

Genombasierte Modellbildung zur Biosynthese  
von Acarviostatin-Metaboliten in drei  
*Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämmen

DISSERTATION

**Zur Erlangung des akademischen Grades**  
**Doktor der Naturwissenschaft**  
*(Dr. rer. nat.)*

der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von:  
Vera Ortseifen  
geboren in Dernbach

*Bielefeld, Juni 2016*

Erster Gutachter:

**Prof. Dr. Alfred Pühler**

Centrum für Biotechnologie (CeBiTec)

AG Genomforschung industrieller Mikroorganismen

Universität Bielefeld

---

## Zusammenfassung

---

Das Sekundärmetabolit Acarbose wird weltweit in der klinischen Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten eingesetzt. Acarbose ist ein  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor und hilft Patienten, ihren Blutzucker besser zu kontrollieren. Das Medikament ist seit 1990 kommerziell erhältlich und zählt zu den meistverkauften Antidiabetika. Das Sekundärmetabolit wird von Stämmen der Klasse *Actinobacteria* produziert, insbesondere von *Actinoplanes* sp. SE50/110 sowie vom Wildtyp abgeleiteten Stämmen.

In einem ersten Teil wurde die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten im Acarboseproduzenten 1 (AP1) in Abhängigkeit zur C-Quelle analysiert. Dazu konnte eine Detektionsmethode entwickelt werden, um anschließend die Synthese von Acarviostatin-Metaboliten in AP1 bei Anzucht auf Minimalmedium mit unterschiedlichen Zuckern, respektive Maltose, Glucose, Galactose sowie Zuckermischungen, zu charakterisieren. Es wurde gezeigt, dass die Bildung von Acarbose und deren Homologen in Interdependenz zur Kohlenstoffquelle erfolgt. Außerdem werden immer mehrere Acarviostatin-Metabolite in unterschiedlichen Konzentrationen von der Zelle gebildet. Basierend auf den Messungen wurde ein Modell zur Bildung von Haupt- und Nebenkomponten der Acarviostatin-Metabolite in AP1 entwickelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Acarviostatin-Metabolit-Biosynthese in drei Acarboseproduzenten bei Anzucht auf Maltose- (Mal-MM) - sowie Maltotriose-Minimalmedium (MT-MM) betrachtet, sprich in Interdependenz zum Genotyp. Durch Vergleich der Genomsequenzen von AP1, AP2 und AP3 wurden Punktmutationen im Acarbosebiosynthesecluster identifiziert. Das Gen der Acarviostyltransferase *AcbD* ist von zwei Basentransitionen betroffen, wobei eine in der Kodierung eines Stopcodons resultiert. Die identifizierten Mutationen in *acbD* konnten auf Proteom-Ebene bestätigt werden. Aufgrund der zuvor etablierten Detektionsmethode konnte das Acarviostatin-Metabolit-Spektrum in AP1, AP2 und AP3 bei Anzucht auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium charakterisiert werden. Diskrepanzen zur vorher postulierten C-Quellen-assoziierten Produktion der Acarviostatin-Metabolite zeigten sich für den Stamm AP3. Einerseits wurden unter Wachstum der Kultur auf Mal-MM (B) sowohl Acarviostyl-Maltose (Acarbose) als auch Acarviostyl-Maltotriose als Hauptkomponenten gebildet und andererseits zeigte sich bei Wuchs auf MT-MM (B) Acarviostyl-Maltose als einzige Hauptkomponente. Die in Teil 1 entwickelte Modellvorstellung wurde anschließend für die in der

---

Arbeit betrachteten Stämme AP2 und AP3 erweitert. Dem Modell liegen dabei drei Grundannahmen zu Grunde:

- I) die extrazelluläre Acarviosyltransferaseaktivität fehlt im Acarboseproduzenten 3,
- II) innerhalb der Zelle erfolgt der Aufbau von Maltotriose aus Maltose durch eine Maltodextrin-Glucosidase und
- III) Maltotriose kann im Acarboseproduzenten 2 und 3 nicht mehr aufgenommen werden.

Für die im Modell beschriebenen Stoffwechselwege konnten in den Genomsequenzen der drei Acarboseproduzenten Gene identifiziert werden, die für die gesuchten Synthese- und Transportprozesse kodieren können. Die vorliegende Dissertation analysiert damit erstmalig die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in Abhängigkeit von der C-Quelle im Kulturmedium sowie vom Genotyp des produzierenden *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stammes.

---

# Inhaltsverzeichnis

---

1	Einleitung	1
1.1	Die taxonomische Einordnung von <i>Actinoplanes</i> und des Acarboseproduzenten <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	1
1.1.1	Taxonomische Einordnung der Gattung <i>Actinoplanes</i>	1
1.1.2	Der Acarboseproduzent <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	3
1.2	Der $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitor Acarbose von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	4
1.2.1	Klinische und wirtschaftliche Bedeutung von Acarbose	4
1.2.2	Die molekulare Struktur der Acarbose und ihrer Homologe	5
1.3	Die Biosynthese von Acarbose	7
1.3.1	Aufbau des Acarbosebiosynthesegenclusters in <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	7
1.3.2	Acarbosebiosynthese in <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	9
1.3.3	Die Funktion der Acarbose für <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	11
1.4	Charakterisierung des Acarboseproduzenten <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 mittels <i>omics</i> -Technologien	15
1.4.1	Die Genomsequenz von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110-Stämmen	15
1.4.2	Transkriptomanalyse im <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Wildtyp-Stamm	17
1.4.3	Das cytosolische, extrazelluläre und Membranproteom im Acarboseproduzenten <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	17
1.5	Ziele der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Herkunft und Anzucht von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen	21
2.1.1	Herkunft der drei <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämme AP1, AP2 und AP3	21
2.1.2	Kultivierung und Analyse der Acarbosebiosynthese von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen	21
2.2	Auswertung der Genomsequenzen von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen mittels Bioinformatik	23
2.3	Messung von Acarbose und weiteren Acarviostatin-Metabolite im Überstand von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen	24

2.3.1	Messung der Acarboseproduktion im Überstand von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen mittels Flüssigkeitschromatographie . . .	24
2.3.2	Messung der Acarviostatin-Metabolite im Überstand von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelter Massenspektrometrie . . . . .	25
2.4	Analyse des cytosolischen und extrazellulären Proteoms von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämme mittels Gel-basierter Proteomik . . . . .	27
2.4.1	Isolierung extrazellulärer sowie cytosolischer Proteine von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen . . . . .	27
2.4.2	Separation und Identifizierung der Proteine aus <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen mit vertikalen Gelen . . . . .	28
2.4.3	Separation und Identifizierung der Proteine aus <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen mit horizontalen Gelen . . . . .	28
3	Ergebnisse und Diskussion	31
3.1	Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten im Acarboseproduzenten 1 (Teil 1) . . . . .	32
3.1.1	Wuchsverhalten von AP1 nach Anzucht in Minimalmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen . . . . .	32
3.1.2	Bestimmung der extrazellulären Acarviostatin-Metabolite im Kulturüberstand vom AP1 nach Anzucht in Minimalmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen . . . . .	36
3.1.3	Modellvorstellung über die Bildung von Haupt- sowie Nebenkompenten der Acarviostatin-Metabolite durch AP1 . . . . .	41
3.2	Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in drei <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen (Teil 2) . . . . .	48
3.2.1	Die Genomsequenzen der drei <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämme AP1, AP2 und AP3 . . . . .	48
3.2.2	Wuchsverhalten und Acarboseproduktion von drei <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen bei Anzucht in Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium . . . . .	67
3.2.3	Vergleichende Proteomforschung an den drei <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen . . . . .	76
3.2.4	Die Bestimmung der Acarviostatin-Metabolite im Kulturüberstand von drei <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen nach Anzucht in Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium . . . . .	94

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.5	Modellvorschlag zur Bildung von Hauptkomponenten der Acarviostatin-Metabolite in drei Acarboseproduzenten . . . . .	102
4	Ausblick	116
5	Literaturverzeichnis	117
	Abbildungsverzeichnis	136
	Tabellenverzeichnis	138
	Anhang	I

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>%(v/v)</b>	Volumenprozent
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µL</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>Ac</b>	Acarviosyl-Einheit
<b>acb-Proteine</b>	Acarbosebiosyntheseegenclusterprodukte/-proteine
<b>Anz.</b>	Anzahl
<b>AP1</b>	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Acarboseproduzent 1
<b>AP2</b>	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Acarboseproduzent 2
<b>AP3</b>	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Acarboseproduzent 3
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>Bdg.</b>	Bedingung
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>blast</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BTM</b>	Biotrockenmasse
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>CBS</b>	Centraalbureau voor Schimmelcultures



<b>CeBiTec</b>	Centrum für Biotechnologie
<b>CHAPS</b>	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	bidestilliertes Wasser
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b>ESI</b>	Elektrospray-Ionisierung
<b>g</b>	Gramm
<b>ges.</b>	gesamt
<b>GC-MS</b>	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
<b>Gal-MM (A)</b>	Minimalmedium A mit Galactose
<b>Glc-MM (A)</b>	Minimalmedium A mit Glucose
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>IAA</b>	Jodacetamid
<b>IEF</b>	Isoelektrische Fokussierung
<b>IPG</b>	Immobilisierter pH Gradient
<b>insg.</b>	insgesamt
<b>Intens.</b>	Intensität
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KEGG</b>	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
<b>L</b>	Liter
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Milliampere
<b>MALDI</b>	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )

<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>Milli-Q</b>	Reinstwasser vom Typ I
<b>mL</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>Mal-MM (A)</b>	Minimalmedium A mit Maltose
<b>Mal-MM (B)</b>	Minimalmedium B mit Maltose
<b>Mal:Gal-MM (A)</b>	Minimalmedium A mit Maltose/Galactose
<b>Mal:Glc-MM (A)</b>	Minimalmedium A mit Maltose/Glucose
<b>MT-MM (B)</b>	Minimalmedium B mit Maltotriose
<b>MS</b>	Massenspektrometer
<b>MOWSE</b>	<i>MOlecular Weight SEarch</i>
<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>m/z</b>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nm</b>	Nanometer
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>NRPS</b>	Nicht-ribosomale Peptidsynthase
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>p.A.</b>	<i>per analysis</i>
<b>pI</b>	isoelektrischer Punkt
<b>PKS</b>	Polyketidsynthase
<b>PMF</b>	Peptidmassenfingerprint ( <i>peptide mass fingerprint</i> )
<b>Pos.</b>	Position

<b>PTS</b>	Phosphotransferase-System
<b>Ref.</b>	Referenz
<b>RPKM</b>	<i>reads per kilobase of coding sequence per million mapped reads</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNASeq</b>	RNA Sequenzierung
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunden
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SNPs</b>	Punktmutationen ( <i>single nucleotide polymorphisms</i> )
<b>Sym</b>	Symbol
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>ToF</b>	Flugzeit ( <i>Time of Flight</i> )
<b>tRNA</b>	Transfer-RNA
<b>TRIS</b>	2-Amino-2-hydroxyl-methylpropan-1,3-diol
<b>TLS</b>	Translationsstartstelle
<b>TSS</b>	Transkriptionsstartstelle
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute / Drehzahl
<b>V</b>	Volt
<b>VE-Wasser</b>	deionisiertes Wasser
<b>vers.</b>	verschiedene
<b>Vh</b>	Voltstunden
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>Zeitpkt.</b>	Zeitpunkt



# KAPITEL 1

---

## Einleitung

---

### 1.1 Die taxonomische Einordnung von *Actinoplanes* und des Acarboseproduzenten *Actinoplanes* sp. SE50/110

#### 1.1.1 Taxonomische Einordnung der Gattung *Actinoplanes*

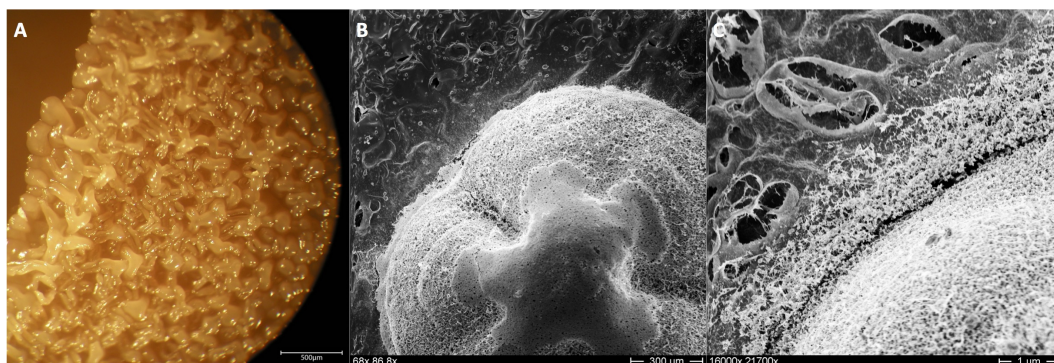
Die Gattung *Actinoplanes* wurde erstmals 1950 von John Nathaniel Couch beschrieben. Der Begriff *Actinoplanes* kommt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Wörtern Strahlen (*aktis aktinos*) und Wanderer/Vagabund (*planes*) zusammen. Die Gattung *Actinoplanes* wird taxonomisch in das Phylum der *Actinobacteria* eingeordnet, welches aufgrund zahlreicher 16S und 23S rRNA Analysen gut beschrieben ist (LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Weiterhin ist die Gattung taxonomisch zur Ordnung *Micromonosporales* und der Familie der *Micromonosporaceae* zugehörig (ZHI, LI und STACKEBRANDT, 2009; STACKEBRANDT, RAINEY und WARD-RAINEY, 1997; LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Die ersten beschriebenen Spezies der Gattung sind *Actinoplanes philippinensis* (Typ Species), *Actinoplanes utahensis* sowie *Actinoplanes missouriensis* (COUCH, 1963; LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Die Mitglieder der Gattung werden in die Gruppe der Gram-positiven Bakterien eingeordnet (LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Die Bakterien besitzen einen Spezies-spezifischen hohen GC-Gehalt von 69-73 % auf (FARINA und BRADLEY, 1970; PARENTI und CORONELLI, 1979; LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Sie wachsen unter aeroben Bedingungen, chemo-organotroph und als mesophile Mikroorganismen in einem Temperaturbereich von 10 bis 35 °C mit einem Optimum zwischen 23 bis 28 °C (WAKSMAN und HENRICI, 1943; LEE, 2002; LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Aufgrund des guten Wachstums in einem pH-Bereich von 6-8 werden *Actinoplanes*-Spezies als neutrophil charakterisiert (LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Manche Vertreter zeigen auch psychrophile oder thermo-tolerante Eigenschaften.

Die meisten Spezies dieser Gattung haben eine orangene Färbung und formen dichte Kolonien mit regelmäßigen, definierten Strukturen in Festkultur (siehe Abbildung 1.1 , PARENTI und CORONELLI (1979)). Auf Grundlage spektrophotometrischer Messungen

wurde das orangene Pigment mit Karotinoiden assoziiert (SZANISZLO und GOODER, 1967). In Flüssigkultur formen *Actinoplanes*-Stämme ein vegetatives Myzel, welches in manchen Spezies keine Farbe aufweist (COUCH, 1963). Die filamentösen Hyphen haben eine Dicke von ca. 0,2-1,0  $\mu\text{m}$  (PARENTI und CORONELLI, 1979). Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist das häufig auf Vertikalebene erhöhte, verschlungene Wachstum mit einer zentralen höckerartigen Vorwölbung (Protuberanz). Bis auf wenige Ausnahmen bilden die Mitglieder dieser Gattung kein Luftmycel aus (COUCH, 1963; LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Charakteristisch ist außerdem die Reproduktion durch Sporen, welche in den Sporangien gebildet werden (COUCH, 1963; PARENTI und CORONELLI, 1979). Sporangien kommen angeheftet auf Substratoberflächen, an Agar oder auch losgelöst in kurzen Sporangiphoren vor. Zahlreiche Sporen werden innerhalb dieser Sporangien gebildet und sind in der Lage sich nach Entlassung durch polare oder laterale Flagellen aktiv fortzubewegen (COUCH, 1963; PARENTI und CORONELLI, 1979; LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Ein weiteres Merkmal aller Isolate ist die Zusammensetzung des Peptidoglykans der Zellwand, welche im Wesentlichen aus Glycin, meso-2,6-Diaminopimelinsäure und/oder Hydroxy-Diaminopimelinsäure besteht (LECHEVALIER, LECHEVALIER und GERBER, 1971; SZANISZLO und GOODER, 1967; LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012).

*Actinoplanes*-Stämme wurden weltweit aus unterschiedlichen Milieus isoliert (COUCH, 1963; PARENTI und CORONELLI, 1979; CROSS, 1981; MAKKAR und CROSS, 1982). Mitglieder dieser Gattung treten in allen Arten von Böden auf, zum Beispiel in denen von trockenen Wüstengebieten, in Sanddünen nahe Meeresküsten oder von tropischen und subtropischen Regionen (GARRITY, HEIMBUCH und GAGLIARDI, 1996; MAKKAR und CROSS, 1982). Es konnte eine Korrelation zwischen der Abundanz von *Actinoplanes*-Stämmen zur Art des Bodens, dem pH-Wert sowie dem Angebot von organischen Substanzen festgestellt werden (NONOMURA, 1969). Generell enthalten 66 % aller Bodenproben Sporangien und 56 % Spezies dieser Gattung (COUCH, 1963; LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Weiterhin wurde das Vorkommen von *Actinoplanes*-Stämmen oder dessen Sporangien auf Pflanzen- oder Tierresten sowie marinen Habitaten beschrieben (COUCH, 1963; JENSEN, DWIGHT und FENICAL, 1991; MAKKAR und CROSS, 1982; CROSS, 1981). Trotz ihres ubiquitären Auftretens ist die Rolle von *Actinoplanes* in dem Ökosystem Boden bislang kaum bekannt (LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Nur vereinzelt konnten Phytohormone von *Actinoplanes* Spezies nachgewiesen werden, welche eine Rolle in der Interaktion mit Pflanzen spielen könnten (SOLANS *et al.*, 2011).

## 1.1 Die taxonomische Einordnung von *Actinoplanes* und des Acarboseproduzenten *Actinoplanes* sp. SE50/110



**Abbildung 1.1:** Mikroskopische Aufnahmen von *Actinoplanes* sp. SE50/110. Die Bilder zeigen eine Agarkultur von *Actinoplanes* sp. SE50/110 im Lichtmikroskop (A; Maßstab 500µm) und im Elektronenmikroskop mit unterschiedlicher Vergrößerung (B; Maßstab 300µm und C; Maßstab 1µm). Die Aufnahmen wurden zusammen mit Prof. Dr. K. Niehaus, Dr. H. Bednarz und Dr. S. Wendler angefertigt.

*Actinoplanes*-Stämme zeigen ein hohes Potential in der Produktion einer Vielzahl unterschiedlicher Sekundärmetabolite. Es sind mehr als 120 industriell relevante Substanzen beschrieben, zum Beispiel Antibiotika wie Lipiarmycin, Taitomycin, Purpuromycin oder Teichomycin (PARENTI und CORONELLI, 1979; JENSEN, DWIGHT und FENICAL, 1991; LUDWIG, EUZEBY und WHITMAN, 2012). Des Weiteren sind auch klinisch relevante Aminosäure-Derivate, wie Teichoplanin von *Actinoplanes teichomyceticus*, bekannt (LAZZARINI *et al.*, 2000). Diese Liste kann um das Pseudotetrasaccharid Acarbose erweitert werden, welches effektiv bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt wird (GERARD, LUYCKX und LEFEBVRE, 1981; CHIASSON *et al.*, 1994).

### 1.1.2 Der Acarboseproduzent *Actinoplanes* sp. SE50/110

Der Stamm *Actinoplanes* sp. SE50 wurde am 22. Dezember 1969 aus einer Bodenprobe einer Kaffeeplantage in der Nähe der Stadt Ruiru in Kenia (Afrika) isoliert (FROMMER *et al.*, 1975). Neben weiteren Isolaten wurde der Stamm von der Bayer AG auf inhibitorische Wirkung gegen Glucosidasen getestet und in dem US-Patent 3,876,766 beschrieben (FROMMER *et al.*, 1975). Ein relevanter inhibitorischer Effekt gegen intestinale Amylasen, Maltasen sowie Saccharasen konnte nachgewiesen werden (FROMMER *et al.*, 1975; SCHMIDT *et al.*, 1977). Der Stamm *Actinoplanes* sp. SE50/110 ist eine Spontanmutante von *Actinoplanes* sp. SE50 und weist eine besonders gute Acarboseproduktion von bis zu 1,0 g/L auf (FROMMER *et al.*, 1979). Die Typ-Stämme *Actinoplanes utahensis* IMSNU 20044<sup>T</sup> sowie IFO 13244<sup>T</sup> gelten als die nächsten Ver-

wandten (SCHWIENSTEK *et al.*, 2011). Eine Alternative zur Acarboseproduktion mit *Actinoplanes* sp. SE50/110 sowie nah verwandten Stämmen liegt in der Nutzung von Mitgliedern der Familie *Streptomycetaceae*, respektive *Streptomyces glaucescens* GLA.O und *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 (ROCKSER und WEHMEIER, 2009; ORTSEIFEN *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2012).

## 1.2 Der $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitor Acarbose von *Actinoplanes* sp. SE50/110

### 1.2.1 Klinische und wirtschaftliche Bedeutung von Acarbose

Der  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitor Acarbose wird weltweit zur klinischen Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2-Patienten eingesetzt und zählt zu den erfolgreichsten bakteriellen Sekundärmetaboliten (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Die Zahl der Diabetes mellitus Erkrankungen steigt weltweit rapide an. Nach der sechsten Ausgabe des IDF-Atlas sind um die 7,6 Millionen Patienten in Deutschland an Diabetes mellitus erkrankt (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014). Demzufolge sterben in Deutschland stündlich drei Menschen an Diabetes (DANNE, 2014). Damit reiht sich Deutschland in die zehn Ländern mit der höchsten Anzahl an Betroffenen ein (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014). Mit den neusten Zahlen ergibt sich eine Steigerung von etwa 40 % seit Beginn des Jahrtausends. Die Zunahme wird dabei vor allem auf den sich immer schneller ausbreitenden Typ 2 zurückgeführt, welcher den Schätzungen zufolge 95 % aller Diabetes-Fälle ausmacht (DANNE, 2015).

Die meisten Diabetes Fälle können in zwei Kategorien eingeteilt werden - Typ 1 (primär insulinabhängig) und Typ 2 (insulin-unabhängig). Typ 1 wird durch eine Autoimmunreaktion charakterisiert, die in den Langerhansschen Inseln auftritt (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010). Bei Diabetes mellitus Typ 2 sind die Ursachen vielfältig und führen zu einer unzureichenden Wirkung von Insulin (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010). Häufig wird die zuletzt genannte Form als Altersdiabetes bezeichnet, obwohl die Erkrankung auch mit Adipositas und mangelnder Bewegung assoziiert werden kann (DANNE, 2015). Therapiert wird bei rund 50 % der Typ 2-Diabetiker ohne Medikamente und lediglich durch Ernährungsumstellung oder Gewichtsabnahme. Bei der anderen Hälfte werden blutzuckersenkende Mittel und/oder Insulin verabreicht (DANNE, 2015). Acarbose setzt beim täglichen Umgang mit der Krankheit an. Das Pseudotetrasaccharid ist ein orales Antidiabetikum und hilft den Diabetes mellitus Typ 2-Patienten im Zusammenhang mit Stärke oder Sucrose-haltigen Diäten bei der Reduktion des Blutglu-



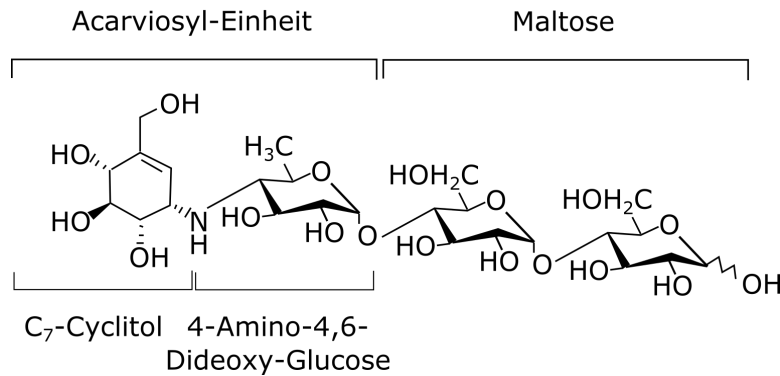
coselevels und führt demzufolge zu einer moderaten Insulinantwort (PULS und KEUP, 1973; BISCHOFF, 1994; MOORADIAN und THURMAN, 1999). Im Detail resultiert die kompetitive inhibitorische Aktivität der Acarbose gegenüber intestinalen Enzymen, wie zum Beispiel Glucosidasen, Maltasen, Dextrinasen sowie einigen  $\alpha$ -Amylasen, in einer verzögerten Verdauung von langkettigen Polysacchariden (SCHMIDT *et al.*, 1977; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Durch die zeitliche Verzögerung in der Resorption von verdauten Monosacchariden durch den Darm wird der postprandiale Anstieg der Blutzuckerwerte vermindert. Acarbose selbst hat eine verschwindend geringe Resorptionsquote und keine nachweisbare Toxizität beim Menschen (MIKHAILETS und POLYAK, 1989). In Langzeitstudien wurde die Verträglichkeit von Acarbose getestet (MERTES, 2001; LI *et al.*, 2011). Generell zeigte sich Acarbose selbst bei einer täglichen Einnahme als nicht belastend. Die Inzidenz von Acarbose-assoziierten Nebenwirkungen lag bei 4,7 % (MERTES, 2001). Der  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitor wird als Medikament seit 1986 mit Erstzulassung in der Schweiz unter unterschiedlichen Handelsnamen, z.B. *Glucobay*<sup>®</sup>, von der Bayer AG vertrieben. Das Therapeutikum zählt zu den umsatzstärksten Pharma-Produkten von der Bayer AG und wird mittlerweile in 110 Ländern eingesetzt (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; BAYER AG, 2015).

### 1.2.2 Die molekulare Struktur der Acarbose und ihrer Homologe

Das Sekundärmetabolit Acarbose besteht aus einer Acarviosyl-Einheit, welche über eine  $\alpha$ -1,4-Bindung mit Maltose verknüpft ist (siehe Abbildung 1.2). Die Acarviosyl-Grundstruktur setzt sich aus dem ungesättigten C<sub>7</sub>-Cyclitol und einer 4-Amino-4,6-dideoxy-Glucose zusammen und ist essentiell für die Hemmwirkung gegen  $\alpha$ -Glucosidasen (SCHMIDT *et al.*, 1977; TRUSCHEIT *et al.*, 1981). Die glykosidische Bindung innerhalb dieser grundlegenden Kernstruktur ist über ein Stickstoffatom realisiert und von zentraler Bedeutung, da diese nicht durch  $\alpha$ -Glucosidasen gespalten werden kann (HEIKER *et al.*, 1982).

*Actinoplanes* sp. SE50/110 produziert neben Acarbose noch eine Reihe weiterer Homologe (siehe Abbildung 1.3). Alle Homologe besitzen die Acarviosyl-Einheit als elementare Kernstruktur (PIEPERSBERG *et al.*, 2002) und werden wie Acarbose in die C<sub>7</sub>N-Aminocyclitol-Familie eingeordnet. Sie gelten als hitze- und pH-stabile Pseudooligosaccharide (TRUSCHEIT *et al.*, 1981; ARAKAWA *et al.*, 2003). Die Mitglieder dieser Familie unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrem inhibitorischen Potential gegenüber  $\alpha$ -Glucosidasen, welches auf Variationen in den angehängten Zuckern zurückgeführt werden kann (FROMMER *et al.*, 1979; HEMKER *et al.*, 2001; ROCKSER und WEHMEIER, 2009). Die Bildung

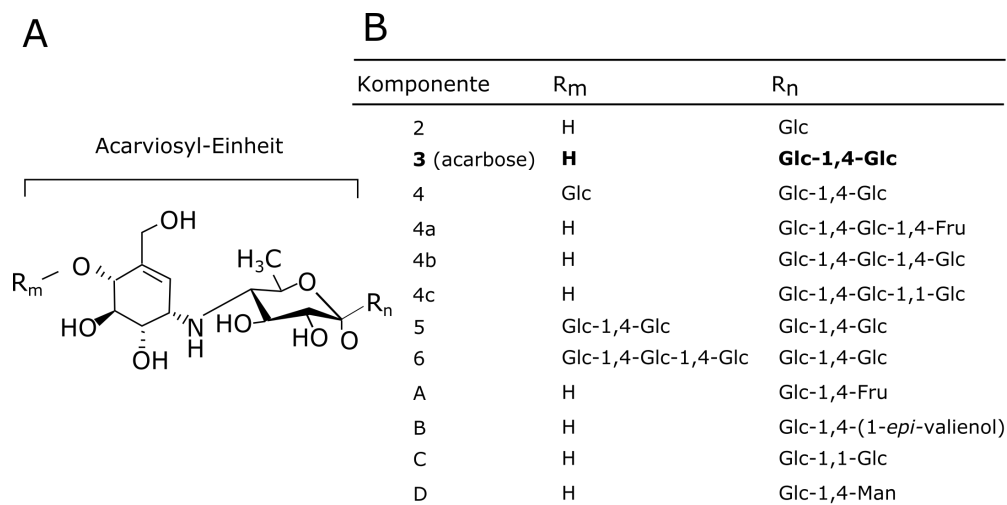
## Acarbose



**Abbildung 1.2: Struktur des Pseudotetrasaccharids Acarbose bestehend aus der Acarviosyl-Einheit sowie einer Maltose.** Die Acarviosyl-Einheit bildet die Kernstruktur aller Homologen und besteht wiederum aus einem C<sub>7</sub>-Cyclitol und 4-Amino-4,6-Dideoxy-Glucose.

dieser Homologe erfolgt in Abhängigkeit von der angebotenen C-Quelle. Zum Beispiel werden in Anwesenheit von Maltose und Glucose überwiegend kurze Homologe, wie die Komponente 2 oder Acarbose, gebildet, während Stärke zur Formation von längeren Komponenten führt (SCHMIDT *et al.*, 1977; FROMMER *et al.*, 1979). Interdependent mit der Länge verändert sich auch das inhibitorische Wirkspektrum. Während niedermolekulare Pseudooligosaccharide eher Maltasen und Disaccharidasen hemmen, sind längere Homologe bei  $\alpha$ -Amylasen effektiver (FROMMER *et al.*, 1979; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). In Studien von HEMKER *et al.* (2001) konnte gezeigt werden, dass ein Umbau zwischen den Homologen stattfinden kann.

