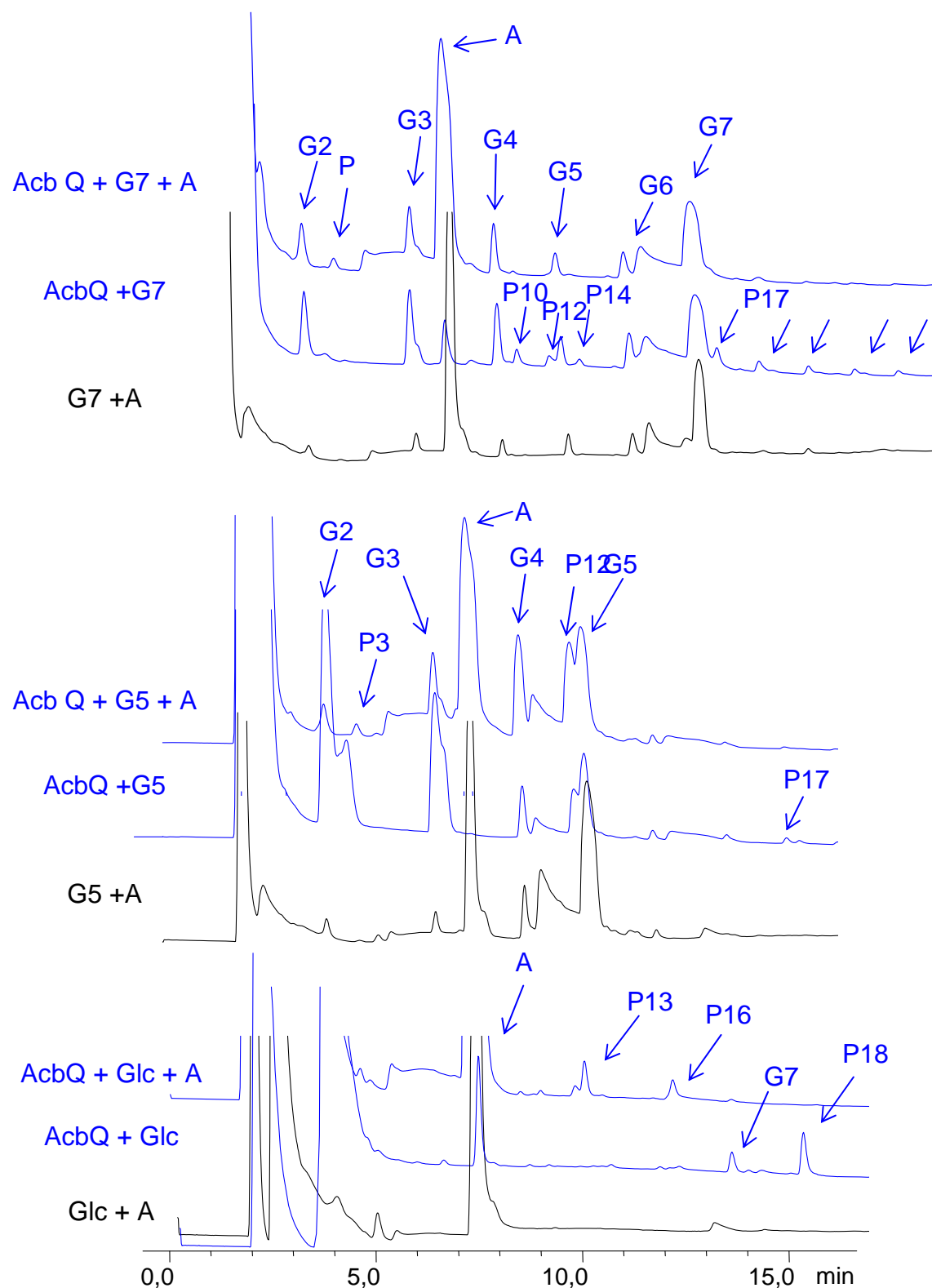
Es sollte im Weiteren geklärt werden, ob auch durch enzymatische Aktivität der Acarbose-4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ die Maltooligosaccharide G2 bis G7 als Substrate abgebaut werden bzw. ob AcbQ in der Lage ist Glucose als Substrat zur Synthese neuer Produkte zu nutzen. Die Aktivität des Enzyms AcbQ konnte jeweils für den Umsatz der Substrate Glc, G5 und G7 gezeigt werden. In der Abbildung 3.28 sind die HPLC-ECD-Chromatogramme der Messungen dargestellt. Die Retentionszeiten und die Flächen der Peaks sind in der Tabelle 3.11 gezeigt.

Die Analyse der Enzymtests mit dem Enzym AcbQ und Glucose zeigte, dass zwei neue Produkte gebildet wurden. Der Peak G7, der bei der charakteristischen Retentionszeit von G7 gemessen wurde, und P18. Wurde im Testansatz Glucose und Acarbose verwendet, ändert sich das Produktspektrum und es traten ebenfalls zwei neue Produktpeaks auf. P13 und P16. Der Peak P13 stellte sich als Doppel-Peak dar. Beide Peaks traten nur nach Inkubation mit AcbQ auf.

Die Aktivität von AcbQ auf G5 ist deutlich ersichtlich. Es scheint als ob aus G5 die Produkte G2 und G3 durch enzymatische Hydrolyse entstanden. Die beiden Produkte verzeichneten eine starke Zunahme. Des Weiteren zeigte sich kurz nach G2 ein weiterer Peak bei 4,42 min (P3). Zusätzlich konnten P17 und P12 gemessen werden. Der Peak P12 wurde kurz vor G5 detektiert und trat nur in Anwesenheit von AcbQ auf.

In der Analyse des Enzymtests von AcbQ und G7  $\pm$  Acarbose zeigte sich ein Peak mit der charakteristischen Retentionszeit von Acarbose. Zusätzlich wurde P10 detektiert sowie ein Doppel-Peak bei 9,77 min. Des Weiteren wurde P14 gemessen. Auch in diese Messung zeigten sich die regelmäßig auftretenden Peaks beginnend mit P16, die auch schon bei G6 auftraten (Daten nicht gezeigt). In Gegenwart von Acarbose trat Peak P4 zusätzlich auf.

AcbQ scheint ebenso in der Lage zu sein neben den phosphorylierten Acarbose-Homologen auch Maltooligosaccharide als Substrate umzusetzen. Auffällig ist, dass das Produktspektrum, resultierend aus der enzymatischen Aktivität von AcbQ sich in Gegenwart von Acarbose anders zusammensetzt. Die Produkte der enzymatischen Aktivität von AcbQ konnten nicht identifiziert werden. Ersichtlich ist auch, dass neue Produkte eher aus dem Umsatz der längerkettigen Maltooligosaccharide gebildet wurden. Im Besonderen sei der Umsatz von G5 durch AcbQ erwähnt, aus dem die Produkte G2 und G3 synthetisiert wurden. Die Messung des Ansatzes mit G6 (nicht gezeigt) und G7 zeigte, dass im späteren Verlauf weitere Produkte entstanden, die in regelmäßigem Abstand eluiert wurden. Die Retentionszeiten und Flächen der Messungen finden sich in der Tabelle 3. 12 wieder.



**Abb. 3.29: HPLC-ECD-Chromatogramme zum Nachweis der Aktivität von AcbQ.** Es sind vergleichend immer drei Chromatogramme übereinander gezeigt. Das untere schwarze, (Glc + A) bezieht sich auf die Messung der Kontrolle mit Glucose und Acarbose. Es folgt die Analyse von AcbQ mit Glc. Das obere Chromatogramm stellt die Analyse des Enzymtest dar, in dem AcbQ mit Glucose und Acarbose inkubiert wurde. Die Tests setzten sich wie unter 2.Material und Methoden beschrieben zusammen.

Tab. 3.12: Retentionszeiten/Flächen zur AcbQ Aktivität in Bezug auf Maltooligosaccharide.

G4 + A	AcbQ + G4	AcbQ + G4 + A	G5 + A	AcbQ + G5	AcbQ + G5 + A	G6 + A	AcbQ + G6	AcbQ + G6 + A	G7 + A	AcbQ + G7	AcbQ + G7 + A	Ret. Time (min)
0,6	3,9	2,3	0,8	7,3	4,2	0,6	3,7	3,3	0,8	4,1	3,1	2,4
											0,4	2,9
							0,2					3,5
0,3	0,7	0,5	0,2	5,7	0,5	0,1	1,2	1,9		1,0	0,5	3,8
		0,1		1,2			0,1					4,4
					0,2			0,2			0,1	4,6
												4,7
		0,1			0,3			0,5			0,3	5,4
												5,5
0,7	0,9	2,4	0,2	5,1	0,9	0,1	1,1	0,6	0,2	1,4	0,6	6,3
		0,2	5,5									6,9
4,3	0,4	4,6			8,1	5,5		8,8	5,4	0,7	7,3	7,1
6,5	4,0	4,0		0,8	2,3		0,6	0,7		0,9	0,6	8,2
			1,5									8,7
				0,4	0,7			0,3		0,2		9,0
	0,0											9,2
		0,1	5,0		1,0							9,7
	0,2	0,1		1,3	1,6		0,3	1,0		0,3	0,3	9,9
								0,6				10,2
		0,0					0,4			0,1		10,4
	0,1			0,1	0,1	4,8	2,3	3,1	0,4			11,4
		0,0			0,1						0,4	11,8
	0,7	0,3		0,7	0,6		0,1	0,4		0,7	0,6	12,2
	0,1			0,1			0,1		2,2	2,2	2,3	13,3

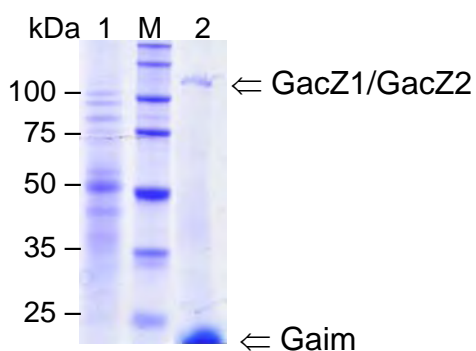
Fortsetzung Tab. 3.12

Ret. Time (min)	Glc +A	AcbQ +Glc	AcbQ +Glc +A	G2 +A	AcbQ + G2	AcbQ + G2 + A	G3 +A	AcbQ + G3	AcbQ + G3 + A	Ret. Time (min)
2,4	66,2	90,5	76,6	4,9	8,7	6,1	0,2	4,0	6,6	2,4
2,9				0,9						2,9
<b>3,5</b>		<b>1,3</b>	<b>0,9</b>							<b>3,5</b>
3,8	0,3	1,2	0,6	16,6	6,7	7,5	1,0	0,5	1,8	3,8
4,4				0,1	1,8	2,1				4,4
4,6							0,5			4,6
4,7									0,4	4,7
5,4				0,5		0,4				5,4
5,5									0,2	5,5
6,3				1,9	0,8	0,7	10,1	5,1	8,4	6,3
6,9										6,9
7,1	5,8	1,2	11,1	4,9	0,4	9,3	4,3	0,7	8,0	7,1
8,2				0,2	0,1	0,2		0,2		8,2
8,7							0,3		0,5	8,7
9,0					0,1	0,1		0,8		9,0
9,2					0,6	0,1			0,0	9,2
9,7										9,7
9,9					0,1	0,1		0,1		9,9
10,2			0,3						0,2	10,2
10,4						0,0				10,4
11,4					0,2	0,2		0,0		11,4
11,8									0,2	11,8
12,2			0,3		0,2	0,2		0,8	0,6	12,2
13,3		0,2			0,0	0,1		0,0		13,3

### 3.2 Analyse sekretierter Enzyme des Acarbose-Metabolismus aus *S. glaucescens*

Das 26 *gac*-Gene umfassende Acarbose-Biosynthese-Gencluster von *S. glaucescens* GLA.O enthält, analog dem *acb*-Gencluster aus *Actinoplanes* SE50/110 zwölf potentielle Gene, die an einem möglichen Acarbose-Metabolismus beteiligt sein könnten. Im *gac*-Gencluster wurden vier Gene mit einer Signalsequenz identifiziert, die möglicherweise sekretiert werden; dabei handelt es sich um die Enzyme: GacZ1, GacZ2, GacE2 und das Gaim Protein.

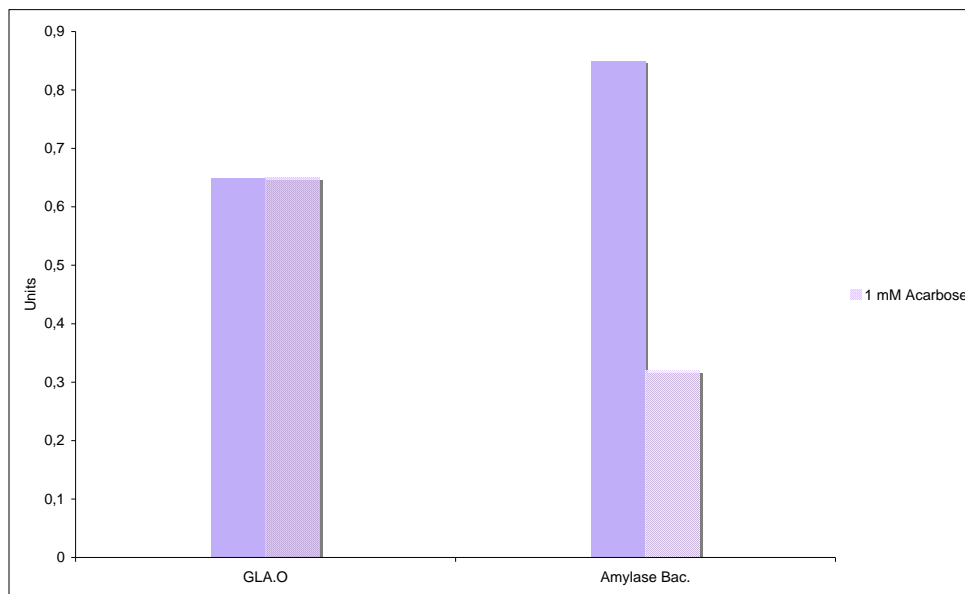
Auch die Analyse des Überstandes von *S. glaucescens* GLA.0 zeigte, dass in Cerestar-Medium, ebenso wie bei *Actinoplanes* sp. (s. Abb. 3.1) die Sekretion von Proteinen induziert wurde. Nach 72 h Anzucht dominierten zwei Proteinbanden im Überstand, die den abgeleiteten Proteingrößen nach den langkettigen  $\alpha$ -Amylasen GacZ1 (110 kDa) oder GacZ2 (116 kDa) entsprechen könnten. Zusätzlich war eine Proteinbande zu erkennen, bei der es sich wahrscheinlich der abgeleiteten Proteingröße nach, um den potentiellen  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor Gaim (9 kDa) handelte (s. Abb. 3.32).



**Abb. 3.32: Nachweis der Proteine GacZ1/GacZ2 und Gaim.** Überstände aus der Anzucht von *S. glaucescens* GLA.0 nach 72 h bei 30°C. Die Probe wurde in einem 10%igem SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und das Gel anschließend gefärbt. Es wurden je 15  $\mu$ l der Überstände aufgetragen. Spur 1: Überstand der Anzucht von *S. glaucescens* GLA.0 in 3%igem Trypton-Medium, Spur M: Molekulargewichtsmarker Broad Range (s. Abb. 3.1), Spur 2: Überstand der Anzucht von *S. glaucescens* GLA.0 in Cerestar-Medium.

Erste Analysen zu der postulierten Enzymaktivität, der im Überstand gezeigten Proteine (s. Abb. 3.32) wurden mit dem Starch Azure Enzymtest wie unter 2. Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Die  $\alpha$ -Amylaseaktivität von *S. glaucescens* GLA.0 wurde auf 0,65 U bestimmt.

Es konnte bei diesen Ansätzen keine Hemmung der  $\alpha$ -Amylaseaktivität Acarbose beobachtet werden (s. Abb.3.33). Als Referenz diente erneut die  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus* sp., die in den Ansätzen mit Acarbose deutlich inhibiert wurde.



**Abb. 3.33:  $\alpha$ -Amylaseaktivität von *S. glaucescens*.** Nachweis durch (Starch Azure Enzymtest 2.10.6.3). Vergleich der Aktivität der Enzyme des Überstandes von *S. glaucescens* (GLA.O) und der  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. (1 U)  $\pm$  1 mM Acarbose.

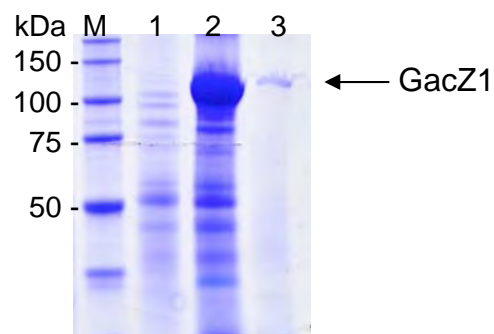
Dieser erste Test zeigte, dass auch Proteine die von *S. glaucescens* GLA.0 sekretiert wurden, möglicherweise Acarbose-resistent sind. Da aufgrund der Vielzahl an potenziellen Enzymen, die im extrazellulären Stärke-Abbau von *S. glaucescens* involviert zu sein scheinen, die Zuordnung der hier bestimmten  $\alpha$ -Amylaseaktivität zu einem der *gac*-Protein nicht möglich war, sollten diese näher charakterisiert werden.

### 3.2.1 Charakterisierung des GacZ1 Proteins aus *S. glaucescens*

#### 3.2.1.1 Überproduktion von GacZ1

Das Gen *gacZ1* (3141 bp) codiert für das sekretierte Enzym GacZ1 (1046 aa mit Signalpeptid), das eine mögliche Pullulanase darstellt (s. Einleitung). Das abgeleitete Protein hat ein Molekulargewicht von 113,2 kDa bzw. 109,7 kDa für das reife Protein. Die Signalsequenz umfasst 36 aa bzw. 108 bp.

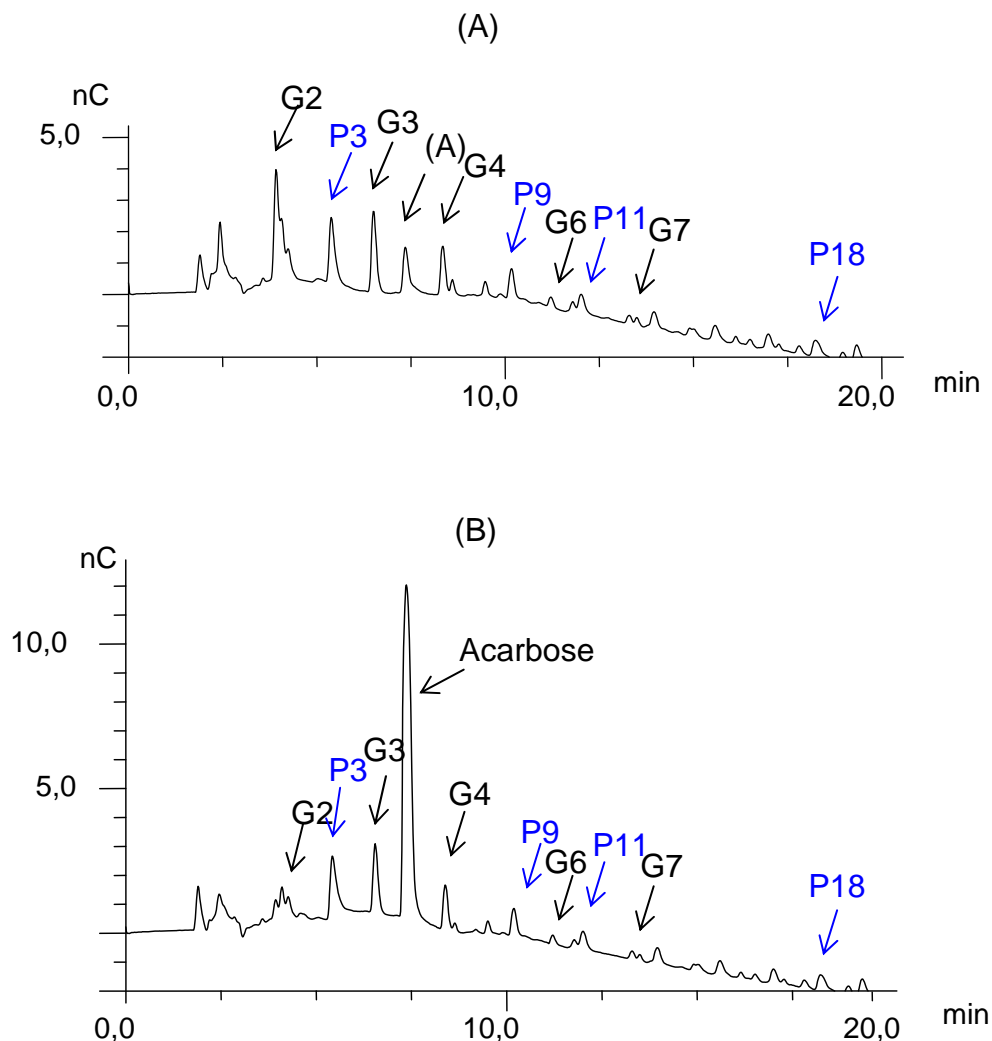
Die Optimierung der heterologen Produktion wurde in *S. lividans* TK24 M2 mit dem Konstrukt pUWLHisgacZ1His (Produktion von C-His-GacZ1) in 3%igem Trypton-Medium mit 0,5% Cerestar bei 30°C für 72 h erreicht. Dabei wurde das GacZ1 Protein mit einem C-terminalen 6x His-Tag produziert und konnte so aus dem Überstand durch Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie unter nativen Bedingungen gereinigt werden. Die Analyse der Proteinproduktion im Überstand erfolgte mittels SDS-PAGE (Abb. 3.34).



**Abb. 3.34: Heterologe Produktion des GacZ1 Fusionsproteins in *S. lividans* TK24 M2.** Die Produktion des Proteins erfolgte wie im Text beschrieben. Es wurden je 10 µl der Fraktionen aufgetragen. Spur M: Molekulargewichtsmarker Broad Range Marker (s. Abb. 3.1), Spur 1: *S. lividans* TK24 M2 (Kontrolle), Spur 2: Überstand der Anzucht von TK24 M2pUWLHisgacZ1His, Spur 3: Elution von GacZ1 der Ni-NTA-Reinigung.

### 3.2.1.1 HPLC-ECD-Analyse der $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacZ1

Ein Sequenzvergleich zeigte, dass das Protein GacZ1 strukturell den bereits untersuchten Enzymen AcbZ (s. 3.1.1) und AcbE (s. 3.1.2) aus *Actinoplanes* SE50/110 ähnelt. Daher wurde die katalytische Aktivität von GacZ1 mit Stärke und Pullulan als Substraten untersucht. Die Produkte der Enzymtests wurden mittels HPLC-ECD analysiert (Abb. 3.35).



**Abb. 3.35 (A): HPLC-ECD-Analyse der  $\alpha$ -Amylaseaktivität des gereinigten GacZ1 Proteins.** Das Protein resultierte aus der Anzucht in *S. lividans* TK24 M2pUWLHiscacZ1His. In den Tests wurden je 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gereinigtes Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 28°C für 6h. Als Substrate wurden 0,5% Stärke verwendet (A) sowie 0,5% Stärke und 1 mM Acarbose (B). (s. Abb. 3.8).



