

**Untersuchungen zum Einbau  
des Stickstoffes in der Acarviose-Einheit der  
Acarbose bei *Actinoplanes* sp. 50/110: die  
Aminotransferase AcbV**

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

Eingereicht von  
Paz Marta Diaz-Guardamino Uribe

Wuppertal

im Februar 2000

**A mis padres**  
**Meinen Eltern**

## **Mein Dank gilt:**

Herrn Prof. Dr. W. Piepersberg für die Überlassung des Themas, seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine vielseitige Unterstützung während der Erstellung meiner Promotionsarbeit.

Herrn Prof. Dr. H. J. Altenbach für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. U. Wehmeier für seine nie endende Hilfsbereitschaft und viele hilfreichen Diskussionen.

Bayer AG:

Frau Dr. A. Crueger und Herrn Dr. Wehlmann für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. H. Apeler und seiner Mannschaft, insbesondere E. Schmidt, für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Dipl. Chem. O. Block für die Bereitstellung des synthetisierten *2-epi-5-epi-Valiolon*.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre, an die ich mich gerne zurückerinnern werde, und für die Unterstützung, um mein Deutschkenntnis zu verbessern.

Meinem Mann Stefan danke ich für alles.

Meiner Familie für ihre wertvolle Unterstützung.

Allen meinen wundervollen Freunden, insbesondere Stefan, Peter, Pfeily, Andreas, Nina, Carmen und Antje, die es geschafft haben, dass ich hier in Deutschland wie zu Hause mich fühle.

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

## Zusammenfassung

## Summary

## Resumen

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Einleitung</b>   | 1  |
| 1.1. <i>Actinoplanes</i> sp.   | 1  |
| 1.2 Acarbose und homologe Pseudooligosaccharide als Inhibitoren von $\alpha$ -Glucosidasen         | 2  |
| 1.3 Medizinische Anwendung von Acarbose  | 4  |
| 1.4 Acarbose-Stoffwechsel in <i>Actinoplanes</i> sp.   | 5  |
| 1.5 Das Acarbose-Biosynthesegencluster   | 12 |
| 1.6 Zur Regulation des Acarbose-Biosynthesegenclusters   | 13 |
| 1.7 Stickstoff-Assimilation  | 13 |
| 1.8 Ziele der Arbeit   | 15 |
| <b>2. Material und Methoden</b>  | 16 |
| 2.1 Chemikalien und Enzyme   | 16 |
| 2.2 Medien und Lösungen  | 17 |
| 2.2.1 Verwendete Medien  | 17 |
| 2.2.2 Verwendete Lösungen  | 18 |
| 2.3 Bakterien und Plasmide   | 20 |
| 2.4 Oligonukleotide  | 25 |
| 2.5 Kulturbedingungen und Lagerung der Bakterienstämme   | 26 |
| 2.6 Gentechnische Methoden   | 26 |
| 2.6.1 Präparationsmethoden von Nukleinsäuren   | 26 |
| 2.6.2 <i>In vitro</i> Manipulation von Nukleinsäuren   | 27 |
| 2.6.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten   | 27 |
| 2.6.4 Markierung von DNA-Fragmenten  | 28 |
| 2.6.5 DNA-DNA Hybridisierung   | 28 |
| 2.6.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)   | 29 |
| 2.6.7 DNA-Sequenzierung  | 30 |
| 2.7 Transformation von <i>E. coli</i> und Streptomyceten   | 30 |
| 2.8 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>   | 31 |
| 2.9 Heterologe Expression in Streptomyceten  | 31 |
| 2.10 Herstellung Zell-freier Extrakte  | 32 |
| 2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung | 32 |
| 2.12 Immobilisierung von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran                                      | 32 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 2.13      | Immunologischer Nachweis immobilisierter Polyhistidin-Fusionsproteine   | 33 |
| 2.14      | Präparative Umsetzung von dTDP-D-Glucose zu<br>dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose  | 33 |
| 2.15      | Umsetzung von Ribose-5-phosphat und Hydroxypyruvat zu<br>2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -Valiolon   | 34 |
| 2.16      | Nachweis der Aminotransferaseaktivität  | 34 |
| 2.17      | Hochdruckflüssigchromatographie-Analyse   | 36 |
| 2.18      | Dünnschichtchromatographie  | 36 |
| 2.19      | Computerprogramme   | 37 |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>   | 38 |
| 3.1       | Glutaminsynthetasen aus <i>Actinoplanes</i> sp.   | 38 |
| 3.1.1     | Glutaminsynthetase I ( <i>glnA</i> )  | 38 |
| 3.1.1.1   | Amplifizierung und Klonierung eines <i>glnA</i> Fragments   | 38 |
| 3.1.1.2   | Screening einer Genbank mit der <i>glnA</i> -Gensonde   | 38 |
| 3.1.1.3   | Analyse der DNA- und abgeleiteten Aminosäuresequenz<br>des <i>glnA</i> -Gens aus <i>Actinoplanes</i> sp.  | 39 |
| 3.1.2     | Glutaminsynthetase II ( <i>glnII</i> )  | 41 |
| 3.1.2.1   | Amplifizierung und Klonierung eines <i>glnII</i> -Genfragments  | 41 |
| 3.1.2.2   | Screening einer Genbank mit einer <i>glnII</i> -Gensonde  | 41 |
| 3.1.2.3   | Analyse der DNA- und abgeleiteten Aminosäuresequenz<br>des <i>glnII</i> -Gens aus <i>Actinoplanes</i> sp.   | 42 |
| 3.2       | Sekundärmetabolit-Aminotransferasen (SMATs)   | 43 |
| 3.2.1     | Amplifizierung und Klonierung von zwei SMAT-codierenden<br>DNA-Fragmenten   | 43 |
| 3.2.2     | Lokalisation der <i>smat1</i> - und <i>smat2</i> -kodierenden DNA-Bereiche<br>im Genom von <i>Actinoplanes</i> sp.                                | 44 |
| 3.3       | Identifizierung eines Aminotransferasegens aus <i>Actinoplanes</i> sp. und der<br>benachbarten Gene innerhalb des Acarbose-Biosynthesegenclusters | 45 |
| 3.3.1     | Amplifizierung und Klonierung von <i>acbB</i> aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0   | 46 |
| 3.3.2     | Southern-Hybridisierungen mit einer <i>acbB</i> -Gensonde   | 46 |
| 3.3.3     | “Shot gun“ Klonierung des <i>acbB</i> -ähnlichen Aminotransferasegens<br>aus <i>Actinoplanes</i> sp.  | 47 |
| 3.3.4     | Analyse des 5,2 kb <i>KpnI/BglII</i> DNA-Fragmentes durch<br>DNA-Sequenzierung  | 48 |
| 3.3.5     | Informationsgehalt der offenen Leserahmen <i>acbU</i> , <i>acbV</i> , <i>acbW</i><br>und <i>acbX</i> von <i>Actinoplanes</i> sp.                  | 50 |
| 3.3.5.1   | Das Gen <i>acbU</i>   | 50 |
| 3.3.5.2   | Das Gen <i>acbV</i>   | 50 |
| 3.3.5.3   | Das Gen <i>acbW</i>   | 50 |

|                      |  |    |
|----------------------|--|----|
| 3.3.5.4              | Das Gen <i>acbX</i>  | 51 |
| 3.3.6                | Lage des 5,2 kb <i>KpnI/BglII</i> DNA-Fragmentes relativ zum <i>acb</i> -Gencluster auf dem Chromosom von <i>Actinoplanes</i> sp.  | 52 |
| 3.4                  | Versuche zur Expression der Aminotransferase AcbV  | 53 |
| 3.4.1                | Versuche zur Expression von AcbV unter Kontrolle des natürlichen Promotors in <i>S. lividans</i> TK23                              | 53 |
| 3.4.2                | Expression der Aminotransferasen AcbV aus <i>Actinoplanes</i> sp. und AcbB aus <i>S. glaucescens</i> in <i>E. coli</i>             | 53 |
| 3.4.3                | Co-Expression der Aminotransferasen AcbV bzw. AcbBSg mit GroESEL von <i>S. griseus</i> in <i>E. coli</i>                           | 55 |
| 3.4.4                | Heterologe Expression der Aminotransferasen AcbV und AcbBSg unter Kontrolle des <i>rhaP</i> Promotors in <i>E. coli</i>            | 55 |
| 3.4.5                | Heterologe Expression der Aminotransferasen in <i>S. lividans</i> TK23   | 56 |
| 3.5                  | Herstellung von 2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -Valiolon   | 57 |
| 3.5.1                | Versuche zur Expression von löslichem AcbC in <i>E. coli</i>   | 57 |
| 3.5.2                | Synthese von Sedoheptulose-7-Phosphat und 2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -Valiolon in einer gekoppelten Reaktion                     | 58 |
| 3.6                  | Versuche zum Nachweis einer Aminotransferaseaktivität von AcbV bzw. AcbBSg   | 59 |
| 3.6.1                | 4-Aminobutyrat als Aminodonor  | 60 |
| 3.6.2                | Glutamat als Aminodonor  | 61 |
| 3.7                  | Suche nach Genen für die Biosynthese von Valienamin-haltigen Sekundärmetaboliten in Streptomyceten                                 | 63 |
| 3.7.1                | Identifizierung von Homologen zu Acarbose-Biosynthesegenen in anderen Streptomyceten mittels PCR                                   | 63 |
| 3.7.1.1              | Versuche zur Isolierung von <i>acbC</i> -ähnlichen Genen mit Hilfe der PCR   | 63 |
| 3.7.1.2              | Isolierung von <i>acbB</i> -(dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase) ähnlichen Genen mit Hilfe der PCR                                       | 64 |
| 3.7.2                | Versuche zur Identifizierung von Homologen zu Acarbose-Biosynthesegenen in anderen Actinomyceten mittels "Southern" Hybridisierung | 66 |
| <b>4. Diskussion</b> |  | 67 |
| 4.1                  | Suche nach einem Aminotransferasegen innerhalb des Acarbose-Biosynthesegenclusters   | 67 |
| 4.2                  | AcbV aus <i>Actinoplanes</i> sp. ist eine dNTP-4-Keto-6-desoxyglucose Aminotransferase   | 71 |
| 4.2.1                | Heterologe Überproduktion der Enzyme AcbB aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0 und AcbV aus <i>Actinoplanes</i> sp. in                  |    |

|  |    |
|--|----|
| <i>E. coli</i> und <i>S. lividans</i> .  | 73 |
| 4.2.2 AcbB aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0 und AcbV aus <i>Actinoplanes</i> sp.<br>katalysieren die Umsetzung von dTDP-4-Keto-6-deoxyglucose zu<br>dTDP-D-4,6-Dideoxy-4-aminoglucose | 75 |
| 4.3 Die Proteine AcbW und AcbX, mögliche Komponenten eines<br>ABC-Exporters  | 76 |
| 4.4 Das AcbU Protein   | 77 |
| 4.5 Ein Modell des Acarbose-Stoffwechsels in <i>Actinoplanes</i> sp.   | 78 |
| 4.6 Entwicklung einer "Screening"-Methode, um homologe<br>Acarbose-Biosynthesegene in Actinomyceten zu identifizieren  | 80 |
| 4.7 <i>Actinoplanes</i> sp. besitzt zwei Glutaminsynthetasen   | 82 |
| <b>Literatur</b>   | 83 |
| <b>Anhang 1:</b> <i>glnA</i> DNA-Sequenz   | 95 |
| <b>Anhang 2:</b> DNA-Sequenz des 5,2 kb <i>KpnI/BglIII</i> DNA-Fragmentes  | 97 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |   |        |  |
|----------------|---|--------|--|
| A              | Adenin  | PVDF   | Polyvinylidendifluorid                                 |
| Abb.           | Abbildung   | RBS    | Ribosomenbindestelle                                   |
| ABC            | ATP-Bindungs-Kassette                             | RNA    | Ribonukleinsäure                                       |
| al.            | altera  | rpm    | revolutions per minute                                 |
| ALF            | automatisierter Laser Fluorescens-(DNA)-Sequenzer | RT     | Raumtemperatur   |
| APS            | Ammoniumpersulfat                                 | s      | Sekunde  |
| AS             | Aminosäure  | s.     | siehe  |
| Atase          | Acarviosyl-Transferase                            | SDS    | Natriumdodecylsulfat                                   |
| ATP            | Adenosintri-phosphat                              | s.o.   | siehe oben   |
| bp             | Basenpaar   | sp     | spezies  |
| BSA            | Rinderserumalbumin                                | ssp    | Subspezies   |
| bzw.           | beziehungsweise                                   | s.u.   | siehe unten  |
| C              | Cytosin   | T      | Thymidin   |
| ca.            | circa   | Tab.   | Tabelle  |
| CGTase         | Cyclomaltodextrine-Glucano-Transferase            | TEMED  | Tetraethylmethylen-diamin                              |
| DC             | Dünnschichtchromatografie                         | Tris   | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan                        |
| d.h.           | das heiss   | U      | "unit"   |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid                                  | u.s.w. | und so weiter  |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                            | UV/VIS | Ultraviolett/sichtbares Licht-                         |
| dNTP           | Desoxynukleosidtriphosphate                       | vgl.   | vergleiche   |
| 6DOH           | 6-Desoxyhexose(n)                                 | X-Gal  | 5'-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -Galactopyranosid |
| dTDP           | Desoxythymidindiphosphat                          | z.B.   | zum Beispiel   |
| EDTA           | Ethylendiaminotetraessigsäure                     |        |  |
| G              | Guanosin  |        |  |
| h              | Stunde  |        |  |
| HPLC           | Hochdruckflüssigchromatographie                   |        |  |
| IPTG           | Isopropylthiogalactosid                           |        |  |
| kb             | Kilobasenpaare                                    |        |  |
| K <sub>m</sub> | Michaelis-Menten-Konstante                        |        |  |
| Min            | Minute  |        |  |
| MW             | Molekulargewicht                                  |        |  |
| NAD            | Nicotinamidadenindinukleotid                      |        |  |
| NADP           | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat              |        |  |
| NTP            | Nukleosidtriphosphat                              |        |  |
| OD             | optische Dichte                                   |        |  |
| ORF            | offener Leserahmen                                |        |  |
| P              | Phosphat  |        |  |
| PAGE           | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                   |        |  |
| PCR            | Polymerase-Kettenreaktion                         |        |  |
| PEG            | Polyethylenglykol                                 |        |  |
| pers.          | persönlich(e)                                     |        |  |
| PMSF           | Phenylmethylsulfonylfluorid                       |        |  |

## ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befasste sich mit dem Stickstoffstoffwechsel bei *Actinoplanes* sp. unter besonderer Berücksichtigung der Frage, wie der Stickstoff in den alpha-Glucosidaseinhibitor Acarbose während der Biogenese eingeführt wird. Zu klären galt es welches der postulierten Intermediate der Biosynthese transaminiert und durch welches Enzym diese Reaktion katalysiert wird.

Heterologe PCR führte zur Identifizierung der Glutaminsynthetasen kodierenden Gene *glnA* und *glnII* auf dem Genom von *Actinoplanes* sp.. Das Vorkommen von mindestens zwei Glutaminsynthetasen deutet darauf hin, dass *Actinoplanes* einen von *E. coli* abweichenden, aber zu anderen Actinomyceten und im Boden lebenden Bakterien ähnlichen Stickstoffmetabolismus besitzt. Die Aufklärung einer möglichen Beteiligung dieser beiden Proteine an der Stickstoffbereitstellung für die Acarbosebiosynthese könnte für eine zukünftige Optimierung der industriellen Acarboseproduktion von Bedeutung sein.

Hybridisierungsexperimente mit einer Gensonde aus *S. glaucescens* GLA.0 (*acbB*) führte zum Auffinden eines homologen Gens in *Actinoplanes* sp.. Eine physikalische Kartierung und DNA-Sequenzierung zeigten, dass dieses als *acbV* bezeichnete Gen ca. 7 kb stromaufwärts von *acbQ* und anderen Acarbosebiosynthesegenen lokalisiert ist. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt mit ca. 30% die höchste Ähnlichkeit zu verschiedenen GabT-Proteinen. Diese zählen zur Subfamilie III der Aminotransferasen. Die Homologie von *acbV* zu *acbB* aus *S. glaucescens* beträgt 72,3% identische Aminosäuren.

Die aufgrund der Aminosäuresequenzanalyse von AcbV aus *Actinoplanes* sp. postulierte Funktion als Aminotransferase sowie dessen homologes Protein AcbBSg aus *S. glaucescens* konnte experimentell untermauert werden. Nach heterologer Expression beider Proteine in *E. coli* und *S. lividans* TK23 und anschließenden Enzymtests mit Zellextrakten wurde gezeigt, dass dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose mit L-Glutamat als Aminodonor spezifisch umgesetzt wird. Wahrscheinlich entsteht dTDP-D-4,6-Didesoxy-4-aminoglucose. Damit scheint nicht 2,5-*epi*-Valiol-1-amin, sondern dTDP-D-4,6-Didesoxy-4-aminoglucose die aminierte Vorstufe für die Bildung von Acarbose zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei weitere, in Nachbarschaft zum Acarbose-Biosynthesegencluster liegende Gene gefunden werden, *acbU*, *acbW* und *acbX*. Das Genprodukt von *acbU* enthält die für eine ATP-Bindung charakteristischen "Walker-Motive" und zeigt Ähnlichkeit zu den beiden Pep2 Proteinen, die von zwei Glycogenbiosynthese-Genclustern aus *S. coelicolor* kodiert werden. Die abgeleiteten Proteine AcbW und AcbX zeigen signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen der Superfamilie der ABC-Transporter. Sie könnten für den Acarbose-Export zuständig sein.

Es konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung der Gene *acbV* aus *Actinoplanes* sp. bzw. *acbB* aus *S. glaucescens* spezifisch Valienamin-haltige Sekundärmetabolit produzierende Streptomyceten identifiziert werden können. Von den Genen *acbK* (Acarbose-7-Kinase) und *acbC* (C7-Cyclitolsynthase) abgeleitete Hybridisierungssonden eignen sich nicht für das Screening von Produzenten bakterieller alpha-Glucosidaseinhibitoren.

## SUMMARY

This thesis deals with the nitrogen metabolism in *Actinoplanes* sp. and is focused on the incorporation of the amino nitrogen into the alpha-glucosidase inhibitor acarbose during its biogenesis. It should be clarified which of the postulated precursors serve as substrate for the transamination and which enzyme is responsible for its catalysis.

Heterologous PCR revealed the existence of the genes *glnA* and *glnIII* within the genome of *Actinoplanes* sp.. The occurrence of at least two genes encoding glutamine synthetases indicates that *Actinoplanes* sp. has a nitrogen metabolism, which may be similar to those of other actinomycetes and soil living bacteria. Further investigations will probably elucidate the implication of the two enzymes in nitrogen metabolism and the acarbose formation in *Actinoplanes* sp. during industrial fermentation processes.

Using an *acbB* gene probe from of *S. glaucescens* GLA.0 in Southern hybridisation experiments led to the detection of an homologue gene in *Actinoplanes* sp. The homologous gene is located about 7 kb upstream of the *acbQ* gene and other acarbose biosynthetic genes as was shown by physical mapping and DNA sequencing of the hybridising fragment. The deduced amino acid sequence shares about 30% identity with various GabT proteins, which belong to the subfamily III of aminotransferases. The amino acid sequence homology of AcbV from *Actinoplanes* sp. to AcbB from *S. glaucescens* is 72.3%.

The amino acid sequence analyses of AcbV from *Actinoplanes* sp. and AcbB from *S. glaucescens* suggested for both proteins a function as an aminotransferase. Enzyme assays using cell free extracts from *S. lividans* TK23, which was able to express heterologously both proteins, corroborated the assumed function. The nucleotide activated sugar dTDP-4-keto-6-desoxyglucose is converted by both proteins in the presence of L-glutamate probably to dTDP-D-4,6-dideoxy-4-aminoglucose. Consequently dTDP-D-4,6-dideoxy-4-aminoglucose and not 2,5-epi-valiol-1-amine seems to be the aminated precursor for the formation of acarbose.

In the course of this study three additional genes, *acbU*, *acbW*, and *acbX* have been identified, which also seem to belong to the acarbose biosynthetic gene cluster. The gene product of *acbU* harbours typical "Walker-motives" indicating a putative ATP-binding site. Additionally, the deduced amino acid sequence shares similarity to the Pep2 proteins, which are encoded by the two glycogen biosynthetic gene clusters of *S. coelicolor*. The deduced proteins AcbW and AcbX show significant homology to proteins of the ABC transporter superfamily. They could be involved in the export of acarbose.

Hybridisation probes derived from the genes *acbV* from *Actinoplanes* sp. or *acbB* from *S. glaucescens* are valuable tools in order to identify streptomycetes producing secondary metabolites of the valienamine type. On the other hand *acbK* (encoding acarbose 7-kinase) or *acbC* (encoding C7-cyclitol synthase) gene probes have not been useful for the screening of alpha-glucosidase inhibitor producers.

## RESUMEN

Esta tesis trata sobre el esclarecimiento del metabolismo del nitrógeno en *Actinoplanes* sp., y en particular sobre la incorporación del nitrógeno en acarbosa, inhibidor de  $\alpha$ -amilasas, durante su biosíntesis. Las principales preguntas a responder han sido la identificación del intermediario el cual es transaminado durante la biosíntesis de acarbosa, así como la identificación de la enzima responsable de dicha reacción.

Utilizando el método PCR fué posible identificar dos genes *glnA* y *glnII*, los cuales codifican dos glutaminsintetasas diferentes en el genoma de *Actinoplanes* sp.. El hecho de que esta bacteria posea dos enzimas glutaminsintetasas demuestra que su metabolismo del nitrógeno es similar al que poseen otros actinomicetes y bacterias del suelo. Como Proteínas responsables de la asimilación de nitrógeno, el esclarecimiento del papel que juegan estas dos proteínas en la biosíntesis de la Acarbosa podría ser de gran ayuda en la optimización de la producción industrial de la acarbosa en el futuro.

Experimentos de hibridación utilizando un gen de *S. glaucescens* GLA.0 como sonda, dieron como resultado la identificación de un gen homólogo en el genoma de *Actinoplanes* sp. Por medio de mapeo de restricción y de secuenciación de DNA se pudo establecer la localización de este gen, al que se le llamó *acbV*, a unas 7 kb de distancia del gen *acbQ* y otros genes responsables de la biosíntesis de la acarbosa. La secuencia de aminoácidos, deducida de la del DNA, presenta la mayor similitud, de aproximadamente 30%, con proteínas GabT, las cuales pertenecen a la subfamilia III de aminotransferasas. Las proteínas AcbV de *Actinoplanes* sp. y AcbB de *S. glaucescens* GLA.0 presentan una identidad del 72,3% a nivel de aminoácidos entre ellas.

La función de aminotransferasa que se postuló para AcbV y para su homóloga AcbB en base a los análisis de la secuencia de aminoácidos se pudo demostrar experimentalmente. Tras la expresión heteróloga en *E. coli* y en *S. lividans* TK23 de las dos proteínas y la utilización de dichos extractos libres de células en tests enzimáticos se pudo demostrar que estas proteínas, AcbV y AcbB catalizan la reacción que transforma dTDP-4-keto-6-desoxyglucosa en dTDP-D-4,6-didesoxy-4-aminoglucosa utilizando L-Glutamato como donador del grupo amino. Con este hecho se demuestra que el intermediario en la formación de acarbosa es dTDP-D-4,6-didesoxy-4-aminoglucosa y no 2,5-*epi*-Valiol-1-amin.

En este trabajo se identificaron tres genes más, los cuales se localizan, así como *acbV*, en el “cluster” de genes responsables de la biosíntesis de acarbosa, los cuales fueron llamados *acbU*, *acbW* y *acbX*. El producto del gen *acbU* presenta en su secuencia de aminoácidos los motivos “Walker”, característicos para secuencias de unión a ATP (ATP-binding site), y a su vez presenta homología con proteínas codificadas en “clusters” de genes relacionados con la biosíntesis de glucógeno localizados en el genoma de *S. coelicolor*. Las proteínas deducidas de los genes *acbW* y *acbX* tienen similitud con proteínas de la superfamilia de ABC-transportadores de membrana. Éstas podrían jugar un papel en la exportación de acarbosa.

Se pudo demostrar que la utilización de AcbV de *Actinoplanes* sp., así como de AcbB de *S. glaucescens* GLA.0, como sondas específicas para la localización de genes relacionados en la biosíntesis de metabolitos secundarios que contienen Valienamina en otros Streptomicetes resultó eficiente y específica.

# 1. Einleitung

## 1.1. *Actinoplanes* sp.

Die Bakteriengattung *Actinoplanes* gehört zu der Ordnung *Actinomycetales*, Familie *Actinoplanaceae* (Goodfellow und Cross 1993). Die in diese Gattung eingeordneten Bakterien sind Gram-positiv und wachsen in Form von filamentösen Hyphen. Ein Luftmycel ist sehr spärlich oder meistens gar nicht ausgeprägt (Bland und Couch 1981). Die Sporen werden in runden oder globulären Sporangien gebildet und sind polar oder lateral begeißelt (Parenti und Coronelli 1979). Das gattungsspezifische Merkmal ist die Zusammensetzung der Zellwände. Das Peptidoglycan enthält meso- und/oder Hydroxydiaminopimelinsäure und Glycin (Zellwandtyp II), ein Zucker (Xylose und Arabinose) und Phosphatidylethanolamin (Lechevalier und Lechevalier 1970). Anstelle von *N*-Acetylmuraminsäure ist *N*-Glycolylmuraminsäure mit Acetylglucosamin alternierend  $\beta(1,4)$ -glycosidisch verknüpft. Aus dieser Besonderheit resultiert die Unempfindlichkeit von *Actinoplanes* gegenüber Lysozym (Vobis 1989). Die Bestimmung der 16S rDNA bestätigte die taxonomische Einordnung von *Actinoplanes* sp. innerhalb des Bakterienreiches und zeigt die Abgrenzung zu den aus der gleichen Ordnung stammenden Streptomyceten (Mehling et al. 1995). Die höchste Sequenzübereinstimmung konnte mit *Frankia* sp. und *Micromonospora chalcea* gezeigt werden (Mehling 1996). Die DNA von *Actinoplanes* sp. besitzt mit 72-73% den typischen hohen G+C-Gehalt, der charakteristisch für Actinomyceten ist (Farina und Bradley 1970).

Vertreter der Gattung *Actinoplanes* kommen auf Pflanzenresten, auf vielen verschiedenen Böden und an Fluß- und Seeufern vor. Wegen der Anpassung an ein wässriges Milieu durch ein bewegliches Stadium während ihres Lebenszyklus (Higgins 1967), wurde eine Anpassung an ein wässriges "Habitat" vorgeschlagen. Die Tatsache, daß auch in Sandboden *Actinoplanes* sp. isoliert werden konnten (Palleroni 1976), spricht gegen so eine Hypothese (Parenti und Coronelli 1979; Makkar und Cross 1982). Die durchgeführten Untersuchungen, die über Beweglichkeit der Sporen, welche polar oder lateral begeißelt sind, konnten keine Wanderungsfähigkeit bei *Actinoplanes* sp. nachgewiesen werden (Palleroni 1980).

Die Gattung *Actinoplanes* zeichnet sich durch die Bildung diverser Sekundärmetabolite mit antibiotischer Wirkung (z.B. Teicoplanin, Purpuromycin, Xanthon, Plauracin, Gardimycin) aus (Parenti und Coronelli 1979; Kirillov et al. 1997; Chu et al. 1997).

Der  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Acarbose konnte erstmals in der Kulturbrühe von *Actinoplanes* sp. SE50 nachgewiesen werden (Schmidt et al. 1977). Acarbose gehört strukturell zu den Aminoglycosiden, die hauptsächlich von Actinomyceten gebildet werden (Piepersberg und Distler 1997). Diese bedeutende Gruppe von Sekundärmetaboliten (Streptomycin, Bluensomycin, Spectomycin, Neomycin, Kanamycin, Gentamycin, Validamycin, u.s.w.) hat hohe medizinische Bedeutung erlangt.

## 1.2 Acarbose und homologe Pseudooligosaccharide als Inhibitoren von $\alpha$ -Glucosidasen

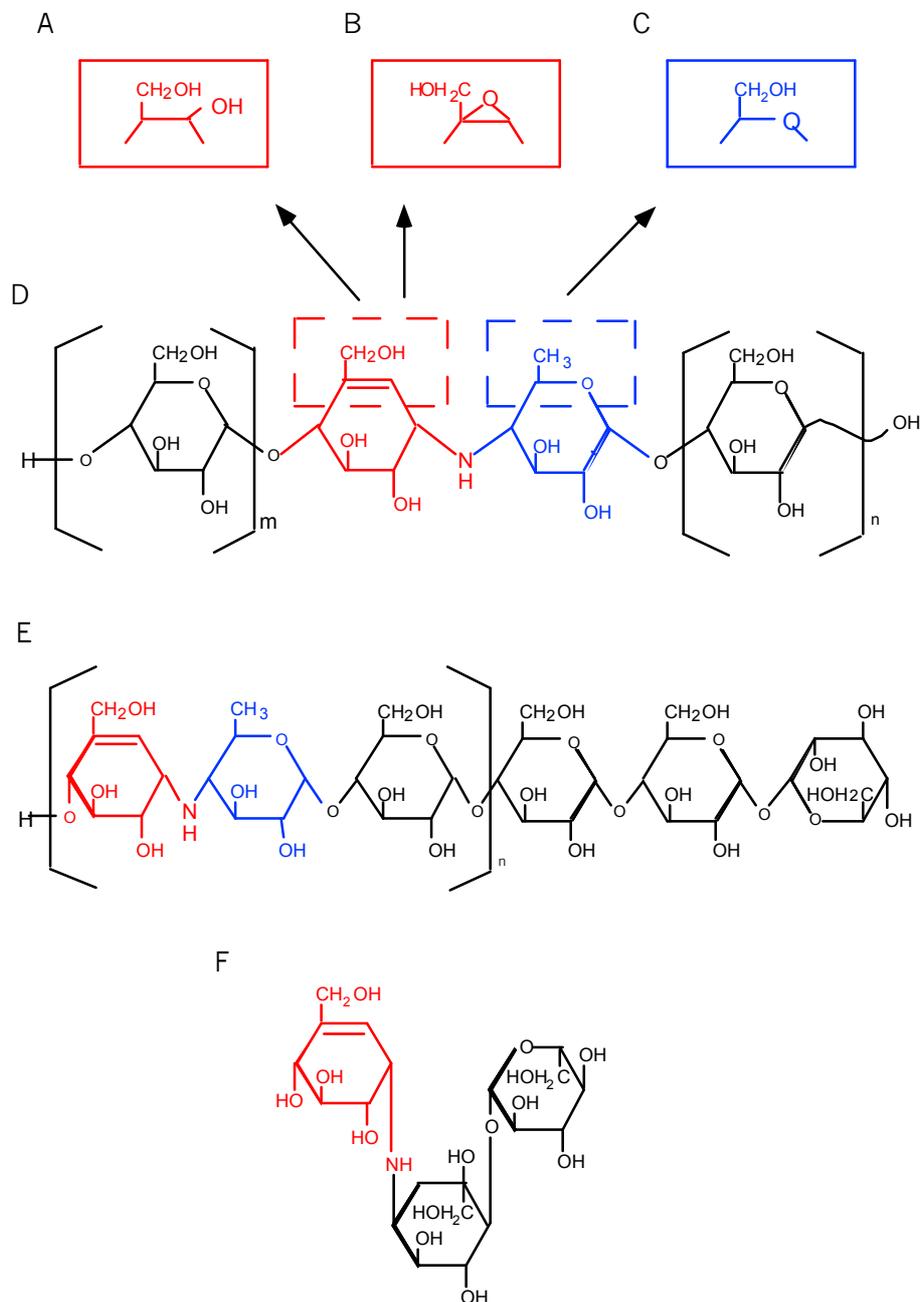
Acarbose gehört zu einer Gruppe von hitze- und säurestabilen Pseudooligosacchariden, die sich durch ihre Fähigkeit zur Inhibition von  $\alpha$ -Glucosidasen auszeichnen (Müller et al., 1980), wobei die Acarviosyl-Einheit essentiell für die Hemmwirkung ist (Heiker et al., 1981). Die Acarviose besteht aus einem ungesättigten C<sub>7</sub>N-Cycliten, dem Valienamin, und einer 4,6-Dideoxy-D-glucopyranose, welche  $\alpha$ -1,4 N-glycosidisch miteinander verknüpft sind. Dieses "core" kann an dem reduzierenden und an dem nicht reduzierenden Ende mit einer unterschiedlichen Anzahl von Glucoseeinheiten  $\alpha$ -1,4-O-glycosidisch (bzw. analog dazu) verknüpft werden (Abb. 1.1). In Kulturversuchen mit *Actinoplanes* sp. konnte gezeigt werden, daß in Abhängigkeit der Fermentationsbedingungen verschiedene Inhibitorgemische für  $\alpha$ -Amylasen, Maltasen, Glucoamylase und Saccharasen gebildet werden. Mit Glucose als Kohlenstoffquelle wird hauptsächlich die Komponente 2 (m = 0, n = 1; Abb. 1.1) gebildet. Mit Maltose wird vorwiegend die als Acarbose bezeichnete Komponente 3 (m = 0, n = 2; Abb. 1.1) gebildet, mit kleinen Mengen von Stärke die Komponenten 4, 5 und 6 (m = 1, n = 2; m = 2, n = 2 und m = 3, n = 2; Abb. 1.1; Frommer et al. 1979; Schmidt et al. 1977).

Ihre Hemmwirkung üben diese Pseudooligosaccharide gegenüber Hydrolasen von  $\alpha$ -1,4-glycosidischen Bindungen aus (Truscheid et al. 1981).  $\beta$ -Amylasen,  $\beta$ -Glucosidasen,  $\beta$ -Galactosidasen sowie Pullulanasen und Isoamylasen mikrobieller oder pflanzlicher Herkunft werden nicht gehemmt. Es konnte gezeigt werden, daß durch Acarbose eine Cyclodextrin-Glycosyltransferase sowie  $\alpha$ -Amylasen aus *Bacillus* sp. bzw. *Aspergillus* sp. durch Acarbose gehemmt werden (Truscheid et al. 1981; Strokopytov et al. 1995; Müller 1986).

Die  $\alpha$ -Glucosidasen werden von Acarbose kompetitiv gehemmt, wie aus röntgenkristallographischen Studien an Saccharase-Isomaltase Komplexen, isoliert aus dem Dünndarm von Ratten abgeleitet werden kann. (Samulitis et al. 1987, Hanzoet et al. 1981). Die Saccharase spaltet stereospezifisch die Bindung der Saccharose zwischen dem C1 des Glucosylrestes und dem glycosidischen Sauerstoff. Nach der Protonierung des glycosidischen Sauerstoffs durch eine Proton-Donor-Gruppe des Enzyms, entsteht ein Oxocarbeniumion, welches über eine benachbarte Carboxylgruppe des Enzyms stabilisiert wird und nach Dissoziation der Fructose mit einem Wassermolekül zur  $\alpha$ -Glucose reagiert (Müller 1986).

Durch die Kristallisation der  $\alpha$ -Amylase aus der Bauchspeicheldrüse vom Schwein (PPAII) (Gilles et al. 1996; Qian et al. 1994) und der Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) aus *Bacillus circulans* (Strokopytov et al. 1995) mit gebundener Acarbose im aktiven Zentrum, konnten detailliertere Aussagen über den molekularen Mechanismus der Hemmung dieser Enzyme gemacht werden. Für die PPAII konnte gezeigt werden, daß Glutamat-233 des aktiven Zentrums der  $\alpha$ -Amylase eine Wasserstoffbrücke mit der N-glycosidischen Bindung der "core-Einheit" bildet (Qian et al. 1994). Bei der Hemmung von CGTase kommt es zu einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Glutamat-257 im aktiven Zentrum mit der O-

glycosidischen Bindung zwischen der 4-Keto,6-deoxy-D-glucopyranose und dem Maltoserest (Strokopytov et al. 1995).



**Abb. 1.1: Struktur von Acarbose und homologen Pseudooligosacchariden.** A. Oligostatin-Gruppe (Meji Seika, 1979). B. Epoxid-Gruppe (Takeda, 1982). C. Adiposin-Gruppe (Toyo Jaza, 1977; Thaisha Pharm., 1978). D. Acarbose-Gruppe (Acarbose  $n = 2$ ,  $m = 0$ ; Bayer 1970). E. Trestatin-Gruppe (A:  $n = 2$ ; B:  $n = 1$ ; C:  $n = 3$ ; (Yokose et al. 1983). F. Validamycin A (Hori und Kameda 1972).

Sekundärmetaboliten mit einer Acarbose homologen Struktur werden von einigen *Streptomyces* Arten gebildet (Abb. 1.1). Die von *Streptomyces diastaticus* subsp. *amylostaticus* gebildeten Homologen der Amylostatin-Reihe weisen eine zur Acarbose identische Struktur auf (Murao und Ohya 1975; Fukuhara et al. 1982). Die

Pseudooligosaccharide der Adiposin-Reihe, die von *Streptomyces calvus* gebildet werden, unterscheiden sich von der Acarbose-Reihe durch einen Austausch der 4-Amino-4,6-dideoxyglucopyranose gegen eine 4-Amino-4-deoxyglucopyranose (Namiki et al. 1982a; Namiki et al. 1982b). Der Unterschied zwischen den Homologen der Oligostatin-Reihe von *Streptomyces myxogenes* zur Acarbose-Reihe besteht in der Addition von Wasser an die Doppelbindung der Valienamin-Einheit (Omoto et al. 1981). Von *Streptomyces flavochromogenes* werden Epoxid-Derivate an der gleichen Doppelbindung gebildet (Takeda et al. 1982). Die Trestatine (A, B, C) werden von *Streptomyces dimorphogenes* gebildet und weisen einen Trehalosylrest am reduzierenden Ende der Moleküle und einen ein- bis dreifachen Einbau von Acarviosyl-Resten auf (Yokose et al. 1983).

Die Validamycine bzw. Validoxylamine aus *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus* zeigen grössere strukturelle Unterschiede zu den Homologen der Acarbose (Abb. 1.1). An die Valienamin-Einheit ist ein gesättigter C<sub>7</sub>-Cyclit gebunden, der unterschiedlich substituiert sein kann (Horii und Kameda 1972). Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Verbindungen zeigen die Validamycine keine Aktivität gegen  $\alpha$ -glycosidische Bindungen spaltende Enzyme. Sie wirken wie die Trestatine als Trehalase-Inhibitoren.

### 1.3 Medizinische Anwendung von Acarbose

Der  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitor Acarbose ist seit 1990 unter dem Namen Glucobay für die medizinischen Anwendung zugelassen (Bischoff et al. 1994). Acarbose wird zur Behandlung von Kohlenhydrat-Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes mellitus, Adipositas und Hyperlipoproteinämie angewendet (Puls und Keup 1973; Puls et al. 1977).

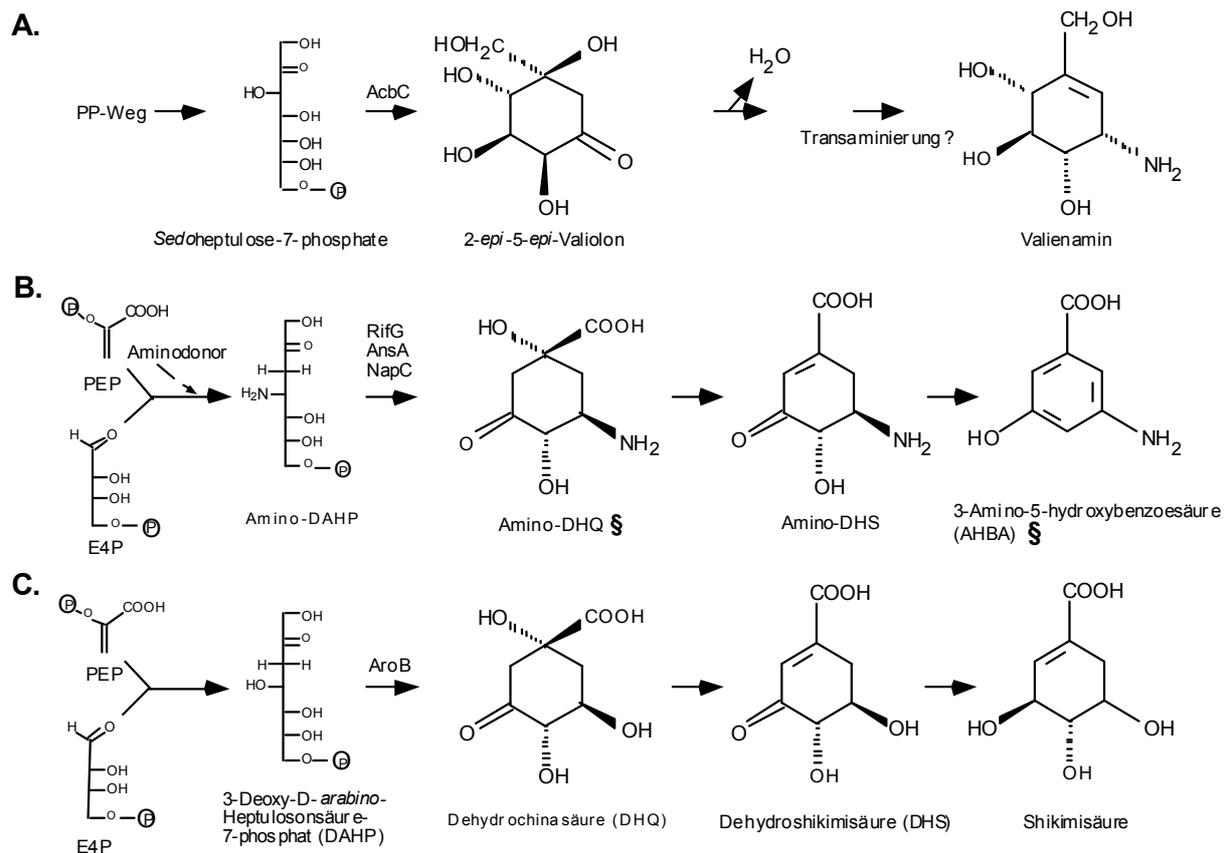
Die  $\alpha$ -Glucosidasen des Dünndarmbürstensaumes sind essentiell für die Verdauung von Kohlenhydraten, weil nur Monosaccharide in Dünndarm resorbiert werden können. Deswegen müssen alle Di- und Oligosaccharide in der Nahrung vor der Aufnahme im Dünndarm abgebaut werden. Die verminderte Resorption von Monosacchariden, und damit ein geringer postprandialer Anstieg des Blutzuckerspiegels führt zu einer modulierten Insulinantwort, die die direkte Auswirkung ist, wenn die Kohlenhydrat-Verdauung durch die Inhibierung von  $\alpha$ -glucosidasen (Saccharase,  $\alpha$ -Amylase, Maltase, usw.) mit Acarbose beeinflusst worden ist.

In pharmakokinetischen Untersuchungen zeigte sich, daß Acarbose den Dünndarm passiert und in unveränderter Form fast vollständig wieder ausgeschieden wird. Die Resorption freier Glucose wird durch Acarbose gehemmt und die Lipid- und Proteinaufnahme im Dünndarm beeinflusst. In medizinischen Studien konnte die Wirksamkeit von Acarbose hauptsächlich in der Therapie von Diabetes mellitus Typ II (nicht Insulin abhängig), aber auch beim Typ I (Insulin abhängig), gezeigt werden (Emilien et al. 1999; Mooradian und Thurman 1999; Yamamoto et al. 1999).

### 1.4 Acarbose-Stoffwechsel in *Actinoplanes* sp.

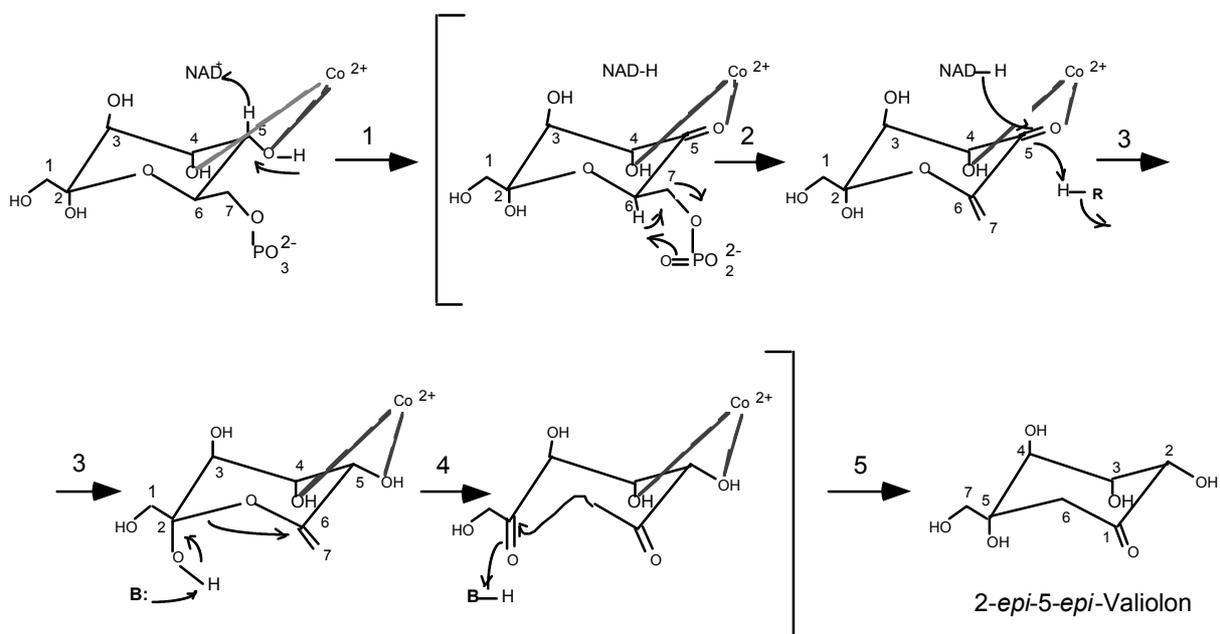
Zur Biosynthese von Acarbose in *Actinoplanes* sp. ist bisher nur wenig bekannt. Wahrscheinlich werden die Untereinheiten C<sub>7</sub>N-Cyclit, 4,6-Didesoxyppyranose und die Glucosemono- bzw. oligomere zuerst synthetisiert und dann miteinander verknüpft. Die Biosynthesestudien konzentrierten sich zunächst auf die Entstehung der “core-Einheit” bestehend aus dem Cycliten, der N-glycosidisch mit der Desoxyhexose verknüpft ist.