Die Homologe besitzen weiterhin Variationen des Zuckerrestes, beispielsweise Fructose und Mannose anstelle von Glucose, oder von deren Verknüpfung (HEMKER *et al.*, 2001). Zum Beispiel unterscheidet sich die Komponente C ausschließlich in der glykosidischen Bindung des angehängten Disaccharids. Dieses Homolog wird vor allem am Ende der Fermentation gebildet und kann anteilmäßig bis zu 28 % der Acarbosekonzentration betragen (CHOI und SHIN, 2003). Die Separation der Komponente C von Acarbose stellt den Aufreinigungsprozess des Wirkstoffes vor erhebliche Probleme (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004).



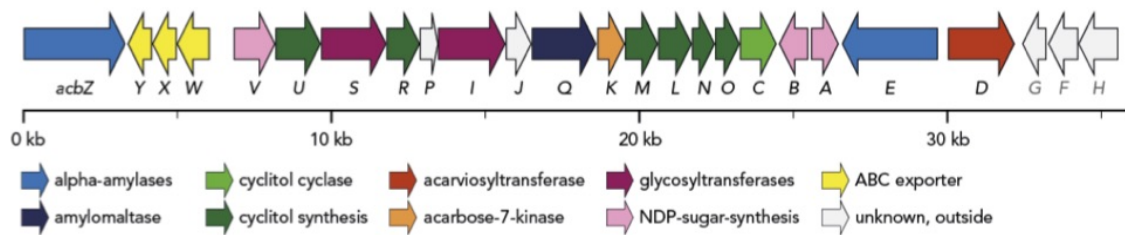
**Abbildung 1.3: Bezeichnung und Struktur der Acarbose sowie Acarbose-Homologe aus der Acarviostatin-Metabolit-Familie.** Die Abbildung (A) zeigt die Acarviosyl-Einheit als elementare Kernstruktur aller Mitglieder der Acarviostatin-Metabolit-Familie. In der Tabelle (B) werden bislang beschriebene Homologe aus WEHMEIER und PIEPERSBERG (2004) und TRUSCHEIT *et al.* (1981) dargestellt. Glc bezeichnet Glucose, Fru Fructose und Man Mannose. Modifizierte Abbildung aus WENDLER (2015).

## 1.3 Die Biosynthese von Acarbose

### 1.3.1 Aufbau des Acarbosebiosynthesegenclusters in *Actinoplanes* sp. SE50/110

Die Sequenzierung des **Acarbose-Biosynthese-Genclusters** (*acb*) war ein sukzessiver Prozess (STRATMANN, 1997; THOMAS, 2001). Zunächst wurde mittels DNA-Hybridisierungstechnik und unter Einsatz des dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gens *strE* aus *Streptomyces griseus* als heterologe Gensonde das Gen *acbB* identifiziert (STOCKMANN und PIEPERSBERG, 1992; STRATMANN, 1997). Im nächsten Schritt wurde darauf aufbauend die Sequenz rund um das Gen entschlüsselt und patentiert (STRATMANN *et al.*, 1999; CRUEGER *et al.*, 1998). In den Folgejahren gelang die Sequenzierung des kompletten 25 Gene umfassenden *acb*-Biosynthesecoluster (siehe Abbildung 1.4; THOMAS (2001); DIAZ-GUARDAMINO URIBE (2001); WEHMEIER (2003)). Diese Zahl musste in den darauffolgenden Jahren auf 22 Gene korrigiert werden, nachdem LICHT *et al.* (2010) widerlegen konnten, dass der vorgeschlagene Acarviostatin-Importer AcbGFH Acarbose transportiert.

Die Acarbosebiosynthesegencluster der Stämme *Streptomyces glaucescens* GLA.O und *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 unterscheiden sich signifikant in ihrer Organisation



**Abbildung 1.4:** Darstellung des Acarbosebiosynthese-Genclusters in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Die postulierten Funktionen der *acb*-Genprodukte sind farblich kodiert (SCHWIENTEK, 2012).

und andererseits auch im Genbestand zum *acb*-Gencluster (ROCKSER und WEHMEIER, 2009; GUO *et al.*, 2012). Ein wesentlicher Unterschied liegt in der Größe der Cluster. Während *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit insgesamt 22 Genen das kleinste Cluster bildet, zählen das *gac*-Acarbosebiosynthese-Gencluster von *S. glaucescens* GLA.O 26 und das *sct*-Acarbosebiosynthese-Gencluster von *S. coelicoflavus* ZG0656 sogar 27 Gene (GUO *et al.*, 2012). Während die *Streptomyces*-Stämme einerseits ein vorgeschlagenes Acarbose-Importersystem und zum anderen Regulatorproteine aufweisen, beinhaltet das Acarbosebiosynthese-Gencluster von *Actinoplanes* sp. SE50/110 das Acarviosyltransferasegen *acbD* als Alleinstellungsmerkmal. Ein Homolog des Gens konnte in dem vollständigen Genom von *S. glaucescens* GLA.O sowie im *draft* Genom von *S. coelicoflavus* ZG0656 nicht gefunden werden (GUO *et al.*, 2012; ORTSEIFEN, 2012). Die Bedeutung der Acarviosyltransferase wird in Abschnitt 1.3.3 näher erläutert.

Es wird davon ausgegangen, dass das Acarbosebiosynthese-Gencluster von *Actinoplanes* sp. SE50/110 in mindestens acht Transkriptionseinheiten eingeteilt ist, von denen drei als Operons agieren (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Die Regulation der Biosynthese ist weitgehend unerforscht. Die Acarbosebiosynthese beginnt bereits in der Wachstumsphase (THOMAS, 2001). Jedoch fehlt ein Gen für einen stoffwechselformspezifischen Transkriptionsregulator, der innerhalb des Clusters lokalisiert ist, wie dies für andere Acarbosebiosynthesecluster bekannt ist (ROCKSER und WEHMEIER, 2009; GUO *et al.*, 2012). Eine Alternative zur Wachstumsphasen-abhängigen Steuerung durch Regulatorproteine wäre die Möglichkeit der Substratinduktion durch exogene Kohlenstoffquellen. Früh wurde festgestellt, dass die Acarbose-Bildung in Abhängigkeit von der angebotenen C-Quelle steht (FROMMER *et al.*, 1975; SCHMIDT *et al.*, 1977). Maltose und Maltotriose wurden als Induktoren des Acarbosebiosyntheseclusters postuliert, genauer die Induktion der Transkription des Acarviosyltransferasegens *acbD* sowie des Amylasegens *acbE* (BRUNKHORST *et al.*, 2005). Für diese Art der direkten

positiven Regulation spricht das Auffinden einer sogenannten *dyadic symmetry element* (DSE)-Box, welche *upstream* der Gene *acbD* und *acbE* sowie *acbA* und *acbB* zu finden ist (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Durch die erfolgreiche Sequenzierung des Genoms konnten weitere Vorhersagen getroffen werden, auf Grundlage derer das bestehende Modell der Acarbosebiosynthese und des „Carbophor“-Modells verfeinert wurden (WENDLER *et al.*, 2013).

#### 1.3.2 Acarbosebiosynthese in *Actinoplanes* sp. SE50/110

Der Biosyntheseweg von Acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110 ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Nachdem in mehreren Studien bis 2001 immer mehr Gene des Acarbosebiosynthesegenclusters identifiziert wurden, ergaben sich auch Einblicke in die Organisation innerhalb des Clusters. Abgesehen von deren Lokalisation konnten einige Genprodukte hinsichtlich ihrer biochemischen Funktionen untersucht werden, genauer AcbK (DREPPER und PAPE, 1996), AcbC (STRATMANN *et al.*, 1999), AcbD (HEMKER *et al.*, 2001), AcbM und AcbO (ZHANG *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003). Die Bedeutung der anderen im *acb*-Gencluster kodierten Proteine wurde aufgrund von Homologievergleichen vorhergesagt (DIAZ-GUARDAMINO URIBE, 2001; BRUNKHORST, 2004; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; ZHANG *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003). Die Modelle zum Acarbosemetabolismus basieren auf oben erwähnten molekularbiologischen Untersuchungen und bioinformatischen Vorhersagen (LEE *et al.*, 1997; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; WENDLER *et al.*, 2013). Die Lokalisation der Gene im *acb*-Cluster sowie die Funktionen ihrer Produkte sind in Abbildung 1.4 dargestellt. Im Allgemeinen können die Genprodukte in die drei Kategorien Acarbosebiosynthese, Transport und Verstoffwechslung von  $\alpha$ -Glucosiden klassifiziert werden (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Bei zwei im Acarbosebiosynthesegencluster lokalisierten Genen, respektive *acbJ* und *acbP*, ist die Rolle bislang unbekannt (ZHANG *et al.*, 2002; WENDLER *et al.*, 2013). Basierend auf *Basic Local Alignment Search Tool* (blast)-Analysen handelt es sich bei dem Genprodukt von AcbJ vermutlich um eine Hydrolase und bei AcbP um eine putative NTP-Pyrophosphohydrolase (SCHWIENTEK, 2012; WENDLER *et al.*, 2015).

Ein Modell zur Synthese von Acarbose bestehend aus zwei Synthesesträngen wurde vorgeschlagen (siehe Abbildung 1.5, ZHANG *et al.* (2002)). Im ersten Synthesestrang wird das C<sub>7</sub>-Cyclitol ausgehend von Seduheptulose-7-Phosphat aus dem Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg gebildet. Weiterhin erfolgt in einer davon losgelösten Reaktion die Bildung des Desoxyzuckers aus D-Glucose-1-Phosphat (ARAKAWA *et al.*, 2003; STRAT-

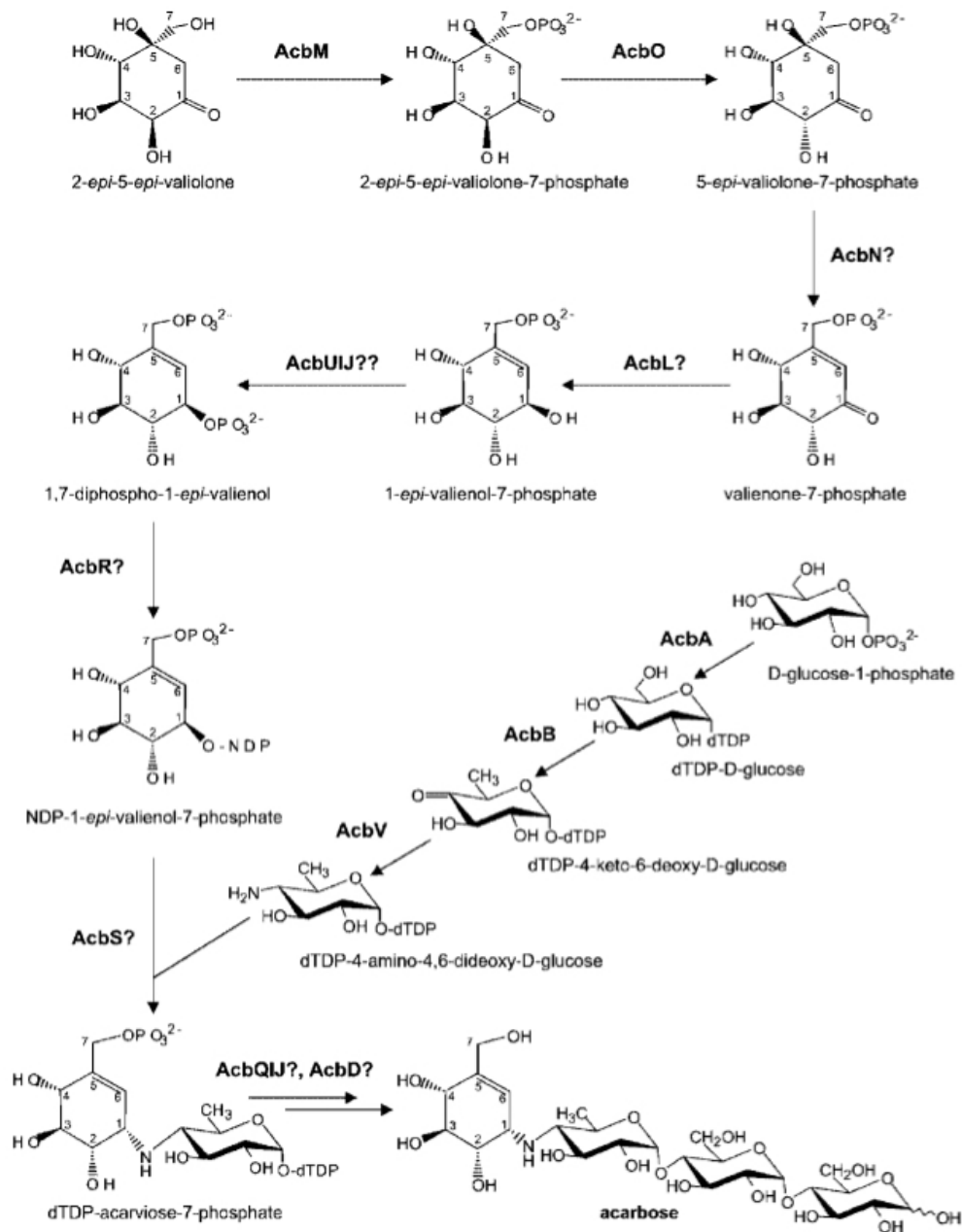


Abbildung 1.5: Darstellung der Acarbosebiosynthese in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Das Modell der Biosynthese des Pseudotetracosaccharids Acarbose zeigt die elf Teilschritte sowie die beteiligten Enzyme (ZHANG *et al.*, 2002). Im Modell fehlt der erste Syntheseschritt von Seduheptulose-7-Phosphat zu 2-epi-5-epi-Valiolone katalysiert durch AcbC.

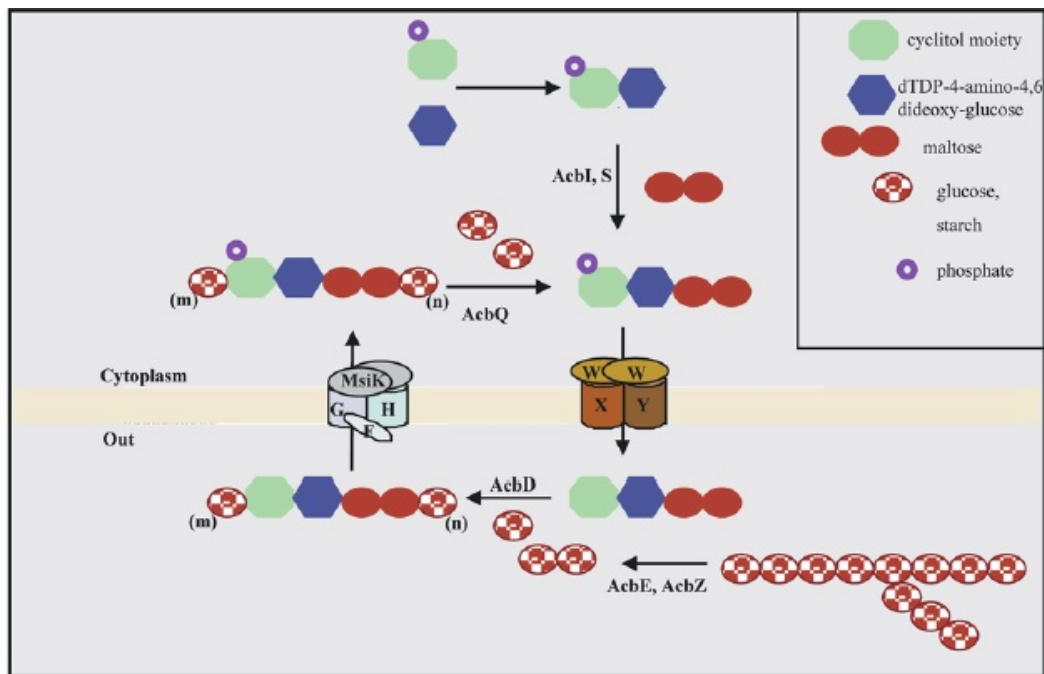
MANN *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2002; PIEPERSBERG und DISTLER, 1997). Die Synthese von NDP-1-*epi*-valienol-7-Phosphat (Strang 1) erfolgt durch die Genprodukte von *acbC*, *acbM*, *acbO*, *acbL*, *acbN*, *acbU* sowie *acbR* (STRATMANN *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Die Bildung von D-Glucose-1-Phosphat zu dTDP-4-Amino-4,6-Didesoxy-D-Glucose wird durch die Enzyme AcbA, AcbB und AcbV katalysiert und folgt damit dem gut charakterisierten dTDP-Hexose-Stoffwechselweg (LIU und THORSON, 1994; PIEPERSBERG und DISTLER, 1997).

Die Synthese der energiereichen Verbindung dTDP-Acarviose-7-Phosphat (Acarviosyl-Einheit) erfolgt durch den Transfer des Desoxyzuckers auf das C<sub>7</sub>-Cyclitol katalysiert durch die Glykosyltransferase AcbS (ZHANG *et al.*, 2002). Die Bildung der Acarbose ausgehend von der Acarviosyl-Einheit blieb lange Zeit ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass neben Maltose auch Maltotriose eingebaut werden kann (LEE *et al.*, 1997). Außerdem konnte in Einbaustudien mit Isotopen-markierter Glucose gezeigt werden, dass diese lediglich in die 4-Amino-4,6-didesoxy-D-Glucose der Acarviosyl-Einheit und nicht in die Maltosyl-Untereinheit eingebaut wird (MAUL *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 1997). Auch wurde spekuliert, ob die Acarbose innerhalb oder außerhalb der Zelle gebildet wird (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Im Hintergrund der Forschung zu *Streptomyces glaucescens* GLA.O und der Funktion von Acarbose in dessen Produzenten wird aktuell davon ausgegangen, dass die Verknüpfungsreaktion im Cytosol erfolgt (ROCKSER und WEHMEIER, 2009). In dem derzeitigen Modell von WENDLER *et al.* (2013) sind die Glykosyltransferase AcbI und die Hydrolase AcbJ für die intrazelluläre Synthese verantwortlich. Weiterhin legen die Ergebnisse der Proteomforschung von WENDLER *et al.* (2015) nahe, dass die Acarboseclusterproteine, welche für die Synthese des Pseudotetrasaccharids verantwortlich sind, in der Nähe der Membran lokalisiert sind. In einer Membranfraktion konnten 15 intrazelluläre Acb-Proteine detektiert werden (WENDLER *et al.*, 2015). Die Organisation von metabolomisch aktiven Enzymen in Komplexen (Metabolon) wird auch als *substrate channeling* bezeichnet. Dieses Ergebnis korreliert mit Beobachtungen anderer exportierter Sekundärmetabolite (WENDLER *et al.*, 2015).

#### 1.3.3 Die Funktion der Acarbose für *Actinoplanes* sp. SE50/110

Die primäre Funktion der Acarbose ist die Inhibierung artfremder  $\alpha$ -Glucosidasen. Dabei resultiert die Hemmung dieser Enzyme in der Inhibierung der Degradation von C-Quellen für Konkurrenten in natürlichen Habitaten und demzufolge in einem eigenen

exklusiven Nahrungsvorrat. Weiterhin führt das Vorhandensein eigener Enzyme, die durch das Pseudotetrasaccharid nicht inhibiert werden können, zu einem Vorteil für den langsam wachsenden Organismus (BRUNKHORST, ANDERSEN und SCHNEIDER, 1999). Darüberhinaus interferiert Acarbose mit Transportprozessen. Ein Effekt auf den Transport von Nahrungsquellen wurde in Studien mit *Escherichia coli* analysiert (BRUNKHORST, ANDERSEN und SCHNEIDER, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das Sekundärmetabolit von *Actinoplanes* sp. SE50/110 die Aufnahme von Maltose hemmt und zu einem schlechterem Wachstum der *E. coli* Zelle führt (BRUNKHORST, ANDERSEN und SCHNEIDER, 1999).



**Abbildung 1.6: Darstellung der Acarbose in der Funktion als Carbophor.** Die Abbildung zeigt ein zyklisches Durchlaufen von Acarbose und Acarbose-basierten Metaboliten zwischen intrazellulären und extrazellulären Raum. Der Re-Import der Metabolite, die intrazelluläre Phosphorylierung sowie das Recyclen der Acarbose stellt ein System zur Aufnahme und Abgabe von Zuckern dar und führt zu einem exklusiven Nahrungsvorrat für *Actinoplanes* sp. SE50/110 (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004).

Darüberhinaus gibt es noch eine weitere postulierte Funktion des Sekundärmetaboliten. Neben den Genprodukten des *acb*-Genclusters, die in die Kategorie Acarbosebiosynthese fallen, gibt es Proteine, die dem Transport und der Verstoffwechslung von  $\alpha$ -Glucosiden zugeordnet werden. Auf Grundlage der Transporter- und Exportproteine wurde das



„Carbophor“-Modell entwickelt (siehe Abbildung 1.6), welche einen extra- und einen intrazellulären Acarbosekreislauf vereint sowie ein System zum Erwerb von Glucose aus Stärke darstellt (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Das Modell beschreibt zunächst den Export von Acarbose aus dem Cytoplasma über den im *acb*-Gencluster kodierten ABC-Transporter AcbWXY (DREPPER und PAPE, 1996; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Bis zum Ausschleusen aus der Zelle bleibt die Position 7 des Valienamin phosphoryliert, um intrazelluläre Proteine gegen die enzymhemmende Wirkung zu schützen (BRUNKHORST, 2004). Erst außerhalb der Zelle kommt es zur Inhibierung von  $\alpha$ -Glucosidasen. Dabei besitzt *Actinoplanes* sp. SE50/110 eigene Acarbose-insensitive extrazelluläre  $\alpha$ -Glucosidasen, respektive AcbZ und AcbE (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2009). Des Weiteren konnte ein Umbau von Acarbose im extrazellulären Raum beschrieben werden. Katalysiert durch die Acarviosyltransferase AcbD wird das Pseudotetrasaccharid mit Glucose oder anderen Oligosacchariden beladen. Zum einen kann dadurch das Inhibierungsspektrum erweitert und zum anderen das Nahrungsangebot gebunden werden. Dies führt dazu, dass die C-Quellen nicht mehr durch artfremde Organismen in der selben ökologischen Nische genutzt werden können (WEHMEIER, 2003; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; BRUNKHORST *et al.*, 2005). Als Acarviosyl-Akzeptoren fungieren die Produkte der  $\alpha$ -Amylasen AcbE und AcbZ. In dem Modell erfolgt nach dem enzymatischen Transfer der Transport der resultierenden Acarbose-Homologen ins Cytoplasma (BRUNKHORST *et al.*, 2005). Wie in Abschnitt 1.3.1 bereits beschrieben, wurde davon ausgegangen, dass die am Rande des *acb*-Genclusters lokalisierten Gene *acbGFH* für einen solchen Importer kodieren (WEHMEIER, 2003). In Kristallstrukturaufklärungen konnten Licht *et al.* (2010) jedoch zeigen, dass das Substratbindeprotein AcbH eine hohe Affinität zu  $\beta$ -D-Galactopyranose aufweist. In dem von Wendler *et al.* (2013) postulierten Modell übernimmt die Funktion der Acarbose-Aufnahme der im Genom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 kodierte ABC-Transporter MalEFG. Gemäß des Modells werden nach dem Re-Import die Acarbose beziehungsweise die Acarviostatine-Metabolite durch die Acarbose-7-Kinase AcbK rephosphoryliert, um die inhibierende Wirkung des Pseudotetrasaccharids im intrazellulären Raum zu verhindern (WEHMEIER, 2003). Die Saccharideinheiten werden anschließend durch die Amylotransferase AcbQ abgespalten und dem Metabolismus zur Verfügung gestellt (BOOS und SHUMAN, 1998; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; MERETTIG, 2009). Daraufhin erfolgt ein neuer „Carbophor“-Zyklus.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Acarbose einen großen Nutzen für den langsam wachsenden Stamm *Actinoplanes* sp. SE50/110 hat. Einerseits führt die Inhibierung von fremden  $\alpha$ -Glucosidasen zu einem exklusiven Vorrat an Kohlenstoffquellen. Auch

durch die Bindung der Kohlenhydrate an Acarbose ist es Nahrungskonkurrenten nicht mehr möglich, diese zu nutzen (PIEPERSBERG *et al.*, 2002; WEHMEIER, 2003). Ebenfalls werden Maltosetransportsysteme von konkurrierenden Mikroorganismen durch Acarbose gehemmt (BRUNKHORST, ANDERSEN und SCHNEIDER, 1999; STRATMANN, 1997; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Basierend auf dem derzeitigen Metabolismus-Modell hat Acarbose ähnlich zu Siderophoren eine „Carbophor“-Funktion innehat (WEHMEIER, 2003). Es wird angenommen, dass Acarbose in erster Linie als Inhibitor fungiert und lediglich in hohen Konzentrationen im extrazellulären Raum die Funktion als „Carbophor“ einnimmt (MERETTIG, 2009). Eine wesentliche Rolle im „Carbophor“-Modell spielt dabei die Acarviosyltransferase AcbD.

#### Die besondere Rolle der Acarviosyltransferase AcbD für *Actinoplanes* sp. SE50/110

Das im *acb*-Biosynthesecoluster lokalisierte Gen *acbD* kodiert für eine extrazelluläre Acarviosyltransferase. Es konnte lediglich eine geringe Aktivität von AcbD im Cytoplasma nachgewiesen werden (HEMKER *et al.*, 2001). Wie in dem Abschnitt 1.3.3 beschriebenen Modell katalysiert das Enzym Acarviosyltransferase das Beladen der Acarbose mit Sacchariden. Zur Charakterisierung des Genproduktes wurde das *acbD* Gen heterolog in dem Stamm *Streptomyces lividans* TK23 exprimiert (HEMKER *et al.*, 2001). Das Protein weist zu einem Eigenschaften einer extrazellulären  $\alpha$ -Glucosidase sowie Transglycosylase der  $\alpha$ -Amylase Familie auf. Zum anderen zeigt AcbD die höchste Ähnlichkeit zu Cyclodextrin Glucanotransferasen (CGTasen) (HEMKER *et al.*, 2001). In Enzymassays konnte jedoch weder eine CGTase noch eine  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität festgestellt werden. Zur Untersuchung der Transglykosylierungsaktivität wurden Akzeptor- und Donorspezifitäten analysiert (HEMKER, 1997; HEMKER *et al.*, 2001).

AcbD hat neben Acarbose als Donor- und Maltose als effizientestes Akzeptorsubstrat noch eine Bandbreite an weiteren Substraten, darunter auch Glucose, Maltooligosaccharide, Dextrin und Amylopektin. Außerdem konnte gezeigt werden, dass einige Homologe der Acarbose, darunter Komponente 2 und Komponente 4b, Donor-Substrate darstellen können. Die Diversität der Akzeptoren sowie Donoren spiegelt die zentrale Rolle von AcbD in der Bildung von verschiedenen Pseudooligosacchariden in *Actinoplanes* sp. SE50/110 wider. Auf Grund der Ergebnisse wurden generelle Akzeptor- sowie Donorstrukturen abgeleitet (HEMKER, 1997; HEMKER *et al.*, 2001). Untersuchungen zur Acarviosyltransferase konnten weiterhin zeigen, dass Komponente C nicht in Anwesenheit von AcbD, Acarbose und Trehalose gebildet wird, was schlußfolgern lässt, dass diese nicht durch Beteiligung des Enzyms entsteht (HEMKER, 1997). Zusammengefasst

#### 1.4 Charakterisierung des Acarboseproduzenten *Actinoplanes* sp. SE50/110 mittels *omics*-Technologien

---

zeigen die Resultate in der Literatur, dass Acarbose nicht nur intrazellulär synthetisiert wird, sondern ebenfalls durch Umbaureaktionen von anderen Homologen gebildet wird (HEMKER *et al.*, 2001). Interessanterweise konnte kein Ortholog zu *acbD* in den anderen bekannten Acarbosebiosyntheseclustern von *Streptomyces glaucescens* GLA.O und *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 gefunden werden (ORTSEIFEN *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2012).