Die Analyse der Proben mit Stärke als Substrat für GacZ1 zeigte, dass die eingesetzte Stärke zu Maltooligosacchariden abgebaut wurde. Haupthydrolyseprodukte waren Maltose, Maltotriose und Maltotetraose (Abb. 3.35 (A)). In Gegenwart von Acarbose zeigte das Enzym GacZ1 die gleiche Aktivität. Das Abbaumuster der Maltooligosaccharide war identisch mit dem Ansatz, der keine Acarbose enthielt. Auch zeigte sich, dass das Produktspektrum zu den bereits zuvor analysierten langkettigen  $\alpha$ -Amylasen AcbZ und AcbE aus *Actinoplanes* SE50/110 (s. 3.1.1 und 3.1.2) identisch war.

Allerdings entsprach die Peakfläche, also die Molarität der gemessenen Maltooligosaccharide nicht den Werten, die mit AcbZ bzw. AcbE erhalten wurden. Während Maltose als Produkt der Stärke-Spaltung durch AcbZ immer als definierter Peak detektiert werden konnte, war in den Tests mit GacZ1 dieser Peak scheinbar nicht absolut definiert (Rauschen). Wahrscheinlich setzte sich der in den GacZ1 Tests als Maltose detektierte Peak aus einem Gemisch an strukturell ähnlichen Disacchariden zusammen, deren Auflösung durch die Methode der HPLC-ECD nicht gegeben war und für deren weitere Analyse auch die Referenzsubstanzen fehlten. In Anwesenheit von Acarbose war der Anteil des Produktes Maltose stark reduziert.

Zudem konnten weitere Produkte, wie z. B. die Peaks P3, P9 und P11 (Abb. 3.35) detektiert werden, denen bisher auch noch keine Substanzen zugeordnet werden konnten, da keine entsprechenden Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen. Ähnliche Produktpeaks mit vergleichbaren Retentionszeiten wurden durch die  $\alpha$ -Amylasen AcbZ und AcbE aus *Actinoplanes* sp. nicht freigesetzt.

Auffällig war weiter, dass sich die Peaks, die identisch mit der Glucose detektiert wurde sowie der Maltose-Peak in Anwesenheit von Acarbose veränderten. Die Substanzen, die wahrscheinlich bei der charakteristischen Retentionszeit der Glucose eluiert wurden, nahmen um 43% zu (s. Tab. 3.14), während die Maltose um 66% abnahm. Der Peak 3 gewann um 36% an Fläche, ebenso P9 mit einer Zunahme von 15%. Die Fläche der Maltoheptaose stieg um 146% enorm an.

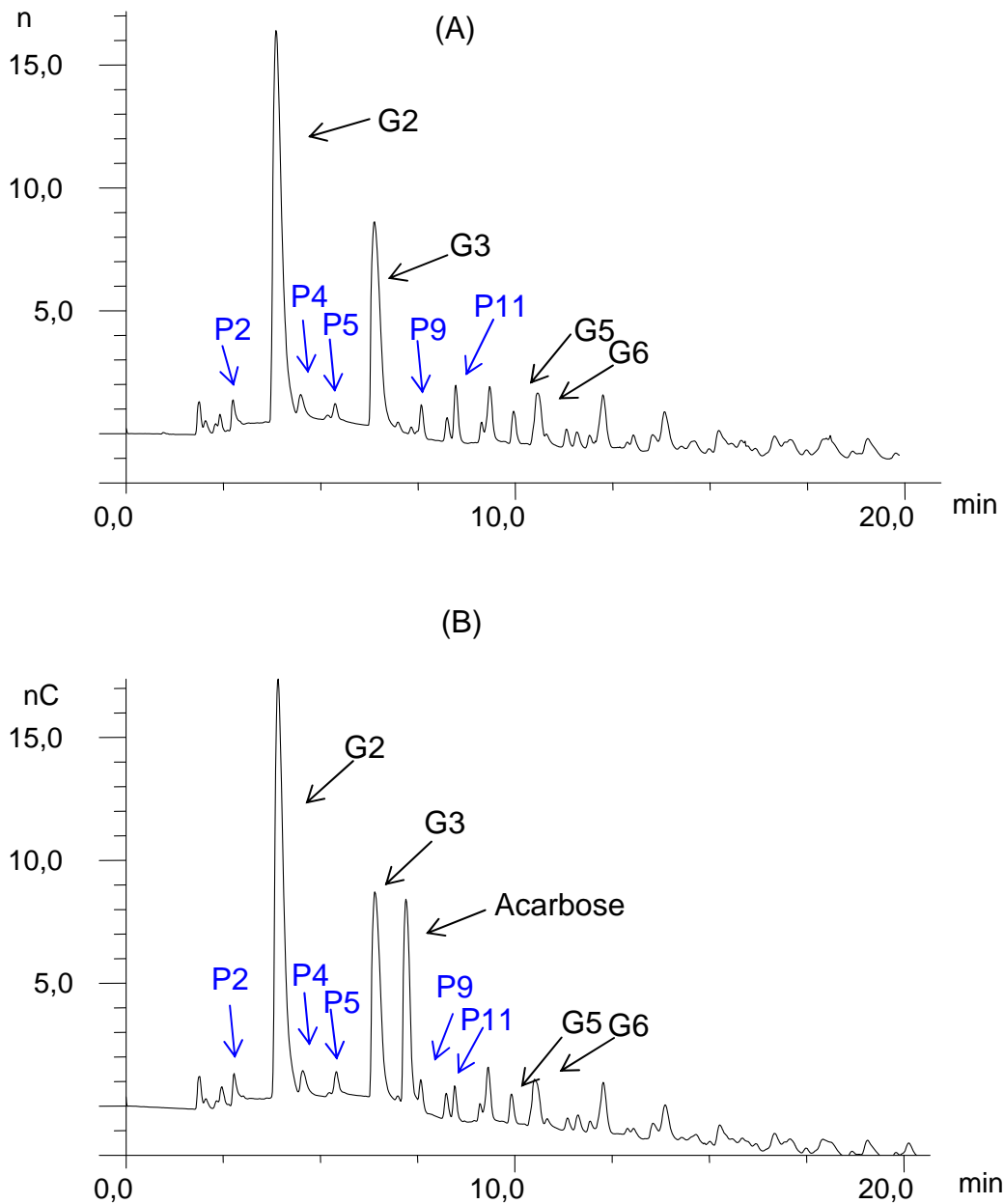
Tab. 3.14: Messdaten zur  $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacZ1.

Ret.Zeit (min)	Peak	Fläche (nC*min)	
		(A) ohne Acarbose	(B) mit Acarbose
2,45	Glc	0,403	0,578
4,10	G2	0,950	0,321
5,43	P3	0,390	0,530
6,55	G3	0,400	0,353
7,37	A	0,293	2,757
8,38	G4	0,234	0,209
8,63	P7	0,063	0,016
9,50	P8	0,067	0,050
10,18	P9	0,146	0,168
11,20	G6	0,045	0,040
12,00	P11	0,168	0,158
13,30	G7	0,028	0,069
13,95	P12	0,117	0,121
15,00	P13	0,065	0,071
15,60	P14	0,102	0,104
16,52	P15	0,029	0,030
17,00	P16	0,071	0,077
17,82	P17	0,040	0,045
18,23	P18	0,123	0,126

Die in der Tabelle 3.14 aufgeführten Daten geben die Daten der Messung aller Peaks in dem GacZ1 Test mit Stärke als Substrat wieder. Unklar bleibt weiterhin, ob es sich bei den detektierten Substanzen, um durch GacZ1 generierte modifizierte Maltooligosaccharide handelt (s. Diskussion).

### 3.2.1.3 HPLC-ECD-Analyse der Pullulanaseaktivität von GacZ1

Die Analyse der Ansätze, in denen GacZ1 mit Pullulan inkubiert wurde, zeigt eindeutig, dass auch GacZ1 Pullulanaseaktivität besitzt. In der Abbildung 3.36 ist das erhaltene Produktmuster gezeigt, das aus dem Abbau von Pullulan durch GacZ1 resultierte.



**Abb. 3.36: HPLC-ECD-Analyse zur Pullulanaseaktivität von C-His-GacZ1.** In den Tests wurden je 20 µg/µl gereinigtes Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 28°C für 6h. Als Substrate wurden 0,5% Pullulan verwendet (A) sowie 0,5% Pullulan und 1 mM Acarbose (B). (s. Abb. 3.8).

Die Hauptprodukte der Pullulanspaltung waren dabei Maltose, Maltotriose sowie Maltohexaose. Wie zu erwarten war, wurde die Pullulanaseaktivität von GacZ1 durch Acarbose nicht inhibiert. In Gegenwart von Acarbose vergrößerte sich der Anteil an Maltohexaose, gemessen an der Fläche des als G7 detektierten Peaks sogar um 15%. Es entstanden weitere Produkte, die hier als P2, P4 und P5 in der Abbildung 3.36 (A) und (B) dargestellt sind, und deren Flächenanteile in Anwesenheit von Acarbose ebenso zunahmen. Die Peaks P9 und P11 in der Abbildung 3.36 (B) waren in den Ansätzen mit Acarbose reduziert; P11 war in den Ansätzen mit Acarbose um 47% reduziert. Maltotetraose und P11, dem keine Substanz zu zuordnen war, traten in der Abbildung 3.36 als Doppel-Peak auf. Das Produkt, das als P11 detektiert wurde, könnte ein Isomer der Maltotetraose darstellen bzw. es könnte sich um ein strukturell ähnliches Saccharid handeln.

Vergleicht man das Abbaumuster und die detektierten Peaks in den GacZ1 Tests mit Pullulan, mit den erhaltenen Daten für AcbZ und AcbE (s. 3.1.1 und 3.1.2), so zeigt sich, dass GacZ1 scheinbar aus Pullulan eine Vielzahl an Produkten generiert bzw. modifiziert.

Es fällt weiter auf, dass auch in den AcbE Ansätzen ein Doppel-Peak-Muster von G4 und P7 detektiert wurde (s. Abb. 3.17), das ebenso durch die enzymatische Aktivität von GacZ1 als G4 und P11 auftrat. Zur Identifizierung der unbekanntenen Produkte fehlten die Referenzsubstanzen.

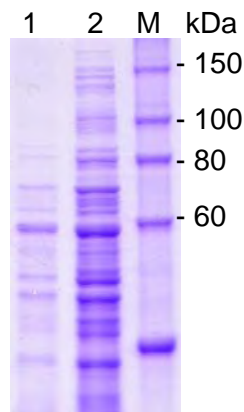
**Tab. 3.15: Messdaten zur Pullulanaseaktivität von GacZ1.**

Ret.Zeit (min)	Peak	Fläche (nC*min)	
		(A) ohne Acarbose	(B) mit Acarbose
2,42	Glc	0,037	0,068
2,75	P2	0,148	0,176
3,85	G2	4,065	4,220
4,48	P4	0,121	0,137
5,37	P5	0,068	0,112
6,38	G3	2,132	2,043
6,98	P7	0,026	-
7,33	A	0,024	1,472
7,58	P9	0,147	0,094
8,25	G4	0,096	0,103
8,47	P11	0,256	0,136
9,13	P12	0,044	0,039
9,33	P13	0,251	0,245
9,85	G5	0,149	0,151
11,4	G6	0,295	0,339
13,25	G7	0,032	0,026

### 3.2.2 Charakterisierung des GacE2 Proteins aus *S. glaucescens*

#### 3.2.2.1 Überproduktion von GacE2

Die heterologe Überproduktion des sekretierten GacE2 Proteins (569 aa) erfolgte in *S. lividans* TK24 M2 unter Verwendung des pUWL201/gacE2 Plasmids (s. 2.3). Die Kulturen von *S. lividans* TK24 M2 pUWL201/gacE2 wurden für eine optimale Proteinproduktion in 3%igem Trypton-Medium mit 0,5% Cerestar bei 30°C für 72 h angezogen. Der Überstand wurde mittels Konzentratoren eingeengt (s. 2.10), sodass es möglich war, das native GacE2 Protein (60,6 kDa) auch ohne His-Tag zu konzentrieren. Die Kontrolle der Proteinproduktion erfolgte mittels SDS-PAGE (Abb. 3.37).

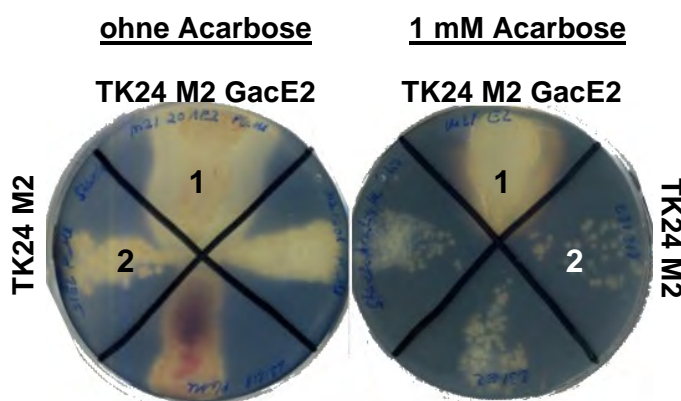


**Abb. 3.37: Überproduktion von GacE2 durch *S. lividans* TK24 M2.** Die Anzucht erfolgte in 3%igem Trypton-Medium mit 0,5% Cerestar bei 30°C für 72 h unter Verwendung des Konstrukts pUWL201/gacE2. Es wurden je 15 µl der Fraktionen aufgetragen und im 10%igem SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde anschließend gefärbt. Spur 1: GacE2 nach Anreicherung des Überstandes durch Ausschluss-MW-Chromatographie von 30 und 100 kDa, Spur 2: Überstand aus der Anzucht von TK24 M2 pUWL201gacE2, Spur M: Molekulargewichtsmarker (s. Abb. 3.4).

### 3.2.2.2 Analysen zu der Aktivität des GacE2 Proteins

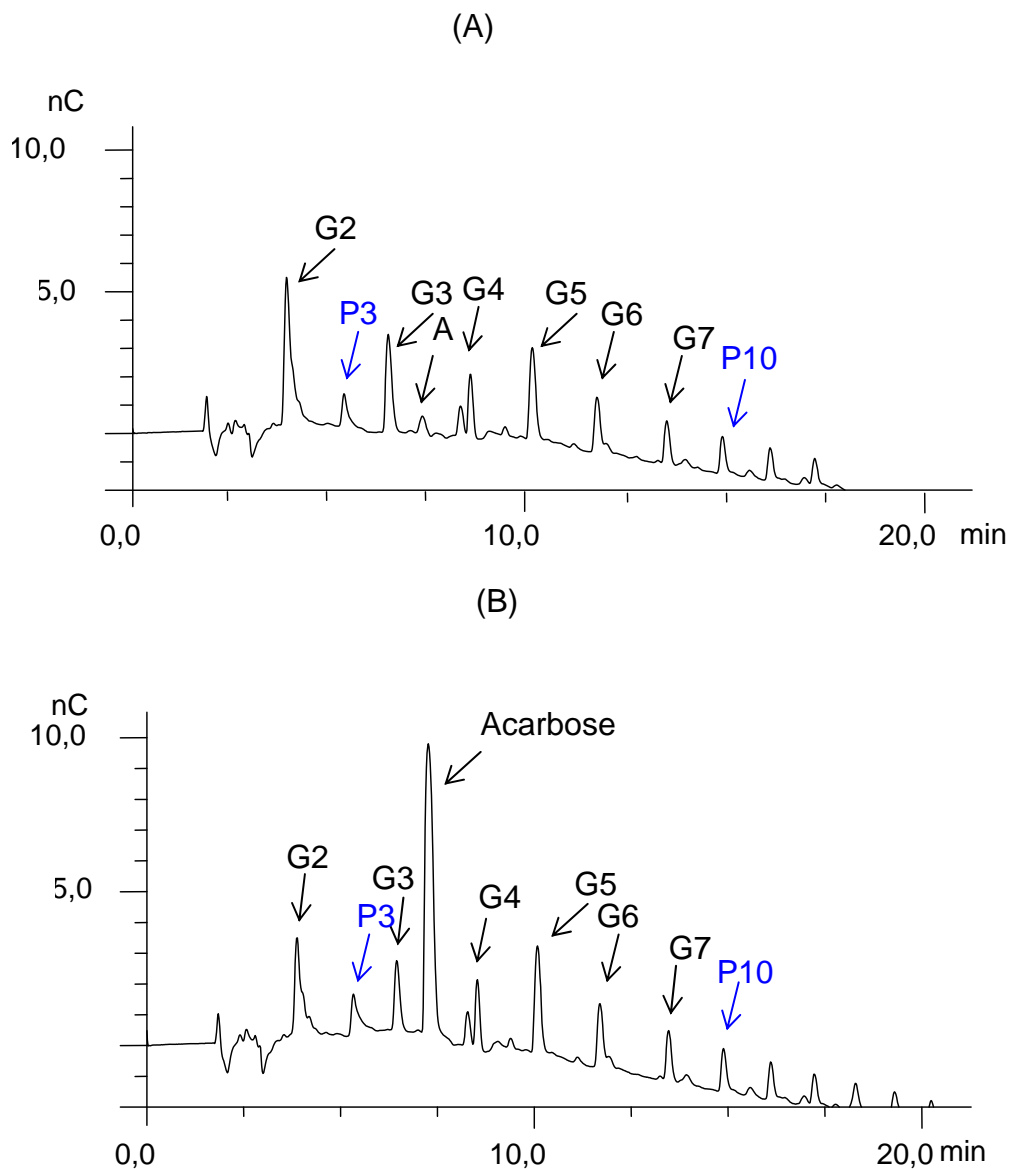
Der erste Nachweis der  $\alpha$ -Amylaseaktivität des GacE2 Proteins wurde durch Ausstreichen der Stämme auf Stärkeplatten erbracht.

Aus der Abbildung 3.38 ist ersichtlich, dass der Kontrollstamm *S. lividans* TK24 M2 nur eine schwache  $\alpha$ -Amylaseaktivität aufzeigte und, wenn Acarbose dem Agar zugesetzt wurde, gar nicht in der Lage war Stärke abzubauen. Während auf den Sektoren (1) mit *S. lividans* TK24 M2 pUWL201gacE2 ein Abbau der Stärke sichtbar war. Dieses Ergebnis zeigte, dass GacE2 von TK24 M2 in aktiver Form sekretiert wurde und den Stärkeabbau katalysierte. Auch auf der Stärkeplatte mit 1 mM Acarbose war die gleiche enzymatische Aktivität sichtbar und somit konnte gezeigt werden, dass GacE2 Acarbose-insensitiv ist.



**Abb. 3.38: Nachweis der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacE2 von *S. lividans* TK24 M2.** Der Nachweis erfolgte auf Stärkeplatten. Die Platte enthielt 1% Stärke  $\pm$  1 mM Acarbose. Die Stämme wurden auf den Platten ausgestrichen, bei 28°C für 72 h kultiviert und anschließend mit  $I_2/KI$  gefärbt (s. 2. Material und Methoden). Es erfolgte der Ausstrich von *S. lividans* TK24 M2/pUWL201gacE2 im Sektor 1 und im Sektor 2 von *S. lividans* TK24 M2 (Kontrolle).

Die anschließende HPLC-ECD Analyse der Produkte, resultierend aus den Enzymtests ergab, dass die Hauptprodukte aus der Stärkespaltung durch GacE2 Maltose und Maltotriose waren. Durch Acarbose in den Ansätzen wurde das Enzym nicht inhibiert (Abb. 3.39 (B)). Allerdings änderten sich die Verhältnisse der Flächen der Produkte, so war z. B. Maltose um 37% reduziert und Maltotriose um 40%; während sich der Anteil an Maltopentaose nicht änderte. Das in der Abbildung 3.38 als P3 detektierte Produkt, nahm in dem Ansatz mit Acarbose im Flächenanteil um 38% zu, ebenso wie der Anteil von P10 (Anstieg um 11%) und ein weiteres als P14 benanntes Produkt (Anstieg um 25%, nicht in der Abbildung gezeigt, s. Tab. 3.16). Ein dem P3 entsprechendes Produkt wurde auch in den Stärkeabbautests mit GacZ1 detektiert, das auch in den GacZ1 Tests mit Acarbose um 36% anstieg. In den Tests mit der  $\alpha$ -Amylase AcbE von *Actinoplanes* sp. wurde ein solcher Produktpeak bei der Hydrolyse von Pullulan detektiert (s. 3.1.1 und 3.1.2).



**Abb. 3.39: HPLC-ECD-Analyse der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacE2.** Die Anzucht und Konzentration von GacE2 erfolgte wie unter 2. Material und Methoden beschrieben. Als Substrat wurden 0,5% Stärke (A) sowie 0,5% Stärke + 1 mM Acarbose (B) verwendet, und mit dem angereicherten Protein (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ÜN bei 37°C inkubiert.

Tab. 3.16.: Messdaten zur  $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacE2.

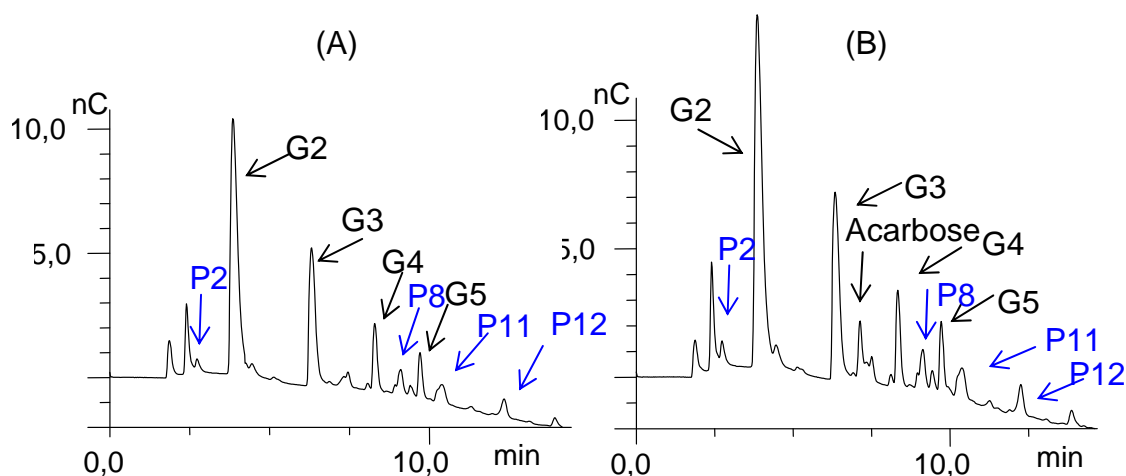
Ret.Zeit (min)	Peak	Fläche (nC*min)	
		(A) ohne Acarbose	(B) mit Acarbose
2,60	Glc	0,782	0,845
3,88	G2	1,173	0,735
5,33	P3	0,233	0,323
6,45	G3	0,594	0,356
7,32	A	0,114	2,302
8,53	G4	0,460	0,474
10,08	G5	0,566	0,607
11,72	P8	0,372	0,401
13,48	G7	0,233	0,245
14,88	P10	0,219	0,245
16,08	P11	0,211	0,179
17,22	P12	0,186	0,152
18,28	P13	0,173	0,185
19,28	P14	0,122	0,153
20,02	P15	-	0,007

In einer Sequenzanalyse des Proteins GacE2 durch das Programm Blast, wurde unter anderem eine nicht-spezifische Pullulanase Domäne (PulA; der Bereich umfasst die AA 99 bis AA 219) identifiziert. Als weiteres Substrat für GacE2 wurde daraufhin Pullulan getestet und die Produkte des Enzymtests wurden durch HPLC-ECD analysiert.