Der C<sub>7</sub>N-Cyclit von Acarbose ist identisch mit Valienamin, einer Komponente von Validamycin A (Abb. 1.1) und besteht aus einem Cyclohexan-Ring mit einer Hydroxymethyl-Gruppe und einer Aminogruppe in einer 1,3 (meta) Anordnung (Abb. 1.2 A). Diese m-C<sub>7</sub>N-Einheit kommt in modifizierter Form in zahlreichen anderen Sekundärstoffen wie z. B. Rifamycin, Mitomycin, Ansatrienin vor. Die Vorstufen für die Synthese solcher Cycliten entstammen dem Shikimisäure-Weg, der im Primärstoffwechsel für die Bereitstellung von aromatischen Aminosäuren verantwortlich ist (Abb. 1.2; August et al. 1998; Kim et al. 1998; Chen et al. 1999; Abou-Zeid et al. 1995; Frost und Draths 1995).



**Abb. 1.2: Vergleich der Valienamine-, AHBA- und Shikimisäure-Biosynthese-Wege.** (A.) Biosynthese-Weg des Valienamins in *Actinoplanes* sp. (Stratman et al. 1999); (B.) Postulierter Biosynthese-Weg der 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure in *Amycolatopsis mediterranei* (RifG) und *Streptomyces collinus* (AnsA und NapC) (August et al. 1998; Chen et al. 1999); (C.) Biosynthese-Weg der Shikimisäure in *E. coli*. § Markierte Substrate, die für Fütterungsexperimente in *Actinoplanes* sp. eingesetzt wurden.

In Fütterungsexperimenten mit den  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten 3-Aminodehydrochinasäure (ADHQ) und 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) (Abb. 1.2 B), konnte in Acarbose keine markierte dieser  $\text{C}_7\text{N}$ -Einheiten eingebaut werden, so dass eine Beteiligung des Shikimisäure-Weges, wie bei der Biosynthese des Validamycins, wahrscheinlich nicht vorliegt (Degwert et al. 1987; Floss 1997). Bei der Synthese der Acarbose wird  $^{13}\text{C}$ -Glycerin in den Valienamin-Rest (Degwert et al. 1987) eingebaut und L-Arabinose und D-Xylose konnten als mögliche Vorstufen des  $\text{C}_7$ -Cyclitols identifiziert werden (van Hülst 1985). Deswegen wurde die Cyclisierung eines Heptulose-Phosphats, das aus der Transketolase-Reaktion des Pentose-Phosphat-Wegs stammte, vorgeschlagen (Rinehart et al. 1992). Diese Hypothese wurde durch genetisch-biochemische Untersuchungen bewiesen (Stratmann 1997). Die  $\text{C}_7$ -Cyclit Synthase AcbC (Abb. 1.2) wurde heterolog produziert und mit diesem Enzym konnte die Cyclisierung von *Sedoheptulose-7-phosphat* nachgewiesen werden (Stratmann et al. 1999). Das AcbC Protein zeigt 26,8% Identität in der Aminosäuresequenz zum AroB Protein aus *Mycobacterium tuberculosis*, welches mit verschiedenen bakteriellen AroB Proteinen, die für 5-Dehydrochinasäuresynthasen kodieren, verwandt ist (DHQ-Synthase von *E. coli* oder ADHQ von *Amycolatopsis mediterranei* S699; Abb. 1.2). Durch die Kristallisation der Dehydrochinasäure-Synthase aus dem filamentösen Pilze *Emericella nidulans* konnten Aussagen über die molekularen Mechanismen der Reaktion gemacht werden (Carpenter et al. 1998) und auf die AcbC Reaktion übertragen werden (Abb. 1.3).



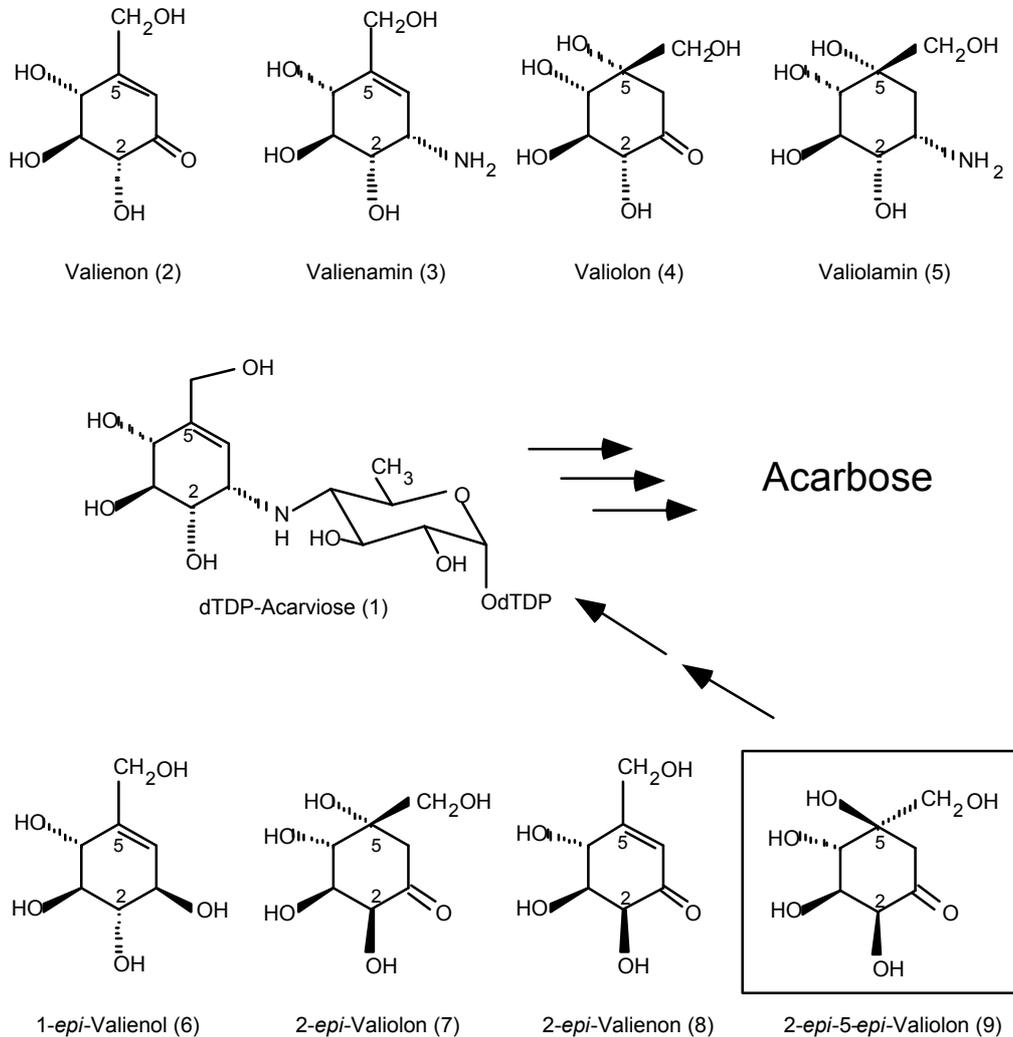
**Abb. 1.3 Möglicher Reaktionsmechanismus von AcbC.** (nach Carpenter et al. 1998; Stratmann et al. 1999). (1) Dehydrogenierung an C-5; (2) Phosphat Elimination; (3) Reduktion; (4) Öffnung des Ringes und Rotation von C-5-C-6; (5) Aldol-kondensation.

Als bevorzugte Hypothese zum Einbau des Stickstoffes in die Acarbose erschien die Transaminierung des Cycliten, wobei Valienamin (3) oder eine andere C<sub>7</sub>N-Einheit das Endprodukt der Reaktion hätte darstellen können (Abb. 1.4). Mit zellfreien Extrakten von *Actinoplanes* sp. wurde versucht, verschiedener  $\alpha$ -Ketosäuren mit Hilfe von Valienamin zu transaminieren. Es konnte aber keine Transaminierung nachgewiesen werden (Niehues 1991). Es ist zu vermuten, daß die erforderlichen optimalen Test-Bedingungen für die Aminotransferase nicht ermittelt werden konnten oder aber eine andere Verbindung das Produkt der Transaminierung des Cyclites sein könnte, wobei 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon, das Produkt der AcbC Reaktion, z. B. als Substrat hätte dienen können.

Wichtige Hinweise für die Entwicklung der Hypothese, welche Substanz der direkte Vorläufer für die Bildung von Acarviose darstellen könnte, erhielt man aufgrund von Fütterungsversuchen mit verschiedenen, Isotopen-markierten des C<sub>7</sub>-Cycliten bzw. deren aminierter Form (C<sub>7</sub>N) (Abb. 1.4, Mahmud et al. 1999). Die ersten Fütterungsexperimente wurden mit tritiiertem Valienon (2), dem sog. Gabosin, und dessen aminierter Form, Valienamin (3), und mit tritiiertem Valiolon (4) bzw. Valiolamin (5), durchgeführt (Abb. 1.4). Valienon (2) und Valienamin (3) weisen die gleiche Konfiguration des Cycliten auf wie die der Acarviosyl-Einheit und sollten deswegen direkt in Acarbose eingebaut werden. Valiolon (4) und Valiolamin (5) sind die in C5 hydroxilierten Vorstufen des Cycliten (2) und (3), welche vor den Einbau in der Acarviosyl-Einheit deshydratisiert werden müssen. Keine dieser genannten Cyclite wurde von *Actinoplanes* sp. in Acarbose eingebaut. Die Fermentationsmedien und zellfreien Extrakte von *Actinoplanes* sp. wurden analysiert, um die verschiedenen vorkommenden Cyclite zu identifizieren. Am Ende der Fermentation fand man jedoch signifikante Mengen von 1-*epi*-Valienol (6) vor. Es wurde vermutet, dass möglicherweise 1-*epi*-Valienol (6) ein Produkt des Acarboseabbaus sein könnte. Die Hypothese, dass 1-*epi*-Valienol (6) nach einer Phosphataktivierung an C1 mit dem Stickstoff des C4 der dTDP-4-Amino-4,6-didesoxyglucose verbunden werden könnte, wie es ähnlich in der Aristeromycin- und Neplanocin-Biosynthese bei *S. citricolor* postuliert wird (Hill et al. 1995), könnte auch für die Acarbose-Biosynthese plausibel sein. Ausgehend von dieser Annahme wurde dann [1-<sup>13</sup>C]-markiertes 1-*epi*-Valienol (6) gefüttert. Es konnte jedoch auch kein Einbau von 1-*epi*-Valienol (6) in Acarbose nachgewiesen werden (Mahmud et al. 1999).

Die Auswahl der Cyclite (Abb. 1.4;) 2, 3, 4, 5, und 6, die bisher in Fütterungsexperimente benutzt wurden, besitzen die gleiche Stereochemie an C2 wie der Cyclit in der Acarviosyl-Einheit. Das bedeutet, dass die C<sub>7</sub>-Cyclase entweder *ido*-Heptulose-7-phosphat verwendet oder aber *sedo*-Heptulose-7-phosphat, wobei dann allerdings gleichzeitig eine C5-Epimerisierung erfolgen müßte. Die Vermutung, dass das Reaktionsprodukt der C<sub>7</sub>-Cyclase eine andere Stereochemie an C2 oder C5 haben könnte, führte zu Einbaustudien unter Verwendung von 2-*epi*-Valiolon (7), 2-*epi*-Valienon (8) und 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon (9), welches das Cyclisierungsprodukt der AcbC Cyclase darstellt (Stratmann et al. 1999). In einem späteren Schritt müßte dann die C2-Epimerisierung erfolgen. Es konnte gezeigt

werden, dass das nur das Produkt des AcbC Enzyms, das C<sub>7</sub>-Cyclit 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon (9), eine Vorstufe für die Acarbosebiosynthese ist (Abb. 1.4; Mahmud et al. 1999). Auf welcher Stufe die Epimerisierung dann nachträglich erfolgt ist noch nicht geklärt.



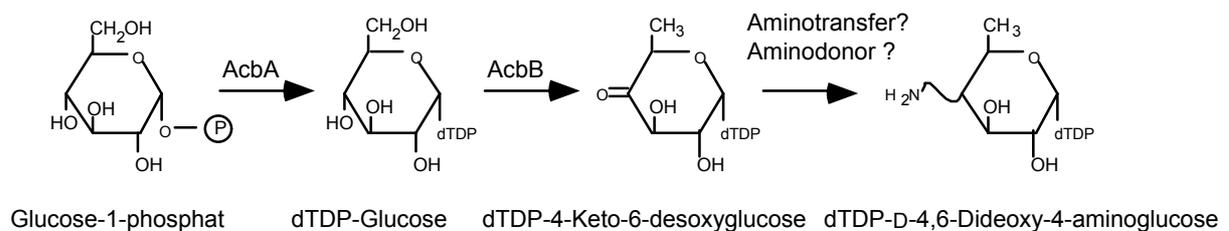
**Abb. 1.4 Acarviosylbiogenese.** Zusammenfassung der Fütterungsexperimente mit radioaktiven Cyclitolvorstufen. Die gerahmte Substanz wird in Acarbose eingebaut.

Die zweite Hypothese zum Einbau des Stickstoffes in die Acarbose war die Transaminierung der Carbonylfunktion von dTDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose. Rohextrakte unterschiedlich alter Zellen wurden auf Transaminase-Aktivität mit allen 21 proteinogenen Aminosäuren und auch mit D-Aminosäuren als Substrat untersucht (Niehues 1991). Es konnte keine Transaminierungsaktivität nachgewiesen werden. Natürlich besteht die Möglichkeit, daß dieses Enzym existiert, aber noch nicht die erforderlichen optimalen Test-Bedingungen ermittelt werden konnten.

Eine weitere offene Frage ist die Herkunft des Stickstoffes. Es wurde durch Fütterungsexperimente mit [<sup>15</sup>N]-markierten potentiellen Aminogruppen-Donoren festgestellt,

daß von allen getesteten Aminosäuren der  $\alpha$ -Aminostickstoff von Glutamat am effizientesten in Acarbose von den *Actinoplanes* sp. Zellen eingebaut wird (Lee und Egelkroust 1998).

Die Hypothese, dass die Biosynthese der Vorstufen von dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose ausgehend von Glucose-1-phosphat über einen aktivierenden Schritt (AcbA, dTDP-Glucose-Synthase Reaktion) und anschließender dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase Reaktion abläuft (AcbB; Abb. 1.5), wurde mit enzymatischen Untersuchungen unterstützt. In diesen Versuchen konnte eine dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase Aktivität, die mit der Acarbose-Production während der Fermentation korreliert, im Rohextrakt von *Actinoplanes* sp. nachgewiesen werden (Goeke 1986; Liedert 1991). Fütterungsexperimente mit [ $^{13}\text{C}$ ]-Glucose zeigten, daß der 4-Keto-6-desoxyzucker des Acarviosylrestes aus der Glucose stammt (van Hülst 1985). Dieser Biosyntheseweg der Vorstufen von Desoxyhexosen wurde mehrmals beschrieben (Liu und Thorson 1994; Piepersberg 1995; Piepersberg und Distler 1997; Verseck 1997; Liu und Rosazza 1998).



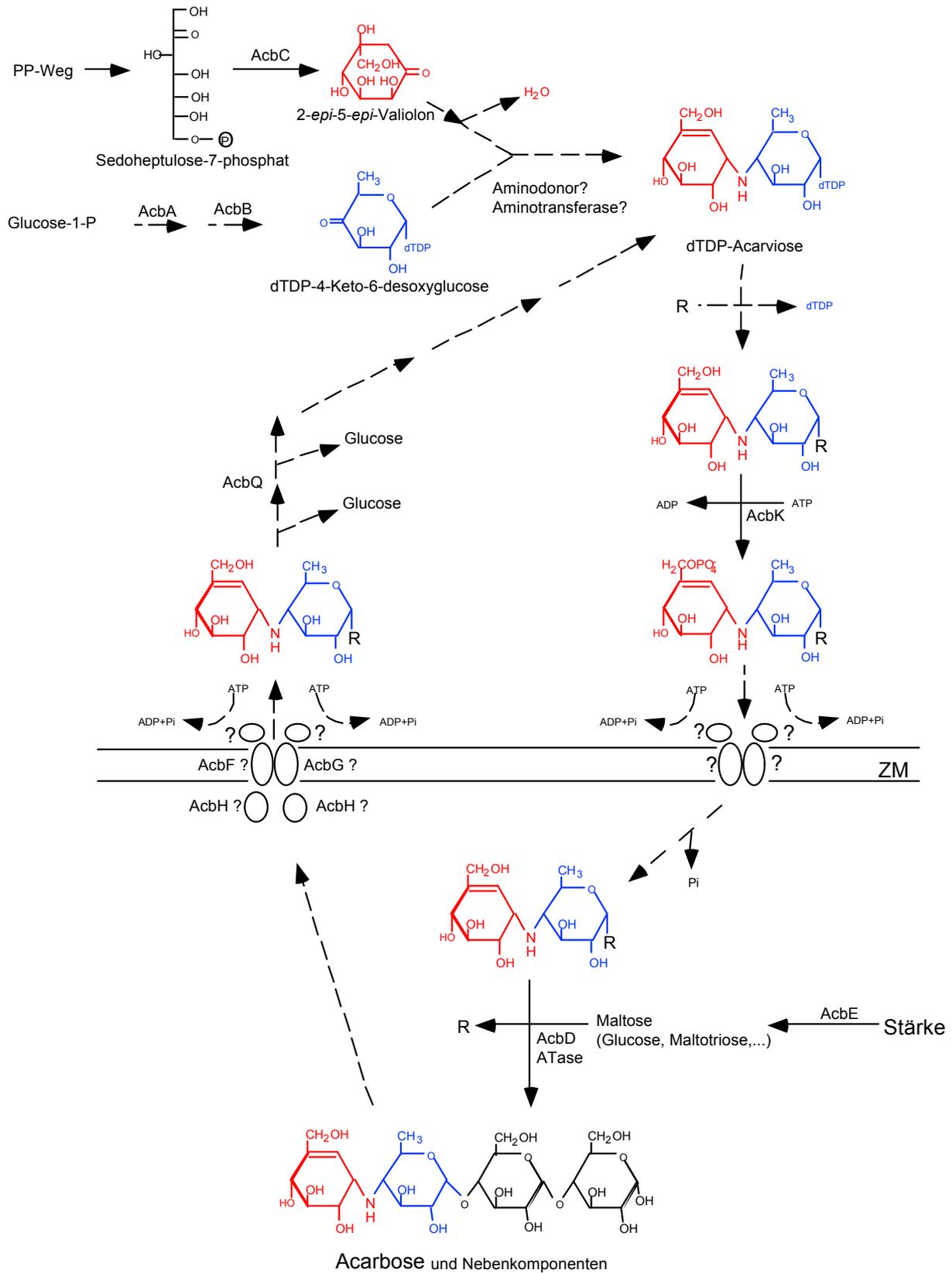
**Abb. 1.5: Biosynthese von dTDP-4-keto-6-desoxyglucose und möglicher Aminotransfer auf das Zuckermolekül.**

Eine Theorie zur Klärung des Mechanismus der Kondensation der beiden Einheiten,  $\text{C}_7\text{N}$ -Cyclit und 4-6-Didesoxypyranose, lieferte Schaper (1991) mit der Vermutung, daß die dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose vor der Verknüpfung mit dem Cycliten auf ein Lipidcarriermolekül übertragen werden könnte. Anlaß für diese Hypothese waren Experimente mit Tunicamycin, einem Antibiotikum, von dem bekannt ist, daß es spezifisch den Transfer von nucleotidgebundenen Zuckern auf Lipidcarrier inhibiert. Ein Zusatz von Tunicamycin zum Fermentationsmedium zu einem Zeitpunkt starker Acarboseproduktionsrate resultierte in einer deutlichen Abnahme der Acarbosebildung. Beispiele für derartige Carrier finden sich bei der Synthese der bakteriellen Zellwand, wobei Undecaprenylphosphat, ein in der Membran verankertes  $\text{C}_{55}$ -Isoprenoid an der Verknüpfung des Muraminsäurepentapeptides mit *N*-Acetylglucosamin beteiligt ist (Höltje und Schwarz 1985; Lennarz und Scher 1972; Raetz 1996). Alternativ könnte die Biosynthese des primären Endproduktes, beziehungsweise Acarbose und Nebenkomponenten, intrazellulär ablaufen und anschließend durch einen speziellen Transporter, wie für andere Sekundärmetabolite, z. B. Erythromycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Oleandomycin usw., beschrieben worden ist (Fath und Kolter 1993; Ross et al. 1990; Guilfoile und Hutchinson 1991; Rodriguez et al. 1993), ausgeschleust werden.

Die biologische Bedeutung der Acarbose- und Nebenkomponenten-Produktion bei *Actinoplanes* sp. ist unbekannt. Es konnte gezeigt werden, daß die  $\alpha$ -Amylase AcbE (Abb. 1.6; Abb. 1.7 und Tab. 1.1) in Gegenwart von 1mM Acarbose, Stärke hydrolysiert, wohingegen diese Acarbose-Konzentration andere  $\alpha$ -Amylasen aus anderen Organismen vollständig hemmt (Stratmann 1997; Hemker 1997). Diese Produkte des Stärkeabbaus könnten durch die Aktivität der Acarviosyltransferase (AcbD, Abb. 1.6; Abb. 1.7 und Tab. 1.1), welche von Hemker (1997) und Stratmann (1997) beschrieben wurde, mit dem Acarbiose-Rest verknüpft werden. Die entstandenen Pseudooligosaccharide könnten dann durch ein spezifisches Aufnahmesystem in die Zellen von *Actinoplanes* sp. aufgenommen werden, um sich dadurch einen Vorteil gegenüber konkurrierenden Mikroorganismen bei der Erschließung von C-Quellen zu verschaffen. Möglicherweise sind die Genprodukte von *acbG*, *acbF* (Stratmann 1997) und *acbH* (M. Jahrling, persönliche Mitteilung) die Komponenten eines solchen spezifischen Aufnahmesystems (Tab. 1.1), das ähnlich zu dem Maltose-Maltodextrin Aufnahmesystem (*malEFG*) von *Streptomyces coelicolor* ist (van Wezel et al. 1997). Es konnte allerdings kein Leserahmen für ein Protein mit einer ATP-spaltenden ABC-Domäne gefunden werden. In *S. lividans* und *S. reticuli* konnte ein unspezifisches ATP-spaltendes Enzym (MsiK), nachgewiesen werden, das an einer separaten Stelle im Genom und ebenfalls nicht benachbart zu den Genen für die weiteren Komponenten eines ABC-Aufnahmesystems liegt und das die Energie für die spezifischen Cellobiose- bzw. Maltose-Aufnahmesysteme dieser beiden Streptomyceten liefert (Schlösser et al. 1997). Es wurde gezeigt, daß Acarbose ein kompetitiver Inhibitor der Maltose-Aufnahme in *E. coli* ist (Brunkhorst et al. 1999). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese eines Aufnahmesystems, das zu dem Maltose-Maltodextrin Aufnahmesystem MalEFGK2 von *E. coli* (Boos und Shuman 1998) ähnlich sein könnte (Abb. 1.6; Abb.1.7).

Eine Acarbose-7-Phosphotransferase wurde in *Actinoplanes* identifiziert und charakterisiert (Goeke et al. 1996; Drepper und Pape 1996). Dieses Enzym (AcbK, siehe Abb. 1.6; Tab. 1.1) zeigt eine hohe Spezifität für Acarbose obwohl ihre biologische Funktion bisher nicht geklärt werden konnte. Da die intrazelluläre Maltase von *Actinoplanes* sp. durch Acarbose inhibiert wird, hingegen unempfindlich gegen Acarbose-7-Phosphat ist, wird eine Art Resistenzmechanismus diskutiert oder aber eine Funktion in der Wiederaufnahme der Acarbose und der Nebenkomponenten diskutiert.

Das *acbQ* Genprodukt könnte nach Aufnahme von Maltodextrinen oder aber von Acarbose und deren Nebenkomponenten die Rolle einer Maltodextrin-Glucanotransferase (Amylomaltase) übernehmen, wie es bei dem MalQ Protein in *E. coli* der Fall ist, und aus Maltodextrinen Glucose freisetzen. Der Acarviosylrest könnte durch eine Phosphorylase, entsprechend dem MalP Protein in *E. coli* (Boos und Shuman 1998), freigesetzt werden und durch eine Nukleotidaktivierung der Acarviosyl-Einheit regeneriert werden. Solch eine Phosphorylase ist jedoch noch nicht bei *Actinoplanes* sp. nachgewiesen worden.



**Abb. 1.6 Modell Acarbose-Stoffwechsel bei *Actinoplanes* sp.:** Erklärung siehe Text 1.4. R = Glucose oder Oligosaccharide; postulierte Reaktionen sind durch gestrichelte Linien markiert.

### 1.5 Das Acarbose-Biosynthesecluster

Mittels Hybridisierung mit dem *strE*-Gen des Streptomycin-Biosyntheseclusters aus *S. griseus* als DNA-Hybridisierungsprobe können DNA-Bereiche, die für die Synthese von Desoxyhexosen kodieren, in der genomischen DNA von Actinomyceten identifiziert werden (Piepersberg 1994; Stockmann und Piepersberg 1992). Mit Hilfe dieses für eine dTDP-Glucose-4,6-dehydratase codierenden Gens wurde ein verwandtes Gen (*acbB*), dessen Genprodukt an der postulierten Acarbose Biosynthese beteiligt sein könnte, in der chromosomalen DNA von *Actinoplanes* sp. identifiziert und der benachbarte DNA-Bereiche kloniert, sequenziert und weiter analysiert (Stratmann 1997). Unter der Voraussetzung, daß die kodierenden DNA-Bereich, die für die Produktion von Sekundärmetaboliten verantwortlich sind, in sog. "Clustern" gruppiert sind (Malpartida und Hopwood 1986), wurde vermutet, dass die von Stratmann (1997) identifizierten Leserahmen für Proteine, die an der Bildung der Acarbose beteiligt sein könnten, kodieren. Tab. 1.1 enthält alle bisher bekannten Gene des Acarbose-Genclusters.

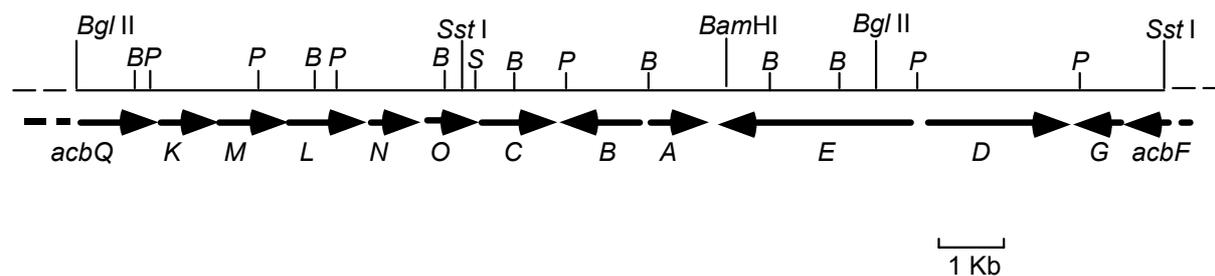


Abb. 1.7 Das Acarbose-Biosynthesecluster (Stratmann 1997). P = *Pst*I; B = *Bam*HI; S = *Sst*I.

Tab. 1.1 Gene des Acarbose-Biosynthesecluster.

| Gen         | (mögliche) Funktion                                   | Evidenz(a) | Referenz(b) |
|-------------|---|------------|-------------|
| <i>acbA</i> | dTDP-Glucosesynthase                                  | s          | 1, 2, 3     |
| <i>acbB</i> | dTDP-Glucose-4,6-dehydratase                          | s, e       | 1, 4, 5     |
| <i>acbC</i> | C7-Cyclitolcyclase                                    | s, e       | 1, 6        |
| <i>acbD</i> | Acarviosyltransferase                                 | s, e       | 1, 7        |
| <i>acbE</i> | $\alpha$ -Amylase                                     | s, e       | 1, 7        |
| <i>acbF</i> | Membrankomponente eines Kohlenhydrat-ABC-Transporters | s          | 1           |
| <i>acbG</i> | Membrankomponente eines Kohlenhydrat-ABC-Transporters | s          | 1           |
| <i>acbK</i> | Acarbose-7-kinase                                     | s, e       | 9, 10       |
| <i>acbL</i> | (Polyol-) Dehydrogenase                               | s          | 8           |
| <i>acbM</i> | unbekannt   | s          | 8           |
| <i>acbN</i> | unbekannt   | s          | 8           |
| <i>acbO</i> | unbekannt   | s          | 8           |
| <i>acbQ</i> | Amylomaltase  | s          | 1           |

a) Abkürzungen: s = Aminosäuresequenzvergleich mit Proteindatenbanken; e = Enzymcharakterisierung.

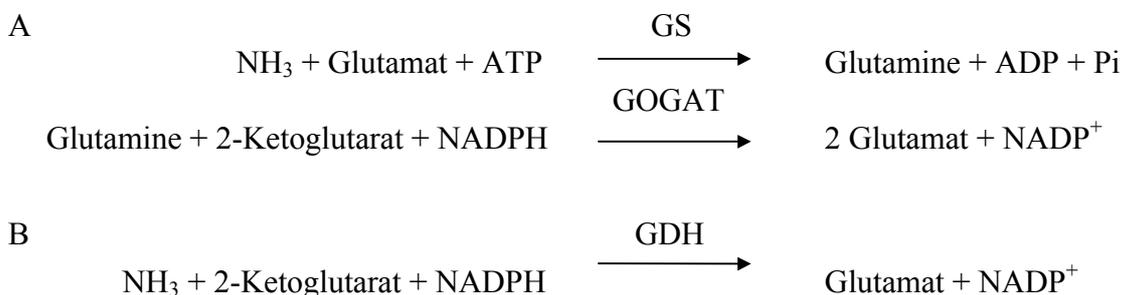
b) 1 = Stratmann (1997); 2 = Piepersberg (1995); 3 = Piepersberg und Distler (1997); 4 = Goeke (1986); 5 = Liedert (1991); 6 = Stratmann et al. (1999); 7 = Hemker (1997); 8 = M. Jahrling (pers. Mitteilung); 9 = Goeke et al. (1996); 10 = Drepper und Pape (1996).

## 1.6 Zur Regulation des Acarbose-Biosyntheseengclusters

Die ersten Versuche zur Regulation der Expression von Enzymen des Acarbose-Stoffwechsels bei *Actinoplanes* sp. wurden von Stratmann (1997) durchgeführt. Die Induktion der Expression der Acarviosyltransferase (AcbD) und der  $\alpha$ -Amylase (AcbE) in einem Vollmedium durch Maltose und Maltotriose konnte in einer SDS-PAGE sichtbar gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Induktionsmechanismus nicht durch Glucose reprimierbar war. In den intercistronischen Bereichen zwischen den Genen *acbA* - *acbB* und *acbE* - *acbD* konnte das Hexanucleotid 5' C/A TTGC T/A 3' nachgewiesen werden. Solche vergleichbaren Strukturen sind auch in den regulatorischen Regionen von Genen des Stärke- bzw. Maltose-Stoffwechsels anderer Bakterien vorhanden und eine Beteiligung dieser Sequenzen an der Regulation des Maltose-Aufnahmesystems bei *Streptomyces coelicolor* wird diskutiert (Wezel et al. 1997b). Die Aufklärung der Funktion der Hexanucleotid-Sequenzen muss noch untersucht werden.

## 1.7 Stickstoff-Assimilation

Die Beobachtung einer Abnahme der Acarbose-Produktion bei hoher Ammoniumaccumulation im Medium (A. Crueger, pers. Mitteilung), machte eine Untersuchung der Stickstoff-Regulation bei *Actinoplanes* sp. sinnvoll. Ähnliche Effekte konnten bei der Cephalosporin-Produktion bei *Streptomyces clavuligerus* (Buscaran et al. 1989) und bei der Teicoplanin-Produktion bei *Actinoplanes teichomyceticus* (Heydorn et al. 1999) beobachtet werden. Die zuständigen Enzyme der Amoniumassimilation sind die Glutamin-Synthetase (GS), die Glutamat-Synthase (GOGAT) und die Glutamat-Dehydrogenase (GDH), wobei der GS/GOGAT Biosynthese-Weg ubiquitär bei Bakterien ist (Abb. 1.8).



**Abb. 1.8 Reaktionen der Amoniumassimilation in Bakterien.** (A) GS/GOGAT Biosynthese-Weg; (B) GDH Biosynthese-Weg.

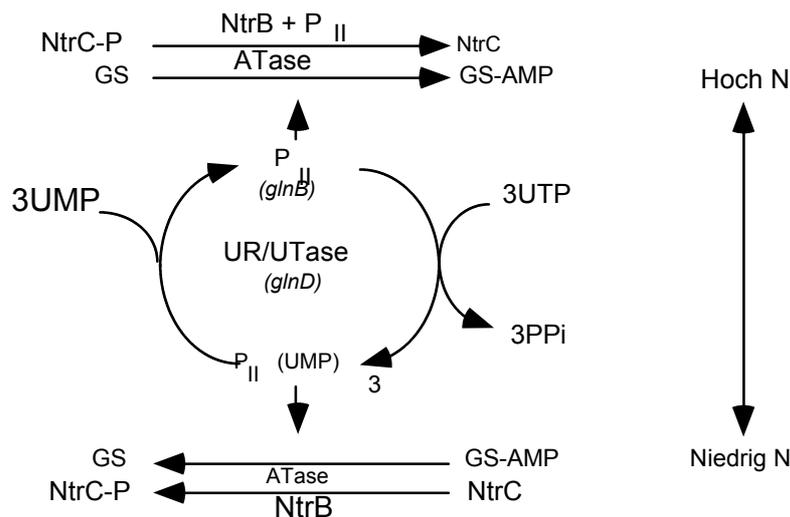
Es wurden mehrere Glutamin-Synthetasen identifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß manche durch Adenylierung postranslational modifiziert und damit reguliert werden können. Diese Eigenschaft wird für ihre Zuordnung benützt (Tab. 1.2).

**Tab. 1.2 GS Enzyme in Prokaryonten.** (Merrick und Edwards 1995)

| Enzym | Gen          | Größe <sup>a</sup> kD | Nr <sup>a</sup> | Merkmal         | Modifikation <sup>b</sup>                                     | Verbreitung   |
|-------|--------------|-----------------------|-----------------|-----------------|---|---|
| GSI   | <i>glnA</i>  | 55                    | 12              | Hitze stabil    | Adenylierung <sup>b</sup> ,<br>ADP-ribosilierung <sup>c</sup> | Fast ubiquitär  |
| GSII  | <i>glnII</i> | 36                    | 8               | Hitze labil     | Möglich <sup>d</sup>  | <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> ,<br><i>Agrobacterium</i> ,<br><i>Streptomyces</i> , <i>Frankia</i> spp.                               |
| GSIII | <i>glnA</i>  | 75                    | 6               | NB <sup>e</sup> | NB  | <i>Bacteroides</i> , <i>Butyrivibrio</i> ,<br><i>Synechocystis</i> ,<br><i>Synechococcus</i> , <i>Gleocapsa</i> ,<br><i>Pseudoanabaena</i> spp. |
| GlnT  | <i>glnT</i>  | 47                    | 8               | Hitze stabil    | ADP-ribosilierung <sup>g</sup>                                | <i>Rhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> spp.  |

<sup>a</sup> Untereinheit; <sup>b</sup> Nicht bei Cyanobakterien beschreiben; <sup>c</sup> In *R. rubrum*, *Streptomyces griseus* und *Synechocystis* spp.; <sup>d</sup> In *R. leguminosarum*; <sup>e</sup> NB Nicht bekannt; <sup>f</sup> Auch GSIII genannt; <sup>g</sup> In *R. meliloti*.

Die Synthese dieser Proteine, und teilweise deren Aktivität, ist Nährstoff abhängig und deswegen stark reguliert. Die allgemeine Stickstoff-Regulation, das so genannte *ntr*-System, wurde ausführlich bei der Familie *Enterobacteriaceae* untersucht (Abb. 1.9; Merrick und Edwards 1995). Dieses Regulationssystem besteht aus vier Enzymen: eine Uridylyltransferase (UTase/UR; *glnD*), ein kleines Trimere-bildendes Protein (P<sub>II</sub>; *glnB*), eine Histidin-Kinase (NtrB; *ntrB*) und ein DNA-Bindeprotein (NtrC; *ntrC*). Bei limitierenden Stickstoff-Bedingungen transferiert das UTase Enzym auf einen Tyr Rest des P<sub>II</sub> Enzyms eine Uridylyl-Gruppe. Das uridylierte P<sub>II</sub> fördert einerseits die Deadenylierung des GS Enzyms in seine aktive Form durch eine Adenylyl-Transferase (ATase; *glnE*), und andererseits die Phosphorylierung des NtrC Enzym durch die Histidin-Kinase NtrB. Nur durch die phosphorylierte Form des NtrC wird die Transkription des *glnA* (GSI) aktiviert (Abb. 1.9).



**Abb. 1.9: Stickstoff-Regulation der Familie *Enterobacteriaceae* (*ntr*-System).** UTase/UR (*glnD*) = Uridylyltransferase; P<sub>II</sub> (*glnB*) = Trimere-bildendes Protein; NtrB (*ntrB*) = Histidin-Kinase; NtrC (*ntrC*) = DNA-Bindeprotein; NtrC-P = phosphoryliertes DNA-Bindeprotein, aktiviert die GS Transkription; GS = aktive Glutamin-Synthetase; GS-AMP = adenylierte und dadurch inaktive Glutamin-Synthetase.

Die Stickstoff-Regulation wurde in Actinomyceten bisher wenig untersucht. GSI und GSII konnten in manchen Streptomycceten identifiziert werden. Beide Enzyme wurden aus *S. hygrocopicus* (Kumada et al. 1990), *S. viridochromogenes* (Hillemann et al. 1993), *S. coelicolor* und *S. griseus* (Fink et al. 1999) kloniert und sequenziert, und mittels "Southern" Hybridisierung bei *S. cattleya*, *S. parvulus*, *S. lividans* und *S. galilaeus* identifiziert (Behrmann et al. 1990). Es konnte auch gezeigt werden, daß für die Transkription des *glnA* Gens in *S. coelicolor* ein einziges Gen, *glnR*, das "upstream" von *glnA* liegt, notwendig ist (Lewis V. Wray et al. 1991). Die Sequenz des *glnR* Gens zeigte Homologien mit DNA-Binde-Proteinen. Mit Hilfe der PCR-Methode konnten *ntr*-ähnliche Strukturen (*glnE*, *ntrC* und *glnB*) bei *S. coelicolor* identifiziert werden (E. Engels, persönliche Mitteilung). Die Aktivität des Proteins GlnE aus *S. coelicolor* konnte als eine Adenylyl-Transferase, entsprechend GlnE aus *E. coli* (Merrick und Edwards 1995), zum ersten mal in einem Vertreter der Gram + Bakterien identifiziert werden (Fink et al. 1999).

### 1.8 Ziele der Arbeit

Mit Hilfe der Identifizierung von Acarbose-Biosynthesegenen und der Entschlüsselung der biochemischen Grundlagen des Acarbose-Stoffwechsels in *Actinoplanes* sp., könnte die industrielle Produktion von Acarbose durch Methoden eines biochemisch-molekularbiologisches "Engineering" in Zukunft optimiert oder auch eine biokombinatorische Methodik zur Synthese neuer Naturstoffe aufgebaut werden. Ziele dieser Arbeit sind:

1. Suche nach Aminotransferasegenen innerhalb oder in benachbarten DNA-Bereichen des Acarbose-Biosynthesegenclusters.
2. Suche nach einem Acarbose-spezifischen Aminotransferasegen, welches für ein Protein kodiert, das den Einbau des Stickstoffes in die Vorläufer katalysiert.
3. Aufklärung, welches die aminierte Vorläufersubstanz für die Synthese der Acarviose ist und welches Co-Substrat dabei benötigt wird.
4. "Screening" nach potentiellen Glutaminsynthetasen und deren Beteiligung bei der Acarbose-Biosynthese.
5. Entwicklung einer "Screening"-Methode, um homologe Acarbose-Biosynthesegene in anderen Actinomyceten identifizieren zu können.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen.

#### Chemikalien

|  |   |
|--|---|
| Agarose                                | Boehringer (Mannheim)   |
| Antibiotika                            | Boehringer (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Squibb and Sons (Princeton, USA)        |
| Blocking-Reagenz                       | Boehringer (Mannheim)   |
| Chemikalien, p.A. Qualität             | Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)    |
| dNTP                                   | Boehringer (Mannheim)   |
| Fluoreszenz markierte Sequenzierprimer | MWG Biotech, Interactiva  |
| Hybond-N <sup>+</sup> Nylon-Membranen  | Amersham Buchler (Braunschweig)   |
| Jet-Sorb-Kit                           | Genomed (Bad Oeynhausen)  |
| Medienbestandteile                     | Difco (Detroit, USA) Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe) |
| Qiagen-Plasmid-Kit                     | Qiagen (Hilden)   |
| Qiagen-Gel Extraction Kit              | Qiagen (Hilden)   |
| Qiagen-PCR Purification Kit            | Qiagen (Hilden)   |
| Radiochemikalien                       | Amersham Buchler (Braunschweig)   |
| Röntgenfilme                           | Amersham Buchler (Braunschweig)   |
| Thermosequenase Cycle-Sequence Kit     | Amersham Pharmacia (Freiburg)   |

#### Enzyme

|                                       |                                |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| Alkalische Phosphatase (CIP)          | Roche Diagnostics (Mannheim)   |
| DIG Nucleic Acid Detection Kit        | Roche Diagnostics (Mannheim)   |
| DIG DNA Labelling Kit                 | Roche Diagnostics (Mannheim)   |
| DNA-Polymerase I Klenow-Fragment      | Life Technologies (Eggenstein) |
| DNase I (RNase frei)                  | Roche Diagnostics (Mannheim)   |
| Double-stranded Nested Deletion-Kit   | Amersham Pharmacia (Freiburg)  |
| $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase | Sigma (Deisenhofen)            |
| Lysozym                               | Serva (Heidelberg)             |

|  |   |
|--|---|
| Restriktionsendonukleasen                    | New England Biolabs (Schwalbach), Roche<br>Diagnostics (Mannheim), Life Technologies<br>(Eggenstein), Amersham Pharmacia (Freiburg) |
| Rediprime Random Primer Labelling-Kit        | Amersham Buchler (Braunschweig)   |
| Ribonuklease A                               | Sigma (Deisenhofen)   |
| Succinat Semialdedehyde Dehydrogenase        | Sigma (Deisenhofen)   |
| T4-DNA-Ligase (einschl. Puffer)              | Life Technologies (Eggenstein)  |
| T4-Polynukleotidkinase (einschl. Puffer)     | New England Biolabs (Schwalbach)  |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (einschl. Puffer) | Life Technologies (Eggenstein)  |
| Transketolase                                | Sigma (Deisenhofen)   |
| Vent-DNA-Polymerase (einschl. Puffer)        | New England Biolabs (Schwalbach)  |
| Western-Blot-Kit                             | Roche Diagnostics (Mannheim)  |

## 2.2 Medien und Lösungen

### 2.2.1 Verwendete Medien

#### Medien für *E.coli*:

|                           |                |
|---------------------------|----------------|
| LB-Medium                 | (Miller 1972)  |
| LB-Agar (LB+1,5% Agar)    |                |
| SOB-Medium                | (Hanahan 1983) |
| SOC-Medium                | (Hanahan 1983) |
| M9+CA-Medium              | (Moore 1992)   |
| TBYE-Medium               | (Moore 1992)   |
| Tryptone-Phosphate-Medium | (Moore 1992)   |
| TB-Medium                 | (Miller 1972)  |
| Top-Agar                  | (Miller 1972)  |
| LT-Agar                   | (Miller 1972)  |

#### Medien für Streptomyceten und *Actinoplanes sp.*:

|                |                             |
|----------------|-----------------------------|
| SMA-Agar       | (Distler et al. 1985)       |
| SPMR-Agar      | (Babcock und Kendrick 1988) |
| Spurenelemente | (Hopwood et al. 1985)       |
| TSB-Medium     | (Hopwood et al. 1985)       |
| TSB-PEG 8000   | (Babcock, Kendrick 1988)    |
| YEME-Medium    | (Hopwood et al. 1985)       |

## Acarbose-Produktionsmedium

(Stratmann, 1997)

|             |                                       |        |
|-------------|---------------------------------------|--------|
| Lösung I:   | MD-50                                 | 70 g   |
|             | (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>     | 5 g    |
|             | Hefeextrakt                           | 2 g    |
|             | ad 400 ml mit H <sub>2</sub> O        |        |
| Lösung II:  | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 1 g    |
|             | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 1 g    |
|             | Tri-Natriumcitrat                     | 5 g    |
|             | ad 400 ml mit H <sub>2</sub> O pH 7,0 |        |
| Lösung III: | MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O | 1 g    |
|             | FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O | 0,25 g |
|             | CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 2 g    |
|             | ad 200 ml mit H <sub>2</sub> O        |        |

die Lösungen wurden gemischt und anschließend sterilfiltriert.

## SC-Medium

(Stratmann, 1997)

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 0.5 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0.25 g |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O | 0.5 g  |
| Glucose                               | 10 g   |
| Pepton                                | 5 g    |
| ad 950 ml mit H <sub>2</sub> O pH 7.0 |        |

nach dem Autoklavieren dazugeben:

|           |   |
|-----------|---|
| Asparagin | 0.5 g in 50 ml H <sub>2</sub> O sterilfiltriert |
|-----------|---|

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Kulturmedien bei Bedarf entsprechend den Plasmid-resistenzmarkern mit 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Chloramphenicol, 4 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml Kanamycin oder 25 µg/ml Thiostrepton supplementiert.