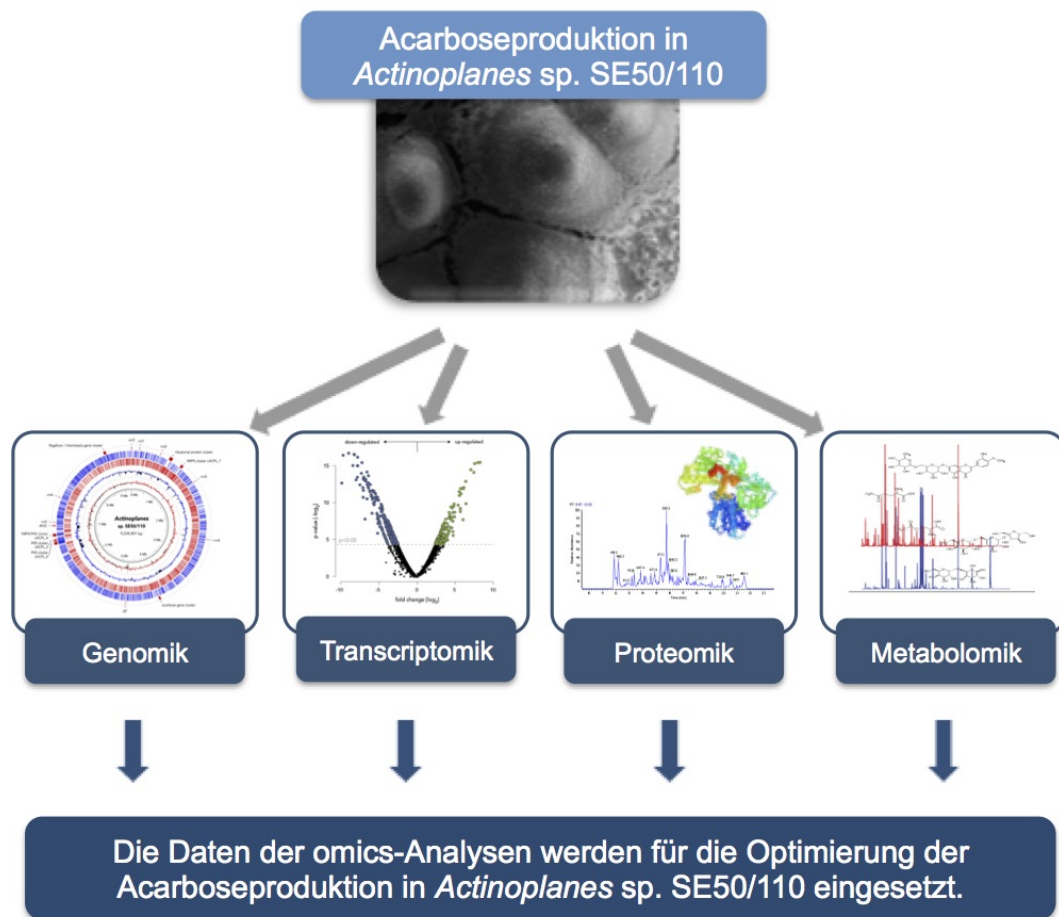
#### 1.4 Charakterisierung des Acarboseproduzenten *Actinoplanes* sp. SE50/110 mittels *omics*-Technologien

Zahlreiche *omics*-Plattformen werden genutzt, um mikrobielle Systeme systematisch zu erforschen, zum Beispiel Genomics, Transkriptomics, Proteomics, Metabolomics, Interactomics sowie Fluxomics (ZHANG, LI und NIE, 2010). Weiterentwicklungen in der Technik ermöglichen eine immer bessere Forschung in unterschiedlichen *omics*-Feldern, zum Beispiel durch *next generation sequencing* oder *state-of-the-art mass spectrometry*. Dennoch können einzelne *omics*-Analysen die Komplexität der mikrobiellen Biologie nicht darstellen (ZHANG, LI und NIE, 2010). Die zellulären Komponenten aus den einzelnen Teildisziplinen wirken als ein integriertes System *in vivo*, was als logische Konsequenz die Integration von *omics*-Daten fordert (BUESCHER und DRIGGERS, 2016). Integrative *omics*-Studien wurden bereits für unterschiedliche Prokaryoten durchgeführt, zum Beispiel *Rhodococcus opacus* strain PD630 (CHEN *et al.*, 2014). Auch für den Wildtyp-Stamm *Actinoplanes* sp. SE50/110 konnten verschiedene *omics*-Technologien für die Genom-weite Erforschung genutzt werden.

##### 1.4.1 Die Genomsequenz von *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämmen

Die Genomics ist ein Forschungszweig, der sich mit der Beschreibung der gesamten Erbinformation eines Organismus, eines Gewebes oder einer Zelle beschäftigt. Methoden zum Erreichen dieser Ziele sind die Nutzung von rekombinanter DNA, DNA-Sequenzierung sowie bioinformatische Werkzeuge, um die Sequenz zu assemblieren sowie zu annotieren (KLUG *et al.*, 2012). Disziplinen im Bereich Genomik umfassen strukturelle und funktionelle Genomik, vergleichende Genomik sowie Metagenomik, und haben zu einer *omics*-Revolution in der modernen Biologie beigetragen (KLUG *et al.*, 2012).

Das Genom des Wildtyp-Stamms *Actinoplanes* sp. SE50/110 konnte erfolgreich sequenziert und assembliert werden (SCHWIENTEK *et al.*, 2012). Der Stamm besitzt ein zirkuläres Chromosom mit einer Größe von 9,2 Mbp (SCHWIENTEK *et al.*, 2012).



**Abbildung 1.7:** Übersicht der Forschung im Gebiet der Acarbosebiosynthese von *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit unterschiedlichen *omics* Technologien.

Mit Hilfe der GenDB Annotations-Software erfolgte die Genomannotation (SCHWIEN-TEK *et al.*, 2012; MEYER *et al.*, 2003). Neben dem Acarbosebiosynthesecluster konnten weitere putative Sekundärmetabolitcluster in dem Stamm gefunden werden, darunter Nicht-ribosomale Peptidsynthase (*non-ribosomal peptide synthetase*; NRPS) und Polyketidsynthase (*polyketide synthase*; PKS)-Cluster (SCHWIEN-TEK, 2012). Das Genom wurde beim NCBI unter der Zugangsnummer CP003170 hinterlegt. Mit der Genomsequenz konnte die Grundlage für die Durchführung von Transkriptomics- sowie Proteomics-Experimenten gelegt werden. Ausgehend vom Wildtyp-Stamm *Actinoplanes* sp. SE50/110 wurden weitere Produktionsstämme entwickelt. Ausgewählte Acarboseproduzenten wurden sequenziert und gegen das assemblierte Wildtyp-Genom verglichen,

um Mutationen zu identifizieren. Diese Arbeiten wurden in dem Patent WO 2012016960 A1 *Genomics of actinoplanes utahensis* veröffentlicht (SELBER *et al.*, 2011).

#### 1.4.2 Transkriptomanalyse im *Actinoplanes* sp. SE50/110 Wildtyp-Stamm

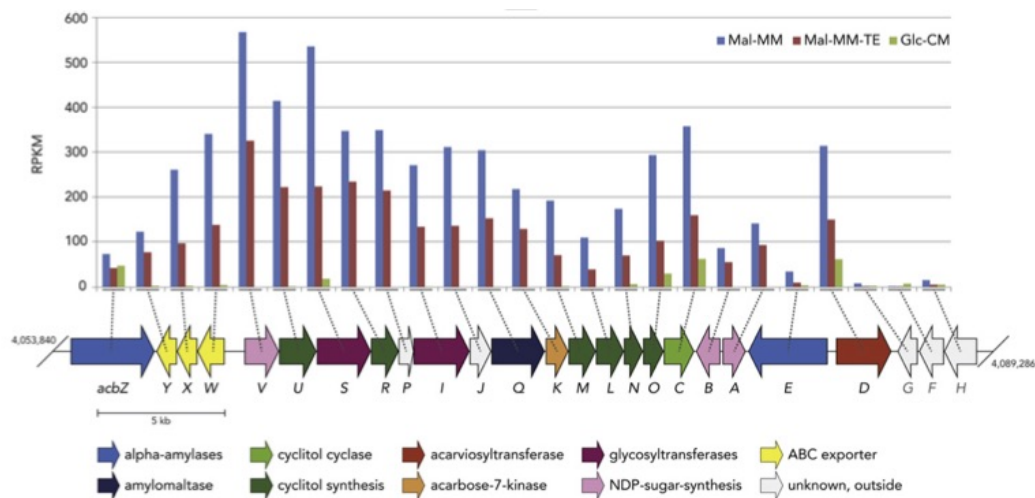
Transkriptomics bezeichnet die Erforschung des kompletten Transkriptoms einer Zelle, respektive die Gesamtheit der RNA Transkripte, die unter spezifischen Bedingungen und Zeitpunkt in der Zelle vorliegen. Um dieses Ziel zu erreichen werden Methoden wie Mikroarray-Analyse oder RNA Sequenzierung (RNASeq) angewendet (NATURE, 2016; WANG, GERSTEIN und SNYDER, 2009). Letztere Methode ist ein erst kürzlich entwickelter Ansatz, welcher sich gegenüber Mikroarrays in einer höheren Sensitivität, verbesserten Auflösung sowie Datenlage auszeichnet (SEQC/MAQC-III CONSORTIUM, 2014).

Die RNASeq-Technologie konnte für den hoch GC-Organismus *Actinoplanes* sp. SE50/110 erfolgreich etabliert werden (SCHWIENTEK *et al.*, 2011). Die Transkriptomforschung verfolgte dabei das Ziel, die Genomsequenz zu verbessern (SCHWIENTEK *et al.*, 2014) und die Transkription ausgewählter Gene unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren (SCHWIENTEK *et al.*, 2013). Die Überarbeitung der Genomannotation konnte durch das Korrigieren der Transkriptionsstartstellen sowie der Identifizierung neuer Gene erreicht werden (SCHWIENTEK *et al.*, 2014). Der Vergleich unterschiedlicher Anzuchtbedingungen von *Actinoplanes* sp. SE50/110 zeigt eine geringere Transkription der *acb*-Clustergene bei Wuchs auf Glucose-Komplexmedium im Vergleich zum Maltose-Minimalmedium (siehe Abbildung 1.8). Diese Beobachtung konnte mit der in der Literatur beschriebenen geringen Acarbosekonzentration bei Wuchs auf Glucose in Verbindung gebracht werden (WANG *et al.*, 2011; SCHWIENTEK *et al.*, 2013).

#### 1.4.3 Das cytosolische, extrazelluläre und Membranproteom im Acarboseproduzenten *Actinoplanes* sp. SE50/110

Der Begriff Proteom beschreibt die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Organs, eines Organismus oder einer Kultur unter definierten Bedingungen. Dabei umfasst die Bezeichnung Proteomics die systematische Erforschung von Proteinen in parallelem Ansatz mit dem Ziel, eine detaillierte Beschreibung ihrer Struktur und ihrer Funktion zu erhalten (PATTERSON und AEBERSOLD, 2003).

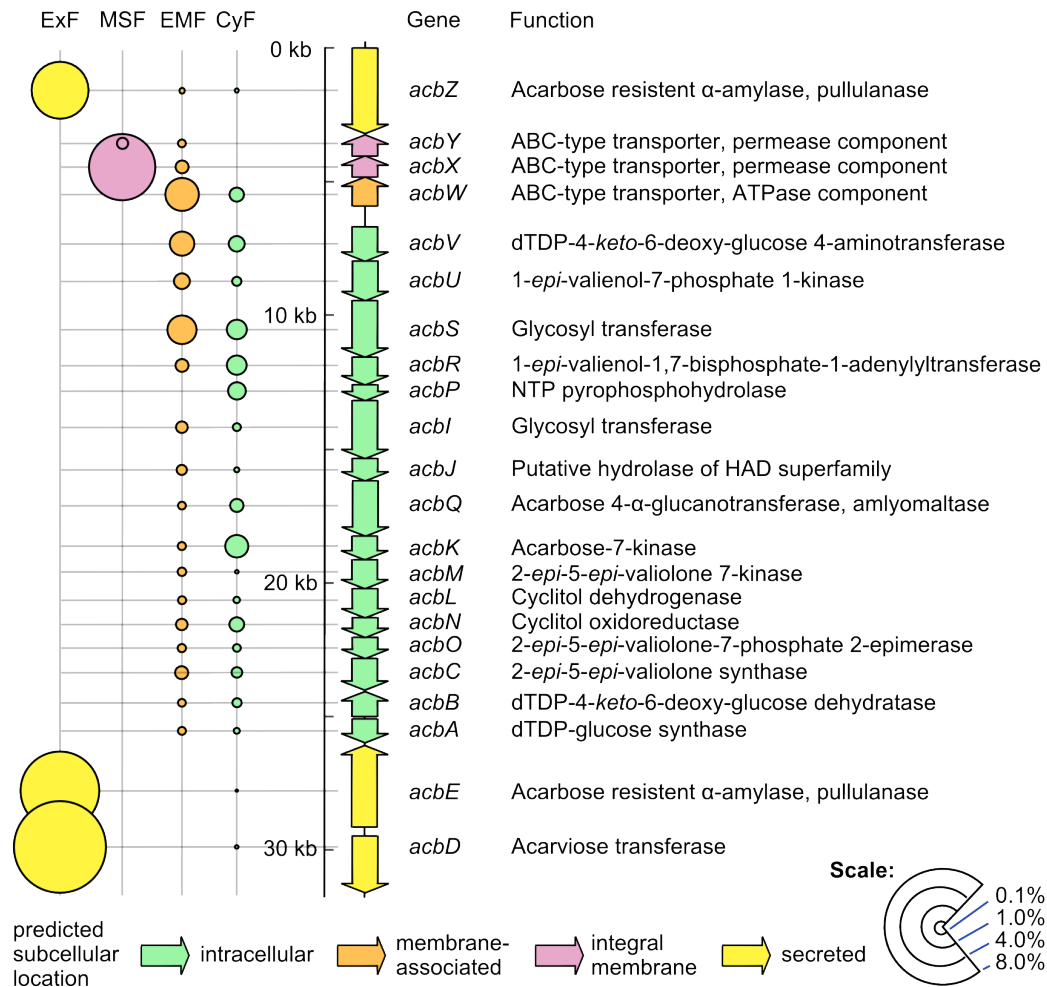
In verschiedenen Studien konnten gel-basierte sowie gel-freie Ansätze der Proteomforschung für den Wildtyp-Stamm *Actinoplanes* sp. SE50/110 etabliert werden (WENDLER *et al.*, 2013; WENDLER *et al.*, 2015). Des Weiteren erfolgte sukzessive die Erforschung



**Abbildung 1.8: Vergleichende Transkriptomics des Acarbosebiosynthesecluster von *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit RNASeq.** Die Abbildung zeigt die Transkription des *acb*-Clusters bei Anzucht des Wildtyp-Stamms auf Maltose-Minimalmedium (Mal-MM, blau), Maltose-Minimalmedium unter Zusatz von Spurenelementen (Mal-MM-TE, rot) sowie Glucose-Komplexmedium (Glc-CM, grün). Dabei ist die Anzahl an gemappten Reads innerhalb eines Transkripts, dem sogenannten RPKM Wert, wiedergegeben. Die Expression der Gene ist annähernd zweimal so hoch in Mal-MM im Vergleich zu Mal-MM-TE. In Glc-CM konnte nur eine geringe Expression im Vergleich zu den anderen Bedingungen festgestellt werden (SCHWIENTEK *et al.*, 2013).

des Proteoms in unterschiedlichen Fraktionen sowie zu verschiedenen Bedingungen (WENDLER *et al.*, 2013; WENDLER *et al.*, 2015; WENDLER *et al.*, 2016). Aufgrund der Proteomstudien wurden Vorschläge zum Acarbose-Importer gemacht, respektive der ABC-Transporter MalEFG. Demzufolge wurde ein neues Modell zum Acarbosemetabolismus aufgestellt (WENDLER *et al.*, 2013). Mittels gel-freier Proteomics konnten alle Acarbosebiosyntheseproteine in unterschiedlichen zellulären Fraktionen erfasst werden (WENDLER *et al.*, 2015). Darüber hinaus gelang es durch vergleichende Proteomforschung, mit dem ABC-Transporter MstEAF einen Kandidaten für den Glucose-Import zu identifizieren (WENDLER *et al.*, 2016).

1.4 Charakterisierung des Acarboseproduzenten *Actinoplanes* sp. SE50/110 mittels omics-Technologien



**Abbildung 1.9: Umfassende Analyse der Acarbosebiosynthesepoteine von *Actinoplanes* sp. SE50/110 in unterschiedlichen Fraktionen.** Die Abbildung zeigt die Resultate der LC-MS-basierten Proteomforschung für die Proteine des Biosyntheseclusters in der cytosolischen (CyF), der angereicherten Membran (EMF), der *membran shaving* (MSF) sowie der extrazellulären Fraktion (ExF). Die Abundanzen der einzelnen Proteine basierend auf *normalized spectral abundance factors* (NSAFs) sind mittels der Kreisflächen kenntlich gemacht. Weiterhin werden die zellulären Zuordnungen farblich kenntlich gemacht, sprich cytosolische Proteine in grün, Membran-assoziierte Genprodukte in orange, integrale Membranproteine lila und extrazelluläre Enzyme in gelb (WENDLER *et al.*, 2015).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Der  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Acarbose wird im industriellen Maßstab von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen produziert und spielt eine wichtige Rolle in der Behandlung der global steigenden Patientenzahlen mit Diabetes mellitus Typ 2. In den letzten Jahren ist es gelungen Methoden der Genomik, der Transkriptomik sowie der Proteomik für den *Actinoplanes* sp. SE50/110 Wildtyp-Stamm (Acarboseproduzent 1) zu entwickeln.

Motiviert aus den Ergebnisse der genannten *omics*-Ebenen soll ein Detektionsverfahren für Acarviostatin-Metabolite entwickelt werden. Mit einer solchen Methode soll zunächst die Bildung von Acarviostatin-Metaboliten im *Actinoplanes* sp. SE50/110 Wildtyp-Stamm (Acarboseproduzent 1) in Abhängigkeit von der C-Quelle der Kulturmediums untersucht werden. Anschließend ist geplant, die Synthese der Acarviostatin-Metabolite in Interdependenz zum Genotyp von drei Acarboseproduzenten von *Actinoplanes* sp. SE50/110 zu untersuchen. Zu beiden Forschungsfragen soll die Synthese der Acarviostatin-Metabolite modellhaft dargestellt werden.



# KAPITEL 2

---

## Material und Methoden

---

### 2.1 Herkunft und Anzucht von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen

#### 2.1.1 Herkunft der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme AP1, AP2 und AP3

In dieser Arbeit werden drei Acarbose produzierende *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme verwendet. Der erste Bakterienstamm der dem Wildtyp *Actinoplanes* sp. SE50/110 entspricht und im Folgenden als Acarboseproduzent 1 (AP1) bezeichnet wird, wurde dem Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) zu Forschungszwecken von der Bayer AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt. Ein identischer Stamm kann ebenfalls aus der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Identifikationsnummer 31044 sowie aus der Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) unter der Nummer 674.73 bezogen werden. Die zwei produzierenden *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme, im Folgenden bezeichnet als Acarboseproduzent 2 (AP2) sowie Acarboseproduzent 3 (AP3), wurden ebenfalls von der Bayer AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 Kultivierung und Analyse der Acarbosebiosynthese von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen

##### Kultivierung des Acarboseproduzent 1 auf definierten C-Quellen in Minimalmedium (A)

Die Kultivierung von AP1 in Schüttelkolben folgt den Beschreibungen in WENDLER *et al.* (2013). Vorkulturen werden aus Dauerkulturen inokuliert und in NBS-Medium angezogen. Die Kultivierung erfolgt über 65 Stunden bei 28 °C und 140 Umdrehungen pro Minute / Drehzahl (U/min). Zum Animpfen der Hauptkulturen werden die Zellen zunächst in Natriumchlorid zweimal gewaschen. Als Medium der Hauptkultur wird das in WENDLER *et al.* (2013) beschriebene Minimalmedium (A) verwendet, welches mit unterschiedlichen Zuckern supplementiert wird. Als C-Quellen werden Maltose, Glucose, Galactose sowie Mischungen aus Maltose-Glucose und Maltose-Galactose in äquivalenten C-Mol Mengen von 2,4 C-mol eingesetzt. Die Zellernte sowie die Beprobung der Schüttelkolben zur Bestimmung der Acarbosekonzentrationen folgte den Beschreibungen in WENDLER *et al.* (2013).

### Vergleichende Kultivierung der drei Acarbose produzierenden *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme AP1, AP2 und AP3

Für die Kultivierung der *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme werden diese zunächst aus einer Glycerinkultur in einem komplexen Vorkulturmedium in sterilen 250 mL PETG-Schikane-Kolben (Nalgene) angezogen. Das Vorkulturmedium wurde von der Bayer AG zur Verfügung gestellt. Die Kolben werden bei 28 °C und 260 U/min für 72 Stunden inkubiert. Nach der Vorkultur erfolgt die Kultivierung der drei Acarboseproduzenten in zwei unterschiedlichen Medien, respektive Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium (B), welche ebenfalls von der Bayer AG bereitgestellt wurden. Zum Überimpfen werden die Vorkulturen für 2 Minuten bei 2500 U/min abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 50 mL einer 0,9 %igen Natriumchlorid (NaCl)-Lösung gewaschen. Der Vorgang wird zweimal wiederholt und das Pellet in 50 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. 5 mL der gewaschenen Vorkultur werden zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Die Kolben werden bei 28 °C und 260 U/min für 288 Stunden inkubiert.

**Probenahme und Ernte der Hauptkultur** Die Schüttelkolbenkultivierungen werden beprobt und die Biotrockenmasse sowie die Acarbosekonzentration pro Kolben und Zeit bestimmt. Dazu wird 1 mL Kultur in ein zuvor ausgewogenes Reaktionsgefäß gefüllt und für 15 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, sterilfiltriert und für die Analytik zurückgestellt. Das Pellet wird mit 1 mL deionisiertem Wasser gewaschen, 15 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben werden getrocknet und zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) anschließend ausgewogen. Zur Erfassung der Unterschiede auf den verschiedenen *omics*-Ebenen werden komplette Kolben geerntet. Die Trennung der Zellen vom Überstand erfolgt durch Zentrifugation der Probe für 3 Minuten bei 5000 U/min und 10 °C in einem 50 mL Röhrchen. Der Überstand wird sterilfiltriert und für die Lyophilisierung eingefroren. Die Zellen werden zweimal mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,2) gewaschen und jeweils für 3 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wird ebenfalls zur Lyophilisierung eingefroren. Die Gefriertrocknung wurde bei Bayer in Wuppertal durchgeführt.

### Analytik zur Atmung von Acarboseproduzent 1 auf unterschiedlichen C-Quellen mittels Phänotypische Microarrays

*Actinoplanes* sp. SE50/110 Acarboseproduzent 1 (AP1) Zellen werden nach Anzucht auf SFM-Medium (20 g/L Sojamehl, 20 g/L Mannitol, 20 g/L Agar, aufgefüllt mit Leitungswasser auf 1 L; pH auf 8,0; zweimal autoklavieren - persönliche Kommunikation T. Gren) in die kommerziell erhältlichen Platten PM1 und PM2 (OmniLog<sup>®</sup>, Biolog) für die Analyse der C-Quellen gegeben. Das Vorgehen folgt den Herstellerangaben für *Streptomyces* Stämme. Die Atmung von *Actinoplanes* sp. SE50/110 auf 192 verschiedenen Substraten werden anhand der Reduktion des Farbstoffes über einen Zeitraum von 144 Stunden aufgezeichnet. Die Vermessung der Platten erfolgt im Replikat. Die Farbintensität als Indikator der Atmung zum letzten Zeitpunkt der unterschiedlichen C-Quellen werden verglichen.

## 2.2 Auswertung der Genomsequenzen von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen mittels Bioinformatik

Für den Vergleich von Genomen, insbesondere der Suche nach Deletionen, wird die Software MAUVE vom *Darling lab* verwendet (DARLING *et al.*, 2004). Hierzu werden alle Genome anhand von *progressiveMauve* ausgerichtet. Dabei werden die Standard-Parameter verwendet. Anschließend wird in den Genome nach nicht-homologen Bereichen gesucht. Anhand der Export-Funktionen können ebenfalls Listen von orthologen kodierenden Sequenzen sowie Lücken exportiert und in Excel analysiert werden. Analog wird mit Hilfe der r2cat Software Restrukturierungen und Lücken in den Genomen detektiert (HUSEMANN und STOYE, 2010).

Zur Erkennung von prokaryotischen Sekundärmetabolitclustern im Genom wird die Software antiSMASH verwendet (MEDEMA *et al.*, 2011). Dabei wird basierend auf *hidden Markov models*-Profilen von Genen, welche spezifisch in bestimmten Typen von Genclustern präsent sind, Vorhersagen über die Existenz von Sekundärmetabolitcluster gemacht. Dabei werden die Standard-Suchparameter von antiSMASH 3.0 verwendet.

Für die Suche nach homologen Proteinsequenzen wird das online Werkzeug blastp des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verwendet. Die Suchanfrage erfolgt gegen die vom NCBI bereitgestellte *non-redundant* (nr) Proteinsequenzdatenbank mit Standard-Parametern (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Des Weiteren wird für die Erfassung von Proteindomänen die Pfam (**P**rotein **F**amilies, <http://pfam.xfam.org>) verwendet (BATEMAN *et al.*, 1999; COGGILL, FINN und BATEMAN,

2008; FINN, GRIFFITHS-JONES und BATEMAN, 2003). Die hier verwendete Version Pfam 29.0 enthält 16295 Einträge (Dezember 2015). Alle Einträge sind manuell kuriiert und enthalten zwei multiple Sequenzalignments, zwei *profile-Hidden Markov Models* (profile-HMMs) und eine Annotationsdatei (FINN *et al.*, 2006).

Gemäß veröffentlichter Protokolle für *Actinoplanes* sp. SE50/110 erfolgte die subzellulären Zuordnung der Genprodukte mit der Locate P v.2.0 Pipeline (WENDLER *et al.*, 2013; WENDLER *et al.*, 2015). Für die Klassifizierung der Punktmutationen werden weitere Softwaretools verwendet, respektive PredictProtein sowie RaptorX. Das zuerstgenannte Werkzeug ist ein meta-Service für Analysen von Proteinsequenzen (YACHDAV *et al.*, 2014). Neben strukturellen und funktionellen Eigenschaften werden auch Vorhersagen zur Lokalisation, Protein-Protein-Bindungsstellen sowie Prognosen über die Wirkung von Punktmutationen erstellt. Bezogen auf das letztgenannte wird die implementierte Software SNAP2 von Rostlab (TU München) verwendet. RaptorX berechnet mögliche Proteinstrukturen und gibt anhand dessen Prognosen über Bindestellen und Substrate (KÄLLBERG *et al.*, 2012; KÄLLBERG *et al.*, 2014).

## 2.3 Messung von Acarbose und weiteren Acarviostatin-Metabolite im Überstand von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen

### 2.3.1 Messung der Acarboseproduktion im Überstand von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen mittels Flüssigkeitschromatographie

Die Bestimmung der Acarbosekonzentration im Kulturüberstand der *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme erfolgt nach dem Protokoll von WENDLER *et al.* (2013). Die wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben vorbereiteten Proben werden mit Reinstwasser vom Typ I (Milli-Q) verdünnt und in HPLC-Vials überführt. Das Injektionsvolumen beträgt 10  $\mu\text{L}$ . Weiterhin wird eine Standardgerade mit unterschiedlichen Acarbosekonzentrationen aufgenommen (Acarbose-Charge, GOS-7068/6). Zur Messung werden eine Hypersil APS-2 Vorsäulenkategorie (5  $\mu\text{m}$ , MZ Analysentechnik) sowie eine analytische Aminophasen-Säule (Hypersil<sup>TM</sup> APS-2 Amino LC-Säule, 125 mm x 4,0 mm, Porengröße 3  $\mu\text{m}$ , Thermo Fischer Scientific) verwendet. Die Säulen werden auf 33 °C temperiert. Die Anlage wird isokratisch mit einer Flußrate von 1,7  $\text{mL min}^{-1}$  mit dem Fließmittel bestehend aus 26 %(v/v) Phosphatpuffer (Kaliumdihydrogenphosphat 620 mg/L, Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat 380 mg/L), 64 %(v/v) Acetonitril (chromasolv) und 10 %(v/v) Methanol (chromasolv) beschickt. Die Detektion erfolgt mittels UV-Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda=210$  nm. Für eine bessere Vergleichbarkeit

### 2.3 Messung von Acarbose und weiteren Acarviostatin-Metabolite im Überstand von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen

---

der einzelnen Stämme werden spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit  $\sigma$  bestimmt, welche sich nach folgender Formel mit der Acarbosekonzentration  $c_{Acarbose}$  und der Biotrockenmasse (BTM) berechnet:

$$\sigma_t = \frac{c_{Acarbose,t} - c_{Acarbose,t-1}}{\left(\frac{BTM_t + BTM_{t-1}}{2}\right) \cdot (t - t_{-1})} \quad (2.1)$$

#### 2.3.2 Messung der Acarviostatin-Metabolite im Überstand von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelter Massenspektrometrie

Aufreinigung der Acarviostatin-Metabolite aus dem Kulturüberstand des Acarboseproduzent 1 bei Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen

Aufreinigung der Acarviostatin-Metabolite aus dem Kulturüberstand bei Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen Zur Vermessung der Acarviostatin-Metabolite werden 10 mL des Überstandes durch Zentrifugation bei 10.000 U/min für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgeerntet (Kühlzentrifuge 5810R mit Festwinkelrotor, Eppendorf AG). Der Überstand wird mit einem Sterilfilter (0,2  $\mu$ m Biorad Laboratories, München) gefiltert. Die Acarviostatin-Metabolite werden mittels Festphasen-Extraktion über Chromabond<sup>®</sup> Easy Säulen (Macherey-Nagel, REF 730753) angereichert. Hierzu werden die Säulen mit 3 mL Methanol (CHROMASOLV<sup>®</sup>, für HPLC, Sigma-Aldrich) equilibriert. Anschließend wird die Säule mit 3 mL Milli-Q gewaschen und sequentiell mit der Probe beladen. Um unspezifische Bindungen abzulösen wird mit 3 mL einer 95:5 % (v/v) Methanol/Wasser-Lösung (HPLC-grade) gewaschen. Für eine verbesserte Ausbeute wird zweimal mit je 1,5 mL Methanol (CHROMASOLV<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich) durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 2500 U/min eluiert (Kühlzentrifuge 5810, Eppendorf AG). Zum Schluss erfolgt die Trocknung der Probe mittels Stickstoff und die Aufnahme in 500  $\mu$ L eines 80 % (v/v) Acetonitril / 20 % (v/v) Wasser-Gemisches.

Modifizierte Aufreinigung der Acarviostatin-Metabolite aus dem Kulturüberstand Für die LC-MS basierten Analysen der Acarviostatin-Metabolite aus dem Kulturüberstand von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen wurde ein leicht modifiziertes Protokoll angewendet. Zunächst wird ein Kolben der Schüttelkolbenkultivierung entnommen,

abzentrifugiert und lyophilisiert. Für die Aufreinigung der Proben wird das Lyophilisat in Milli-Q gelöst. Analog der oben beschriebenen Festphasen-Extraktion erfolgt im nächsten Schritt die Anreicherung der Acarviostatin-Metabolite. Nach der Elution in 3 mL Methanol (CHROMASOLV<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich) erfolgt die Vermessung im Massenspektrometer.