Der Enzymtest wurde mit dem angereicherten Überstand aus der Anzucht von *S. lividans* TK24 M2 pUWL201/gacE2 (s. 2.10) analog zu den obigen Tests nun als Substrat mit Pullulan durchgeführt. Die Analyse des Tests per HPLC-ECD zeigt die Abbauprodukte aus dem Pullulanase-Verdau (s. Abb. 3.40). Das Enzym GacE2 ist ebenfalls in der Lage Pullulan als Substrat zu verwerten.



Alle detektierten Produkte verzeichneten einen wesentlichen Anstieg der Flächen in Anwesenheit von Acarbose: Maltose stieg um 44%, Maltotriose um 35% und das Produkt mit der Retentionszeit von 2,73 min (P2) stieg um 82% an (s. Tab. 3.17).



**Abb. 3.40: HPLC-ECD-Analyse der Pullulanaseaktivität von GacE2.** Die Anzucht und Konzentration von GacE2 erfolgten wie unter 2. Material und Methoden beschrieben. Als Substrate wurde zum einen 0,5% Pullulan (A) und auch 0,5% Pullulan + 0,1 mM Acarbose (B) verwendet, die Proben wurden ÜN bei 37°C inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug 10 µg/µl.

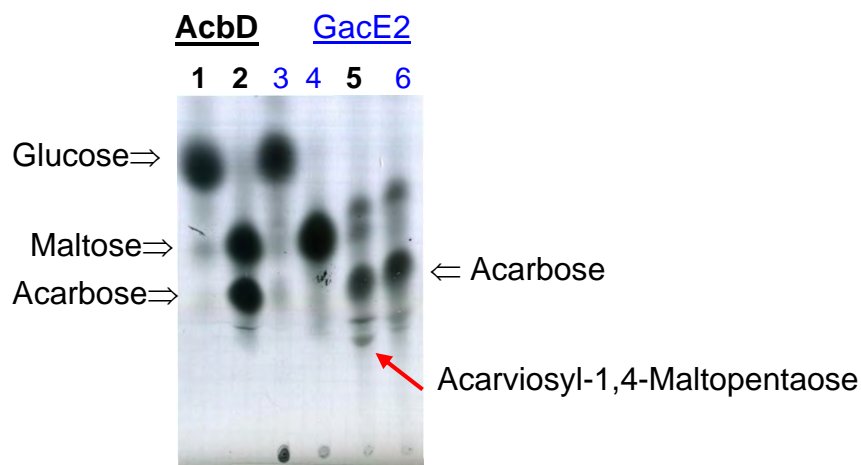
**Tab. 3.17: Messdaten zur Pullulanaseaktivität von GacE2.**

Ret.Zeit (min)	Peak	Fläche (nC*min)	
		(A) ohne Acarbose	(B) mit Acarbose
2,40	Glc	0,330	0,493
2,73	P2	0,044	0,080
3,85	G2	2,779	4,028
6,32	G3	1,278	1,722
7,13	A	-	0,515
7,45	G4	0,037	-
8,28		0,455	0,644
9,10		0,189	0,296
9,40		0,036	0,088
9,70		0,247	0,358
10,40		0,202	0,302
12,33		0,134	0,259
13,93		0,060	0,102

### 3.2.2.3 Analyse der Acarviosyltransferaseaktivität von GacE2

In dem *gac*-Gencluster konnte keine Gen identifiziert werden, dass wie im *acb*-Gencluster für eine Acarviosyltransferase codiert. Es wurde untersucht, ob das sekretierte GacE2 Protein analog zu dem AcbD Protein aus *Actinoplanes* SE 50/110, einen Acarviosyltransfer katalysieren könnte, obwohl Sequenzvergleiche lediglich eine 31%ige Identität beider Proteine ergaben.

In der Abbildung 3.43 sind in den Spuren 2 und 5 die Acarviosyltransferasereaktion von AcbD zu erkennen (wie schon in 3.1.5.1 beschrieben). Durch die Austauschreaktion der Maltose-Einheit der Acarbose durch die radioaktiv-markierte Maltose traten nun zwei Spots bei der Detektion auf (Spur 2); dabei handelt es sich zum einen um Maltose und zum Anderen um die nun radioaktiv-markierte Acarbose. Die Enzymaktivität von AcbD zeigte sich auch in Spur 5, AcbD katalysierte den Transfer von Maltoheptaose auf die Acarviosyl-Einheit und es entstand das neue Produkt Acarviosyl-1,4-Maltopentaose. AcbD katalysierte allerdings keine Reaktion mit Glucose und Acarbose. Die Enzymtests wurden analog mit GacE2 durchgeführt und es zeigte sich, dass keine Acarviosyltransferaseaktivität von GacE2 ausging.

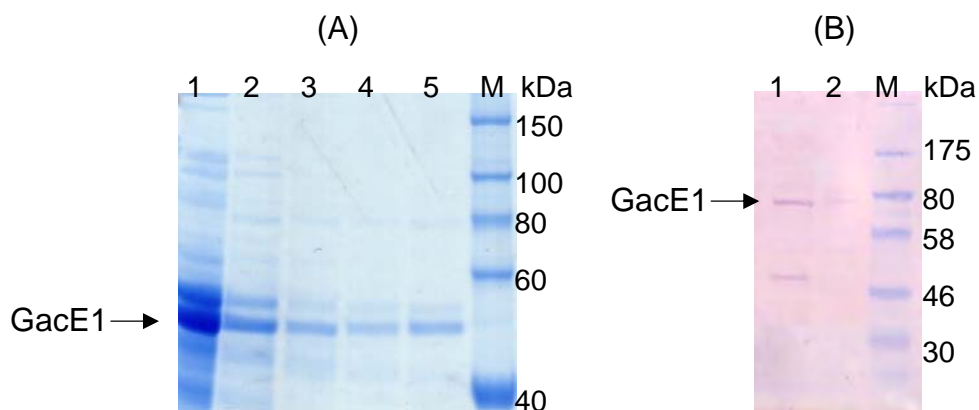


**Abb. 3.42: Vergleich der Aktivität von GacE2 und AcbD.** Die Analyse der Enzymtest erfolgte durch DC und anschließender Detektion auf einem Röntgenfilm (s. Abb. 3.42). Die Analyse der Tests mit AcbD sind schwarz beschriftet, die mit GacE2 blau. Spur 1: AcbD +  $^{14}\text{C}$ -Glucose und Acarbose als Substrat, Spur 2: AcbD +  $^{14}\text{C}$ -Maltose und Acarbose als Substrat, Spur 3: GacE2 +  $^{14}\text{C}$ -Glucose und Acarbose als Substrat, Spur 4: GacE2 +  $^{14}\text{C}$ -Maltose und Acarbose als Substrat, Spur 5: AcbD +  $^{14}\text{C}$ -Acarbose und Maltoheptaose als Substrat, Spur 6: GacE2 +  $^{14}\text{C}$ -Acarbose und Maltoheptaose als Substrat. Die Enzymtests wurden wie in 2.11.7.1 für AcbD beschrieben nun mit dem Protein GacE2 durchgeführt. Zur Kontrolle diente AcbD (s. Abb. 3.18, Produktion von AcbD). Die Produktion von GacE2 wurde wie unter 2. Material und Methoden beschrieben durchgeführt (s. Abb. 3.37).

### 3.2.3 Charakterisierung des GacE1 Proteins aus *S. glaucescens*

#### 3.2.3.1 Überproduktion von GacE1

Das *gacE1*-Gen (1683 bp) codiert für das intrazelluläre Enzym GacE1 (61,6 kDa), das eine  $\alpha$ -Amylase Domäne aufweist, aber auch möglicherweise  $\alpha$ -Glucosidase Aktivität besitzt. Die Optimierung der heterologen Proteinproduktion erfolgte mit dem Konstrukt pUWLHiscGacE1 in *S. lividans* TK24 M2, in Cerestar-Medium bei 30°C für 96 h. Das Protein wurde als Fusionsprotein mit N-terminalem His-Tag produziert (N-His-GacE1). Aus dem zellfreien Rohextrakt der Anzucht von in *S. lividans* TK24 M2 pUWLHiscGacE1 wurde das Protein GacE1 gereinigt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (s. Abb. 3.44 (A) und (B)).



**Abb. 3.42: Heterologe Produktion des GacE1 Fusionsproteins von *S. lividans* TK24 M2, Reinigung sowie Western Blot Analyse.** Die Anzucht von *S. lividans* TK24 M2pUWLHiscGacE1 erfolgte in Cerestar-Medium bei 30°C für 96 h. Das N-His-GacE1 Protein wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Es wurden je 10  $\mu$ l der einzelnen Fraktionen im 10%igen SDS-PAGE eingesetzt (A). Spur 1: zellfreier Rohextrakt, Spur 2: Durchlauf, Spur 3 und 4: Waschschrte, Spur 5: Elution, Spur M: Molekulargewichtsmarker (s. Abb. 3.4). In Abbildung (B) ist die Western Blot Analyse dargestellt: Spur 1 und 2: Elutionen. Spur M: Molekulargewichtsmarker Broad Rang (s. Abb. 3.5).

### 3.2.3.2 Analysen zur Enzymaktivität des GacE1 Proteins

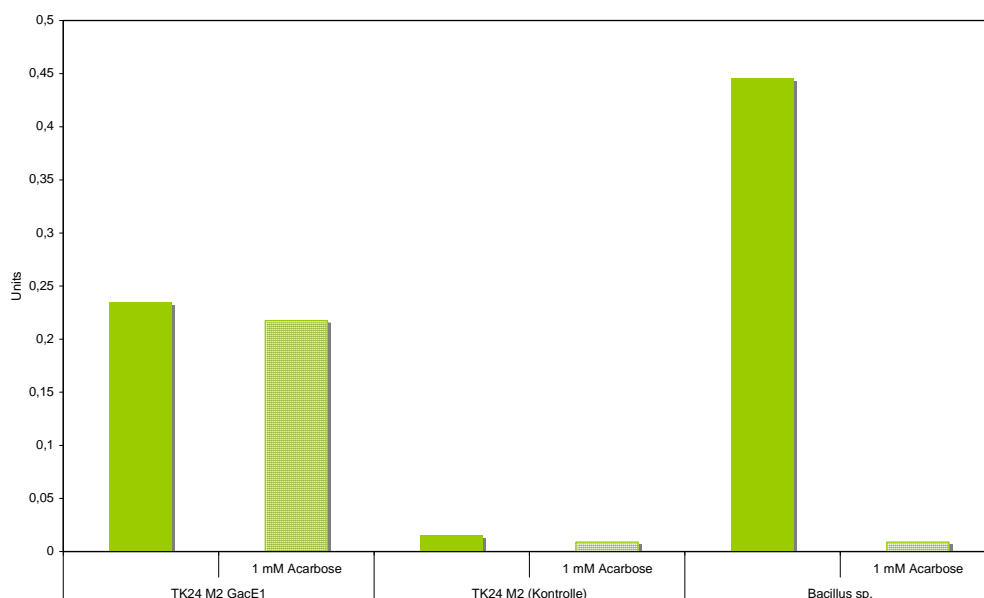
Erste Analysen zu der  $\alpha$ -Amylaseaktivität wurden auch durch Ausstriche der Stämme auf Stärkeplatten erbracht. Die Abbildung 3.38 zeigt, dass die Stämme *S. lividans* TK24 M2pUWLHiscacE1 und TK23pUWLHiscacE1  $\alpha$ -Amylaseaktivität besitzen und mit Acarbose nicht inhibiert wurden, während der Kontrollstamm *S. lividans* TK24 M2 Stärke mit Acarbose nicht hydrolysieren konnte.



**Abb. 3.43: Nachweis der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacE1.** Die Platte enthielt 1% Stärke + 1 mM Acarbose. Die Stämme *S. lividans* TK24 M2 (Kontrolle), *S. lividans* TK23 pUWLHiscacE1 und TK24 M2pUWLHiscacE1 wurden auf der Platte ausgestrichen und bei 28°C für 72 h inkubiert (s. Abb. 3.38).

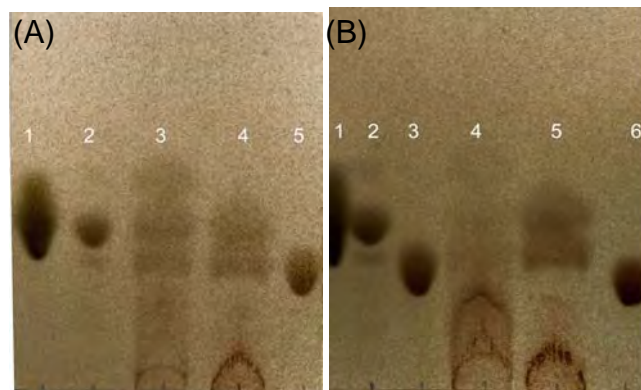
Das Ergebnis des Ausstrichs der Stämme auf Stärkeplatten wurde auch durch Enzymtests, in denen Stärke als Substrat diente, mit zellfreiem Rohextrakt bestätigt. Das gereinigte Protein GacE1 aus der Anzucht von *S. lividans* TK24 M2pUWLHisgacE1 und zellfreier Rohextrakte von *S. lividans* TK24 M2pUWLHis wurden in den Tests eingesetzt, als Referenz diente wieder die  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp.. Die Tests wurden wie unter 2.10.6.4 beschrieben analysiert.

Aus der Abbildung 3.44 ist ersichtlich, dass GacE1 Stärke hydrolysierte und auch mit Acarbose im Ansatz in der Lage war, das Substrat zu spalten. Die errechnete Aktivität für GacE1 betrug 0,24 U. Der Kontrollstamm *S. lividans* TK24 M2pUWLHis zeigte, wie es zu erwarten war, kaum messbare  $\alpha$ -Amylase Aktivität (0,02 U), während die  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. in dem Ansatz mit Acarbose wieder fast vollständig inhibiert wurde.



**Abb. 3.44: Aktivität und Acarbose-Resistenz von GacE1.** Die Anzucht von *S. lividans* TK2 M2pUWLHisgacE1 und dem Kontrollstamm *S. lividans* TK24 M2pUWLHis erfolgte in Cerestar-Medium für 96 h bei 30°C. Die Enzymtests wurden mit gereinigtem Enzym aus der Anzucht von *S. lividans* TK2 M2pUWLHisgacE1 und mit zellfreiem Rohextrakt von *S. lividans* TK2 M2pUWLHis durchgeführt (je 10 µg/µL), als weitere Kontrolle wurde die zuvor beschriebene  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. mit 0,5 U eingesetzt. Als Substrat diente 0,5% Stärke  $\pm$  1 mM Acarbose. Der Nachweis der Aktivität erfolgte mittels Dinitrosalicylsäure-Methode (s. 2. Material und Methoden).

Der Nachweis der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacE1 wurde auch durch die DC-Methode mit anschließender Visualisierung (s. 2.10.6) erbracht. Der Test setzte sich wie unter 2.10.7.1 beschrieben zusammen. In der Abbildung 3.45 (A) in Spur 3 ist der Ansatz mit Stärke und der  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. analysiert; in (B) Spur 4 ist der Ansatz mit Stärke und Acarbose gezeigt. Während sich bei (A) eine deutliche Spaltung der Stärke durch die  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. erkennen lässt, zeigte sich in (B) Spur 4 das Produktmuster nicht, somit wurde das Enzym inhibiert. Der Test mit GacE1 und Stärke ist in Abbildung (A), Spur 4 und in (B), Spur 5 mit Stärke und Acarbose aufgetragen. In beiden Spuren ist anhand der Referenzsubstanzen ersichtlich, dass Stärke vor allem in Maltose und Maltotriose durch GacE1 hydrolysiert wurde. Die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase GacE1 wurde durch die Methoden Dinitrosalicylsäure (DNS), Stärkeplatten und durch die Analyse per DC nachgewiesen und zeigte eindeutig, dass GacE1 Stärke hydrolysiert und Acarbose-insensitiv ist.



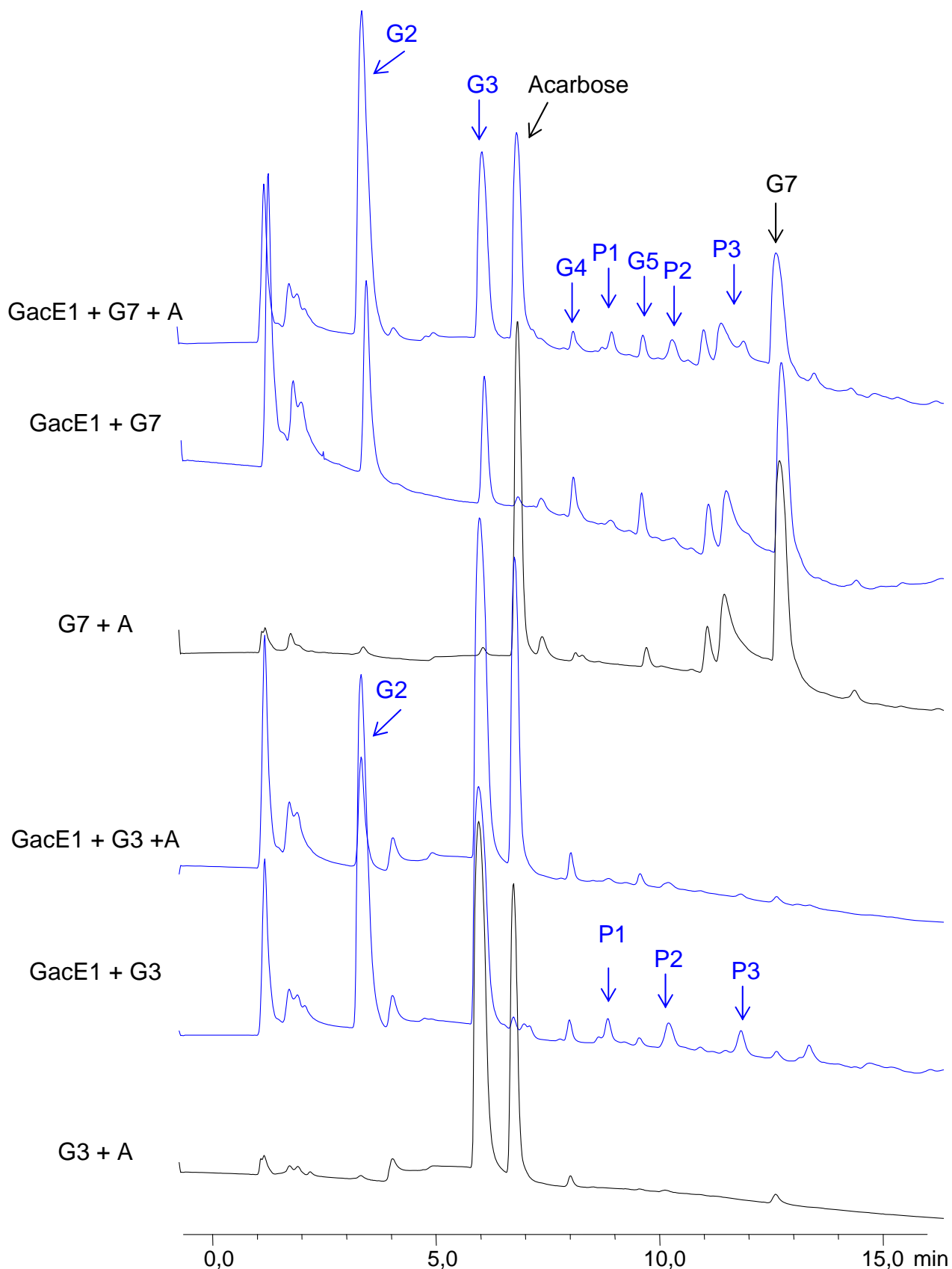
**Abb. 3.45: Analyse der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacE1.** Die Tests setzten sich wie unter 2.10.6 beschrieben zusammen. Die Analyse der Tests erfolgte durch DC. In Abb. (A) sind die Referenzsubstanzen in den Spuren 1, 2 und 5 aufgetragen. Spur 1: Glucose, Spur 2: Maltose, Spur 3: Test mit der  $\alpha$ -Amylase *Bacillus* sp. + Stärke, Spur 4: gereinigtes GacE1 + Stärke, Spur 5: Acarbose. In Abb. (B) sind die Referenzsubstanzen in den Spuren 1-3 und 6 aufgebracht. Spur 1: Glucose, Spur 2: Maltose, Spur 3: Maltotriose, Spur 4: Test mit der  $\alpha$ -Amylase *Bacillus* sp. + Stärke + Acarbose, Spur 5: gereinigtes GacE1 Protein + Stärke + Acarbose, Spur 6: Acarbose. (Laufmittel A, Farbentwicklung durch Cer-Reagenz, s. 2. Material und Methoden).

Die Mögliche  $\alpha$ -Glucosidaseaktivität des Enzyms GacE1 wurde mit der Methode der HPLC-ECD untersucht. Die Enzymtests setzten sich wie unter 2.10.7 beschrieben zusammen. Es wurden in den Ansätzen die Maltooligosaccharide als Substrate für das gereinigte GacE1 Protein verwendet. Die in der Abbildung 3.46 gezeigten Analysen, spiegeln die Umsätze wieder, die aus den Ansätzen mit dem Enzym GacE1 und Maltotriose und GacE1 und Maltoheptaose resultierten. Nur mit den Substraten G3 und G7 konnte eine  $\alpha$ -Glucosidaseaktivität von GacE1 gemessen werden.

Die Analyse des Ansatzes mit GacE1 und G3 zeigte (s. Abb. 3.46 GacE1 + G3, GacE1 + G3 + A), dass G3 zu Maltose hydrolysiert wurde. Die Reaktion wurde auch in Gegenwart von Acarbose umgesetzt. Der Peak, der unter anderem die Detektion der Glucose darstellt, verzeichnet ebenfalls im Vergleich zu der Referenz (s. Abb. 3.46 G3 + A) einen starken Anstieg, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass als weiteres Produkt Glucose aus der Hydrolyse von G3 entstanden ist. Des Weiteren fielen die Peaks P1, P2 und P3 auf, die ebenfalls bei der Analyse des Tests GacE1 und G3 gemessen wurden. Diese detektierten Peaks stellen neue Produkte dar, die durch den Umsatz von G3 durch das Enzym GacE1 entstanden sein könnten. Allerdings sind diese neuen Produktpeaks nicht durch die  $\alpha$ -Glucosidase- bzw.  $\alpha$ -Amylaseaktivität von GacE1 zu erklären und wurden auch nicht in der Analyse des Reaktionsgemisches von GacE1 und G3 mit Acarbose detektiert.