## 2.2.2 Verwendete Lösungen

## TBE (10 x) (Sambrook et al. 1989)

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Tris/HCl            | 108 g/l |
| Borsäure            | 55 g/l  |
| 0,5 M EDTA (pH 8,0) | 80 ml   |
| pH                  | 8,3     |

## SSC (20 X) (Sambrook et al. 1989)

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| NaCl                        | 3 M   |
| Natriumcitrat               | 0,3 M |
| pH (mit Citrat eingestellt) | 7,0   |

## TAE (50 x) (Sambrook et al. 1989)

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Tris/HCl            | 242 g/l |
| Eisessig            | 57 ml   |
| 0,5 M EDTA (pH 8,0) | 100 ml  |

## TE (10 x) (Sambrook et al. 1989)

|          |        |
|----------|--------|
| Tris/HCl | 100 mM |
| EDTA     | 10 mM  |
| pH       | 8,0    |

**Hybridisierungslösung I**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| SSC                      | 6 x   |
| Na-Phosphatpuffer pH 6,8 | 10 mM |
| EDTA                     | 1 mM  |
| SDS                      | 0,5%  |
| Blocking-Reagenz         | 0,1%  |

**Hybridisierungslösung II**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| SSC               | 6 x   |
| N-Lauroylsarcosin | 0,1%  |
| SDS               | 0,02% |
| Blocking-Reagenz  | 1%    |

**Western-Blot Puffer**

|          |          |
|----------|----------|
| Tris/HCl | 15,1 g/l |
| Glycin   | 72 g/l   |
| SDS      | 0,1%     |

**TBS Puffer**

|          |        |
|----------|--------|
| Tris/HCl | 10 mM  |
| NaCl     | 150 mM |
| pH       | 7,5    |

**SM Puffer**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Tris/HCl          | 10 mM |
| MgSO <sub>4</sub> | 10 mM |
| Gelatine          | 0,01% |
| pH                | 7,4   |

**Ninhydrin-Reagenz**

|              |           |
|--------------|-----------|
| Sprühlösung: |           |
| Ninhydrin    | 0,2 g     |
| Ethanol      | ad 100 ml |

**Aufschlußpuffer I**

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Tris              | 50 mM   |
| MgCl <sub>2</sub> | 10 mM   |
| EDTA              | 1 mM    |
| DTT               | 1 mM    |
| PLP               | 0,02 mM |
| pH                | 7,5     |

**Aufschlußpuffer II**

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Kaliumphosphat    | 20 mM   |
| β-Mercaptoethanol | 0,01%   |
| EDTA              | 1 mM    |
| PLP               | 0,02 mM |
| pH                | 7,2     |

## 2.3 Bakterien und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2.1, Phagen und Plasmide in Tab. 2.2 und 2.3 aufgelistet.

**Tab. 2.1 Verwendete Bakterienstämme**

| Stamm                                      | genetische und phänotypische Eigenschaften   | Referenz                  |
|--|--|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$       | $\phi$ 80d, <i>lacZ</i> $\square$ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , ( $r_k^- m_k^-$ ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\lambda$ , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\square$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169   | Hanahan 1983              |
| <i>E. coli</i> JM109                       | F' <i>traD36</i> , <i>lacI<sup>Q</sup></i> , <i>lacZ</i> $\square$ M15, <i>proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup></i> ( <i>McrA<sup>-</sup></i> ); $\square$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^- m_k^-$ ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>recA1</i> | Yanisch-Perron 1985       |
| <i>E. coli</i> NM539                       | <i>supF</i> , <i>hsdR</i> , <i>lacY</i> , (P2 <i>cox</i> )   | Frischauf et al. 1983     |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS              | <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> ( $r_B^- m_B^-$ ), $\lambda$ Prophage mit T7 RNA Polymerasegen, pLysS, <i>cat</i>   | Studier et al. 1990       |
| <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'               | <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> (F' <i>proAB lac<sup>Q</sup> Z</i> $\square$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ))  | Bulloock et al. 1987      |
| <i>E. coli</i> LE392                       | F <sup>-</sup> , <i>hsdR574</i> ( $r_k^- m_k^-$ ), <i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>lacII</i> ( $\square$ ( <i>lacIZY</i> ) <sub>6</sub> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>metB1</i> , <i>trpR55</i> )   | Sambrook et al. 1989      |
| <i>Actinoplanes</i> sp. 50/110             | Acarboseproduzent  | ATCC 31044                |
| <i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.0      | Wildtyp, 5'-Hydroxystreptomycinproduzent   | ETH22794; Ono et al. 1983 |
| <i>S. lividans</i> 66 TK 23                | Actinorhodin, <i>spc-1</i><br>Prodigiosinproduzent CDA   | Hopwood et al. 1985       |
| <i>S. lividans</i> 1326                    | Wildstamm  | Hopwood et al. 1985       |
| <i>S. dimorphogenes</i>                    | Trestatinproduzent   | ATCC 31484                |
| <i>S. dimorphogenes</i>                    | Trestatinproduzent   | ATCC 31485                |
| <i>S. hygroscopicus</i> sp <i>limoneus</i> | Validamycinproduzent   | ATCC 21431                |
| <i>S. hygroscopicus</i> sp <i>limoneus</i> | Validamycin produzent  | ATCC 21432                |
| <i>S. calvus</i>                           | Adiposinproduzent  | ATCC 31478                |
| <i>S. myxogenes</i>                        | Oligostatinproducent   | ATCC 31305                |

**Tab. 2.2 Verwendete Phagen und Plasmide**

| Phage/Plasmid   | Genotyp/ Eigenschaften/Verwendung   | Referenz                  |
|-----------------|---|---------------------------|
| λGEM-12         | Herstellung eine <i>Actinoplanes</i> sp. DNA-Bibliothek   | Jarling, M., Wuppertal    |
| λGEM-24SMAT1    | ca. 14 kb-Fragment genomischer DNA von <i>Actinoplanes</i> sp.  | diese Arbeit              |
| λGEM-1GSI       | ca. 16 kb-Fragment genomischer DNA von <i>Actinoplanes</i> sp.<br>aus der <i>glnA</i> -Region                                   | diese Arbeit              |
| λGEM-1GSI II    | ca. 15 kb-Fragment genomischer DNA von <i>Actinoplanes</i> sp.<br>aus der <i>glnII</i> -Region                                  | diese Arbeit              |
| pBlueScript KS+ | <i>bla</i> , <i>lacZ</i> -α, Klonierungsvektor  | Stratagene, Heidelberg    |
| pET11a          | <i>bla</i> , T7 ø 10, <i>E. coli</i> Expressionsvektor  | Rosenberg et al. (1987)   |
| pET16b          | <i>bla</i> , T7 ø 10, <i>E. coli</i> Expressionsvektor  | Rosenberg et al. (1987)   |
| pUC18           | <i>bla</i> , <i>lacZ</i> -α, Klonierungsvektor  | Vieira und Messing (1982) |
| pUC19           | <i>bla</i> , <i>lacZ</i> -α, Klonierungsvektor  | Vieira und Messing (1982) |
| pUCBM21         | <i>bla</i> , <i>lacZ</i> -α, Klonierungsvektor  | Vieira und Messing (1982) |
| pUCPU21         | <i>bla</i> , <i>lacZ</i> -α, Klonierungsvektor  | Wehmeier U., Wuppertal    |
| pSVW701         | <i>bla</i> , heterologe Expression von RbFB   | Verseck, S., (1997)       |
| pJOE2702        | <i>bla</i> , <i>rrnB</i> , <i>rhaP</i> , <i>E. coli</i> Expressionsvektor   | Volff, et al (1996)       |
| pJOE2775        | <i>bla</i> , <i>rrnB</i> , <i>rhaP</i> , <i>E. coli</i> Expressionsvektor   | Volff, et al (1996)       |
| pUWL201         | <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>Streptomyces-E. coli</i> „shuttle“-Plasmid,<br><i>Streptomyces</i> Expressionsvektor               | Wehmeier U., Wuppertal    |
| pUWL201 RBS II  | <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>Streptomyces-E. coli</i> „shuttle“-Plasmid,<br><i>Streptomyces</i> Expressionsvektor               | Weingarten P., Wuppertal  |
| pUWL218         | <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>Streptomyces-E. coli</i> „shuttle“-Plasmid   | Wehmeier U.F. (1995)      |
| pSTW22.1        | <i>cat</i> , <i>tsr</i> , <i>strR</i> , <i>Streptomyces-E. coli</i> „shuttle“-Plasmid,<br><i>Streptomyces</i> Expressionsvektor | Thamm S. (1997)           |
| pAAW24.1        | <i>bla</i> , <i>kan</i> , <i>Streptomyces</i> Expressionsvektor   | Arnold A. Wuppertal       |
| pAS2            | <i>bla</i> , <i>lacZ</i> -α, 2,2 kb <i>Bam</i> HI Fragment ( <i>acbC</i> -Bereich)  | Stratmann A. (1997)       |
| pAS6/3.1        | <i>bla</i> , <i>lacZ</i> -α, 1.1 kb <i>Hinc</i> II Fragment ( <i>acbK</i> )   | Stratmann A. (1997)       |
| pAS8.3          | <i>bla</i> , <i>acbC</i> <i>E. coli</i> Expressionsvektor   | Stratmann A. (1997)       |
| pSUTNESLB10     | <i>groESL</i> aus <i>S. griseus</i> , <i>cat</i> , <i>E. coli</i> Expressionsvektor   | Pöhling S. (1997)         |

**Tab. 2.3 Neukonstruierte Plasmide**

| Name    | Konstruktion  |
|---------|---|
| pMD13   | 3 kb <i>Sst</i> I-Fragment aus Phage 24SMAT1 in pUC18       |
| pMD13.1 | 1 kb <i>Kpn</i> I/ <i>Sst</i> I-Fragment aus pMD13 in pUC18 |
| pMD13.2 | 2 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pMD13 in pUC18              |
| pMD13.3 | 0,7 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pMD13 in pUC18            |

**Tab. 2.3 (Fortsetzung)**


---

|            |  |
|------------|--|
| pMD13.4    | 0,3 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Sst</i> I-Fragment aus pMD13 in pUC18   |
| pMD14.2    | 3,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus Phage 1GSI in pUC18  |
| pMD14.2.1  | 1,5 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Sst</i> I-Fragment aus pMD14.2 in pUC18   |
| pMD14.2.2  | 1,2 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pMD14.2 in pUC18   |
| pMD14.2.3  | 2 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pMD14.2 in pUC18   |
| pMD14.2.31 | 1,3 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment aus pMD14.2.3 in pUC18   |
| pMD14.2.32 | 0,7 kb <i>Pst</i> I/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus pMD14.2.3 in pUC18   |
| pMD14.2.33 | 1,2 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragment aus pMD14.2.3 in pUC18  |
| pMD14.2.34 | 1,7 kb <i>Sst</i> I-Fragment aus pMD14.2.3 in pUC18  |
| pMD14.2.35 | 0,3 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Sst</i> I-Fragment aus pMD14.2.3 in pUC18   |
| pMD14.2.36 | 0,5 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus pMD14.2.3 in pUC18  |
| pMD14.2.37 | 0,3 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus pMD14.2.3 in pUC18   |
| pMD14.3    | 2,8 kb <i>Sst</i> I-Fragment aus Phage1GSI in pUC18  |
| pMD14.3.2  | 1,2 kb <i>Sst</i> I/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus pMD14.3 in pUC18   |
| pMD15      | 7 kb <i>Sst</i> I-Fragment aus Phage 1GSII in pUC18  |
| pMD15.1    | 2 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pMD15 in pUC18   |
| pMD15.2    | 1 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Fragment aus pMD15.1 in pUC18   |
| pMD15.3    | 0,9 kb <i>Pst</i> I-Fragment aus pMD15.1 in pUC18  |
| pMD15.5    | 1 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I-Fragment aus pMD15 in pUC18   |
| pMD15.6    | 0,8 kb <i>Kpn</i> I-Fragment aus pMD15 in pUC18  |
| pMD15.7    | 3,2 kb <i>Kpn</i> I/ <i>Sst</i> I-Fragment aus pMD15 in pUC18  |
| pMDAT1Sg   | 1290 bp PCR-Fragment (Primer AT1/AT2) aus genomischer <i>S. glaucescens</i> GLA.0 DNA in pUC18/ <i>Hinc</i> II |
| pUCATSg    | 1392 bp <i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus pH16ATSg in pUCPU21   |
| pUCAT1     | 1554 bp <i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus pH16AT1 in pUCPU21  |
| pUCAT9     | 1608 bp <i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus pH16AT9 in pUCPU21  |
| pUMDC      | 1143 bp <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment aus pMDC in pUCPU21   |
| pMD418.2   | 2,2 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pMD418 in pUC18  |
| pMD1       | 366 bp PCR-Fragment (Primer MS1/MS3) aus genomischer <i>Actinoplanes</i> sp DNA in pUC18/ <i>Hinc</i> II       |
| pMD3       | 278 bp PCR-Fragment (Primer MD9/MD10) aus genomischer <i>Actinoplanes</i> sp DNA in pUC18/ <i>Hinc</i> II      |
| pMD5       | 490 bp PCR-Fragment (Primer MD12/MD13) aus genomischer <i>Actinoplanes</i> sp DNA in pUC18/ <i>Hinc</i> II     |
| pMD7       | 1047 bp PCR-Fragment (Primer MD14/MD16) aus genomischer <i>Actinoplanes</i> sp DNA in pUC18/ <i>Hinc</i> II    |
| pMD6       | 300 bp PCR-Fragment (Primer AS2/AS5) aus genomischer <i>S. calvus</i> DNA in pUC18/ <i>Hinc</i> II             |

---

**Tab. 2.3 (Fortsetzung)**

|           |  |
|-----------|--|
| pMD8      | 300 bp PCR-Fragment (Primer AS2/AS5) aus genomischer <i>S. hygrosopicus</i> spp. <i>limoneus</i> DNA in pUC18/ <i>HincII</i>   |
| pMD9      | 300 bp PCR-Fragment (Primer AS2/AS5) aus genomischer <i>S. dimorphogenes</i> DNA in pUC18/ <i>HincII</i>                       |
| pMD418    | 5,13 kb <i>KpnI/BglII</i> -Fragment aus genomischer <i>Actinoplanes</i> sp. DNA in pUC19 <i>KpnI/BamHI</i>                     |
| pVK26     | 4,7 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK43     | 4,2 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK65     | 3,9 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK83     | 3,6 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK104    | 3,4 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK124    | 3,1 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK13     | 2,7 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK102    | 2,2 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK311    | 1,8 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK143    | 1,4 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK182    | 1,0 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pVK285    | 0,6 kb verkürztes Fragment aus pMD418  |
| pMDR418   | 5,13 kb <i>XbaI/EcoRI</i> -Fragment aus pMD418 in pBlueScript KS+ <i>XbaI/EcoRI</i>  |
| pRVK6     | 4,8 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK2     | 4,4 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK8     | 3,9 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK39    | 3,6 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK40    | 3,2 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK45    | 3,0 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK18    | 2,8 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK16    | 2,5 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK19    | 1,9 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK34    | 1,5 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK47    | 1,2 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK13    | 0,8 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pRVK45    | 0,4 kb verkürztes Fragment aus pMDR418   |
| pMDEAT1Sg | 1290 bp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pMDAT1Sg in pET11a. Heterologe Expression von AcbB aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0     |
| pH16ATSg  | 1290 bp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pMDAT1Sg in pET16b. Heterologe Expression von His-AcbB aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0 |
| pH16AT1   | 1452 bp <i>NdeI/BamHI</i> -PCR-Fragment in pET16b. Heterologe Expression von His-AcbV-k aus <i>Actinoplanes</i> sp.            |

**Tab. 2.3 (Fortsetzung)**


---

|           |  |
|-----------|--|
| pH16AT9   | 1506 bp <i>NdeI/BamHI</i> -PCR-Fragment in pET16b. Heterologe Expression von His-AcbV-l aus <i>Actinoplanes</i> sp.                            |
| pMAT1     | 2,2 kb <i>BamHI</i> -Fragment aus pMD418 in pUWL218. Heterologe Expression von AcbV aus <i>Actinoplanes</i> sp.                                |
| pMAT2     | 5,13 kb <i>EcoRI/XbaI</i> -Fragment aus pMD418 in pUWL218. Heterologe Expression von AcbV aus <i>Actinoplanes</i> sp.                          |
| pJATSg    | 1290bp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pH16ATSg in pJOE2702. Heterologe Expression von AcbB aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0                    |
| pJAT1     | 1452 bp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pH16AT1 in pJOE2702. Heterologe Expression von AcbV-k aus <i>Actinoplanes</i> sp.                      |
| pJAT9     | 1506 bp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pH16AT9 in pJOE2702. Heterologe Expression von AcbV-l aus <i>Actinoplanes</i> sp.                      |
| pJATHSg   | 1290 bp <i>NdeI/BamHI</i> -PCR-Fragment in pJOE2775. Heterologe Expression von AcbB-His aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0                        |
| pJATH1    | 1290 bp <i>NdeI/BamHI</i> -PCR-Fragment in pJOE2775. Heterologe Expression von AcbV-k-His aus <i>Actinoplanes</i> sp.                          |
| pJATH9    | 1350 bp <i>NdeI/BamHI</i> -PCR-Fragment in pJOE2775. Heterologe Expression von AcbV-l-His aus <i>Actinoplanes</i> sp.                          |
| pSTMDATSg | 1290 bp <i>NdeI/BamHI</i> -Fagment aus pMDAT1Sg in pSTW22.1 <i>NdeI/BglII</i> . Heterologe Expression von AcbB aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0 |
| pAMAT1    | 1452 bp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pH16AT1 in pAAW24.1. Heterologe Expression von AcbV-k aus <i>Actinoplanes</i> sp.                      |
| pAMAT2    | 1506 bp <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pH16AT9 in pAAW24.1. Heterologe Expression von AcbV-l aus <i>Actinoplanes</i> sp.                      |
| pHWATSg   | 1392 bp <i>HindIII/BamHI</i> -Fragment aus pUCATSg in pUWL201. Heterologe Expression von His-AcbB aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0              |
| pHWAT1    | 1554 bp <i>HindIII/BamHI</i> -Fragment aus pUCAT1 in pUWL201. Heterologe Expression von His-AcbV-k aus <i>Actinoplanes</i> sp.                 |
| pHWAT9    | 1608 bp <i>HindIII/BamHI</i> -Fragment aus pUCAT9 in pUWL201. Heterologe Expression von His-AcbV-l aus <i>Actinoplanes</i> sp.                 |
| pMDC      | 1143 bp <i>NdeI/BglII</i> -PCR-Fragment in pJOE2702 <i>NdeI/BamHI</i> . Heterologe Expression von AcbC aus <i>Actinoplanes</i> sp.             |
| pFMDC     | 1143 bp <i>NdeI/BglII</i> -PCR-Fragment in pJOE2775 <i>NdeI/BamHI</i> . Heterologe Expression von AcbC-His aus <i>Actinoplanes</i> sp.         |

---

## 2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR sind in Tab. 2.4 aufgeführt.

**Tab. 2.4 Verwendete Oligonukleotide**

| Primerbezeichnung  | Sequenz                                     |
|--|---|
| Heterologe Primer für die Amplifizierung von SMAT-codierenden Genbereichen aus <i>Actinoplanes</i> sp.:                          |   |
| MS1:   | 5'GGCGACGAGGTGATCGTCCC 3'                   |
| MS2:   | 5'ACTGCCTGGACCCGG 3'                        |
| MS3:   | 5'TGTGCGCAGTCCTCGAT 3'                      |
| MS4:   | 5'CCGGGTCCAGGCAGT 3'                        |
| MD5:   | 5'GGCGACGAGGTGATCGTGCC 3'                   |
| MD6:   | 5'CTGCGCCGCGTCCTCCACGA 3'                   |
| MD:9   | 5'CC(C/G)GG(C/G)GACGAGGT(C/G)ATC 3'         |
| MD10:  | 5'(C/G)GC(C/G)CC(C/G)CCCTC(C/G)CC(C/G)CC 3' |
| MD11:  | 5'CTG(C/G)GC(C/G)GCGTCCTC(C/G)AC(C/G)AC 3'  |
| Heterologe Primer für die Amplifizierung Glutaminsynthetase-codierenden Genbereichen aus <i>Actinoplanes</i> sp.:                |   |
| MD12:  | 5'CAGTGGGAGTTCCAG 3'                        |
| MD13:  | 5'GCGTCCTCGATGTA(C/G)CCCTT 3'               |
| MD14:  | 5'TTCGACGGCTCCTCGATC 3'                     |
| MD15:  | 5'GGCCAGGTACGGGTTGCC 3'                     |
| MD16:  | 5'GTAGAGGTCTTGTTCGAT 3'                     |
| MD17:  | 5'GAGGTGGGCACCGCCGGC 3'                     |
| Heterologe Primer für die Amplifizierung von Teilbereichen des <i>acbB</i> Gens aus <i>Actinoplanes</i> sp. (A. Stratmann 1997): |   |
| AS1:   | 5'CTGGTGACCGGAGCGGCGGGCTTC 3'               |
| AS2:   | 5'GCCGCCGA(A/G)TCCCATGT(C/G)GAC 3'          |
| AS3:   | 5'(C/G)CCGTAGACCTCGTC(C/G)GT(C/G)GA 3'      |
| AS4:   | 5'TC(C/G)AC(C/G)GACGAGGTCTACGGG 3'          |
| AS5:   | 5'CCCGTAGTTGTTGGAGCAGCGGGT 3'               |
| AS6:   | 5'GTA(C/G)CGCCGGTCGTG(T/G)CC 3'             |
| Heterologe Primer für die Amplifizierung von Teilbereichen des <i>acbC</i> Gens aus <i>Actinoplanes</i> sp.:                     |   |
| acbC1:   | 5'CGGCGGTTCTGTGGTGGTG 3'                    |
| acbC2:   | 5'GTCGGTGGTGGGGTG 3'                        |
| acbC3:   | 5'GGTCTGGTGGCCAGCCTCTAC 3'                  |
| acbC4:   | 5'GTGCCGACGACACTGGTC 3'                     |
| acbC5:   | 5'GACCAGTGTTCGTCGGCAC 3'                    |
| acbC6:   | 5'AACGGGCTCGCCGAG 3'                        |
| acbC7:   | 5'CTCGGCGAGCCCGTT 3'                        |
| acbC8:   | 5'GAACGTGTGCCCGTA 3'                        |
| acbC9:   | 5'ACACACGGCCTCGCCGTG 3'                     |
| Primer für die Amplifizierung des <i>acbB</i> -Gens von <i>S. glaucescens</i> GLA.0:   |   |
| AT1:   | 5'GCAGAGGCACATATGACAGGCTT 3'                |
| AT2:   | 5'TGGAGAGGATCCCGAGCAGGC 3'                  |
| sgl RHAM:  | 5'CGGCCAGGATCCCGCGATC 3'                    |
| Primer für die Amplifizierung des <i>acbV</i> -Gens von <i>Actinoplanes</i> sp.:   |   |
| MAT1:  | 5'GCGGCGGTTCATATGAGCAGGCAGG 3'              |
| MAT3:  | 5'GTCGAGGATCCGCACCCC 3'                     |
| MAT9:  | 5'GTGACCCGTCATATGTTCCGAGCCG 3'              |
| act RHAM:  | 5'GCCGGGGGATCCTGCCGTACC 3'                  |
| Primer für die Amplifizierung des <i>acbC</i> -Gens von <i>Actinoplanes</i> sp.:   |   |
| AS-C1 (A. Stratmann 1997):   | 5'AGGGAAGCTCATATGAGTGGTGTTCGAG 3'           |
| MD-C3:   | 5'TCGCTCCGGAGATCTGCGTC 3'                   |

**Tab. 2.4 (Fortsetzung)**

---

|                                   |                               |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| MD-C4:                            | 5'GTGCTGCAAGATCTCGGGCGGCCT 3' |
| Primer für DNA-Sequenzreaktionen: |                               |
| universal primer:                 | 5'GTAAAACGACGGCCAGT 3'        |
| reverse primer:                   | 5'GAAACAGCTATGACCATG 3'       |

---

## 2.5 Kulturbedingungen und Lagerung der Bakterienstämme

*E. coli* wurde in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten (s. 2.2.1) angezogen. Für das Wachstum von Plasmid-haltigen Stämmen wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika supplementiert (s. 2.2.1). LB-Agar wurde für die Blau-Weiß Selektion rekombinanter pUC- und pBluescript-Derivate 40 µg/ml X-Gal zugesetzt. Stammkulturen wurden in 30% Glycerin bei -20°C gelagert.

*E. coli* NM539 oder LE392 wurde als Wirtstamm für Derivate des Bakteriophagen LambdaGEM-12 verwendet. Nach Anzucht bei 37°C über Nacht wurden die Zellen mit einigen Tropfen Chloroform lysiert und die Phagensuspension bei 4°C aufbewahrt. Für das Durchmustern rekombinanter LambdaGEM-12 sowie für die Präparation von DNA wurden Phagen entsprechend der von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Platten-Lysat-Methode vermehrt.

Streptomycetenstämme wurden bei 28 - 30°C und bei Anzucht in Flüssigkulturen unter Schütteln bebrütet. Wenn nicht anders vermerkt wurden die Stämme auf SMA-Platten angezogen. Sporen wurden mit einer 20%igen Glycerinlösung abgeschwemmt und bei -20°C gelagert.

*S. lividans* wurde in TSB und für die Herstellung von Protoplasten in TSB-PEG 8000-Medium angezogen. Für Plasmid-tragende Stämme enthielt das Medium die entsprechenden Antibiotika (s. 2.2.1).

## 2.6 Gentechnische Methoden

### 2.6.1 Präparationsmethoden von Nukleinsäuren

Für die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* wurden die Methoden Kochpräparation (Sambrook et al. 1989), Alkalische Lyse (Birnboim und Doly 1979) und des Proteokolls zum Qiagen-Plasmid-Kit verwendet.

Die Präparation von Phagen DNA aus *E. coli* NM539 und LE392 erfolgte nach der Platten-Lysat-Methode von Sambrook et al. (1989).

Für die Isolation von Plasmiden aus Streptomyceten wurde der Qiagen-Plasmid-Kit verwendet (modifiziert nach Birnboim und Doley 1979): 1 ml Zellsuspension wurden

sedimentiert und mit Lösung I gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Lyse-Puffer (Lösung I mit 10 mg/ml Lysozym) resuspendiert und bis zu 30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem Originalprotokoll, allerdings unter Verdopplung der angegebenen Volumina.

Für die Präparation von Gesamt-DNA aus Streptomyceten wurde die Quick-Präparation (Pospiech, A. und Neumann, B., 1995) eingesetzt: 2 g Myzel (Nassgewicht) wurde in 5 ml SET Puffer mit 1mg/ml Lysozym für *Streptomyces* sp. und 10 mg/ml für *Actinoplanes* sp. (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7,5) aufgenommen. Nach 30 min (60 min für *Actinoplanes* sp.) Inkubation bei 37°C in einem Schüttelinkubator wurden 0,5 ml SDS 10% und 0,5 mg/ml Proteinase K zupipettiert. Nach 2 Stunden Inkubation bei 55°C wurden 5 M NaCl (1/3 des vorhandenen Volumens) und das gleiche Volumen an Chloroform zugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig durchmischt und bei Raumtemperatur mindestens für eine Stunde inkubiert. Durch Zentrifugation (30 min, 5000 upm, Sigma 3K1-Zentrifuge) wurde die wässrige Phase mit einer abgeschnittenen Kunststoff-Spitze abpipettiert. Die sich in der wässrigen Phase befindende DNA wurde mit 1 Volumen Isopropanol gefällt, abzentrifugiert (13000 g, 20 min) und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde in Wasser oder TE aufgenommen.

### 2.6.2 *In vitro* Manipulation von Nukleinsäuren

Restriktionsendonucleasen, alkalische Phosphatase, T4-Polynukleotidkinase und T4-Ligase wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller verwendet. Entsprechendes galt für die Entfernung von 3'- oder 5'-Überhängen von DNA-Fragmenten mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I.

Die Reinigung *in vitro* manipulierter DNA erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion (Sambrook et al. 1989) oder durch Auftrennung in Agarosegelen (s. 2.6.3) und anschließender Gelelution mit Hilfe des Jet-Sorb-Kit oder des Qiagen Gel Extraction Kit (s. 2.1)

Die Plasmide mit seriell verkürzten Insertionen wurden mit Hilfe des "Double-stranded Nested Deletion Kits" (s. 2.1) ausgehend von den Plasmiden pMD418 und pMDR418 (Tab. 2.3) und unter Beachtung der Herstellerempfehlungen hergestellt (s. Ergebnisse 3.3.4).

### 2.6.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese unter einer Spannung von 5 - 10 V/cm aufgetrennt. Den Proben wurden 1/10 Volumenanteile Probenauftragspuffer (0,5 g/ml Saccharose, 160 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mg/ml Bromphenolblau, 0,5 mg/ml Xylencyanol) beigemischt. Es wurden 0,5 - 2%ige Agarosekonzentrationen und TAE- oder TBE-Puffer (s. 2.2) verwendet (Sambrook et al. 1989). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (366 nm) enthielt die Agarose 0,1 µg/ml Ethidiumbromid.

Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden für die Auftrennung von DNA-Fragmenten, die aus Sequenzier-Reaktionen (s. 2.6.7) hervorgegangen waren, verwendet. Das Gel setzte sich zusammen aus 6% Polyacrylamid (Acrylamid:N,N-Bisacrylamid = 19:1), 7 M Harnstoff und 1 x TBE-Puffer (2.2). Die Polymerisation wurde durch den Zusatz von 500 µl APS (10%) und 40 µl TEMED pro 80 ml Lösung gestartet. Die Trennstrecke betrug 40 cm. Die Elektrophorese erfolgte bei 65°C bei einer konstanten Spannung von 1600 V.

#### **2.6.4 Markierung von DNA-Fragmenten**

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit 50 µCi  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol) und dem "rediprime-Random Primer Labelling-Kit" (s. 2.1) und nach den Vorgaben des Herstellers. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung (70°C, 10 min) gestoppt.

Die nicht radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit dem DIG-DNA Labelling Kit (2.1) unter Beachtung der Herstellerempfehlungen durchgeführt.

#### **2.6.5. DNA-DNA Hybridisierung**

Für den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNA aus Agarosegelen (s. 2.6.3) auf Hybond-N<sup>+</sup> Nylon-Membranen (s. 2.1) wurde nach der Methode von Reed und Mann (1985) verfahren. Der mit 0,4 M NaOH durchgeführte Kapillarblot erfolgte über Nacht. Die Membran wurde anschließend in 2 x SSC (s. 2.2) geschwenkt und 20 min bei 120°C getrocknet.

Für das Durchmustern von rekombinanten Bakteriophagen  $\lambda$ GEM12 wurde die Methode von Benton und Davis (1977), modifiziert nach Sambrook et al. (1989) verwendet. Phagen-DNA wurde auf Hybond-N<sup>+</sup> Nylon-Membranen (2.1) transferiert.

Hybridisierungen erfolgten in Plastikschüsseln und temperierbaren Wasserbadschüttlern. Die Membranen wurden zunächst für 2 - 4 h in reichlich Hybridisierungslösung (2.2) geschwenkt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung erneuert und zu dieser die hitzedenaturierte (100°C, 5 min), [<sup>32</sup>P]-markierte- oder DIG-markierte-DNA-Sonde (2.6.4) pipettiert. Die Hybridisierungen erfolgten über Nacht. Für die Beseitigung unspezifischer Wechselwirkungen wurden die Membranen 3 mal mit [6 x SSC (2.2), 0,5% SDS] gewaschen. Entsprechend der in den Versuchen angegebenen Stringenz wurden weitere Waschvorgänge mit abnehmender SSC-Konzentration, jedoch gleichbleibender SDS-Konzentration vorgenommen.

### 2.6.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (Mullis et al. 1987) diente der gezielten *in vitro* Vermehrung ausgesuchter DNA Bereiche (Innis et al. 1990). Diese Methode wurde zur Amplifizierung verschiedener DNA-Abschnitte aus chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. und *Streptomyces* sp. verwendet. In den Tab. 2.5, 2.6 und 2.7 sind die PCR-Bedingungen dargestellt.

**Tab. 2.5: Standard PCR-Ansätze.**

| Komponente (s. 2.1)   | Konzentration                |
|---|------------------------------|
| dNTPs   | 200 µM                       |
| DMSO oder Formamid  | 10%                          |
| Vent-DNA-Polymerase oder <i>Taq</i> -Polymerase   | 2,5 Unit                     |
| PCR Puffer (10x)  | 10%                          |
| Template: genomischer DNA aus <i>Actinoplanes</i> sp. und <i>S. glaucescens</i> GLA.0 oder Plasmide (s 2.6.1) | variable                     |
| Oligonukleotid-Primer   | 50 bis zu 100 pmol je Primer |
| H <sub>2</sub> O  | ad 100 µl                    |
| Mineralöl (Roth, Karlsruhe)   | 75 µl                        |

**Tab. 2.6: Standard Amplifikationsbedingungen**

| Schritt (nr) | Temperatur (°C)    | Dauer                 |
|--------------|--------------------|-----------------------|
| 1            | 98                 | 5 min.                |
| 2            | 95                 | 1 min.                |
| 3            | variable (Tab.2.7) | 30 sec.               |
| 4            | 72                 | variable (Tab 2.7; *) |
| 5            | 72                 | 5 min.                |
| 6            | 9                  | □                     |

(\*) 30 Zyclen von Schritt 4 bis 2.

**Tab 2.7: Temperatur und Dauer für die Primeranlagerung der jeweiligen Ansätze im Ergebnisteil**

| Anlagerungstemperatur (°C)            | Polymerisationsdauern (sec.) | Oligonukleotid-Primer-Paare (Tab. 2.4)                                      |
|---------------------------------------|------------------------------|---|
| 40                                    | 30                           | MD14/17 ( <i>glnA</i> , Ergebnisse 3.1.1.1)                                 |
| 45                                    | 30                           | MD12/13 ( <i>glnII</i> , Ergebnisse 3.1.2.1)                                |
| 40                                    | 30                           | MS1/3 (Smat2) und MD9/10 (Smat1), Ergebnisse 3.2.1                          |
| 54(erste 5 Zyklen) und 60 (25 Zyklen) | 30                           | AT1/2 ( <i>acbB</i> aus <i>S. glaucescens</i> GLA.0, Ergebnisse 3.3.1)      |
| 58                                    | 20                           | MAT1/3, MAT9/3 MAT1/act.RHAM und MAT9/act.RHAM (Ergebnisse 3.4.2 und 3.4.4) |
| 53                                    | 20                           | AT1/2 und AT1/sgl.RHAM (Ergebnisse 3.4.2 und 3.4.4)                         |
| 50                                    | 20                           | AS-C1/MD-C3 und AS-C1/MD-C4 (Ergebnisse 3.5.1)                              |
| 54                                    | 30                           | AS3/AS5 (Ergebnisse 3.7.1.2)  |

### 2.6.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Methode von Sanger et al. (1977) mit rekombinanten pUC18, pUC19, pBlueScript KS+ und pUCBM21 Plasmiden (s. 2.3).

Die Sequenzierung mit CY5-markierten Oligonukleotiden (Tab. 2.4) erfolgte mit Thermosequenasen (Amersham Pharmacia, Freiburg). Die aus der Sequenzierreaktion resultierenden Fragmente wurden in einem 6% Long-Range-Gel (Biozym, Hessisch Oldendorf), das 6 M Harnstoff enthielt, getrennt und mittels eines A.L.F-Express DNA-Sequenzierers (Amersham Pharmacia, Freiburg) detektiert. Die Umsetzung der gemessenen Fluoreszenzmuster zu einer DNA-Sequenz erfolgte durch das Computerprogramm A.L.F. Manager 2.5 bzw. ALFwin 1.1.

Um das Insert von pMD418 (Tab. 2.3) zu sequenzieren, wurde der "Double-stranded Nested Deletion Kit" (2.1) benutzt. Es wurde Plasmid-DNA von pMD418 mit dem Qiagen-Plasmid-Kit präpariert (2.6.1) und mit den Restriktionsenzymen *PstI/XbaI* hydrolysiert. Mit Hilfe der Exonuklease III, die an dem 3'-Strang des *XbaI*-Restriktionsschnittes angreift und einzelsträngig verkürzt, wurde bei 30°C die erste Phase des Verkürzungsprozesses durchgeführt. Es wurden alle 5 min Proben genommen und mit Nuklease S1, die die restlichen Einzelstränge angreift, 30 min weiterinkubiert. Dann wurde die Reaktion beendet und die verkürzten DNA Moleküle religiert und in *E. coli* XL1 Blue MRF' transformiert (2.7). Mit der Absicht, das 5,2 Kb DNA-Fragment doppelsträngig zu sequenzieren, wurden Verkürzungsklone in die andere Richtung hergestellt. Dazu wurde das Insert des pMD418 als *EcoRI/XbaI* Fragment in pBluescript KS<sup>+</sup> ligiert. Das resultierende Plasmid pMDR418 wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII/ApaI* hydrolysiert. Das hydrolysierte Plasmid wurde mit der Exonuklease III, die den 3'-Strang des *HindIII*-Restriktionsschnittes angreift und verkürzt, mit Nuklease S1 inkubiert und schliesslich religiert. Die Plasmide wurden dann der Grösse entsprechend ausgewählt und sequenziert (Tab. 2.3). Die resultierenden Plasmide sind in der Abb. 3.3.2 dargestellt.

### 2.7 Transformation von *E. coli* und Streptomyceten

Kompetente Zellen der *E. coli* Stämme XL1 Blue MRF' und DH5 $\alpha$  wurden nach der Methode von Hanahan (1983) und Zellen von *E. coli* BL21(DE3)pLysS nach der Methode von Mandel und Higa (1970) (CaCl<sub>4</sub>-Methode) hergestellt. Für die Transformation wurden 0,1 ml Zellsuspension und 0,01 - 1  $\mu$ g DNA verwendet (Sambrook et al. 1989). Die Regeneration der Zellen erfolgte in SOC- oder LB-Medium (s. 2.2).

Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten erfolgte nach der Methode von Babcock und Kendrick (1988). *S. lividans* wurde in TSB-PEG8000 (s. 2.2) angezogen. Die Regeneration der transformierten Protoplasten erfolgte für 18-24 Stunden bei 28°C auf zuvor getrockneten SPMR-Agarplatten (s. 2.2). Anschließend wurden die Platten mit 2,5 ml wässriger Thiostreptonlösung (200  $\mu$ g/ml), bzw. mit 2,5 ml Kanamycinlösung (400  $\mu$ l/ml) überschichtet und weitere 3-4 Tage bei 28°C inkubiert.

## 2.8 Heterologe Genexpression in *E. coli*

*E. coli* BL21(DE3)pLysS mit den Plasmiden pH16ATSg, pH16AT1, pH16AT9 und pSUTNESLB10, die die heterologe Expression von AcbV aus *Actinoplanes* sp. und AcbB aus *S. glaucescens* GLA.0 (Ergebnisse 3.4.2 und 3.4.3; Tab. 2.3) ermöglichen sollten, wurden in LB-Medium (s. 2.2 mit dem entsprechend Selektionsantibiotikum) unter starkem Schütteln bei 37°C, 30°C oder 20°C kultiviert. Frisches Medium wurde mit einer Übernachtskultur auf eine anfängliche OD<sub>550</sub> von ca 0,05 beimpft. Bei einer Zelldichte von OD<sub>550</sub> = 0,5 wurde die Kultur mit 1 ml IPTG (100 mM) induziert und noch für eine weitere Stunde inkubiert. Zu definierten Zeiten wurden 1 ml Proben gezogen, die Zellen sedimentiert, mit 40 µl PAGE-Probenauftragspuffer (Laemmli 1970) versetzt und für eine anschließende SDS-PAGE (s. 2.11) eingefroren. Der verbleibende Rest der Kultur wurde geerntet und zur Herstellung von Zell-freiem Extrakt verwendet (s. 2.10).

JM109 mit den rekombinanten Plasmiden pJOE2702 und pJOE2775 sowie deren Derivaten pJATSg, pJAT1, pJAT9, pJATHSg, pJATH1, pJATH9, pMDC und pFMDC, die für die heterologe Expression von AcbV aus *Actinoplanes* sp. und AcbB aus *S. glaucescens* GLA.0 konstruiert worden waren (vgl. Ergebnisse 3.4.4 und 3.5.1; Tab. 2.3), wurden in LB-Medium mit 0,2% L-Rhamnose (Voff 1996) bei 30°C mit einer Übernachtskultur beimpft. Nach 6 und 12 Stunden wurden jeweils Proben gezogen und für eine anschließende SDS-PAGE vorbereitet.

## 2.9 Heterologe Expression in Streptomyceten

Mit Derivaten der Plasmide pUWL201, pHWAT1, pHWAT9 und pHWATSg (Tab. 2.2) transformierte *S. lividans* 66 TK23 Zellen, wurden in TSB (s. 2.2) mit 25 µl/ml Thiostrepton angezogen. Diese Kulturen wurden mit einer 2 bis 3 Tage alten Vorkultur angeimpft, bei 28°C kultiviert und nach 3-4 Tagen geerntet.

Mit Derivaten der pAAW24.1 (Tab. 2.2), bzw. pIJ6021 (Takano et al. 1995) transformierte *S. lividans* 66 1326 Zellen wurden in YEME (s. 2.2) mit 25 µg/ml Kanamycin und mit einer 2 bis 3 Tage alten Vorkultur beimpft. Nach 12-20 Stunden wurde die Expression der heterologen Proteine durch Zugabe von Thiostrepton (8 µg/ml Endkonzentration) induziert. Nach weiteren 48 bis 58 Stunden Inkubation bei 28°C in einem Schüttel-Inkubator wurden die Zellen geerntet.

## 2.10 Herstellung Zell-freier Extrakte

Zellen von Streptomyceten wurden durch Zentrifugation geerntet, zweimal mit kaltem Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) gewaschen und bei -20°C gelagert. Für die Herstellung Zell-freier Extrakte wurden die Zellen in Aufschlusspuffer I (s. 2.2.2) im Verhältnis 1,5 ml/g Zellen aufgetaut und mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus UW60 mit 5 mm Mikrospritze und Spannungsquelle HD60, Bandelin, Berlin) auf Eis für 4-10 x 20 sec in 15 sec-Abständen mit 70% Intensität und 20% Zyklus aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation

mit mit 30000 g bei 4°C (Sorvall RC-5B, DuPont, Bad Nauheim) abgetrennt. Der Überstand wurde auf Enzymaktivität überprüft.

Die Anreicherungen der überexprimierten His-AcbV-1 und His-AcbB Fusionsproteine in *S. lividans* Expressionssextrakte erfolgten durch Affinitätschromatografie mit Ni<sup>+</sup>-NTA-Agarose Säulen von Quiagen (Hilden) unter Beachtung der Herstellerempfehlungen.

Mit *E. coli*-Stämmen wurde wie oben beschrieben verfahren mit der Ausnahme, dass die Zellen in Aufschlusspuffer im Verhältnis 1 ml/0,2 g Zellen aufgetaut wurden. Anschließend wurden alle Rohextrakte aliquotiert und eingefroren.

### **2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der zu analysierenden Proben erfolgte nach Bradford (1976) mit Hilfe des Protein-Assay Kit (BioRad, München), wobei mit BSA eine Eichgerade erstellt wurde.

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen sowie deren Anfärbung mit Coomassie-Farbstoff erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Es wurden 10%ige Gele hergestellt. Für die Abschätzung von Proteinmassen wurden als Vergleichsproteine BSA ( $M_r = 66$  kDa), Ovalbumin ( $M_r = 45$  kDa), Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase ( $M_r = 36$  kDa), Carboanhydrase ( $M_r = 29$  kDa), PMSF behandeltes Trypsinogen ( $M_r = 24$  kDa), Trypsinhibitor aus Sojabohne ( $M_r = 20$  kDa) und  $\alpha$ -Lactalbumin ( $M_r = 14,2$  kDa) des Proteinstandardgemisches 7L von Sigma (Deisenhofen) verwendet.

### **2.12 Immobilisierung von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran**

Proteine wurden nach analytischer SDS-PAGE mittels einer Semidry-Blotapparatur (Biometra, Göttingen) auf PVDF-Membran (Amersham Buchler, Braunschweig) übertragen. Der Transfer erfolgte 15 min bei 250 mA, gefolgt von 15 min bei 150 mA in Western-Blot Puffer (2.2.2). Die erfolgreiche Übertragung auf die Membran wurde durch eine reversible Ponceau S-Färbung (0,2 % Ponceau S in 1 % Essigsäure) mit anschließender Hintergrundentfärbung durch Wasser überprüft. Durch Inkubation in TBS Puffer (2.2.2) wurde die Membran vollständig entfernt.

### 2.13 Immunologischer Nachweis immobilisierter Polyhistidin-Fusionsproteine

Zum Nachweis immobilisierter Proteine (2.12) wurde die Membran für 30 min mit TBST Puffer (TBS in 2.2.2, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X-100) + 3% BSA zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen versetzt und anschließend 30 min mit dem Anti-His-Tag-Antikörper (verdünnt nach den Anweisungen des Herstellers (Boehringer, Mannheim) in TBST + 3% BSA inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit TBST Puffer entfernt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper, Anti-Rabbit-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Boehringer, Mannheim), der zuvor 1:2500 in TBST + 3% BSA verdünnt wurde. Nach Entfernen des ungebundenen Zweitantikörpers (3 x 10 min Waschen mit TBST) erfolgte die Nachweisreaktion mit NBT/BCIP (Boehringer, Mannheim) als Substrat für die Alkalische Phosphatase.

### 2.14 Präparative Umsetzung von dTDP-D-Glucose zu dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose.

Die Bestimmung der Aktivität der dTDP-D-Glucose-4,6 Dehydratase erfolgte abgewandelt nach Wang und Gabriel (1969) und Okazaki et al. (1962).