#### Vermessung von aufgereinigten Acarviostatin-Metabolite am ESI-micrOToF-Q

Die Vermessung der ankonzentrierten Acarviostatin-Metabolite (2.3.2) erfolgt mittels LaChromUltra HPLC System (Hitachi Europe Ltd.) gekoppelt mit einem micrOToF-Q Hybrid Quadrupol *time-of-flight* Massenspektrometer (Bruker Daltonics). Zur Trennung der Acarviostatin-Metabolite dient eine Cogent Diamond Hydride<sup>™</sup> HPLC-Säule (MircoSolv Technology Corporation; 150 mm x 2,1 mm; 3  $\mu$ L Partikelgröße). Die Säule wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 400  $\mu$ L x min<sup>-1</sup> befahren. Als Laufmittel werden 50 % (v/v) Acetonitril, 50 % (v/v) H<sub>2</sub>O und 0,1 % (v/v) Ameisensäure (wässriges Laufmittel A) sowie 90 % (v/v) Acetonitril, 10 % (v/v) H<sub>2</sub>O und 0,1 % (v/v) Ameisensäure (organisches Laufmittel B) eingesetzt. Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften der Acarviostatin-Metabolite wird über das wässrige Lösungsmittel eluiert. Es wird folgender Gradient gefahren: t = 0 min 100 % Laufmittel B, t = 8 min 100 % Laufmittel A, t = 13 min 100 % Laufmittel A, t = 15,5 min 100 % Laufmittel B und t = 18 min 100 % Laufmittel B.

Zur Messung der Acarviostatin-Metabolite wird ein Massenspektrometer mit einer Elektrospray-Ionisierung (ESI)-Quelle verwendet, welche im positiven Ionisierungsmodus arbeitet. Stickstoff wird als Trocknungsgas bei 8 bar eingesetzt und wie die Kapillare auf 180 °C geheizt. Der Massenscan erfolgt in einem Bereich von 50-3000 m/z. Für die Kalibrierung des ESI-micrOToF-Q sowie für die externe Kalibrierung während der Messung wird eine 0,1 M Natriumformiat Lösung in 50 % (v/v) Isopropanol verwendet. Zur Messung wird das Eluat in ein HPLC-Vial überführt und 10  $\mu$ L in das HPLC-System eingespritzt. Die Analyse der Rohdaten erfolgt mit der Compass DataAnalysis Software (Version 4.0 SP1) der Compass<sup>™</sup>Umgebung (Bruker Daltonics). Vor der Auswertung werden die Rohdaten auf Grundlage der externen Kalibrierung einer automatischen internen Massenkalisierung unterzogen.

## 2.4 Analyse des cytosolischen und extrazellulären Proteoms von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme mittels Gel-basierter Proteomik

### 2.4.1 Isolierung extrazellulärer sowie cytosolischer Proteine von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen

Der folgende Abschnitt beschreibt die Extraktion, die Auftrennung, die Vermessung und die Identifizierung der extrazellulären sowie cytosolischen Proteine mittels Massenspektrometrie. Nach der Ernte des Zellpellets für die cytosolischen sowie des Kulturüberstands für die extrazellulären Proteine werden die Proben lyophilisiert. Dazu werden die Ansätze in der Lyophylle über mehrere Tage bei  $-60\text{ °C}$  und  $0,0003\text{ mbar}$  getrocknet (Lyophylle Alpha 1-4 LD<sub>plus</sub> Christ®). Die Extraktion der extrazellulären sowie cytosolischen Proteine folgt jeweils einer spezifischen Methode, während die Methoden der Quantifizierung, Separation, Vermessung und Identifizierung für beide Proteinfractionen anwendbar sind. Hierzu wird das Protokoll von WENDLER *et al.* (2013) verwendet.

#### Proteinquantifizierung der extrazellulären und cytosolischen Proteine

Die Quantifizierung der Proteine erfolgt mittels einer modifizierten Form des Bradford-Tests, dem Roti® Nanoquant Protein-Quantifikations-Assay. Mit dieser Methode können Proteine ab einer Konzentration von  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  detektiert werden. Für die Analyse wird eine Roti® Nanoquant-Arbeitslösung angesetzt. Hierzu wird die Stammlösung 1:5 mit Milli-Q verdünnt. Anschließend wird das rehydrierte Protein gevortext und für zehn Minuten bei Raumtemperatur (RT) sowie maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert (Tischzentrifuge 5424/5415 R, Eppendorf AG). Zur externen Kalibrierung wird eine Standardreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) aufgenommen. Die Vermessung erfolgt analog zur Proteinprobe. Je  $200\text{ }\mu\text{L}$  Milli-Q werden in Küvetten (Polystyrol, Sarstedt) vorgelegt. Daraufhin werden je  $2\text{ }\mu\text{L}$  der Probe hinzupipettiert und resuspendiert. Die Küvetten werden leicht gevortext und kurz vor der Messung mit  $800\text{ }\mu\text{L}$  der Roti® Nanoquant-Arbeitslösung versetzt. Als Leerprobe (*Blank*) wird eine Küvette mit  $1\text{ mL}$  Milli-Q gefüllt. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 590\text{ nm}$  wird im Photometer der Wert für den Protein-gebundenen Farbstoff und bei  $\lambda = 450\text{ nm}$  der Wert des ungebundenen Farbstoffs bestimmt. Die Messung erfolgt im fünffach Replikat.

#### 2.4.2 Separation und Identifizierung der Proteine aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen mit vertikalen Gelen

Die Separation der Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung sowie 2D-SDS-PAGE erfolgt nach dem Protokoll von WENDLER *et al.* (2013). Die getrennten Proteine werden im Gel anhand von kolloidalem Coomassie angefärbt und mit Trypsin (*Sequencing Grade Modified Trypsin*, Promega) direkt in der Gel-Matrix verdaut. Die Identifizierung der Proteine folgt einem modifizierten Protokoll von HANSMEIER *et al.* (2006). Dazu wird das Massenspektrometer ultrafleXtreme™ MALDI-ToF/ToF von Bruker Daltonics genutzt. Zusammengefasst werden die Proben zunächst auf ein *Target* (384-Well MTP *Anchor Chip* 800/384 von Bruker Daltonics) aufgetragen. Als Matrix dient  $\alpha$ -cyano-4-Hydroxyzimtsäure (HCCA) (Sigma®). Jeweils 1  $\mu$ L Probe wird mit 1  $\mu$ L Matrix kristallisiert. Als Standard dienen die vier Substanzen Angiotensin II, Substance P, ACTH-Clip 1-17 und ACTH-Clip 18-39. Für den Vergleich werden folgende Parameter gewählt - Enzym: Trypsin; Fehlschnittstellen: 1; Modifikationen: Carbamidomethyl (C) und dynamische Modifikationen: Oxidation (M); Peptidtoleranz:  $\pm 100$  ppm; Massen: MH<sup>+</sup> und Monoisotopisch. Für die MS/MS Messung wird eine Massentoleranz von 0,7 Dalton akzeptiert. Die erhaltenen Massenspektren, welche als Masse-Ladungsverhältnis (m/z) gegen relative Häufigkeit dargestellt werden, können über die Bruker BioTools™ Software mit der Datenbanksuchmaschine Mascot™ analysiert werden.

#### 2.4.3 Separation und Identifizierung der Proteine aus *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen mit horizontalen Gelen

Separation der Proteine in der zweiten Dimension mit horizontalen Gelen

Die quantitativen Proteomarbeiten wurden am Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald durchgeführt. Die Separation der Proteine in der ersten Dimension anhand des isoelektrischen Punktes folgte der beschriebenen Methode in WENDLER *et al.* (2013). Zur Separation der Proteine in der zweiten Dimension anhand ihres Molekulargewichts wird der HPE™ -*FlatTop Tower* (Serva Electrophoresis, Heidelberg) verwendet (*HPE - high performance electrophoresis*). Die Methode folgt den Herstellerangaben (SERVA ELECTROPHORESIS, 2015). Zur Equilibrierung werden die IPG Streifen in jeweils 5 mL einer Dithiotreitol (DTT)-Lösung und anschließend in einer Jodacetamid (IAA)-Lösung für 15 Minuten geschüttelt. Die Lösungen setzen sich aus 1,8 g Harnstoff und 5 mL Equilibrierungspuffer (IPG Strip Equilibrator, Serva)



zusammen. Für das Ansetzen der DTT-Lösung werden 50 mg DTT und für die IAA-Lösung 125 mg IAA verwendet und jeweils auf ein Gesamtvolumen von 6 mL mit Milli-Q aufgefüllt. Es werden die gebrauchsfertigen 2D HPE™ Gele (Large Gel NF 12.5 % Kit, Serva Electrophoresis) verwendet. Die Methode basiert auf der Beschreibung für den Lauf am Tag. Das Protokoll folgt den folgenden vier Schritten – Schritt 1: konstante Spannung von 100 V, 7 mA und 1 W pro Gel für 30 Minuten; Schritt 2: konstante Spannung von 200 V, 13 mA und 3 W pro Gel für 30 Minuten; Schritt 3: konstante Spannung von 300 V, 20 mA und 5 W pro Gel für 10 Minuten; Schritt 4: konstante Spannung von 1500 V, 40 mA und 30 W pro Gel für 4 Stunden und 50 Minuten. Dabei ist nach dem dritten Schritt der IPG Streifen zu entfernen.

Anschließend werden die Proteinspots mit dem Fluoreszenzfarbstoff LavaPurple™ (Serva Electrophoresis) gefärbt. Dieser Farbstoff färbt Proteine im Gel bis zu einer Mengen von  $\leq 50$  pg an (SERVA ELECTROPHORESIS, 2016). Das Vorgehen ist ein modifiziertes Protokoll zu den Herstellerangaben (SERVA ELECTROPHORESIS, 2015). Das Färben der Proteinspots erfolgt in vier Schritten – Schritt 1: Fixierung, Schritt 2 Färbung, Schritt 3 Waschen und Schritt 4 Ansäuern. Dazu werden zunächst drei Lösungen hergestellt: 1) Fixierlösung: 15 % Ethanol, 1 % Zitronensäure, 2) Färbepuffer: 6,2 g Borsäure, 1000 mL deionisiertes Wasser (VE-Wasser), mit Natronlauge auf einen sauren pH im Bereich von 10,5-11,2 eingestellt, 3) Waschlösung: 15 % Ethanol. Die drei Lösungen können bei Raumtemperatur gelagert werden. Im ersten Schritt (Fixierung) werden die Gele für eine Stunde in 250 mL Fixierlösung geschüttelt. Im zweiten Schritt wird LavaPurple™ in einem Verhältnis von 1:200 mit dem Färbepuffer gemischt und das Gel in 250 mL dieser Lösung für eine Stunde gefärbt. Darauf folgt der Waschschrift in 250 mL Waschlösung für 30 Minuten. Zum Ansäuern (Schritt 4) werden 250 mL der Fixierlösung verwendet und das Gel in der Lösung für mindestens 30 Minuten geschüttelt. Das Scannen der Gele erfolgt mit dem *GE Healthcare Typhoon TRIO - Variable Mode Imager*.

#### Auswertung mittels Delta2D 4.2 und Identifizierung differenziell exprimierter Proteine

Zur Auswertung wird die Bildanalyse Software Delta 2D 4.2 (Decodon, Deutschland) verwendet. Die Auswertung besteht aus vier Schritten, 1) Erstellung der Fusionsgele, 2) Identifizierung von Spots, 3) Quantifizierung und 4) Erstellung der Picklisten. Im ersten Schritt werden mittels der *warp*-Strategie *Group-Warping* alle Gele einer Gruppe (n=4) auf ein Gelbild gewarpt. Anschließend werden die erstellten Fusionsbilder jeder Gruppe vereint, um ein Mastergel zu erstellen. In Schritt 2 erfolgt die Identifizierung der Spots mittels Software-integriertem Detektionswerkzeug. Die Spots werden manuell

nachbearbeitet und auf alle Gelbilder exportiert. Während des dritten Schrittes werden alle Spots gelabelt, in der Software Delta 2D 4.2 automatisch quantifiziert und in Excel exportiert. Im letzten Schritt werden Picklisten von ausgewählten interessanten Spots erstellt. Die Spots werden nach Volumenprozent sortiert, um die Menge an Trypsin anzupassen. Die Pickliste wird zur EttanSpot Handling Workstation übertragen. Das Ausschneiden der ausgewählten Spots anhand der in Delta 2D erstellten Listen erfolgt mit der *EttanSpot Handling Workstation* (GE Healthcare). Die Ausrichtung der Gele beziehungsweise der Pickautomatik wird gesteuert über vorher angebrachte Markerpunkte. Abschließend kann der Pickvorgang durch erneutes einscannen der Gele überprüft werden. Für den tryptischen Verdau werden zwei unterschiedliche Konzentrationen des Enzyms eingesetzt, 1:10 für stärkere Spots (Spotvolumen  $>0,02$ ) und 1:20 Verdünnung für schwache Spots (Spotvolumen  $\leq 0,02$ ). Die Proteine werden mittels MALDI-ToF/ToF am Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald identifiziert. Hierzu wird eine kombinierte Datenbank aus allen bekannten Proteine des Organismus sowie einer *decoy*-Datenbank (ELIAS *et al.*, 2005) erstellt.

# KAPITEL 3

---

## Ergebnisse und Diskussion

---

Dieses Kapitel beschreibt die Ergebnisse des Promotionsprojektes auf unterschiedlichen *omics*-Ebenen sowie die Diskussion der durchgeführten Experimente im Rahmen von Modellen zur Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten. Dabei umfasst die Arbeit zwei Teile. Im ersten Teil wurde die Synthese von Acarbose und deren Homologe der Acarviostatin-Metabolit-Familie im AP1 untersucht. Im zweiten Teil werden die Analysen auf zwei weitere Acarboseproduzenten ausgeweitet.

### 3.1 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten im Acarboseproduzenten 1 (Teil 1)

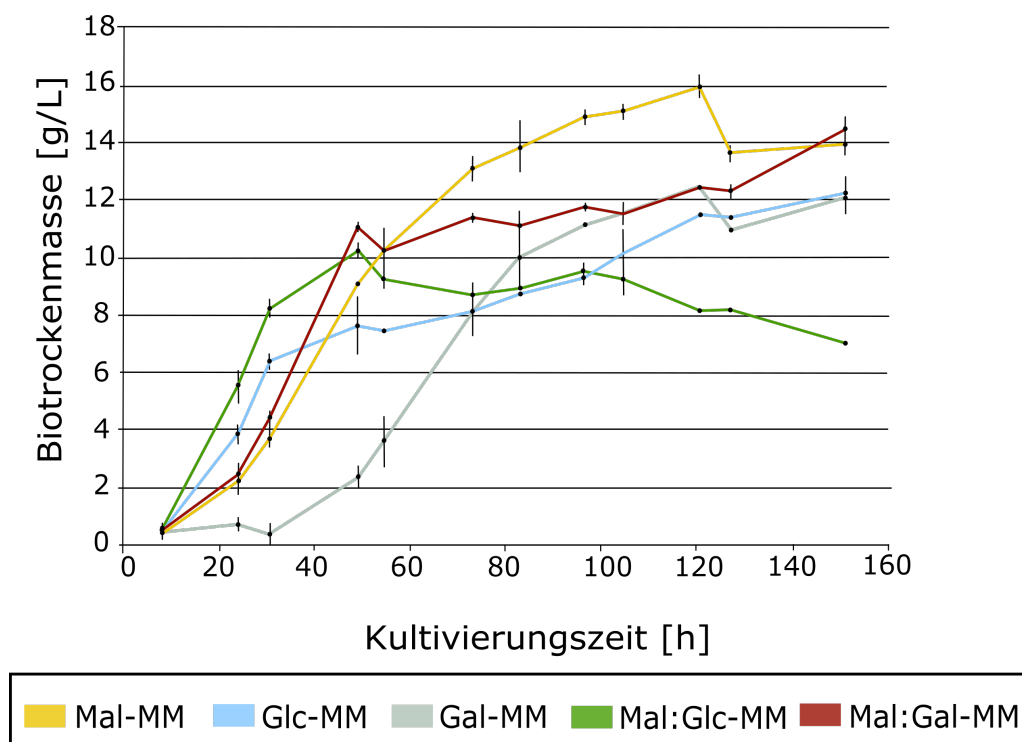
Das Ziel dieser Studie war es, die Biosynthese des Diabetes mellitus Typ 2 Medikamentes Acarviosyl-Maltose (Acarbose) sowie weiteren Acarviostatin-Metaboliten in Schüttelkolbenkulturen des Acarboseproduzenten 1 in Minimalmedium (A) supplementiert mit Maltose (Mal-MM), Glucose (Glc-MM), Galactose (Gal-MM) oder Mischungen aus Maltose/Glucose (Mal:Glc-MM) oder Maltose/Galactose (Mal:Gal-MM) zu analysieren. Teile dieser Arbeit wurden 2014 im *Journal of Biotechnology* unter dem Titel „Carbon source dependent biosynthesis of acarviosine metabolites in *Actinoplanes* sp. SE50/110“ von Wendler und Ortseifen in einer geteilten Erstautorenschaft veröffentlicht.

#### 3.1.1 Wuchsverhalten von AP1 nach Anzucht in Minimalmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der *Actinoplanes* sp. SE50/110 Wildtyp-Stamm, im Folgenden als Acarboseproduzenten 1 bezeichnet, in Minimalmedium mit definierten Zuckern kultiviert (siehe Abschnitt 2.1.2 im Methodenteil). Als Kohlenstoffquelle wurden die drei Saccharide Maltose (putativer Induktor des Genclusters), Glucose (angeblicher Repressor) und Galactose (vermeintlich neutrales Saccharid) ausgewählt. Auch erfolgte der Zusatz von Zuckermischungen, respektive Maltose-Glucose sowie Maltose-Galactose. Während der Schüttelkolbenkultivierungen wurden Kulturüberstände für die Analysen auf Metabolomebene zurückgestellt. Zur Bestimmung der Wuchsverläufe wurden Proben zu zwölf verschiedenen Zeitpunkten genommen, sprich 8, 24, 30,5, 49, 54,5, 73, 83, 96,5, 104,5, 120,5, 127 und 151 Stunden. Dabei erfolgte die Kultivierung mit jeweils drei Replikaten.

Das Wachstumsverhalten der Stämme ist ein wichtiger Parameter für die Produktion von Acarbose und deren Homologen, vor allem vor dem Hintergrund der für Sekundärmetabolite untypischen wachstumsassoziierten Produktbildung. Das Wachstum wird im Falle von mycelartig wachsenden Mikroorganismen häufig über die Biotrockenmasse bestimmt. Der Stamm AP1 wuchs unter allen untersuchten Bedingungen. In allen fünf Bedingungen wurden Biotrockenmassen zwischen 10 und 16 g/L erreicht (vergleiche Abbildung 3.1). Bei Anzucht von AP1 auf Maltose-Minimalmedium konnte im Vergleich zwischen den Konditionen die höchste Biotrockenmasse gemessen werden. Zu Beginn der Kultivierungen erreichen die Kulturen bei Wachstum auf Glc-MM (A) sowie Mal:Glc-MM (A) am schnellsten die Wuchsphase. Dies kann darauf zurückgeführt

### 3.1 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten im Acarboseproduzenten 1 (Teil 1)



**Abbildung 3.1: Wuchsverläufe des Acarboseproduzenten 1 bei Anzucht in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.** In der Abbildung sind die Biotrockenmassen über den Wuchsverlauf des Acarboseproduzenten 1 bei Anzucht auf Minimalmedium supplementiert mit Maltose (Mal-MM), Glucose (Glc-MM), Galactose (Gal-MM), Maltose/Glucose (Mal:Glc-MM) und Maltose/Galactose (Mal:Gal-MM) dargestellt. Die Kultivierungsdauer betrug 151 Stunden. Die Messpunkte sind zur Veranschaulichung mittels Linien verbunden. Die Standardabweichung als Maß für die Streuung der drei Replikate um den Mittelwert ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

werden, dass die Vorkultur im Komplexmedium mit Glucose (NBS-Medium) angezogen wurden und die Kulturen bereits an die C-Quelle adaptiert waren. Im Gegensatz dazu zeigen die Kulturen bei Wachstum auf Mal-MM (A) und Mal:Gal-MM (A) sowie insbesondere Gal-MM (A) eine für bakterielle Kultivierungen typische lag-Phase. Bei Anzucht von AP1 mit zwei C-Quellen, respektive Mal:Gal-MM (A) und Mal:Glc-MM (A) wurde nach 49 Stunden ein lokales Maximum erreicht. Während in der Kultivierung auf Mal:Gal-MM (A) anschließend ein Wachstum beobachtet wurde, sinkt die Biotrockenmasse auf Mal:Glc-MM (A) weiter ab. Demzufolge ist die Mal:Glc-MM (A) Kultivierung die einzige in der eine Absterbephase gezeigt werden konnte.

Die höchsten spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten wurden in vier Bedingungen, respektive auf Mal-MM (A), Glc-MM (A), Mal:Glc-MM (A) und Mal:Gal-MM (A),

zu Beginn der Kultivierung zwischen 8 und 24 Stunden gemessen. Auf Mal-MM (A) erreichte die Kultur eine maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ( $\mu_{max}$ ) von  $0,110 \text{ h}^{-1}$  und damit einhergehend eine Verdopplungszeit ( $t_d$ ) von 6,3 h. Die Werte lagen für die Kultivierungen auf Glc-MM (A) bei  $\mu_{max} = 0,137 \text{ h}^{-1}$  und  $t_d = 5,0 \text{ h}$ , auf Mal:Glc-MM (A) bei  $\mu_{max} = 0,150 \text{ h}^{-1}$  und  $t_d = 4,6 \text{ h}$  und auf Mal:Gal-MM (A) bei  $\mu_{max} = 0,106 \text{ h}^{-1}$  und  $t_d = 6,6 \text{ h}$ . Im Gegensatz dazu wurde bei der Kultivierung auf Gal-MM (A) nach einer über 24 Stunden andauernden lag-Phase erst zwischen 30,5 und 49 Stunden die höchste spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{max} = 0,093 \text{ h}^{-1}$  und demzufolge eine Verdopplungszeit von  $t_d = 7,5 \text{ h}$  erreicht.

Das Wachstum war kongruent zur ermittelten zellulären Atmung von AP1, welche in Vorversuchen mit phänotypischen Mikroarrays untersucht wurde. Phänotypische Mikroarrays (PMs) ermöglichen die Analyse des Katabolismus von zum Beispiel Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor oder Schwefel. Um die zelluläre Atmungsfunktion aufzuzeichnen wird sich zum einen der Elektronentransport und zum anderen die Farbänderung eines Stoffes zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand zu Nutze gemacht. Die Atmung von AP1 auf 192 verschiedenen C-Quellen wurde über einen Zeitraum von 144 Stunden aufgezeichnet. Unter den 25 besten Kohlenhydratquellen konnten zahlreiche Saccharide gefunden werden, unter anderem auch D-Galactose,  $\alpha$ -D-Glucose und D-Maltose (siehe Tabelle A.1 im Anhang). Dabei zeigte sich kongruent zum Wachstum eine bessere Atmung auf  $\alpha$ -D-Glucose im Vergleich zu D-Maltose. Jedoch konnte die beste Atmung im Vergleich zwischen den drei Bedingungen auf Galactose beobachtet werden, was im Gegensatz zum Wuchsverhalten steht.

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass AP1 auf allen definierten C-Quellen wachsen kann. Alle Kultivierungen zeigten in der Wachstumsphase einen linearen Verlauf. Dieses Wuchsverhalten konnte bereits in anderen Kultivierungen beobachtet werden (HÜRTGEN, 2011; ORTSEIFEN, 2012; DROSTE, 2015). In einer Veröffentlichung mit identischen Anzuchtbedingungen konnten Biotrockenmassen vom *Actinoplanes* sp. SE50/110 Wildtyp-Stamm bei Wuchs auf Mal-, Glc-, Mal:Glc- und Mal:Gal-MM zwischen 10 und 15 g/L erreicht werden, was sich mit den hier dargestellten Ergebnissen deckt (ORTSEIFEN, 2012). Bei der Kultivierung auf Minimalmedium A mit Galactose (Gal-MM (A)) liegen die Werte für die Biotrockenmassen in der Publikation bei lediglich 7 g/L und zeigte damit das schlechteste Wachstum im Vergleich zwischen den fünf Bedingungen (ORTSEIFEN, 2012). Die in dieser Arbeit dargestellten Wuchsverläufe zeigen bei Wachstum auf Gal-MM (A) nach einer verlängerten lag-Phase ein vergleichbares Wachstum zu den anderen vier Konditionen, sprich Mal-, Glc-, Mal:Glc- und Mal:Gal-

MM (siehe Abbildung 3.1). Jedoch zeigte die Kultivierung bei Wuchs auf Gal-MM (A) die geringste spezifische Wachstumsgeschwindigkeit.

Die maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten in dem Bereich von  $\mu_{max} = 0,093 \text{ h}^{-1}$  (Gal-MM (A)) bis  $0,150 \text{ h}^{-1}$  (Mal:Glc-MM (A)) sind höher als die wenigen vorhandenen Referenzwerte (HÜRTGEN, 2011). In einer Veröffentlichung konnte für den *Actinoplanes* sp. SE50/110 Wildtyp-Stamm bei Wachstum auf Maltose-Minimalmedium (A) Werte von  $\mu_{max} = 0,08 \text{ h}^{-1}$  in der Wachstumsphase gezeigt werden (HÜRTGEN, 2011). Für *Streptomyces coelicolor* A3(2) wurden maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten von  $\mu_{max} = 0,30 \text{ h}^{-1}$  postuliert (COX, 2004). In Modellierungen des Metabolismus von *Streptomyces coelicolor* A3(2) wurden Werte für  $\mu_{max}$  von  $0,022 \text{ h}^{-1}$  -  $0,056 \text{ h}^{-1}$  bei Wachstum auf Glucose mit unterschiedlichen Stickstoffquellen berechnet (BORODINA, KRABBen und NIELSEN, 2005). Damit korrelierend liegen die minimalen Verdopplungszeiten für AP1 mit 4,6 h bis 7,5 h unter den für diesen Stamm publizierten Literaturwerte von 8,5 Stunden (HÜRTGEN, 2011), aber entsprechen den für *Streptomyces* veröffentlichten Werten von  $t_d = 4 - 6$  Stunden (SHEPHERD *et al.*, 2010). In einer Veröffentlichung wurde neben dem Wachstum von AP1 auf Minimalmedium supplementiert mit Maltose (Mal-MM), Glucose (Glc-MM), Galactose (Gal-MM), Maltose/Glucose (Mal:Glc-MM) und Maltose/Galactose (Mal:Gal-MM) auch die Acarbosekonzentrationen im Kulturüberstand gemessen (ORTSEIFEN, 2012). Es wurde gezeigt, dass Acarbose nur in wesentlichen Mengen in Kulturen nachgewiesen wurde, in denen Maltose in dem Minimalmedium vorhanden war. In der Publikation wurde in anschließenden Proteomexperimenten gezeigt, dass das *acb*-Gencluster unter allen Wachstumsbedingungen exprimiert wurde (ORTSEIFEN, 2012). Dies wirft die Frage auf, welche Funktion die exprimierten *acb*-Gene in Kulturen bei Wachstum in Minimalmedium mit Glucose oder Galactose als einzige Kohlenstoffquelle besitzen. Aus der Literatur ist bekannt, dass *Actinoplanes* sp. SE50/110 in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle unterschiedliche Acarviostatin-Metabolite produziert (SCHMIDT *et al.*, 1977; FROMMER *et al.*, 1979).

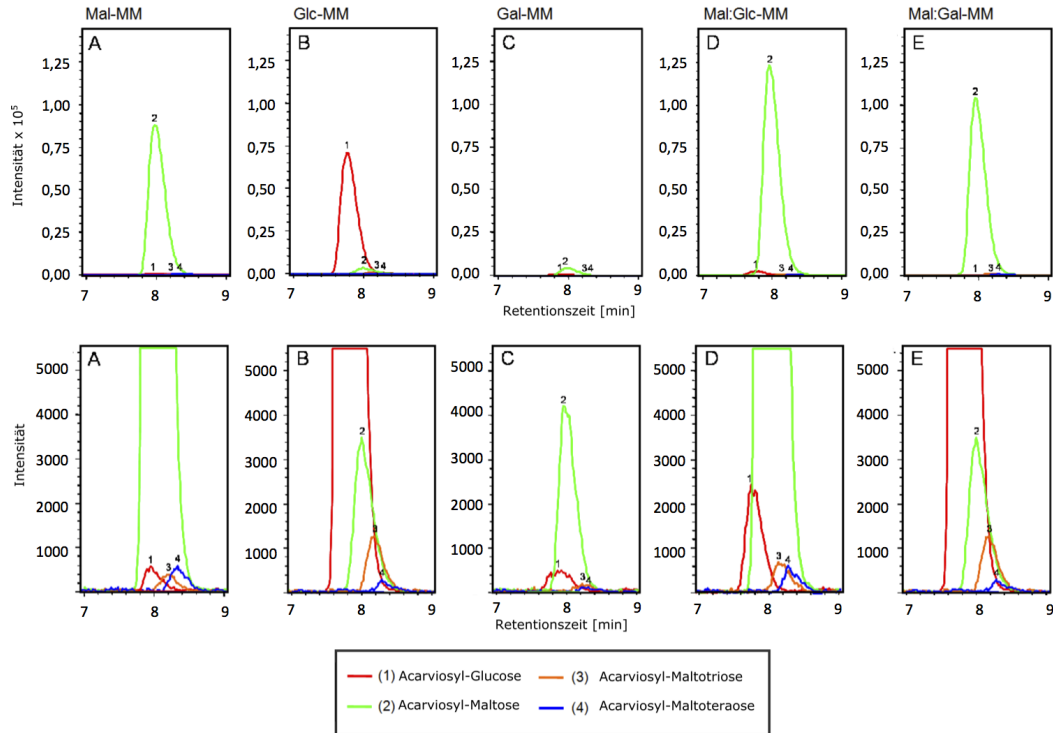
### 3.1.2 Bestimmung der extrazellulären Acarviostatin-Metabolite im Kulturüberstand vom AP1 nach Anzucht in Minimalmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen

Um die Dependenz zwischen angebotener C-Quelle und gebildeten Acarviostatin-Metabolite genauer zu untersuchen, wurde zunächst ein Verfahren zur Detektion dieser Metabolite entwickelt. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen konnte das bis dato verwendete Verfahren zur Detektion von Acarbose nicht für die Identifizierung von Acarviostatin-Metaboliten erweitert werden. Die Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie hat den Vorteil, dass keine Referenzsubstanzen erforderlich waren. Des Weiteren erlaubt die Methode basierend auf der Bestimmung von zwei Parametern, genauer der Retentionszeit sowie dem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ), die Detektion von co-eluierenden Substanzen (ELMASHNI, 2013).