Das Enzym GacE1 scheint auch das Substrat G7 zu hydrolysieren und diese Aktivität erwies sich als Acarbose-insensitiv. Die Messung des Enzymtests in dem durch GacE1 G7 umgesetzt wurde, zeigte, dass im Vergleich zu der Analyse der Referenz (G7 + A), G3 und G2 als Produkte aus dieser Reaktion hervorgegangen sind (s. Abb. 3.46 GacE1 + G7 und GacE1 + G7 + A). Auch der, als Glucose benannte Peak vergrößerte sich. In den Messungen der Tests mit und ohne Acarbose zeigte sich, dass G4 und G5 an Fläche zunahmten; zusätzliche Peaks (P1, P2 und P3) zeigten sich in der Analyse des Ansatzes, in dem GacE1 mit G7 und Acarbose inkubiert wurde.

Die zugehörigen Messdaten der Retentionszeiten und Flächen der Abbildung 3.46 sind in den Tabellen 3.18 und 3.19 ersichtlich.



**Abb. 3.46: HPLC-ECD-Analyse der Aktivität von GacE1.** Als Substrate dienten G3 und G7  $\pm$  Acarbose, es wurde gereinigtes Enzym ( $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) eingesetzt, der Test wurde für 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert (s. 2.10.7). Die Angaben zu den Substraten sind links neben den Chromatogrammen ersichtlich. Das unter Chromatogramm stellt die Messung der Referenzsubstanzen dar (schwarz), es folgt die Analyse des Enzymtest mit dem Maltooligosaccharid (blau) sowie mit dem Maltooligosaccharid und Acarbose (blau).



Tab. 3.18: Messdaten der HPLC-ECD-Analyse zum Umsatz von G3 durch GacE1.

Ret.Time (min)	Peak Name	Area (nC*min)		
		G3 + A*	GacE1 * + G3	GacE1 * + G3 + A
2,47	(Glc)	0,023	0,859	0,784
4,07	G2	-	4,474	0,848
4,77		0,237	0,427	0,283
6,72	G3	4,825	5,196	4,215
7,48	A	2,639	0,290	2,641
8,02		-	-	-
8,77	G4	0,071	0,174	0,155
9,52	P1	-	0,315	-
10,32	G5	-	0,077	0,067
10,97		-	0,363	-
11,65	G6	-	-	-
12,05		-	-	-
12,57		-	0,307	-
13,27	G7	0,085	0,082	-
14,08		-	0,298	-

\* (s. Abb. 3.8)

Tab. 3.19: Messdaten der HPLC-ECD-Analyse zum Umsatz von G7 durch GacE1.

Ret.Time (min)	Peak Name	Area (nC*min)		
		G7 + A*	GacE1 * + G7	GacE1 * + G7 + A
2,47	(Glc)	0,103	0,361	0,615
4,07	G2	0,059	0,706	3,395
6,72	G3	0,042	0,407	1,784
7,48	A	2,398	-	1,838
8,02		0,135	0,029	-
8,77	G4	0,074	0,116	0,110
9,52	P1	-	0,020	0,147
10,32	G5	0,103	0,108	0,111
10,97	P2	-	-	0,161
11,65	G6	0,916	0,449	0,207
12,05		1,375	0,673	0,382
12,31	P3	-	-	0,266
13,27	G7	2,362	1,110	1,392

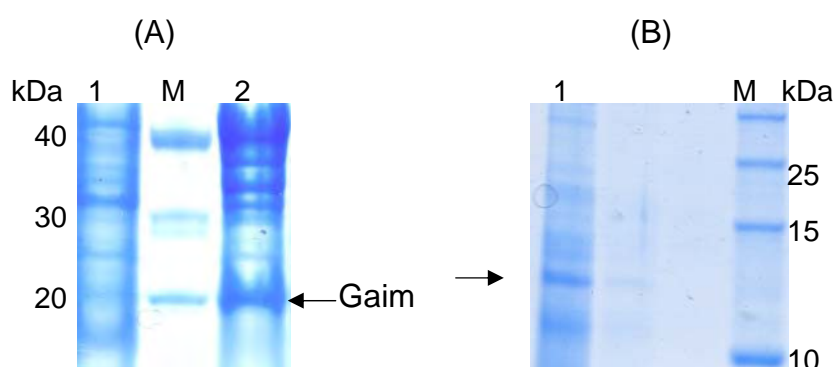
\* (s. Abb. 3.8)

GacE1 besitzt demnach  $\alpha$ -Amylaseaktivität, ist aber scheinbar ebenso in der Lage die Maltooligosaccharide Maltotriose und Maltoheptaose zu spalten und auch kurzkettige Oligosaccharide intrazellulär zu generieren. Die Aktivität von GacE1 ist durch Acarbose in keinster Weise inhibiert.

### 3.2.4 Charakterisierung des Gaim Proteins aus *S. glaucescens*

#### 3.2.4.1 Überproduktion von Gaim

Das *gaim*-Gen (342 bp) codiert für den potenziellen  $\alpha$ -Amylase Inhibitor Gaim (9 kDa). Zur Produktion des Gaim Proteins wurden Zellen von *S. glaucescens* GLA.0 in Cerestar-Medium bei 30°C für 96 h kultiviert. Die Anreicherung des sekretierten Proteins wurde erreicht, indem der Kulturüberstand über Konzentratoren mit einem Ausschluss-Molekulargewicht von 30 kDa selektioniert wurde. Es war unter anderem eine Proteinbande zu erkennen, bei der es sich wahrscheinlich der abgeleiteten Proteingröße nach, um das Gaim Protein handelte. Das so erhaltene native Protein ist in der Abbildung 3.47 durch eine SDS-PAGE analysiert.

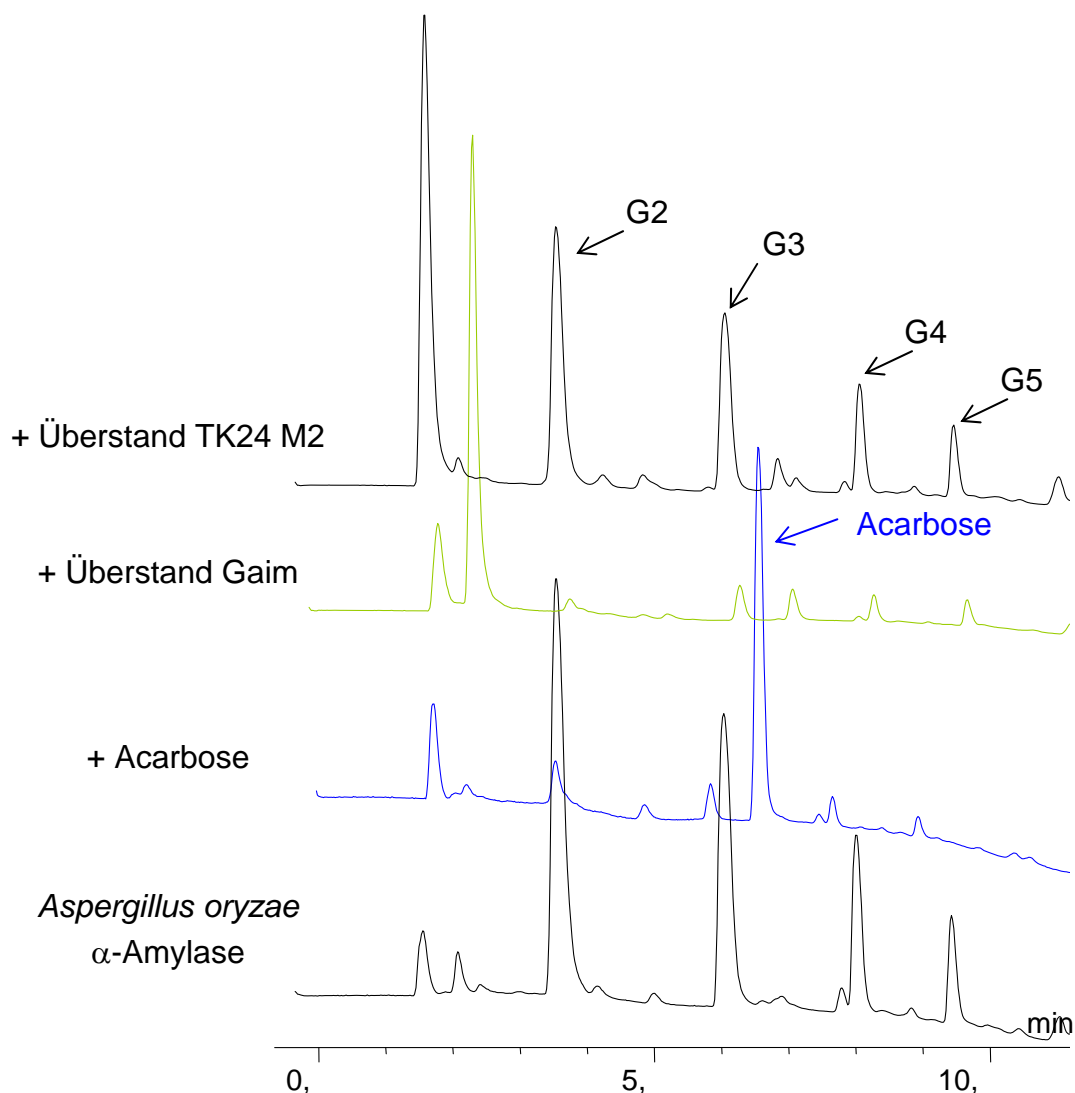


**Abb. 3.47: Heterologe Produktion des Gaim Proteins von *S. glaucescens*.** (A) Die Anzucht von *S. glaucescens* GLA.0 erfolgte in Cerestar-Medium bei 30°C für 96 h, zur Referenz wurde die Kultur von *S. lividans* TK24 M2pUWLHis parallel angezogen. Die Überstände wurden dann über Ausschluss-MW-Säulen von 50 kDa selektioniert. Spur 1: Überstand von *S. lividans* als Referenz, Spur M: Molekulargewichtsmarker Roti-Mark (s. Abb. 3.4), Spur 2: Überstand von GLA.0. Es wurden je 20  $\mu$ l im 10%igen SDS-PAGE getrennt. (B) Anreicherung des Proteins durch Konzentration. Es folgte eine erneute Reinigung des Überstandes aus Spur 2, in dem nun das Ausschluss-MW 30 kDa gewählt wurde. Spur 1: 20  $\mu$ l der Reinigung des Überstandes von GLA.0. Spur M: Molekulargewichtsmarker Broad Range (s. Abb.3.1). Die Probe wurde im 12%igen SDS-PAGE analysiert.

#### 3.2.4.1 Analyse zur Aktivität des Gaim Proteins

Erste Analysen zu der Enzymaktivität von Gaim wurden mit dem nativen Protein aus *S. glaucescens* GLA.0 durchgeführt. Die Wirkung des potenziellen  $\alpha$ -Amylase-Inhibitors Gaim auf die  $\alpha$ -Amylasen von *Bacillus* sp., *Aspergillus oryzae* und auf die  $\alpha$ -Amylase des Pankreas aus Schweinen wurde untersucht. Die  $\alpha$ -Amylasen wurden mit dem Substrat Stärke inkubiert, um den Einfluss auf die Aktivität der  $\alpha$ -Amylasen zu messen, wurden diese zusätzlich mit dem selektionierten Überstand aus der Anzucht von *S. glaucescens* inkubiert. Als Kontrolle wurden die oben erwähnten  $\alpha$ -Amylasen parallel mit 0,01 mM Acarbose versetzt; als Referenz wurde der Überstand aus der Anzucht von *S. lividans* TK24 M2pUWLHis, der identisch behandelt wurde, wie die Anzucht von *S. glaucescens*, herangezogen. Die Analyse der Produkte

resultierend aus dem Enzymtest erfolgte mit der Methode der HPLC-ECD. Die Abbildung 3.48 zeigt die Messung der Tests zu der Aktivität der  $\alpha$ -Amylase aus *Aspergillus oryzae*. Dieses Enzym wurde als einziges der verwendeten Enzyme durch den Überstand von *S. glaucescens* gehemmt, während bei den anderen Enzymen die enzymatische Aktivität durch den Gaim-haltigen Überstand nicht beeinflusst wurde.



**Abb. 3.48: HPLC-ECD-Analyse der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von *Aspergillus oryzae*.** Die  $\alpha$ -Amylase von *Aspergillus oryzae* wurde mit einer berechneten Aktivität von 1 mU im Test eingesetzt, als Substrat diente 0,5% Stärke. Drei weitere Tests wurden mit 0,1 mM Acarbose, mit dem Gaim-Protein (resultierend aus dem angereicherten Überstand von *S. glaucescens*; 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , es wurden 5  $\mu\text{l}$  im Test eingesetzt) und dem identisch behandeltem Überstand aus der Anzucht von *S. lividans* TK24 M2 (im Test wurden 5  $\mu\text{l}$  eingesetzt) versetzt (s. 2.10.7). Die Inkubation der Tests erfolgte für 4 h bei 37°C. Die Zusammensetzung der Tests ist aus der Beschriftung links von den Chromatogrammen ersichtlich. Die Analysen der Tests sind vergleichend übereinander dargestellt.

In der Abbildung 3.48 sind die Analysen der Enzymtests, in dem Stärke durch die  $\alpha$ -Amylase aus *Aspergillus oryzae* gespalten wurde, gezeigt. In dem unteren Chromatogramm ist die Messung dargestellt, die, wie erwartet zeigt, dass Stärke in die Maltooligosaccharide G2, G3, G4 und G5 gespalten wird. Der Einfluss von 0,01 mM Acarbose zeigte sich in der darauf folgenden Messung: die Produktpeaks sind nur noch sehr gering vorhanden, somit ist die  $\alpha$ -Amylase inhibiert. Die Konzentration von 0,01 mM Acarbose erwies sich allerdings nicht als ausreichend, um das Enzym vollständig zu inhibieren. Des Weiteren ist die Analyse des Tests zu sehen, der mit dem Gaim-Protein supplementiert wurde. Das Produktmuster der Peaks, das aus der Stärkespaltung hervorgeht, trat hier nun nicht mehr auf. Der selektionierte Überstand aus der Anzucht von *S. glaucescens* GLA.0 schien auf die  $\alpha$ -Amylaseaktivität von *Aspergillus oryzae* Einfluss zu nehmen, während die Überstand aus der Anzucht des Kontrollstammes *S. lividans* TK24 M2pUWLHis nicht auf die Aktivität auswirkte.

Die Retentionszeiten und Flächen der Messungen sind in der Tabelle 19 aufgeführt.

**Tab. 3.19: Messdaten aus der HPLC-ECD-Analyse der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von *Aspergillus oryzae***

Ret.Time (min)	Peak	Fläche (nC*min)			
		$\alpha$ -Amylase <i>Aspergillus</i>	mit Acarbose	+ Überstand Gaim	+ Überstand TK24 M2
3,87	G2	2,523	0,422	0,115	2,511
6,33	G3	1,715	0,588	0,230	1,571
7,08	A	0,033	0,913	0,188	0,036
8,28	n.a.	0,867	0,351	0,173	0,823
9,70	n.a.	0,427	0,235	0,159	0,404
11,30	n.a.	0,197	0,407	0,094	0,124

Diese erste Untersuchung zu der Aktivität des Enzyms Gaim zeigte, dass dieses möglicherweise in der Lage ist, auf die Aktivität bestimmter  $\alpha$ -Amylasen Einfluss zu nehmen. Da das Protein nicht als Fusionsprotein produziert wurde und durch Konzentratoren mit bestimmten Ausschluss-Molekulargewicht angereichert wurde, ist es nicht auszuschließen, dass sich eventuell Rückstände des Mediums aus der Anzucht von *S. glaucescens* GLA.0 auf die  $\alpha$ -Amylaseaktivität auswirkten. Allerdings wurden die  $\alpha$ -Amylase von *Bacillus* sp. und die  $\alpha$ -Amylase des Schweine-Pankreas nicht durch das Gaim-Protein beeinflusst und der Kulturüberstand des Kontrollstammes *S. lividans* TK24 M2pUWLHis zeigte keinerlei inhibitorische Wirkung. Die in diesen Tests verwendeten  $\alpha$ -Amylasen wurden jedoch alle durch Acarbose inhibiert.

## 4. Diskussion

Die postulierte Hypothese zur physiologischen Bedeutung und Funktion des  $\alpha$ -Amylaseinhibitors Acarbose im Ökosystem der Produzenten *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens* beschreibt einen integrierten intra- und extrazellulären Acarbose-Metabolismus, der der Erschließung von exogenen Kohlenstoffquellen dient („Carbophor-Modell“) (Wehmeier & Piepersberg, 2004; Rockser & Wehmeier, 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es, die Aktivität der extra- und intrazellulären maltolytischen Enzyme vor allem mit Bezug auf das Carbophor-Modell näher zu charakterisieren.

### 4.1 Die Optimierung der heterologen Überexpression im genetischen Kontext

Für die molekularbiologischen Arbeiten mit den Actinomycetenstämmen war es von Bedeutung, die entsprechenden Gene näher zu charakterisieren, um so die heterologe Überproduktion der zu analysierenden Proteine zu gewährleisten und gegebenenfalls zu optimieren.

Die Streptomycetengene weisen einen relativ hohen G/C-Gehalt auf (bis >70 %; Enquist & Bradley, 1971; Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2008). Der G/C-Gehalt, z. B. des *acbZ* Gens liegt bei 72,3%. Erste Schwierigkeiten zeigten sich wahrscheinlich deshalb bei der bei der Amplifikation der DNA von *Actinoplanes* sp. durch die Methode der Polymerasekettenreaktion; zum einen bedingt durch die hohe Schmelztemperatur der DNA sowie die Neigung der DNA zur Bildung von selbstkomplementären Strukturen, die zur Entstehung von DNA-Schleifen führt, sodass kein korrektes PCR-Produkt entstehen kann (Moreau *et al.*, 1994). Teilweise war es möglich durch den Zusatz von Additiven, wie z. B. DMSO ein PCR-Produkt zu generieren (Varadaraj & Skinner, 1994); ebenso erwies sich eine zweistufige PCR, mit einer zu Beginn niedrigeren Temperatur als hilfreich. Die heterologe Überexpression einiger Gene von *Actinoplanes* sp. in *E. coli* führte zum einen zu einer Wachstumsbeeinträchtigung des Expressionsstammes, ebenso kam es zur Bildung von unlöslichen Protein-Aggregaten. Das *E. coli* K-12 Genom mit ca.  $4,65 \cdot 10^6$  Basenpaaren, enthält etwa 5000 Gene und weist einen G/C-Gehalt von ca. 50% auf (Präve *et al.*, 1994); die damit verbundene Codonverwendung war daher für die heterologe Proteinproduktion an Streptomycetengen nicht ideal. Auch die Veränderung der Kultivierungs- und Induktionsparameter, wie z. B. Absenkung der Inkubationstemperatur, verschiedene Nährmedien, Co-Expression mit plasmidcodierten Chaperonin-komplexen (GroEL/GroES, Cpn60/Cpn10) (Goloubinoff *et al.*, 1989; Pöhling, 1997; Fenton & Horwich, 2003; De Marco *et al.*, 2005; Lin & Rye, 2006; Strocchi *et al.*, 2006; Madan *et al.*, 2008), limitierende Expression bzw. Autoinduktion (Studier *et al.*, 2005) oder Anzucht der Zellen unter osmotischen Stressbedingungen, durch Zugabe von z. B. Sorbitol (Kopetzki *et al.*, 1989; Olis & Lee, 1993; Hockney, 1994) verbesserte die Proteinausbeute nicht. Auch die

Verwendung verschiedener *E. coli* Expressionsstämme und Systeme, sowohl die Verwendung von N- oder C-terminalen Fusions-*Tags* als auch der PelB-Signalsequenz zur Isolierung der Proteine aus dem Periplasma von *E. coli*, zeigte nur bedingt Erfolg (Better *et al.*, 1988).

Die heterologe Überproduktion der Proteine von *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens* konnte erfolgreich in *S. lividans*, im Besonderen in dem  $\alpha$ -Amylase-defizienten Stamm *S. lividans* TK24M2 (Tsao *et al.*, 1993), gewährleistet werden. Von Vorteil gegenüber dem *E. coli* Expressionssystem erwiesen sich auch die Gemeinsamkeit in der Proteinsekretion und die Struktur der Gene von *S. lividans* und *Actinoplanes* sp. (Gilbert *et al.*, 1995; Morosoli *et al.*, 1997; Stratmann, 1997).

Um die Problematik der Proteinproduktion und Sekretion der Actinomycetenenzyme in *E. coli* zu verdeutlichen, sind die Strukturen der Gene *acbZ* und *acbE* sowie die für die sekretorische Enzymproduktion relevanten Strukturmerkmale der abgeleiteten Proteine AcbE und AcbZ im folgenden analysiert und mit bekannten Strukturen bei Streptomycceten und *E. coli* verglichen.

Für das *acbZ* Gen wurde der potenzielle Promotor ermittelt, die Nucleotidsequenz der -35-Region der ( $\sigma^{70}$ )-Promotoren (TTCGAA) liegt 430 bp stromaufwärts des Startcodons (ATG). Der Abstand vom Transkriptionsstartpunkt zur kodierenden Region liegt bei *Streptomyces* sp. zwischen 9 und 345 Nucleotiden und ist somit wesentlich größer als bei *E. coli* Genen; grundsätzlich weisen Promotorsequenzen in *Streptomyces* sp. eine große Heterogenität auf und verfügen nicht immer über die konservierten -10- und -35-Regionen (Strohl, 1992; Bourn and Babb, 1995). Die Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz der RBS liegt meist 5-12 Nucleotide vor dem Startcodon, der Bereich kann 3-7 Nucleotide umfassen. Die am stärksten konservierte Sequenz ist (a/g)-G-G-A-G-G (Strohl, 1992). Sechs Nucleotide vor dem *acbZ* Startcodon konnte die Sequenz 5'-GGCGG-3' identifiziert werden. Der Promotorbereich des *acbE* Gens zeigt eine signifikante Übereinstimmung mit den Konsensussequenzen der -35 und -10 Regionen der *E. coli* ( $\sigma^{70}$ ) ähnlichen Promotoren auf (Strohl, 1992; Stratmann, 1997).