Folgender Ansatz wurde für die präparative Umsetzung von dTDP-D-Glucose zu dTDP-4-keto-6-desoxyglucose gewählt (Verseck 1997)

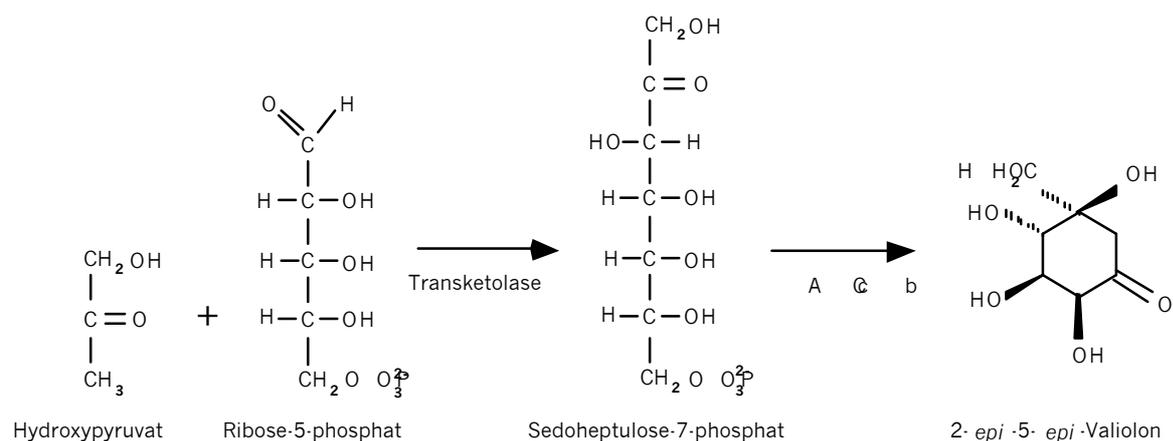
#### Präparative Umsetzung mit RmlB:

|                  |                              |
|------------------|------------------------------|
| Tris/HCl, pH 7,5 | 300 µmol                     |
| dTDP-Glucose     | 164 µmol (entspricht 100 mg) |
| Rohextr. RfbB    | 120 nKat                     |
| Endvolumen       | 6 ml                         |

Für die Umsetzung der dTDP-D-Glucose wurde Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pSVW701, der das Enzym RmlB aus *Salmonella enterica* B überexprimiert, (Verseck, S., 1997) eingesetzt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch einminütiges Kochen abgestoppt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand mit der dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose wurde für die Bestimmung einer möglichen Aminotransferaktivität (s. 3.6) weiter verwendet.

## 2.15 Umsetzung von Ribose-5-phosphat und Hydroxypyruvat zu 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon

Die in Schärken U. 1997 beschriebene Umsetzung von Ribose-5-phosphat und Hydroxypyruvat zu Sedoheptulose-7-phosphat sollte in dem Puffersystem, welches für die Zyclisierung von Sedoheptulose-7-phosphat von Stratmann (1997) entwickelt wurde, erfolgen. Der Ablauf des gekoppelten Tests ist in Abb. 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1:** Umsetzung von Ribose-5-phosphat und Hydroxypyruvat zu 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon

Die Herstellung des AcbC Proteins ist in 3.5.1 beschrieben. Die Enzymtests wurden bei 30°C über Nacht inkubiert.

### Zusammensetzung des gekoppelte Enzymtest :

|          |                                |
|----------|--------------------------------|
| 0,5      | mM Thiaminpyrophosphat (TPP)   |
| 10       | mM Ribose-5-phosphat           |
| 10       | mM Hydroxypyruvat              |
| 1        | Unit Transketolase             |
| 4        | mM CoCl <sub>2</sub>           |
| 2        | mM NAD <sup>+</sup>            |
| variable | µl Expressionsextrakte (AcbC)  |
| ad 50    | µl Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 |

## 2.16 Nachweis der Aminotransferaseaktivität

Es wurden verschiedene Enzymtests mit dem AcbV-Protein (kurze und lange Versionen aus *Actinoplanes* sp.) und AcbB-Protein (aus *S. glaucescens*) in zellfreien Extrakten nach Yohana et al. (1985) durchgeführt (vgl. 3.4). Als Substrat diente dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose (2.14) und als Aminodonoren L-Glutamat, L-Glutamin, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Ornithin und 4-Aminobutyrat. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch einminütiges Kochen abgestoppt. Die Proteine wurden

durch Zentrifugation abgetrennt. Die Überstände wurden durch HPLC-Analysen charakterisiert (2.17).

Es wurden verschiedene gekoppelte Enzymtests entwickelt (vgl. 3.6). Als Substrate dienten jeweils 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon (2.15 oder von O. Block (pers. Mitteilung) synthetisiertes 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon) und dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose (2.14) und als Aminodonoren jeweils 4-Aminobutyrat und L-Glutamat.

#### 4-Aminobutyrat als Aminodonor:

Zusammensetzung des Enzymtestes nach Zaboura et al. (1978):

|          |   |
|----------|---|
| 1        | mM Substrat (s 3.6.1)                   |
| 1        | mM Aminobutyrat                         |
| 1        | mM NADP <sup>+</sup>                    |
| 0,1      | mM PLP                                  |
| 0,5      | Unit SSDH                               |
| variable | µl Expressionsextrakte (AcbV oder AcbB) |
| ad 1     | ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,2          |

#### L-Glutamat als Aminodonor:

Zusammensetzung des Enzymtestes:

|          |   |
|----------|---|
| 0,2      | mM Substrat a) oder b)                  |
| 0,2      | mM L-Glutamat                           |
| 0,1      | mM NAD <sup>+</sup>                     |
| 0,1      | mM FAD <sup>+</sup>                     |
| 0,1      | mM CoA                                  |
| 0,1      | mM TPP                                  |
| 0,1      | mM PLP                                  |
| 0,5      | Unit α-KGDH                             |
| variable | µl Expressionsextrakte (AcbV oder AcbB) |
| ad 1     | ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,2          |

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Substrat gestartet. Die Zunahme von NADH bzw. NADPH wurden spektroskopisch bei  $\lambda_{340\text{nm}}$  beobachtet (Perkin Elma Lambda 2). Die Berechnung der NADPH und NADH Umsatz erfolgte nach der Formel:

$$\Delta E = \epsilon \times d \times c$$

$\Delta E$  = Extinktionsänderung

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient

(NADH =  $6,2 \times 10^3$  l/mol x cm)

$d$  = Schichtdicke der Kuvette (cm)

$c$  = Konzentration

## 2.17 Hochdruckflüssigchromatographie-Analyse

Zur Analyse Nukleotid-aktivierter Zucker wurde die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt. Die HPLC-Trennungen wurden mit einer Anlage der Firma Beckman (Beckman Instruments, München), bestehend aus Detektormodul 166, Solventmodul 125 und Autosampler 502 mit 20 µl Probenschleife, durchgeführt. Folgende Trennsysteme wurden modifiziert nach Payne und Ames (1982) verwendet:

### "reversed phase" Chromatographie (Verseck 1997):

|                   |  |            |
|-------------------|--|------------|
| Säule:            | Eurospheer 100 C18; 250 x 4,6 mm, 5 µm (Knauer, Berlin)    |            |
| Laufmittel A:     | Kaliumphosphatpuffer pH 6                                  | 30 mM      |
|                   | Acetonitril  | 2%         |
|                   | Tetrabutylammoniumhydrogensulfat                           | 5 mM       |
| Laufmittel B:     | Acetonitril  | 100%       |
| Elutionsprogramm: | Flußrate:  | 1,5 ml/min |
|                   | von 0% B nach 40% B in 60 min (interne Gradientenkurve 4). |            |
|                   | Reäquilibriert wurde die Säule für 15 min. mit 100% A      |            |

Alle Laufmittel wurden vor der Benutzung in einer Sterilfilter-Einheit mit einer MF12-Membran (Porengröße: 0,2 µm; Schleicher & Schüll, Bassel) entgast.

Die Detektion fand bei 260 nm statt. Die Auswertung der Elutionsprofile erfolgte mit dem Computerprogramm "Gold" Version 711U (Beckman Instruments, München). Die Identifizierung Nukleotid-aktivierter Zucker erfolgte durch Co-Chromatographie und Vergleich der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen. Für die Quantifizierung der Zucker wurde mit Standardsubstanz eine Dreipunkteichung der Peakflächen in Abhängigkeit von der Konzentration vorgenommen.

## 2.18 Dünnschichtchromatographie

Die Überprüfung der Umsetzung von Ribose-5-phosphat und Hydroxypyruvat zu 2-*epi*-5-*epi*-Valiolon erfolgte auf Kieselgelfolien mit dem Laufmittel Butanol/Ethanol/A.dest. (9:7:4), wobei Aliquots aus entsprechenden Reaktionsansätze analysiert wurden. Durch Besprühen der DC-Folien mit dem Cer-Reagenz (2.2.2) und anschließender Entwicklung bei 90°C wurden die verschiedenen Reaktionsansätze analysiert. Auch bei der Überprüfung der möglichen Aminotransferaseaktivität wurden Kieselgelplatten verwendet. Die Detektion von Aminogruppen-enthaltenden Verbindungen erfolgte durch Besprühen mit Ninhydrin Reagenz (2.2.2) und Entwicklung bei 110°C

## 2.19 Computerprogramme

Für die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurden die Programme DNA-Strider 1.1 (Marck 1988), Brujone II (Vara), das BLAST-Programmpaket (Altschul et al. 1990), FASTA 1.4 x 2 (Pearson und Lipman 1988) und ClustalV (Higgins 1991) verwendet. Von Nukleinsäuren abgeleitete Aminosäuresequenzen wurden mit den aktuellsten verfügbaren Versionen der SWISSPROT- und GENBANK-Datenbanken verglichen. Hydrophobizitätsprofile von Aminosäuresequenzen wurden unter Verwendung des Algorithmus von Kyte und Doolittle (1982) berechnet.

### 3 ERGEBNISSE

Da zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt war, welche Enzyme am spezifischen N-Metabolismus und -Einbau während der Acarboosesynthese in *Actinoplanes* sp. beteiligt waren, sollten zunächst die Gene für Glutaminsynthetasen und Aminotransferasen gesucht werden (vgl. 1.8). Abhängig von den Befunden sollte dann flexibel verfahren werden, um deren Funktion und Beteiligung an der Biosynthese zu charakterisieren.

#### 3.1 Glutaminsynthetasen aus *Actinoplanes* sp.

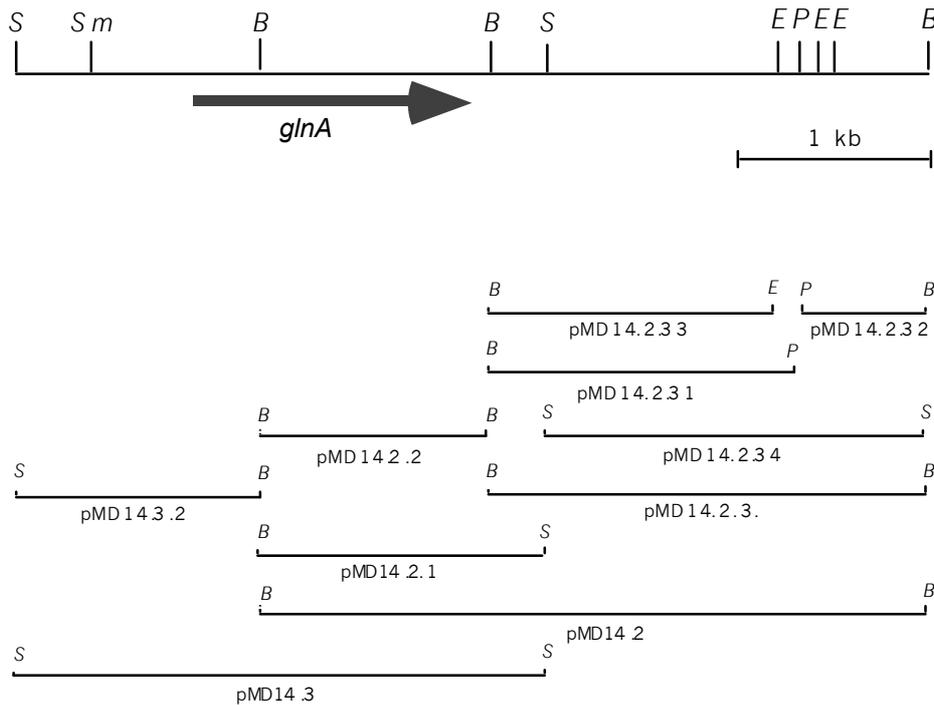
##### 3.1.1 Glutaminsynthetase I (*glnA*)

###### 3.1.1.1 Amplifizierung und Klonierung eines *glnA* Fragments

Das *glnA*-Gen sollte mittels heterologer PCR aus der genomischen DNA von *Actinoplanes* sp. amplifiziert werden. Dazu wurden auf der Basis bekannter *glnA*-DNA-Sequenzen geeignete Oligonukleotide abgeleitet. Als Grundlage für die Synthese der Primer für die *glnA*-PCR (MD14 - MD17) diente ein Sequenzvergleich zwischen den GlnA Proteinen aus *S. viridochromogenes* und *S. hygroscopicus*, wobei das als MD16 bezeichnete Oligonukleotid den Bereich der Adenylierungsstelle des Proteins umfaßte (Abb. 3.1.2). In einer unter Standardbedingungen (2.6.6) durchgeführten PCR mit chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. wurden mit der Primerkombination MD14/16 ein DNA-Fragment amplifiziert, das der erwarteten Länge von ca. 1 kb entsprach. Das DNA-Fragment wurde in den mit *HincII* hydrolysierten pUC18 Vektor zu pMD7 kloniert. Die aus der anschließend bestimmten Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte die erwartete signifikante Ähnlichkeit zu bereits bekannten Glutaminsynthetase von Typ I (Tab. 3.1.1).

###### 3.1.1.2 Screening einer Genbank mit der *glnA*-Gensonde

Eine GEM12 Genbank von *Actinoplanes* sp. (M. Jarling, pers. Mitteilung) wurde mit einem 1 kb *PstI/XbaI* Fragment aus dem Plasmid pMD7 gescreent. Es wurden vier rekombinante Phagen isoliert, die als 1GSI, 2GSI, 9GSI und 10GSI bezeichnet wurden. Die DNA des rekombinanten Phagen 1GSI wurde präpariert, *SstI* und *BamHI* hydrolysiert und anschließend mit der o.g. Sonde hybridisiert. Zwei hybridisierende DNA-Fragmente, ein 2,8 kb *SstI* und ein 3,5 kb *BamHI* DNA-Fragment, wurden mit entsprechend hydrolysiertem Vektor pUC18 ligiert. Die weitere Analyse der resultierenden Plasmide pMD14.3 und pMD14.2 führte zu den in Abb. 3.1.1 dargestellten Restriktionskarte. Nach Subklonierung überlappender Restriktionsfragmente konnte die DNA-Sequenz des *Actinoplanes* sp. *glnA*-Gens ermittelt werden (Anhang 1).



**Abb. 3.1.1 Restriktionskarte des *glnA*-DNA-Bereiches von *Actinoplanes* sp..** Ausgewählte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind dargestellt. Die relative Lage der aus den Plasmiden pMD14.3 und pMD14.2 zur Sequenzierung subklonierten DNA-Bereiche ist dargestellt. Abk.: S = *Sst*I, B = *Bam*HI, E = *Eco*RI, P = *Pst*I, Sm = *Sma*I.

### 3.1.1.3 Analyse der DNA- und abgeleiteten Aminosäuresequenz des *glnA*-Gens aus *Actinoplanes* sp.

Es wurde ein 1422 bp grosser offener Leserahmen (*glnA*) identifiziert, dessen G+C-Gehalt mit 66% für Actinomyceten recht gering ist. Mit 61%, 42% und 95% an Position 1, 2 bzw. 3 entsprach die G+C-Verteilung der typischen Codonverwendung bei Streptomyceten. Die Länge der aus dem offenen Leserahmen abgeleiteten Proteinkette beträgt 474 AS. Vergleiche der Aminosäuresequenz mit den bereits bekannten Proteinen von *S. viridochromogenes* und *S. coelicolor* ergab eine Sequenzidentität von ca. 70% (Tab. 3.1.1, Abb. 3.1.2).

**Tab. 3.1.1 Ähnlichkeit der GSI-Aminosäuresequenzen verschiedener Eubakterien. (% Identität)**

|                             | <i>Actinoplanes</i> sp. | <i>S. viridochromogenes</i> | <i>S. coelicolor</i> | <i>Frankia alni</i> | <i>Rhizobium meliloti</i> |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|
| <i>Actinoplanes</i> sp.     | 100                     | 70,0                        | 70,8                 | 67,1                | 50,2                      |
| <i>S. viridochromogenes</i> |                         | 100                         | 90,6                 | 66,4                | 50,7                      |
| <i>S. coelicolor</i>        |                         |                             | 100                  | 67,5                | 51,9                      |
| <i>Frankia alni</i>         |                         |                             |                      | 100                 | 56,5                      |
| <i>Rhizobium meliloti</i>   |                         |                             |                      |                     | 100                       |

```

Act.      MFANPEELLRYLKDEDVKFVDVRFCDLPGVMQHFNIPVESFDDSVATDGL
S.vir.    MFQNADAEAKKLIADDEDVKFIDVRFCDLPGVMQHFTIPASAFD---PAEEL
S.coe.    MFQNADDVKKFIADEDVKFVDVRFCDLPGVMQHFTLPATAFD---PDAEQ
          ** *... . . *****.*****.***.***.
          MD14  ────▶
Act.      AFDGSSIRGFQAIHESDMMLLPDVATAFVDRFRIQKTLALNFFIHDPFTR
S.vir.    AFDGSSIRGFQAIHESDMAVRADLSTARVDFFRDKTVNINFFIHDPITG
S.coe.    AFDGSSIRGFQAIHESDMSLRPDLSTARVDFFRDKTLNINFFIHDPITG
          *****.***.***.***.***.***.***.***.***.
Act.      EAYSRDPRNVAKKAEEAYLASSGIADTAYFGAEAEFYIFDSIRHETSAHQ
S.vir.    EQYSRDPRNVAKKAEEAYLASTGIGDTGYFGPEAEFYVFDVSVRLANSATES
S.coe.    EQYSRDPRNVAKKAEEAYLASTGIADTAFFGPEAEFYVFDVSVRFATRENES
          * *****.***.***.***.***.***.***.***.***.
Act.      FYYIDSIEGAWNSGREGGNGRKYKTAFFKGGYFPVSPVDHYADLRDAMVR
S.vir.    FYHIDSEAGAWNTGALEN--NRGYKVRYKGGYFPVPPVDHFADLRAQISL
S.coe.    FYHIDSEAGAWNTGALED--NRGYKVRYKGGYFPVPPVDHFADLRAEISL
          ** ***  ***.* *. *****.*****.***.***.***.
          MD17  ────▶
Act.      RLVDTGFTVERSHEVGTAGQGEINYKFSTLLHAGDQMQLFKYIIKNTAW
S.vir.    ELDRAGLQVERHDHEVGTAGQAEINYKFNTLLAAADDLQLFKYIVKNVAW
S.coe.    ELERSGLQVERQHHEVGTAGQAEINYKFNTLLAAADDLQLFKYIVKNVAW
          * *.***.*****.*****.***.*.*.*****.***.***
Act.      EHGKTATFMPKPLFGDNGSGMHTHQNLWLGGEPFLFYDKTGYAGLSDMGRW
S.vir.    QNGKTATFMPKPIFGDNGSGMHVHQLWTTGGQALFYDEAGYAGLSDTARY
S.coe.    KNGKTATFMPKPIFGDNGSGMHVHQLWSGGEPFLFYDEQGYAGLSDTARY
          .*****.*****.***.*.*.***.*****.***.***
Act.      YIGGLLHHAPSLLGFTNPTVNSYAA-VPGYKAPVNLVLSQRNRSACTGIP
S.vir.    YMGGILKHAPSLLAFTNPTVNSYHRLVPGFEAPVNLVYSQRNRSAMRIP
S.coe.    YIGGILKHAPSLLAFTNPTVNSYHRLVPGFEAPVNLVYSQRNRSAMRIP
          *.**.* *****.*****.***.*****.*****.***
          MD15  ◀───┐
Act.      VTGSNPKAKRVEFRVPDPSSNPYLAFSAQMMAGLDGIKKNKIEPPAPIDKD
S.vir.    ITGSNPKAKRVEFRAPDSSGNPYLAFSALLLAGLDGIKKNKIEPAEPIDKD
S.coe.    ITGSNPKAKRVEFRAPDASGNPYLAFSALLLAGLDGIKKNKIEPAEPIDKD
          .*****.***.*.*****.***.*****.***.***.***
          ◀───┘
Act.      LYDLPPEEWGSVKQVPGSLDAVLNSLEADHEFLTAGGVFTDDLISTWIDY
S.vir.    LYELAPEEHAGVPQVPTSLPAVLDREADHEFLLAGDVFTPDLIETWIDY
S.coe.    LYELAPEEHANVAQVPTSLGAVLDREADHEFLQGDVFTPDLIETWIDF
          **.*.***.***.***.***.***.*****.***.***.***.***.
Act.      KRTNEIDPVRLRPTPHEFEMYYNV
S.vir.    KRTNEIAPLQLRPHPYEYEQYYDV
S.coe.    KRANEIAPLQLRPHPEFEMYFDV
          **.****.*.***.*.*.*.*.***.***.***.***.***

```

**Abb. 3.1.2 Sequenzvergleich von GlnA-Protein aus verschiedenen Actinomyceten.** GlnA Proteine aus *Actinoplanes* sp. (Act., diese Arbeit), *S. viridochromogenes* (S. vir.) und *S. coelicolor* (S. coe.). Die konservierte Adenylierungsstelle ist umrandet dargestellt. Bereiche, die für die Ableitung von PCR-Primern verwendet wurden, sind mit Pfeilen dargestellt. Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (\*) und konservative Austausche durch einen Punkt (.) markiert.

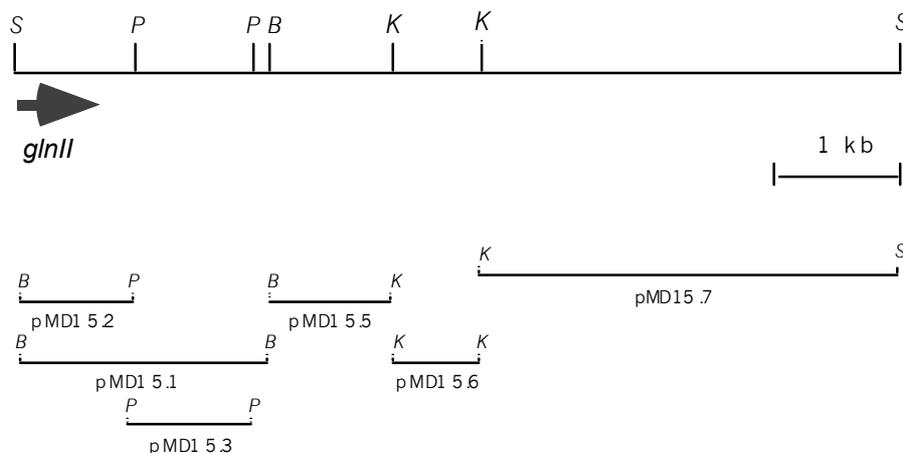
### 3.1.2 Glutaminsynthetase II (*glnII*)

#### 3.1.2.1 Amplifizierung und Klonierung eines *glnII*-Genfragments

Das *glnII* Gen sollte mittels PCR direkt aus der genomischen DNA von *Actinoplanes* sp. amplifiziert werden. Es wurden Oligonukleotid-Primer (MD12 und MD13) aus hochkonservierten Bereichen von GlnII-Proteinen (Behrmann et al. 1990) abgeleitet unter Verwendung der Streptomycceten-spezifischen Codonverwendung (Wright und Bibb 1992). Mit dem Primerpaar konnte unter Standardbedingungen (2.6.6) ein DNA-Fragment mit der erwarteten Grösse von 490 bp amplifiziert werden. Das DNA-Fragment wurde in den mit *HincII* hydrolysierten Vektor pUC18 zu pMD5 kloniert und sequenziert. Die aus der teilweise bestimmten Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte eine signifikante Ähnlichkeit zu bereits bekannten Glutaminsynthetasen von Typ II.

#### 3.1.2.2 Screening einer Genbank mit einer *glnII*-Gensonde

Die  $\lambda$ GEM12 Genbank von *Actinoplanes* sp. wurde mit einer für das *glnII*-Gen spezifischen Sonde (400bp *PstI/XbaI* Fragment aus dem Plasmid pMD5) gescreent. Es wurden drei rekombinante Phagen isoliert (1GSII, 8GSII und 11GSII), die mit der Sonde hybridisierten. Die DNA den rekombinanten Phagen 1GSII wurde präpariert, *SstI* hydrolysiert und gegen die o. g. *glnII* Sonde hybridisiert. Ein 7 kb großes Fragment hybridisierte mit der Sonde. Dieses wurde in pUC18 kloniert. Das resultierende Plasmid pMD15 wurde durch Restriktionsanalyse und Hybridisierung kartiert (Abb. 3.1.3). Nach der Subklonierung überlappender Restriktionsfragmente konnte nachgewiesen werden, dass die DNA-Sequenz des *Actinoplanes* sp. *glnII*-Gens nicht komplett auf pMD15 liegt.



**Abb. 3.1.3 Restriktionskarte des klonierten Bereiches des *glnII* Gens.** Ausgewählte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind dargestellt. Die relative Lage der aus dem Plasmid pMD15 zur Sequenzierung subklonierten DNA-Bereiche ist dargestellt. Abk.: S = *SstI*, B = *BamHI*, K = *KpnI*, P = *PstI*.

### 3.1.2.3 Analyse der DNA- und abgeleiteten Aminosäuresequenz des *glnII*-Gens aus *Actinoplanes* sp.

Es wurde ein 477 bp grosser Bereich eines offenen Leserahmens (*glnII*) identifiziert, dessen G+C-Gehalt 69,8% beträgt. Mit 68%, 52% und 88,7% an Position 1, 2 bzw. 3 entsprach die G+C-Verteilung der typischen Codonverwendung bei Streptomyceten. Die Länge der aus dem sequenzierten DNA-Bereich abgeleiteten Proteinkette beträgt 159 AS. Vergleiche der Aminosäuresequenz des C-terminalen Bereiches des Proteins mit den bereits bekannten Proteinen von *S. viridochromogenes* und *S. coelicolor* ergab eine Sequenzidentität von ca. 83% (Tab. 3.1.2, Abb. 3.1.4).

|        |   |
|--------|---|
| Act.   | -----   |
| S.vir. | MTFKAEYIWIWIDGTEPTAKLRSKTKIITGQPAGLDALPIWGFDFGSSTNQAE |
| S.coe. | MTFKAEYIWIWIDGTEPTAKLRSKTKIITAAPAGLDALPVWGFDFGSSTNQAE |
| Act.   | -----   |
| S.vir. | GHSSDCVLKPVFTCPDPIRGGDDILVLCVNLNIDLTPHASNTRAALAEVA    |
| S.coe. | GSSSDCVLKPVFSCPDPIRGGEDILVLCVLDLDTMTPHPSNTRAALAEELS   |
| Act.   | -----   |
| S.vir. | ERFAAQEPIFGIEQEYTFQDGYPLGFPGGGFPAPQGGYYCGVGADEIFG     |
| S.coe. | ERFAAQEPVFGIEQEYTFKGRPLGFPEGGFPAQGGYYCGVGSDEIFG       |
|        | <b>MD12</b> →   |
| Act.   | -----QWEFQVGPVAPLQVSDHLWVAR                           |
| S.vir. | RDVVEAHLNCLKAGLAISGINAEVMPGQWEFQVGPVSPLEVSDDLWVAR     |
| S.coe. | RDVVEAHLNCLKAGLGISGINAEVMPGQWEFQVGPLAPLEVSDDLWVAR     |
|        | ***** . * . * . * . *                                 |
| Act.   | WLLYRIAEDFGISATLDPKPVKGDWNGAGAHTNFSTKAMRDNYAAIITAA    |
| S.vir. | WLLYRTAEDFDVAATLDPKPVKGDWNGAGAHTNFSTKAMRESYDAIITAA    |
| S.coe. | WLLYRTAEDFEVSATLDPKPVKGDWNGAGAHTNFSTKAMREGYDAIITAA    |
|        | ***** * . * . * . * . * . * . * . * . * . *           |
| Act.   | ESLGK--RRQEHVDGYGAGIEHRLTGLHETAPWTEYSYGVSDRGASVRIP    |
| S.vir. | ESLGEKSKPLDHVKNYGAGIDDLTGLHETAPWNEYSYGVSDRGASVRIP     |
| S.coe. | ESLGEKSKPMDHVKNYGAGIDDLTGLHETAPWNEYSYGVSDRGASVRIP     |
|        | **** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *          |
|        | <b>MD13</b> ←   |
| Act.   | WQVEKDGKGYIEDRRPNANVDPYVVTRLLIDTCCAAL---AQA           |
| S.vir. | WQVEKDGKGYIEDRRPNANVDPYVVTRLLVDTCCSALEKAGQV           |
| S.coe. | WQVEKDGKGYIEDRRPNANVDPYVVTRLLVDTCCSALEKAGQV           |
|        | ***** . * . * . * . *                                 |

**Abb. 3.1.4 Sequenzvergleich von GlnII aus verschiedenen Actinomyceten.** GlnII Proteine aus *Actinoplanes* sp. (Act., diese Arbeit), *S. viridochromogenes* (S. vir.) und *S. coelicolor* (S. coe). Bereiche, die für die Ableitung von PCR-Primern verwendet wurden, sind mit Pfeilen dargestellt. Identische Aminosäuren sind durch einen Stern (\*) und konservative Austausche durch einen Punkt (.) markiert.

**Tab. 3.1.2 Ähnlichkeit der GSII-Aminosäuresequenzen verschiedener Eubakterien in einem C-terminalen Bereich von 165 AS. (% Identität)**

|                             | <i>Actinoplanes</i> sp. | <i>S. viridochromogenes</i> | <i>S. coelicolor</i> | <i>Frankia alni</i> | <i>Rhizobium meliloti</i> |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|
| <i>Actinoplanes</i> sp.     | 100                     | 83,0                        | 83,0                 | 54,3                | 40,4                      |
| <i>S. viridochromogenes</i> |                         | 100                         | 91,5                 | 59,9                | 46,6                      |
| <i>S. coelicolor</i>        |                         |                             | 100                  | 59,9                | 45,9                      |
| <i>Frankia alni</i>         |                         |                             |                      | 100                 | 43,4                      |
| <i>Rhizobium meliloti</i>   |                         |                             |                      |                     | 100                       |

### 3.2 Sekundärmetabolit-Aminotransferasen (SMATs)

Aminogruppen übertragende Enzyme, die überwiegend von Genclustern der Antibiotika-, Lipopolysaccharid- bzw. anderer Sekundärmetabolit-Biosynthesen codiert werden, gehören zu einer neuen Unterfamilie von Aminotransferasen. Vertreter dieser Subfamilie wurden als "sekundärmetabolische Aminotransferasen" (SMATs) oder Ketozucker- und Ketocyclit-aminotransferasen bezeichnet (Piepersberg 1994, Piepersberg und Distler 1997). Alle Vertreter dieser Proteinfamilie weisen acht hochkonservierte Motive bzw. Aminosäurepositionen und einen konservierten Lysin-Rest auf. Eine Ausnahme bilden die Pyridoxaminphosphat-abhängigen Dehydratasen RfbH und AscC, die an Stelle des Lysins einen konservierten Histidin-Rest aufweisen (Abb. 3.2.1). Die hochkonservierten Reste Asp-173 und Lys-202 bezogen auf StsC, sind wahrscheinlich durch Interaktion des N-1-Atoms des Cofaktors Pyridoxalphosphat an der Bildung der Schiff-Base beteiligt (Pascarella und Bossa 1994).

Unter der Voraussetzung, dass der Einbau des Stickstoffes in Acarbose durch Transaminierung der dTDP-4-Keto-6-deoxy-D-glucose erfolgt, machte dieses die Beteiligung einer SMAT plausibel und sogar sehr wahrscheinlich. Die aus der bisher klonierten und bestimmten Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Acarbose-Biosynthesegenclusters zeigten jedoch keine signifikanten Ähnlichkeiten zu dieser Protein-Subfamilie (Stratmann 1997). In dieser Arbeit wurde die Identifizierung eines Aminotransferasegens, das in Nachbarschaft zum bisher bekannten Acarbose-Biosynthesegenclusters auf dem Chromosom von *Actinoplanes* sp. liegen und an dem Acarbose-Stoffwechsel beteiligt sein sollte, vorgenommen.

#### 3.2.1 Amplifizierung und Klonierung von zwei SMAT-codierenden DNA-Fragmenten

Die Suche nach Genen für Aminotransferasen vom SMAT-Typ wurde mittels heterologer PCR und mit der genomischen DNA von *Actinoplanes* sp. als Template durchgeführt. Dazu wurden aus den auf AS-Ebene hochkonservierten Bereichen geeignete Oligonukleotide abgeleitet (MS1 - 4 und MD5 - 11, s. Tab. 2.4; Abb. 3.2.1). Es wurden verschiedene PCR-Ansätze durchgeführt, wobei die Anlagerungstemperaturen zwischen 30°C und 45°C variierten und die Oligonukleotidkombinationen gewechselt wurden. In einer durchgeführten PCR

wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 40°C und einer Verlängerungszeit von 30 sec. mit der Oligonukleotidkombination MS1/3 ein 278 bp Fragment, das der erwarteten Länge entsprach, amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde in *HincII* hydrolysiertem Vektor pUC18 zu pMD1 (*smat2*) kloniert und sequenziert. In einer anderen PCR wurde bei gleicher Anlagerungstemperatur und Verlängerungszeit für die MD9/10 Oligonukleotidkombination e in 366 bp DNA-Fragment amplifiziert. Dieses Fragment entsprach auch der erwarteten Länge und wurde in *HincII* hydrolysiertem Vektor pUC18 zu pMD3 (*smat1*) kloniert und sequenziert. Die aus der *smat1*-Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz, die den konservierten Lysinrest enthielt, zeigte eine 69%ige Identität mit der Aminosäuresequenz von StsC, die aus der *smat2*-Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz eine von 45%.

### 3.2.2 Lokalisation der *smat1*- und *smat2*-kodierenden DNA-Bereiche im Genom von *Actinoplanes* sp.

Mit Hilfe der Southern-Hybridisierung sollte die Restriktionskarte der beiden SMAT-Gene bestimmt werden. Damit sollte die Frage geklärt werden, ob sie in der chromosomalen Umgebung des bisher klonierten Acarbose-Biosynthesegenclusters lagen. Dafür wurden verschiedene Cosmide, die die chromosomale Umgebung des Acarbose-Biosynthesegenclusters von *Actinoplanes* sp. tragen, mit den *smat1*- und *smat2*-Gensonden gescreent (s. 2.6.4 und 2.6.5). Die Hybridisierungen gegen die DNA der Cosmide pES7.12K4, pES7.12K5, pES7.12K9 und pES7.12K10 einer Bank, die bei der Bayer AG erstellt worden war (E. Schmidt und H. Apeler, pers. Mitteilung), hydrolysiert mit den Restriktionsenzymen *BamHI*, *SstI* und *PstI*, erbrachten jedoch keine Signale. Daraus ergab sich ein guter Hinweis, dass keine der so gefundenen SMAT-Gene im oder benachbart zum Acarbose-Biosynthesegencluster lagen.

Um die gefundenen SMAT-Gene distinkten chromosomalen Fragmenten zuordnen zu können, wurden die klonierten Fragmente mit chromosomaler *Actinoplanes* sp. DNA, hybridisiert und die in Tabelle 3.2.1 aufgeführten Signale erhalten.

**Tab. 3.2.1 Mit der *smat1*- und *smat2*-kodierenden DNA hybridisierende genomische DNA-Fragmente in *Actinoplanes* sp..**

| Enzym        | SMAT1 | SMAT2 |
|--------------|-------|-------|
| <i>BglII</i> | 3     | 7     |
| <i>BamHI</i> | 3     | 2,3   |
| <i>PstI</i>  | 2,5   | >1    |
| <i>SstI</i>  | 2,2   | 6,5   |



Pseudooligosaccharide mit einer zum Amylostatin-Gruppe (Acarbose) homologen Struktur werden von einer Reihe von *Streptomyces* Arten gebildet (s. 1.2). Die Biosynthesegene für Pseudooligosaccharide aus diesen Stämmen sind bislang noch nicht intensiv untersucht worden. Es wurden bisher nur aus *S. glaucescens* GLA.0 Biosynthesegene, die für die Biosynthese von  $\alpha$ -Amylase-Hemmstoffe kodieren, isoliert (Hoechst Patent DE19622783). Eines der dabei charakterisierten Gene (*acbB*; Genprodukt zur Vermeidung von Verwechslungen im folgenden AcbBSg genannt) kodiert für ein Protein mit hoher Homologie zu Aminotransferasen (z. B. 30% GabT aus *E. coli*), die zu der Subfamilie III der PLP-abhängigen Aminotransferasen gehören. Es wurde spekuliert, dass AcbBSg für den Einbau des Stickstoffes in die  $\alpha$ -Amylase hemmenden Pseudooligosaccharide verantwortlich sein könnte. Ein dazu ähnliches Gen wurde bisher nicht in der Nähe des Acarbose-Biosynthesegenclusters identifiziert. Daher wurde zunächst die Suche nach einem homologen Gen im Genom von *Actinoplanes* sp. vorgenommen. Sollte ein zu AcbBSg ähnliches Gen gefunden werden, gälte es anschließend eine mögliche Beteiligung des Genproduktes an der Biosynthese von Acarbose zu überprüfen.

### 3.3.1 Amplifizierung und Klonierung von *acbB* aus *S. glaucescens* GLA.0

Um eine Gensonde für die Suche nach einem Gen, das eine AcbBSg entsprechende Aminotransferase kodiert, zu präparieren, wurde mittels PCR das *acbB*-Gen direkt aus der genomischen DNA von *S. glaucescens* GLA.0 amplifiziert. Mit Hilfe der bekannten *acb*-Gene aus *S. glaucescens* GLA.0 (Hoechst Patent DE19622783) wurden geeignete Oligonukleotide abgeleitet. Dabei wurde für die spätere Klonierung (s. u.) in Expressionsvektoren am vermuteten Startcodon des *acbB*-Leserahmens eine *Nde*I-Restriktionsschnittstelle (Primer AT1; s. Tab. 2.4) und eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle 50 bp stromabwärts des Stopcodons (Primer AT2; s. Tab. 2.4) eingefügt. Unter den in Tab. 2.7 aufgeführten Bedingungen wurde unter Verwendung der Vent-DNA-Polymerase ein 1290 bp DNA-Fragment, das das komplette *acbB*-Gen umfaßte, amplifiziert und mit *Hinc*II hydrolysiertem Vektor pUC18 zu pMDAT1Sg ligiert. Durch Restriktionskartierung und Sequenzierung von pMDAT1Sg wurde die Übereinstimmung mit dem publizierten Gen *acbB* aus *S. glaucescens* belegt.

### 3.3.2 Southern-Hybridisierungen mit einer *acbB*-Gensonde

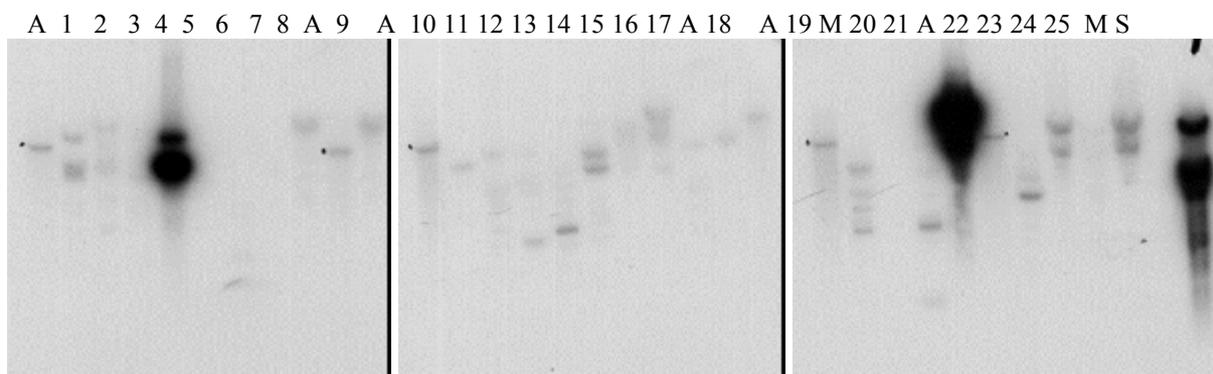
Mit Southern-Hybridisierungen sollte festgestellt werden, ob ein *acbB*-homologes Aminotransferasegen in der DNA von *Actinoplanes* sp. SE 50/100 existiert. Das *acbB*-Gen aus *S. glaucescens* GLA.0 (s. 3.3.1) wurde dazu als heterologe Sonde gegen verschieden hydrolysierte chromosomale DNA von *Actinoplanes* sp. benutzt (s. 2.6.5). Es konnte in jedem Restriktionsansatz ein einzelnes DNA-Fragment identifiziert werden, das mit der Sonde spezifisch hybridisierte (Tab. 3.3.1).

**Tab 3.3.1 Mit *acbB* aus *S. glaucescens* GLA.0 hybridisierende genomische DNA-Fragmente in *Actinoplanes* sp.**

| Restriktionsenzyme          | Hybridisierende DNA-Fragment (kb) |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| <i>Sst</i> I                | 12                                |
| <i>Sst</i> I/ <i>Bgl</i> II | 7,2                               |
| <i>Sst</i> I/ <i>Kpn</i> I  | 7,1                               |
| <i>Bam</i> HI               | 2,2                               |
| <i>Bgl</i> II               | 7,2                               |
| <i>Bgl</i> II/ <i>Kpn</i> I | 5,2                               |
| <i>Kpn</i> I                | 7,1                               |

### 3.3.3 “Shot gun“ Klonierung des *acbB*-ähnlichen Aminotransferasegens aus *Actinoplanes* sp.

Um das mit *acbB* hybridisierende 5,2 kb *Bgl*II/*Kpn*I DNA-Fragment aus der genomischen DNA von *Actinoplanes* sp., zu klonieren, wurde chromosomale DNA mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II/*Kpn*I vollständig hydrolysiert, elektrophoretisch aufgetrennt und DNA-Fragmente korrespondierender Größe isoliert und mit *Bam*HI/*Kpn*I hydrolysiertem pUC19 Plasmid ligiert. Mit Hilfe der Southern-Hybridisierung wurden 500 verschiedene Plasmide, welche aus Pools von je 25 Plasmid-tragenden Transformanden präpariert wurden, mittels der *acbB*-Gensonde und Southern Hybridisierung untersucht. Es konnten zwei “Plasmid-pools“, die mit der Gensonde hybridisierten, identifiziert werden (Abb. 3.3.1).

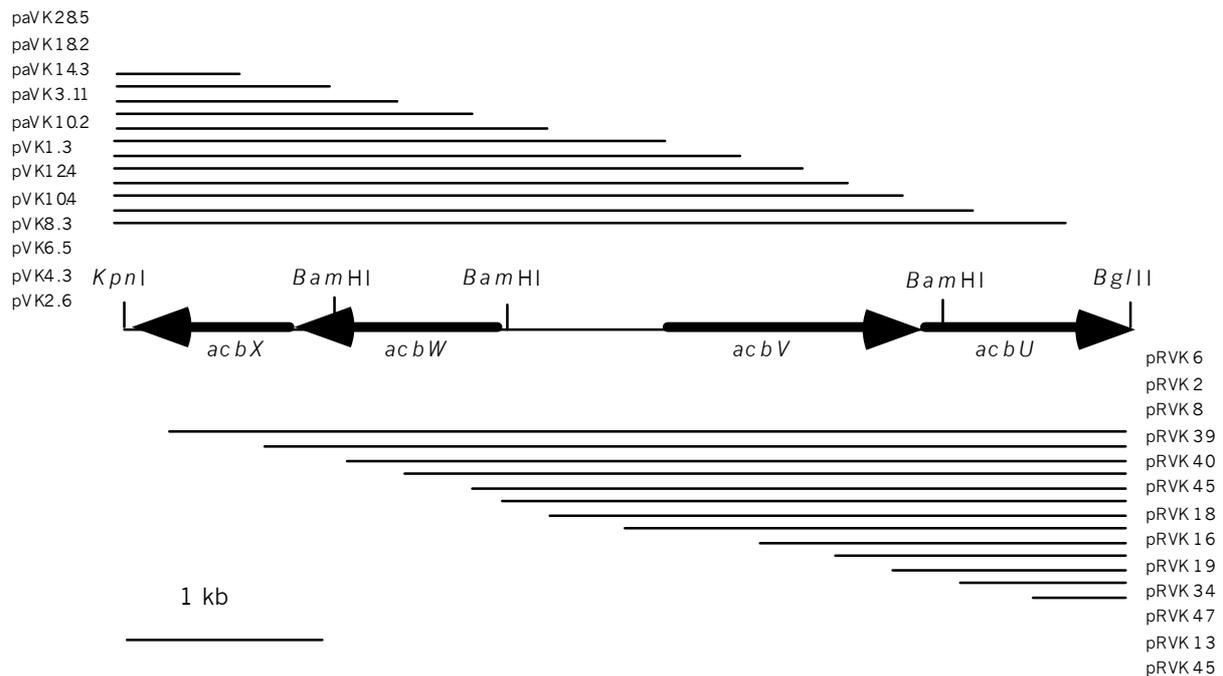


**Abb. 3.3.1 Isolation von *acbV* aus einer DNA-Bibliothek von *Actinoplanes* sp..** Dargestellt ist ein Autoradiogramm der Hybridisierung mit der *acbB*-Gensonde aus *S. glaucescens* GLA.0 gegen die resultierenden “Plasmid-Pools“ der “Shot-gun“ Klonierung eines 5,2 kb DNA-Fragmentes aus *Actinoplanes* sp.. (A) *Kpn*I hydrolysierte genomische DNA aus *Actinoplanes* sp. (1-25) Plasmid-Pools. (M) DNA-Standard. (S) *Nco*I/*Bam*HI hydrolysierte genomische DNA aus *S. glaucescens* GLA.0.

Die Plasmidpräparationen aus den Transformanden-Pools Nr. 4 und 21 wurden anschließend durch Vereinzelung der Stämme und erneuter Southern-hybridisierung (nicht gezeigt) zwei unabhängige Plasmide, pMD218 und pMD418, isoliert. Beide hybridisierten mit der *acbB*-Gensonde und enthielten, wie eine Restriktionsanalyse zeigte, identische 5,2 kb *Bgl*II/*Kpn*I DNA-Fragmente aus *Actinoplanes* sp..