Die Kulturen wurden zu einem Zeitpunkt in der Wachstumsphase beprobt, an dem ähnliche Biotrockenmassen zu erwarten waren. Diese Zeitpunkte waren 54,5 Stunden bei Wachstum der Kultur auf Maltose-, Glucose-, Maltose / Glucose- und Maltose / Galactose-Minimalmedium sowie 73 Stunden bei Anzucht von AP1 auf Galactose-Minimalmedium (vergleiche Abbildung 3.1). Die Acarviostatin-Metabolite wurden aus dem Kulturüberstand isoliert (siehe Abschnitt 2.3.2 Seite 25 im Methodenteil). Die angereicherten Acarviosyl-Zucker (Ac = Acarviosyl-Einheit ;  $C_{13}H_{28}NO_3$ ) wurden mit einer HPLC gekoppelten ESI-microTOF-Q vermessen. Es wurden die Massenspuren folgender Acarviostatin-Metabolite detektiert: Acarviosyl-Monosaccharid (Ac- $C_6H_{11}O_5$ )  $m/z$   $484,2022 \pm 0,1$ , Acarviosyl-Disaccharid (Ac- $C_{12}H_{21}O_{10}$ )  $m/z$   $646,2541 \pm 0,1$ , Acarviosyl-Trisaccharid (Ac- $C_{18}H_{31}O_{15}$ )  $m/z$   $808,3101 \pm 0,1$  und Acarviosyl-Tetrasaccharid (Ac- $C_{24}H_{41}O_{20}$ )  $m/z$   $970,3636 \pm 0,1$ . Die Annotation der Peaks wurde anhand des Vergleichs der theoretisch berechneten Massen mit den  $m/z$ -Werten der Messung durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Zuordnung der  $m/z$ -Werte zu Acarviostatin-Metaboliten anhand des Vergleichs der Massen von auf  $^{14}N$  und  $^{15}N$  gewachsenen *Actinoplanes* sp. SE50/110 Kulturen verifiziert. Die Validierung erfolgte aufgrund einer 1 Dalton Massenverschiebung, welche durch das einzelne Stickstoffatom der glykosidischen Bindung innerhalb der Acarviosyl-Einheit evoziert wird. Mit dem Wissen, dass diese Herangehensweise keine definitive Bestätigung für die Identifizierung eines Moleküls darstellt, vor allem mit der Kenntnis über mögliche isomere Strukturen, wurde die Annahme getroffen, dass in der Gruppe der Acarviosyl-Monosaccharide neben weiteren Isomeren Acarviosyl-Glucose als Hauptprodukt gebildet wird. Diese Prämisse wurde analog auch



### 3.1 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten im Acarboseproduzenten 1 (Teil 1)



**Abbildung 3.2: Extrahierte Ionenchromatogramme der detektierten Acarviostatin-Metabolite aus den Überständen des Acarboseproduzenten 1 bei Wuchs auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.** Nach Kultivierung im komplexen NBS-Vorkulturmedium (WENDLER *et al.*, 2013) wurden die Kulturen in Minimalmedium mit definierten C-Quellen kultiviert. Dabei wurden äquivalente C-Mol Mengen der Zucker Maltose (Mal-MM; A1 & A2), Glucose (Glc-MM; B1 & B2), Galactose (Gal-MM; C1 & C2) sowie der Zuckermischungen Maltose & Glucose (Mal:Glc-MM; D1 & D2) und Maltose & Galactose (Mal:Gal-MM; E1 & E2) eingesetzt. Um auch kleinere Peaks darzustellen zeigen die Grafiken A2-E2 eine Vergrößerung der Abbildungen A1-E1. Die abgebildeten, nummerierten Peaks 1-4 zeigen die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC's). Dabei gibt die Nummer des Peaks auch gleichzeitig die Anzahl der an die Acarviosyl-Einheit angehängten Glucose-Einheiten wieder, sprich die  $[M+H]^+$  Massen (1)  $m/z$   $484,2054 \pm 0,1$  (rot, Acarviosyl-Glucose), (2)  $m/z$   $646,2542 \pm 0,1$  (grün, Acarviosyl-Maltose), (3)  $m/z$   $808,3101 \pm 0,1$  (orange, Acarviosyl-Maltotriose) und (4)  $m/z$   $970,3636 \pm 0,1$  (blau, Acarviosyl-Maltotetraose).

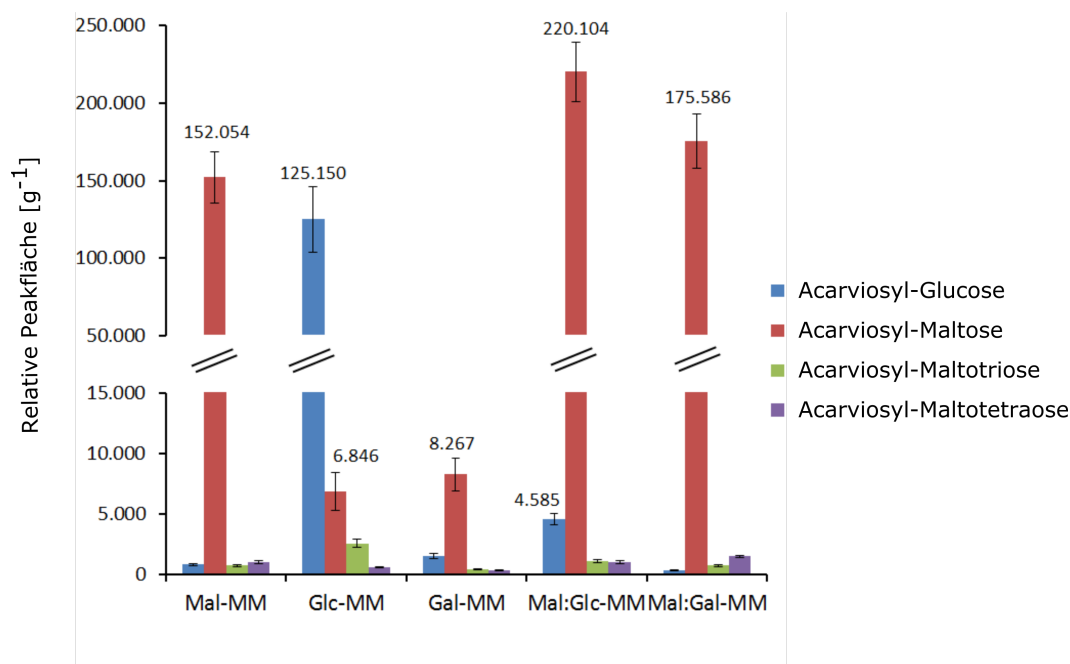
auf die drei weiteren Gruppen übertragen und damit die Acarviostatin-Metabolite Acarviosyl-Maltose (Acarbose), Acarviosyl-Maltotriose und Acarviosyl-Maltotetraose als überwiegend produzierte Acarviostatin-Metabolite ausgewiesen.

Die Resultate der vermessenen Acarviostatin-Metabolite im Kulturüberstand von *Actinoplanes* sp. SE50/110 zeigten unterschiedliche Metabolitspektren zwischen den fünf Bedingungen, respektive Mal-MM, Glc-MM, Gal-MM sowie Mal:Glc-MM, Mal:Gal-MM. Es konnten alle vier hier analysierten Acarviostatin-Metabolite, genauer gesagt Acarviosyl-Glucose bis Acarviosyl-Maltotetraose, detektiert werden (siehe Abbildung 3.2). Des Weiteren konnten Differenzen in der Intensität der Peaks festgestellt werden. Um die Dependenz vom Kultivierungsverlauf auszugleichen, wurden die Peakflächen auf die Biotrockenmassen normalisiert (siehe Abbildung 3.3).

Anhand der Daten wurde ersichtlich, dass die Acarviostatin-Metabolite grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt werden können - die Hauptkomponenten sowie die Nebenkomponten. Dabei waren die Mitglieder der zuletzt genannten Gruppe in der Intensität ihrer relativen Peakflächen um ein Vielfaches geringer als die gebildeten Hauptkomponenten. Es zeigte sich deutlich, dass unter Zusatz von Maltose zum Minimalmedium die Hauptkomponente immer Acarviosyl-Maltose (Acarbose) darstellte, während bei Wuchs von AP1 auf Glucose-Minimalmedium Acarviosyl-Glucose (Komponente 2) als Hauptkomponente detektiert wurde. Weiterhin konnte bei Wuchs auf Galactose-Minimalmedium nur Nebenkomponten und keine Hauptkomponente identifiziert werden. Unter Anzucht von AP1 auf Minimalmedium unter Zusatz von Zuckermischungen wurde erstaunlicherweise nur eine Hauptkomponente synthetisiert. Dabei zeigte sich sowohl bei Supplementation von Maltose und Glucose als auch bei Maltose und Galactose Acarviosyl-Maltose (Acarbose) als Hauptkomponente.

Bislang wurde davon ausgegangen, dass lediglich Acarbose intrazellulär durch *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämme synthetisiert wird, während das beobachtete Spektrum an Nebenkomponten aus der Aktivität der Acarviosyltransferase AcbD im extrazellulären Raum resultiert (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; ROCKSER und WEHMEIER, 2009; WENDLER *et al.*, 2013). Aufgrund der konzipierten Experimente mit definierten Kohlenstoffquellen in Minimalmedium muss die Bildung aller Acarviostatin-Metabolite innerhalb der Zelle erfolgen. Dies begründet sich vor allem durch das Auftreten höherer Acarviostatin-Metabolite wie zum Beispiel Acarviosyl-Maltotetraose bei Wuchs der Kultur auf Glc-MM. Das Anhängen von Glucose-Einheit an Acarviostatin-Metabolite im Secretom wäre kein energieneutraler Prozess. Infolge der hohen negativen freien Energie ( $-\Delta G$ ) der Hydrolysereaktion können Polysaccharide nicht spontan aus freien

### 3.1 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten im Acarboseproduzenten 1 (Teil 1)



**Abbildung 3.3: Die Produktion von extrazellulären Acarviostatin-Metabolite bei Wuchs des Acarboseproduzenten 1 auf Minimalmedium mit unterschiedlichen C-Quellen.** Die dargestellten relativen Peakflächen von Acarviostatin-Metaboliten wurden durch Normalisieren der Peakflächen der extrahierten Ionenchromatogramme auf die Biotrockenmassen berechnet. Gemessene Acarviostatin-Metaboliten Spektrum werden für den Acarboseproduzent 1 bei Wachstum in Minimalmedium supplementiert mit Maltose (Mal-MM), Glucose (Glc-MM), Galactose (Gal-MM), Maltose/Glucose (Mal:Glc-MM) und Maltose/Galactose (Mal:Gal-MM) dargestellt. Die Standardabweichungen sind angegeben (n = 4).

Monosacchariden synthetisiert werden (ALLBY, 1998). Daher kann das Vorkommen von höheren Acarviostatin-Metaboliten bei Wuchs auf Mono- sowie Disacchariden nur durch eine intrazelluläre Reaktion erklärt werden. Diese Tatsache ließ schlussfolgern, dass AcbD lediglich durch Austausch von Zuckern, sprich Transglykosylierungsreaktion, das Acarviostatin-Metabolit-Spektrum modifizieren kann.

In Arbeiten von SCHMIDT *et al.* (1977) und FROMMER *et al.* (1979) wurde postuliert, dass in Anwesenheit von Maltose und Glucose überwiegend kurze Homologe, wie die Komponente 2 oder Acarbose, gebildet werden, während Stärke zur Formation von längeren Komponenten führt (vergleiche Abschnitt 1.2.2). Die hier dargestellten Resultate spezifizieren die publizierten Ergebnisse. Basierend auf den Resultaten konnte deduziert werden, dass die Bildung von Haupt- und Nebenkompenten in direkter Abhängigkeit zur angebotenen C-Quelle steht. Dabei kann Acarbose ebenfalls die

Rolle als Nebenkomponente einnehmen, wenn beispielsweise ausschließlich Glucose angeboten wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nicht nur Acarbose intrazellulär synthetisiert wird. Aufgrund der Resultate wurden die Arbeiten an der Entwicklung eines neuen Modells zur Skizzierung der Synthese von Haupt- sowie Nebenkomponenten durch AP1 motiviert.

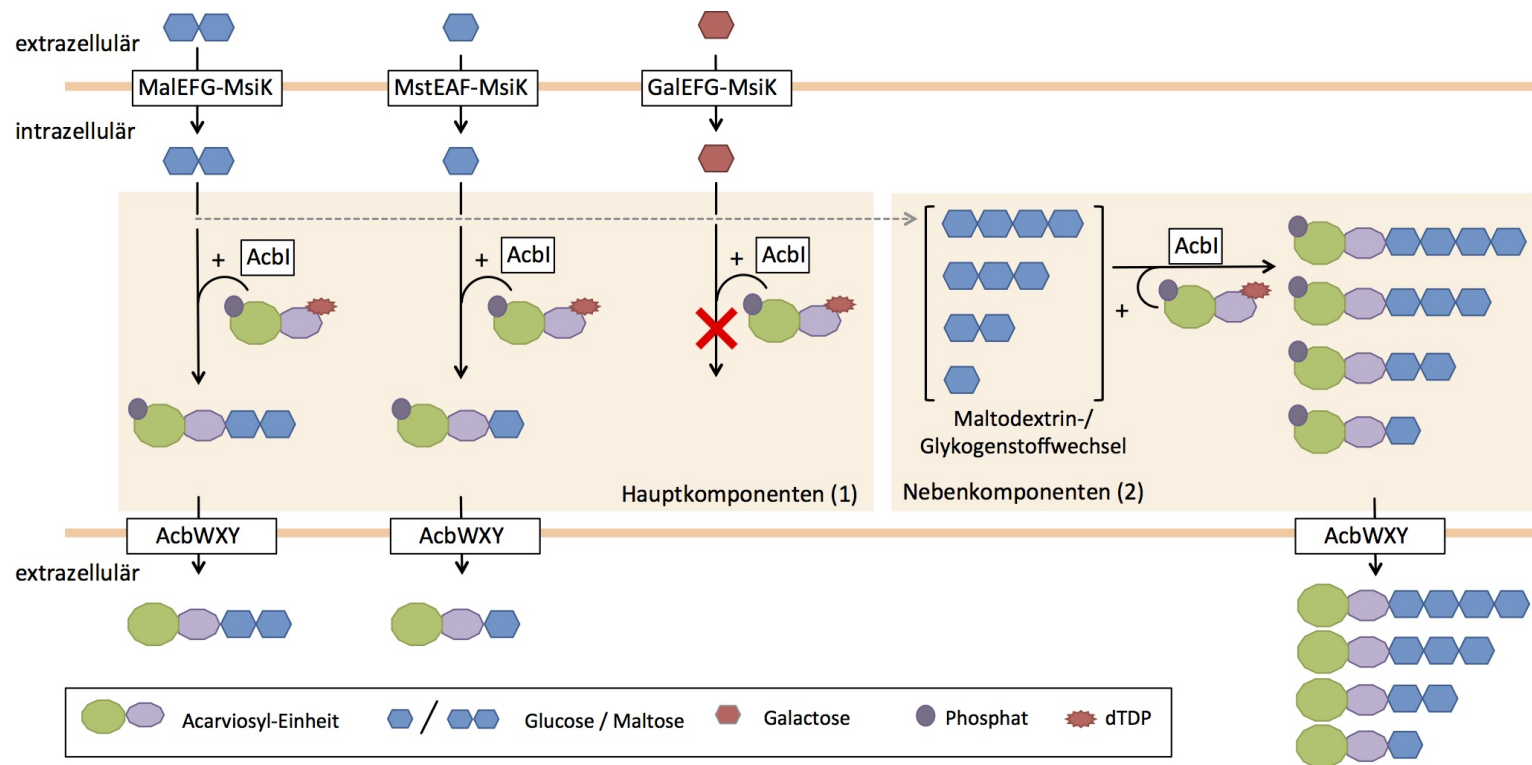
#### 3.1.3 Modellvorstellung über die Bildung von Haupt- sowie Nebenkomponenten der Acarviostatin-Metabolite durch AP1

Das neue Modell stellt drei Erkenntnisse heraus: I) die intrazelluläre Bildung von Acarviostatin-Metaboliten, II) die direkte Abhängigkeit zur angebotenen C-Quelle sowie III) die Synthese von Haupt- und Nebenkomponenten. Ausgehend von der zuvor veröffentlichten Modellvorstellung von ZHANG *et al.* (2002) und WENDLER *et al.* (2013) wurde die intrazelluläre Biosynthese von Acarbose aus Seduheptulose-7-Phosphat und Glucose-1-Phosphat übernommen. Weiterhin wurde der vorgeschlagene finale Schritt der direkten Glykosylierung von dTDP-Acarviose-7-Phosphat sowie der anschließende Export aus der Zelle von Wehmeier und Piepersberg (2004) in das Modell aufgenommen. Um die Komplexität der Darstellung zu reduzieren und auf die Hauptaussagen zu beschränken, wurde von der Darstellung der Transglykosylierung im Außenraum (HEMKER *et al.*, 2001), dem Reimport in die Zelle (BRUNKHORST *et al.*, 2005; WENDLER *et al.*, 2013) sowie dem intrazellulären Recycling des Pseudotetrasaccharids abgesehen (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004).

Das vorgeschlagene Modell zur Bildung von Acarviostatin-Metaboliten in AP1 sieht vor, dass der Zucker zunächst anhand verschiedener ABC-Transporter in die Zelle importiert wird (siehe Abbildung 3.4).

**Aufnahme von Glucose - MstEAF-MsiK** Auf Grundlage von Proteomarbeiten zeigte sich, dass **MstEAF** (ACPL\_858-860) bei Anzucht auf Glucose als C-Quelle als einziger dominanter Transporter identifiziert werden konnte (WENDLER *et al.*, 2015; WENDLER *et al.*, 2016). Demzufolge wurde der Monosaccharid-Transporter als Importer für Glucose postuliert (WENDLER *et al.*, 2016). Weitere Glucose-Aufnahmesysteme im Acarboseproduzenten 1 sind derzeit nicht bekannt.

In dem Operon des Monosaccharid-Transporters **MstEAF** konnten kein für den ABC-Transport essentielles ATP-Bindeprotein detektiert werden. Analog zu den Beschreibungen der ABC-Transporter AgleFG sowie MalEFG (WENDLER *et al.*, 2013) wird davon ausgegangen, dass diese Funktion von **MsiK** (ACPL\_8014) übernommen wird. Die ATP-Bindungskomponente **MsiK** wurde erstmals in *Streptomyces lividans* nachgewiesen (HURTUBISE *et al.*, 1995) und ist in eine Vielzahl von ATP-abhängigen Transportprozessen in *Streptomyces* involviert (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Weiterhin wurde die mRNA des Gens *msiK* in RNASeq Daten bei Anzucht vom *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stamm auf Maltose und Glucose detektiert (WENDLER *et al.*, 2013; SCHWIENSTEK *et al.*, 2013).



**Abbildung 3.4: Modellvorstellung über die Synthese von Haupt- und NebenkompONENTEN der Acarviostatin-Metabolit-Familie durch den Acarboseproduzenten 1.** Das Modell übernimmt die in der Literatur beschriebenen Annahmen über die initiale intrazelluläre Biosynthese der Acarviostatin-Metabolite, den vorgeschlagenen finalen Schritt der direkten Glykosylierung von dTDP zur Aktivierung von Acarviose-7-Phosphat und dem anschließenden Export aus der Zelle (Wehmeier und Piepersberg, 2004). In (1) ist die Bildung von Hauptkomponenten und in (2) die Bildung von NebenkompONENTEN dargestellt. In der Modellvorstellung liegt der Hauptunterschied in der Herkunft der variablen Saccharideinheit. Während die angebotene C-Quelle die Hauptkomponente bestimmt, werden die NebenkompONENTEN aus den Zuckern des Maltodextrin-/Glykogenmetabolismus entnommen.

**Aufnahme von Galactose - GaleFG-MsiK** Für den Transport von Galactose in die Zelle wird ein weiterer Importer postuliert, respektive der ABC-Transporter **GaleFG**. Dieser Transporter ist in unmittelbarer Nachbarschaft zum *acb*-Biosynthesegencluster lokalisiert (vergleiche Abschnitt 1.3.1). In einer wissenschaftlichen Studie von LICHT *et al.* (2010) konnte gezeigt werden, dass die Genprodukte von *acpl\_3685-3687* nicht für einen Acarviostatin-Importer kodieren, sondern eine Funktion in dem Transport von Galactose inne haben. Basierend auf Kristallstrukturanalysen und Bindeassays zum Bindeprotein des ABC-Transporters konnte belegt werden, dass weder Galactose-basierte Di- oder Trisaccharide noch Monosaccharide wie D-Xylose als Substrate mit [<sup>14</sup>C]-Galactose um die Bindung konkurrieren können (LICHT *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass das gefaltete Gale (früher AcbH) Acarbose oder längere Homologe nicht bindet. Die Aufnahme von Galactose durch den ABC-Transporter **GaleFG** erfolgt unter Verbrauch von ATP und demzufolge analog zur Glucose-Aufnahme putativ unter Beteiligung des multiplen Zuckerimport-Proteins **MsiK** als ATPase Untereinheit.

**Aufnahme von Maltose - MaleFG-MsiK** Für die Aufnahme von Maltose wird ein dritter ABC-Transporter, respektive **MaleFG** (ACPL\_6400-6402), vorgeschlagen. Diese Annahme stützt sich auf die Resultate der Charakterisierung von Maltose sowie Maltotriose Transport im Acarbose-produzierenden Stamm *Actinoplanes* sp. SN223/29 von BRUNKHORST *et al.* (2005). Auf Grundlage ihrer wissenschaftlichen Arbeit wurde die Existenz zweier dominanter Maltodextrin-Transportsysteme postuliert (BRUNKHORST *et al.*, 2005). Insgesamt konnten zwei Maltodextrin-Aufnahmesysteme innerhalb des Genoms von *Actinoplanes* sp. SE50/110 beschrieben werden, **MaleFG** und AgIEFG (WENDLER *et al.*, 2013). Dem ABC-Transporter MaleFG wurde die Rolle als Acarbose-sensitiver Transporter von Maltose und zur Wiederaufnahme von Acarbose-basierten Metaboliten zugeschrieben (WENDLER *et al.*, 2013). Basierend auf der Genomannotation wird eine hohe Affinität vom Bindeprotein Male für Maltose indiziert (WENDLER *et al.*, 2013). Das Maltose-Transportsystem wurde außerdem bereits in verschiedenen Gram-positiven Bakterien beschrieben, respektive *S. coelicolor* (VAN WEZEL *et al.*, 1997) und *S. lividans* (SCHLÖSSER, WEBER und SCHREMPF, 2001). Analog zur Glucose- sowie Galactose-Aufnahme kann das multiple Zuckerimport-Protein **MsiK** als ATPase Untereinheit für den ABC-Transporter fungieren (WENDLER *et al.*, 2013).

**Direkte Glykosylierung der C-Quelle - AcbI** Nach der Aufnahme der Zucker können diese intrazellulär als variable Saccharideinheit an die Acarviosyl-Einheit durch **AcbI**

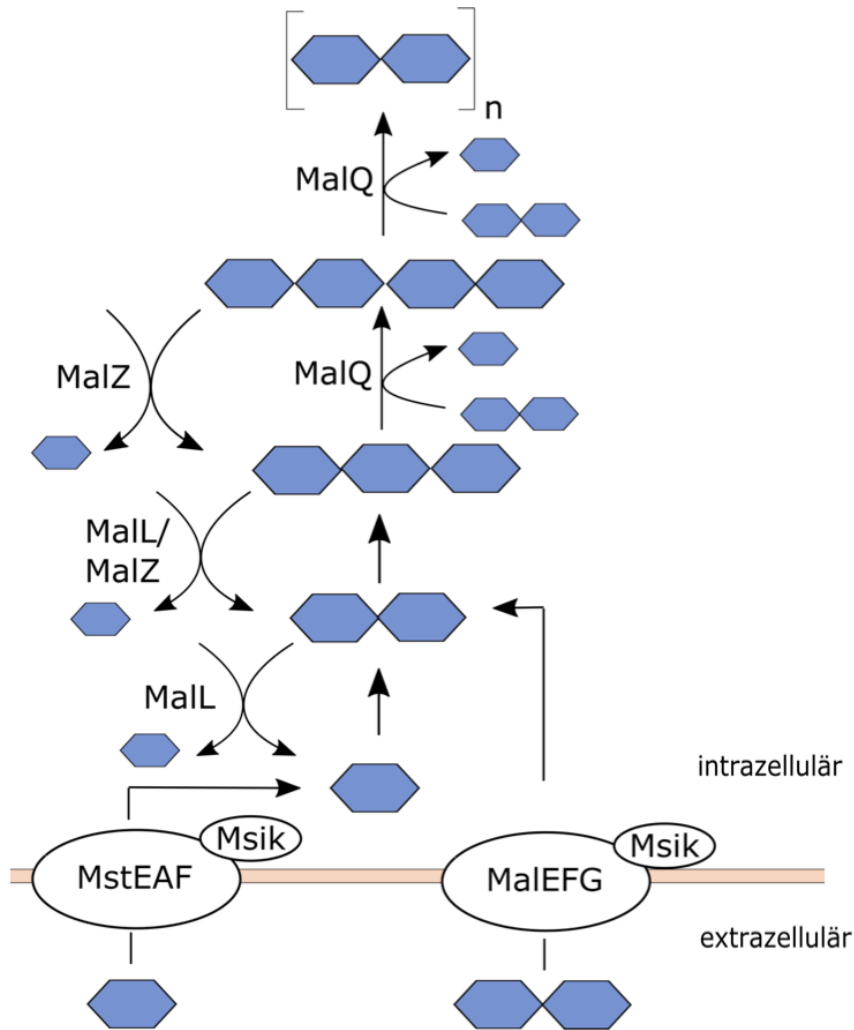
angehängt werden (WENDLER *et al.*, 2013). Bislang gibt es keine Hinweise darauf, dass zur Inkorporation der variablen Saccharideinheit durch das Enzym **AcbI** aktivierte Zucker benötigt werden (LEE *et al.*, 1997). Das in dieser Reaktion gebildete Acarviostatin-Metabolit wird als Hauptkomponente bezeichnet. Bei Wachstum von AP1 auf Galactose-Minimalmedium kann das Disaccharid nicht zur direkten Glykosylierung genutzt werden, was zur Abwesenheit einer entsprechenden Hauptkomponente führt. Die einzige Differenz in der Struktur von Galactose und Glucose ist die axiale statt der äquatorialen Position der C<sub>4</sub>-Hydroxygruppe. Analog zur Präferenz der Acarviostyltransferase AcbD (HEMKER *et al.*, 2001) ist das Disaccharid höchstwahrscheinlich kein Substrat des Enzyms **AcbI**.

**Export der Acarviostatin-Metabolite in den Außenraum - AcbWXY** Nach der intrazelluläre Synthese der Acarviostatin-Metabolite werden diese durch den ABC-Exporter **AcbWXY** in den Außenraum exportiert (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; WENDLER *et al.*, 2013). Die Gene des ABC-Transporters sind innerhalb des *acb*-Genclusters kodiert und besitzen eine hohe Sequenzhomologie zu den anderen Acarbose-Exportern in den Biosyntheseclustern von *Streptomyces glaucescens* GLA.O (VAHEDI-FARIDI *et al.*, 2010) sowie *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 (GUO *et al.*, 2012). Aufgrund der Dephosphorylierung der Acarviostatin-Metabolite während des Transportes wird keine zusätzliche ATPase-Einheit für den Transport postuliert (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; WENDLER *et al.*, 2013).

**Synthese von Nebenkomponenten** Des Weiteren skizziert das Modell die Synthese von Nebenkomponenten. Wie in Abschnitt 3.1.2 dargelegt, konnten in allen Bedingungen stets vier Acarviostatin-Metabolite identifiziert werden, wovon drei in geringeren Mengen vorlagen. Durch die Abwesenheit von entsprechenden Zuckern im Medium der Kultur wird davon ausgegangen, dass die variablen Saccharideinheiten für die Synthese solcher Acarviostatin-Metabolite intrazellulär gebildet werden. Demzufolge wird zunächst die angebotene C-Quelle aufgenommen und in der Zelle im Kohlenhydratmetabolismus verstoffwechselt. Die Kohlenstoffquelle kann anschließend für den Aufbau von Biomasse sowie weiteren Sekundärmetaboliten genutzt werden. Im Kontext der Generierung von Biomasse sowie dem Aufbau von Energiespeichern wie Glykogen können weitere Saccharide gebildet werden.

**Der Maltodextrin- / Glykogenstoffwechsel - MalL, MalZ, MalQ** Der Maltodextrin- / Glykogenstoffwechsel in *Actinoplanes* sp. SE50/110 ist bislang nicht detailliert erforscht.





**Abbildung 3.5:** Modell des Maltodextrin-/ Glykogen-Stoffwechsels in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Gennamen sind folgenden Enzymen zuzuordnen: MalZ – Maltodextrin Glucosidase, MalQ – Amylomaltase, MalL –  $\alpha$ -Glucosidase/Maltase, MstEAF – Glucose-Transporter, MalEFG – Maltose-Transporter, MsiK – ATPase-Untereinheit des ABC-Transporters.