Als sekretiertes Protein besitzt die Primärstruktur des AcbZ Proteins ein N-terminales Signalpeptid, das sich mit einer Länge von 64 aa deutlich von anderen Streptomycceten Signalpeptiden absetzt. Generell sind die Signalpeptide der Streptomycceten mit etwa 35 aa im Vergleich zu denen anderer Gram-positiver Bakterien von 29-31 aa im Mittel länger (Gilbert *et al.*, 1995). Das Signalpeptid, das zur Sekretion des AcbE Proteins führt, besteht nur aus 33 aa. Innerhalb der DNA-codierenden Signalsequenz weisen Streptomyccetengene meist ein zweites Startcodon auf, dem auch eine zweite Ribosomale Bindestelle vorangestellt ist (Page *et al.*, 1996). Auch in der Sequenz des *acbZ* Gens ist ein zweites Startcodon (ATG) 112 bp stromabwärts sowie eine mögliche RBS, 35 bp stromaufwärts des zweiten Startcodons, zu finden. Möglicherweise führt dieses weitere Startcodon bei der heterologen Expression in *E. coli* zu einer Verkürzung des Leserahmens. Die

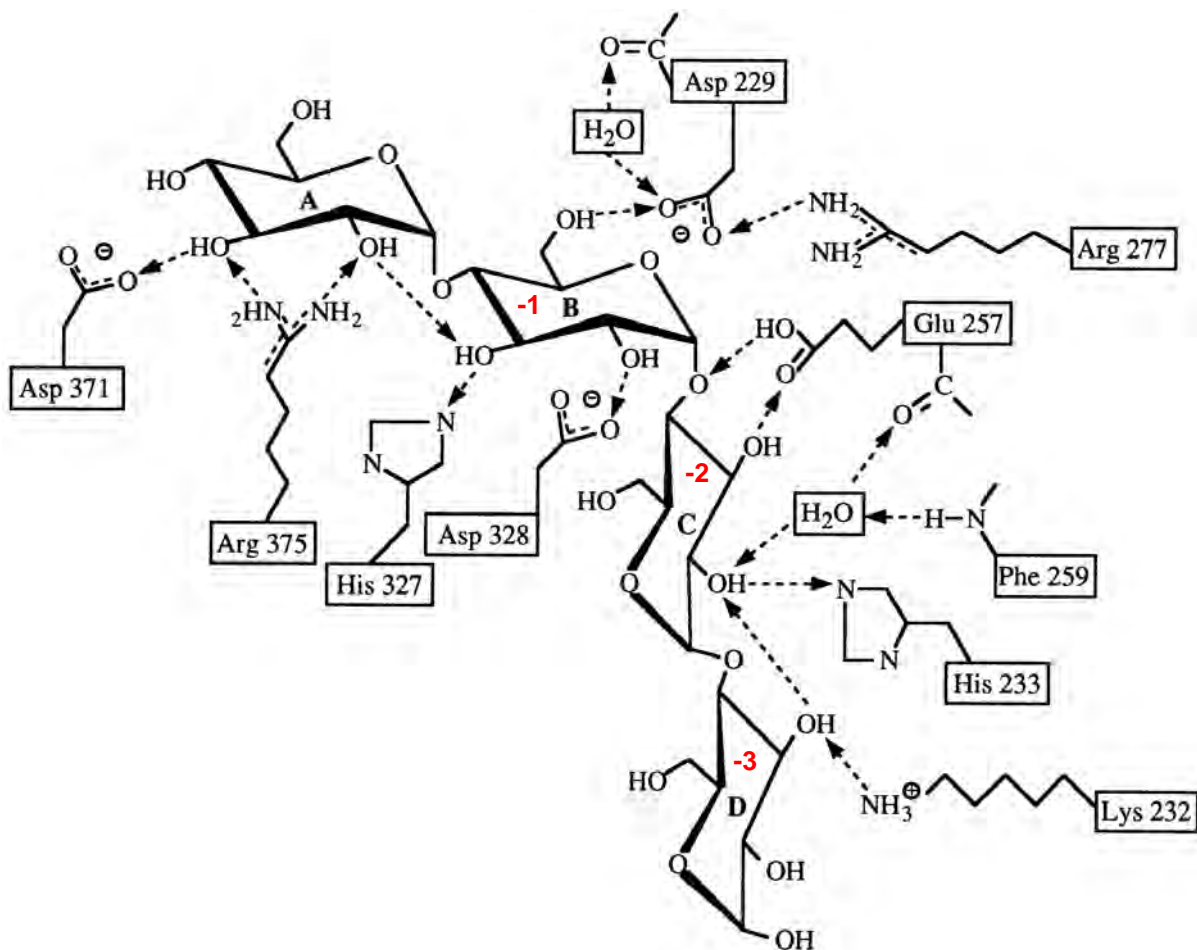
sekretierten Proteine verschiedener Organismen weisen grundsätzlich gleiche Strukturmerkmale auf. Das Signalpeptid wird in eine N-terminale, hydrophobe und C-terminale Region unterteilt (Pugsley, 1993). Die n-Region besitzt eine positive Nettoladung und verbleibt bei dem Vorgang der Sekretion in der Innenseite der Membran; der hydrophobe Bereich integriert in die Membran, sodass es zur Translokation des Proteins kommt; in der c-Region befindet sich die Erkennungs- und Schnittstelle der Signalpeptidase (Gilbert *et al.*, 1995). Die zur Sekretion benötigten Signalpeptide von *E. coli* und Actinomyceten unterscheiden sich vor allem in der Länge der n-, h- und c-Regionen, in der Ladungsverteilung sowie in der Aminosäurezusammensetzung (von Heijne & Abrahmsen, 1989). Wahrscheinlich kommt es aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Signalpeptide bei der heterologen Proteinproduktion in *E. coli* zur Bildung von unlöslichen Protein-Aggregaten.

#### **4.2 Die extrazellulären, amyolytischen Enzyme der Acarbose-Produzentenstämme *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens***

Das Carbohydrat-Modell postuliert, dass die Enzyme AcbZ und AcbE sowie GacZ1 und GacE2 an dem extrazellulären Stärkeabbau durch *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens* beteiligt sind (Wehmeier & Piepersberg, 2004; Rockser & Wehmeier, 2009). Die Proteine konnten durch erste Analysen der Primärstruktur der Familie der  $\alpha$ -Amylasen zugeordnet werden. Dabei gehören die Enzyme AcbE, AcbZ und GacZ1 zu den langkettigen  $\alpha$ -Amylasen und scheinen mit einem Molekulargewicht von über 100 kDa typisch für Actinomyceten zu sein; so hat z. B. die  $\alpha$ -Amylase von *S. lividans* TK24 (CAA49759) ein MW von 100,6 kDa, die Pullulanase von *S. svicensis* (ATCC 29083) weist ein MW von 194,5 kDa auf.

Die  $\alpha$ -Amylasen verschiedener Organismen zeigen eine ähnliche 3D-Struktur, die sich in die Domänen A, B und C gliedert (Beier *et al.*, 2000). Die A-Domäne weist die typische katalytische  $(\beta/\alpha)_8$ -Topologie eines TIM-*barrels* auf, benannt nach einer „Fass“-ähnlichen Struktur der Triosephosphatisomerase (EC 5.3.1.1) (Wierenga, 2001). Allen Stärke abbauenden Enzymen ist dieses TIM-*barrel* gemein (Beier *et al.*, 2000); dabei bilden die acht  $\beta$ -Stränge das Innere der fassähnlichen Struktur, wobei Wasserstoffbrücken die Stränge eins und acht verbinden; das Fass wiederum ist umgeben von einem konzentrischen Zylinder aus  $\alpha$ -Helices. Das aktive Zentrum in der A-Domäne wird durch eine große Schleife vom C-Terminus des  $\beta$ -Stranges zum N-Terminus der  $\alpha$ -Helices gebildet. Die konservierten Bereiche des TIM-*barrels* umfassen insgesamt sechs  $\beta$ -Stränge; in der Familie GH13 sind diese besser konserviert als die entsprechenden  $\alpha$ -Helices, die sehr variabel in der Länge und Sequenz sein können (Janecek, 1997). Domäne B, die kleinste der drei Domänen, befindet sich zwischen dem dritten  $\beta$ -Strang und der dritten  $\alpha$ -Helix innerhalb des TIM-*barrels*. Dieser Bereich weist innerhalb der  $\alpha$ -Amylase Familie eine große Variabilität bezüglich der Länge und Sequenz auf (Raasch, 2001). Bei einigen

Enzymen der Familie GH13 konnten der Domäne B eine Funktion bei der Substraterkennung und Bindung zugeordnet werden; bei  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Enzymen trägt sie durch Wechselwirkungen mit dem zweiwertigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion zur Stabilisierung der Proteinstruktur im Bereich des aktiven Zentrums bei (Matsuura *et al.*, 1984; Buisson *et al.*, 1987). Domäne C besteht aus acht antiparallelen  $\beta$ -Strängen und weist im Vergleich der primären Sequenzen von  $\alpha$ -Amylasen verschiedener Herkunft, die höchste Variabilität auf. Bisher konnte der Domäne C noch keine spezifische Funktion zugeordnet werden, allerdings wurde postuliert, dass die Domäne funktionell an der Kohlenhydratbindung beteiligt ist (Knegtel *et al.*, 1995; Svensson, 1994; Beier *et al.*, 2000).



**Abb. 4.1: Bindung zwischen Maltotetraose/Acarbose und den aktiven Zentren der CGTase von *B. circulans* (Knegtel *et al.*, 1995).** A-B: Glucoseeinheiten; Asp229, Asp328, Asp371 und Glu257 sind die katalytisch aktiven Aminosäuren der Regionen I-IV (s. Tab. 4.1); +1 bis -3 *subsites* (modifiziert nach Leemhuis *et al.*, 2004).



Die aktiven Zentren bei  $\alpha$ -Amylasen zeichnen sich durch vier katalytisch aktive Aminosäuren in den Regionen I-IV aus (s. Tab. 4.1). Grundsätzlich kommt es zur Hydrolyse durch einen Double-Displacement-Mechanismus (s. Einleitung) (McCarter & Withers, 1994), indem die glycosidische Bindung zwischen der -1 und +1 *subsite* gespalten wird. Die *subsites* stellen Bindungsregionen für Monosaccharidyl-Einheiten des Substratmoleküls dar (Davies *et al.*, 1997). Nach der Hydrolyse verbleibt das Glycosyl-Enzym-Intermediat gebunden an den *subsites* -1, -2, und -3 (Abb. 4.1).

Die TAKA-Amylase A (P0C1B3) von *Aspergillus oryzae* (Matsuura *et al.*, 1984) wurde intensiv untersucht und die funktionell wichtigen Aminosäuren wurden auch anhand der 3-D-Struktur des Protein-Substrat-Komplexes charakterisiert (Janecek & Bateman, 1996). Für die Hydrolyse sind ein Glutamat-Rest (E) und zwei Aspartat-Reste (D) von Bedeutung, die sich in der TAKA-Amylase A an den folgenden Positionen finden: E230, D206 und D297 (Qian *et al.*, 1994; Janecek *et al.*, 1997). Dabei ist der Glutamat-Rest im aktiven Zentrum an der Übertragung eines Protons auf ein Sauerstoffatom der C1-O1-Bindung im Glucosemolekül beteiligt. Es kommt zur Spaltung der C1-O1-Bindung, sodass ein resonanzstabilisiertes Oxocarbenium-Ion an C1 gebildet wird. Anschließend lagert sich eine OH-Gruppe eines Wassermoleküls an das Oxocarbenium-Ion an. Die Aspartat-Reste im aktiven Zentrum fungieren als Nucleophil, während der Glutamat-Rest als allgemeiner Säure-Base-Katalysator dient. Die ionisierte Carboxylgruppe von D206 trägt zur Stabilisierung des entstandenen Oxocarbeniumions bei. Ein weiterer Aspartat-Rest D175 der TAKA-Amylase A ist an der Bindung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions beteiligt (Brzozowski & Davies, 1997). Das Metallion wirkt als Cofaktor auf die Aktivität und agiert als stabilisierendes Brückenglied zwischen den Domänen A und B (Matsui & Svensson, 1997). Die hochkonservierten Histidin-Reste H122 und H296 interagieren mit einer Substratbinderegion (*subsite* -1) und sind so an der Bindung und der Stabilisation des Übergangszustandes während der Katalyse beteiligt (Sögaard *et al.*, 1993; Imamura *et al.*, 2003). Diese konservierten Histidin-Reste sind ebenfalls an der Bindung von Acarbose im aktiven Zentrum der CGTase von *B. circulans* beteiligt.

Das Genprodukt AcbZ wurde im Sequenzvergleich der Familie der  $\alpha$ -Amylasen (EC 3.2.1.1) zugeordnet. Die Analyse der Aminosäuresequenz wurde mittels der Proteindatabase „SMART“ geführt (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Die  $\alpha$ -Amylasedomäne umfasst die Aminosäuren (aa) 92-551. Es folgt eine  $\alpha$ -Amylase-C-Domäne (566-646 aa) und zwei aufeinanderfolgende Pullulanasedomänen (753-858 aa, 866-964 aa). Die größte Übereinstimmung zeigt das AcbZ Protein mit einer Pullulanase aus *S. sviveus* ATCC 29083 (YP\_002 204104.1) (Tab. 1.2; Tab. 4.1). Ein Sequenzvergleich verschiedener Proteine aus der Familie 13 der Glycosidhydrolasen, unter anderem mit der TAKA-Amylase A und mit den Enzymen von *Actinoplanes* SE 50/100 und *S. glaucescens*, zeigt die Übereinstimmung mit den stark konservierten Regionen I-IV der  $\alpha$ -Amylasen, CGTasen und Pullulanasen (s. Tab. 4.1). Demnach wird das aktive Zentrum bei AcbZ durch die Aminosäuren D210, D345, E379 und D450 in der Domäne A gebildet (s. Tab. 4.1). Die Carbohydrat-

Bindedomänen sind vor den Pullulanasedomänen lokalisiert (CBDII: 598-678 aa, CBD IV: 604-729 aa, CBM6: 617-729 aa).

Tab. 4.1: Vergleich der konservierten Regionen der GH13 Familie mit ausgewählten Enzymen aus den *acb*- und *gac*-Genclustern.

Enzym		I	II	III	IV
Konsensus aa		DXXXNH •	GXRDXXZH	EZZ	XXBBHD ••
<i>Actionoplanes</i> sp. SE 50/100 (Y18523)	AcbZ	210 DIIVNH	341 GYRMDTVKH	379 EVFS	445 FLGNHD
	AcbE	134 DIVVNH	265 GYRLDTLKA	310 EVTS	371 GEWNHD
	AcbD	167 DWTPNG	252 GIRVDAVKH	285 EWYM	352 FLDNQD
<i>S. glaucescens</i> (AM409314)	GacZ1	180 DVITNH	303 GFRVDTAKN	342 EAFS	407 FLGSHD
	GacZ2	188 DVITNH	311 GFRVDTV RN	350 ETLS	415 FLGNHD
	GacE2	116 DTVINH	200 GFRIDAAKH	232 ETIG	290 FVTNHD
	GacE1	116 DVVPNH	220 GFRIDVAHG	284 EAWT	340 VLSNHD
<i>S. lividans</i> TK24 (CAA49759)	$\alpha$ -Amylase	145 DVITNH	275 GFRIDTVKH	313 EVYS	379 FLGNHD
<i>Aspergillus oryzae</i> TAKA-Amylase A (P0C1B3)	$\alpha$ -Amylase	117 DVVANH	202 GIRIDTVKH	230 EVLD	292 FVENHD
<i>B. circulans</i> (P43379)	CGTase	135 DFAPNH	225 GIRMDAVKH	257 EWFL	323 FIDNHD
<i>B. subtilis</i> (CAB14971)	Pullulanase	338 DVVFNH	404 GFRFDLLGI	461 EGWD	521 YVESH D

Die charakteristischen Aminosäuren der aktiven Zentren von Enzymen sind durch Fettdruck markiert. Abk.: X = hydrophobe Aminosäure, B = hydrophile Aminosäure, Z = wichtig für die Spezifität,  $\diamond$  = Substratbindestelle.

AcbE weist ebenfalls die charakteristischen Aminosäuren des aktiven Zentrums von Enzymen aus der Familie 13 der Glycosidhydrolasen in den konservierten Regionen I-IV auf (s. Tab. 4.1). Die  $\alpha$ -Amylase Domäne liegt dabei wiederum in der Domäne A und umfasst die Aminosäuren 47-508; eine weitere in der Domäne C 571-601 aa. Die zwei Pullulanasedomänen finden sich bei 707-813 aa und 814-917 aa.

Im Sequenzvergleich zeigt das Protein GacZ1 von *S. glaucescens* große Ähnlichkeit zu einer Pullulanase aus *S. avermitilis* MA-4680 (s. Tab. 1.2). Es wurde darin eine  $\alpha$ -Amylasedomäne identifiziert, die die Aminosäuren 64-463 umfasst und folgende theoretisch katalytisch aktiven Aminosäuren aufweist: D180, D308, E342 und D413. Des Weiteren finden sich eine  $\alpha$ -Amylase-C-Domäne (Position: 531-605 aa) sowie zwei Pullulanasedomänen mit folgenden Positionen: 819-916 aa und 721-814 aa. Ein Vergleich der konservierten Regionen I-IV der GH13 und GacZ1, zeigt Übereinstimmungen in den jeweiligen Sequenzen (Tab. 4.1).

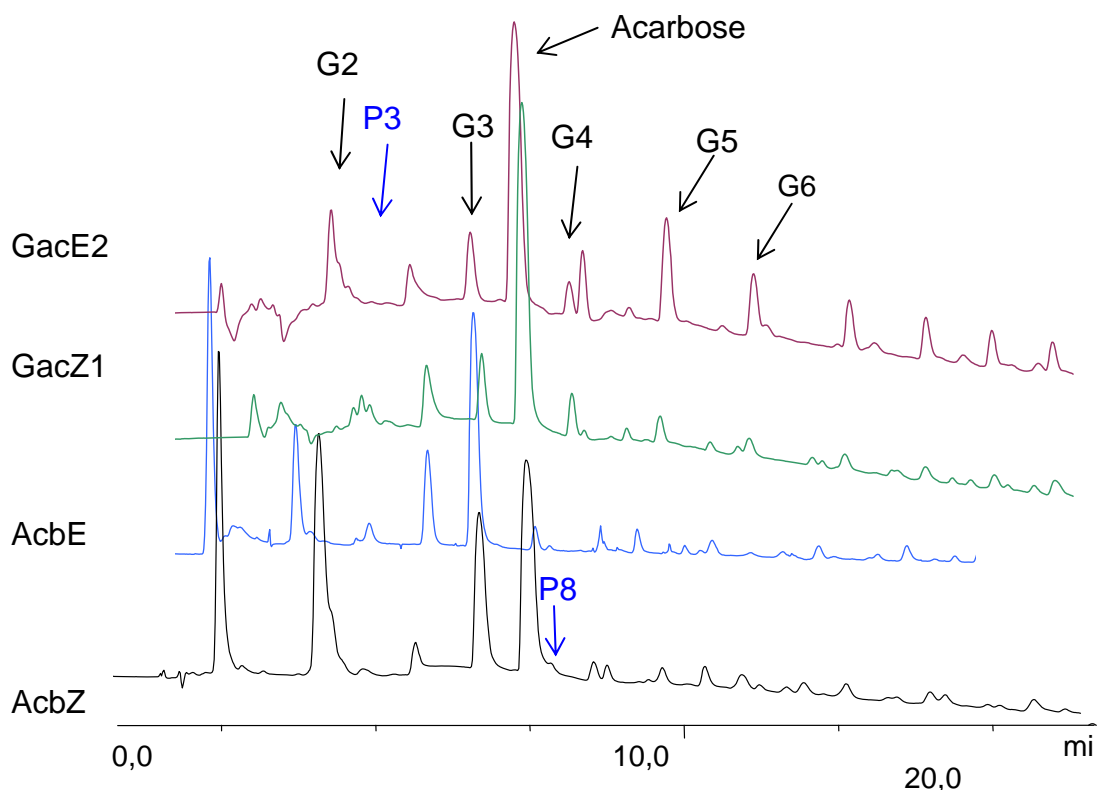
Das GacE2 Protein weist die größte Übereinstimmung zu einer  $\alpha$ -Amylase aus *S. venezuelae* P22998 auf (s. Tab. 1.2). Innerhalb der Aminosäuresequenz findet sich

eine  $\alpha$ -Amylasedomäne, die die Position von 35-371 aa einnimmt und durch die folgenden katalytischen Aminosäuren charakterisiert werden kann: D116, D205, D296 und E232. GacE2 kann daher ebenso aufgrund der konservierten Regionen I-IV den Glycosidhydrolasen der Familie 13 zugeordnet werden. Des Weiteren finden sich eine  $\alpha$ -Amylase-C-Domäne (Position 383-456 aa) und ein Carbohydrat-Bindemodul (CBM20) ab der Position 473-565 aa.

Die katalytischen Aktivitäten der Enzyme AcbE, AcbZ, GacZ1 und GacE2, wurden daher entsprechend der identifizierten Substratbindedomänen und der katalytischen Domänen, Stärke bzw. Pullulan zu spalten in dieser Arbeit eingehend untersucht. Erste Daten lagen bereits zu der  $\alpha$ -Amylase AcbE vor. Dabei zeigte sich, dass das AcbE Enzym als erste  $\alpha$ -Amylase Acarbose-insensitiv war (Stratmann, 1997). Allerdings wurden diese Untersuchungen nicht in einem  $\alpha$ -Amylase-defizienten Wirtstamm durchgeführt, sodass keine eindeutigen Daten bezüglich der  $\alpha$ -Amylaseaktivität von AcbE erhalten wurden. Auch stand damals keine Methode zur Verfügung, die für die Analysen ausreichend sensitiv war. Die Methode von Stratmann (1997) erwies sich auch als ungenügend reproduzierbar.

### 4.3 Die Enzymaktivitäten der extrazellulären, amylolytischen Enzyme der Acarbose-Produzentenstämme *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens*

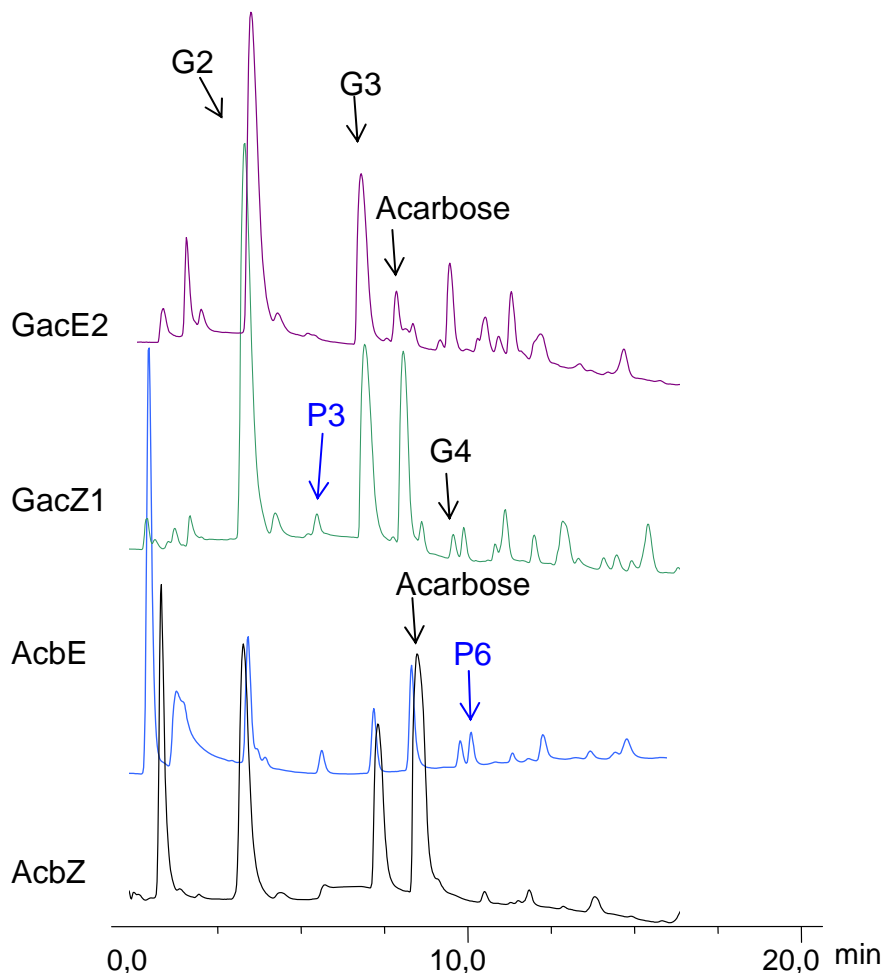
In dieser Arbeit konnten die Proteine AcbE und AcbZ von *Actinoplanes* sp. SE 50/110 eindeutig als Acarbose-resistente  $\alpha$ -Amylasen der Familie GH13 identifiziert werden. Die Hauptprodukte der Stärkespaltung durch die Enzyme waren dabei immer G2 und G3 (s. Abb. 4.1). Auch in Gegenwart von Acarbose waren die Enzyme grundsätzlich hydrolytisch aktiv.