### 3.3.4 Analyse des 5,2 kb *KpnI/BglII* DNA-Fragmentes durch DNA-Sequenzierung

Um das Insert von pMD418 zu sequenzieren, wurden verschiedene Verkürzungsplasmide, hergestellt (Tab. 2.3, 2.6.7). Das Insert von pMD418 hatte eine Gesamtlänge von 5128 bp (Sequenz s. Anhang 2). Unter Beachtung der Kriterien für die Streptomyceten-spezifische Codonverwendung (Bibb et al. 1984; Wright und Bibb 1992) konnten auf dem in Anhang 2 dargestellten DNA-Fragment, vier offene Leserahmen identifiziert werden. Diese erhielten die Bezeichnungen *acbU*, *V*, *W* und *X* (Abb. 3.3.2).



**Abb. 3.3.2 Restriktionkarte und Sequenzierungsstrategie für das klonierte DNA-Fragment in pMD418.** Dargestellt sind die Restriktionkarte und die vier identifizierten Leserahmen *acbU*, *acbV*, *acbW* und *acbX*. Die Länge der Rest-DNA in den Verkürzungsplasmiden sind mit Linien dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Gene *acbXW* einen Gesamt-[G + C]-Gehalt von 69,6 bzw. 70,3 mol% hatten, wohingegen derjenige von *acbVU* mit 72,5 und 73,9 mol% höher lag (Tab. 3.3.2). Wie für Actinomyceten charakteristisch, fand sich an Position 3 eines jeden Codons zu 90 % ein G oder C (Tab. 3.3.2; Bibb et al. 1984). Die 7 Codons TTA, CTT, ATA, TCT, CCT, CAA, und AGA wurden nicht verwendet (Tab. 3.3.3). Weiterhin zeigte die Analyse, dass die Genpaare *acbXW* und *acbVU* entgegengesetzt orientiert sind und wahrscheinlich je eine gemeinsame Transkriptionseinheit bilden, da die jeweiligen postulierten Stopp- und Startcodons dieser beiden Genpaare miteinander überlappten.

Tab. 3.3.2 G+C-Gehalt der Codons der Gene *acbU*, *acbV*, *acbW* und *acbX*.

| Gen         | G+C-Gehalt gesamt (%) | G+C-Gehalt Position 1 (%) | G+C-Gehalt Position 2 (%) | G+C-Gehalt Position 3 (%) |
|-------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>acbU</i> | 73,9                  | 77,6                      | 54,9                      | 89,3                      |
| <i>acbV</i> | 72,5                  | 76,6                      | 50,9                      | 90,0                      |
| <i>acbW</i> | 70,3                  | 70,8                      | 44,9                      | 95,3                      |
| <i>acbX</i> | 69,6                  | 67,2                      | 49,6                      | 92,2                      |

Tab. 3.3.3: Codonverwendung der Gene *acbU*, *acbV*, *acbW* und *acbX*.

| As | Codon | <i>acbU</i> | <i>acbV</i> | <i>acbW</i> | <i>acbX</i> | $\Sigma$ | As       | Codon  | <i>acbU</i> | <i>acbV</i> | <i>acbW</i> | <i>acbX</i> | $\Sigma$ |
|----|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| F  | TTT   | -           | 1           | -           | -           | 1        | Y        | TAT    | 1           | 1           | -           | -           | 2        |
|    | TTC   | 7           | 13          | 11          | 12          | 43       |          | TAC    | 8           | 6           | 7           | 8           | 29       |
| L  | TTA   | -           | -           | -           | -           | -        | H        | CAT    | 5           | 1           | -           | -           | 6        |
|    | TTG   | 1           | 2           | -           | 2           | 5        |          | CAC    | 10          | 16          | 9           | 2           | 37       |
|    | CTT   | -           | -           | -           | -           | -        | Q        | CAA    | -           | -           | -           | -           | -        |
|    | CTC   | 6           | 18          | 10          | 18          | 52       |          | CAG    | 9           | 8           | 10          | 6           | 33       |
|    | CTA   | 1           | -           | -           | -           | 1        | N        | AAT    | -           | 1           | -           | -           | 1        |
|    | CTG   | 33          | 33          | 28          | 30          | 124      |          | AAC    | 3           | 6           | 4           | 8           | 21       |
| I  | ATT   | -           | 1           | -           | -           | 1        | K        | AAA    | -           | 1           | 1           | -           | 2        |
|    | ATC   | 11          | 12          | 21          | 12          | 56       |          | AAG    | 1           | 3           | 5           | 1           | 10       |
|    | ATA   | -           | -           | -           | -           | -        | D        | GAT    | 4           | 1           | 3           | -           | 8        |
| M  | ATG   | 3           | 3           | 7           | 4           | 17       |          | GAC    | 20          | 22          | 25          | 4           | 71       |
| V  | GTT   | 1           | -           | -           | -           | 1        | E        | GAA    | 7           | 7           | 3           | -           | 17       |
|    | GTC   | 10          | 12          | 21          | 10          | 53       |          | GAG    | 11          | 20          | 12          | 4           | 47       |
|    | GTA   | -           | 2           | -           | 2           | 4        | C        | TGT    | 1           | -           | -           | 1           | 2        |
|    | GTG   | 13          | 22          | 12          | 12          | 59       |          | TGC    | 3           | 7           | 1           | -           | 11       |
| S  | TCT   | -           | -           | -           | -           | -        | W        | TGG    | 6           | 3           | 3           | 4           | 16       |
|    | TCC   | 5           | 4           | 4           | 3           | 16       | R        | CGT    | 2           | 2           | -           | 2           | 6        |
|    | TCA   | 1           | 1           | -           | -           | 2        |          | CGC    | 15          | 11          | 15          | 6           | 47       |
|    | TCG   | 6           | 6           | 6           | 6           | 24       |          | CGA    | 3           | 1           | 1           | 1           | 6        |
| P  | CCT   | -           | -           | -           | -           | -        |          | CGG    | 22          | 23          | 22          | 6           | 73       |
|    | CCC   | 12          | 5           | 2           | 3           | 22       |          | AGA    | -           | -           | -           | -           | -        |
|    | CCA   | -           | 1           | -           | -           | 1        |          | AGG    | -           | 1           | -           | 1           | 2        |
|    | CCG   | 19          | 16          | 13          | 12          | 60       | S        | AGT    | -           | -           | -           | 1           | 1        |
| T  | ACT   | -           | 1           | 1           | -           | 2        |          | AGC    | 6           | 6           | 9           | 3           | 24       |
|    | ACC   | 13          | 19          | 15          | 8           | 55       | G        | GGT    | 3           | 5           | 2           | 4           | 14       |
|    | ACA   | 4           | -           | 1           | -           | 5        |          | GGC    | 19          | 24          | 17          | 14          | 74       |
|    | ACG   | 3           | 6           | 4           | 3           | 16       |          | GGA    | -           | 3           | 2           | 3           | 8        |
| A  | GCT   | 2           | 1           | -           | 3           | 6        |          | GGG    | 8           | 11          | 5           | 2           | 26       |
|    | GCC   | 30          | 45          | 22          | 25          | 122      |          |        |             |             |             |             |          |
|    | GCA   | 4           | 3           | 1           | 3           | 11       |          |        |             |             |             |             |          |
|    | GCG   | 14          | 14          | 7           | 18          | 53       | $\Sigma$ | Codons | 366         | 432         | 343         | 268         |          |

### 3.3.5 Informationsgehalt der offenen Leserahmen *acbU*, *acbV*, *acbW* und *acbX* von *Actinoplanes* sp.

#### 3.3.5.1 Das Gen *acbU*

Das Genprodukt von *acbU* zeigte eine geringe Ähnlichkeit (25% Identität) zu einem Protein Pep2, welches von dem Glycogensynthese-Gencluster aus *S. coelicolor* kodiert wird (Bruton et al. 1995). In dem Genom von *S. coelicolor* kommen zwei Glycogensynthese-Gencluster vor. Diese haben ähnliche Gene, die die selbe Anordnung zeigen, obwohl die Nukleotidsequenzen nicht identisch sind. Die Funktion dieser Proteine ist unbekannt.

#### 3.3.5.2 Das Gen *acbV*

Das von der Nukleotidsequenz abgeleitete Polypeptid AcbV ähnelte Aminotransferasen, die zu der Aminotransferasesubfamilie III gehören. Die Tabelle 3.3.5 zeigt die Ähnlichkeit mit verschiedenen Typ III-Aminotransferasen. Die höchste Ähnlichkeit bestand dabei aber, wie zu erwarten, zu AcbBSg aus *S. glaucescens* GLA.0.

**Tab. 3.3.4 Ähnlichkeit von AcbV zu GabT-verwandten (Subfamilie III) Aminotransferasen verschiedener Eubakterien. (% Identität)**

|                                  | <i>Actinoplanes</i><br>sp. | <i>S. glaucescens</i> | <i>A.</i><br><i>mediterranei</i> | <i>M.</i><br><i>tuberculosis</i> ,<br>GabT | <i>S. coelicolor</i> | <i>E. coli</i> ,<br>GabT |
|----------------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------------|--|----------------------|--------------------------|
| <i>Actinoplanes</i> sp.          | 100                        | 72,3                  | 27,1                             | 28,6                                       | 25,3                 | 30,0                     |
| <i>S. glaucescens</i>            |                            | 100                   | 27,2                             | 30,5                                       | 26,1                 | 27,8                     |
| <i>A. mediterranei</i>           |                            |                       | 100                              | 23,7                                       | 22,4                 | 27,2                     |
| <i>M. tuberculosis</i> ,<br>GabT |                            |                       |                                  | 100  | 25,4                 | 41,1                     |
| <i>S. coelicolor</i>             |                            |                       |                                  |  | 100                  | 25,8                     |
| <i>E. coli</i> , GabT            |                            |                       |                                  |  |                      | 100                      |

AcbV Aminotransferase aus *Actinoplanes* sp. (diese Arbeit), AcbBSg Aminotransferase aus *S. glaucescens* (Hoechst Patent DE19622783), putative dNTP-hexose Aminotransferase aus *A. mediterranei* (Kim et al. 1998), putative GabT aus *M. tuberculosis* (Connor et al. 1996.), putative Aminotransferase aus *S. coelicolor* (SC66T3.33, Accession Nr. e1490128), GabT aus *E. coli* (Bartsch et al. 1990).

#### 3.3.5.3 Das Gen *acbW*

Das Gen *acbW* kodierte für ein Protein, das Ähnlichkeit zu Membrantranslokatoren der Superfamilie der ABC-Transportproteine (ATP binding cassette; Hyde et al. 1990) zeigt. Die Polypeptidketten der ATP-Bindungsproteine vom Typ MtrA (z. B. DrrA, OleC-Orf4), zu denen AcbW mit ca. 30% identischen As strukturell den höchsten Grad Übereinstimmung aufwies, enthielten die charakteristischen hochkonservierten ATP-Bindungsdomänen. Diese charakteristischen Domänen bestehen aus zwei konservierten Motiven, die "Walker A und B

Sites“ genannt werden (Walker et al. 1982; Abb. 3.3.3). Die ATP-Bindungsproteine von Typ MtrA sind die charakteristischen cytoplasmatischen Komponenten von ABC-Transportern, die z. B. Resistenz gegen verschiedene Antibiotika und Antikrebs-Drogen vermitteln. Diese Substanzen werden durch die ABC-Transporterproteine aus den Zellen transportiert (Exporter-Typ).

|             | Walker Motiv A  |             | Loop 3                                    |  | Walker Motiv B |
|-------------|---|-------------|---|--|----------------|
| <b>AcbW</b> | GVK <b>I</b> AY <b>I</b> GAN <b>G</b> AG <b>K</b> STTIKLLT          | <b>85aa</b> | LSLGQRMLAEIAASLLHDP <b>AVVFLDEPT</b> IGLD |  |                |
| <b>MtrA</b> | GEIVG <b>F</b> L <b>G</b> P <b>N</b> G <b>A</b> G <b>K</b> TTTMRMLT | <b>84aa</b> | LSGCQARRVDMALGLMHQ <b>PELLFLDEPT</b> ANLD |  |                |
| <b>DrrA</b> | GLVYGIL <b>G</b> P <b>N</b> G <b>A</b> G <b>K</b> STTIRMLA          | <b>84aa</b> | YSGMRRRLDIAASIVVTP <b>DLLFLDEPT</b> TGLD  |  |                |
| <b>OleC</b> | GTVMGV <b>L</b> G <b>P</b> N <b>G</b> A <b>G</b> K <b>T</b> TLVRILS | <b>84aa</b> | YSGMRRRLDLAASMI <b>GRPAVLYLDEPT</b> TGLD  |  |                |
|             | * . . . * . * * * * * . * . . . *                                   |             | * . . . * . . . * . . . * * * * * *       |  |                |

**Abb. 3.3.3 Vergleich der ATP-Bindungsdomäne von AcbW mit bekannten ATP-Bindungsproteinen**  
Identische Aminosäurereste sind durch einen Stern, konservative Austausche durch einen Punkt markiert. Die konservierten AS-Reste in den Walker Motiven sind fettgedruckt. AcbW aus *Actinoplanes* sp. (diese Arbeit); MtrA, Mithramycinresistenzgen aus *S. argillaceus* (Fernandez et al. 1996); DrrA, Daunorubicin/Doxorubicinresistenzgen aus *S. peucetius* (Guilfoile und Hutchinson 1991); OleC, Oleandromycinresistenzgen aus *S. antibioticus* (Rodriguez et al. 1993).

### 3.3.5.4 Das Gen *acbX*

Das von der Nukleotidsequenz abgeleitete Polypeptid AcbX zeigte keine signifikante Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen. Das postulierte Startcodon des *acbX*-Gens überlappte mit dem für *acbW* postulierten Stopcodon und in Konsequenz wurde vermutet, dass das *acbX*-Gen für Membran-ständige Proteinkomponente des ABC-Transportsystems kodieren könnte. Deshalb wurde ein Hydrophobizitätsprofil der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *acbX* erstellt und mit denjenigen anderer ABC-Transporter verglichen. Abb. 3.3.4 und Tabelle 3.3.4 zeigen, das AcbX 6 Membran-durchspannende Domänen besitzen könnte. Im Vergleich zu DrrB und OleC-Orf4 waren die Transmembranhelices I und II in AcbX dabei zum N-Terminus hin verschoben.

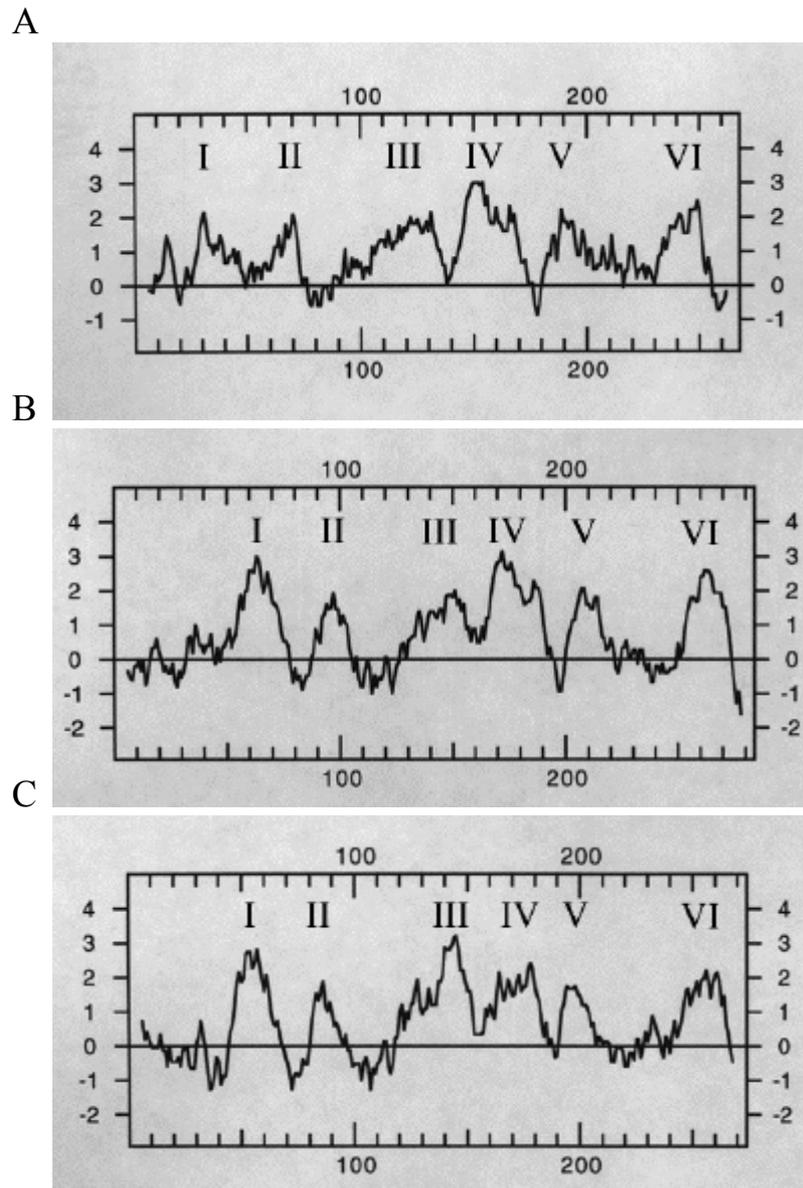
**Tab. 3.3.5 Mögliche Transmembrandomänen von AcbX.**

| Transmembranhelix | von AS | bis AS | Länge in AS | Richtung |
|-------------------|--------|--------|-------------|----------|
| I                 | 24     | 44     | 21          | i-a      |
| II                | 41     | 75     | 35          | a-i      |
| III               | 115    | 133    | 19          | i-a      |
| IV                | 142    | 159    | 18          | a-i      |
| V                 | 181    | 199    | 19          | i-a      |
| VI                | 232    | 255    | 24          | a-i      |

Das Modell wurde mit dem TMPRED-Programm errechnet.

(i-a) = innen-ausen.

(a-i) = ausen-innen.



**Abb. 3.3.4 Vergleich der Hydrophobizitätsprofile von AcbX mit bekannten Membranproteinen von ABC-Transporten.** Die Ähnlichkeit der Hydrophobizitätsprofile wurden nach Kyte und Doolittle (1982) berechnet. Kurvenverlauf:  $> 0$  = hydrophobe,  $< 0$  = hydrophile Bereiche innerhalb der Polypeptidkette. (A) AcbX aus *Actinoplanes* sp.. (B) DrrB, Membranprotein des Daunorubicin/Doxorubicin ABC-Transporters aus *S. peucetius* (Guilfoile und Hutchinson 1991). (C) OleC-Orf4, Membranprotein des Oleandomycin ABC-Transporters aus *S. antibioticus* (Rodriguez et al. 1993).

### 3.3.6 Lage des 5,2 kb *KpnI/BglIII* DNA-Fragmentes relativ zum *acb*-Gencluster auf dem Chromosom von *Actinoplanes* sp.

Um eine mögliche Beteiligung der auf dem 5,2 kb *KpnI/BglIII* DNA-Fragment liegenden (und vorläufig mit *acb*-Symbol benannten) Gene an der Biosynthese von Acarbose zu überprüfen, werde zunächst die Lage des o. g. Fragmentes in Bezug zum Acarbosebiosynthesegen-cluster bestimmt. Später identifizierte und parallel unabhängig analysierte Acarbosebiosynthesegene enthaltende rekombinante Phagen ( $\Phi 52$ ,  $\Phi 53$  und  $\Phi 103$ ; M. Jarling und H. Thomas, pers. Mitteilung) bestätigten durch Restriktionsanalyse und Hybridisierungsexperimente eine Überlappung mit dem 5,2 kb *KpnI/BglIII*-Fragment. Dabei

wurde ein mit der *acbB*-Gensonde (s. 3.3.1) hybridisierendes 2,2 kb *Bam*HI-Fragment des rekombinanten Phagen  $\Phi$ 52 identifiziert (s. auch Abb. 1.7). Der DNA-Bereich lag demnach auf dem Chromosom von *Actinoplanes* sp. benachbart zu Genen, für die eine Beteiligung an der Bildung der Acarbose gezeigt wurde (Stratmann 1997).

Nach der Sequenzbestimmung des Inserts von den pMD418 Plasmid wurde festgestellt, daß die Sequenz eines DNA-Bereich zu 100% mit einer bereit bekannten Sequenz des rekombinanten Phagen  $\Phi$ 52 übereinstimmt (M. Jarling, pers. Mitteilung).

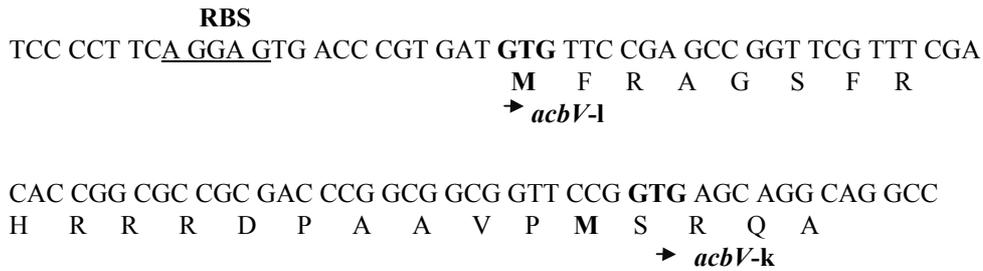
### **3.4 Versuche zur Expression der Aminotransferase AcbV**

#### **3.4.1 Versuche zur Expression von AcbV unter Kontrolle des natürlichen Promotors in *S. lividans* TK23**

Es konnte gezeigt werden, daß die alpha-Amylase AcbE aus *Actinoplanes* sich in *S. lividans* TK23 unter Kontrolle des natürlichen Promotors konstitutiv exprimieren ließ (Stratmann 1997). Es ist zu vermuten, daß im Bereich stromaufwärts des *acbV*-Gens ein Promotor liegt, der möglicherweise auch von den *S. lividans* TK23 RNA-Polymerasen erkannt wird. In der Hoffnung einer konstitutiven Expression von *acbV* in *S. lividans* wurden ein 5,2 kb *Eco*RI/*Hind*III- und ein 2,2 *Bam*HI DNA-Fragment aus pMD418 in den bifunktionalen Streptomyeten-*E. coli* Vektor pUWL218 ligiert. Beide Fragmente umfaßten das *acbV*-Gen sowie die stromaufwärts liegenden DNA-Bereiche, die mögliche Transkriptionsinitiationssignale tragen könnten. *S. lividans* Zellen, die die daraus resultierenden Plasmide pMDAT1 und pMDAT2 enthielten, wurden auf Expression von AcbV überprüft. In zellfreien Extrakten konnte nach denaturierender SDS-Gelelektrophorese, im Vergleich zu Kontrollexperimenten mit pUWL218, kein zusätzliches auf AcbV hinweisendes Protein detektiert werden, unabhängig davon, ob die *S. lividans* Zellen in TBS oder Acarboseproduktionsmedium angezogen wurden.

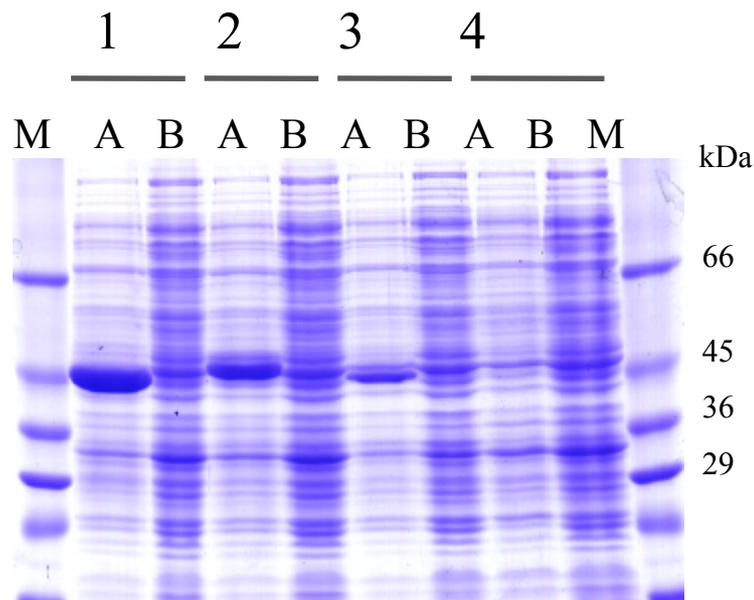
#### **3.4.2 Expression der Aminotransferasen AcbV aus *Actinoplanes* sp. und AcbB aus *S. glaucescens* in *E. coli***

Es wurden zwei mögliche Startcodons für *acbV* gefunden (*acbV*-l, *acbV*-k; s. Abb. 3.4.1). Die abgeleiteten hypothetischen Proteine wurden mit AcbV-l (47,9 kDa) und AcbV-k (45,8 kDa) bezeichnet. Deswegen wurden mittels der PCR-Methode zwei verschiedene Fragmente aus chromosomaler DNA von *Actinoplanes* sp. amplifiziert, welche die beiden möglichen kodierenden Bereiche des *acbV*-Gens umfaßten (2.6.6, Tab. 2.7: Primerkombinationen MAT1/3 und MAT9/3). Das *acbB*-Gen aus *S. glaucescens* GLA.O wurde ebenfalls amplifiziert (2.6.6, Tab. 2.7: Primerkombination AT1/2). Die amplifizierten Gene *acbV*-k, *acbV*-l und *acbB* wurden mit dem *E. coli* Expressionsvektor pET16b ligiert (Tab. 2.2).



**Abb. 3.4.1 5'-Bereich des *acbV*-Gens.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz. In fett sind die beiden möglichen Startcodons gezeigt. RBS: Mögliche Ribosomenbindungsstelle.

Die resultierenden Plasmide pH16AT1, pH16AT9 und pH16ATSg (Tab. 2.3) kodieren für die Proteine AcbV-k, AcbV-l und AcbBSg jeweils mit einem His<sub>6</sub>-Rest N-terminal fusioniert. In Expressionsexperimenten in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen unter Standardbedingungen (s. 2.8), konnte nur eine zusätzliche Proteinbande (45,6 kDa), welche in dem Zellextrakt des AcbBSg-Expressionsexperiments vorkam, im Vergleich zu den Kontrollexperimenten mit pET16b auf SDS-Gelen nach Coomassie-Färbung (2.11) detektiert werden. Die Expression von AcbV-k und AcbV-l war nicht erfolgreich oder zu schwach, um mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden zu können. Die Expressionsexperimente wurden dann in LB Medium + 1M Sorbitol + 2,5 mM Betain bei 20 °C nochmals durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> = 0,3 induziert und nach 14 Stunden geerntet. Diesmal konnten die Expressionen von AcbV-k, AcbV-l und AcbBSg auf SDS-Gelen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.4.2). Die Expressionsversuche führten nur zur Bildung von unlöslichen Proteinen.

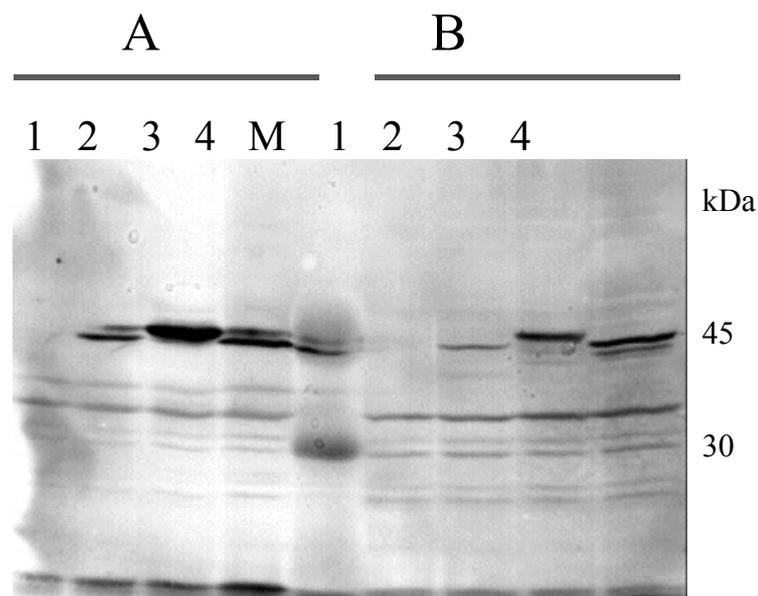


**Abb. 3.4.2 Expression von AcbV-k, AcbV-l und AcbBSg *E. coli* BL21 (DE3).** Dargestellt ist eine SDS-PAGE Analyse nach Coomassie-Färbung. A: Zellextrakte 14 Stunden nach der Induktion geerntet B: Zellextrakte vor der Induktion geerntet. M: Standard. 1: AcbBSg (pH16ATSg). 2: AcbV-l (pH16AT9). 3: AcbV-k (pH16AT1). 4: Kontrolle (pET16b).

### 3.4.3 Co-Expression der Aminotransferasen AcbV bzw. AcbBSg mit GroESEL von *S. griseus* in *E. coli*

Um lösliche Proteine zu gewinnen, wurde eine Co-Expression der Aminotransferasen AcbV bzw. AcbBSg mit den Chaperonen GroESEL von *S. griseus* in *E. coli* versucht (Pöhling 1997).

Die Plasmide pH16AT1, pH16AT9 und pH16ATSg (s. 3.4.2) wurden in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, welche das pSUTNESLB10 Plasmid trugen, transformiert. Das Plasmid pSUTNESLB10 ist ein GroESEL-Expressionsystem unter Kontrolle des T7 $\square$ 10 Promotors (Pöhling 1997). Unter Standardbedingungen (2.8), konnten keine zusätzlichen Proteinbanden im Vergleich zu den Kontrollexperimenten mit pET16b auf SDS-Gelen nach Coomassie-Färbung (2.11) detektiert werden. Mit Hilfe der Westernblot-Methode und Anti His-Tag Antikörpern (2.12 und 2.13), konnte die Produktion der drei Fusionsproteine His-AcbV-k, His-AcbV-l und His-AcbBSg in löslicher Form nachgewiesen werden (s. Abb. 3.4.3).



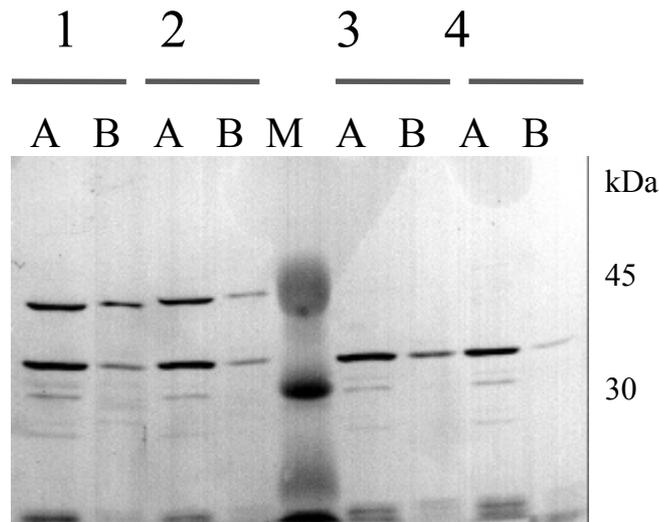
**Abb. 3.4.3 Co-Expression beider AcbV-Versionen und AcbBSg mit GroESEL aus *S. griseus* in *E. coli*** Die Expressionen wurden mittels anti His-tag Antikörpern nachgewiesen. A: komplette Zellextrakte. B: Zellfreie-Extrakte. M: Standard. 1: Kontrolle (pET16b). 2: His-AcbV-k (pH16AT1). 3: His-AcbV-l (pH16AT9). 4: His-AcbBSg (pH16ATSg).

### 3.4.4 Heterologe Expression der Aminotransferasen AcbV und AcbBSg unter Kontrolle des *rhaP* Promotors in *E. coli*

Die rekombinanten Plasmide pJATH1, pJATH9 und pJATHSg, die Derivate von pJOE2775 sind, kodierten AcbV-k-His, AcbV-l-His und AcbBSg-His jeweils mit einer His<sub>6</sub>-enthaltenden Peptidextension C-terminal fusioniert (Tab. 2.3). Um diese Plasmide zu konstruieren, wurden an der Stelle des Stopcodons der Gene *acbV-k*, *acbV-l* und *acbB* mittels

PCR eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle eingeführt (2.6.6, Tab. 2.7: Primerkombinationen MAT1/act.RHAM, MAT9/act.RHAM und AT1/sgl.RHAM).

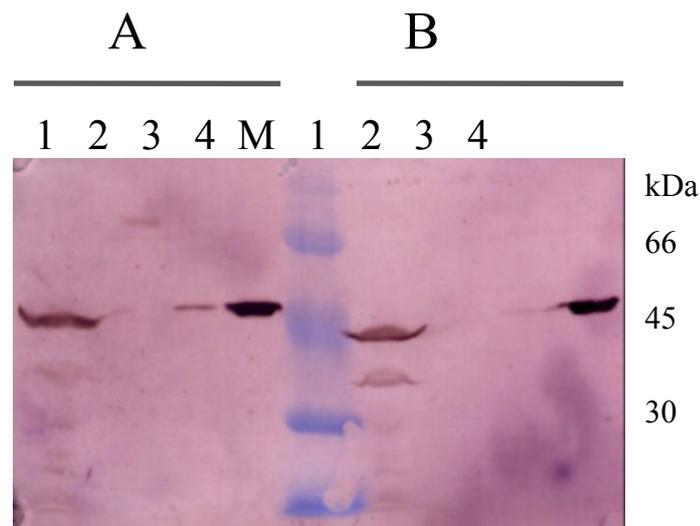
Die Expressionsexperimente wurden wie in 2.8 beschrieben in *E. coli* JM109 durchgeführt. Es konnten keine zusätzlichen Proteinbanden im Vergleich zu den Kontrollexperimenten mit pJOE2775 auf SDS-Gelen nach Coomassie-Färbung detektiert werden. In Westernblots mit Anti His-Tag Antikörpern konnte die Expression der AcbV-l-His und AcbBSg-His Fusionsproteine in löslicher Form nachgewiesen werden (Abb. 3.4.4).



**Abb. 3.4.4 Expression von AcbV-l-His und AcbBSg-His unter Kontrolle des *rhaP* Promotors in *E. coli* JM109.** Die rekombinant produzierten Proteine wurden mittels Anti His-tag Antikörpern im Westernblot nachgewiesen. A: Zellfreie Extrakte. B: Komplette Zellextrakte. M: Standard. 1: AcbBSg-His (pJATSg). 2: AcbV-l-His (pJAT9). 3: AcbV-k-His (pJAT1). 4: Kontrolle (pJOE2775).

### 3.4.5 Heterologe Expression der Aminotransferasen in *S. lividans* TK23.

Diese Expressionsvektoren pHWAT1 (*his-acbV-k*), pHWAT9 (*his-acbV-l*) und pHWATSg (*his-acbB*) (Tab. 2.3) wurden in *S. lividans* TK23 transformiert. Die Expression der AcbV-k-His, AcbV-l-His und AcbBSg-His Enzyme erfolgte unter der Kontrolle des *ermE\** Promotors (2.9). Nach 48 Stunden Wachstum wurden die Zellen geerntet. Es konnten keine zusätzlichen Proteinbanden auf SDS-Gelen nach Coomassie-Färbung detektiert werden aber in Western Blots mit Anti His-Tag Antikörpern konnte die Expression der AcbV-l-His und AcbBSg-His Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die überproduzierten Proteine AcbV-l-His und AcbBSg-His wurden mittels Affinitätschromatografie mit Ni<sup>+</sup>-NTA-Agarose Säulen angereichert (2.10). Wegen der schwachen Produktion beider Proteine, wurden bei der Affinitätschromatografie neben den nur geringfügig überproduzierten AcbV-l-His und AcbBSg-His andere Proteine, die unspezifisch an der Ni<sup>+</sup>-NTA-Agarose banden, angereichert. Die Anreicherung wurde jedoch mit Anti His-Tag Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.4.5).



**Abb. 3.4.5 Produktion und Anreicherung von AcbV-I-His und AcbBSg-His.** Die Fusionsproteine AcbV-I-His und AcbBSg-His waren in *S. lividans* wie unter 3.4.5 beschrieben produziert worden und wurden mittels Anti His-tag Antikörpern nachgewiesen. A: Expression und Anreicherung des AcbV-I-His Proteins. B: Expression und Anreicherung des AcbBSg-His Proteins. M: Standard. 1: Zellfreie-Extrakte. 2: Waschen. 3: Elution I. 4: Elution II.

### 3.5 Herstellung von 2,5-*epi*-Valiolon

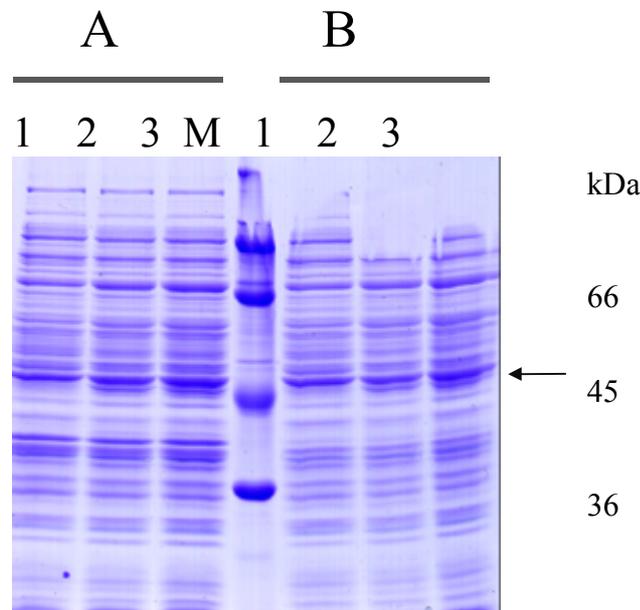
Die C7-Cyclitol Synthase AcbC katalysiert die Bildung des Reaktionsproduktes 2,5-*epi*-Valiolon (Stratmann et al. 1999). Diese Valienamin-Vorstufe konnte das mögliche Substrat für andere Biosynthesegene, d.h. Acb-Proteine (wie z.B. AcbV), darstellen (vgl. 1.4). Sedoheptulose-7-phosphat, das Substrat des AcbC Enzyms war nicht käuflich zu erwerben. Daher musste eine enzymatische Methode zur Herstellung von 2,5-*epi*-Valiolon etabliert werden (2.15).

#### 3.5.1 Versuche zur Expression von löslichem AcbC in *E. coli*

Bisherige Versuche zur Expression von AcbC in *E. coli* führten nur zur Bildung von unlöslichem Protein; andererseits erwiesen sich die rekombinanten Überproduzenten von AcbC in *S. lividans* als instabil (Stratmann 1997). Um daher lösliches Protein in *E. coli* zu gewinnen, wurde ein anderes Expressionssystem für *E. coli* getestet, das unter der Kontrolle des *rha* Promotors eine moderate und kontrollierte Überproduktion ermöglichen sollte (Volf, et al. 1996; s. auch 3.4.4).

Zwei verschiedene PCR-Fragmente, welche das *acbC*-Gen umfassten, wurden jeweils mit einer *Bgl*II Restriktionsschnittstelle 30 bp stromabwärts des Stopcodons der *acbC*-Gens und andere mit der *Bgl*II Restriktionsschnittstelle an Stelle des Stopcodons des *acbC*-Gens amplifiziert (2.6.6, Tab. 2.7: Primerkombinationen AS-C1/MD-C3 und AS-C1/MD-C4). Diese DNA-Fragmente wurden mit der pJOE2702 und pJOE2775 zu pMDC und pFMDC

kloniert (Tab. 2.3). Die Expression erfolgte in *E. coli* JM109 (2.8). Die Expression des AcbC Proteins konnte auf SDS-Gelen nach Coomassie-Färbung (2.11) nachgewiesen werden (Abb. 3.5.1).

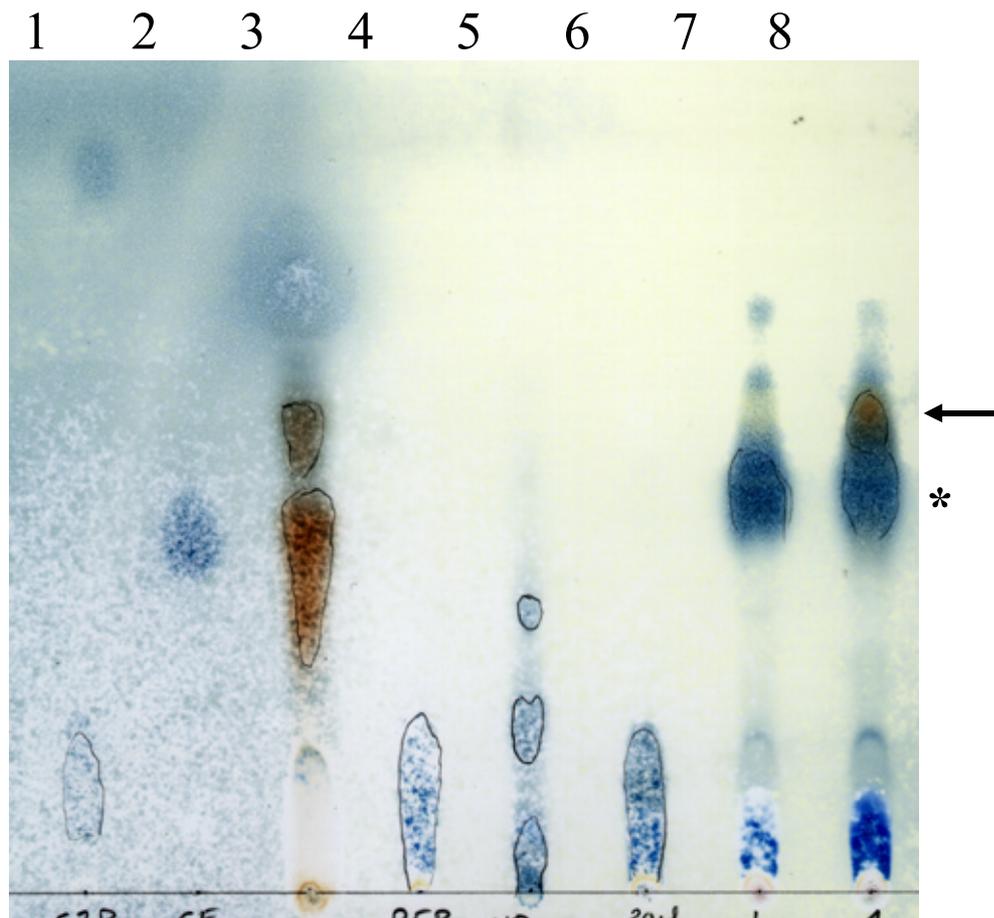


**Abb. 3.5.1 Expression des AcbC Proteins aus *Actinoplanes* sp. unter Kontrolle des *rha* Promotors in *E. coli* JM109.** Dargestellt ist eine SDS-PAGE Analyse nach Coomassie-Färbung. A: komplette Zellextrakte. B: Zellfreie-Extrakte. M: Standard. 1: pJOE2702 (Kontrolle). 2: pMDC1. 3: pMDC2.

### 3.5.2 Synthese von Sedoheptulose-7-Phosphat und 2,5-*epi*-Valiolon in einer gekoppelten Reaktion

Die Umsetzung von Ribose-5-phosphat und Hydroxypyruvat zu Sedoheptulose-7-phosphat wurde in einem Kaliumphosphatpuffer optimiert, obwohl die Verwendung dieses Puffer die Transketolase störte (Schärken 1997). Allerdings sollte in diesem Puffersystem gewährleistet sein, daß die Zyklisierungsreaktion erfolgt. Der Ablauf und die Zusammensetzung des gekoppelten Tests ist in Material und Methoden (s. 2.15) dargestellt.

Die Umsetzung der Substrate wurde durch Dünnschichtchromatografie auf Kieselgelfolien verfolgt (2.18). Die Transketolase EC 2.2.1.1 setzt Hydroxypyruvat mit Ribose-5-phosphat zu Sedoheptulose-7-phosphat um (vgl. Spur 6, Abb. 3.5.2). Wurde zusätzlich ein wie oben beschriebener AcbC-Extrakt (s. 3.5.1) zugesetzt, konnte die Bildung einer Substanz festgestellt werden (Spur 8), die die gleichen Laufeigenschaften aufwies, wie das zuvor beschriebene 2,5-*epi*-Valiolon (Stratmann et al. 1999; vgl. Spur 3). Heterolog in *E. coli* produziertes AcbC-Protein ist somit in der Lage, 2,5-*epi*-Valiolon zu bilden. Es ergaben sich Hinweise, dass in den verwendeten Rohextrakten eine starke Dephosphorylierung der Substrate Ribose-5-phosphat und Sedoheptulose-7-phosphat (vgl. Spur 8) stattfand.



**Abb. 3.5.2 Bildung von 2,5-*epi*-Valiolon durch gekoppelte Enzymreaktionen.** DC-chromatographische Trennung des Umsatzes von Ribose-5-phosphat und Hydroxypyruvat mit Transketolase und AcbC. Die getrocknete DC-Folie wurde mit dem Cer-Reagenz besprüht und durch Hitze entwickelt. 1: Sedoheptulose-7-phosphat. 2: Sedoheptulose. 3: AcbC-Enzymtestansatz von Stratmann A. (1997). 4: Ribose-5-phosphat. 5: Hydroxypyruvat. 6: Umsetzung von Ribose-5-phosphat und Hydroxypyruvat zu Sedoheptulose-7-phosphat durch Transketolase-aktivität. 7: Transketolase mit Extrakt aus *E. coli* (pJOE2702) als Negative-kontrolle. 8: Gekoppelter Transketolase/AcbC-Ansatz mit pMDC-Extrakt. Pfeil = 2,5-*epi*-Valiolon; Stern = wahrscheinlich Mischung aus dephosphorylierter Ribose und Sedoheptulose.