Jedoch können die Genomannotation sowie Studien in anderen Bakterien, respektive *E. coli* (BOOS und SHUMAN, 1998; DIPPEL *et al.*, 2005) sowie *C. glutamicum* (SEIBOLD, WURST und EIKMANN, 2009), eine Vorstellung über den Ablauf geben (siehe Abbildung 3.5). Ausgehend von Maltotriose werden intrazellulär höherwertige Maltodextrine unter Freisetzung von Glucose synthetisiert. Diese Reaktionen werden durch die Amylomaltase **MalQ** katalysiert. Für den Aufbau von höherwertigen Maltodextrinen wird Maltose als Co-Substrat benötigt (SEIBOLD, WURST und EIKMANN, 2009). Maltotriose gilt als kleinstmögliches Substrat für Amylomaltasen und als essentiell für die Aktivierung dieser Enzyme (BOOS und SHUMAN, 1998). Neben der Rolle in der Synthese von Maltodextrinen gilt Maltotriose auch als Faktor für die Induktion der *mal*-Gene, insbesondere *malZ*, *acpl\_4500*, *malQ*, *acpl\_3674* sowie *malP* (RAIBAUD und RICHET, 1987; BOOS und SHUMAN, 1998; DIPPEL und BOOS, 2005; LENGSELD *et al.*, 2009). Des Weiteren konnten Studien in *E. coli* zeigen, dass der Mikroorganismus in Abwesenheit von endogenen Maltodextrinen nicht auf Maltose wachsen kann (BOOS und SHUMAN, 1998). Der Aufbau von Maltose und Maltotriose könnte in einer reversiblen Hydrolysereaktion durch **MalL** (ACPL\_2547) sowie **MalZ** synthetisiert werden. Auf die Reaktion wird in Abschnitt 3.2.5 näher eingegangen. Neben dem Aufbau von Maltodextrinen wird ebenfalls dessen Abbau durch **MalL** sowie **MalZ** sowie den Import von Glucose und Maltose durch die beiden ABC-Transporter **MstEAF** und **MalEFG** im Modell skizziert.

**Der Katabolismus von Galactose - GalK, GalT, GalE** Der Katabolismus von Galactose erfolgt über den Leloir-Metabolismus (HOLDEN, RAYMENT und THODEN, 2003). Ausgehend von  $\alpha$ -D-Galactose erfolgt unter ATP-Verbrauch die Bildung von  $\alpha$ -D-Galactose-1-Phosphat katalysiert durch die Galactokinase (2.7.1.6, - *galK*, *acpl\_7779*). Im nächsten Schritt erfolgt der Umbau zu UDP-Galactose und anschließend zu UDP-Glucose. An der Reaktion sind die Enzyme Galactose-1-Phosphat-Uridyltransferase (2.7.7.12, *galT*, *acpl\_901*) und die UDP-Glucose-4-Epimerase (5.1.3.2, *galE*, *acpl\_7036*, *acpl\_7778*) beteiligt (HOLDEN, RAYMENT und THODEN, 2003).

Die im Maltodextrin- /Glykogenstoffwechsel sowie dem Leloir-Metabolismus gebildeten Zucker können als variable Saccharideinheit fungieren und in einer direkten Glykosylierung durch **AcbI** an dTDP-Acarviose-7-Phosphat angehängt werden.

Zusammengefasst wurde im ersten Teil der Arbeit die Synthese von Acarviostatin-Metaboliten in AP1 in Suspensionskulturen in Minimalmedium supplementiert mit den definierten Kohlenstoffquellen Maltose, Glucose, Galactose oder Mischungen aus

### 3.1 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten im Acarboseproduzenten 1 (Teil 1)

---

Maltose / Glucose und Maltose / Galactose untersucht. Aus dem Kulturüberstand angereicherte Acarviostatin-Metabolite wurden mit einer LC-MS-basierten Methode identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Spektrum von Acarviostatin-Metaboliten unter allen getesteten Bedingungen von AP1 synthetisiert wurde. Dabei kam es zur Bildung von Haupt- sowie Nebenkomponten. Wie erwartet wurde in allen Maltose-enthaltenden Minimalmedien Acarbose (Acarviosyl-Maltose) als Hauptkomponente gebildet, während in Minimalmedium mit Glucose Acarviosyl-Glucose die synthetisierte Hauptkomponente war. Unter Zusatz von Galactose zum Minimalmedium wurde von AP1 keine Hauptkomponente sondern ausschließlich Nebenkomponten gebildet. Basierend auf den Ergebnissen wurde ein Modell für die intrazelluläre Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in AP1 vorgeschlagen. Die postulierte Modellvorstellung beinhaltet dabei ebenfalls die Synthese von Haupt- und Nebenkomponten der Acarviostatin-Metabolit-Familie.

Im Folgenden wurde die Acarviostatin-Metabolit-Bildung dreier *Actinoplanes* sp. SE50/-110-Stämme, respektive Acarboseproduzent 1, Acarboseproduzent 2 und Acarboseproduzent 3, bei Anzucht auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium analysiert, um die Abhängigkeit der Acarviostatin-Metabolit-Synthese von Genotyp zu analysieren. Des Weiteren gilt es zu überprüfen, ob das aufgestellte Modell auch auf diese Bedingungen anwendbar ist.

## 3.2 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen (Teil 2)

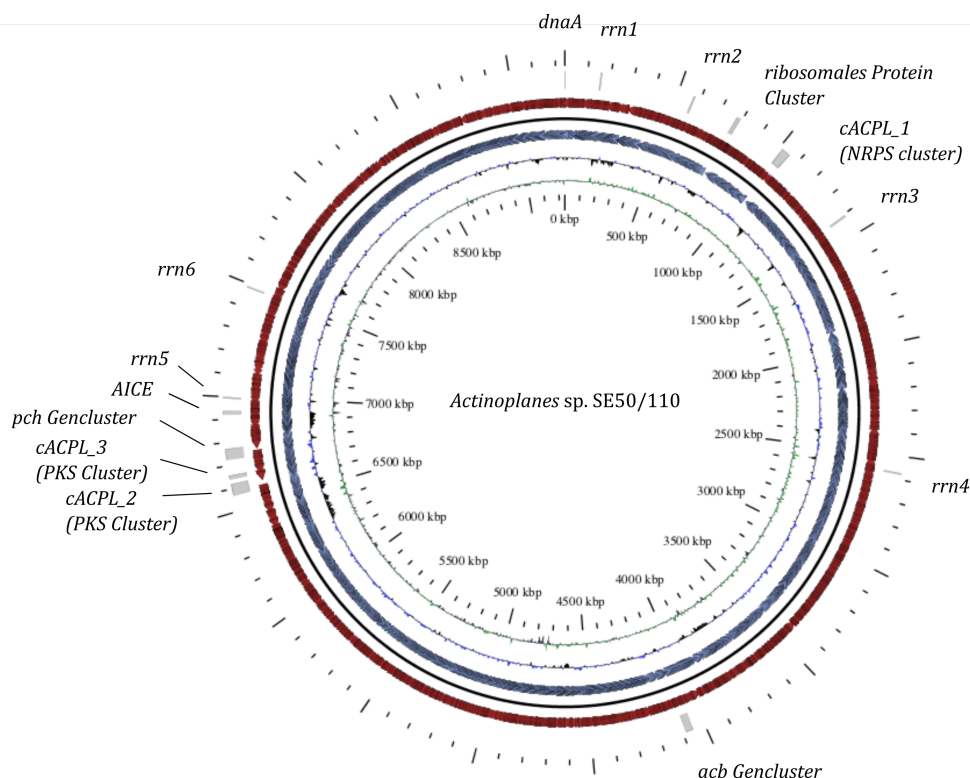
Das Ziel des zweiten Teils war es, die Bildung von Acarviostatin-Metaboliten in drei Acarboseproduzenten in Minimalmedium (B) ergänzt mit den Zuckern Maltose oder Maltotriose zu analysieren. Dabei wird ebenfalls auf die Unterschiede zwischen den drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen auf Ebene des Genoms sowie des Proteoms eingegangen. Die Beschreibung der Ergebnisse ist gegliedert nach den angewendeten *omics*-Technologien, als da wären Genomik, Proteomik sowie Metabolomik. Dementsprechend behandelt der erste Abschnitt die Analysen der Mutationen in den Genomen der vom Acarboseproduzenten 1 abstammenden Stämme Acarboseproduzent 2 und 3.

### 3.2.1 Die Genomsequenzen der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme AP1, AP2 und AP3

Das Vorliegen einer assemblierten DNA-Sequenz erlaubt die Genomannotation mittels bioinformatischer Methoden. Auf Grundlage der annotierten Genome können metabolische Netzwerke erstellt werden. Weiterhin gilt das Vorhandensein der Genomsequenz als Basis für zahlreiche Forschungsfelder der Post-Genomik, genauer gesagt Transkriptomik und Proteomik. Außerdem werden Vergleiche von Genomen angestrebt um beispielsweise Differenzen zwischen unterschiedlichen Produktionsstämmen zu identifizieren.

Als Ausgangspunkt des hier durchgeführten Genomvergleichs der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämme wurde auf eine verbesserten Genomsequenz des Wildtyp-Stamms Acarboseproduzenten 1 zurückgegriffen. Diese Arbeiten wurden durch Dr. S. Schneiker-Bekel koordiniert und sind nicht veröffentlicht. Die zwei Stämme *Actinoplanes* sp. SE50/110 Acarboseproduzent 2 (AP2) und *Actinoplanes* sp. SE50/110 Acarboseproduzent 3 (AP3) sind chronologisch ausgehend vom Acarboseproduzenten 1 entwickelt und auf eine erhöhte Acarboseproduktion gescreent und selektiert worden. Die Stämme wurden aus der Stammsammlung von der Bayer AG zur Verfügung gestellt. Die Sequenzierung sowie die Assemblierung der Stämme AP2 sowie AP3 erfolgte mit neuen Sequenzierungsdaten aus *whole genome shotgun* sowie *long paired end* Bibliotheken mittels des MiSeq<sup>®</sup> System (Illumina). Auf Grundlage dieser Arbeiten wurde ein Mapping mit dem Softwaretool SARUMAN (**S**emiglobal **A**lignment of Short **R**eads using **C**UDA and **N**eedleman-Wunsch) (BLOM *et al.*, 2011) erstellt. Die drei assemblierten Sequenzen waren Ausgangspunkt der hier vorgestellten Arbeiten.

### 3.2 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen (Teil 2)



**Abbildung 3.6: Genomplot von *Actinoplanes* sp. SE50/110.** Prominente Regionen sind in der Abbildung markiert und benannt. Das Genom besteht aus 9.240.006 Basenpaaren in denen 8270 Protein-kodierenden Sequenzen vorhergesagt werden konnten. Die Ringe repräsentieren folgende Merkmale beginnend vom äußersten: 1) Gencluster und weitere prominente Regionen, 2) Gene auf dem kodierenden Strang, 3) Gene auf dem nicht-kodierenden Strang, 4) der GC Gehalt sowie 5) GC skew.

Die nicht veröffentlichte verbesserte Genomsequenz von AP1 zeigt ein zirkuläres Chromosom mit einer Größe von 9,2 Mbp mit einem Spezies-spezifischen hohen GC-Gehalt von 71,32 % (siehe Abbildung 3.6). Insgesamt konnten 8270 Protein-kodierende Sequenzen mit Hilfe der Prodigal (HYATT *et al.*, 2010) sowie Gismo Software (KRAUSE *et al.*, 2007), welche in die GenDB Annotations-Pipeline implementiert wurden (MEYER *et al.*, 2003), gefunden werden. Dies entspricht einer Kodierdichte von ca. 89 % (siehe Tabelle 3.1). In Summe verfügt *Actinoplanes* sp. SE50/110 über sechs *rrn*-Operons sowie 97 tRNAs. Weiterhin konnten neben dem bereits bekannten Acarbosebiosynthesegencluster vier Nicht-ribosomale Peptidsynthase (NRPS) / Polyketidsynthase (PKS)-Cluster

mit Hilfe der antiSMASH 2.0 Pipeline (MEDEMA *et al.*, 2011) identifiziert werden (SCHWIENTEK *et al.*, 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die identifizierten Mutationen auf Basis von AP1 in AP2 und AP3 anhand der vorhergesagten Funktionen kategorisiert und analysiert. Dabei lag der Fokus in prominenten Regionen wie Regulatoren, tRNAs und rRNAs sowie Mutationen in Sekundärmetabolitclustern, insbesondere dem Acarbosebiosynthesegencluster. Das assemblierte Genom von AP2 zeigte eine Größe von 9.238.691 bp. Damit ist das Genom um 1315 bp kleiner als im AP1. Insgesamt konnten 1319 Punktmutationen (*single nucleotide polymorphisms*) (SNPs) identifiziert werden. Bei Punktmutationen, die den Austausch von nicht-komplementären Basen zur Folge haben, überwog der Austausch von Guanin oder Cytosin zu Adenin oder Thymin, respektive 95 % aller Transitionen. Dies resultierte in einem niedrigerem GC-Gehalt von 71,31 %. In 14 % aller Gene in AP2 konnten Punktmutationen festgestellt werden, 91 davon in Regulatoren und zwei in für tRNAs kodierenden Sequenzen. In Summe bewirkten 20 der identifizierten Basentransitionen eine Stopmutation in der kodierenden DNA-Sequenz (siehe Tabelle 3.3).

Das zirkuläre Genom von AP3, welcher wiederum eine Fortentwicklung von AP2 darstellt, ist mit einer Größe von 9.235.211 bp um 4795 bp kleiner als AP1 (vergleiche Tabelle 3.2). Die Erstellung eines Syntenie-Plots mit Hilfe der Software r2cat (HUSEMANN und STOYE, 2010) zeigte eine gedrehte Ausrichtung eines größeren DNA-Fragments in AP3 (siehe Abbildung A.1 im Anhang). Von 1954 detektierten Punktmutationen führten ebenfalls 95 % zu einem Austausch von Guanin oder Cytosin zu Adenin oder Thymin und somit zu einer Verringerung des GC-Gehaltes. Von den 1319 Mutationen

**Tabelle 3.1: Eigenschaften des *Actinoplanes* sp. SE50/110 Genoms.**

Größe (bp)	9.240.006
GC-Gehalt (%)	71,32
Protein-kodierende Sequenzen	8.270
Dichte kodierende Sequenzen (%)	89,31
Durchschnittliche Genlänge	990
Anzahl rrn-Operons	6
Anzahl tRNAs	97
Anzahl mit EC Nummer <sup>a</sup>	2729
Anzahl mit COG Nummer <sup>b</sup>	971

<sup>a</sup> Anzahl CDS der eine EC Nummer zugewiesen werden konnte

<sup>b</sup> Anzahl CDS der eine COG Nummer zugewiesen werden konnte

**Tabelle 3.2: Identifizierte Mutationen der Acarboseproduzenten 2 (AP2) und 3 (AP3) im Vergleich zum Referenzgenom *Actinoplanes* sp. SE50/110.**

	AP2	AP3
Größe (bp)	9.238.691	9.235.211
Anzahl SNPs	1319	1954
GC Gehalt (%)	71,31	71,30
SNPs in CDS	1176	1723
SNPs in Regulatoren	91	124
Anzahl an rRNAs mit SNPs	0	0
Anzahl an tRNAs mit SNPs	2	4
Anzahl an bekannten Sekundärmetabolitclustern mit SNPs	5	5
Anzahl an Stopmutationen	20	36

im Acarboseproduzenten 2 konnten nur fünf SNPs nicht im AP3 gefunden werden (siehe Tabelle A.2 im Anhang). Es wurden 552 zusätzliche SNPs detektiert. Dabei sind insgesamt 21 % der Gene in AP3 betroffen. Es wurden keine Punktmutationen in *rrn*-Operons und vier in tRNA-kodierenden Sequenzen identifiziert.

In Summe bewirkten 36 der detektierten intragenischen Mutationen in AP3 die Kodierung eines Stopcodons im Gen und damit einen frühzeitigen Abbruch der Translation (vergleiche Tabelle 3.3). 20 dieser 36 Stopmutationen konnten ebenfalls in AP2 identifiziert werden. Es konnten Stopmutationen in Genen von unterschiedlichen Stoffwechselwegen gefunden werden, zum Beispiel der Glykolyse, dem Kohlenhydratmetabolismus, im Transport, in der Regulation sowie innerhalb von Stoffwechselwegen zur Produktion von Sekundärmetaboliten. Dabei ist die genaue Funktion der zu Stoffwechselwegen zugeordneten Genen und deren Produkte unbekannt. Zum Beispiel lässt die automatische Annotation des TetR Regulatorgens *acpl\_8159*, welches ebenfalls eine Stopmutation aufweist, nicht auf dessen Rolle innerhalb des *Actinoplanes* sp. SE50/110 Metabolismus schließen. Es konnten zwei Stopmutationen in Genen der annotierten NRPS/PKS-Cluster identifiziert werden, respektive in den Genen *pks1C* und *pks3A*, sowie eine Mutation in der Inositol Monophosphatase *suhB*. Die Bildung von anderen Sekundärmetaboliten kann in Konkurrenz zur Produktion von Acarbose stehen. Auch die Bildung von Inositol konkurriert mit der Bildung der Acarviosyl-Einheit aus Glucose-1-Phosphat um Vorläuferstrukturen (*Precursor*). Eine weitere Stopmutation konnte in der Phosphoglyceratmutase (*pgm*) sowohl in AP2 als auch in AP3 identifiziert werden. Dieses Enzym ist innerhalb der Glykolyse involviert.

Im Fokus der Acarbosebiosynthese wurden Stopmutationen in Genen näher betrachtet, deren zugehöriges Genprodukt mit dem Acarbose- sowie Kohlenhydratmetabolismus in Verbindung gebracht werden konnten. Es konnte eine Mutation in dem Gen *acpl\_2653*,

einer putativen Glykosyltransferase, in AP2 und AP3 detektiert werden. Vier weitere Stopmutationen, welche ausschließlich in AP3 zu finden sind, betreffen eine weitere Glykosyltransferase, einer Glykosidhydrolase, eine Polysaccharid-Deacetylase sowie die im *acb*-Gencluster kodierte Acarviosyltransferase. Die detektierte Stopmutation in der Acarviosyltransferase *AcbD* bewirkt ein um 60 % verkürztes Genprodukt. Die Mutation wird im Folgenden näher beschrieben.

**Tabelle 3.3: Auflistung aller Punktmutationen deren Substitution zu einem frühzeitigen Stop der Translation führen.**

<i>acpl</i> Nr.	Stop- mutation	AP2	AP3	Größe Protein	Größe mu- tiertes Enzym	Name	Genprodukt
<i>acpl_1363</i>	Trp444*	+	+	602	444	<i>zan</i>	Zonadhesin
<i>acpl_157</i>	Trp132*	+	+	153	132		hypothetisches Protein
<i>acpl_179</i>	Gln38*	-	+	92	38		hypothetisches Protein
<i>acpl_1901</i>	Trp46*	-	+	132	46		hypothetisches Protein
<i>acpl_198</i>	Trp444*	-	+	555	444		putativer ABC Trans- porter
<i>acpl_2025</i>	Trp379*	-	+	600	379		Glykosidhydrolase 15- ähnliches Protein
<i>acpl_2030</i>	Trp492*	-	+	1555	492		hypothetisches Protein
<i>acpl_2071</i>	Trp5*	-	+	157	5		sekretiertes Protein
<i>acpl_2244</i>	Trp377*	+	+	474	377		Sensor Histidinkinase
<i>acpl_254</i>	Gln480*	+	+	504	480	<i>crtI</i>	Phytoene dehydrogen- ase
<i>acpl_2653</i>	Trp215*	+	+	378	215		putative Glyosyltrans- ferase
<i>acpl_3098</i>	Trp12*	+	+	203	12	<i>rmlC</i>	dTDP-4- dehydrorhamnose-3,5- Epimerase
<i>acpl_3189</i>	Trp350*	-	+	584	350		Glykosyltransferase
<i>acpl_3684</i>	Trp286*	-	+	724	286	<i>acbD</i>	Acarviosyltransferase

*Fortsetzung auf folgender Seite....*



3.2 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen (Teil 2)

Tabelle 3.3 – Fortsetzung der vorherigen Seite

<i>acpl</i> Nr.	Stop- mutation	AP2	AP3	Größe Protein	Größe mu- tiertes Enzym	Name	Genprodukt
<i>acpl_4200</i>	Trp84*	-	+	332	84		putatives Protein des Kation-Efflux Systems
<i>acpl_464</i>	Trp196*	+	+	838	196		Cortactin-Bindeprotein
<i>acpl_4645</i>	Trp79*	+	+	243	79		intrinsisches Protein
<i>acpl_4973</i>	Trp440*	+	+	505	440	<i>hexA</i>	$\beta$ -hexosaminidase
<i>acpl_5006</i>	Trp65*	-	+	141	65		hypothetisches Protein
<i>acpl_5092</i>	Trp163*	+	+	533	163		hypothetisches Protein
<i>acpl_5269</i>	Trp146*	+	+	230	146		Phosphoglyceratmutase
<i>acpl_5401</i>	Trp10*	+	+	211	10		putative Methyltrans- ferase
<i>acpl_5594</i>	Trp53*	-	+	130	53		hypothetisches Protein
<i>acpl_6053</i>	Gln3158*	-	+	5096	3158	<i>pks1C</i>	putative Typ I Polyke- tidsynthase
<i>acpl_6147</i>	Trp1179*	+	+	756	1179	<i>pks3A</i>	Polyketidsynthase
<i>acpl_6329</i>	Trp187*	+	+	196	187		hypothetisches Protein
<i>acpl_702</i>	Trp119*	+	+	272	119	<i>suhB</i>	Inositol monophospha- tase
<i>acpl_7233</i>	Trp611*	+	+	685	611		putative Hydrolase
<i>acpl_7434</i>	Trp100*	-	+	867	100		DNA Translocase
<i>acpl_7515</i>	Trp236*	+	+	485	236		Glutathionylspermidine- Synthase
<i>acpl_7527</i>	Trp388*	-	+	438	388		Polysaccharid- Deacetylase
<i>acpl_7571</i>	Trp171*	+	+	225	171		hypothetisches Protein
<i>acpl_8159</i>	Trp171*	+	+	185	171		transkriptioneller Regu- lator der TetR Familie
<i>acpl_8262</i>	Gln50*	+	+	301	50	<i>fas3</i>	Uncharakterisiertes Protein
<i>acpl_8348</i>	Trp203*	-	+	1159	203		

Fortsetzung auf folgender Seite....

Tabelle 3.3 – Fortsetzung der vorherigen Seite

<i>acpl</i> Nr.	Stop- mutation	AP2	AP3	Größe Protein	Größe mu- tiertes Enzym	Name	Genprodukt
<i>acpl_8369</i>	Trp71*	-	+	219	71		RNA Polymerase $\sigma^H$ Faktor

Neben den Punktmutationen, die innerhalb von Protein-kodierenden Sequenzen auftreten, wurden auch Veränderungen identifiziert welche in intergenischen Bereichen lokalisiert waren, respektive 143 in AP2 und 231 in AP3. Um eine Prognose zu erstellen, ob diese Punktmutationen einen Effekt auf die Transkription oder die Translation haben, müssen für jedes benachbarte Gen die Transkriptionsstartstelle (TSS) sowie der nächste Translationsstartstelle (TLS) erfasst werden. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den Protein-kodierenden Sequenzen sowie auf dem Acarbosebiosynthesegencluster. Die zwei intergenischen Mutationen im *acb*-Cluster werden im Folgenden betrachtet. Die Analyse weiterer Punktmutationen in intergenischen Bereiche sollte im Anschluss an diese Arbeit erfolgen.

In beiden Stämmen konnten keine größeren Deletionen beobachtet werden. Der Vergleich von AP1 mit AP2 und AP3 mit Hilfe des Software-Programms MAUVE (DARLING *et al.*, 2004) sowie r2cat (HUSEMANN und STOYE, 2010) zeigten Größenunterschiede in *rrn*-Operons sowie repetitiven Regionen. Dabei ist nicht auszuschließen, dass die Differenzen Artefakte aus der Sequenzierung darstellen.

*Next generation sequencing* erlaubt eine schnelle sowie allumfassende Aufklärung über Veränderungen im Genom. Dadurch konnten über 1000 Punktmutationen in den Genomen von AP2 sowie AP3 identifiziert werden. Die hier dargestellten Ergebnisse basieren auf dem Vergleich der assemblierten Genome von AP1, AP2 und AP3. Dabei kamen aufgrund der zeitlichen Distanz unterschiedliche Sequenzierungstechnologien zum Einsatz. Das Genom von AP1 wurde mit dem GS FLX+ System von 454 Sequencing (Roche) entschlüsselt, während zur Sequenzierung von AP2 und AP3 der MiSeq Sequencer von Illumina genutzt wurde. Die Verwendung unterschiedlicher Technologien kann zur falsch-positiver Identifizierung von Polymorphismen führen (SHIN und PARK, 2016). Deletionsfehler in Sequenzierungen mit dem GS FLX+ System sowie Substituti-

onsfehler im Zusammenhang mit einem hohen GC-Gehalt des Genoms konnten bereits beschrieben werden (SHIN und PARK, 2016).

Eine weitere Fehlerquelle in der Bewertung von SNPs liegt in der automatischen Annotation über die GenDB Annotations-Pipeline (MEYER *et al.*, 2003). Nur ein geringer Anteil der funktionellen Zuweisungen wurde manuell kuriert. Trotzdem kann das annotierte AP1-Genom bei der Betrachtung der Basentransitionen unterstützen. Weiterhin wird eine Einteilung in konservative sowie nicht-konservative Aminosäuresubstitutionen getätigt. Dies erlaubt eine weitere Einschätzung über die Relevanz der Punktmutationen in den *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen. Dennoch sollten ausgewählte Mutationen bioinformatisch sowie Experiment-basiert im Anschluss an diese Arbeit näher charakterisiert werden.

Unter biologischen Gesichtspunkten konnten mehrere Punktmutationen herausgestellt und im Kontext der Bereitstellung von Vorläuferstrukturen betrachtet werden. Neben der Entscheidung Energie für den Aufbau von Biomasse oder für die Produktion von Sekundärmetaboliten zur Verfügung zu stellen, muss die Zelle ebenfalls darüber entscheiden, welche Sekundärmetabolite gebildet werden. Unter Verwendung der Software *antiSMASH* (MEDEMA *et al.*, 2011) konnten neben dem *acb*-Gencluster weitere Sekundärmetabolitcluster detektiert werden, respektive das NRPS Cluster cACPL\_1, zwei PKS Cluster cACPL\_2 und cACPL\_3 sowie ein NRPS/PKS-Hybrid-Cluster cACPL\_4 (SCHWIENTEK *et al.*, 2012). In den zwei Polyketidsynthasegenen *pks1C* und *pks3A* der zwei Cluster cACPL\_1 und 4 konnten Stopmutation identifiziert werden. Bislang konnte nur für das Cluster cACPL\_4 Metabolite und damit einhergehend eine Funktion prognostiziert werden (WENDLER *et al.*, 2015). Die anhand von *antiSMASH* vorgeschlagenen Metabolite des Clusters cACPL\_4 sind dem Siderophor Pyochelin ähnlich, genauer Enantio-Pyochelin. Diese Moleküle spielen eine Rolle in der Bereitstellung von freiem Eisen (YOUARD *et al.*, 2007). In umfangreichen Proteomstudien zu *Actinoplanes* sp. SE50/110 konnten 21 von 23 Proteine des Pyochelin-Clusters gefunden werden (WENDLER *et al.*, 2015). Basierend auf der Datenlage wird davon ausgegangen, dass das *pch*- sowie das *acb*-Biosynthesecuster in *Actinoplanes* sp. SE50/110 co-exprimiert werden. Pyochelin wird dabei ausgehend vom Metabolismusintermediat Chorismat gebildet, welches wiederum durch zahlreiche Syntheseschritte aus Endprodukten der Glykolyse und dem Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg synthetisiert wird (YOUARD *et al.*, 2007).

Damit konkurrieren die Synthese dieser zwei Sekundärmetabolite miteinander sowie mit der Bildung von Biomasse. Die gleichzeitige Produktion von mehreren Sekundärmetaboliten in *Streptomyces* Spezies ist bekannt und wird über die funktionelle Synergie solcher

Metabolite gegen biologische Konkurrenten erklärt (CHALLIS und HOPWOOD, 2003). Zum Beispiel begünstigt Acarbose in der exklusiven Bereitstellung von Kohlenhydraten den Aufbau von Biomasse. Auch das zur Verfügung gestellte freie Eisen kann zum Wachstum der Zelle förderlich sein.

In dem Zusammenhang sind ebenfalls die zwei Stopmutationen in der Phosphoglucomutase *pgm* (*acpl\_5269*) sowie in einem TetR Regulator (*acpl\_8159*) zu setzen. Das Enzym Pgm ist in der Glykolyse involviert. In Studien wurden bereits erfolgreich genetische Veränderung in Genen der Glykolyse zur Überproduktion von Sekundärmetaboliten in *Streptomyces* Spezies eingebracht (BUTLER *et al.*, 2002; LI und TOWNSEND, 2006; CHAUDHARY, DHAKAL und SOHNG, 2013). Die zweite Mutation betrifft ein Mitglied der TetR Regulatorfamilie, welche mit der Regulation von Antibiotikaresistenzen sowie deren Produktion, Quorum Sensing, *small-molecule* Exporter und anderen Aspekten in der prokaryotischen Physiologie assoziiert werden (CUTHBERTSON und NODWELL, 2013). Ein Zusammenhang mit dem Acarbosemetabolismus wäre denkbar, jedoch zeigte der Regulator bislang weder in Regulatorstudien (KÖPFER, 2013; DROSTE, 2015) noch in Transkriptom- (persönliche Kommunikation T. Wolf) oder Proteomstudien (WENDLER *et al.*, 2016) Auffälligkeiten.

Zusammengefasst ergab die systematische Erfassung über 1000 Punktmutationen in den Genomen von AP2 und AP3. Zum einen konnten 1176 SNPs in AP2 sowie 1723 SNPs in Protein-kodierenden Sequenzen von AP3 identifiziert werden. Zum anderen konnten acht sowie zwölf Punktmutationen in Promotorsequenzen von AP2 und AP3 gefunden werden. 20 SNPs im Acarboseproduzenten 2 und 36 SNPs im Acarboseproduzenten 3 führten zu einer Stopmutation im Gen. Sowohl in AP2 als auch in AP3 konnten im *acb*-Biosynthesegencluster Mutationen detektiert werden, welche im Folgenden beschrieben und diskutiert werden.