**Abb. 61: Vergleich der HPLC-ECD-Analysen von AcbZ und AcbE von *Actinoplanes* sp. sowie GacZ1 und GacE2 von *S. glaucescens* mit Stärke als Substrat in Gegenwart von Acarbose.** (Abkürzungen s. Ergebnisse 3.1–3.2).

Bei den Analysen wurden neben den Hauptprodukten G2 und G3, die mit allen Enzymen erhalten wurden, weitere Maltooligosaccharide detektiert. Dabei wurden mit AcbZ folgende Abbauprodukte erhalten: P4 und P8. AcbE zeigte das Abbauprodukt P3. Dabei könnte es sich zum einen, um Produkte aus der einfachen Stärkehydrolyse handeln oder die Produkte resultierten aus einer Transglycosylierungsreaktion; möglicherweise handelte es sich dabei um Acarbose-Homologe oder -Derivate (s. Einleitung, Tab. 1.1). Die Übertragung eines oder mehrerer Glycosylreste eines Oligosaccharides auf ein weiteres Kohlenhydrat gilt als Umkehrreaktion der Glucosidasen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Legler, 1993). Es wird angenommen, dass die Hydrolyse und Transglycosylierung über eine nukleophile Reaktion zwischen dem anomeren C-Atom des Substrates und einem Nukleophil verlaufen. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass im Fall

der Hydrolyse das Reaktionsintermediat von einem aktivierten Wassermolekül und im Fall der Transglycosylierung das Intermediat von einem aktivierten Kohlenhydrat angegriffen wird. Transglycosylierungsreaktionen wurden für  $\alpha$ -Amylasen, Neopullulanasen,  $\alpha$ -Glucosidasen und Maltasen beschrieben (Suganum *et al.*, 1980; Usui *et al.*, 1993; Kuriki *et al.*, 1993; Duan *et al.*, 1993; Wang & Hartman, 1976). Die PPAll  $\alpha$ -Amylase ist in der Lage an dem Acarbosemolekül eine Transglycosylierungsreaktion durchzuführen; durch die Kristallisation des Enzyms in Gegenwart von Acarbose konnte gezeigt werden, dass auf das nichtreduzierende Ende der Acarviosyl-Einheit entweder ein Maltosemolekül oder ein Molekül der Komponente 2 (s. Einleitung, Tab. 1.1) übertragen wird (Gilles *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 1994). Auch das Substrat Pullulan wurde durch die Enzyme AcbZ und AcbE hydrolysiert. Die Hauptprodukte der Pullulanspaltung waren ebenfalls G2 und G3 (s. Abb. 4.2). Durch AcbE wurde zusätzlich aus Pullulan G4 freigesetzt, das sich als Doppelpeak mit P6 in der HPLC-ECD-Analyse darstellte. Auch konnte ein weiteres Produkt P3, ein mögliches Acarbose-Derivate, detektiert werden.



**Abb. 4.2:** Vergleich der HPLC-ECD-Analysen von AcbZ und AcbE von *Actinoplanes* sp. sowie GacZ1 und GacE2 von *S. glaucescens* mit Pullulan in Gegenwart von Acarbose. (Abkürzungen s. Ergebnisse 3.1–3.2).

Die  $\alpha$ -Amylasen von *Actinoplanes* sp. sind somit ebenso fähig  $\alpha$ -1,6-glycosidische Bindungen zu hydrolysieren und weisen somit Ähnlichkeit zu Pullulanasen vom Typ II auf, die sowohl  $\alpha$ -1,6- als auch  $\alpha$ -1,4-glycosidische Bindungen spalten können. Für weitere Analysen sollten die Hydrolyseprodukte durch die NMR- oder durch LC/MS-Methodik verifiziert werden, die im Verlauf dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen.

Die Hydrolyse von Stärke durch die Enzyme von *S. glaucescens* führte neben den Produkten G2 und G3 zusätzlich zu G4 und G5 sowie wahrscheinlich zu weiteren Oligosacchariden. Da keine Referenzsubstanzen vorlagen und die Möglichkeit zur LC/MS- bzw. NMR-Analytik nicht gegeben war, kann keine weitere Aussage über die entstandenen Produkte getroffen werden. Beim Vergleich der Hydrolyseprodukte von AcbZ und GacZ1 zeigte sich, dass bei dem Ansatz mit GacZ1 weniger G2 entstand bzw. dass der Peak wahrscheinlich ein Gemisch aus Disacchariden darstellte; während durch die Katalyse von AcbZ weniger G3 freigesetzt wurde. Es konnten auch weitere Produkte detektiert werden, wie z. B. P3. Dieser Peak konnte vor allem in den Ansätzen mit GacZ1 und GacE2 gemessen werden.

Wie erwartet wurde auch Pullulan durch die Enzyme GacZ1 und GacE2 hydrolysiert. Durch GacZ1 wurde zusätzlich G4 aus Pullulan erhalten; ähnlich wie bei den Ansätzen mit AcbE. In Tests mit GacE2 mit Pullulan und Acarbose war die Produktmenge von G2 verdoppelt und die von G3 sogar verdreifacht. Acarbose scheint somit die Aktivität von GacE2 zu verstärken. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass GacE2 in der Lage ist, Acarbose zu modifizieren, sodass G2 und G3 entstanden. Allerdings besitzt das Enzym keine bisher bekannte Acarviosyltransferaseaktivität (s. Ergebnisse 3.2). Das Auftauchen all dieser neuen Substanzpeaks wird vorläufig mit dem Entstehen zusätzlicher Acarbose-derivate interpretiert, deren Strukturanalyse noch aussteht.

Bisher konnte nicht geklärt werden, wie der Hemmmechanismus der Acarbose von den maltolytischen Enzymen der Produzenten überwunden wird. Es wurde vermutet, dass die Acarbose-Resistenz in der Substitution der hochkonservierten Histidinreste in den Regionen I und IV begründet ist. Möglicherweise wäre auch die Unempfindlichkeit von Pullulanasen gegenüber Acarbose so zu erklären, da z. B. die Pullulanase von *B. subtilis* in der Region II anstelle von Histidin Isoleucin (H412I) aufweist. In der Region II ist im AcbE Protein anstatt Histidin Alanin (H273A) zu finden; im AcbD Protein kommen in den Regionen I und IV Glycin und Glutamin anstelle von Histidin (H172G und H356Q) vor (s. Tab. 4.1). Der Austausch von Aminosäuren innerhalb der Sequenz führt zu einem Acarbose-sensitiven Enzym. Kristallisationsstudien von Amylasen mit dem Inhibitor Acarbose zeigten, dass die Acarviosyl-Einheit im aktiven Zentrum des Enzyms in den -1 und +1 *subsites* bindet (Davies *et al.*, 1997; Uitdehaag *et al.*, 1999; Leemhuis *et al.*, 2005); während die Acarviosyl-Einheit in der Acarviosyltransferase AcbD in den -2 und -1 *subsites* gebunden ist (Leemhuis *et al.*, 2004). Die AcbE-Sequenz weist in Region II als charakteristische Aminosäure eines aktiven Zentrums Alanin anstatt Histidin auf

(H273A). Eine Substitution von Histidin gegen Asparagin in Region II ist auch in den Sequenzen von GacZ1 (H311N) und GacZ2 (H319N) zu finden, in der Sequenz von GacE1 kommt in Region II Glycin statt Histidin (H228G) vor; dieser Austausch entspricht dem in der Sequenz von AcbD. Allerdings findet sich kein Austausch von Aminosäureresten bei den Proteinen AcbZ und GacE2, somit kann die Acarbose-Resistenz des Enzyms mit einem Aminosäureaustausch nicht eindeutig erklärt werden. Ob sich die Acarbose-Resistenz tatsächlich auf die beschriebenen Aminosäuren zurückführen lässt, kann erst durch gerichtete Mutationsstudien gezeigt werden. Andere Strukturelemente, z. B. in der Tertiärstruktur der Proteine, könnten ebenso für die Resistenz verantwortlich sein. Für die katalytische Aktivität spielt z. B. auch der Abstand zwischen den einzelnen katalytisch aktiven Aminosäuren eine wesentliche Rolle, ebenso für die korrekte Substrat-Positionierung und der damit verbundenen Aktivierung eines Wassermoleküls. Möglicherweise hat auch der Abstand zwischen den katalytischen Resten Einfluss auf die Acarbose-Resistenz der Enzyme; die Regionen I-IV von AcbZ und AcbE liegen 236 bzw. 237 aa auseinander, während die Regionen bei GacZ1/Z2 von 227 getrennt sind. Der Abstand der Regionen I-IV bei der  $\alpha$ -Amylase von *S. lividans* TK24 beträgt hingegen 234 aa. Die Geometrie im aktiven Zentrum könnte die Bindung und Aktivierung eines Wassermoleküls und somit die Hydrolyse in Gegenwart von Acarbose erklären. Vielleicht wird das aktive Zentrum der Enzyme von der Größe der B-Domäne beeinflusst, da diese eine mögliche Funktion bei der Substraterkennung und Bindung zeigt (Matsuura *et al.*, 1984; Buisson *et al.*, 1987) und so Einfluss auf die Aktivität in Gegenwart von Acarbose hat. Kristallisationsstudien mit den Proteinen der Acarboseproduzenten könnten dazu beitragen den Mechanismus der Inhibierung aufzuklären.

#### 4.4 Die intrazellulären, maltolytischen Enzyme der Acarbose-Produzentenstämme *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens*

##### 4.4.1 Die Acarbose-4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ von *Actinoplanes* sp.

Im Sequenzvergleich zeigt das Protein AcbQ große Ähnlichkeit zu einer 4- $\alpha$ -Glucanotransferase aus *S. avermitilis* MA-4680 (58% Identität/67% Ähnlichkeit) (s. Tab. 1.2) und nur geringe Ähnlichkeit zu der Amylomaltase MalQ aus *E. coli* (CAQ33737) (31% Identität/48% Ähnlichkeit). In der Proteinsequenz von AcbQ findet sich eine weitere Domäne der GH 77 Familie (Position: 153-687 aa), die den Amylomaltasen (EC 2.4.1.25) zu zuordnen ist, ebenso wie eine  $\alpha$ -Amylasedomäne (Position: 141-420 aa).

Im Allgemeinen sind 4- $\alpha$ -Glucanotransferasen in den Maltose- und Maltooligodextrin-Metabolismus Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien involviert. CGTasen konvertieren unter anderem durch eine intramolekulare Transglycosylierungsreaktion Stärke in Cyclodextrine und besitzen eher eine geringere hydrolytische Aktivität (Barends *et al.*, 2007). In z. B. *E. coli* ist unter anderem die Amylomaltase MalQ an der Metabolisierung von Maltooligodextrinen beteiligt (Boos & Shuhman, 1998). Die glycosidischen Bindungen von Maltodextrinen werden durch die katalytische Aktivität von MalQ gespalten und der reduzierende Anteil, z. B. Glucose, wird dabei frei. Der Dextrinylrest bildet mit dem MalQ Protein einen Übergangszustand durch glycosidische Bindungen in den *subsites* -1 und +1, der durch den Transfer auf ein nichtreduzierendes Ende eines Dextrinakzeptors, aufgelöst wird (s. Abb. 4.1). Das Modell des Maltosestoffwechsels des Gram-positiven *Corynebacterium glutamicum* postuliert ebenfalls eine 4- $\alpha$ -Glucanotransferase-Funktion. Durch die katalytische Reaktion der 4- $\alpha$ -Glucanotransferase MalQ aus *C. glutamicum* werden Maltodextrine als Zwischenprodukte der Maltose gebildet, die gleichzeitig auch das Ausgangssubstrat eines neuartigen Glycogenbiosyntheseweges darstellen (Seibold, 2007; Seibold *et al.*, 2007b; Seibold *et al.*, 2009). Dabei wird auf die Maltose ein, aus der Spaltung von Maltotriose hervorgegangener Maltosylrest,  $\alpha$ 1,4-glycosidisch übertragen, sodass Maltotetraose und ein freies Glucosemolekül entstehen. Maltotetraose kann wiederum als Substrat dienen; Glucose wird über Glucose-1-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt (Seibold *et al.*, 2007b). Es wurde des Weiteren gezeigt, dass eine 4- $\alpha$ -Glucanotransferase Mutante intrazelluläre Kohlenhydrate akkumuliert; MalQ stellt somit ein wesentliches Protein der Enzymausstattung von *C. glutamicum* zur effizienten Nutzung von Stärkeabbauprodukten dar (Seibold *et al.*, 2007b).

Es wurde postuliert, dass das AcbQ Protein an dem intrazellulären Abbau der phosphorylierten höheren Acarbose-Homologen nach deren Aufnahme durch das AcbGFH Importsystem, beteiligt ist (Stratmann 1997; Wehmeier *et al.*, 2004; Wehmeier & Piepersberg, 2004; Rockser & Wehmeier, 2009). Die Ergebnisse dieser



Arbeit zeigten, dass durch die katalytische Aktivität von AcbQ jeweils Maltose, Acarbose sowie das jeweilige höhere Maltooligosaccharid (G3-G6), befreit vom Acarviosylrest, auftrat (s. Abb. 3.27-3.28). Es wurden ebenso individuelle Peaks bei jedem Test detektiert, deren strukturelle Zuordnung allerdings nicht möglich war.

Die Befunde dieser Arbeit zeigten auch, dass durch die katalytische Reaktion von AcbQ auch Maltooligosaccharide hydrolysiert werden. Charakteristisch scheint dabei die Hydrolyse von langkettigen Maltooligosacchariden, wie z. B. Maltopentaose und Maltoheptaose zu sein. Auch hier wird als Hauptprodukt Maltose frei; G5 wird zu G2 und G3 gespalten, während G7 die Produkte G2, G3 und G4 lieferte (s. Abb. 3. 28). Weitere Messungen, in denen Tests mit verschiedenen Maltooligosacchariden als Substrate für AcbQ dienten, wurden ebenfalls analysiert, um Präferenzen für bestimmte Endprodukte festzustellen. Allerdings scheiterte die Auswertung der Tests an dem vielfältigen Produktspektrum, das die HPLC-ECD Methodik lieferte. Es bleibt weiterhin zu erwähnen, dass sich das Produktspektrum in Gegenwart von Acarbose wesentlich anders darstellte; eine Aussage über die erhaltenen Produkte konnte mit der HPLC-ECD Methode jedoch nicht erzielt werden.

*Actinoplanes* sp. ist durch die katalytische Aktivität von AcbQ in der Lage, die glycosidischen Bindungen der phosphorylierten höheren Acarbose-Homologen intrazellulär zu spalten, sodass Acarbose-7-Phosphat frei wird und entsprechend dem Carbophor-Modell, dem Zyklus erneut zum Export zur Verfügung steht. Mit dem Export des entladenen Carbophors beginnt ein neuer Acarbose-Kreislauf. Des Weiteren kommt es durch die Deglucosylierung der Homologen durch AcbQ zu einem Nettogewinn an Energie lieferndem Kohlenhydrat. Grundsätzlich wird Maltose als Produkt der katalytischen Reaktion von AcbQ gebildet; es könnte durch AcbQ aber ebenfalls zur Bildung von höheren Maltodextrinen durch eine Transferreaktion, vergleichbar der 4- $\alpha$ -Glucanotransferasereaktion von *C. glutamicum*, kommen. Die unidentifizierten Peaks, die aus dem Umsatz der Acarviosyl-Maltodextrine mit dem Enzym AcbQ resultierten, könnten dabei die neu gebildeten Maltodextrine darstellen, die effizienter abzubauen sind. Seibold *et al.* (2007b) zeigten, dass Maltodextrine, bestehend aus weniger als fünf Glucoseeinheiten nicht effizient durch die Maltodextrinphosphorylase aus *C. glutamicum* abgebaut werden konnten. Möglicherweise stellt AcbQ so längere Maltodextrine für die Amylomaltase MalQ aus *Actinoplanes* sp. bereit.

Die Befunde dieser Arbeit belegen jedenfalls, dass die Acarbose-4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ ein wesentliches Protein der Enzymausstattung von *Actinoplanes* sp. im Sinne des Carbophor-Modells darstellt.

#### 4.4.2 Die $\alpha$ -Glucosidase GacE1 von *S. glaucescens*

GacE1 ist aufgrund des fehlenden Signalpeptides intrazellulär lokalisiert und ein typischer Vertreter der  $\alpha$ -Glucosidasen. Im Sequenzvergleich zeigt das Protein GacE1 große Ähnlichkeit zu  $\alpha$ -Glucosidasen aus *S. avermitilis* MA-4680 (70% Identität/78% Ähnlichkeit) (s. Tab. 1.2) und *S. ghanaensis* (ATCC 14672) (73% Identität/80% Ähnlichkeit). Es finden sich in der Proteinsequenz zwei typische Motive für  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen, die zur Stabilisierung des Proteins dienen (Positionen: 38-47 und 408-420 aa) sowie eine  $\alpha$ -Amylasedomäne (Position: 31-416 aa). Im *acb*-Gencluster von *Actinoplanes* sp. codiert kein vergleichbares Gen für eine intrazelluläre  $\alpha$ -Glucosidase; die größte Ähnlichkeit zeigt GacE1 innerhalb des Gac-Acb-Proteinpools zu der extrazellulären  $\alpha$ -Amylase AcbE auf.

Es zeigte sich, dass durch GacE1 Stärke hydrolysiert wird und dass Acarbose keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hatte (s. Abb. 3.45). Es konnte ebenso eindeutig gezeigt werden, dass durch die Enzymaktivität von GacE1 die Maltooligosaccharide G3 und G7 hydrolysiert wurden. Maltotriose wurde zu Maltose und Glucose umgesetzt; bei der Spaltung von Maltoheptaose wurden Maltose und Maltotriose frei. Während die Funktion von extrazellulären Amylasen eindeutig in der Erschließung von C-Quellen durch den Abbau von Maltodextrinen und Stärke im Habitat besteht, ist die Rolle von cytoplasmatischen Amylasen im Zusammenspiel der intrazellulären Enzyme dahingegen weniger eindeutig geklärt. Als Substrate für intrazelluläre Amylasen sind prinzipiell Maltodextrine denkbar. Maltodextrine werden im Zuge des extrazellulären Polysaccharidabbaus gebildet und durch ein Transportsystem in die Zelle geschleust bzw. bei dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* gelangen Maltodextrine in hoher Konzentration auch über Maltoporine (LamB) ins Periplasma. Die periplasmatische Amylase z. B. von *E. coli* (MalS) spaltet Maltodextrine, die zu groß für den Transport über die innere Membran sind (Boos & Shuman, 1998). Im Zusammenspiel von MalP, MalQ und MalZ im Maltosestoffwechsel von *E. coli* ist die Anwesenheit eines endogenen Maltodextrin-Primers von mindestens drei Glucoseeinheiten als Induktor nötig. Die Aufgabe von intrazellulären  $\alpha$ -Amylasen könnte darin bestehen, bei dem ausschließlichen Wachstum auf Maltose, intrazellulär Maltotriose als Induktor zu generieren (Boos & Shuman, 1998). Brooker *et al.* (1997) zeigten, dass es bei dem Gram-positiven Bakterium *Streptococcus bovis* durch Inaktivierung der intrazellulären  $\alpha$ -Amylase zur Beeinträchtigung des Zellwachstums kam. Weitere intrazelluläre Amylasen kommen auch in *Salmonella typhimurium* (Raha *et al.*, 1992), *Streptococcus pneumoniae* und *S. salivarius* (Whitehead *et al.*, 1995) vor.

Die Bedeutung von GacE1 für *S. glaucescens* könnte in dem Abbau von Maltodextrinen bestehen, die durch GacQ analog zur Aktivität von AcbQ aus den höheren Acarbose-Homologen resultieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen daher nahe, dass *S. glaucescens* grundsätzlich durch die Enzymaktivität von GacE1 in der Lage ist, intrazellulär Maltodextrine in Gegenwart von Acarbose zu hydrolysieren.

#### 4.5 Die Bedeutung der Ergebnisse im Rahmen des bestehenden Modells zum Acarbosemetabolismus von *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens*

Das derzeitig favorisierte Modell zur Funktion von Acarbose-ähnlichen Metaboliten für ihre Produzenten besagt, dass die Metabolite neben der Rolle als Inhibitor von maltolytischen Enzymen und Maltodextrin-Transportsystemen von Nahrungskonkurrenten der Produzentenstämme *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens*, die Funktion eines Carbophors übernehmen (s. 1.5). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde haben dazu beigetragen, das postulierte Carbophor-Modell zu beweisen.

Beinahe die Hälfte aller Genprodukte des *acb*-Genclusters ist in den Metabolismus der Acarbose selbst, im Besonderen in deren Involvierung in den extrazellulären Stärkeabbau und Transport einbezogen (s. Abb. 1.3). Das Modell postuliert das Vorhandensein spezifischer extrazellulärer Enzyme, wie Acarbose-insensitive und –resistente  $\alpha$ -Glucosidasen, die auch in Gegenwart von Acarbose fähig sind, Stärke zu Maltodextrinen bzw. Maltose zu hydrolysieren. Im *acb*-Gencluster von *Actinoplanes* sp. SE50/110 konnten die Proteine AcbE und AcbZ sowie AcbQ eindeutig als Acarbose-resistente Enzyme der Familie 13 der Glycosidhydrolasen identifiziert werden (s. Tab. 1.2).