### 3.6 Versuche zum Nachweis einer Aminotransferaseaktivität von AcbV bzw. AcbBSg

Es wurden verschiedene Enzymtests mit den Proteinen AcbV-1 aus *Actinoplanes* sp. und AcbBSg aus *S. glaucescens* GLA.0 durchgeführt (2.16). Die Enzymtests wurden mit Zellfreien Extrakten von *S. lividans* TK23 Zellen, die die jeweiligen Aminotransferase-Expressionsplasmide trugen, durchgeführt (s. 3.4.5). Diese Extrakte wurden ausgewählt, um eine mögliche Hintergrundaktivität der dTDP-4-Keto-L-rhamnose 3,5-Epimerase aus *E. coli*, welche ebenfalls dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose umsetzt, zu vermeiden (Verseck 1997). Als Substrate dienen 2,5-*epi*-Valiolon und dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose. 2,5-*epi*-Valiolon wurde enzymatisch gewonnen (s. u.). Später konnte auch von O. Block (Uni. Wuppertal) synthetisch hergestellte Substanz für die Enzymtests eingesetzt werden. dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose wurde mit dem Enzym RmlB aus *Sa. enterica* (dTDP-Glucose 4,6-dehydratase) ausgehend

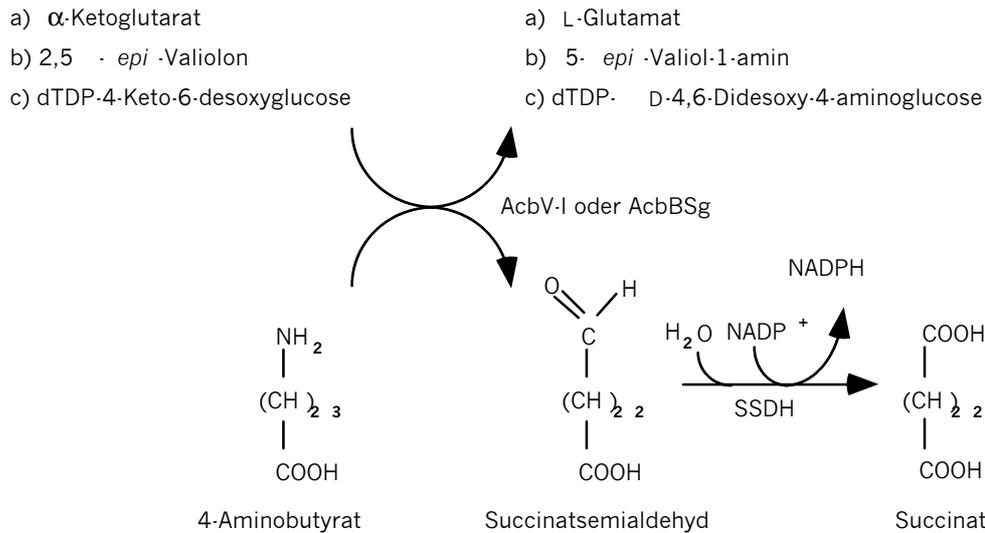
von dTDP-Glucose gewonnen (s. 2.14; Verseck 1997). In von Lee und Egelkraut (1998) durchgeführten Studien wurde L-Glutamat als Hauptdonor des Stickstoffes für die Acarbosebildung identifiziert. Aufgrund dieses Hinweises und der Ähnlichkeit von AcbBSg und AcbV zu GabT aus *E. coli* und *M. tuberculosis* (s. 3.3.5.2), welche 4-Aminobutyrat umsetzen sollten, wurden neben diesen beiden Substraten auch andere Aminodonoren wie L-Glutamin, L-Asparagin, L-Aspartat und L-Ornithin in dieser Arbeit getestet.

Zunächst wurden die Reaktionsgemische durch HPLC-Analyse (2.17) auf die Umsetzung des jeweils eingesetzten Substrats überprüft. Aufgrund der schwachen Aktivität der beiden Proteine AcbV-1 und AcbBSg, welche später nachgewiesen wurde (s. 3.6.2), konnte jedoch mit dieser Methode keine eindeutige Bildung des Produkts dTDP-D-4,6-Didesoxy-4-aminoglucose nachgewiesen werden. Zahlreiche Substanzen des Reaktionsgemisches zeigten ein sehr ähnliches Retentionsverhalten und waren auch durch leichte Modifizierung der Chromatographiebedingungen nicht von dem zu erwartenden Produkt zu trennen. Deswegen wurden verschiedene gekoppelte Enzymtests entwickelt.

### 3.6.1 4-Aminobutyrat als Aminodonor

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von AcbV und AcbBSg zeigten die höchste Ähnlichkeit (30% Identität) zu GabT aus *E. coli* (Bartsch et al. 1990). GabT katalysiert die Umsetzung von 4-Aminobutyrat zu Succinatsemialdehyd unter Verwendung von  $\alpha$ -Ketoglutarat als Aminoakzeptor (Abb. 3.6.1 a). Dieses Enzym spielt eine Rolle beim Abbau verschiedener Aminosäuren. Daher sollte Aminobutyrat als potentieller Aminogruppendonor getestet werden (s. Abb. 3.6.1 und 2.16). Ausserdem sollte die Möglichkeit, dass AcbBSg und AcbV eine typische GabT-Aktivität besitzen könnten, ausgeschlossen werden. (Test a, Abb. 3.6.1). Dafür wurde der in Abb. 3.6.1 dargestellte Enzymtest entwickelt. Die Umsetzung von 2,5-*epi*-Valiolon, dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose oder  $\alpha$ -Ketoglutarat mit AcbV-1 bzw. AcbBSg enthaltenden zellfreien Extrakten von *S. lividans* TK23 (s. 3.4.5) sollte unter Verbrauch von  $\text{NADP}^+$  photometrisch verfolgt werden können.

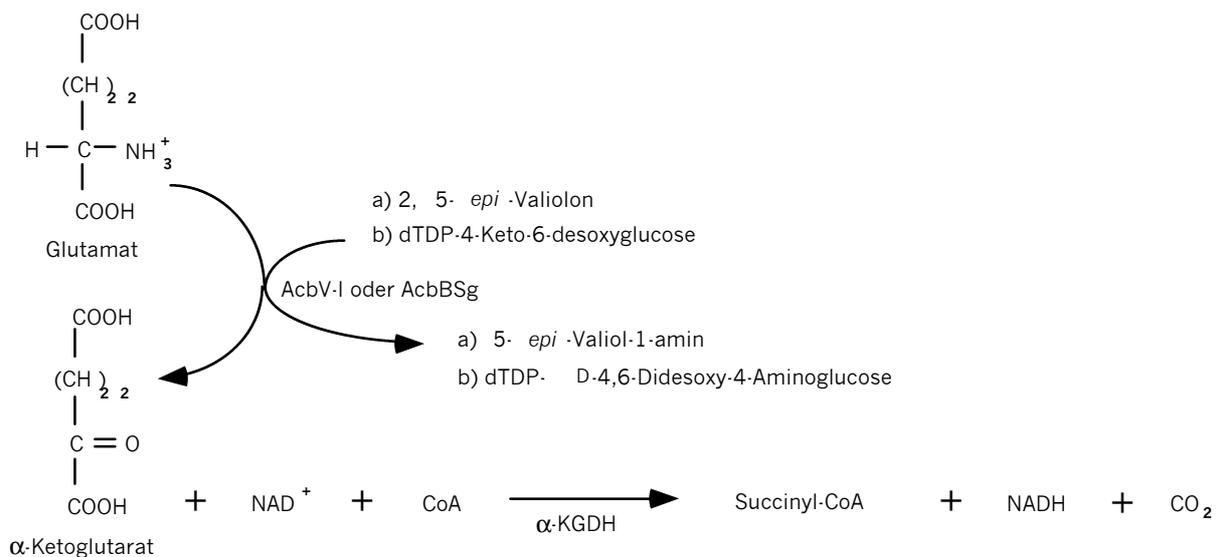
Es konnte jedoch im Vergleich zu den Kontrollexperimenten (mit zellfreien Extrakten, die gewonnen wurden aus *S. lividans* TK23 Zellen, die das Plasmid pUWL201 trugen) keine erhöhte Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat nachgewiesen werden. Damit konnte eine typische GabT-Aktivität für die Proteine AcbV und AcbBSg ausgeschlossen werden. Bei Verwendung von 2,5-*epi*-Valiolon und dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose (Tests b und c, Abb. 3.6.1) als Substrate konnte ebenfalls keine Zunahme oder Abnahme von NADPH nachgewiesen werden, weder bei Verwendung von *S. lividans* Extrakten, die aus AcbV-1, AcbBSg oder pUWL201 tragenden Zellen stammen, noch in Ansätzen, denen eines der Substrate fehlte.



**Abb. 3.6.1 Strategie für den Nachweis der Aminotransferase mit 4-Aminobutyrat als Aminodonor.** Der Nachweis wurde durch Zunahme von NADPH gemessen. SSDH: Succinatsemialdehyd Dehydrogenase. a) GabT Reaktion in *E. coli*. b) 2,5-*epi*-Valiolon als Substrat. c) dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose als Substrat.

### 3.6.2 Glutamat als Aminodonor

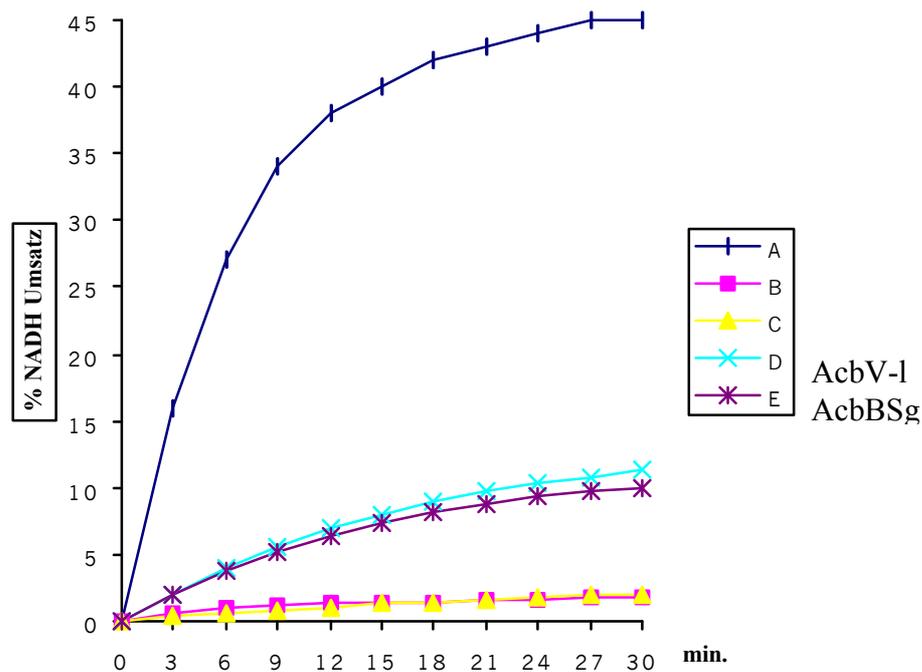
Ebenfalls in einem gekoppelten Enzymtestsystem mit  $\alpha$ -Ketoglutarat Dehydrogenase als Hilfsenzym wurde überprüft, ob L-Glutamat als Aminodonor für die Bildung von 5-*epi*-Valiol-1-amin (mit unklarer Stereochemie an C2) bzw. dTDP-D-4,6-desoxy-4-aminoglucose dienen konnte. Der Verlauf der Reaktion konnte photometrisch bei 340 nm durch Bildung von NADH verfolgt werden (Abb. 3.6.2).



**Abb. 3.6.2 Strategie für den Nachweis der Aminotransferase mit L-Glutamat als Aminodonor.** Der Nachweis wurde durch Zunahme von NADH gemessen.  $\alpha$ -KGDH:  $\alpha$ -Ketoglutarat Dehydrogenase. a) 2,5-*epi*-Valiolon als Substrat. b) dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose als Substrat.

Die Enzymtests wurden mit zellfreien Extrakten von *S. lividans* TK23 Zellen, die die jeweiligen Aminotransferase-Expressionsplasmide pHWAT9 und pHWATSg trugen, durchgeführt (s. 3.4.5). Sowohl in AcbV-I als auch in AcbBSg Extrakten konnte mit dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose als Aminoakzeptor eine über die Zeit zunehmende Extinktion bei 340 nm beobachtet werden, was wahrscheinlich auf die Bildung eines dTDP-Glucosederivates, möglicherweise von dTDP-D-4,6-desoxy-4-aminoglucose zurückgeführt werden kann (Abb. 3.6.3, Kurven D und E).

In den Kontrolllexperimenten, welche z. B. mit zellfreien Extrakten, gewonnen von *S. lividans*/pUWL201 oder aber ohne Zusatz von einem der beiden Substrate durchgeführt wurden, entstand kein NADH. Auch unter Verwendung von 2,5-*epi*-Valiolon als Substrat unterschied sich die Extinktionsveränderung bei 340 nm nicht von den o. g. Negativkontrollen (Abb. 3.6.3). Mit zellfreien Extrakten von *Actinoplanes* sp. konnte ebenfalls weder mit 2,5-*epi*-Valiolon noch mit dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose eine NADH-Bildung beobachtet werden (Abb. 3.6.3, Kurve B).



**Abb. 3.6.3 Aminotransferaseaktivität von AcbV-I und AcbBSg mit dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose als Substrat und L-Glutamat als Aminodonor (vgl. Abb. 3.6.2; b).** Enzymtests wurden bei RT durchgeführt. Kurve A: Umsatz  $\alpha$ -Ketoglutarat mit  $\alpha$ -Ketoglutarat Dehydrogenase (Positivkontrolle). Kurve B: *Actinoplanes* sp. zellfreier Extrakt. Kurve C: Zellfreier Extrakt als Negativkontrolle (*S. lividans* TK23/pUWL201; s. 3.4.5). Kurve D: AcbV-I zellfreier Extrakt (*S. lividans* TK23/pHWAT9; s. 3.4.5). Kurve E: AcbBSg zellfreier Extrakt (*S. lividans* TK23/pHWATSg; s. 3.4.5).

### 3.7 Suche nach Genen für die Biosynthese von Valienamin-haltigen Sekundärmetaboliten in Streptomyceten

Acarbose gehört zu einer Gruppe von Pseudooligosacchariden, die sich durch die Fähigkeit zur Inhibition von Glucosidasen und Trehalasen und den Besitz des Valienamin-Bausteins auszeichnen (Müller et al. 1980; vgl. Einleitung). Neben Acarbose werden z. B. von Actinomyceten auch andere acarviosylhaltige Naturstoffe und Validamycin produziert (Abb. 1.1).

Mit Hilfe von Gensonden, abgeleitet von dem Gencluster der Acarbosebiosynthese aus *Actinoplanes* sp. sollten daher homologe Gene in Streptomyceten, die ähnliche Substanzen produzieren, identifiziert und isoliert werden.

#### 3.7.1 Identifizierung von Homologen zu Acarbose-Biosynthesegenen in anderen Streptomyceten mittels PCR

##### 3.7.1.1 Versuche zur Isolierung von *acbC*-ähnlichen Genen mit Hilfe der PCR

Verschiedene Oligonukleotid-Primer wurden aus hochkonservierten Bereichen von Proteinen, die zu AcbC ähnlich sind, abgeleitet (Abb. 3.7.1; Tab. 2.4). Genomische DNA von *S. myxogenes*, *S. calvus*, *S. dimorphogenes* und *S. hygroscopicus* ssp. *limoneus* wurden als "Template-DNA" in den verschiedenen PCR-Ansätzen eingesetzt (2.6.6). Es konnten mit unterschiedlichen Primerkombinationen, Anlagerungstemperaturen und Verlängerungszeiten Fragmente aus verschiedenen Stämmen isoliert werden (Tab. 3.7.1). Sequenzierungsanalysen zeigten jedoch, dass die von den klonierten DNA-Fragmenten abgeleiteten Aminosäuresequenzen keine Homologie zu AcbC aufwiesen.

**Tab. 3.7.1 PCR Ansätze für die Amplifizierung von Teilbereichen mögliche *acbC*-Gene homologe.**

| Primerpaar | Erwartete Größe bei <i>Actinoplanes</i> sp. (bp) | Anlagerungstemperatur (°C) |
|------------|--|----------------------------|
| acbC 1/9   | 738  | von 44 bis zum 58          |
| acbC 3/9   | 501  | von 44 bis zum 58          |
| acbC 4/9   | 456  | von 44 bis zum 58          |
| acbC 3/7   | 219  | von 44 bis zum 58          |
| acbC 2/8   | 471  | von 44 bis zum 58          |
| acbC 1/8   | 678  | von 44 bis zum 58          |
| acbC 3/8   | 441  | von 44 bis zum 58          |

Die erhaltenen PCR-Fragmente aus den verwendeten Stämmen zeigten keine Homologie zu AcbC.

|      |  |
|------|--|
| AcbC | VSGVETVGVHADAHRDSWQVRAQ-KQITYEVRFRDDVFGLDSTDLLLEAGA  |
| RifG | VPPTTAT-----TREVVELGERAYTVHIGHGVRA-ALPDVVRA--        |
| AroB | MER-----IVVTLGERSYPITIASGLFN-EPASFLPL--              |
|      | . . . . . * . . . . .                                |
|      | —————→ <b>acbC1</b>                                  |
| AcbC | DGAGSRRRFVVVDSAVDALYGSRIREYFTHHGIDHSILVM--RVGETVKD   |
| RifG | --LGARRAVVTA-----RPPDQTPDPGPVPSLVLPARDGEHDKT         |
| AroB | --KSGEQVMLVTNETLAPLYLDKVRGVLEQAGVNVDSVILP--DGEQYKS   |
|      | . . . . . * . . . . . ** *                           |
|      | —————→ <b>acbC2</b> —————→ <b>acbC3</b>              |
| AcbC | FDTAGRIVAAMDAFGLARRREPMIVVGGGVLM DVAGLVASLYRARHAVLR  |
| RifG | LATVAHLCSRFAEFLTRA-DVVVSCGGGTTTDAVGLAASLYHRGTPVVH    |
| AroB | LAVLDTVFTALLQKPHGRD-TTLVALGGGVVGDLTGFAAASYQRGVRFIQ   |
|      | . . . . . * . . . . . *** * * . * . * . . . .        |
|      | <b>acbC5</b> ←————→ <b>acbC4</b>                     |
| AcbC | VPPTLVGLIDA-VSREDRVNFNGHKEPAGYVRPADLTLLDRRFLATLDRR   |
| RifG | VPTSLLAQVDASVGGKTAVNLP EGKNLVGSYQPAAVLCDLDDLATLPER   |
| AroB | VPPTLLSQVDSSVGGKTAVNHPLGKNMIGAFYQPASVVVDLCLKTLPPR    |
|      | *** . * . . * . * . . . . ** * . * . . . * * * * *   |
|      | <b>acbC7</b> ←————→ <b>acbC6</b>                     |
| AcbC | HLSNGLAEMLKIALIKDAELFQLLERHGRVLI EERFQGVPEPVTGPPSGP  |
| RifG | ELRNLGGEIARCHFI-GAPGLDRL-----PLLD-----QVAASVA-       |
| AroB | ELASGLAEVIKYGIILDGAFFNWLEENLDALLR-----LDGPAMAY       |
|      | . * . * . * . . * . . . . * . . . . .                |
|      | —————→ <b>acbC8</b> ←———— <b>acbC9</b>               |
| AcbC | CARH--PWHAGGTRPNLWESRLERSVDYGH TFSPTIEM-RALPALLHGEA  |
| RifG | -----LKARVVAADERDRGLRHTLN YGHTLGHALELATGF AVR-HGEG   |
| AroB | CIRRCCELKAEVVAADERETGLRALLNLGHT FGHAI EAEMGYGNWLHGEA |
|      | . * . . . . * . . . . . *** . . . . . *** .          |
|      | —————  |
| AcbC | VCVDMALTTVLAYRRGLLDVAQRDRIFAVMTALGLPTGI-RLLTPEVLEA   |
| RifG | VAIGTVFAGRLAGALGRIGPDRVAEHHAVVAGYGLPVALPPGPVDPDELLR  |
| AroB | VAAGMVMAARTSERLQGFSSAETQRIITLLK RAGLPVNGPREMSAQAYLP  |
|      | * . . . . * . . . . . *** . . . . .                  |
| AcbC | ALQDTRVHRDQWQRLPLVPGIGGVTFVNDV TAAELQP-----PRX       |
| RifG | FVRRDKKS-TGGLAFVLDGPRGAELVR-DV DEHVVAATLAAMPRA       |
| AroB | HMLRDKKVLAGEMLILPLAIGKSEVRSGV SHELVLNAIADCQSA        |
|      | . . . . . * . * . . . * . . . . .                    |

**Abb. 3.7.1 Sequenzvergleich von AcbC.** RifG: 3-Amino-5-Dehydrochinasäure Synthase aus *Amycolatopsis mediterranei* (August et al. 1998). AroB: 3-Hydroxy-5-Dehydrochinasäure Synthase aus *E. coli*. Bereiche, die für die Ableitung von PCR-Primern verwendet wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

### 3.7.1.2 Isolierung von *acbB*-(*d*TDP-Glucose-4,6-Dehydratase) ähnlichen Genen mit Hilfe der PCR

Aus konservierten DNA-Bereichen der *strE* Genfamilie abgeleitete Oligonukleotide wurden für die Identifizierung des *acbB*-Gens benutzt (Stratmann 1997). Diese Primer wurden unter gleichen Bedingungen für die PCR-Amplifikation *acbB*-homologer-Gene aus dem bereits oben genannten Stammkollektiv eingesetzt (Tab. 2.4; Tab. 2.7). DNA-Fragmente konnten aus genomischer DNA von *S. calvus*, *S. hygroscopicus* spp. *limoneus* und *S. dimorphogenes* amplifiziert werden (2.6.6) und wurden mit dem Vektor pUC18 zu pMD6 (*S. calvus*), pMD8 (*S. hygroscopicus* spp. *limoneus*) und pMD9 (*S. dimorphogenes*) ligiert und anschließend

sequenziert. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten Homologie mit AcbB aus *Actinoplanes* sp. und mit StrE aus *S. griseus* (Tab. 3.7.2, Abb.3.7.2).

|                |   |
|----------------|---|
| StrE           | MALTTLLVGTGAAGFIGSQYVRTLLGPG-GPPDVV--VTALDALTYAGNP                                      |
| AcbB           | M----KILVTGGAGFIGSHFVTSLSIGDIATPQPVTQVTVVVDKLYGGNL                                      |
|                | <b>AS2</b>  |
| StrE           | DNLA AVRGHPRYRFERGDI CDAPGRR-VMAGQDQVVHLAAESHVDRSLLD                                    |
| AcbB           | RNLAEASADPRFSFVRGDI CDEGLIEGLMARHDTVAHFAAETHVDRSVVA                                     |
| <i>S. hyg.</i> | -----AAESHVDRSIVG   |
| <i>S. cal.</i> | -----AAESHVDRSLEG   |
| <i>S. dim.</i> | -----AAESHVDRSIDA<br>***.*****.   |
| StrE           | ASV FVRTNVHGTQ TLLDAATR HGVASFVQVSTDEVYGSLEHGSWTEDEPL                                   |
| AcbB           | SGPFVASNLVGTQVLLDAALRHHIGRFLHVSTDEVYGSIDTGSWAEGHPL                                      |
| <i>S. hyg.</i> | AAPFVSTNVLGTQ TLLDAALRHRVDRFVQVSTDEVYGS LDTGSWTETAPL                                    |
| <i>S. cal.</i> | AAPFFRTNVLGTQ TLLDAVLASGVERVVHVSTDEVYGSIAEGSWTEERPL                                     |
| <i>S. dim.</i> | PDAFIQTNLVGTYTMLPEAVRRPV SGLHHISTDEVYGS LGDGSWPADTPY<br>. * .*. ** .* . . .*****. *** * |
|                | <b>AS5</b>  |
| StrE           | RPNSPY SASKASG DLLALAHVSHGLDVRVTRCSNNYGRQPFPEKLI PRF                                    |
| AcbB           | APNSPYAASKAGS DLLALAYHQTHGMDVVVTRCSNNYGRQPFPEKMI PLF                                    |
| <i>S. hyg.</i> | DPSSPY SASKAAADLVALAYHRTHGLDVVVTRCSNNYG-----  |
| <i>S. cal.</i> | LPNTPYAASKACSDLVARTYWRTHGVNLSVTRCSNNYG-----   |
| <i>S. dim.</i> | DPRSPY SASQAGSDHLASARGQYFGLPVLITRCSNNYG-----<br>* .**.*.*.* .* .* . * . .*****          |
| StrE           | ITLLMDGHRVPLYGDGLNVREWLHVDDHVRGIEAVRTRGRAGR VYNI GGG                                    |
| AcbB           | VTRLLDGLDVPVYGDGRNIRDWLHVSDHCRGLALALGAGRAGEVYHI GGG                                     |
| StrE           | ATLSNKELVGLLLEAAGADWGSVEYVEDRKGHDRRYAVDSTRIQRELGFA                                      |
| AcbB           | WEATNLELTEILLEACGARRSRI SFVTDRKGHDRRYSLDYSKIAGELGYR                                     |
| StrE           | PAVDLADGLAATVAWYHKHRSWWE-----PLVPAGSL--PA   |
| AcbB           | PRVDFTDGLAETVAWYRANRSWWT DGNRWADGRRSLPAIGVRGSPS   |

**Abb. 3.7.2** Sequenzvergleich von bekannten dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase mit der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der PCR-Fragmente. StrE Protein aus *S. griseus*. AcbB Protein aus *Actinoplanes* sp.. Die Oligonukleotide, die für die PCR Ansätze genutzt wurden, sind mit Pfeilen dargestellt.

**Tab. 3.7.2** Ähnlichkeit der dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase StrE und AcbB mit der mittels PCR identifizierten Aminosäuresequenzen verschiedener Streptomyceten. (% Identität)

|                         | StrE | AcbB | <i>S. hygroscopicus</i> | <i>S. calvus</i> | <i>S. dimorphogenes</i> |
|-------------------------|------|------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| <b>StrE</b>             | 100  | 65,3 | 76,2                    | 65,3             | 56,4                    |
| <b>AcbB</b>             |      | 100  | 72,3                    | 62,4             | 54,4                    |
| <i>S. hygroscopicus</i> |      |      | 100                     | 71,3             | 56,4                    |
| <i>S. calvus</i>        |      |      |                         | 100              | 48,5                    |
| <i>S. dimorphogenes</i> |      |      |                         |                  | 100                     |

### 3.7.2 Versuche zur Identifizierung von Homologen zu Acarbose-Biosynthesegenen in anderen Actinomyceten mittels "Southern" Hybridisierung

Die Gene *acbC*, *acbK* und *acbV*, die für die C<sub>7</sub>-Zucker Cyclase, die Acarbose-7-phosphat-Kinase und die dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose Aminotransferase kodieren, wurden für die Identifizierung von homologen Genen aus Produzenten, die Strukturverwandte Stoffe bilden, ausgewählt. Es wurden drei Gensonden eingesetzt, die die Gene *acbC* (900 bp *PstI/BamHI*-Fragment aus pAS2; vgl. Tab. 2.2), *acbK* (1000 bp *EcoRI/HindII*-Fragment aus pAS6/3.1; vgl. Tab. 2.2) und *acbB* aus *S. glaucescens* GLA.0 (s. 3.3.1) umfassen.

Unter dem gewählten Stringenzbedingungen konnten nur in den Hybridisierungsexperimenten mit der Aminotransferasesonde aus *S. glaucescens* GLA.0 (*acbB*) bei allen Acarbosehomologe-produzierenden Stämmen ein Signal erhalten werden (Tab. 3.7.2). Die Hybridisierungsexperimente mit den beiden anderen o. g. Gensonden führten dagegen zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Es tauchten jedoch jeweils mehrere schwache Hybridisierungssignale auf, die aber als unspezifisch eingeschätzt wurden.

**Tab 3.7.2 Mit *acbBSg* aus *S. glaucescens* GLA.0 hybridisierende Fragmente.**

| Stamm                         | Produkt     | Größe des hybridisierenden <i>BamHI</i> Fragments (kb) |
|-------------------------------|-------------|--|
| <i>Actinoplanes</i> sp. (*)   | Acarbose    | 2.2  |
| <i>S. myxogenes</i>           | Oligostatin | 8  |
| <i>S. calvus</i>              | Adiposin    | 4.9  |
| <i>S. dimorphogenes</i> 31485 | Trestatin   | 7.3  |
| <i>S. dimorphogenes</i> 31484 | Trestatin   | 3  |

\* in dieser Arbeit kloniertes *acbV*-Gens

## 4 DISKUSSION

Für eine Optimierung der industriellen Acarboseproduktion und eine zukünftige Herstellung von neuen Wirkstoffen auf der Basis der Struktur der Acarbose und anderer homologer Pseudooligosaccharide ist die Aufklärung des Biosyntheseweges und dessen Regulation bei *Actinoplanes* sp. von entscheidender Bedeutung. Auch die Hypothese einer biologischen Bedeutung der Acarbose- und Nebenkomponentenproduktion an der Erschließung von C-Quellen durch *Actinoplanes* sp. macht die Analyse des Biosynthesegenclusters und dessen Regulation interessant. Mit der Identifizierung eines an der Acarbose-Biosynthese beteiligten Genclusters im Genom von *Actinoplanes* sp. und dessen molekularbiologische Analyse konnten die Grundlagen für die Aufklärung der Acarbose-Biosynthese gelegt werden (Stratmann 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gene, die zum Acarbose-Biosynthesegencluster gehören, identifiziert, kloniert, sequenziert und analysiert. Die Funktionalität eines dieser Genprodukte als Aminotransferase mit entscheidender Bedeutung für die Bildung der Acarviosyl-Einheit (siehe Einleitung) wurde nachgewiesen. Mit dieser Arbeit konnten auch Grundlagen für die weitere Untersuchung des Stickstoffsregulationssystems von *Actinoplanes* sp. sowie für die Suche nach einer effizienten "screening"-Methode für Acarbose- und homologe Pseudooligosaccharid-Biosynthesegene verschiedener Actinomyceten gelegt werden.

### 4.1 Suche nach einem Aminotransferasegen innerhalb des Acarbose-Biosynthesegenclusters

Auf dem bisher von Stratmann (1997) klonierten und teilweise sequenzierten DNA-Fragment, welches einen Großteil des Acarbose-Biosynthesegenclusters beinhaltet und die Gene *acbQ* bis *acbF* kodiert (s. Abb. 1.6), konnte kein Leserahmen gefunden werden, der für eine Aminotransferase hätte kodieren können. In Antibiotika-, Lipopolysaccharid- bzw. anderen Sekundärmetabolit-Biosynthesegenclustern wurden Gene beschrieben, die für PLP-abhängige Aminotransferasen einer neuen Unterfamilie kodieren, wie z. B. DnrJ aus *S. peuceitius*, EryC1 aus *Saccharopolyspora erythraea* und StsC aus *S. griseus*. Diese neue Proteinfamilie ist durch acht konservierte Motive charakterisiert (vgl 3.2, Ahlert 1997), die allerdings keine Aussagen über die Substratspezifität dieser sehr weit verbreiteten und funktionell versatilen Enzyme erlauben. Diese Ketozyucker- und Ketocyclitaminotransferasen werden als "Sekundärmetabolit-Aminotransferasen" (SMATs) bezeichnet (Piepersberg 1994, Piepersberg und Distler 1997). Der erste Vertreter der SMAT-Familie, für den eine Funktion als Aminotransferase biochemisch nachgewiesen wurde, ist StsC (Ahlert et al. 1997). Es katalysiert die Umsetzung von *scyllo*-Inosamin zu *scyllo*-Inosose innerhalb der Streptidin-Biosynthese in dem Streptomycinproduzenten *S. griseus*. Das Genprodukt von *nikC*, ebenfalls ein Vertreter der SMAT-Familie aus dem Nikkomycin-Biosynthesegencluster von *S. tendae* Tü901, besitzt eine  $\alpha$ -Aminotransferaseaktivität und setzt L-Lysin zu Piperidin-2-carbonsäure um (Bruntnner und Bormann 1998). Für weitere Vertreter der Subfamilie wie z. B. DnrJ wird eine Funktion als

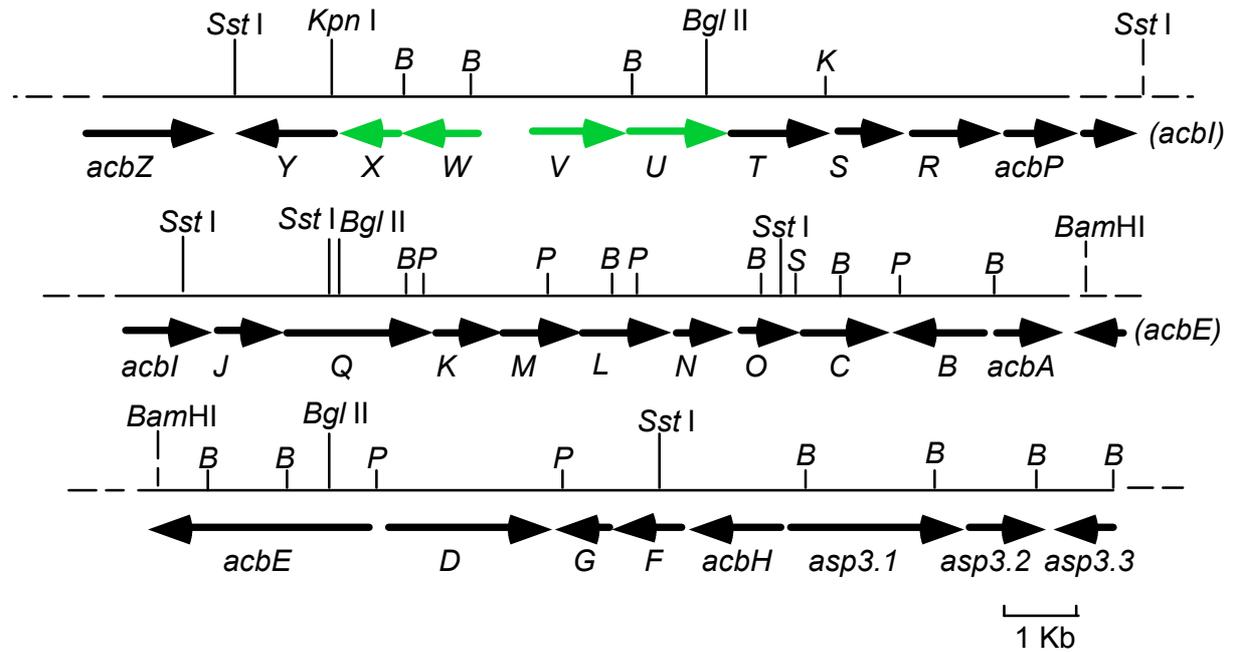
Aminotransferase postuliert (Liu und Thorson 1994). Die Hypothese einer Beteiligung einer SMAT an der Acarbose-Biosynthese, welche einen Ketozucker oder einen Ketocyclit aminieren sollte, erschien daher als sehr wahrscheinlich. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass keine der beiden identifizierten SMAT-Gene (*smat1* und *smat2*, s. 3.2.1) in der unmittelbaren Umgebung des bisher klonierten Acarbose-Biosynthesegenclusters liegen (s. 3.2.2). Aufgrund dieses Ergebnisses musste die Beteiligung dieser SMAT-Gene an der Acarbosebildung in Frage gestellt werden. Es ist zu vermuten, dass die beiden identifizierten SMATs an der Bildung anderer Sekundärmetabolite oder anderer Zellkomponenten (z. B. Zellwandbestandteile) beteiligt sind, die bisher jedoch noch nicht identifiziert wurden. Es ist bekannt, dass andere Vertreter der Gattung *Actinoplanes* verschiedene Sekundärmetabolite wie z. B. das Glycolipid-Antibiotikum Teicoplanin, dessen Biosynthese eine Aminotransferase-Aktivität erfordert (Borghi et al. 1991), produzieren. Auch kann vermutet werden, dass eine größere Anzahl von SMAT-Genen im Genom von Actinomyceten vorkommt als in anderen Bakteriengruppen. Im dem *S. coelicolor* Genom, welche zu Zeit ca. 75% komplett sequenziert wurde, wird mit StsC z. B. auch ein signifikant homologe Gen gefunden.

Die Tatsache, dass die Acarbose-Produktion schon zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase einsetzt, und nicht mit der stationären Phase wie eigentlich typisch für die bakterielle Sekundärmetabolitproduktion, einhergeht, zeigt, dass die Acarbose kein typischer Sekundärmetabolit ist. Deshalb wäre eine Beteiligung von Proteinen, die eigentlich im Primärstoffwechsel der Mikroorganismen involviert sind, denkbar. Wird diese Annahme zugrunde gelegt, so besteht die Möglichkeit, dass die an der Acarbosebiosynthese beteiligte Aminotransferase wegen der metabolischen Wechselbeziehungen einer anderen Subfamilie angehören könnte. Biosynthesegene für Pseudooligosaccharide, die eine zur Acarbose homologe Struktur aufweisen und von einigen *Streptomyces* Arten gebildet werden, sind bislang nicht intensiv untersucht worden (vgl. 1.2). Es wurden bisher nur aus *S. glaucescens* GLA.0 Biosynthesegene für einen  $\alpha$ -Amylase Hemmstoff isoliert (Hoechst Patent DE19622783). Mit dem selben Versuchsansatz von A. Stratmann (1997) zur Identifizierung des Acarbose-Biosynthesegenclusters wurden auch bei *S. glaucescens* GLA.0 Gene, welche für die Synthese von 6-Desoxyhexosen kodieren, gefunden. Eines dieser Signale sollte zu einem Biosynthesegencluster gehören, welches für die Biosynthese eines Acarbose-ähnlichen  $\alpha$ -Glucosidase-Hemmstoffes kodieren sollte. Die Gene wurden ebenfalls als *acb*-Gene bezeichnet (s. Abb. 4.2). Durch Deletion der Gene *acbBCD*, welche jeweils für eine Aminotransferase, dTDP-Glucose Synthase und dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase kodieren (s. Tab. 4.2), wurde eine Mutante von *S. glaucescens* GLA.0 erzeugt, die in dem Produktionsmedium keinen  $\alpha$ -Glucosidase-Hemmstoff mehr produziert (Hoechst Patent DE19622783). Die abgeleitete Aminosäuresequenz eines der klonierten Gene (*acbB*) aus *S. glaucescens* GLA.0 zeigt signifikante Ähnlichkeit zu Aminotransferasen der Subfamilie III (GabT-Familie). Diese Aminotransferasen sind typische Primärstoffwechsellenzyme (Keller et al. 1990; Shaibe et al. 1985). Das AcbB Protein aus *S. glaucescens* GLA.0 zeigte die höchste Ähnlichkeit zu GabT aus *E. coli*. Dieses Enzym spielt offenbar bei den meisten Organismen eine wichtige Rolle für den zentralen Stickstoffkreislauf und ist am Abbau der Aminosäuren L-Arginin, L-Ornithin

und L-Glutamat beteiligt (Shaibe et al. 1985). Damit verwandte Aminotransferasen sind bisher nur in drei Fällen innerhalb eines Sekundärmetabolit-Biosynthesegenclusters identifiziert worden: im Bereich des Rifamycin-Biosynthesegenclusters von *Amycolatopsis mediterranei* S699 (August et al. 1998) und in den Spectinomycin-Biosynthesegenclustern von *S. flavopersicus* (Lyutzkanova et al. 1997) und *S. spectabilis* (Accession Nr AF170704). Das *Orf9*-Gen aus *Amycolatopsis mediterranei* S699 sowie *acbB* aus *S. glaucescens* GLA.0 liegen neben Leserahmen, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zu Proteinen zeigen, die an der Bildung von Nukleotid-aktivierten Hexosen beteiligt sind (August et al. 1998). Deswegen wird postuliert, dass die zueinander ähnlichen Genprodukte von *orf9* und *acbB* (s. Tab. 3.3.5) eine Aminotransferase für nukleotid-aktivierte Hexosen darstellen und beispielsweise die Umsetzung von dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose zu dTDP-4,6-Didesoxy-4-aminoglucose katalysieren könnten.

Ausgehend von dieser Hypothese wurde mit Hilfe des *acbB*-Gens aus *S. glaucescens* GLA.0 ein homologes Gen (*acbV*) im Genom von *Actinoplanes* sp. identifiziert (vgl. 3.3.1 und 3.3.2). Mittels Southern Hybridisierung und PCR-Analyse wurde nachgewiesen, dass das *acbV*-Gen ca. 7 Kb aufwärts des *acbQ*-Gens auf dem Chromosom von *Actinoplanes* sp. liegt (Abb. 4.1). Parallel zu dieser Arbeit wurde das DNA-Fragment zwischen *acbU* und *acbQ* analysiert (Tab. 4.1; M. Jarling und H. Thomas, pers. Mitteilung).

Durch Aminosäuresequenzvergleiche der entsprechenden Genprodukte mit Proteindatenbanken konnte mit Ausnahme von *acbU* den Genen *acbV*, *W* und *X* eine mögliche Funktion innerhalb der Acarbose-Biosynthese zugeordnet werden (Tab. 4.1). Diese Enzymfunktionen fügen sich gut in das gegenwärtige Bild des Acarbose Stoffwechsels von *Actinoplanes* sp. ein (vgl. 4.5). Auch ist aus dem Vergleich der Sequenzen der sich entsprechenden *acb*-Gene aus *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens* GLA.0 deutlich, dass die beiden Gencluster für die Produktion sehr ähnlicher bzw. identische Genprodukte kodieren (s. Abb. 4.2, Tab. 4.2). Die Proteine AcbW (ATP-Bindeprotein) und AcbV (Aminotransferase) aus *Actinoplanes* sp. zeigen viel höhere Identitäten zu AcbA bzw. AcbB aus *S. glaucescens* (s. Tab. 4.2) und ihre kodierenden DNA-Bereiche bzw. Gene, liegen nebeneinander ebenfalls in *Actinoplanes* sp. (Abb. 4.2). Es ist zu vermuten, dass diese homologen Proteine die selbe Funktion aufweisen. Der postulierte Regulator AcbE aus *S. glaucescens*, welche zu der Familie der LacI-Regulatoren Ähnlichkeit zeigt, zeigt leichte Homologie zu Asp3.3 (Tab. 4.2). Das Protein AcbF aus *S. glaucescens* zeigt Homologien zu AcbH aus *Actinoplanes* sp. und zu MalE aus *E. coli* und stellt vermutlich daher eine Komponente eines ABC-Transporters dar. Durch Sequenzvergleiche mit dem sequenzierten Genom von *S. coelicolor* konnten Proteine identifiziert werden, welche nicht nur Homologie zu AcbE und AcbF zeigten, sondern deren kodierende Bereiche bzw. Gene auch nebeneinander liegen und die selbe Anordnung zeigen. In *Actinoplanes* sp. scheint dies nicht der Fall zu sein (vgl. Abb. 4.1 und Abb.4.2).



**Abb. 4.1** Das Acarbose-Biosynthese-gencluster von *Actinoplanes* sp.. Graue Pfeile = in dieser Arbeit analysierte ORFs. P = *PstI*; B = *BamHI*; K = *KpnI*; S = *SstI*.

**Tab. 4.1** Gene des Acarbose-Biosynthese-genclusters von *Actinoplanes* sp..

| Gen           | (mögliche) Funktion                                   | Evidenz(a) | Referenz(b)  |
|---------------|---|------------|--------------|
| <i>acbA</i>   | dTDP-Glucosesynthase                                  | s          | 1-3          |
| <i>acbB</i>   | dTDP-Glucose-4,6-dehydratase                          | s, e       | 1-5          |
| <i>acbC</i>   | C7-Cyclitolcyclase                                    | s, e       | 1, 6         |
| <i>acbD</i>   | Acarviosyltransferase                                 | s, e       | 1, 7         |
| <i>acbE</i>   | $\alpha$ -Amylase                                     | s, e       | 1, 7         |
| <i>acbF</i>   | Membrankomponente eines Kohlenhydrat-ABC-Transporters | s          | 1            |
| <i>acbG</i>   | Membrankomponente eines Kohlenhydrat-ABC-Transporters | s          | 1            |
| <i>acbH</i>   | Bindungsprotein eines Kohlenhydrat-ABC-Transporters   | s          | 8            |
| <i>acbK</i>   | Acarbose-7-kinase                                     | s, e       | 9, 10        |
| <i>acbI</i>   | unbekannt   | s          | 8            |
| <i>acbJ</i>   | unbekannt   | s          | 8            |
| <i>acbL</i>   | (Polyol-) Dehydrogenase                               | s          | 8            |
| <i>acbM</i>   | unbekannt   | s          | 8            |
| <i>acbN</i>   | unbekannt   | s          | 8            |
| <i>acbO</i>   | unbekannt   | s          | 8            |
| <i>acbP</i>   | unbekannt   | s          | 11           |
| <i>acbQ</i>   | Amylomaltase  | s          | 8            |
| <i>acbR</i>   | GlgC-ähnliche NDP-Polyol Synthase                     | s          | 11           |
| <i>acbS</i>   | unbekannt   | s          | 11           |
| <i>acbU</i>   | unbekannt   | s          | diese Arbeit |
| <i>acbV</i>   | Aminotransferase                                      | s, e       | diese Arbeit |
| <i>acbW</i>   | ABC-Exporter  | s          | diese Arbeit |
| <i>acbX</i>   | ABC-Exporter  | s          | diese Arbeit |
| <i>acbY</i>   | unbekannt   | s          | 11           |
| <i>acbZ</i>   | $\alpha$ -Amylase                                     | s          | 11           |
| <i>asp3.1</i> | Galactocerebrosidase (Hexosyl O-acetylhydrolase)      | s          | 8            |
| <i>asp3.2</i> | endo-1,4-beta-Xylanase                                | s          | 8            |
| <i>asp3.3</i> | unbekannt   | s          | 8            |

a) Abkürzungen: s = Aminosäuresequenzvergleich mit Proteindatenbanken; e = Enzymcharakterisierung.

b) 1 = Stratmann (1997); 2 = Piepersberg (1995); 3 = Piepersberg und Distler (1997); 4 = Goeke (1986); 5 = Liedert (1991); 6 = Stratmann et al. (1999); 7 = Hemker (1997); 8 = M. Jarling (pers. Mitteilung); 9 = Goeke et al. (1996); 10 = Drepper und Pape (1996); 11 = H. Thomas (pers. Mitteilung).

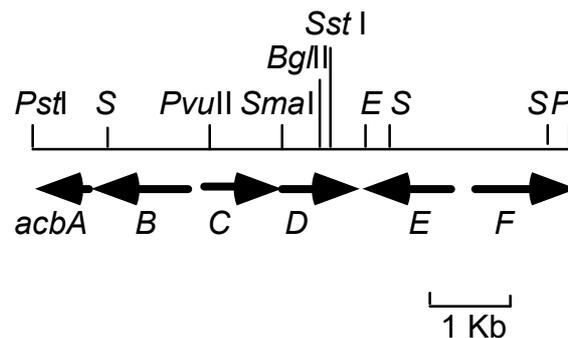


Abb. 4.2 Das Pseudooligosaccharid-Biosynthesecluster von *S. glaucescens* GLA.0 (Hoechst Patent DE19622783). P = *PstI*; E = *EcoRV*; S = *SstI*.