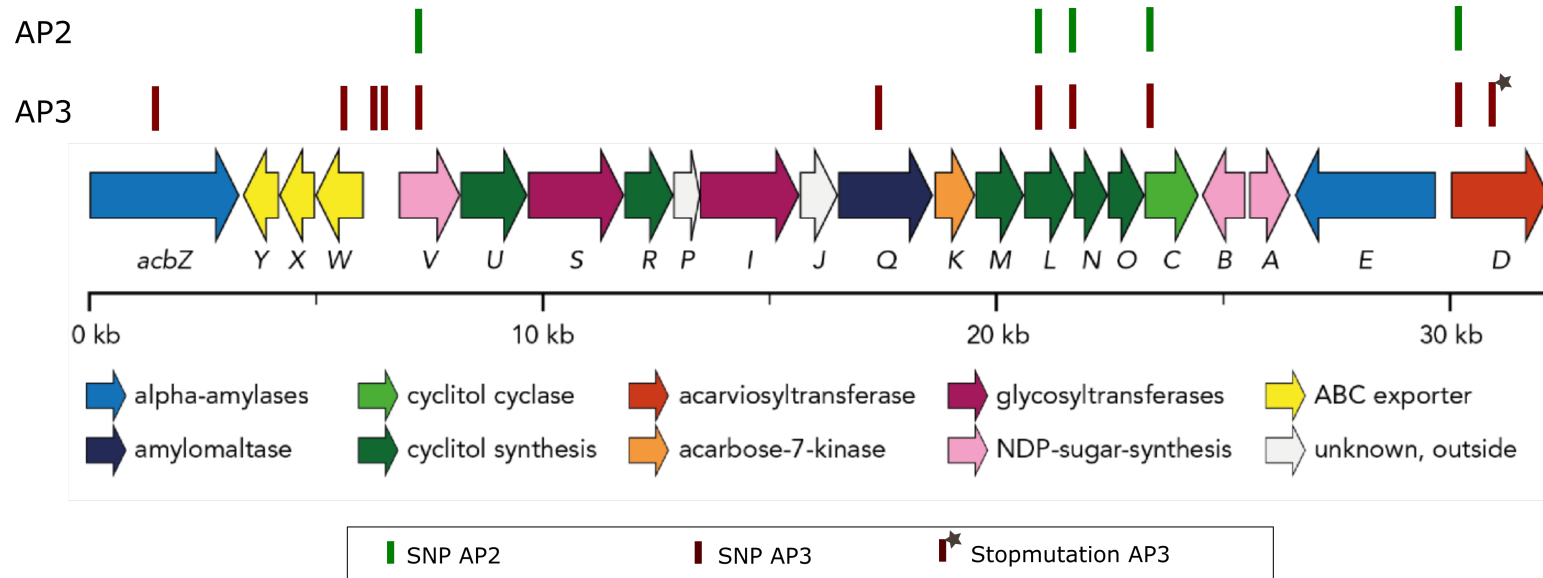
#### Vergleich der Sequenzen des Acarbosebiosynthesegenclusters von drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen

Nach der systematischen Erfassung aller Mutationen in den Genomen der Acarboseproduzenten 2 sowie 3 wurde der Fokus auf die Punktmutationen innerhalb des Acarbosebiosynthesegenclusters gelegt. Dabei wurden sowohl Basenmutationen in introns als auch in intergenischen Regionen betrachtet. Die gefundenen Punktmutationen innerhalb von kodierenden Sequenzen wurden zunächst danach unterteilt, ob diese einen Austausch einer Aminosäure zur Folge haben. Bei dieser Gruppe von Mutationen wurde

zwischen zwei Arten unterschieden: konservativer sowie nicht-konservativer Aminosäureaustausch (KNIPPERS, 1997). Dabei beschreibt die zuerst genannte Kategorie einen Codonaustausch, der eine Aminosäure kodiert, welche zur ursprünglichen biochemisch verwandt ist. Dagegen wird ein nicht-konservativer Austausch durch eine Transition in eine Aminosäure mit anderen biochemischen Eigenschaften charakterisiert. Es sind unterschiedliche Ansätze bekannt, die 21 proteinogene Aminosäuren zu klassifizieren. Eine der häufigsten Einteilungen basiert auf deren Struktur sowie biochemischen Eigenschaften, wie zum Beispiel der Ladung, der Größe oder der Hydrophobizität der Proteine. In dieser Arbeit erfolgt die Einteilung in sechs Hauptgruppen, respektive aliphatische, Hydroxyl- oder Schwefel/Selen-haltige, zyklische, aromatische, basische oder saure Aminosäuren.

Das Acarbosebiosynthesegencluster in *Actinoplanes* sp. SE50/110 besteht aus 22 Genen. Es wurden insgesamt fünf Punktmutationen in AP2 und zusätzlich sechs in AP3 identifiziert (siehe Abbildung 3.7). Neben Basentransitionen in Protein-kodierenden Sequenzen wurden auch intergenische Regionen betrachtet. Die Motivation, auch solche Mutationen zu analysieren, begründet sich in einem putativen Effekt auf genregulatorische Bereiche. Die DNA-Bereiche *upstream* zum Genstart sind besser bekannt als Promotorsequenzen, welche im Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Initiation der Transkription festlegen. Dabei enthalten prokaryotische Promotoren als Signalstrukturen eine Erkennungsstelle an Position -35 und eine Bindestelle an Position -10 (Pribnow-Box) vor der Startstelle der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (STRITTMATTER und BONK, 1999).

In der DNA-Sequenz des Acarbosebiosynthesegenclusters von AP3 wurden zwei Punktmutationen im intergenischen Bereich zwischen den Genen *acbW* und *acbV* identifiziert. Dabei lag der Abstand der Punktmutationen zu den Genen zwischen 360 und 470 Basenpaaren. Die Basentransition an Position 4060189 liegt mit 49 bp vor der prognostizierten Transkriptionsstartstelle (TSS). Dabei ist die -35 Region in dem Bereich von 4060171 bis 406176 vorhergesagt (persönliche Kommunikation T. Wolf). Damit liegt die Punktmutation in einem Bereich in dem eine Bindung von Aktivator- oder Repressorproteinen möglich wäre.



**Abbildung 3.7: Lokalisierung der Punktmutationen im Acarbosebiosynthesecluster der Acarboseproduzenten 2 und 3.** In der Abbildung sind die Gene des Acarbosebiosyntheseclusters gemäß ihrer Funktion farbig dargestellt. Weiterhin sind die Positionen der SNPs im Acarboseproduzenten 2 (AP2) in grün und im Acarboseproduzenten 3 (AP3) in rot markiert. Die Stopmutation ist durch einen grauen Stern kenntlich gemacht (modifiziert v. SCHWIENTEK *et al.* 2012).

Von insgesamt neun Basentransitionen innerhalb von *Acb*-Protein-kodierender Sequenzen konnten fünf im AP2 detektiert werden. Diese fünf SNPs können in zwei neutrale, einen konservativen sowie zwei nicht-konservative Aminosäuresubstitutionen eingeteilt werden (siehe Tabelle 3.4). Die zwei Punktmutationen ohne Auswirkungen auf die kodierende Aminosäure sind in den zwei Genen *acbV* und *acbC* lokalisiert. Der konservative Aminosäureaustausch wurde in der DNA-Sequenz der Acarviotsyltransferase *acbD* an der Position 167 der Aminosäuresequenz identifiziert. Die Substitution wird im folgenden Abschnitt noch einmal genauer betrachtet.

Beide nicht-konservativen Aminosäuresubstitutionen waren innerhalb der DNA-Sequenz des Gens *acbL* lokalisiert. Das Enzym *AcbL* katalysiert durch Oxidation der Hydroxygruppe die Bildung von 5-*epi*-Valiolol-7-Phosphat und damit den fünften Schritt in der Bildung des Valienamins der Acarviotsyl-Kerneinheit der Acarviostatin-Metaboliten (vergleiche Abbildung 1.5). Zum einen wurde an der Position 174 ein Threonin, welches der Gruppe der Hydroxyl-haltigen Molekülen angehört, gegen ein aliphatisches Isoleucin ausgetauscht. Zum anderen erfolgte ein Austausch des aliphatischen Valins in ein Schwefel-haltiges Methionin an Position 353 der Aminosäurekette.

Bioinformatische Werkzeuge können ebenfalls Voraussagen über die Auswirkungen von Punktmutationen erstellen. Das Softwaretool PredictProtein ermöglicht über ein integriertes SNAP3 Werkzeug die Prognose über den Effekt von Aminosäuresubstitutionen. SNAP3 ist ein auf neuronalen Netzen basierender Klassifizierer, dessen Kalkulation zum Effekt von Punktmutationen biologische Eigenschaften wie Sekundärstrukturen oder homologe Sequenzen berücksichtigt. Dabei wird eine Prognose über die Auswirkungen einer Aminosäuretransition an jeder möglichen Position gegeben. Für die Einteilung des Effektes erfolgt eine Punktvergabe von -100 für eine Änderung ohne Auswirkung bis zu +100 für eine starke Implikation auf das Protein (YACHDAV *et al.*, 2014). Für die zwei Aminosäuresubstitutionen in *AcbL* ermittelt die Software Scores von -89 für den Austausch von Threonin zu Isoleucin an Position 174 und -94 für die Transition von Valin zu Methionin an Position 353. Es ist daher zu vermuten, dass die Mutationen keine oder nur eine sehr geringe Auswirkung auf die Funktionsfähigkeit des Proteins haben.

Tabelle 3.4: Auflistung aller Punktmutationen im Acarbosebiosynthesecluster der Acarboseproduzenten 2 und 3.

<i>acpl</i> Nummer	Pos.	Ref. <sup>a</sup>	Neu <sup>b</sup>	AS- Substitution	Art der AS- Substitution	AP2 <sup>c</sup>	AP3 <sup>d</sup>	Größe AS- Sequenz	Name	Genprodukt
<i>acpl_3663</i>	4055389	C	T	Pro511Ser	nicht- konservativ	-	+	1075	<i>acbZ</i>	$\alpha$ -Amylase
<i>acpl_3666</i>	4059101	G	A	Val242Ile	konservativ	-	+	357	<i>acbW</i>	ABC-type Transporter, ATPase Komponente
<i>acpl_3667</i>	4061284	C	T	Phe		+	+	431	<i>acbV</i>	dTDP-4-keto-6-deoxy-Glucose-4-Aminotransferase
<i>acpl_3674</i>	4071791	C	T	His504Tyr	nicht- konservativ	-	+	698	<i>acbQ</i>	Acarbose 4- $\alpha$ -glucanotransferase, Amylomaltase
<i>acpl_3677</i>	4074902	C	T	Thr174Ile	nicht- konservativ	+	+	366	<i>acbL</i>	Cyclitoldehydrogenase
<i>acpl_3677</i>	4075438	G	A	Val353Met	nicht- konservativ	+	+	366	<i>acbL</i>	Cyclitoldehydrogenase
<i>acpl_3680</i>	4077159	C	T	Asp		+	+	398	<i>acbC</i>	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone Synthase
<i>acpl_3684</i>	4084271	G	A	Asp167Asn	konservativ	+	+	724	<i>acbD</i>	Acarviosyltransferase (ATase)
<i>acpl_3684</i>	4084630	G	A	Trp286*		-	+	724	<i>acbD</i>	Acarviosyltransferase (ATase)
<b>SNPs in der intergenische Region des <i>acb</i>-Biosynthesecluster</b>										
	4060189	G	A	zw. <i>acpl_3666</i> & <i>3667</i>		+	+		Abstand zu Genen -364 , -466	
	4060218	C	T	zw. <i>acpl_3666</i> & <i>3667</i>		+	+		Abstand zu Genen -393 , -447	

<sup>a</sup> Referenzbase im Acarboseproduzent 1 *Actinoplanes* sp. SE50/110

<sup>b</sup> Neue Base in den Acarboseproduzenten

<sup>c</sup> Punktmutation im Acarboseproduzenten 2 detektiert (+) bzw. nicht detektiert (-)

<sup>d</sup> Punktmutation im Acarboseproduzenten 3 detektiert (+) bzw. nicht detektiert (-)



Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen fünf Punktmutationen waren sechs ausschließlich im Acarboseproduzenten 3 zu finden, wovon wiederum vier in Protein-kodierenden Bereichen identifiziert wurden. Diese SNPs führten zu einer konservativen, zwei nicht-konservativen Aminosäuresubstitutionen sowie einem Einbau eines Stopcodons und damit zum frühzeitigen Abbruch der Translation (vergleiche Tabelle 3.3). Diese Stopmutation wird im folgenden Abschnitt noch einmal aufgegriffen. Die konservative Mutation betrifft das Gen *acbW*, welche für die ATPase Komponente des Acarbose-Exporter kodiert. Die nicht-konservativen Aminosäuresubstitutionen betreffen die  $\alpha$ -Amylase *AcbZ* sowie die Amylomaltase *AcbQ*. Das Protein *AcbZ* spielt eine Rolle in der Degradation von Polysacchariden im Außenraum der Zelle. Die Amylomaltase *AcbQ* spaltet die Saccharideinheiten von Acarbose-basierten höheren Acarviostatin-Metaboliten nach dem Reimport in die Zelle. Beide *Acb*-Proteine sind im extrazellulären Acarbosemetabolismus aktiv und nicht in der Biosynthese des Pseudotetrasaccharids.

Für die Punktmutationen welche ausschließlich in AP3 detektiert werden konnten prognostiziert das Softwaretool PredictProtein für die Substitution in der ATPase Komponente des Acarbose-Exporterprotein *AcbW* von Valin zu Isoleucin mit einem Score von -97 einen geringen Effekt auf die Funktionsfähigkeit des Proteins. Darüberhinaus werden mit einem Score von -13 moderate Auswirkungen der Aminosäuretransition auf die Funktion der  $\alpha$ -Amylase *AcbZ* vorhergesagt. Für das Protein *AcbQ* wird der Austausch von Histidin zu Tyrosin an Position 504 mit einem Score von 61 bewertet und damit eine Auswirkung auf die Funktionsfähigkeit der Amylomaltase prognostiziert.

Von den insgesamt elf identifizierten Mutationen im Acarbosebiosynthesegencluster sind insgesamt neun in Protein-kodierenden Sequenzen lokalisiert. Davon wurden fünf SNPs zu vier *acb*-Genen in AP2 und AP3 zugeordnet. Die betroffenen Gene *acbV*, *acbL*, *acbC* und *acbD* sind mit Ausnahme des zuletzt genannten in der Biosynthese der Acarbose involviert. Leider fehlen zu zahlreichen *Acb*-Proteine, welche die Synthese unterschiedlicher Intermediate innerhalb der Acarbosebiosynthese katalysieren, wissenschaftliche Studien zur Charakterisierung sowie Funktionsaufklärung. Auch die Biosynthesen nah verwandter Sekundärmetabolite der C<sub>7</sub>N-Aminocyclitol-Familie, wie Validamycin A oder Salbostatin, deren Cluster eine hohe Anzahl an homologen Enzymen zu dem *abc*-Biosynthesecenter besitzen, sind nicht vollständig aufgeklärt (MAHMUD, LEE und FLOSS, 2001; CHOI *et al.*, 2008; MAHMUD, 2009). Eine Ausnahme bildet die 2-*epi*-5-*epi*-Valiolone-Synthase *AcbC*, welche den ersten Schritt in der Biosynthesekette zur Bildung der Acarviosyl-Einheit katalysiert (STRATMANN *et al.*, 1999; MAHMUD, 2009; SPENCE *et al.*, 2013). Neben der Synthese steht das Enzym

im Cyanobakterium *Anabaena vaiabilis* im Verdacht die Konzentration der Vorläuferstruktur Seduheptulose-7-Phosphat zu regulieren (SPENCE *et al.*, 2013). Die Bildung der Acarviosyl-Einheit gilt als ein Engpass (*bottleneck*) in der Acarbosebiosynthese. In Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) Experimenten zeigten sich ungewöhnlich hohe intrazelluläre Konzentrationen an Seduheptulose-7-Phosphat verglichen zu anderen Mikroorganismen (persönliche Kommunikation M. Persicke). Bei Verlust der Funktionsfähigkeit von AcbC müssten in Fluxanalysen höhere Konzentrationen von Seduheptulose-7-Phosphat messbar sein.

Es konnten weitere vier Punktmutationen ausschließlich im Acarboseproduzenten 3 identifiziert werden. Die betroffenen Gene *acbZ*, *acbW*, *acbQ* sowie *acbD* sind ausnahmslos dem extrazellulären Acarbosemetabolismus (Carbophor-Modell) zuzuordnen. Neben dem Export des Sekundärmetaboliten unter Beteiligung von AcbW, der Degradation von Polysacchariden anhand von AcbZ und dem Beladen der Acarbose über AcbD, ist auch die cytosolische Freisetzung von Saccharideinheiten von höheren Acarviostatin-Metaboliten katalysiert durch AcbQ von Mutationen in den assoziierten Genen betroffen (ZHANG *et al.*, 2002; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; WENDLER *et al.*, 2013). Dabei wurde die Basentransition in dem Gen *acbQ* anhand des Softwaretools Predict-Protein als kritisch bewertet. Die Aminosäuresequenz von AcbQ besitzt eine signifikante Ähnlichkeit zur Amylomaltase MalQ von *H. influenzae* (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Amylomaltasen bilden einen typischen Bestandteil des intrazellulären Metabolismus von Maltose und anderen Maltooligodextrinen. Im Zusammenhang mit der Acarbosebiosynthese wird vermutet, dass das Enzym AcbQ Glucose sowie Glucosebasierte Moleküle von höheren Acarviostatin-Metaboliten auf entsprechende Akzeptoren transferiert und demzufolge Acarbose und deren Homologe recycelt (ROCKSER und WEHMEIER, 2009; WENDLER *et al.*, 2013). Unter der Annahme, dass die identifizierte Mutation zum Verlust der Funktion der Amylomaltase führt, müssten sich höhere Acarviostatin-Metabolite im Acarboseproduzenten 3 akkumulieren.

Inwiefern einzelne Punktmutationen oder die Kombination unterschiedlicher Mutationen einen positiven Effekt auf die Konzentration des Zielproduktes Acarbose ausüben, ist ohne Experimente nicht zu belegen. Auch Hypothesen über die Auswirkung der Aminosäuresubstitutionen können nur anhand gentechnischer Veränderungen in AP1 überprüft werden. Neben Spekulationen des Effektes einzelner Aminosäuresubstitutionen, können Auswirkungen von Stopmutationen besser prognostiziert werden. Auch vor dem Hintergrund der Rolle der Acarviiosyltransferase für den Organismus, sollen die Mutationen im *acbD*-Gen im Folgenden näher betrachtet werden.

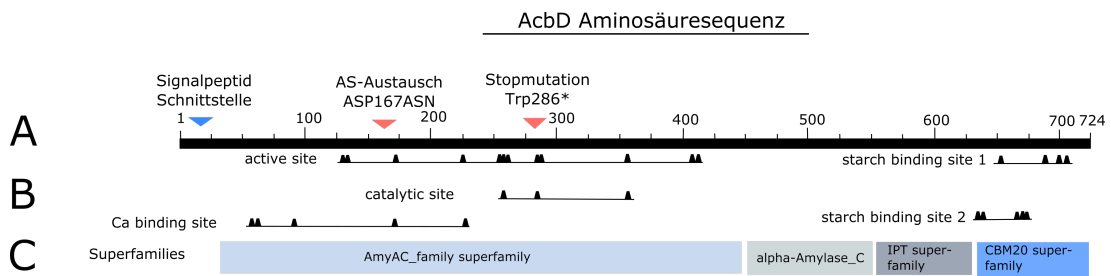
### Analyse der Mutationen in der Acarviosyltransferase AcbD in den *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen

Wie einleitend beschrieben, hat die Acarviosyltransferase AcbD eine Funktion im extrazellulären Acarbosemetabolismus von *Actinoplanes* sp. SE50/110 (siehe Abschnitt 1.3.3). In der Protein-kodierenden Sequenz von *acbD* konnten zwei Aminosäuresubstitutionen identifiziert werden. Die erste Substitution von Guanin zu Adenin resultierte in der Kodierung der Aminosäure Asparagin. Die zuvor kodierte Asparaginsäure zeigt einen sauren pH-Wert während dessen Amid neutrale Eigenschaften aufweist. Die zweite Mutation in der Acarviosyltransferase führt an Position 286 der Aminosäuresequenz zu der Kodierung eines Stopcodons anstelle eines Tryptophans. Mit einer Größe von 724 Aminosäuren geht diese Punktmutation mit einer Verkürzung des Proteins um 438 Aminosäuren, respektive ca. 60 %, einher.

Wie oben bereits beschrieben, können neben der Einteilung in konservativen sowie nicht-konservativen Austausch auch Parameter wie Sequenzhomologie, Pfam-Domänen oder 3D-Struktur in die Bewertung von SNPs mit einbezogen werden. Pfam umfasst eine riesige Kollektion an Protein Domänen-Familien (BATEMAN *et al.*, 2002). Jede dieser Familien wird repräsentiert von multiplen Sequenzalignments sowie *hidden Markov models* (HMMs). Mit Hilfe dieser Datenbank können Domänen annotiert und somit Proteinen Funktionen zugeordnet werden (COGGILL, FINN und BATEMAN, 2008).

Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten für das AcbD Protein insgesamt vier Domänen und ihre Zuordnung in Superfamilien (siehe Abbildung 3.8 C). Neben zwei katalytischen  $\alpha$ -Amylase Domänen wurden noch eine Cycloglycosyltransferase (CGTase) sowie eine Stärke-Bindedomäne detektiert. Zusätzlich wurden Bindestellen für Calcium sowie Stärke identifiziert. Dabei lagen beide Aminosäuresubstitutionen in AcbD innerhalb der ersten  $\alpha$ -Amylase-katalytischen Domäne. Unter der Annahme, dass das um 60 % verkürzte Acarviosyltransferase Protein nicht unmittelbar durch Proteasen abgebaut wird, würde AcbD im Acarboseproduzenten 3 lediglich eine unvollständige  $\alpha$ -Amylase Domäne besitzen.

Für die Klassifizierung der Punktmutationen wurden weitere Softwaretools verwendet, respektive PredictProtein sowie RaptorX (siehe Abschnitt 2.2). Das zuerstgenannte Softwaretool wurde bereits für eine Einschätzung der identifizierten Punktmutationen in den übrigen Acb-Proteinen verwendet und gibt eine Prognose über den Effekt einer Aminosäuresubstitution jeder möglichen Position in der AcbD Sequenz. Jedwede Modifikation an der Position 167 bewirkt eine starke Veränderung des Proteins. Auch der detektierte Austausch in AP2 und AP3 von Asparaginsäure zu Asparagin erwies



**Abbildung 3.8: Bioinformatische Betrachtung der Domänen der Acarviosyltransferase AcbD mit Markierung der SNP-Positionen.** Die Abbildung zeigt schematisch die Aminosäuresequenz des Proteins AcbD. Außerdem sind die Positionen der Signalpeptid-Schnittstelle, der nicht-konservativen Substitution der sauren Aminosäure Asparaginsäure gegen dessen neutrales Amid Asparagin sowie die Lage der Stopmutation gekennzeichnet (A). Mit Hilfe der Pfam Datenbank konnten Protein-Domänen (B), aktive, katalytische sowie bindende Regionen (C) bestimmt werden, welche unterhalb der Sequenz dargestellt sind.

sich mit einem errechneten Score von 95 als eine Basentransition mit erheblichen Auswirkungen. Ebenso wird für die Position 286, die in AP1 ein Tryptophan kodiert, prognostiziert, dass sich jeglicher Aminosäureaustausch auf die Funktion des Enzyms auswirkt.

RaptorX ist kein Werkzeug, um Schätzungen über Effekte von Aminosäuresubstitutionen auf die Proteinfunktion zu erstellen. Hingegen kann das Softwaretool verwendet werden, um Aussagen über putative Bindungsstellen von Substraten zu tätigen und liefert darüberhinaus mögliche Bindemoleküle (KÄLLBERG *et al.*, 2012; KÄLLBERG *et al.*, 2014). Die Analysen konnten fünf putativen Bindetaschen identifizieren. Zwei dieser Taschen sind präsumtiv an der Bindung von Calcium-Ionen beteiligt. Dies bestätigt die Ergebnisse der Analyse der Pfam-Domänen (siehe Abbildung 3.8). Weiterhin werden drei Taschen für die Bindung von Glucose, Maltose sowie die Glucose-abgeleiteten Moleküle 6-deoxy- $\alpha$ -D-Glucose sowie 6-Amino-4-hydroxymethyl-cyclohex-4-ene-1,2,3-Triol vorhergesagt. Das zuletzt genannte Molekül zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zum Acarbose-ähnlichen Molekül Validamin sowie zu NDP-1-*epi*-Valienol-7-Phosphat, einem Intermediat in der Acarbosebiosynthese. Die zwei Basensubstitutionen, welche zu Aminosäuresubstitutionen in der Acarviosyltransferase von AP3 führen, sind laut 3D-Modell der RaptorX Software nicht direkt an der Bindung beteiligt.

Die Funktion der Acarviosyltransferase AcbD für den Organismus *Actinoplanes* sp. SE50/110 ist partiell aufgeklärt. Lange wurde vermutet, dass die Acarviosyltransferase AcbD für das Spektrum an Acarviostatins-Metaboliten verantwortlich ist (WEHMEIER

und PIEPERSBERG, 2004; ROCKSER und WEHMEIER, 2009; WENDLER *et al.*, 2013). Die Umbaureaktionen im Außenraum durch das AcbD Protein erfolgt durch eine Transglykosylierungsaktivität. Die Forschung an weiteren Acarboseproduzenten der Familie *Streptomycetaceae* zeigte, dass die Kodierung des Enzyms in bislang bekannten Acarbosebiosynthesegenclustern einzigartig ist (ROCKSER und WEHMEIER, 2009; ORTSEIFEN *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2012). Die Pfam-Ergebnisse konnten zeigen, dass unterschiedliche Domänen in dem Enzym AcbD zu finden sind, respektive eine  $\alpha$ -Amylase, CGTase und Stärke-Bindedomänen. Jedoch konnten weder eine  $\alpha$ -Amylase noch eine CGTase Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden (HEMKER, 1997; HEMKER *et al.*, 2001). In einem Vergleich zu CGTase aus *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Bacillus circulans*, *Paenibacillus macerans* und *Klebsiella pneumoniae* zeigte sich, dass die für die CGTase-Aktivität wichtige aromatische Aminosäure in AcbD ausgetauscht wurde (HEMKER *et al.*, 2001; PENNINGA *et al.*, 1995).

In Versuchen zur Charakterisierung der Acarviostyltransferase AcbD konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  zu einer Aktivitätssteigerung führt (HEMKER, 1997). Die Ergebnisse sind konform zu den bioinformatischen Analysen mit der Software RaptorX, welche zwei Bindestellen für Calcium prognostizieren. Weiterhin konnte die Aminosäuresubstitution an Position 167 bereits in einem weiteren *Actinoplanes* sp. Stamm untersucht werden. Der Austausch in diesem Stamm äußerte sich durch eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes und wurde durch spätere Sequenzierung bestätigt (SELBER *et al.*, 2011). Das mutierte Protein zeigte im Vergleich zu *Actinoplanes* sp. SN223/29 mit 0,8 nkat/mg einen geringeren mol-Umsatz pro Sekunde. Jedoch zeigte die Bestimmung des  $K_M$ -Wertes eine höhere Effizienz des mutierten Enzyms für die Substrate Maltose und Acarbose (HEMKER, 1997).

Mit Hilfe der Software RaptorX werden neben zwei Bindetaschen für Calcium drei Taschen für die Bindung von Glucose, Maltose sowie die Glucose-abgeleiteten Moleküle 6-deoxy- $\alpha$ -D-Glucose sowie 6-Amino-4-hydroxymethyl-cyclohex-4-ene-1,2,3-Triol vorhergesagt. Das zuletztgenannte Molekül unterscheidet sich lediglich durch eine Doppelbindung zwischen C5 und C6 von dem Acarbose-ähnlichen Molekül Validamin. Validamin ist ein Vorläufer für eine Reihe von Mitglieder der  $\text{C}_7\text{N}$ -Aminocyclitol Molekülfamilie wie Acarbose, Validamycin, Cetoniacyton, Salbostatin (MAHMUD, 2009) und besitzt ebenfalls inhibitorische Aktivitäten gegen  $\alpha$ -D-Glucosidasen wie die Schweine-Sucrase (HORII *et al.*, 1986). In Experimenten zur Steigerung der Acarboseproduktion in Fermentationen mit *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196 konnte eine gesteigerte Synthese durch Zusatz von Validamin gezeigt werden (XUE *et al.*, 2013). Die erhöhte Synthese ging gleichzeitig mit einer reduzierten Bildung der Komponente C einher. Im Gegensatz

zu Validamin stellt Komponente C kein Substrat der Acarviosyltransferase AcbD dar (HEMKER, 1997). Einen Einfluss auf die erhöhte Acarboseproduktion in *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196 durch die Aktivität der Acarviosyltransferase wäre denkbar.

In diesem Abschnitt wurde die Genomsequenzen zweier Acarboseproduzenten mit AP1 verglichen. Zunächst wurden alle SNPs systematisch erfasst. In einem nächsten Schritt wurde das Acarbosebiosynthesecluster genauer betrachtet und die detektierten Punktmutationen beschrieben. In AP3 konnte eine Basentransition identifiziert werden, die zu einer frühzeitigen Stopmutation in der Acarviosyltransferase AcbD führt und damit zu einem um mehr als die Hälfte verkürztem Transkript. Es wird davon ausgegangen, dass das AcbD-Protein in AP3 nicht mehr funktionsfähig ist. Um nicht nur über mögliche Effekte dieser Genomveränderungen zu spekulieren, werden im Folgenden vergleichende Analysen der drei Stämme in Bezug auf Wachstum, Acarbosebiosynthese, Protein- sowie Metabolitprofilen durchgeführt. Vor dem Hintergrund der Acarbosebildung in den drei *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämmen werden Bedingungen gewählt, in denen eine hohe Produktion des Sekundärmetaboliten zu erwarten ist, sprich bei Wachstum auf Minimalmedium mit Maltose und Maltotriose.