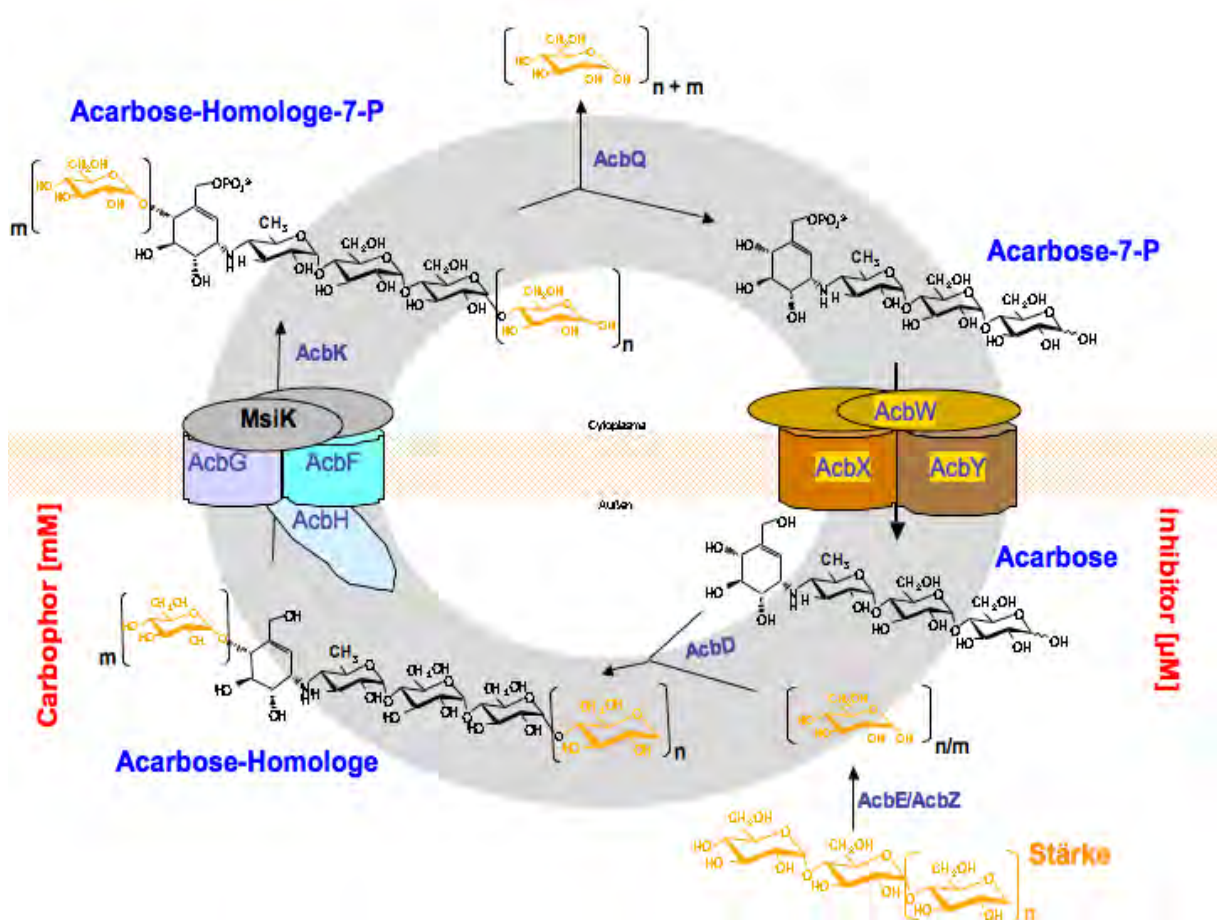


Abb. 4.4: Das Carbophor-Modell von *Actinoplanes* sp. SE50/110.

Der Acarbosekreislauf beginnt mit der intrazellulären Biosynthese von Acarbose-7-Phosphat und dem Transport über das ABC-Exportsystem AcbWXY in das umgebende Medium (s. Abb. 4.4); wahrscheinlich kommt es dabei zur Dephosphorylierung. Die Acarbose-resistenten extrazellulären  $\alpha$ -Amylasen AcbE und AcbZ dienen der Erschließung externer Kohlenstoffquellen, wie z. B. Stärke; während maltolytische Enzyme von Nahrungskonkurrenten im Habitat effektiv gehemmt sind.

Grundsätzlich stellen Acarbose, Acarbose-Homologe und deren Derivate Inhibitoren von Hydrolasen  $\alpha$ -1,4-glucosidischer Bindungen von Nahrungskonkurrenten dar. Ebenso effizient werden die Maltodextrinaufnahmesysteme blockiert. Wahrscheinlich ist dieses sogar der ökologisch wichtigere Effekt, da so die Nährstoffkonkurrenten an der Aufnahme der wichtigsten Kohlenstoffquelle gehindert werden. Dabei können Acarbose und die Homologen zwar über die äußere Membran, z. B. von *E. coli* transloziert werden, aber wirken im Periplasma durch Akkumulation, bedingt durch die hohe Affinität von MalE zu Acarbose, toxisch (Brunkhorst *et al.*, 2005). Das Wirkspektrum der Acarbose sowie der langkettigen Derivate betrifft intrazelluläre und extrazelluläre  $\alpha$ -Glucosidasen, ebenso wie  $\alpha$ -Amylasen verschiedener Pilze und Bakterien wie *Saccharomyces* sp. und *Bacillus subtilis* (Truscheit *et al.*, 1981; Müller, 1989). *Actinoplanes* sp. SE50/110 produziert etwa 2-3 g/l Acarbose, womit die Konzentration ca. 4 mM beträgt. Die Inhibierung der maltolytischen Enzyme und Maltose/Maltodextrin-Transportsysteme von Nahrungskonkurrenten verläuft bereits im mikromolaren Bereich. Die periplasmatische  $\alpha$ -Amylase MalS von *E. coli* ist gegenüber Acarbose ab einer Konzentration von 0,1 mM sensitiv (Brunkhorst, 2005) ebenso wie die  $\alpha$ -Amylase von *B. subtilis* (s. 3.1.1.3.1, diese Arbeit).

Die aus der Aktivität der Acarviosyltransferase AcbD resultierenden Acarbose-Homologe bilden die Substrate des Importsystems AcbHFG (s. Abb.4.4); dabei liegen die Affinitäten der ATase und des Bindeproteins AcbH zu den Substraten im millimolaren Konzentrationsbereich ( $K_m \approx 1\text{mM}$ ); während die ermittelte Affinitätskonstante für die Acarbose-resistenten  $\alpha$ -Amylasen im Vergleich bei relativ hohen  $K_D$ -Werten von etwa 30  $\mu\text{M}$  liegt.

Nach dem Import der Acarbose bzw. der höheren Homologen werden diese in Position C7 durch die Kinase AcbK rephosphoryliert (Rockser & Wehmeier, 2009); Acarbose-7-Phosphat besitzt keine enzymhemmende Wirkung, sodass intrazellulär aktive Hydrolasen geschützt bleiben (Drepper & Pape, 1996; Goetze *et al.*, 1996; Drepper, 1997). Nach einer Deglucosylierung der Acarbose-Homologen durch die 4- $\alpha$ -Glucanotransferase AcbQ beginnt mit dem Export des entladenen Carbophors ein neuer Acarbosekreislauf. Dabei kommt es durch die Deglucosylierung, bei der vor allem Maltose entsteht, zu einem Nettogewinn an Energie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Modell letztendlich durch weitere Daten, bezüglich der Acarbose-resistenten  $\alpha$ -Amylasen und durch den intrazellulären Abbau der Acarbose-Homologen durch AcbQ unterstützt.

Aufgrund des Genbestandes im *gac*-Gencluster verläuft der Acarbosemetabolismus bei *S. glaucescens* wahrscheinlich analog zu dem von *Actinoplanes* sp.. Im *gac*-Gencluster von *S. glaucescens* GLA.O konnten die Proteine GacZ1, GacE1 und GacE2 eindeutig als Acarbose-resistente Enzyme der Familie 13 der Glycosidhydrolasen identifiziert werden (s. Abb. 4.5).

Die  $\alpha$ -Glucosidase GacE1 ist hingegen an der intrazellulären Erschließung von Maltooligosacchariden beteiligt. Während sich möglicherweise die Aktivität der 4- $\alpha$ -Glucanotransferase GacQ auf die Acarbose-Homologen und die bisher unbekanntes Acarbosederivate beschränkt, könnte die  $\alpha$ -Glucosidase GacE1 generell an der intrazellulären Hydrolyse von gewöhnlichen Maltodextrinen in Gegenwart von Acarbose beteiligt sein.

*S. glaucescens* besitzt im Vergleich zu *Actinoplanes* sp. eine umfangreichere Enzymausstattung; so gibt es eine zusätzliche extrazelluläre  $\alpha$ -Amylase GacE2 sowie eine intrazelluläre  $\alpha$ -Glucosidase GacE1. Allerdings wird kein Genprodukt analog zu der Acarviosyltransferase AcbD vom *gac*-Gencluster codiert. Das bindenproteinabhängige ABC-Importsystem GacFGH zeigt hingegen eher Ähnlichkeit zu einem Maltose-/Maltodextrinaufnahmesystem von *Streptomyces* sp. als zu *Actinoplanes* sp. (s. Tab. 1.2). Neuste Erkenntnisse identifizierten GacH eindeutig als Maltose-/Maltodextrin-Bindenprotein, mit der Fähigkeit zur Bindung von Komponente 5C (s. Tab. 1.1) (Licht *et al.*, unveröffentlicht), die bereits im Überstand von *S. glaucescens* GLA.O nachgewiesen werden konnte (Rockser & Wehmeier, 2009). Des Weiteren belegen erste Analysen des GacH Bindenproteins, eine geringe Affinität zu Acarbose; diese Ergebnisse stützen den Befund, dass es sich bei GacFGH um ein Acarbose-resistentes Maltose-/Maltodextrinimportersystem handelt (Rockser & Wehmeier). Auch scheint sich das Produktspektrum von *S. glaucescens* anders zusammensetzen; Acarbose konnte erst zu einer späteren Wachstumsphase, in geringen Mengen detektiert werden, während schon frühzeitig Acarbose-Homologe und Derivate gemessen wurden (Rockser & Wehmeier, 2009). Eventuell ist das im Vergleich zu *Actinoplanes* sp. unterschiedliche Produktspektrum von *S. glaucescens* darauf zurückzuführen, dass es durch die multifunktionalen extrazellulären Enzyme GacE2, GacZ1 und/oder GacZ2 zur Synthese von unterschiedlichen Acarbosederivaten kommt. Wahrscheinlich stellt Acarbose im Sekundärmetabolit-spektrum von *S. glaucescens* nicht das Hauptendprodukt dar. *S. glaucescens* GLA.O gelangt im Vergleich zu *Actinoplanes* sp., wesentlich schneller in die stationären Wachstumsphase; die bisher unbekanntes Acarbosederivate und Homologen von *S. glaucescens* GLA.O könnten es durch ein ausgedehntes physiologisches Hemmspektrum der Exoenzyme von Nahrungskonkurrenten für den Produzenten möglich machen, weitere Nischen im Habitat zu besetzen (Rockser & Wehmeier, 2009).

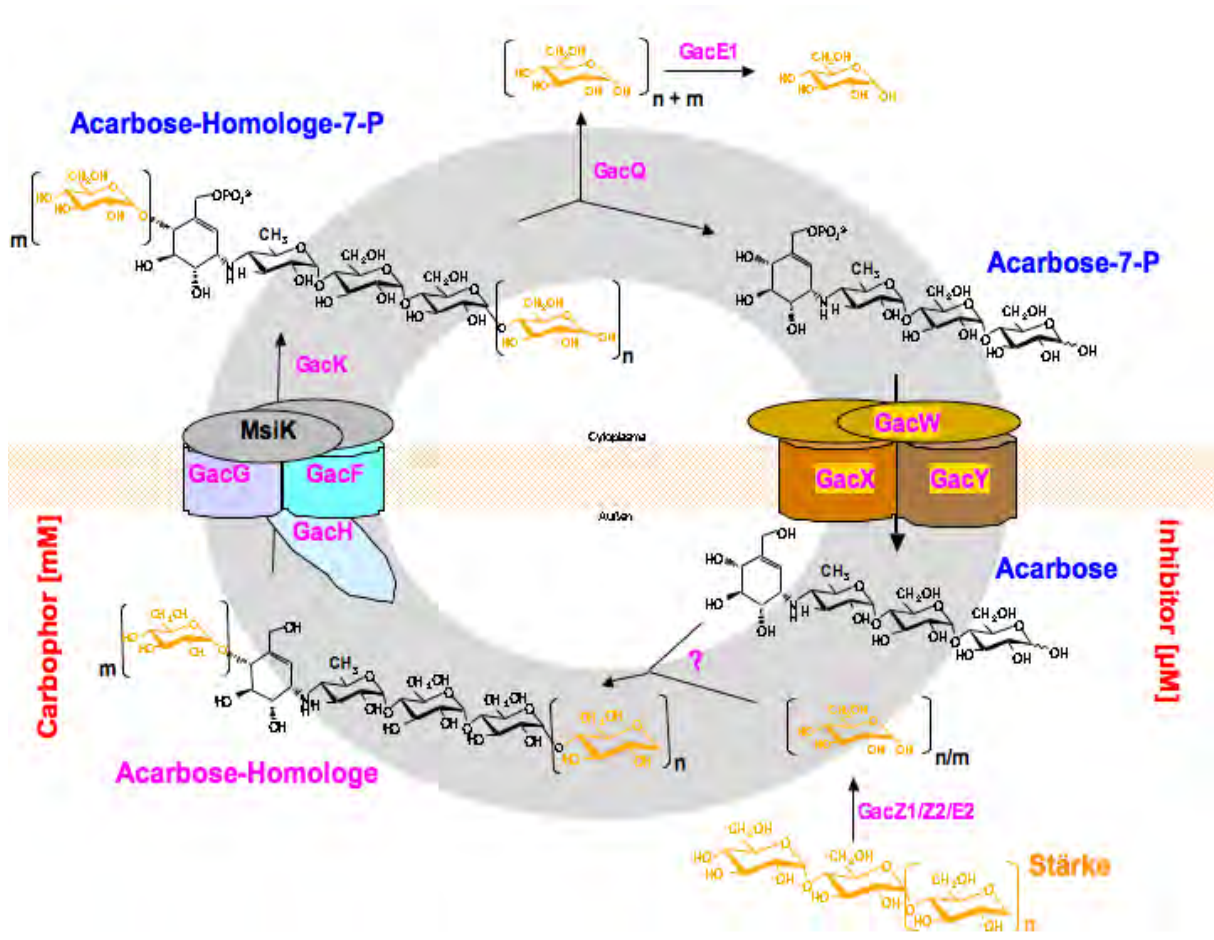


Abb. 4.5: Das Carbophor-Modell von *S. glaucescens* GLA.O.

*Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens* sind beide befähigt Acarbose als Carbophor zu nutzen. Die erhaltenen Befunde, dass die Freisetzung von Maltooligosacchariden aus Stärke bzw. Pullulan und Maltodextrinen durch die extrazellulären und intrazellulären Acarbose-resistenten maltolytischen Enzyme katalysiert wird, bestätigen eindeutig das Carbophor-Modell. Die Bedeutung der Acarbose für die Produzentenstämme beruht aber wahrscheinlich in dem ausgedehnten physiologischen Hemmspektrum der Acarbose, das die Inhibierung von Exoenzymen und den Wachstumsstatus ganzer Zellen von konkurrierenden Mikroorganismen umfasst (Stratmann, 1997; Hemker *et al.*, 2001; Wehmeier, 2003; Wehmeier & Piepersberg, 2004; Brunkhorst, 2004). Möglicherweise sprechen die Befunde zu den Konzentrationsbereichen dafür, dass die niedrigen Affinitäten der Enzyme aus *Actinoplanes* sp. (Hemker *et al.*, 2001; Leemhuis *et al.*, 2004; Brunkhorst *et al.*, 2005) und *S. glaucescens* tatsächlich physiologisch sind und die Aufnahme des Carbophors gegenüber der Hemmwirkung im Habitat nur sekundär ist. Wahrscheinlich kommt es über das Carbophor zu einem Recycling der Pseudooligosaccharide, sodass die Energie von überschüssig exportierten Molekülen dem Produzentenstamm wieder zugeführt werden kann. Somit fungiert

Acarbose in erster Linie als Inhibitor und erst dann, wenn der Sekundärmetabolit in hoher Konzentration in der Umgebung vorliegt, übernimmt Acarbose die Carbophor-Funktion.

Analog dem Mechanismus des *quorum sensing* könnten die Acarboseproduzenten so die Populationsdichte der Nahrungskonkurrenten im Habitat erkennen (Piepersberg, 1992, 1993, 2002; Schauder & Bassler, 2001).

Möglicherweise unterliegt das Carbophor einer Regulation, sodass es zu keiner unspezifischen Genexpression kommt. Für die Gene *acbE* und *acbD* (Stratmann, 1997) sowie für das Gen *acbH*, welches für das Bindeprotein codiert, ist eine Induktion durch Maltose bzw. Maltotriose und darüber hinaus insbesondere durch Acarbose nachgewiesen worden (Brunkhorst, 2005). Durch die extrazellulären Enzyme AcbE und AcbD sowie das Bindeprotein AcbH kommt es zum Re-Import der Acarbose und der Homologen. Ausgelöst durch die Induktion von Maltose bzw. Maltotriose, die Saccharide resultieren dabei aus der maltolytischen Enzymaktivität von Nahrungskonkurrenten im Habitat, käme es zur erhöhten Produktion und Sekretion von Acarbose. Es konnte ebenso eine Korrelation zwischen der Acarboseproduktion und der Wachstumsrate bei *Actinoplanes* sp. festgestellt werden (Daten unveröffentlicht).

## 5. Ausblick

Die Entdeckung neuer Substanzen, mit möglicher  $\alpha$ -Glucosidaseinhibitorfunktion ist, in Hinblick auf die Entwicklung von Diabetes mellitus Typ-2 zur Volkskrankheit, von wesentlichem biotechnologischen Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch enzymatische Synthese die Produktion spezifischer Acarbose-Homologer *in vitro* möglich ist. Die Verbesserung etablierter Wirkstoffe durch Modifikationen wäre dabei anzustreben. So wurde von Park *et al.* (1998) gezeigt, dass Acarviosin-Glucose (am reduzierenden Ende der Acarbose fehlt eine Glucoseeinheit) 430-fach stärker inhibierend auf eine  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe wirkt als Acarbose selbst; durch den Austausch von Maltose durch Isomaltose wurde die PAAI  $\alpha$ -Amylase des Schweines 15-fach stärker inhibiert. Durch weitere Modifikationen ist es möglich, das Wirkspektrum der Acarbose zu erweitern. Lee *et al.* (2001) zeigten, dass durch den Austausch der Maltoseeinheit der Acarbose durch Cellobiose und Lactose  $\beta$ -Glucosidasen und  $\beta$ -Galactosidasen inhibiert wurden, die zuvor nicht durch Acarbose beeinflusst wurden.



---

**Literaturverzeichnis**

- Asano N, Takeuchi M, Kameda Y, Matsui K, Kono Y (1990). Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. *J Antibiot.* (Tokyo). 43(6): 722-6.
- Babcock, MJ, KE Kendrick (1988). Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 170: 2802–2808
- Bai L, Li L, Xu H, Minagawa K, Yu Y, Zhang Y, Zhou X, Floss HG, Mahmud T, Deng Z. (2006). Functional analysis of the validamycin biosynthetic gene cluster and engineered production of validoxylamine A. *Chem Biol.* 13(4): 387-97.
- Ball SG, Morell MK (2003). From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 207-33.
- Bardone MR, Paternoster M, Coronelli C. (1978). Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. II. Extraction and chemical characterization. *J Antibiot.* (Tokyo). 31(3): 170-7.
- Barends TR, Bultema JB, Kaper T, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. (2007). Three-way stabilization of the covalent intermediate in amylomaltase, an alpha-amylase-like transglycosylase. *J Biol Chem.* 282(23): 17242-9.
- Beier L, Svendsen A, Andersen C, Frandsen TP, Borchert TV, Cherry JR. (2000) Conversion of the maltogenic alpha-amylase Novamyl into a CGTase. *Protein Eng.* 13, 509- 513.
- Bender H, Lehmann J, Wallenfels K. (1959). Pullulan, an extracellular glucan from *Pullularia pullulans*. *Biochim Biophys Acta.* 36: 309-16.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417(6885): 141-7.
- Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH. (1988). Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science.* 240(4855): 1041-3.
- Bischoff H. (1994). Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *Eur J Clin Invest.* 24 Suppl 3: 3-10.
- Boos W, Shuman H. (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(1):204-29.
- Bourn WR, Babb B. (1995). Computer assisted identification and classification of streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 23(18): 3696-703.
- Brayer GD, Sidhu G, Maurus R, Rydberg EH, Braun C, Wang Y, Nguyen NT, Overall CM, Withers SG. (2000). Subsite mapping of the human pancreatic alpha-amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques. *Biochemistry.* 39(16): 4778-91.



- Brunkhorst C, Andersen C, Schneider E. (1999). Acarbose, a pseudooligosaccharide, is transported but not metabolized by the maltose-maltodextrin system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 181(8): 2612-9.
- Brunkhorst C, Schneider E. (2005). Characterization of maltose and maltotriose transport in the acarbose-producing bacterium *Actinoplanes* sp.. *Res Microbiol.* 156(8): 851-7.
- Brzozowski AM, Davies GJ. (1997). Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry.* 36(36): 10837-45.
- Buisson G, Duée E, Haser R, Payan F. (1987). Three-dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J.* 6(13):3909-16.
- Catley BJ. (1980). Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans*. *Appl Environ Microbiol.* 39(4): 923–925.
- Chater KF, Merrick MJ. (1979). Streptomycetes. In: *Developmental Biology of Prokaryotes*. Ed.: J.H. Parish. 93–114, Blackwell Scientific Publications
- Coutinho PM, Henrissat B. (1999). Life with no sugars? *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1(2): 307-8.
- Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch D. (1999). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398, 701-704.
- Dauter Z, Dauter M, Brzozowski AM, Christensen S, Borchert TV, Beier L, Wilson KS, Davies GJ. (1999). X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Biochemistry.* 38(26): 8385-92.
- Davies *et al.*, 1997; Uitdehaag *et al.*, 1999; Leemhuis *et al.*, 2005; Leemhuis *et al.*, 2004
- Davies GJ, Wilson KS. (1999). Trapped in the act of catalysis. *Nat Struct Biol.* 6(5): 406-8.
- de Marco A, Vigh L, Diamant S, Goloubinoff P. (2005). Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones.* 10(4): 329-39.
- Decker H. (1996). Isolation of the biosynthesis genes for pseudooligosaccharides from *Streptomyces glaucescens* GLA.0 and their use. *Int. patent no.* WO 97/47748 (Hoechst AG)
- Dharmalingam K, Cullum J. (1996). Genetic instability in *Streptomyces*. *J. Biosci.* 21: 433-444.
- Diaz-Guardamino PM. (2000). 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.
- Dong H, Mahmud T, Tornus I, Lee S, Floss HG. (2000). Biosynthesis of the validamycins: identification of intermediates in the biosynthesis of validamycin A by *Streptomyces hygrosopicus* var. *limoneus*. *J Am Chem Soc.* 123(12): 2733-42.