Tab. 4.2 Gene des Pseudooligosaccharid-Biosynthesecluster von *S. glaucescens* GLA.0.

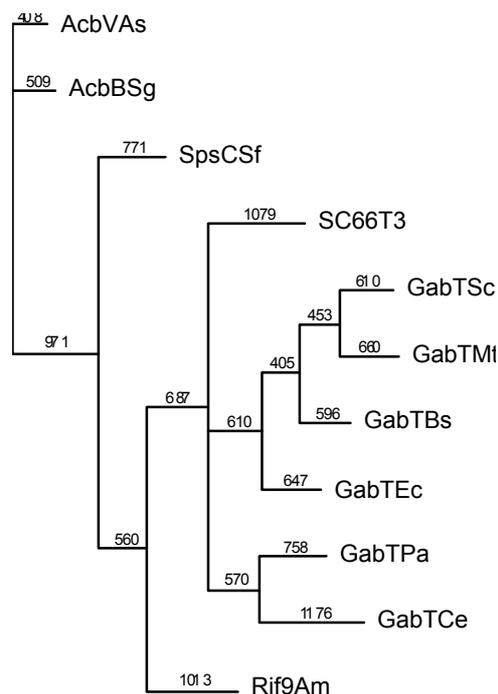
| Gen         | (mögliche) Funktion          | Homologe in<br><i>Actinoplanes</i> sp. | Ähnlichkeit<br>(% Identität/in überlappenden AS) |
|-------------|------------------------------|--|--|
| <i>acbA</i> | ABC-Exporter                 | <i>acbW</i>                            | 72/240   |
| <i>acbB</i> | Aminotransferase             | <i>acbV</i>                            | 73/421   |
| <i>acbC</i> | dTDP-Glucosesynthase         | <i>acbA</i>                            | 45/209   |
| <i>acbD</i> | dTDP-Glucose-4,6-dehydratase | <i>acbB</i>                            | 59/317   |
| <i>acbE</i> | Regulator                    | <i>asp3.3</i>                          | 25/215   |
| <i>acbF</i> | ABC-Transporters             | <i>acbH</i>                            | 24/352   |

#### 4.2 AcbV aus *Actinoplanes* sp. ist eine dNTP-4-Keto-6-desoxyglucose Aminotransferase

Die Sequenzierung des *acbV*-Gens aus *Actinoplanes* sp. zeigte, dass eine Identität der Nucleotidsequenzen von 69,7% zu *acbB* aus *S. glaucescens* GLA.0 für eine erfolgreiche DNA-DNA Hybridisierung ausreichte. Die von *acbV* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte eine Identität von 73% zu AcbB aus *S. glaucescens* GLA.0, so dass es durchaus wahrscheinlich ist, dass beide Proteine die gleiche katalytische Aktivität aufweisen. AcbV wies eine Identität von 27,3% zu der postulierten Hexoseaminotransferase (Orf9) aus dem Rifamycin-Biosynthesecluster von *Amycolatopsis mediterranei* S699 auf (August et al. 1998) und von 30,4% zu SpcC aus dem Spectinomycin-Biosynthesecluster von *S. flavopersicus* (Lyutskanova et al. 1997) auf. Alle vier Proteine zeigen Ähnlichkeiten zu Aminotransferasen, die zu der Subfamilie III der Aminotransferasen gehören (vgl. 3.3.5.2).

Ein Phylogramm mit den hier aufgeführten Proteinen läßt vermuten, dass die gamma-Aminobuyrataminotransferasen, vertreten durch GabT verschiedenen Ursprungs, zusammen mit AcbV und AcbB aus *Actinoplanes* bzw. *S. glaucescens* sowie SpcC aus *S. flavopersicus* und dem Genprodukt von Orf9 aus *Amycolatopsis mediterranei* aus einer gemeinsamen Vorläufersequenz hervorgegangen sind, möglicherweise zunächst durch Genduplikationen (Abb. 4.3). Zu einem späteren Zeitpunkt während der Evolution haben sich die Gene bzw. Genprodukte innerhalb einer Species funktionell auseinander entwickelt. Die Enzyme der GabT-Familie sind am Primärmetabolismus beteiligt (s.o.). AcbV bzw. AcbB und die anderen o. g. Aminotransferasen übernehmen nunmehr Aufgaben im Sekundärstoffwechsel z. B. als nuklotidaktivierte Zucker transaminierende Enzyme (s.u.). Diese funktionelle Aufspaltung könnte sich auch für Genprodukte dieser Proteinfamilie bei *S. coelicolor* zeigen: Beide im

Phylogramm aufgeführten Genprodukte (SC66T3, GabTSc) gehören unterschiedlichen Ästen an, obwohl eine Aussage über die Funktion der SC66T3 noch nicht möglich ist. Man muss deshalb annehmen, das z. B. auch *Actinoplanes* sp. und *S. glaucescens* zumindest eine zusätzliche Aminotransferase der unmittelbaren GabT Familie besitzen. Mit zunehmender DNA-Sequenzinformation von verschiedenen Mikroorganismen und biochemischer Aufklärung von einzelnen Aminotransferasen dieser Gruppe sollte es in Zukunft möglich sein, diese Hypothese einer Genduplikation mit anschließender funktionaler Differenzierung vor der Weiterverbreitung in anderen Spezies zu untermauern.



**Abb. 4.3 Phylogenetischer Baum der GabT-Familie.** Das Phylogramm wurde mit dem PAUP-Program aufgrund des Aligments alle verwendeten Aminosäure-Sequenzen errechnet. Die Zahlen geben die Mutation Distanzen an. Das Protein AcbVAs stammt aus *Actinoplanes* sp. (diese Arbeit), AcbBSg aus *S. glaucescens* GLA.0 (Hoechst Patent DE19622783), SpsCSf aus *S. flavopersicus* (Lyutzkanova et al. 1997), Rif9Am aus *Amycolatopsis mediterranei* (August et al. 1998), GabTMt aus *M. tuberculosis* (Connor et al. 1996), GabTEc aus *E. coli* (Bartsch et al. 1990), SC66T3 aus *S. coelicolor* (SC66T3.33, Accession-Nr. e1490128), GabTSc aus *S. coelicolor* (Accession-Nr. AL022268), GabTBs aus *Bacillus subtilis* (Accession-Nr. D50453), GabTPa aus *Pyrococcus abyssi* (Accession-Nr. AJ248285, AL096836), GabTCe aus *Caenorhabditis elegans* (Accession-Nr. 269664).

Die Gene, welche für die Synthese von 6-Desoxyhexosen kodieren, liegen meist nebeneinander innerhalb eines Operons oder in benachbarten Operons und ihre Transkription wird gemeinsam reguliert. Diese wurde z. B. beim Streptomycincluster aus *S. glaucescens* und *S. griseus* gezeigt (Pissowotzki et al. 1991). Auch für die Gene *acbBCD* (Aminotransferase, dTDP-Glucose Synthase und dTDP-4,6-Glucose Dehydratase) aus *S. glaucescens* GLA.0 scheint dies zuzutreffen. Überraschenderweise liegt *acbV* aus *Actinoplanes* sp. innerhalb des Acarbose-Biosyntheseegenclusters nicht neben *acbA* und *acbB*, Gene für die dTDP-Glucose

Synthase bzw. dTDP-4,6-Glucose Dehydratase kodieren. Eine gemeinsame Regulation all dieser Gene wäre zu erwarten, wenn ein Regulatorprotein die Transkription dieser Operons regulieren würde. Bisher gibt es jedoch im gesamten analysierten Acarbosecluster noch keinen eindeutigen Hinweis auf einen solchen Regulator. Ebenso wurden auf der DNA-Ebene keine potenziellen Operatorsequenzen identifiziert.

#### 4.2.1 Heterologe Überproduktion der Enzyme AcbB aus *S. glaucescens* GLA.0 und AcbV aus *Actinoplanes* sp. in *E. coli* und *S. lividans*.

Um die Enzyme AcbB aus *S. glaucescens* GLA.0 und AcbV aus *Actinoplanes* sp. lösliche und aktiv zu erhalten, mussten verschiedene Expressionssysteme für *E. coli* und Streptomyceten getestet werden, die nachfolgend diskutiert werden. Aufgrund der zwei möglichen identifizierten Startcodons des AcbV Proteins wurden beide Versionen, AcbV-k (kurz) und AcbV-l (lang), heterolog in den o. g. Stämmen überproduziert (vgl. 3.4.2). Tabelle 4.3 stellt die Ergebnisse der verschiedenen Versuche nochmals vergleichend gegenüber.

**Tab. 4.3 Übersicht über die Ergebnisse der heterologen Proteinproduktion in Abhängigkeit verschiedener Expressionssysteme.**

| Protein       | Expressionsplasmide |         |          |          |         |         |
|---------------|---------------------|---------|----------|----------|---------|---------|
|               | pET11a              | pET16b  | pJOE2702 | pJOE2775 | pUWL218 | pUWL201 |
| <b>AcbB</b>   | + (I)               | +* (A*) | n.d.     | +* (A)   | —       | +* (A)  |
| <b>AcbV-k</b> | n.d.                | +* (A*) | n.d.     | -        | n.d.    | -       |
| <b>AcbV-l</b> | n.d.                | +* (A*) | n.d.     | +* (A)   | n.d.    | +* (A)  |

+ = detektierbare Proteinbildung nach PAGE und Coomassie-Färbung, +\* = immunologisch detektierbare Proteinbildung (s. 2.13 und 3.4), n.d. = mit keiner der beiden o. g. Methoden detektierbar, (I) = Bildung unlöslichen Proteins (inclusion bodies), (A) aktives Enzym, (A\*) aktives Enzym, erhalten durch Ko-Expression mit Chaperonen (s. 3.4.3).

Es konnte nur das Protein AcbB aus *S. glaucescens* GLA.0 unter Standardbedingungen mit den Expressionsplasmiden pET11a und pET16b exprimiert werden (Novagen 1992; Studier et al. 1990). Allerdings lag es komplett in inaktiver Form als unlösliche Inclusion Bodies, vor. Die Gründe für die Bildung von Inclusion Bodies sind bisher nur wenig verstanden. Chemophysikalische Eigenschaften von Proteinen, wie z. B. Größe, Hydrophobizität usw. konnten bisher nicht mit der Bildung unlöslicher Aggregate korreliert werden (Kane und Hartley 1988, Wilkinson und Harrison 1991). Eine Rolle bei der Bildung solcher falsch gefalteter Proteine könnte indirekt der GC-Gehalt über die damit verbundene Kodon-Verwendung spielen. Für diese Hypothese liegen noch keine experimentell eindeutigen Befunde vor. Erste Hinweise für diese Vermutung lieferte Verseck (1997) mit verschiedenen Überproduktionsversuchen der Rml-Proteine A, B, C und D aus *Sa. enterica* und den analogen Str-Proteinen aus *S. griseus*. Die Gene aus *Salmonella* besitzen einen GC-Gehalt von 39 bis 50% (Stevenson et al. 1994, Marolda und Valvano 1995) und ähneln damit den *E. coli* Genen. Die Str-Proteine werden dagegen von Genen mit einem GC-Gehalt zwischen 66 - 76% kodiert

(Distler et al. 1987; Beyer 1996). Es ist so auch zu vermuten, dass die Kodonverwendung in *acbB* aus *S. glaucescens* GLA.0 und *acbV-k* und *acb-l* aus *Actinoplanes* sp. die Bildung von aktiven AcbB bzw. AcbV Proteine verhinderte.

Zu den am häufigsten angewandten Strategien zur Vermeidung unlöslicher Protein-Aggregate zählt die Veränderung der Kulturbedingungen für die *E. coli* Zellen wie z. B. Absenkung der Inkubationstemperatur, Variation des pH im Medium, limitierende Induktion der Expression oder Anzucht der Zellen unter osmotischen Stressbedingungen durch Zugabe von z. B. Glycin oder Sorbitol (Kopetzki et al. 1989, Olis und Lee 1993, Hockney 1994). Diese Maßnahmen führen zu einer Verlangsamung des Faltungsvorgangs der nascierenden Proteine (Rudolph und Lillie 1996). Die Proteine AcbB aus *S. glaucescens* GLA.0, AcbV-k und AcbV-l aus *Actinoplanes* sp. wurden unter verschiedenen Veränderungen der Kulturbedingungen immer noch als Inclusion Bodies produziert (s. 3.4.2).

AcbBSg und AcbV Proteine wurden in löslicher Form in *E. coli* durch Co-expression mit den Chaperonen GroESL aus *S. griseus* überproduziert (Pöhling 1997), oder mit Hilfe eines Expressionsystems, das als Kontrollelemente der Transkription und Translation den Promotor *rhaP* besitzt (vgl. 3.4.3 und 3.4.4). Allerdings waren sie nur in geringer Menge exprimiert und mit Antikörper nachweisbar.

Für die heterologe Expression der Aminotransferase-Proteine erwies sich auch hier ein nahe verwandter Wirtstamm als vorteilhaft, da darin die zuvor auftretenden Probleme teilweise ausgeräumt werden konnten (s.o.). Es wurde ein DNA-Fragment aus *Actinoplanes* sp. kloniert, welches zusätzlich zu den AcbV-kodierenden-Bereich, auch potenzielle native Regulationselemente beinhaltet (s. 3.4.1). Ein Teil der mangelnden AcbV Bildung könnte daher an einer mangelnden Aktivierung liegen. Es ist zu vermuten, dass der Promotor entweder nicht von den Transkriptionssystemen des Wirtsorganismus erkannt wurde oder dass ein Aktivator in *S. lividans* nicht gebildet wird unter den verwendeten Expressionsbedingungen. Ein Gen, dessen abgeleitetes Produkt Ähnlichkeit zu Transkriptionsregulatoren aufweist, konnte bisher auch noch nicht im *acb*-Gencluster gefunden werden (vgl. Tab 4.1). Der intercistronische DNA-Bereich zwischen *acbV* und *acbW* scheint somit nicht die Regulationselemente zu besitzen, die für eine deutlich detektierbare Expression nach Induktion mit Maltose oder Maltotriose in *S. lividans* notwendig sind. Andererseits konnte das von Stratmann (1997) identifizierte Hexanukleotid, welches upstream des Start-Kodons in entsprechenden Bereichen von Genen des Stärke- bzw. Maltose-Stoffwechsels wie z. B. *acbD* und *acbE* aus *Actinoplanes* sp., *malE* aus *S. coelicolor* und *malP* aus *E. coli* usw., 197 bp upstream des Start-Kodons von *acbV* identifiziert werden (s. Anhang 2). Daraus kann geschlossen werden, dass eine starke Expression von AcbV in *S. lividans* entweder eine andere Promotor- Struktur oder zusätzliche induzierende Faktoren benötigt, die in diesem Stamm nicht vorhanden sind.

#### 4.2.2 AcbB aus *S. glaucescens* GLA.0 und AcbV aus *Actinoplanes* sp. katalysieren die Umsetzung von dTDP-4-Keto-6-deoxyglucose zu dTDP-D-4,6-Dideoxy-4-aminoglucose.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Aufklärung des Einbaus des Stickstoffes in Acarbose. Die Fragen, die beantwortet werden mussten, waren:

1. Welches Substrat wird transaminiert, das C<sub>7</sub>-Cyclit oder die 4-Keto-6-dideoxypyranose?
2. Welche Aminodonor dient der Reaktion als Cosubstrat?

Die in dieser Arbeit identifizierten Genprodukte AcbBSg bzw. AcbV könnten die Transaminierung eines Acarbose-Vorläufers katalysieren. Die Befunde verschiedener Studien zeigten, dass die potenziellen Substrate für die Transaminierung das Cyclit 2,5-*epi*-Valiolon oder 4-Keto-6-desoxyglucose sein könnten (vgl. 1.4). Zur Beantwortung dieser Frage mussten die beiden potenziellen Substrate hergestellt werden (vgl. 3.5 und 2.14). Hinweise auf den vermutlichen Aminodonor wurden durch Fütterungsversuche mit Stickstoff markierten möglichen Aminodonoren erhalten. In diesen Studien wurde L-Glutamat als Hauptdonor des Stickstoffes für die Acarbosebildung identifiziert (Lee und Egelkraut 1998). Die Ergebnisse konnten in dieser Arbeit untermauert werden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von AcbV bzw. AcbBSg zu den GabT-Proteinen aus *E. coli* und *M. tuberculosis*, welche 4-Aminobutyrat umsetzen, hätte man annehmen können, dass dies ebenfalls das Cosubstrat von AcbV bzw. AcbBSg ist. Jedoch war der einzige positiv messbare Aminodonor L-Glutamat und nicht L-Glutamin, L-Asparagin, L-Aspartat oder L-Ornithin, die ebenfalls getestet wurden (vgl. 3.6.1).

Die einzigen reproduzierbaren Transaminierungsaktivitäten von AcbV-I und AcbBSg konnten in einem gekoppelten Enzymtestsystem mit  $\alpha$ -Ketoglutarat Dehydrogenase als Hilfsenzym und nur mit dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose als Aminoakzeptor und L-Glutamat als Aminodonor detektiert werden (vgl. 3.6.2). Diese Testbedingungen für die Transaminierungsreaktion müssen wahrscheinlich optimiert werden. Andererseits enthielten die in *S. lividans* TK23 überproduzierten AcbBSg und AcbV Proteine am N-Terminus einen fusionierten Polyhistidinrest, welcher unter Umständen die Reaktivität der Enzyme verringern könnte. Aufgrund der insgesamt schwachen Aktivität kann man vermuten, dass das aminierte Produkt dTDP-D-4,6-Dideoxy-4-aminoglucose in den verschiedenen zuvor durchgeführten Enzymtests nicht nachgewiesen werden konnte. Die Analyse dieser Experimente war erschwert, da die Reaktionsgemische mittels HPLC-Analyse und Detektion bei 260 nm auf die Umsetzung des jeweils eingesetzten Substrats, nicht jedoch auf Produktbildung hin überprüft werden konnten. Zahlreiche Substanzen des Reaktionsgemisches zeigten ein sehr ähnliches Retentionsverhalten und waren auch durch Modifizierung der Chromatographiebedingungen nicht von dem zu erwartenden Produkt zu trennen.

Eine zukünftig mögliche gezielte Mutagenese des *acbV*-Gens bei *Actinoplanes* sp. sollte die Beteiligung von dessen Genprodukt Einbau des Stickstoffes in die Acarviose-Einheit der Acarbose untermauern. Andererseits sollte die Bildung von Acarbose durch Klonierung des gesamten Acarbose-Biosyntheseclusterns in einem geeigneten Vektor, in *S. lividans*

nachgewiesen werden. Auch hier sollte eine gezielte Mutagenese des *acbV*-Gens zum Verlust der Acarbosebiosynthese und der Anhäufung von dTDP-4-keto-6-desoxyglucose führen. Damit würde die in dieser Arbeit nachgewiesene Aminotransferaseaktivität ebenfalls bestätigt.

Die bisher identifizierten Aminotransferasen, die innerhalb der Biosynthesegencluster von Aminoglycosideinheiten verschiedener Sekundärmetabolite liegen, und für welche Nukleotid-aktivierte Zucker als Substrate postuliert wurde wie z. B. TylB aus *S. fradiae* (Tylosin; Merson-Davies und Cundliffe 1994), LmbS aus *S. lincolnensis* (Lincomycin; Peschke et al. 1995), gehören zu der SMAT-Familie (s. 4.1; Piepersberg 1997). AcbV aus *Actinoplanes* sp. und AcbB aus *S. glaucescens* GLA.0 sind die ersten Vertreter einer anderen Aminotransferase Subfamilie (GabT Familie), welche einen Nukleotid-aktivierte 6-Desoxyhexose transaminieren. Diese beiden Aminotransferasen sowie SpcC aus *S. flavopersicus* und das Genprodukt von Orf9 aus *Amycolatopsis mediterranei*, welche einen gemeinsamen Ursprungs in der GabT-Familie haben könnten, könnten zu einer neuen Sekundärmetabolit-Aminotransferase Familie gehören, die eine völlig andere Entwicklung genommen haben als die Aminotransferasen, die als SMATs bezeichnet wurden (s. 4.2).

#### 4.3 Die Proteine AcbW und AcbX, mögliche Komponenten eines ABC-Exporters

Die sequenzielle Anordnung der Gene *acbW* und *acbX* (und *acbY*) läßt vermuten, dass Sie wahrscheinlich eine gemeinsame Transkriptionseinheit bilden, da die jeweiligen postulierten Stopp- und Startcodons dieser beiden Genpaare miteinander überlappen. Das AcbW Protein besitzt einen vollständigen Satz der für ATP-Bindung und -Hydrolyse notwendigen Sequenzmotive, die als Walker A und B Sequenzmotive bezeichnet werden. Das AcbX Protein enthält sechs Membran-durchspannende Domänen (vgl. 3.3.5.4). Die getrennten AcbW und X Polypeptidketten würden dann wie in dem Fall von OleC und OleC-Orf5 aus *S. antibioticus* (Rodriguez et al 1993), DrrA und DrrB aus *S. peuceticus* (Guilfoile und Hutchinson 1991) und MtrA und MtrB aus *S. argillaceus* (Fernandez et al. 1996), jeweils ein ABC-Exportersystem des Typ B repräsentieren (Higgins 1992). Durch Aminosäuresequenzvergleiche der Genprodukte AcbW, AcbX und AcbY mit Proteindatenbanken konnten ähnliche Proteine, deren Gene die gleiche Anordnung zeigen, in *Deinococcus radiodurans* und *Synechocystis* sp. gefunden werden (White et al. 1999; Kaneko et al. 1996). Allerdings ist die Funktion dieser postulierten ABC-Transporter ebenfalls noch unbekannt.

ABC-Transporter wurden mittlerweile in zahlreichen Streptomycceten identifiziert. Die bisher beschriebenen ABC-Transporter sind am Export von Antibiotika wie z. B. OleC aus *S. antibioticus* (s.o.) und am Import, wie z. B. das Xylobiose-Aufnahmesystem bei *S. lividans* (Hurtubise et al. 1995), beteiligt. Im Acarbose-Biosynthesegencluster konnte auch ein potenzielles Kohlenhydrat-Aufnahmesystem identifiziert werden (vgl. Tab. 4.1; Stratmann 1997). Für einen Antibiotika-produzierenden Organismus hat ein solches Exportsysteme nicht nur die Bedeutung eines weiteren Resistenzmechanismus gegen ihr eigenes Produkt, sondern auch für einen schnellen Export des Produkts. Möglicherweise werden nur die im Organismus vorliegenden modifizierten Produkte, z. B. die phosphorylierten, acetylierten oder glycosylierten

Derivate von den ABC-Exportern erkannt (Mansouri und Piepersberg 1992; Calcutt und Schmidt 1994; Olano et al. 1995). Eine solche Funktion würde sich gut in die Hypothese einfügen, dass die Acarbose-7-Phosphotransferase (AcbK), die von Goeke et al (1996) identifiziert wurde, an dem Acarbose Exportsystem beteiligt ist. Eine Beteiligung von AcbK könnte auch Bedeutung für die intrazelluläre Inaktivierung aufgenommener bzw. biosynthetisch hergestellter Acarbose-(derivate) haben.

#### 4.4 Das AcbU Protein

Durch Sequenzvergleiche von AcbU mit Proteindatenbanken konnten bisher keine Vorschläge für eindeutige Funktionen abgeleitet werden, die eine Beteiligung an der Acarbose-Biosynthese nahelegen würden. Das Genprodukt von *acbU* zeigte Ähnlichkeit zu zwei unterschiedlichen Proteinfamilien. Es hat geringe Homologien zu den Pep2-Proteinen, welche von den zwei Glycogensynthese-Genclustern aus *S. coelicolor* kodiert werden (Bruton et al. 1995) und andererseits zu RamA aus *S. coelicolor* und *S. lividans*, welches für das ATP-Bindeprotein eines ABC-Transporters vom Typ A kodiert (Ma und Kendall 1994).

Das konservierte Motiv, das auf beiden Pep2 Sequenzen liegt, kommt auch in zwei abgeleiteten Proteinen zweier ORFs mit unbekannter Funktion in *Mycobacterium tuberculosis* vor (Abb. 4.4, A). Aufgrund der Lage der *pep2* Gene innerhalb des Glycogen-Biosyntheseegenclusters bei *S. coelicolor* kann spekuliert werden, dass die Pep2 Proteine, AcbU und vielleicht auch die aus *M. tuberculosis* stammenden Genprodukte an der Kondensation von Zuckereinheiten oder auf sonstige Weise am Metabolismus von Maltodextrinen bzw. Glucose beteiligt sein könnten.

Andererseits konnten typische Motive für ATP-Bindestellen identifiziert werden (Abb. 4.4; B). Das könnte bedeuten, dass *acbU* für ein ATP-Bindeprotein kodiert. Das Protein AcbU muß aber deshalb nicht unbedingt Bestandteil eines ABC-Transporter-Systems sein, da die Ähnlichkeit sich lediglich auf die Walker-Motive beschränkt (s. Abb. 4.4), die anderen Sequenzbereiche aber nur sehr schwache Ähnlichkeit zu z. B. RamA aus *S. coelicolor* besitzen. Das Protein AcbU könnte eine Phosphorylierungsfunktion besitzen und z. B. 2,5-*epi*-Valiolon vor der Kondensation mit der dTDP-D-4,6-Didesoxy-4-aminoglucose aktivieren könnte. Solche Proteine, wie bei der Aktivierung des Cyclites vor der Kondensation mit einer Adeninbase im Biosyntheseweg von Aristeromycin und Neplanocin in *S. citricolor* beschrieben wurden (Hill et al. 1995), konnte noch keinem Genprodukt des Acarbose-Biosyntheseegenclusters zugeordnet werden, obwohl sie für die Biosynthese der Acarviose notwendig sein könnten.

## A

|               |                       |             |                              |
|---------------|-----------------------|-------------|------------------------------|
| <b>AcbU</b>   | DFHTELAQRLEPAP-TFPVNA | <b>53aa</b> | PSHGDLHLTHILRRQTPDG--WRLCVID |
| <b>M. tub</b> | SVHATLADSLGTAQATFPVDR | <b>37aa</b> | RVHGDLHLGQVLR--TPES--WLL--ID |
| <b>Pep2</b>   | EVHTALARAL---PTVTLGHA | <b>50aa</b> | RVHGDLHLGQCLR--SPDG-EWSL--ID |
| <b>Pep2*</b>  | DVHLALAS-----A-FPVGA  | <b>51aa</b> | RIHGDLHLGQVLR-----GRDWF--VID |

## B

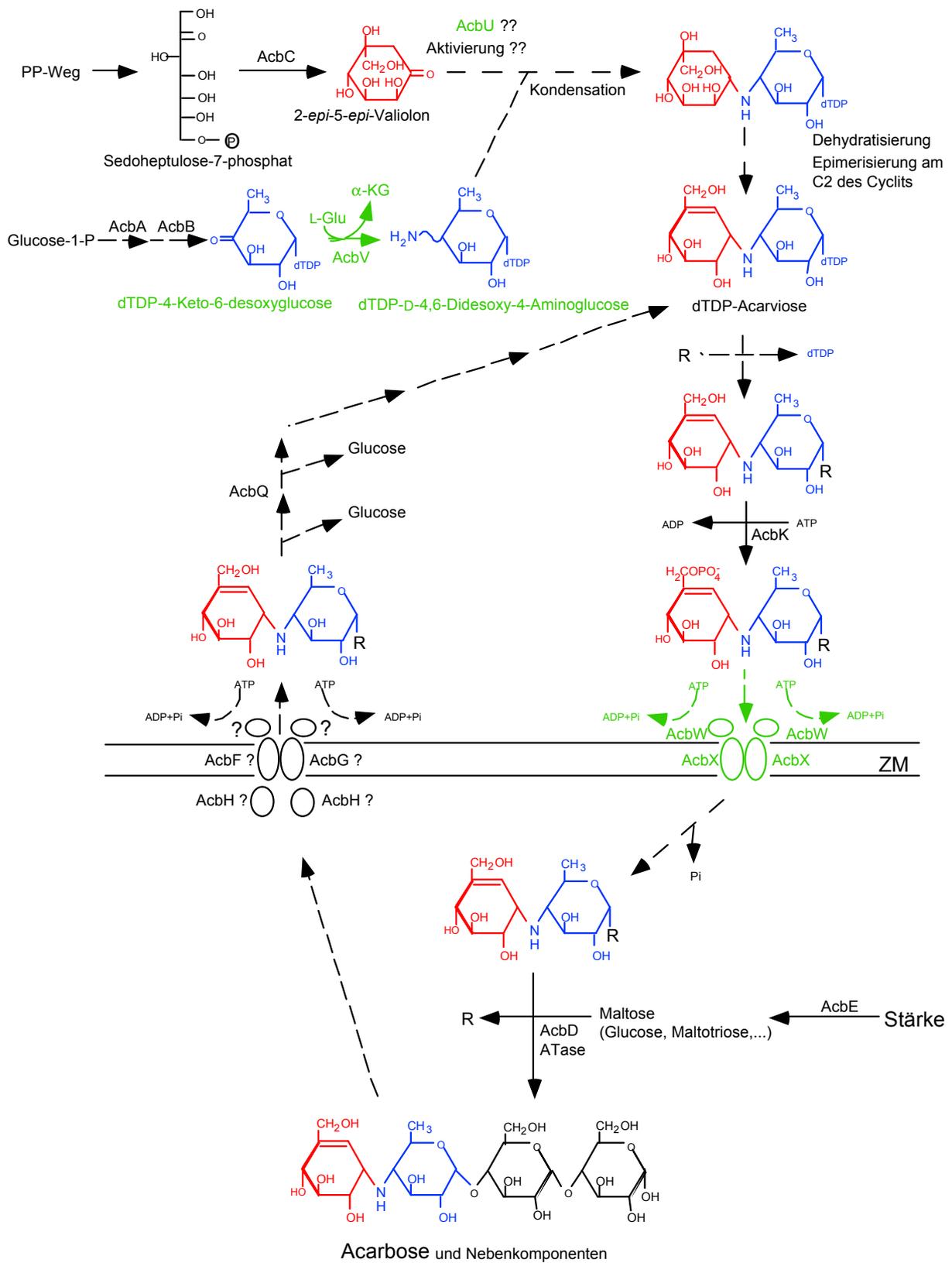
|              | Walker Motiv A          |             | Loop 3                            | Walker Motiv B |
|--------------|-------------------------|-------------|-----------------------------------|----------------|
| <b>Typ B</b> |                         |             |                                   |                |
| <b>AcbW</b>  | GVKIAYIGANGAGKSTTIKLLT  | <b>85aa</b> | LSLGQRML-AEIAASLLHDPVAVFLDEPTIGLD |                |
| <b>MtrA</b>  | GEIVGFLGPNAGKTTTMRMLT   | <b>84aa</b> | LSGCQARR-VDMALGLMHQPELLFLDEPTANLD |                |
| <b>DrrA</b>  | GLVYGILGPNAGKSTTIRMLA   | <b>84aa</b> | YSGMRRR-LDIAASIVVTPDLLFLDEPTTGLD  |                |
| <b>OleC</b>  | GTVMGVLGPNAGKTTLVRIIS   | <b>84aa</b> | YSGMRRR-LDLAASMIGRPAVLYLDEPTTGLD  |                |
| <b>AcbU</b>  | AAGRHRGTGRRGDGRA--ASIAG | <b>86aa</b> | PSHGDLHLSHILRRQTPDGWRLCVIDLSTPAPD |                |
| <b>Typ A</b> |                         |             |                                   |                |
| <b>RamA</b>  | GSTVAVVGRSGAGKSVLAAVAG  | <b>99aa</b> | LSGGEHQRLGLARAFAHAGRLLVLDATSSLD   |                |

**Abb. 4.4 Konservierte Motive der Aminosäuresequenz des Proteins AcbU.** A. Vergleich mit Pep2-ähnlichen Proteinen. AcbU aus *Actinoplanes* sp. (diese Arbeit); Pep2, kodiert vom Glycogensynthese-Genclusters aus *S. coelicolor* (Bruton et al. 1995); M. tub, *M. tuberculosis*, unbekannte Funktion (Accesion Nr. Z92770 und Z96071). B. Vergleich mit ATP-Bindestellen in ABC-Transportern. Die Walker Motive sind auf fettgedruckt. AcbW, aus *Actinoplanes* sp. (diese Arbeit); MtrA, Mithramycinresistenzgen aus *S. argillaceus* (Fernandez et al. 1996); MrrA, Daunorubicin/Doxorubicinresistenzgen aus *S. peuceticus* (Guilfoile und Hutchinson 1991); OleC-orf4, Oleandromycinresistenzgen aus *S. antibioticus* (Rodriguez et al. 1993); RamA, Luftmyzelbildung aus *S. coelicolor* (Ma und Kendall 1994).

#### 4.5 Ein Modell des Acarbose-Stoffwechsels in *Actinoplanes* sp.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das bisherige Modell des Acarbosestoffwechsels in *Actinoplanes* sp. (vgl. Einleitung 1.4, Abb. 1.6; Abb. 4.5). Viele Annahmen dieses Modells müssen noch durch genetische und biochemische Arbeiten in der Zukunft bestätigt bzw. überprüft werden.

Nach der Bestätigung der Cyclisierung von *sedo*-Heptulose-7-phosphat zu 2,5-*epi*-Valiolon durch AcbC (Stratmann et al. 1999), das mit großer Wahrscheinlichkeit eine direkte Vorstufe für die Cycliteinheit der Acarbose darstellt (Mahmud et al. 1999), konnte die Transaminierung der dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose durch das Enzym AcbV nachgewiesen werden (s. 4.3). Danach entsteht wahrscheinlich die "core Einheit" durch Kondensation des 2,5-*epi*-Valiolons mit dTDP-D-4,6-Didesoxy-4-aminoglucose. Der C<sub>7</sub>-Cyclit könnte zuvor durch Phosphorylierung aktiviert werden und die Kondensationsreaktion thermodynamisch begünstigen. Eine dafür notwendige Kinase ist jedoch noch nicht im Acarbose-Biosynthesecluster identifiziert worden. AcbU könnte möglicherweise aufgrund der Ähnlichkeit zu einem Protein, welches am Zuckerstoffwechsel beteiligt ist und gleichzeitig eine ATP-Bindestelle besitzt, diese Funktion übernehmen (s. 4.4). Nach Kondensation mit der dTDP-D-4,6-Didesoxy-4-aminoglucose wird



**Abb. 4.5 Modell des Acarbose-Stoffwechsels bei *Actinoplanes* sp.:** Erklärung siehe Text zu 4.5. R = Glucose oder Oligomere davon; postulierte Reaktionen sind durch gestrichelte Linien markiert; die Ergebnisse dieser Arbeit sind in grün wiedergegeben.

es wahrscheinlich dehydratisiert und an C2 epimerisiert, so dass dTDP-Acarviose entsteht. Es wird spekuliert, dass diese Reaktionen nur von einem einzigen Enzym katalysiert werden könnte. Nach der Verknüpfung von Glucosemono- bzw. -oligomeren mit der "core-Einheit" könnten die resultierende Acarbose und davon abgeleiteten Nebenkomponenten durch AcbK (Drepper und Pape 1996; Goeke et al. 1996) oder eine andere Kinase inaktiviert bzw. als Transportmolekül markiert und durch ein ABC-Transporter-System, z. B. mit AcbW und AcbX, aus der Zelle exportiert werden.

Um die biologische Bedeutung der Produktion der Acarbose- und ihrer Nebenkomponenten bei *Actinoplanes* zu erklären, wurde spekuliert, dass mit Hilfe der  $\alpha$ -Amylase AcbE und der Acarviosyltransferase AcbD mehrere Zucker-Einheiten zu verlängerten Acarbosederivaten ausserhalb der Zelle miteinander verknüpft werden und die resultierenden Moleküle durch ein zu *E. coli* ähnliches Aufnahmesystem aus AcbG, AcbF und AcbH anschließend wieder aufgenommen werden (s. Einleitung 1.4; Abb. 1.6). Acarviose oder Acarbose würde somit ein "Taxi" darstellen, welches Glucoseoligomere aus der Umgebung aufsammelt und zum Bestimmungsort in die Zelle transportiert. Für die Beförderung wird mit ATP bezahlt. So eine Strategie könnte von Vorteil gegenüber konkurrierenden Mikroorganismen bei der Erschließung von C-Quellen für *Actinoplanes* sp. bedeuten (s. Einleitung 1.4).

#### 4.6 Entwicklung einer "Screening"-Methode, um homologe Acarbose-Biosynthesegene in Actinomyceten zu identifizieren

In dieser Arbeit konnten die Grundlagen für das Etablieren einer effizienten "Screening"-Methode für Acarbose- und homologe Pseudooligosaccharide produzierende Streptomyceten gelegt werden. Für diesen Zweck wurden Acarbose-Biosynthese spezifische Gene wie *acbC* (C7-Cyclitolcyclase AcbC), *acbK* (Acarbose-7-kinase AcbK), *acbB* (dTDP-Glucose-4,6-dehydratase AcbB) und *acbV* (Aminotransferase AcbV) aus *Actinoplanes* sp. ausgewählt. Die Ergebnisse (vgl. 3.7) sind in der Tab. 4.4 zusammengefasst.

**Tab. 4.4 Überblick der identifizierten Gene in den untersuchten Streptomyceten.**

| Methode                         | Durch Hybridisierung <sup>1</sup> |             |             | Durch PCR <sup>2</sup> |             |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|
|                                 | <i>acbC</i>                       | <i>acbK</i> | <i>acbV</i> | <i>acbB</i>            | <i>acbC</i> |
| <b>Gen</b>                      |                                   |             |             |                        |             |
| <b>Stamm</b>                    |                                   |             |             |                        |             |
| <i>Actinoplanes</i> sp. (*)     | +                                 | +           | +           | +                      | +           |
| <i>S. calvus</i>                | -                                 | -           | +           | +                      | -           |
| <i>S. myxogenes</i>             | -                                 | -           | +           | -                      | -           |
| <i>S. dimorphogenes</i>         | -                                 | -           | +           | +                      | -           |
| <i>S. hygrosopicus limoneus</i> | -                                 | -           | +           | +                      | -           |
| <i>S. lividans</i> (**)         | -                                 | -           | -           | n.d.                   | n.d.        |

<sup>1</sup>(s. 3.7.2), <sup>2</sup>(s. 3.7.1), (\*) = Positivkontrolle, (\*\*) = Negativkontrolle, n.d. = nicht durchgeführte Experiment.

Die Verwendung der *acbC*- und *acbK*-Gene als gezielte Sonden zum Auffinden von Homologen zu Acarbosebiosynthesegenen in Streptomyceten scheint nicht möglich zu sein (s. Tab 4.4). Die Ähnlichkeit von *acbC* auf DNA-Ebene mit Genen für möglicher C7-Cyclitolcyclasen, die die gleiche Funktion bei anderen Stämmen besitzen sollten, reicht auch bei niedrig stringenten Hybridisierungsbedingungen offensichtlich nicht aus, um homologe Gene zu identifizieren. Auch unter Verwendung der PCR Methode konnten keine *acbC* homologen Gene gefunden werden (vgl. 3.7.1.1). Aufgrund der niedrigen Ähnlichkeit der Primärstrukturen der C7-Cyclitolcyclase AcbC aus *Actinoplanes* sp. mit denen der 3-Amino-5-Dehydrochinasäure-Synthase RifG aus *Amycolatopsis mediterranei* (August et al. 1998) und derjenigen der 3-Hydroxy-5-Dehydrochinasäure Synthase AroB aus *E. coli* wurden vielleicht nicht die optimalen Primer und PCR-Bedingungen verwendet. Eine alternative Möglichkeit besteht darin, dass keine AcbC-ähnliche Cyclase in anderen Produzenten Valienamin-haltiger Sekundärmetabolite benutzt wird, sondern ein völlig anderer Biosyntheseweg beschritten wird. Gleiches gilt für die Hybridisierungsversuche mit der *acbK*-Sonde.

Homologe Gene zu der dTDP-Glucose-4,6-dehydratase (*strE*) aus dem Streptomycin-Biosynthesegencluster bzw. *acbB* aus *Actinoplanes* sp. konnten in *S. calvus*, *S. dimorphogenes* und *S. hygrosopicus limoneus* identifiziert werden (vgl. 3.7.1.2). Damit bestätigte sich noch einmal, dass mit von *strE* abgeleiteten Gensonden DNA-Bereiche, die für Synthesegene von 6-Desoxyhexosen kodieren, in der genomischen DNA von Actinomyceten identifiziert werden können (Stockmann und Piepersberg 1992). Die Verwendung von *strE* als Gensonde könnte allerdings bei Actinomyceten, die mehrere Sekundärmetabolite bilden, nicht spezifisch genug sein. So können z. B. bei *S. glaucescens* GLA.0 mindestens zwei unabhängige Homologe mit der *strE* Gensonde identifiziert werden: *strE* aus dem Hydroxy-Streptomycin Biosynthesegencluster, welches an der dTDP-L-Dihydrostreptose-Biosynthese beteiligt ist, und *acbD*, welches von einem  $\alpha$ -Amylase Hemmstoff-Biosynthesegencluster kodiert wird (Hoechst Patent DE19622783; s. 4.1).

Die Anwendung der *acbB*-Gensonde aus *S. glaucescens* GLA.0 bzw. der *acbV*-Gensonde aus *Actinoplanes* sp., deren Genprodukte beide Nukleotid-aktivierte Zucker transaminieren, scheinen spezifisch genug zu sein, um Gene für die Biosynthese von Valienamin-haltigen Sekundärmetaboliten zu identifizieren (vgl. Tab. 3.7.2). Das läßt darauf schließen, dass in den untersuchten Stämmen nur ein zu *acbV* aus *Actinoplanes* sp. und *acbB* aus *S. glaucescens* GLA.0 hochgradig homologes Gen vorhanden ist, welches dann mit großer Wahrscheinlichkeit an der Biosynthese von Adiposin, Oligostatin, Trestatin bzw. Validamycin A beteiligt sein sollte. Aufgrund der Ähnlichkeiten benachbarter Gene zu AcbV und AcbSg, wie AcbASg zu AcbW (vgl. Tab. 4.2), könnten noch mehr solche spezifischen Gensonden identifiziert werden.

#### 4.7 *Actinoplanes* sp. besitzt zwei Glutaminsynthetasen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Grundlagen für die Untersuchung des zentralen Stickstoff-Regulationssystems von *Actinoplanes* sp. gelegt werden. Die in dieser Arbeit identifizierten Gene *glnA* und *glnII* sind in verschiedenen Actinomyceten gefunden worden (vgl. 3.1.1, 3.1.2 und 1.7). Die Regulation des GlnA Enzyms aus *S. coelicolor* A3(2) ist in verschiedenen Studien untersucht worden. In diesen Studien wurde gezeigt, dass das *glnA*-Gen auf Transkriptions- und Translationsebene reguliert wird (Lewis V. Wray et al. 1991; Fink et al. 1999). Über die Regulation und biologische Bedeutung des *glnII*-Gens ist noch wenig bekannt. Das GlnII Enzym kommt hauptsächlich in Bodenmikroorganismen vor (s. Tab. 1.2). Deswegen wird spekuliert, dass diese Stämme aufgrund des eingeschränkten Stickstoffgehalts mancher Böden eine zweite Glutaminsynthetase benötigen. Diese Hypothese würde nur Sinn machen, wenn das GlnII-Enzym einen niedrigeren  $K_m$ -Wert als das GlnA besäße. Beide Enzyme aus verschiedenen Bakterien wie z. B. *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Frankia* und auch Streptomyceten weisen aber mit einem  $K_m$  von 0,2 mM identische Affinitäten zu Ammonium auf (Merrick und Edwards 1995). Überraschenderweise konnte durch Sequenzierung des Genoms von *S. coelicolor* eine dritte potentielle Glutaminsynthetase, welche mehr Ähnlichkeit zum *glnA*-Typ zeigt, identifiziert werden (Cosmid SC135; Accession Nr. 3581868). Es ist somit möglich, dass auch *Actinoplanes* sp. als naher Verwandter zu *Streptomyces* eine dritte Glutaminsynthetase besitzen könnte.

Aufgrund des Einflusses der Ammoniumakkumulation auf die Sekundärmetabolitproduktion während der Fermentationsprozesse (vgl. 1.7) ist die Aufklärung des Stickstoffregulationssystems in Actinomyceten von grossem Interesse. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Einfluß dieses Regulationsystems für die Sekundärmetabolit- bzw. Acarbose-Produktion aufzuklären. Mit denen in dieser Arbeit identifizierten Genen könnte z. B. die Expression, insbesondere die Transkription von *glnA* und/oder *glnII* mit der Acarboseproduktion in Korrelation zu bringen. Diese Arbeiten müssen auch die Suche nach weiteren regulatorischen Genen wie z. B. *ntrBC*, die noch nicht in einem Gram-positiven Mikroorganismus identifiziert wurden oder *glnE*, identifiziert in *S. coelicolor* A3(2) (Fink et al. 1999), mit einschliessen. Dieses würde die Möglichkeit einer zukünftigen gezielten Mutagenese und damit die Beeinflussung des Stickstoffhaushaltes bzw. der Stickstoffverwertung während der Fermentation bei der Acarboseproduktion ermöglichen.