- Drepper A, Pape H. (1996). Acarbose 7-phosphotransferase from *Actinoplanes* sp.: purification, properties, and possible physiological function. *J Antibiot* (Tokyo). 49(7): 664-8.
- Embley TM, Stackebrandt E. (1994). The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu Rev Microbiol.* 48:257-89.
- Enquist LW, Bradley SG. (1971). Characterization of deoxyribonucleotide acid from *Streptomyces venezuelae* species. *Develop. Ind. Microbiol.* 12: 225-236.
- Farina G, Bradley SG. (1970). Reassociation of deoxyribonucleic acids from *Actinoplanes* and other actinomycetes. *J Bacteriol.* 102(1): 30-5.
- Fenton WA, Horwich AL. (2003). Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide. *Q Rev Biophys.* 36(2):229-56.
- Frommer W, Junge B, Müller L, Schmidt D und Truscheit I (1979). Neue Enzyminhibitoren aus Mikroorganismen. *J. Med. Plant Res.* 35: 195-217.
- Geng P, Bai G. (2007). Two novel aminooligosaccharides isolated from the culture of *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 as potent inhibitors of  $\alpha$ -amylase. *Carbohydr Res.* 343(3): 470-6.
- Gerber NN, Lechevalier HA. (1965). Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl Microbiol.* 13(6): 935-8.
- Gilbert M, Morosoli R, Shareck F, Kluepfel D. (1995) Production and secretion of proteins by Streptomyces. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15, 13-39.
- Gilles C, Astier JP, Marchis-Mouren G, Cambillau C, Payan F. (1996). Crystal structure of pig pancreatic  $\alpha$ -amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose. *Eur J Biochem.* 238(2): 561-9.
- Goeke K, Drepper A, Pape H. (1996). Formation of acarbose phosphate by a cell-free extract from the acarbose producer *Actinoplanes* sp. *J Antibiot* (Tokyo). 49(7): 661-3.
- Goloubinoff P, Gatenby AA, Lorimer GH. (1989). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature.* 337(6202):44-7.
- Habermehl GG, Hammann PE, Krebs HC, Ternes W. (2008). *Naturstoffchemie: Eine Einführung.* Springer, Berlin; Auflage: 3.
- Haeder S, Wirth R, Herz H, Spiteller D. (2009). Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(12): 4742-6.
- Hemker M, 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(15): 4484-92.

- Hockney RC. (1994). Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 12(11):456-63.
- Hofmann K, Wood SW, Brinton CC, Montibeller JA, Finn FM (1980). Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77(8): 4666-8.
- Hütter R. (1967). Classification of the streptomycetes with special regard to the antibiotics formed from them. *Bibl Microbiol.* 6: 1-382.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol.* 21(5): 526-31.
- Iwasa T, Yamamoto H, Shibata M. (1970). Studies on validamycins, new antibiotics. I. *Streptomyces hygrosopicus* var. *limoneus* nov. var., validamycin-producing organism. *J Antibiot* (Tokyo). 23(12): 595-602.
- Janecek S, Bateman A. (1996). The parallel ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-barrel: perhaps the most universal and the most puzzling protein folding motif. *Biologia (Bratislava)* 51: 613.
- Janecek S, Svensson B, Henrissat B. (1997). Domain evolution in the alpha-amylase family. *J Mol Evol.* 45(3): 322-31.
- Jones D, Metzger HJ, Schatz A, Waksman SA. (1944). Control of gram-negative bacteria in experimental animals by streptomycin. *Science.* 100(2588): 103-105.
- Junge E, Boeshagen H, Stoltefuss J, Mueller L. (1980). Derivatives of acarbose *Enzyme Inhibitors* Verlag Chemie, Weinheim, pp.139-151.
- Kagawa M, Fujimoto Z, Momma M, Takase K, Mizuno H. (2003). Crystal structure of *Bacillus subtilis* alpha-amylase in complex with acarbose. *J Bacteriol.* 185(23): 6981-4.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. *The John Innes Foundation, John Innes Centre, Norwich, UK*
- Knegtel RM, Strokopytov B, Penninga D, Faber OG, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. (1995). Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products. *J Biol Chem.* 270(49):29256-64.
- Kolstø AB. (1997). Dynamic bacterial genome organization. *Mol Microbiol.* 24(2): 241-8.
- Kopetzki E, Schumacher G, Buckel P. (1989). Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol Gen Genet.* 216(1): 149-55.
- Kuriki T, Imanaka T. (1999). The concept of the alpha-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J Biosci Bioeng.* 87(5): 557-65.
- Leblond P, Decaris B. (1994). New insights into the genetic instability of streptomyces. *FEMS Microbiol Lett.* 123(3): 225-32.

- Lechevalier HA, Lechevalier MP (1970). The Actinomycetales. Jena, Veb G. Fisher. pp.: 393-405.
- Lee S, 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, 2: 225-227.
- Lee S, Sauerbrei B, Niggemann J and Egelkrou E (1997). Biosynthetic studies on the alpha-glucosidase inhibitor acarbose in *Actinoplanes* sp.: source of the maltose unit. *J. Antibiot.* (Tokyo) 50: 954-960.
- Leemhuis H, Wehmeier UF, Dijkhuizen L. (2004). A single mutation switches the reaction specificities of cyclodextrin glycosyltransferase and the acarbose modifying enzyme acarviosyl transferase. *Biochemistry* 43, 13204–13213.
- Legler G. (1995). Mechanism of enzymic glycoside hydrolysis and of glycosyl transfer by glycosidases and glycosyltransferases. *Carbohydr Res.* 250(1):vii-xx.
- Lezhava A, Mizukami T, Kajitani T, Kameoka D, Redenbach M, Shinkawa H, Nimi O, Kinashi H. (1995). Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 177(22):6492-8.
- Lin Z, Rye HS. (2006). GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 41(4): 211-39.
- Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW. (1994). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol.* 14(5): 1103.
- Lüllmann H, Wehling M, Mohr K. (2006). Pharmakologie und Toxikologie Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen; 16. Aufl.
- MacGregor EA, Janecek S, Svensson B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1546(1): 1-20.
- Machius M, Vértesy L, Huber R, Wiegand G. (1996). Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic alpha-amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. *J Mol Biol.* 260(3): 409-21.
- Madan D, Lin Z, Rye HS. (2008). Triggering protein folding within the GroEL-GroES complex. *J Biol Chem.* 283(46): 32003-13.
- Mahmud T, Flatt PM, Wu X. (2007). Biosynthesis of unusual aminocyclitol-containing natural products. *J Nat Prod.* 70(8): 1384-91.
- Mahmud T, Lee S, Floss HG. (2001). The biosynthesis of acarbose and validamycin. *Chem Rec.* 1(4): 300-10.
- Malpartida F, Hopwood DA. (1984). Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Biotechnology.* 24: 342-3.
- Martín MF, Liras P. (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol.* 43:173-206.

- Matsui I, Svensson B. (1997). Improved activity and modulated action pattern obtained by random mutagenesis at the fourth beta-alpha loop involved in substrate binding to the catalytic (beta/alpha)<sub>8</sub>-barrel domain of barley alpha-amylase. *J Biol Chem.* 272(36): 22456-63.
- Matsuura Y, Kusunoki M, Harada W, Kakudo M. (1984). Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem.* 95(3): 697-702.
- McCarter JD, Withers SG. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol.* 4(6):885-92.
- Mehling A, Wehmeier UF, Piepersberg W. (1995). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS Microbiol Lett.* 128(2): 119-25.
- Mehling A, Wehmeier UF, Piepersberg W. (1995). Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. *Microbiology.* 141(Pt 9): 2139-47.
- Minagawa K, Zhang Y, Ito T, Bai L, Deng Z, Mahmud T. (2007). ValC, a new type of C7-Cyclitol kinase involved in the biosynthesis of the antifungal agent validamycin A. *Chembiochem.* 8(6):632-41.
- Moreau A, Duez C, Dusart J. (1994). Improvement of GC-rich template amplification by inverse PCR. *Biotechniques.* 17(2): 232-4.
- Morosoli R, Shareck F, Kluepfel D. (1997). Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett.* 146(2):167-74.
- Müller L (1986). Microbial glucosidase inhibitors. *Microbial Products II*, Pape H, Rehm HJ (ed). Verlag Chemie, Weinheim. *Biotechnology*, 4: 531-567.
- Müller L, Junge B, Frommer W, Schmidt DD and Truscheit E (1980). Acarbose (Bayg5421) and homologous  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *actinoplanaceae*. In Brodbeck, U. (ed). Enzyme inhibitors, Verlag Chemie, Weinheim.
- Murao S, Ohyama K. (1975). New amylase inhibitor (S-AI) from *Streptomyces diastaticus* var. *amylostaticus* No 2476. *Agri Biol. Chem.* 39: 2271-2273.
- Musialowski MS, Flett F, Scott GB, Hobbs G, Smith CP, Oliver SG. (1994). Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the dnaA-gyrB region. *J Bacteriol.* 176: 5123–5125.
- Nahoum V, Roux G, Anton V, Rougé P, Puigserver A, Bischoff H, Henrissat B, Payan F. (2000). Crystal structures of human pancreatic alpha-amylase in complex with carbohydrate and proteinaceous inhibitors. *Biochem J.* 15; 346 Pt 1:201-8.
- Namiki S, Kangouri K, Nagate T, Hara H, Sugita K, Omura S (1982a). Studies on the alpha-glucoside 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-inhibitor adiposin. I. isolation and physicochemical properties. *J. Antibiot.* 35: 1234-1236.

- Ohnishi, Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 190, 4050–4060.
- Olis PO, Lee SC (1993). Recent advances in heterologous gene expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 520-525.
- Omoto S, Itoh J, Ogino H, Iwamatsu K, Nishizawa N, Inouye S. (1981). Oligostatins, new antibiotics with amylase inhibitory activity, II. Structures of oligostatins C, D, and E. *J Antibiot* (Tokyo) 34(11): 1429-33.
- Ono K, Smith EE. (1986). Purification of glucoamylase by acarbose (BAY g-5421) affinity chromatography. *Biotechnol Appl Biochem.* 8(2-3): 201-9.
- Oslancova A, Janecek S. (2002). Oligo-1,6-glucosidase and neopullulanase enzyme subfamilies from the alpha-amylase family defined by the fifth conserved sequence region. *Cell Mol Life Sci.* 59(11): 1945-59.
- Page N, Kluepfel D, Shareck F, Morosoli R. (1996). Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: dependence on number of ribosome-binding sites. *Nat Biotechnol.* 14(6): 756-9.
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135-152.
- Panzda, K., Pfalzer, G., Cullum, J. and Hranuelli, D. (1997). Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiology* 143, 1493-1501
- Parenti F, Coronelli C (1979). Members of the genus Actinoplanes and their antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 33, 389–411.
- Park SY, Kim HK, Yoo SK, Oh TK, Lee JK (2000). Characterization of *glk*, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 188:209-215.
- Piepersberg W, Diaz-Guardamino PM, Stratmann A, Thomas H, Wehmeier UF, Zhang CS. (2002). Recent developments in the biosynthesis and regulation of aminoglycosides. In: Fierro, F., Martín, J.F. (Eds.), *Microbial Secondary Metabolites: Biosynthesis, Genetics and Regulation*. Research Signpost, Kerala, pp. 1–26.
- Piepersberg W, Distler J. (1997). Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In: *Biotechnology*, Rehm HJ, Reed G (ed), second, completely revised edition, Vol. 17. Verlag Chemie, Weinheim, pp.: 397-488.
- Piepersberg W. (1993). *Streptomyces* and *Corynebacteria*. In: *Biotechnology*, Rehm H, Reed G, Pühler A, Stadler P (ed). VCH, Weinheim, pp.: 434-468.
- Piepersberg W. (1997). Molecular biology, biochemistry, and fermentation of aminoglycoside antibiotics (Ch. 4). In: *Biotechnology of industrial antibiotics* (2nd Ed.), Strohl WR (ed). Marcel-Dekker Inc., New York, pp.: 81-163.
- Pöhling S, Piepersberg W, Wehmeier UF. (1997). Protein secretion in *Streptomyces griseus* N2-3-11: characterization of the *secA* gene and its growth phase-dependent expression. *FEMS Microbiol Lett.* 156(1): 21-9.
- P. Präve P, Faust U, Sittig W, Sukatsch AD (1994). *Handbuch der Biotechnologie*, 4. Aufl. Oldenbourg Verlag

- Pugsley AP. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 57(1): 50-108.
- Puls W, Keup U. (1973). Influence of an  $\alpha$ -amylase inhibitor (BAY d 7791) on blood glucose, serum insulin and NEFA in starch loading tests in rats, dogs and man. *Diabetologia.* 9(2): 97-101.
- Qian M, Haser R, Buisson G, Duee E, Payan F (1994). The active center of a mammalian  $\alpha$ -amylase. Structure of the complex of a pancreatic  $\alpha$ -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 33: 6284-6294
- Raasch C. (20019). Molekulare, biochemische und strukturelle Untersuchungen an amylolytischen Enzymen von *Thermotoga maritima* MSB8. Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Raha M, Kawagishi I, Muller V, Kihara M, Macnab RM. (1992). *Escherichia coli* produces a cytoplasmic alpha-amylase, AmyA. *J Bacteriol.* 174: 6644-52.
- Rambelli F, Brigotti M, Zamboni M, Denaro M, Montanaro L, Sperti S (1989). Effect of the antibiotic purpurosmycin on cell-free protein-synthesizing systems. *Biochem. J.* 259: 307–310.
- Rauenbusch E, Schmidt D. (1978). Verfahren zur Isolierung von (O{4,6-Dideoxy-4[1s-(1,4,6/5)-4,5,6-trihydroxy-3-hydroxymethyl-2-cyclohexen-1-yl]-amino- $\alpha$ -D-glucopyranosyl}-(1→4)-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1→4)-D-Glukopyranose) aus Kulturbrühen. Deutsches Patent DE 2719912 (Process for isolating glucopyranose compound from culture broths; US patent 4,174,439).
- Redenbach M, Flett F, Piendl W, Glocker I, Rauland U, Wafzig O, Kliem R, Leblond P, Cullum J. (1993). The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions. *Mol Gen Genet.* 241(3-4): 255-62.
- Redenbach M, Kieser HM, Denapaitte 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 (1): 77-96
- Rockser Y, Wehmeier UF. (2009). The gac-gene cluster for the production of acarbose from *Streptomyces glaucescens* GLA.O: identification, isolation and characterization. *J Biotechnol.* 140(1-2): 114-23. Epub 2008 Nov 18.
- Schauder S, Bassler BL. (2001). The languages of bacteria. *Genes Dev.* 15(12): 1468-80.
- Schedel M. (2006). Weiße Biotechnologie bei Bayer HealthCare Product Supply: Mehr als 30 Jahre Erfahrung, Chemie Ingenieur Technik 78, No. 4, S. 485-489.
- Schlösser A, Weber A, Schrempf H. (2001). Synthesis of the *Streptomyces lividans* maltodextrin ABC transporter depends on the presence of the regulator MalR. *FEMS Microbiol. Lett.* 196, 77–83.

- Schmidt DD, Frommer W, Junge B, Müller L, Wingender W, Truscheit E (1977).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: new complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* 64: 535-536.
- Schmidt DD, 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 T, Gries K, Josten M, Wiedemann I, Pelzer S, Labischinski H, Sahl HG. (2009). The lipopeptide antibiotic Friulimicin B inhibits cell wall biosynthesis through complex formation with bactoprenol phosphate. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(4): 1610-8.
- Seibold GM, Eikmanns BJ. (2007). The glgX gene product of *Corynebacterium glutamicum* is required for glycogen degradation and for fast adaptation to hyperosmotic stress. *Microbiology.* 153(Pt 7): 2212-20.
- Seibold G, Dempf S, Schreiner J, Eikmanns BJ. (2007a). Glycogen formation in *Corynebacterium glutamicum* and role of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Microbiology.* 153(Pt 4): 1275-85.
- Seibold GM, Wurst M, Eikmanns BJ. (2009). Roles of maltodextrin and glycogen phosphorylases in maltose utilization and glycogen metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology.* 155(Pt 2): 347-58.
- Sögaard M, Kadziola A, Haser R, Svensson B. Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley alpha-amylase. (1993). *J Biol Chem.* 268(30): 22480-4.
- Imamura K, Ogawa T, Sakiyama T, Nakanishi K. (2003). Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state. *J Pharm Sci.* 92(2):266-74.
- Stam MR, Blanc E, Coutinho PM, Henrissat B. (2006). Evolutionary and mechanistic relationships between glycosidases acting on alpha- and beta-bonds. *Carbohydr Res.* 340(18): 2728-34.
- Stockmann M, Piepersberg W. (1992). Gene probes for the detection of 6-deoxyhexose metabolism in secondary metabolite-producing streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 185-189.
- Stratmann A, Mahmud T, Lee S, Distler J, Floss H.G, Piepersberg W (1999). The AcbC protein from *Actinoplanes* species is a C<sub>7</sub>-cyclitol synthase related to 3-dehydroquininate synthases and is involved in the biosynthesis of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose. *J. Biolo. Chem.* 274: 10889-10896.
- Stratmann A. (1997). Identifizierung eines Acarbose-Biosynthesegenclusters in *Actinoplanes* sp. und Charakterisierung ausgewählter Enzyme des Acarbose-Stoffwechsels. Dissertation, Institut für chemische Mikrobiologie. Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal.
- Strocchi M, Ferrer M, Timmis KN, Golyshin PN. (2006). Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics.* 6(1):193-206.
- Strohl WR. (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 20(5): 961-74.



- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60–89.
- Suganum *et al.*, 1980; Usui *et al.*, 1993; Kuriki *et al.*, 1993; Duan *et al.*, 1993; Wang & Hartman, 1976
- Svensson S. (1994). Protein engineering in the  $\alpha$ -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity and stability. *Plant Mol. Biol.* 25: 145-157
- Tamura T, Hatano K. (2001). Phylogenetic analysis of the genus *Actinoplanes* and transfer of *Actinoplanes minutisporangius* Ruan *et al.* 1986 and '*Actinoplanes aurantiacus*' to *Cryptosporangium minutisporangium* comb. nov. and *Cryptosporangium aurantiacum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 6): 2119-25.
- Tessier PM, Vandrey SD, Berger BW, Pazhianur R, Sandler SI, Lenhoff AM. (1996). Self-interaction chromatography: a novel screening method for rational protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58(Pt 10 Pt 1): 1531-5.
- Truscheit E, Frommer W, Junge B, Müller L, Schmidt D, Wüthrich W. (1981). Chemistry and biochemistry of bacterial alpha-glucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 20, 744–761.
- Tsao LS, Lin LL, Chen JC, Chen JH, Hsu WH. (1993). Cloning and characterization of an alphaamylase gene from *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1171:255-262.
- Uitdehaag JC, Kalk KH, van Der Veen BA, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. (1999). The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a gamma-cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution. *J Biol Chem.* 274(49): 34868-76.
- Van Hülst R. (1985). Untersuchungen zur Biosynthese von Acarbose bei *Actinoplanes* sp. *Dissertation*, WWU Münster
- Varadaraj K, Skinner DM. (1994). Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene.* 140(1):1-5.
- Vihinen M, Mäntsälä P. (1989). Microbial amyolytic enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 24(4): 329-418.
- Virolle MJ, Gagnat J. (1994). Sequences involved in growth-phase-dependent expression and glucose repression of a *Streptomyces* alpha-amylase gene. *Microbiology.* 140(Pt 5): 1059-67.
- Vobis G. (1989) *Actinoplanetes*. In: Bergy's manual of systematic bacteriology, Section 28, Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (ed). pp.: 2418-2428.
- Vollf JN, Altenbuchner J (1998). Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol. Microbiol.* 27: 239- 246.
- von Heijne G, Abrahmsén L. (1989). Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* 244(2):439-46.
- Waksman SA, Henrici AT. (1943). The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. *J Bacteriol.* 46(4): 337-41.
- Waksman SA. (1965). A quarter-century of the antibiotic era. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 9–19

- Watanabe K, Furumai T, Sudoh M, Yokose K, Maruyama HB. (1984). New alpha-amylase inhibitor, trestatins. IV. Taxonomy of the producing strains and fermentation of trestatin A. *J Antibiot* (Tokyo). 37(5):479-86.
- Weber W, Zähler H, Siebers J, Schröder K, Zeeck A. (1979). Metabolic products of microorganisms. 175. Tetracenomycin C. *Arch Microbiol*. 121(2): 111-6.
- Wehmeier UF (2003). The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* SE50/110: A progress report. *Biocat. Biotrans.* 21: 279 – 284
- Wehmeier UF (2004). Acarbose, ein therapeutisch eingesetzter Wirkstoff: Biosynthese und Funktion. *BIOSpektrum* 1/04, 10. Jahrgang.
- Wehmeier UF, Piepersberg W. (2003). The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* SE50/110: a progress report. *Biocat. Biotrans.* 21, 279–285
- Wehmeier UF, Piepersberg W. (2004). Molecular biology and enzymology of the metabolism of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 613–625.
- Wellington EMH, Cresswell N, Herron PR. (1992). Gene transfer between streptomycetes in soil. *Gene* 115: 193 – 198.
- Whitehead TR, Cotta MA. (1995). Identification of intracellular amylase activity in *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*. *Curr Microbiol.* 30(3):143-8.
- Williams ST, Vickers JC (1986). The ecology of antibiotic production. *Microb. Ecol.* 12: 43–52.
- Wong PG, Zhang Y, Luo S, Tang Y, Yu L, Hou KY, Cheng JP, Zeng X (2006). Carbohydrate-Protein Interactions by “Clicked” Carbohydrate Self-Assembled Monolayers. *Anal. Chem.* 78 (6), pp 2001–2008
- Woodward RB (1981). Asymmetric Total Synthesis of Erythromycin. 1. Synthesis of of an Erythronolide A Seco Acid Derivative via Asymmetric Induction. In: *Journal of the American Chemical Society*.
- Wright F, Bipp MJ. (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113: 55-65.
- Yokose K, Ogawa K, Sano T, Watanabe K, Maruyama HB, Suhara Y (1983). New  $\alpha$ -amylase inhibitor, trestatins. II. Structure determination of trestatins A, B and C. *J. Antibiot.* 36: 1166-1175.
- Zakrzewska-Czerwinska J, Schrempf H. (1992). Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. *J Bacteriol.* 174(8): 2688-93.

- Zhang CS, Podeschwa M, Altenbach HJ, Piepersberg W, Wehmeier UF. (2003a). The acarbose-biosynthetic enzyme AcbO from *Actinoplanes* sp. SE 50/110 is a 2-*epi*-5-*epi*-valiolone-7-phosphate 2-epimerase. *FEBS Lett.* 540, 47–52.
- Zhang CS, Podeschwa M, Altenbach HJ, Piepersberg W, Wehmeier UF. (2003b). Identification of a 1-*epi*-valienol 7-kinase activity in the producer of acarbose, *Actinoplanes* sp. SE50/110. *FEBS Lett.* 540, 53–57.
- Zhang CS, Stratmann A, Block O, Brueckner R, Podeschwa M, Altenbach HJ, Wehmeier UF, Piepersberg W. (2002). Biosynthesis of the C(7)-cyclitol moiety of acarbose in *Actinoplanes* species SE50/110. 7-O-phosphorylation of the initial cyclitol precursor leads to proposal of a new biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 22853–22862.

---

## **Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Ort/Datum.....

Nadine Merettig.....