**Zitierte Literatur**

- Abou-Zeid A, Euverink GJW, Hessels GI, Jensen RA and Dijkhuizen L (1995). Biosynthesis of L-Phenylalanine and L-Tyrosine in the Actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. App. Env. Microbiol. Vol 61, no 4: 1298-1302.
- Ahlert J (1997). Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von Streptomycin in *Streptomyces griseus* N2-3-11: Identifizierung und Expression einer L-Glutamin: *scyllo*-Inosose Aminotransferase. Dissertation. Chemische Mikrobiologie, BUGH Wuppertal.
- Ahlert J, Distler J, Mansouri K, Piepersberg W (1997). Identification of *stsC*, the gene encoding the L-glutamine:*scyllo*-inosose aminotransferase from streptomycin-producing streptomycetes. Arch. Microbiol. 168: 102-113.
- Alexander FW, Sandmeier E, Mehta PK and Christen P (1994). Evolutionary relationships among pyrodoxal-5'-phosphate dependent enzymes. Eur. J. Biochem. 219: 953-960.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipmann DJ (1990). Basic logical alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410
- Arber W (1958). Transduction of chromosomal genes and episom in *E.coli*. Virology 11: 273.
- August PR, Tang L, Yoon YJ, Ning S, Müller R, Yu T-W, Taylor M, Hoffmann D, Kim C-G, Zhang X, Hutchinson CR and Floss HG (1998). Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. Chem. Biol. 5 (2): 69-79.
- Babcock MJ, Kendrick KE (1988). Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. J Bacteriol 170: 2802-2808.
- Bartsch K, von Johnn-Marteville A and Schulz A (1990). Molecular analysis of two genes of the Escherichia coli *gab* cluster: nucleotide sequence of the glutamate:succinic semialdehyde transaminase gene (*gabT*) and characterization of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (*gabD*). J. Bacteriol. 172 (12): 7035-7042.
- Bascaran V, Hardisson C and Brana AF (1989). Isolation and characterization of nitrogen-deregulated mutants of *Streptomyces clavuligerus*. J. Gen. Microbiol. 135: 2475-2482.
- Bland CE and Couch JN (1981). The family Actinoplanaceae. In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balous, A. and Schlegel, H.G. (ed.). The prokaryotes, Vol II, Springer Verlag, New York. p.2004-2010.
- Behrmann I, Hillemann D, Pühler A, Strauch E and Wohlleben W (1990). Overexpression of a *Streptomyces viridochromogenes* gene (*glnII*) encoding a glutamine synthetase similar to those of Eucaryotes confers resistance against the antibiotic phosphinothricyl-alanyl-alanine. J. Bacteriol. 172, 9: 5326-5334.
- Benton WD, Davies RW (1977). Screening  $\lambda$ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196: 180.
- Bibb MJ, Findlay PR and Johnson MW (1984). The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. Gene 30: 157-166.
- Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res 7: 1513.

- Bischoff H, Ahr HJ, Schmidt D, Stoltefuß J (1994). Acarbose, ein neues Wirkprinzip in der Diabetestherapie. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 42, 11: 1119-1128.
- Boos W and Shuman H (1998). Maltose/Maltodextrin system of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism and Regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 1: 204-229.
- Borghi A, Edwards D, Zerilli LF and Lancini GC (1991). Factors affecting the normal and branched-chain acyl moieties of teicoplanin components produce by *Actinoplanes teichomyceticus*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 587-592.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brunkhorst C, Andersen C and Schneider E (1999). Acarbose, a pseudooligosaccharide, is transported but not metabolized by the maltose-maltodextrin system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 181, 8: 2612-2619.
- Bruntner C, and Bormann C (1998). The *Streptomyces tendae* Tü901 L-lysine 2-aminotransferase catalyzes the initial reaction in nikkomycin D biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 254: 347-355.
- Bruton CJ, Plaskitt KA and Chater KF (1995). Tissue-specific glycogen branching isoenzymes in a multicellular procaryote, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 18: 89-99.
- Buchner J, Rudolph R (1991). Routes to active proteins from transformed microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2: 532-538
- Bullock WO, Fernandez JM und Short JM (1987). *Biotechniques* 5: 376-378
- Calcutt MJ, Schmidt FJ (1994). Gene organization in the bleomycin-resistance region of the producer organism *Streptomyces verticillus*. *Gene* 151: 17-21.
- Carpenter E, Hawkins AR, Frost JW and Brown KA (1998). Structure of dehydroquinase synthase reveals an active site capable of multistep catalysis. *Nature*, 394: 299-302.
- Chen S, von Bamberg D, Hale V, Breuer M, Hardt B, Müller R, Floss HG, Reynolds KA and Leistner E (1999). Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin: identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* Tü 1892. *Eur. J. Biochem.* 260: 1-11.
- Chong S, Mersha FB, Comb DG, Scott ME, Landry D, Vence LM, Perler FB, Benner J, Kucera RB, Hirvonene CA, Pelletier JJ, Paulus H and Xu M-Q (1997). Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, 192: 277-281.
- Chong S, Shao Y, Paulus H, Perler FB, Benner J and Xu M-Q (1996). Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein: the steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an *in vitro* splicing system. *J. Biol. Chem.* 271: 22159-22168.
- Chu M, Truumees I, Mierzwa R, Terracciano J, Patel M, Loebenberg D, Kaminski JJ, Das P, Puar MS (1997). Sch 54445: a new polycyclic xanthone with highly potent antifungal activity produced by *Actinoplanes* sp. *J. Nat. Prod.* 60 (5): 525-528.

- Daniels DL, Plunkett III G, Burland V und Blattner FR (1992). Analysis of the *E. coli* genome: DNA sequence of the region from 84,5 to 86,5 minutes. *Science* 257: 771-778.
- Degwert U, van Hülst R, Pape H, Herrold RE, Beale JM, Keller PJ, Lee JP, Floss HG (1987). Studies on the biosynthesis of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose: valienamine, a m- C<sub>7</sub>N unit not derived from shikimate pathway. *J. antibiot.* 40, 6: 855-861.
- Dhillon N, Hale RS, Cortés J und Leadlay PF (1989). Molecular characterization of a gene from *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*) which is involved in erythromycin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 3: 1405-1414.
- Distler J, Ebert A, Mansouri K, Pissowotzki K, Stockmann M Piepersberg W (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotid sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acid Res.* 15: 8041-8056.
- Distler J, Manouri K, Piepersberg W (1985). Streptomyces biosynthesis in *Streptomyces griseus*. II: Adjacent genomic location of biosynthetic genes and one of two streptomycin resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 30: 151-154
- Drepper A und Pape H (1996). Acarbose 7-Phosphotransferase from *Actinoplanes* sp.: Purification, Properties, and Possible Physiological Function. *J. Antibiotics* 49, 7: 664-668.
- Emilien G, Maloteaux JM, Ponchon M (1999). Pharmacological management of diabetes: recent progress and future perspective in dialy drug treatment. *Pharmacol. Ther.* 81 (1): 37-51.
- Fernández AM, Lombe F, Méndez C and Salas JA (1996). An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer *Streptomyces argillaceus*. *Mol. Gen. Genet.* 251: 692-698.
- Fink D, Falke D, Wohlleben W and Engels A (1999). Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2): modification of glutamin synthetase I by an adenyltransferase. *Microbiology* 145: 2313-2322.
- Floss HG und Beale JM (1989). Untersuchungen zur Biosynthese von Antibiotica. *Angw. Chem.* 101: 147-179.
- Floss HG (1997). Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports.* 433-452.
- Frischauf AM, Lehrach H, Poustka A, Murray N (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J Mol Biol* 170: 821-842.
- Frommer W, Junge B, Müller L, Schmidt DD, Truscheidt E (1979). Neue Enzyminhibitoren aus Mikroorganismen. *Plant. Medica*, 35: 195-217.
- Frost JW und Draths KM (1995). Biocatalytic syntheses of aromatics from D-Glucose: Renewable Microbial Sources of aromatic Compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 557-579.
- Fukuhara K, Murai H, Murauo S (1982). Isolation and structure-activity relationship of some amylostatins (F-1b fraction) produced by *Streptomyces diastaticus* subsp. *amylostaticus*. *Agric. Biol. Chem.* 46, 7: 1941-1945.
- Gilles C, Astier J P, Marchis-Mouren G, Cambillan C, Payan F (1996). Crystal structure of pig pancreatic  $\alpha$ -amylase isoenzym II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose. *Eur. J. Biochem.* 238: 561-569.

- Goeke K (1986). Enzymatische Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel und zur Biosynthese des  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitors Acarbose bei *Actinoplanes* sp.. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, WWU Münster.
- Goeke K, Drepper A and Pape H (1996). Formation of Acarbose Phosphate by a cell-free extrakt from the Acarbose producer *Actinoplanes* sp. J. antibiotics. 49, 7: 661-663.
- Goodfellow M und Cross T (1993). The Biology of the Actinomycetes. In: Goodfellow, M., Mordarski, M. und Williams, S.T. (ed.). Academic Press: 59-63.
- Guilfoile PG und Hutchinson CR (1991). A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8553-8557.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557-580.
- Hanzoet G, Pircher HP, Vanni P, Oesch B, Semenza G (1981). An example of enzyme hysteresis: The slow and tight interaction of some fully competitive inhibitors with small intestinal sucrase. J. Biol. Chem. 256: 3703-3711.
- Heiker FR, Böshagen H, Junge B, Müller L, Stoltefuß J (1981). Studies designed to localize the essential structural mit of glycoside-hydrolase inhibitors of the acarbose type. In: Creutzfeldt, W. (Hrsg.) first international simposium on acarbose s. 137-141; Amsterdam: Excerpta Medica.
- Hemker M (1997). Pseudooligosaccharide und Stärkestoffwechsel bei *Actinoplanes* sp.. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, WWU Münster.
- Heydorn A, Suhr-jessen T and Nielsen J (1999). Growth and production kinetics of a teicoplanin producing strain of *Actinoplanes teichomyceticus*. J. Antibiot. 52(1): 40-44.
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Ann Rev Cell Biol 8: 67-113.
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R (1991). CLUSTALV: improved software for multiple sequence alignment.
- Higgins ML (1967). Release of sporangiospores by a strain of *Actinoplanes* . J. Bacteriol. 94, 3: 495-498.
- Hill JM, Jenkins GN, Rush CP, Turner NJ, Willets AJ, Buss AD, Dawson MJ and Rudd BAM (1995). Revised pathway for the biosynthesis of aristeromycin and neplanocin A from D-glucose in *Streptomyces citricolor*. J. Am. Chem. Soc. 117: 5391-5392.
- Hillemann D, Dammann T, Hillemann A and Wohlleben W (1993). Genetic and biochemical characterization of the two glutamine synthetases GSI and GSII of the phosphinothricyl-alanyl-alanine producer, *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. J. Gen. Microbiol. 139, 1773-1783.
- Hockney RC (1994). Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. TIBTECH 12: 456-463.
- Hoechs Patent nr. DE19622783 (1996). Isolierung der Biosynthese für pseudooligosaccharide aus *Streptomyces glaucescens* und ihre Verwendung.

- Höltje JV and Schwarz U (1985). Biosynthesis and growth of the murein sacculus. In: Nanninga, N. (eds.), molecular cytology of *Escherichia coli*. Academic Press, London, pp. 77-119.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrempf H (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich.
- Horii S und Kameda Y (1972). Structure of the antibiotic validamycin A. J. Chem. Commun., 747-748
- Hurtubise Y, Shareck F, Kluepfel D, Morosoli R (1995). A cellulase/xyllanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. Mol Microbiol 17: 367-377.
- Hyde SC, Elmsley P, Hartshorn M, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Hubbard R und Higgins CF (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature 346: 362-365.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990). PCR-Protokols: a guide to Methods and applications. Academic Press, INC
- Jiang XM, Neal B, Santiago F, Lee SJ, Romana LK und Reeves PR (1991). Structure and sequence of the *rfb* (O Antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar *typhimurium* (strain LT2). Mol. Microbiol. 5: 695-713.
- Kane JF, Hartley DL (1988). Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Tibtech 6: 95-101.
- Keller JW, Baurick KB, Rutt GC, O'Malley MV, Sonafrank NL, Reynolds RA, Ebbesson LOE and Vajdos FF (1990). *Pseudomonas cepacia* 2,2-Dialkylglycine Decarboxylase. Sequence and expression in *Escherichia coli* of structural and repressor genes. J. Biol. Chem. 265, 10: 5531-5539.
- Kieser T (1984). Factors affecting the isolation of ccc DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. Plasmid 12: 19-36.
- Kim CG, Kirschning A, Bergon P, Ahn Y, Wang JJ, Shibuya M und Floss HG (1992). Formation of 3-amino-5-hydroxy-benzoic acid, the precursor of mC7N units in ansamycin antibiotics, by a new variant of the shikimate pathway. J. Am. Chem. Soc. 114: 4941-4943.
- Kim CG, Yu TW, Fryhle C, Handa S und Floss HG (1998). 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC7N units in rifamycin and related antibiotics. J. Biol. Chem. 273(11): 6030-6040.
- Kirillov S, Vitali LA, Goldstein BP, Monti F, Semenov Y, Makhno V, Ripa S, Pon CL, Gualerzi CO (1997). Purpurosmycin: an antibiotic inhibiting tRNA aminoacylation. RNA, 3(8): 905-915.
- 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 condition. Mol. Gen. Genet. 216: 149-155.
- Kumada Y, Takano E, Nagaoka K and Thompson CJ (1990). *Streptomyces hygroscopicus* has two glutamine synthetase genes. J. Bacteriol. 172, 9: 5343-5351.

- Kyte J, Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Biol Chem* 157:105-132.
- Lacalle RA, Tercero JA und Jiménez A (1992). Cloning of the complete biosynthetic gene cluster for an aminonucleoside antibiotic, puromycin, and its regulated expression in heterologous hosts. *EMBO J.* 11: 785-792.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lechevalier HA, Lechevalier MP (1970). *The Actinomycetales*. pp. 393-405. Jena: Veb G. Fisher. 439.
- Lee S and Egelkroun 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.
- Lennarz WJ and Scher MG (1972). Metabolism and function of polyisoprenol sugar intermediates in membran-associated reactions. *Biochem. Biophys. Acta* 265: 417-441.
- Liedert A (1991). Untersuchungen zur dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase von *Actinoplanes* sp.. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, WWU. Münster.
- Liu SY and Rosazza JPN (1998). Enzymatic conversion of glucose to UDP-4-keto-6-deoxyglucose in *Streptomyces* spp.. *App. Env. Microbiol.* 64, 10: 3972-3976.
- Liu HW and Thorson JS (1994). Pathways and Mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 223-256.
- Lyutskanova D, Distler J and Altenbuchner J (1997). A spectinomycin resistance determinant from the spectinomycin producer *Streptomyces flavopersicus*. *Microbiology* 143 (7): 2135-2143.
- Ma H, Kendall K (1994). Cloning and analysis of a gene cluster from *Streptomyces coelicolor* that causes accelerated aerial mycelium formation in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 176: 3800-3811.
- Mahmud T, Tornus I, Egelkroun E, Wolf E, Uy C, Floss HG and Lee S (1999). Biosynthetic studies on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose in *Actinoplanes* sp.: 2-epi-5-epi-valiolone is the direct precursor of the valienamine moiety. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 6973-6983.
- Makkar NS und Cross T (1982). Actinoplanetes in soil and on plant litter from freshwater habitats. *J. Appl. Bact.* 52: 209-218.
- Mandel M, Higa A (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53: 150.
- Mansouri K und Piepersberg W (1991). Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: Nucleotide sequence of five genes, *strFGHIK*, including a phosphatase gene. *Mol. Gen. Genet.* 228: 459-469.
- Marck C (1988). "DNA-Strider": a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Macintosh family of computers. *Nucleic Acid Res* 16.
- Marolda CL, Valvano MA (1995). Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis region of the *Escherichia coli* VW187 (O7:K1) *rfb* gene cluster: identification of functional

- homologs of *rfbB* and *rfbA* in the *rff* cluster and correct location of the *rffE* gene. J. Bacteriol. 177: 5539-5546.
- Mehling A, Wehmeier UF, Piepersberg W (1995). Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. Microbiol. 141: 2139-2147.
- Mehling A (1996). Development of diagnostic tools for the detection of streptomycetes and recombinant derivatives. Dissertation. Chemische Mikrobiologie, BUGH Wuppertal.
- Mehta PK, Hale TI und Christie P (1993). Aminotransferases: demonstration of homologie and division into evolutionary subgroups. Eur. J. Biochem. 211: 373-376.
- Merson-Davies LA und Cundliffe E (1994). Analysis of five biosynthetic genes from the *tylIBA* region of the *Streptomyces fradiae* genome. Mol. Microbiol. 13: 349-355.
- Merrick MJ and Edwards RA (1995). Nitrogen control in bacteria. Microbiol. Rev. 59, 4: 604-622.
- Miller JH (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, p 433.
- Mooradian AD und Thurman JE (1999). Drug therapy of postprandial hyperglycaemia. Drugs, 57: 19-29
- Moore JT, Uppal A, Male F, Maley GF (1992). Overcoming Inclusion Body Formation in a High-Level Expression System. Protein Expression and Purification 4, 160-163.
- Mullis KA, Falloona FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyced reaction. Methods Enzymol., 155: 335-350.
- Müller L, Junge B, Frommer W, Schmidt D, Truscheit E (1980). Acarbose (BAYg 5421) and homologous  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from actinoplanaceae. In Brodbeck, U. (ed.), Enzyme inhibitors. pp. 109-122, Verlag Chemie, Weinheim.
- Müller L (1986). Microbial glucosidase inhibitors. In: Pape, H., Rehm, H.J. (eds.): Microbial products II. Biotechnology 4: 531-567, Verlag Chemie, Weinheim.
- Murao S und Ohyama K (1975). New amylase inhibitor (S-AI9 from *Streptomyces diastaticus* var. *amylostaticus* no. 2476. Agr. Biol. Chem. 39: 2271-2273.
- Murphy PJ, Trenz SP, Grzemeski W, de Bruijn FJ und Schell J (1993). The *Rhizobium meliloti* rhizopine *mos* locus is a mosaic structure facilitating ist simbiotic regulation. J. Bacteriol. 175: 5193-5204.
- Namiki S, Kaugori K, Nagate T, Hara H, Sugita K, Ommura S (1982a). Studies on the  $\alpha$ -glucosidase hydrolase inhibitor, adiposin II. Taxonomic studies on the producing microorganism. J. Antibiot. 35: 1156-1159.
- Namiki S, Kaugori K, Nagate T, Hara H, Sugita K, Ommura S (1982b). Studies on the  $\alpha$ -glucosidase hydrolase inhibitor, adiposin I. Isolation and physicochemical properties. J. Antibiot. 35: 1234-1236.
- Niehues B (1991). Transaminasen bei *Actinoplanes* sp.. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie, WWU Münster.
- Novagen (1992). pET system manual. Novagen, Madison, USA.

- Okazaki R, Okazaki T, Strominger JT, Michelson AM (1962). Thymidine-diphosphate-4-keto-6-deoxyglucose, an intermediate in thymidine-diphosphate-l-rhamnose synthesis in *Escherichia coli* strains. *J. Biol. Chem.* 237: 3014-3026
- Olano C, Rodriguez AM, Méndez C, Salas JA (1995). A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. *Mol Microbiol* 16: 333-343.
- 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 (1981). Oligostatin, a new antibiotic with amylase inhibitory activity. II. Structures of oligostatins C, D and E. *J. Antibiot.* 34: 1429-1433.
- Ono H, Cramer R, Hintermann G, Hütter R (1983). Hydroxystreptomycin production and resistance in *Streptomyces glaucescens*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 529-537
- Palleroni NJ (1976). Chemotaxis in *Actinoplanes*. *Arch. Microbiol.* 110, 13-18.
- Palleroni NJ (1980). A chemotactic method for the isolation of Actinoplanaceae. *Arch. Microbiol.* 128, 53-55.
- Parenti F, Coronell C (1979). Members of the genus *Actinoplanes* and their antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 389-411.
- Pascarella S und Bossa F (1994). Similarity between pyridoxal/pyridoxamine phosphat-dependent enzymes involved in dideoxy and deoxyaminosugar biosynthesis and other pyridoxal phosphate enzymes. *Prot. Sci.* 3: 701-705.
- Payne SM, Ames BN (1982). A procedure for rapid extraction and high pressure liquid chromatographic separation of the nucleotides and other small molecules from bacterial cells. *Anal Biochem* 123: 151-161
- Pearson WR, Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-2448
- Peschke U, Schmidt H, Zhang H-Z und Piepersberg W (1995). Molecular characterization of the lincomycin production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* 16: 1137-1156.
- Piepersberg W (1994). Pathway engineering in secondary metabolite-producing Actinomycetes. *Crit. Rev. in Biotech.*, 14, 3: 251-285.
- Piepersberg W (1995). Streptomycin and related Aminoglycoside. In: Vining, L.C., Stuttard, C. (eds.), *Genetics and Biochemistry of antibiotic production*. Butterworth-Heinemann, Biotechnologie series, Vol. 28, Newton, MA, pp 531-570.
- Piepersberg W und Distler J (1997). Aminoglycosides and sugar componenets in other secondary metabolites. In: Rehm, H-J., Reed, G. (ed.), *Biotechnology: second, completely revised edition*, Vol.7, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 397-488.
- Pissowotzki K, Mansouri K, Piepersberg W. (1991). Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*. Molecular structure and putative function of genes *strELMB2N*. *Mol. Gen. Genet.* 231: 113-123.

- Pöhling S (1997). Analyse des allgemeinen Proteinsekretionsapparates von *Streptomyces griseus* und *Streptomyces galbus*. Dissertation. Chem. Mikrobiologie BUGH Wuppertal
- Pospiech A and Neumann B, (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. TIG 11: 6.
- Puls W und Keup U (1973). Influence of an  $\alpha$ -amylase inhibitor (BAY d 7791) on blood glucose, serum insulin and NEFA in starch loading test in rats, dogs and man. Diabetologia, 9: 97.
- Puls W, Keup U, Krause HP, Thomas G, Holtmeier F (1977). Glucosidase inhibition: a new approach to the treatment of diabetes, obesity and hyperlipoproteinaemia. Naturwissenschaften 64: 536-537.
- Qian M, Haser R, Buisson G, Duée 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.
- Raetz CRH (1996). Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In: Neidhard, F.C. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Washington DC, ASM, pp. 1035-1063.
- Reed KC, Mann DA (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nucleic Acid Res 13: 7207-7221.
- Rinehart KL, Snyder WC, Staley AL and Lau RCM (1992). Biosynthetic studies on Antibiotics. In: Petroski, R.J., McCormick, S.P. (eds.), Secondary-Metabolite biosynthesis and metabolism, Plenum Press, New York, pp. 41-60.
- Rodríguez AM, Olano C, Vilches C, Méndez C und Salas JA (1993). *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. Mol. Microbiol. 8: 571-582.
- Rosenberg AH, Lade BN, Chui D, Lin S, Dunn JJ, Studier FW (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. Gene 56: 125-135.
- Rudolph R, Lillie H (1996). *In vitro* folding of inclusion body proteins. FASEB J. 10: 49-56.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samulitis BK, Goda Z, Lee SM, Koldovsky O (1987). Inhibitory mechanism of acarbose 1-deoxynojirimycin derivatives on carbohydrases in rat small intestine. Drugs Exptl. Clin. Res., 13: 517-524.
- Sanger F, Nicklan S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-determination inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467.
- Schaper B (1991). Biochemische und physiologische Studien zur Biosynthese des  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitors Acarbose. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, WWU Münster.
- Schärken U (1997). Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Transketolase und Transaldolase, sowie biochemische Charakterisierung der Enzyme aus *E. coli*. Dissertation. Forschung Zentrum Jülich, Universität Düsseldorf.
- Schlösser A, Kampers T and Schrempf H (1997). The *Streptomyces* ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport. J. Bacteriol., 179: 2092-2095.

- 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.
- Shaibe E, Metzger E and Halpern YS (1985). Metabolic pathway for the utilization of L-Arginin, L-Ornithine, Agmatine, and Putrescine as nitrogen sources in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 163, 3: 933-937.
- Stevenson G, Neal B, Liu D, Hobbs M, Packer NH, Batley M, Redmond JW, Lindqvist L, Reeves PR (1994). Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *J. Bacteriol.* 176: 4144-4156.
- Stockmann M and Piepersberg W (1992). Gene probes for the detection of 6-deoxyhexose metabolism in secondary metabolite-producing streptomycetes. *FEMS Microbiol. Letters*, 90: 185-190.
- Stratmann A (1997). Identifizierung eines Acarbose-Biosynthesegenclusters in *Actinoplanes* sp. und Charakterisierung ausgewählter Enzyme des Acarbose-Stoffwechsels. Dissertation. Chemische Mikrobiologie, BUGH Wuppertal.
- Stratmann A, Mahmud T, Lee SS, Distler J, Floss HG and Piepersberg W (1999). The AcbC Protein from *Actinoplanes* Species is a C<sub>7</sub>-cyclitol Synthase related to 3-Dehydroquinate Synthases and is involved in the Biosynthesis of the  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Acarbose. *J. Biol. Chem.* 274, 16: 10889-10896.
- Strokopytov B, Penninga D, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkhuizen, Dijkstra BW (1995). X-ray structure of cyclodextrine glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry*, 34: 2234-2240.
- Studier WF, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990). Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods. Enzymol.* 185: 61-89.
- Stutzman-Engwall KJ, Otten SL und Hutchinson CR (1992). Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. *J. Bacteriol.* 174: 144-154.
- Takagi M, Takada H, und Imanaka T (1990). Nucleotide sequence and cloning in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus stearothermophilus* pleiotropic regulatory gene *degT*. *J. Bacteriol.* 172: 411-418
- Takano E, White J, Thompson CJ, Bibb MJ (1995). Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene* 166: 133-137.
- Takeda H, Nakagawa Y, Kuichi A (1982). *Jpn Kokai*, 58, 172400.
- Tercero JA, Espinosa C, Lacalle RA und Jiménez A (1996). The biosynthetic pathway of the aminonucleoside antibiotic puromycin, as deduced from the molecular analysis of the *pur* cluster of *Streptomyces alboniger*. *J. Biol. Chem.* 271: 1579-1590.
- Thamm S and Distler J (1997). Properties of C-terminal truncated derivatives of the activator, StrR, of the streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 265-272

- Thorson JS, Lo SF, Ploux O, He X und Liu H-w (1994). Studies on the biosynthesis of 3,6-dideoxyhexoses: molecular cloning and characterization of the *asc* (ascarylose) region *Yersinia pseudotuberculosis* serogroup VA. J. Bacteriol. 176: 5483-5493.
- Truscheid E, Frommer W, Junge B, Müller L, Schmidt DD, Wingender W (1981). Chemie und Biochemie  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren. Angew. Chem. 93: 738-755.
- van Hülst R (1985). Untersuchungen zur Biosynthese von Acarbose bei *Actinoplanes* sp.. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, WWU Münster.
- van Wezel GP, White J, Bibb MJ and Postma PW (1997a). The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. Mol. Gen. Genet., 254: 604-608.
- van Wezel GP, White Young PJ, Postma PW and Bibb MJ (1997b). Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) is controlled by *malR*, a member of the *lacI-galR* family of regulatory genes. Mol. Microbiol., 23, 3: 537-549.
- Verseck S (1997). Klonierung und Expression von bakteriellen Enzymen der Biosynthese von 6-Deoxyhexose-Derivaten und deren Verwendung zur präparativen Herstellung von dTDP-aktivierten Hexosen. Dissertation. Chem. Mikrobiologie BUGH Wuppertal.
- Vieira J, Messing JR (1982). The pUC plasmids and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19:259-268.
- Vobis G (1989). Section 28 Actinoplanetes. In: Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., (ed.): Bergey's manual of systematic bacteriology; pp. 2418-2428.
- Volff J-N, Eichenseer C, Viell P, Piendl W and Altenbuchner J (1996). Nucleotide sequence and role in DNA amplification of the direct repeats composing the amplifiable element AUD1 of *Streptomyces lividans* 66. Mol. Microbiol. 21(5), 1037-1047.
- Walker JE, Sarste M, Runswick MJ und Gay NJ (1982). Distantly related sequences in the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. 1: 945-951.
- Wang R, Seror SJ, Blight M, Pratt JM, Broome-Smith JK, Holland IB (1991). Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. J Mol Biol 217: 441-454.
- Wehmeier UF (1995). New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors allowing blue-white screening on X-Gal plates. Gene, 165: 149-150.
- Wilkinson DL, Harrison RG (1991). Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Bio/Technology 9: 443-448.
- Wray LV, Atkinson MR and Fisher SH (1991). Identification and cloning of the *glnR* locus, which is required for transcription of the *glnA* gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol. 173, 22: 7351-7360.
- Wright F and Bibb MJ (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. Gene, 113: 55-65
- Yamamoto M, Jia DM, Fukumitsu KI, Imoto I, Kihara Y, Hirohata Y, Otsuki M (1999). Metabolic abnormalities in the genetically obese and diabetic Otsuka Long-Evans

- Tokushima Fatty rat can be prevented and reversed by  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Metabolism*, 48 (3): 347-354.
- Yamauchi N und Kakinuma K (1993). Biochemical studies on 2-Deoxy-*Scyllo*-Inosose, an early intermediate in the biosynthesis of 2-Deoxystreptamine: IV A clue to the similarity of 2-Deoxy-*scyllo*-Inosose Synthase to Dehydroquinase Synthase. *J. antibiotics*: 1916-1918.
- Yamauchi N und Kakinuma K (1995). Enzymatic Carbocycle formation in microbial secondary Metabolism. The mechanism of the 2-Deoxy-*scyllo*-inosose Synthase reaction as a crucial step in the 2-Deoxystreptamine biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. org. Chem.* 60: 5614-5619.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Yokose K, Ogawa K, Sano T, Watanobe , Maruyama HB, Suhara Y (1983). New  $\alpha$ -amylase inhibitor, trestatines. II. Structure determination of Trestatines A, B und C. *J. Antibiot.* 36: 116-1175.
- Yonaha K, Suzuki K und Toyama S (1985). 4-Aminobutyrate: 2-oxoglutarate aminotransferase of *Streptomyces griseus*: Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 146: 101-106.
- Zaboura M und Halpern YS (1977). Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid degradation in *Escherichia coli* by nitrogen metabolism enzymes. *J. Bacteriol.* 133: 447-451.

|   |      |
|---|------|
| CACGACCGGGGAGCTTACGGCGATAGGTTCCGGGGTTTCGGCCGTTGCGCACACGCCGTGCCTGA   | 65   |
| TCACCCGGTTACGTAACACGGCGGAAACAATAGGGACACGCCGGGGCAACTCCGGACCCATAACG   | 130  |
| -35   |      |
| TCGCGACCAGCCTTGCCAGGTGGCGGGCGTATGCCGCCCCGGTGTTCGGAAAACGTGCCAGGAGGAC | 195  |
| -10   |      |
| RBS   |      |
| <b>Start</b>  |      |
| GTGTGTTTCGCCAATCCCGAGGAACTCCTGCGATACCTCAAAGACGAGGACGTCAAGTTCGTTCGAC | 260  |
| V F A N P E E L L R Y L K D E D V K F V D                           |      |
| GTACGTTTCTGTGACCTCCCCGGCGTGATGCAGCACTTCAACATCCCGGTGGAGTCGTTCGACGA   | 325  |
| V R F C D L P G V M Q H F N I P V E S F D D                         |      |
| CAGTGTGGCAACCGACGGTCTCGCCTTCGACGGGTCTCGATCCGCGGTTTCCAGGCCATCCACG    | 390  |
| S V A T D G L A F D G S S I R G F Q A I H E                         |      |
| BamHI   |      |
| AGTCCGACATGATGCTGCTGCCGGACGTGCGCCACCGCGTTCGTCGACCGGTTCCGGATCCAGAAG  | 455  |
| S D M M L L P D V A T A F V D R F R I Q K                           |      |
| ACGCTGGCCCTGAACTTCTTCATCCACGACCCGTTACCCGCGAGGCCTACTCGCGTGACCCGCG    | 520  |
| T L A L N F F I H D P F T R E A Y S R D P R                         |      |
| GAACGTGGCCAAGAAGGCCGAGGCGTACCTCGCGTCGAGCGGCATCGCCGACACCGCCTACTTCG   | 585  |
| N V A K K A E A Y L A S S G I A D T A Y F G                         |      |
| GCGCCGAGGCCGAGTTCTACATCTTCGACTCGATCCGCCACGAGACCTCCGCGCACCAGGCGTTC   | 650  |
| A E A E F Y I F D S I R H E T S A H Q A F                           |      |
| TACTACATCGACTCGATCGAGGGCGCGTGGAACCTCCGGCCGTGAGGAGGAGGGCGGCAACCGCGG  | 715  |
| Y Y I D S I E G A W N S G R E E E G G N R G                         |      |
| TTACAAGACCGCGTTCAAGGGCGGCTACTTCCCGGTCTCCCCGGTTCGACCACTACGCCGACCTGC  | 780  |
| Y K T A F K G G Y F P V S P V D H Y A D L R                         |      |
| GCGACGCGATGGTCCGCCGCTGGTCGACACCGGCTTACCGTGGAGCGCTCGCACCACGAGGTC     | 845  |
| D A M V R R L V D T G F T V E R S H H E V                           |      |
| GGCACCGCCGGCCAGGGCGAGATCAACTACAAGTTTTCCACGCTGCTGCACGCCGGCGACCAGAT   | 910  |
| G T A G Q G E I N Y K F S T L L H A G D Q M                         |      |
| GCAGCTGTTCAAGTACATCATCAAGAACACCGCCTGGGAGCACGGCAAGACGGCGACCTTCATGC   | 975  |
| Q L F K Y I I K N T A W E H G K T A T F M P                         |      |
| SphI  |      |
| CGAAGCCGCTGTTTCGGCGACAACGGCTCCGGCATGCACACCCACCAAAACCTGTGGCTGGGCGGC  | 1040 |
| K P L F G D N G S G M H T H Q N L W L G G                           |      |
| GAGCCGCTGTTCTACGACAAGACCGGTTACGCCGGGCTGTCCGACATGGGCCGCTGGTACATCGG   | 1105 |
| E P L F Y D K T G Y A G L S D M G R W Y I G                         |      |
| CGGGCTGCTGCACCACGCGCCGTCGCTGCTGGGCTTACAAAACCCGACGGTCAACTCTTACGCCG   | 1170 |
| G L L H H A P S L L G F T N P T V N S Y A A                         |      |
| CTGTTCCCGGCTACAAGGCCCGGTTCAACCTGGTTCTATCGCAGCGCAACCGTTCCGCGTGCACC   | 1235 |
| V P G Y K A P V N L V L S Q R N R S A C T                           |      |

|  |      |
|--|------|
| GGCATCCCGGTCACCGGCAGCAACCCGAAGGCCAAGCGCGTCGAGTTCCGCGTCCCGGACCCGTC<br>G I P V T G S N P K A K R V E F R V P D P S               | 1300 |
| GTCCAACCCGTACCTGGCGTTCTCCGCCCAGATGATGGCCGGCCTCGACGGCATCAAGAACAAGA<br>S N P Y L A F S A Q M M A G L D G I K N K I               | 1365 |
| TCGAGCCCCCGGCCCGATCGACAAGGACCTCTACGACCTCCCGCCGGAGGAGTGGGGCAGCGTC<br>E P P A P I D K D L Y D L P P E E W G S V                  | 1430 |
| AAGCAGGTCCCGGCTCCCTCGACGCCGTCTCAACTCCCTCGAGGCCGACCACGAGTTCCTCAC<br>K Q V P G S L D A V L N S L E A D H E F L T                 | 1495 |
| CGCCGGCGGCGTCTTCACCGACGACCTCATCTCCACCTGGATCGACTACAAGCGCACCAACGAAA<br>A G G V F T D D L I S T W I D Y K R T N E I               | 1560 |
| TCGACCCGGTCCGGCTCCGCCCGACCCCGCACGAGTTCGAGATGTACTACAACGTC <b>TGACGCTTG</b><br>D P V R L R P T P H E F E M Y Y N V <b>* Stop</b> | 1625 |
| CTGAAGTGGCCACTCCCGGTCCGGGGGTGGCCGCTTCTCTCTGTCCGGTGGCGACCGCCATCCTT  | 1690 |
| <i>Bam</i> HI  |      |
| GTTGGCGGTGGCGGCCGGTATCTCTCTTCCCGGTGGACGGCCCATCCAGGATCC   | 1746 |

**Anhang 1: *glnA* DNA-Sequenz.** Die DNA-Sequenz umfaßt die offene Leserahm *glnA*. Unter der DNA-Sequenz ist die abgeleitete Aminosäuresequenz des *glnA*-Gens dargestellt. Vor dem *glnA*-Translatiosstartpunkt wurde eine mögliche RBS (Ribosomenbindestelle) fett markiert. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind über der unterstrichenen DNA-Sequenz angegeben.



CCACGGGTCAAGCCGCACCTACACCAACTAGTCCAGGGCCTGGCGGACGAACTCCTGGTCCAGGT 1300  
 T G L E A H I H N I L D R V A Q K L V L D

CCGGCTACCACCCAAGCAGCTCCTTCTGGTGCCGGCCCAGCACGTTCGTCGCTCCGCCGCTAGAGC 1365  
 L G I T P E D L F V V A P D H L L S A A I E

CGGGCGTACGCGACCGGGTCCGAGTCGACCCGCTGGCCCCACAACGGCTCCCGGGCTCCAGGTC 1430  
 A R M R Q G L S L Q R V P T N G L A G L D L

GGCCAGGGCCTTGTCCGCGTACAAGGCCAGCATGTGGCGGACGCCGTGGAGCATCTGCACGGCGT 1495  
 R D R F L R M N R D Y V A Q P V E Y V H R

CCTACGCCTTGTCTCAGCTCCTGGCCGTCTAGGGTGGTCTCGACCGACGCGACCGGCTTCTGGTGC 1560  
 L I R F S D L V P L D W W L Q S R Q G F V V

GGCTAGGCCGGCCGCTGGGGCCACGCGACGGCCACGCCAGCTCCGGCAGCTGGGCCTGGGCGGG 1625  
 G I R G A V R T R Q R H P D L G D V R V R G

CCACCAGCCCGCGTACTACGGCCAGTCCCTCAAACCTAGCACCACCTGAACGGGCGCGCAAGCGGG 1690  
 T T P R M I G T L L K I T T S K G A G N A

GCTACATCCGCTAGAACTGTGGCCTGCCCTGGAGCTTCGACTACAGCAGCTGCCGGCCCTGGTGC 1755  
 G I Y A I K V G S P V E F S I D D V A R V V

AGCATGGCCCGGCTCCTTGTACCAAGCGTCCGACGGGGCGTCTGGGCCGAGCGCGCCATCGCGAA 1820  
 D Y R A S F M T R L S G R L G P E R R Y R K

CTTACGAACGACTCCACGAGCCGCTCCTAG**GTAC**CGGCCAGCACGGCAGGCCGGCCCGTACGGCCC 1885  
 GCCGGTTCGTGCCGTCCGGCCGGGCATGCCGGG  
 F H K S L H E A L I **M**  
 **Start AcbW**

*Bam*HI

GCATGGGCCCGTACCGCTCAGCTCTACTAAGTGCCTAGGAGCAAAGAAAAGCCTTCTACAGCAC 1950  
 CGTACCCGGGCATGGCGAGTCGAGATGATTCACGGATCCTCGTTTTCTTTTCCGGAAGATGTCGTG

CGCCGTTGTAAACTTTAACTACTAATGGTAGTTAATTGGCTCAAAGGTGTTACAGCGCGGCCAG 2015  
 GCGGCAACATTTTGAATTTGATGATTACCATCAATTAACCGAGTTTCCACAATGTCGCGCCGGTC

AGCCGCTGGCCGATATACCTTCGTTAGGCTTGTTCAGCCGGCCTCCTACAACAGCTGCCACACTGT 2080  
 TCGGCGACCGGCTATATGGAAGCAATCCGAACAGTCGGCCGGAGGATGTTGTCGACGGTGTGACA

TAGGCGCCCGCCGGCCGCGGCGGACGCGGCCCTCACGCCGGCCGGTAGGAGCAACAGGCTCCACG 2145  
 ATCCGCGGGCGGCGGCGCGCTGCGCCGGAGTGC GGCCGGCCATCCTCGTTGTCCGAGGTGC

ACTCCCGTGC CGGCTAGCGAGCCATCCCCCTCCCGCCAGTAGGCGACACGCCACGCCCTAGTGC 2210  
 TGAGGGGCACGGCCGATCGCTCGGTAGGGGGAGGGCGGTCATCCGCTGTGCGGTGCGGGATCAGC

GTTCACTCGTAACTTACGCTAACGCCCGCTGAGCAGTTCGGCGGCACGGGCCAGGAGCTTTACA 2275  
 CAAGTGAGCATTGAATGCGATTGCGGCGGCACTCGTCAAGCCGCCGTGCCCGGTCTTCGAAATGT

CTGGCGCTTTGGAAAGGGCAGGCTATACCTCACTGGCCGAGTATTAACAACAAAGCCCCGTTGT 2340  
 GACCGCGAAACCTTTCCCGTCCGATATGGAGTGACCGGCGTCATAATTTGTTGTTTCGGGCAACA

TTGGGTAGCGGCTAGGAGCTATATAATGGTCGGCCGAAAAGGCTGTAAGCCGGTCTACTTACGCC 2405  
 AACCCATCGCCGATCCTCGATATATTACCAGCCGGCTTTTCCGACATTCGGCCAGATGAATGCGG

AATGTCTGCCCTGGCCGCCACCCCGGCTACACCCGCCCAACGCCCTCCCCGCCGGCC**ACTTG** 2470  
 TTACAGACGGGACCGGCGGGTGGGGCCGGATGGTGGGCGGGGTTCGGGAGGGGCGGCCGGTGAAC



CCGGCTGATCGAGCAGGTCCGGGACCTCGGGCGGGTGTCTGGCCGACCGCCTGGCCGAGATGCACG 3770  
 R L I E Q V R D L G A V L A D R L A E M H D

ACCGGCACCCGCACCTGGGGCGACGTGCGCGGCATCGGCCTGCTGCACGGGCTCGAGTTCGTGCAC 3835  
 R H P H L G D V R G I G L L H G L E F V H

GACCGGCAGAGCCGGCGGGCCGGCCCCGGAGATCGCCCGGGGGTCTACACCACCGCCCTCGACGC 3900  
 D R Q S R R P A P E I A R R V Y T T A L D A

CGGTCTGCGCACCGCCATCGGGGGGCACATCATCCGGCTCGCGCCGCGTTCGTTCATCGACGAGA 3965  
 G L R T A I G G H I I R L A P P F V I D E T

CCGAGCTGCTGCGCGGCCTGGACCTGCTGGACCGGGCGATTACCGAGGCCGGGCGGGTGACGGCA 4030  
 E L L R G L D L L D R A I T E A G R V T A

M

Start AcbU →

TGACACCCCGGCCGGTTCAGCACGATCGACGTGAGCCTCGCCAGCCTGCTGCGCACCGCCGACTGG 4095  
 \* Stop AcbV  
 T P R P V S T I D V S L A S L L R T A D W

*Bam*HI

CCGCACGAGGATCTGCGCGGTCCCGGGCGGGGTGCGGATCCTCGACGAGGCGATCCTCGGCCCGTC 4160  
 P H E D L R G P G G V R I L D E A I L G P S

CCGGTTGCTGATCGTCGCGGCCGAACGGAACCCCGAGAGCCGCTACTTCGTTCGCGGTTCTGCGCC 4225  
 R L L I V A A E R N P E S R Y F V A V L R H

ACGATCCGTCCCGGGAGGCCGTGCGCGACGCCGCCACGACCGGGCCGTGGTCCAGGCGATGCGC 4290  
 D P S R E A V G D A A H D R A V V Q A M R

GAGCGGCTGGCACTACCCACCGCAGCCGGCCATCTGATCGTCTTCGACGGTGACCCCGCGCCGTT 4355  
 E R L A L P T A A G H L I V F D G D P A P F

CCGAGCCACCCGGCCGTTTCGACCCCGGGTGGTTCGACCAACGCCCTGTCGCTGGCCGATCTGGACG 4420  
 R A T R P F D P G W S T N A L S L A D L D G

GGAACTGCACATCCACAAGGCGTACCGGCTGGTGTTCGGCCGCCACCCGGGAACCGCATCTGCTG 4485  
 T L H I H K A Y R L V S A A T R E P H L L

CGGCTGATGCATCGCGCGGCCGTACCCAGCGATGGGCCGGCGACTACCACTACGTGGAGCAGCC 4550  
 R L M H R G G R T Q R W A G D Y H Y V E Q P

CTCCGGGCGCCGCTACCCGCTGGGCCTGCTCTACGCCTATGCCGAAGGGACAGCCTCGACCTGCC 4615  
 S G R R Y P L G L L Y A Y A E G T A S T C R

GCTGCGCACAGCATCCGGTTCGATGTGGCCGGCGCTGCTGGGCGGCACCGAACCAGCCGGCGCGGT 4680  
 C A Q H P V D V A G A A G R H R T G R R G

GACGGCCGCGCAGCGTCCATCGCGGGCGAGCTGCCCGGCGTTCGGCCGGTTCCCTCCGCGACTTCCA 4745  
 D G R A A S I A G E L P G V G R F L R D F H

TACCGAACTGGCGCAGCGGCTGGAACCCCGCGCCGACGTTCCCGGTGAACGCCTACCTGCGGGAGA 4810  
 T E L A Q R L E P A P T F P V N A Y L R E T

CCGCCGAGCGGGTGGCGGGCGCTGGGGTGCCGGATCAGCGCCGACGAACGTTACCCCGGCCGGTG 4875  
 A E R V A A L G C R I S A D E R Y P R P V

CGCGAGGCGGTCGTCGCCGCCCTGACCGGCGAACTGGACCAGGCCACCACCAGCGCGGTGCGGGT 4940  
R E A V V A A L T G E L D Q A T T S A V R V

GCCGTGGCCGGCCGGCCCGTCGCACGGCGACCTGCACCTGTCGCACATCCTGCGCCGGCAGACAC 5005  
P W P A G P S H G D L H L S H I L R R Q T P

CGGACGGCTGGCGGCTGTGTGTGATCGACCTGTCCACGCCCGCCCCGACCCGGCCGACCCGCTC 5070  
D G W R L C V I D L S T P A P D P A D P L

*Bgl*III

GGCGCCGCCAGTCACCGTGGCAGGACCTGGTGGCGCTGCTGCGCGGGCTGGAGATCT 5128  
G A A Q S P W Q D L V A L L R G L E I

**Anhang 2: DNA-Sequenz des 5,2 kb *KpnI/BglIII* DNA-Fragmentes.** Die DNA-Sequenz umfaßt die offenen Leserahmen *acbU*, *acbV*, *acbW* und *acbX*. Unter der DNA-Sequenz ist die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der entsprechenden Gene dargestellt. Vor dem *acbV*-Translatiosstartpunkt (197 bp) wurde ein mögliches regulatorisches Hexanukleotidmotive fett markiert. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind über der unterstrichenen DNA-Sequenz angegeben.