### 3.2.2 Wuchsverhalten und Acarboseproduktion von drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen bei Anzucht in Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium

Ein Aspekt im Vergleich der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme liegt in den Unterschieden in der Produktion des Pseudotetrasaccharids Acarbose. In wissenschaftlichen Arbeiten zeigte sich ein positiver Effekt bei Wuchs auf Maltose sowie Maltotriose für die Acarboosesynthese (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004), zum Beispiel durch die Induktion der Acb-Proteine AcbD sowie AcbE (BRUNKHORST *et al.*, 2005) oder die direkte Inkorporation zur Synthese von Acarbose (LEE *et al.*, 1997). Weiterhin können putative Bindestellen von MalT, einem Maltose/ Maltotriose-abhängigen Aktivatorprotein, in der intergenischen Region von den Genen *acbE* und *acbD* gefunden werden (STRATMANN, 1997; BRUNKHORST *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme AP1 sowie die weiterentwickelten Stämme AP2 und AP3 in Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium angezogen. Während der Schüttelkolbenkultivierungen wurden Proben für die Analysen auf Proteom- und Metabolomebene genommen. Zur Bestimmung des Wachstums und der Acarbosekonzentration wurden weitere Proben zu acht verschiedenen Zeitpunkten genommen, respektive 24, 96, 120, 144, 168, 192, 264 und 288 Stunden. Um wichtige Zeitpunkte ausreichend abzudecken variierte die Anzahl der Replikate zwischen den Bedingungen sowie den Zeitpunkten (siehe Tabelle 3.5).

Wuchsverhalten der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, ist das Wachstumsverhalten der Stämme ein wichtiger Parameter für die wachstumsassoziierte Produktbildung von Acarbose.

**Tabelle 3.5: Anzahl an biologischen Replikaten für unterschiedliche Zeitpunkte, Stämme und verwendete C-Quelle.**

Stamm \ Zeit [h]	Zeit [h]							
	24	96	120	144	168	192	264	288
<b>Zucker</b>								
AP1	4	4	4	4	4	4	4	4
AP2	4	4	4	4	4	4	4	4
AP3	3	3	3	3	3	3	3	3
AP1	4	4	4	4	4	4	4	4
AP2	6	6	6	6	10	10	10	6
AP3	5	5	5	5	9	8	8	5

Die Wuchsverläufe auf Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium zeigen, dass die drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme auf beiden C-Quellen wachsen können (siehe Abbildung 3.9). Alle drei Stämme erreichten etwas höhere Biotrockenmassen bei Wuchs auf Minimalmedium B mit Maltotriose (MT-MM (B)) im Vergleich zum Wachstum auf Minimalmedium B mit Maltose (Mal-MM (B)). Dies ist kongruent zur ermittelten zellulären Atmung von AP1, welche in Vorversuchen mit phänotypischen Mikroarrays untersucht wurde (siehe Tabelle A.1).

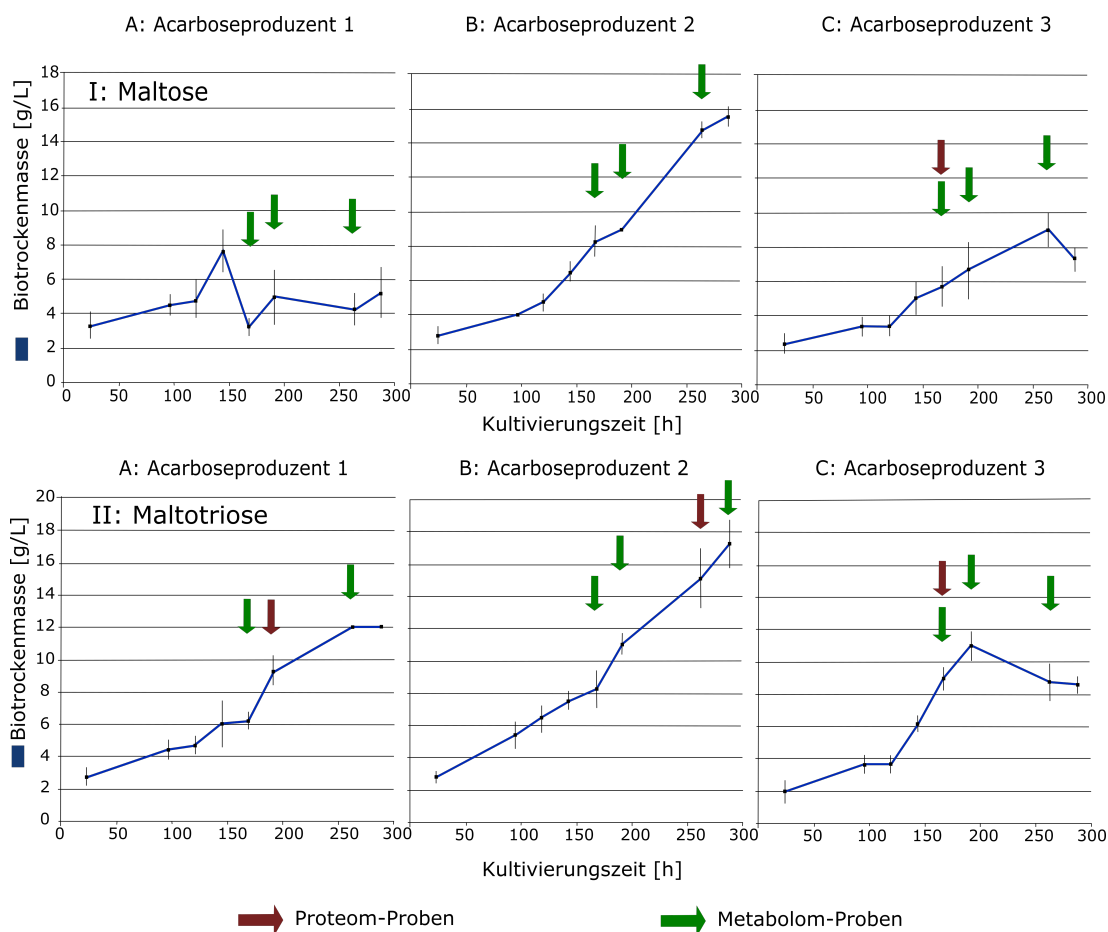
In sämtlichen Kultivierungen verlief die für bakterielle Kultivierungen typische Wachstumsphase ab einem Zeitpunkt von ca. 120 Stunden linear. Die stationäre sowie die Absterbephase zeigte sich lediglich beim AP3 bei Wuchs auf beiden Substraten. Der AP2 zeigte sowohl auf Maltose- als auch auf Maltotriose-Minimalmedium die höchsten Biotrockenmassen im Vergleich zu AP1 und AP3. Zur Messung des letzten Zeitpunktes mit Maximalwerten der Biotrockenmasse von 16 g/L bei Wuchs auf Mal-MM (B) sowie 17 g/L auf MT-MM (B) befand sich die Kultur von AP2 immer noch in der Wachstumsphase. Der Wachstumsverlauf suggeriert, dass eine Zunahme in der Bildung von Biomasse auch nach dem Aufzeichnungszeitraum noch möglich sein kann.

Bei Kultivierung von AP1 auf Mal-MM (B) fiel auf, dass dieser lediglich bis zu einer maximalen BTM von etwa 8 g/L wuchs (vergleiche Abbildung 3.9). Weiterhin waren die vier aufeinanderfolgende Phasen des bakteriellen Wachstums, respektive Anlauf- (lag), Wuchs-, stationäre sowie Absterbephase, nicht im Verlauf erkennbar. Der Höchstwert in der BTM wurde bereits nach 144 Stunden erreicht. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich AP2 sowie AP3 mit einem linearen Anstieg der BTM in der Wachstumsphase. Im AP1 kommt es zunächst zu einem Abfall in der Biotrockenmassen und daraufhin ab einem Zeitpunkt von 192 Stunden zu einer Stagnation im Wachstum. Bei Wuchs der Acarboseproduzenten auf MT-MM (B) zeigt der Acarboseproduzent 3 das schlechteste Wachstum und erreichte nur eine maximale BTM von 11 g/L nach einer Kultivierungszeit von 192 Stunden.

Als Maß für das Zellwachstum wird häufig die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  angeführt. Trotz Schwierigkeiten in der Kultivierung von AP1 bei Wuchs auf Mal-MM (B), wurde im Vergleich zu den anderen hier dargestellten Wuchsverläufen eine hohe maximale Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu_{max} = 0,020 \text{ h}^{-1}$  zwischen 120 und 144 Stunden erreicht. Die Verdopplungszeit lag zu diesem Zeitpunkt bei  $t_d = 34$  Stunden. Die höchste Wachstumsrate bei Kultivierung von AP1 auf MT-MM (B) von  $0,016 \text{ h}^{-1}$  wurde zwischen 168 und 192 Stunden erzielt. Für AP2, welcher den besten Wuchsverlauf der drei hier betrachteten *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen bezogen auf die Biotrockenmassen zeigte, lagen die maximalen Wachstumsgeschwindigkeiten bei



### 3.2 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen (Teil 2)



**Abbildung 3.9: Wuchsverlauf unterschiedlicher *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme bei Kultivierung auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium.** In der Abbildung sind die Biotrockenmassen über den Wuchsverlauf des Acarboseproduzenten 1, Acarboseproduzenten 2 sowie Acarboseproduzenten 3 bei Anzucht auf Minimalmedium ergänzt mit Maltose- (I) und Maltotriose (II) dargestellt. Die Messpunkte sind zur Veranschaulichung mittels Linien verbunden. Die Standardabweichung als Maß für die Streuung der Replikate um den Mittelwert ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Die Zeitpunkte für die Probenahme von Proteom- (rot) sowie Metabolom-Proben (grün) sind mittels Pfeilen markiert.

Kultivierung auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium bei  $\mu = 0,013 \text{ h}^{-1}$  und  $0,012 \text{ h}^{-1}$ . Dies entspricht einer Verdopplungszeit  $t_d$  von ca. 55 Stunden. AP3 zeigte bei Wuchs auf MT-MM (B) die maximale Wachstumsgeschwindigkeit mit  $\mu_{max} = 0,022 \text{ h}^{-1}$  zwischen 120 und 144 Stunden. Auf Mal-MM (B) wurde in der gleichen Zeitspanne eine Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu = 0,017 \text{ h}^{-1}$  und eine Verdopplungszeit von  $t_d = 40$  Stunden erreicht. Obwohl alle Stämme eine höhere Biotrockenmasse bei Wuchs auf MT-MM (B) erzielten, war die maximale Wachstumsgeschwindigkeit auf Mal-MM (B) höher.

Anhand der Resultate ist zu erkennen, dass die Stämme auf beiden Kohlenstoffquellen wachsen können. In Versuchen zur quantitativen Analyse der Metabolite des Zentralstoffwechsels des *Actinoplanes* sp. SE50/110 (AP1) zeigte sich ein vergleichbares Wachstum des Stamms auf Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium (IMMEL, 2013). In der hier dargestellten Kultivierung konnte ein besseres Wachstum auf MT-MM (B) im Vergleich zu Mal-MM (B) beobachtet werden. In der Kultivierung wurden identische Konzentrationen an Maltose sowie Maltotriose eingesetzt, welche sich jedoch im Bezug auf die C-Mol Mengen voneinander unterscheiden. Es wurden 2,7 C-mol (277,5 mM) Maltose und 3,6 C-mol (198,24 mM) Maltotriose eingesetzt. In der Veröffentlichung von ORTSEIFEN (2012) konnte in Kultivierungen von *Actinoplanes* sp. SE50/110 auf Maltose-, Glucose- sowie Galactose-Minimalmedium mit äquivalenten Mengen von 2,4 C-mol gezeigt werden, dass nach 100 Stunden lediglich 43 % der C-Quelle verbraucht war. Demzufolge ist der vollständige Verbrauch der C-Quelle und damit einhergehend ein besseres Wachstum auf MT-MM (B) unwahrscheinlich. Weiterhin sollte sich ein Verbrauch des Kohlenstoffs erst gegen Ende der Kultivierung auf die *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme auswirken.

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, konnte ein lineares Wachstum in der Wachstumsphase von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen bereits in anderen Kultivierungen beobachtet werden (HÜRTGEN, 2011; ORTSEIFEN, 2012; DROSTE, 2015). Weiterhin wurde bei Wuchs auf Minimalmedium A mit Maltose (Mal-MM (A)) maximale Biotrockenmassen von ca. 16 g/L erreicht (vergleiche Abschnitt 3.1.1). In Veröffentlichungen mit zur in Teil 1 gezeigten Kultivierung vergleichbaren Probenahmeprotokoll konnten bei Wuchs auf Mal-MM (A) maximale Biotrockenmassen zwischen 12,0 g/L (IMMEL, 2013) und 12,5 g/L (DROSTE, 2015) gemessen werden. Während AP3 mit einer maximalen Biotrockenmasse von 9,0 g/L unter diesen Werten liegt, befindet sich der Wert der BTM mit 15,5 g/L für AP2 in dem beschriebenen Bereich. Im Bezug auf die Kultivierung auf Maltotriose liegt der einzige bislang veröffentlichte Wert für die BTM bei Wuchs

des Acarboseproduzenten 1 auf einem modifizierten Maltotriose-Minimalmedium bei ca. 12 g/L (IMMEL, 2013). Dieser Wert deckt sich mit der hier gezeigten Kultivierung von *Actinoplanes* sp. SE50/110. Während AP1 eine maximale Biotrockenmasse von 12,0 g/L erreicht, liegt die maximale Biotrockenmassen für AP3 mit 11,0 g/L unter und für AP2 mit 17,2 g/L über dem Ergebnis.

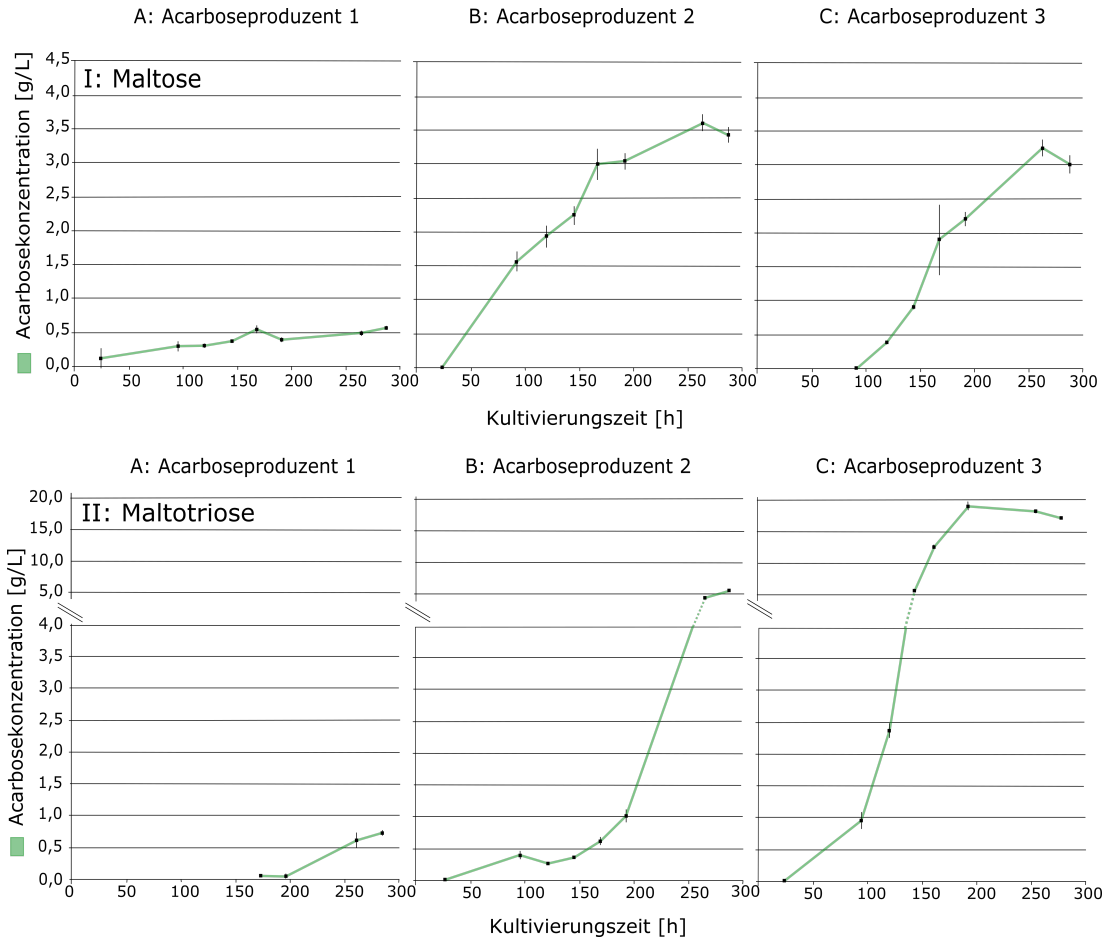
Die hier gezeigten maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen  $\mu_{max} = 0,012 \text{ h}^{-1}$  bis  $0,022 \text{ h}^{-1}$  decken sich nicht mit den Werten anderer Studien auf *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämmen. Im Vergleich zum ersten Experiment (Teil 1) liegen die Werte um ein Vielfaches unter den maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten von bis zu  $\mu_{max} = 0,150 \text{ h}^{-1}$  (vergleiche Abschnitt 3.1.1). Damit korrelierend liegen ebenfalls die Literaturwerte für die minimale Verdopplungszeiten für die Kultivierungen von AP1 in Minimalmedium A um ein Vielfaches unter den hier erreichten Zeiten. In der Wachstumsphase lagen die Verdopplungszeiten zwischen  $t_d = 34$  Stunden (AP1, Mal-MM) und 56 Stunden (AP2, MT-MM). Die oben benannten Differenzen in der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit sowie den Verdopplungszeiten zwischen den Experimenten in Teil 1 und Teil 2 könnten auf den Einsatz unterschiedlicher Stickstoffquellen zurückgeführt werden. Während in dem Minimalmedium nach WENDLER *et al.* (2013) Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle fungiert, wird in der hier gezeigten Kultivierung Asparagin als N-Quelle genutzt.

Zusammengefasst zeigt der Acarboseproduzent 2 das beste Wachstum sowohl auf Maltose-Minimalmedium als auch auf Maltotriose-Minimalmedium. Im nächsten Abschnitt soll der Aspekt der Acarbosebildung genauer betrachtet werden.

#### Acarboseproduktion der drei *Actinoplanes* sp. Stämme bei Anzucht in Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium

Die Bestimmung der Acarbosekonzentration im Kulturüberstand der *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme erfolgte nach dem Protokoll von WENDLER *et al.* (2013). Der Methode liegt das Prinzip der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zu Grunde, ein Modus der Flüssigkeitschromatographie, mit der Substanzen für nachgeschaltete Analysen getrennt oder mittels Standards quantifiziert werden können. Letzteres wird hier angewandt. Die Acarbosekonzentrationen wurden für alle vorhandenen biologischen Replikate vermessen und die Standardabweichungen berechnet.

Acarbose konnte bei Anzucht auf Mal-MM (B) sowie MT-MM (B) von allen hier betrachteten Stämmen synthetisiert werden (siehe Abbildung 3.10). Die Verläufe der Acarboseproduktion über die Zeit glichen dem Trend, der in der Biomassenbildung



**Abbildung 3.10: Acarboseproduktion unterschiedlicher *Actinoplanes* sp. Stämme bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium.** In der Abbildung sind die Acarbosekonzentrationen über den Kultivierungsverlauf des Acarboseproduzenten 1, Acarboseproduzenten 2 und Acarboseproduzenten 3 dargestellt. Um die Acarbosekonzentration unter den sechs Bedingungen darstellen und gleichzeitig die Maltose- (I) sowie die Maltotriose- (II) Bedingung vergleichen zu können variiert die Skala der y-Achse in der unteren Abbildung (II). Die Messpunkte sind zur Veranschaulichung mittels Linien verbunden.

zu erkennen war (siehe Abbildung 3.9). Weiterhin wurde bei sämtlichen Acarboseproduzenten mehr Acarbose bei Wuchs auf MT-MM (B) im Vergleich zu Mal-MM (B) gemessen. Trotz der Auffälligkeiten im Wachstums von AP1 auf Mal-MM (B) war ein linearer Anstieg in der Acarbosekonzentration über die Zeit zu verzeichnen. Dabei gab es ein lokales Maximum nach 168 Stunden, also um 24 Stunden nach dem Erreichen des Maximalwerts der Biotrockenmasse in AP1. AP2 zeigte die höchsten Acarbosewerte auf Mal-MM (B) und erreichte das 6,8fache der gemessenen Konzentration in AP1, während AP3 das 6,5fache der Konzentration erreichte. Im Gegensatz dazu erreicht AP3 im Vergleich der drei Stämme bei Wachstum auf MT-MM (B) die höchste Acarbosekonzentration, respektive das 25,8fache der Konzentration im Acarboseproduzent 1. Jedoch ließ sich bei AP3 ein Sinken der Konzentrationen gegen Ende der Kultivierung feststellen. Auch AP2 erreichte bei Wuchs auf MT-MM (B) vor Ende der Probenahme das Maximum der Acarbosekonzentration mit der 7,5fachen Menge im Vergleich zu AP1. Für die anderen Bedingungen lässt sich darüber spekulieren, ob bei längerem Wachstum die Acarbosekonzentration noch weiter ansteigen würde.

Als eine Kenngröße für den Vergleich der Produktbildung zwischen Stämmen wird häufig die spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit  $\sigma$  genutzt, welche sich aus der Acarbosekonzentration sowie der Biotrockenmassen berechnet (siehe Tabelle A.3 im Anhang). Die höchsten spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeiten wurden bei AP3 in der frühen Wachstumsphase zwischen 144 und 168 Stunden erzielt. Dabei zeigte AP3 bei Wachstum auf Mal-MM (B) ein Produktbildungsgeschwindigkeit von  $\sigma_{max} = 0,00763 \text{ h}^{-1}$  und auf MT-MM (B) von  $\sigma_{max} = 0,03928 \text{ h}^{-1}$ . Der Stamm AP2 erreichte bei Wuchs auf Mal-MM (B) Werte von  $\sigma_{max} = 0,00654 \text{ h}^{-1}$  zwischen 24 und 96 Stunden und auf MT-MM (B) zwischen 196 und 264 Stunden einen Wert von  $\sigma_{max} = 0,00373 \text{ h}^{-1}$ . Der maximalen Werte für den Acarboseproduzent 1 mit  $\sigma_{max} = 0,00089 \text{ h}^{-1}$  bei Wuchs auf Mal-MM (B) zwischen 264 und 288 Stunden sowie  $\sigma_{max} = 0,00074 \text{ h}^{-1}$  bei Wachstum auf MT-MM (B) zwischen 196 und 264 Stunden. Mit Ausnahme von AP1 bei Wuchs auf Minimalmedium supplementiert mit Maltose stützen die Daten eine wachstumsassoziierte Produktbildung.

Die Resultate lassen erkennen, dass die gewählten Kohlenstoffquellen zur Produktion von Acarbose geeignet sind. Publierte Werte für die Acarbosekonzentration von 0,6-1 g/L für den Acarboseproduzent 1 bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte (FROMMMER *et al.*, 1979). Im Gegensatz dazu liegen die maximalen Acarbosekonzentrationen für die Acarboseproduzenten 2 mit 3,6 g/L auf Mal-MM (B) und 5,4 g/L auf MT-MM (B) um ein Vielfaches über dem publizierten Wert sowie dem von AP1.

Der Acarboseproduzent 3 erreicht mit 3,2 g/L bei Wachstum auf Mal-MM (B) und 18,78 g/L bei Wachstum auf MT-MM (B) ebenfalls höhere Werte als AP1.

Anhand der Ergebnisse ist ersichtlich, dass unter Zusatz von Maltotriose im Vergleich zu Maltose mehr Acarbose gebildet wird. Ein Grund könnte die erhöhte Transkription des *acb*-Biosynthesecusters darstellen. Sowohl Maltose als auch Maltotriose wurden in Veröffentlichungen als Induktoren der AcbD und AcbE Expression beschrieben (BRUNKHORST *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte in einem Versuch zur Transkription von *acbV* gezeigt werden, dass das Gen bei Supplementation von Maltotriose zu Beginn der Kultivierung stärker transkribiert ist (persönliche Kommunikation U. Wehmeier). RNASeq-Experimente konnten zeigen, dass das Acarbosebiosynthesegencluster entweder im Ganzen oder gar nicht transkribiert wird (SCHWIENSTEK *et al.*, 2013). Basierend auf den Resultaten und unter der Annahme, dass die Beobachtungen für *acbV* repräsentativ für das ganze Gencluster sind, könnte eine frühzeitigere Expression aller Acb-Proteine unter Maltotriose-Bedingungen eine erhöhte Acarbosebiosynthese zur Folge haben.

Während AP2 ein besseres Wachstum im Vergleich zu den anderen zwei hier betrachteten Stämme aufwies, zeigte AP3 die höchsten Werte für die spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit. In Veröffentlichungen wurde für den *Actinoplanes* sp. SE50/110 Wildtyp-Stamm Werte von  $\sigma_{max} = 0,006 \text{ h}^{-1}$  auf Mal-MM (B) publiziert (DROSTE, 2015). Der  $\sigma$ -Wert ist vergleichbar zu den hier gezeigten maximalen spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeiten von AP2 und AP3 von  $\sigma_{max} = 0,00654 \text{ h}^{-1}$  und  $0,00763 \text{ h}^{-1}$  auf Mal-MM (B). Vergleichbare Werte konnten für die Actinorhodinproduktion im Stamm *Streptomyces lividans* gefunden werden, welcher in Fed-Batch Kultivierungen spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit von bis zu  $\sigma = 0,0042 \text{ h}^{-1}$  erreichte (BRUHEIM *et al.*, 2002). Der genetisch weiterentwickelte Stamm AP3 zeigt höhere Produktbildungsgeschwindigkeiten auf MT-MM (B). Mit  $\sigma_{max} = 0,03928 \text{ h}^{-1}$  unter Maltotriose-Bedingungen lag der Wert um ein 10faches höher als in AP2. In Veröffentlichungen wird aufgrund der maximalen spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeit in der Wachstumsphase eine wachstumsassoziierten Acarbosebildung postuliert (HÜRTGEN, 2011; DROSTE, 2015). Die Produktbildung nach Gaden unterscheidet drei Typen (GADEN, 2000). Typ I ist die wachstumsassoziierte Produktbildung, welche vom Substratverbrauch abhängt und daher zu diesem weitgehend proportional verläuft. Im Typ II hängt die Produktbildung nur indirekt vom Substratverbrauch ab, während der Typ III losgelöst vom Substratverbrauch ist. Normalerweise kann im zuletzt genannten Typ klar zwischen der Wachstums- und der Produktionsphase unterschieden werden (GADEN, 2000; STORHAS, 2003). Die postulierte wachstumsassoziierte Acarboseproduktion steht in Übereinstimmung mit den hier präsentierten Ergebnissen. Lediglich

### 3.2 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen (Teil 2)

---

die Kultivierung von AP1 bei Wuchs auf Mal-MM (B) bildet eine Ausnahme, welche jedoch vor dem Hintergrund des untypischen bakteriellen Wuchsverlaufs vernachlässigt wird.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der Stamm AP2 das beste Wachstum zeigt. Des Weiteren zeigte sich klar eine Verstärkung in der Acarbose-synthese unter Verwendung von Maltotriose gegenüber von Maltose als C-Quelle. Um genauer zu analysieren, worauf die Unterschiede basieren, werden im Folgenden weitere *omics*-Technologien eingesetzt. Dabei wird in logischer Abfolge zunächst das Gebiet der Proteomics behandelt, bevor vertiefende Analysen in der Metabolomics dargestellt werden.

### 3.2.3 Vergleichende Proteomforschung an den drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen

Die Unterschiede in den Acarbosekonzentration zwischen den drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen wurde unter Verwendung vergleichender *omics*-Methoden genauer analysiert. Bereits die Gegenüberstellung der Genome von AP1, AP2 und AP3 zeigte eine Vielzahl an Mutationen, unter anderem im Acarbosebiosynthesegencluster. Während der Anzucht der drei Stämme wurden Transkriptom, Proteom sowie Metabolom-Proben genommen (siehe Abschnitt 3.2.2).

Die Arbeiten auf der Ebene des Transkriptoms wurden von T. Wolf durchgeführt. Der Vergleich zwischen AP1, AP2 und AP3 zeigte eine ungewöhnlich hohe Anzahl differenziell transkribierter Gene. Der Vergleich von AP1 mit dem AP2 ergab 1031 und der Vergleich zwischen den AP3 und AP2 brachte als Resultat 862 signifikant differenziell transkribierte Gene. Eine mögliche Erklärung könnte die Probenahme in unterschiedlichen Wachstumsphasen verbunden mit der geringen Halbwertszeit von Transkripten sein. Die Halbwertszeiten von mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae* variieren zwischen 3 und 90 Minuten (WANG *et al.*, 2002). Dabei liegt die durchschnittliche Halbwertszeit bei ca. 20 Minuten (MILO und PHILLIPS, 2015). Auch die Halbwertszeit von Proteinen sind divers. Zum Beispiel konnten Studien zum *protein turnover* in *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, dass es zwei Klassen von Proteinen gibt, respektive kurz- und langlebige (CHRISTIANO *et al.*, 2014). Während die erste Gruppe eine durchschnittliche Halbwertszeit von einer halbe Stunde besitzt, zeigen Proteine der zweiten Gruppe eine durchschnittliche Halbwertszeit von mehr als drei Stunden (MILO und PHILLIPS, 2015). Durch die längere Halbwertszeit von Proteine wird davon ausgegangen, dass diese zwischen den Wachstumsphasen im Vergleich zu Transkripten geringere Variation im Bezug auf Vorhandensein und Menge aufweisen. In diesem Abschnitt wird daher der Vergleich auf der Ebene des Proteoms zwischen AP1, AP2 und AP3 dargestellt und die Ergebnisse der Transkriptomforschung im Hintergrund der Resultate der Proteomforschung diskutiert.

#### Systematische Erfassung cytosolischer sowie extrazellulärer Proteine der drei *Actinoplanes* sp. Stämme

Die drei Acarboseproduzenten wurden in Maltose- (Mal-MM) sowie Maltotriose-Minimalmedium (MT-MM) angezogen (vergleiche Abschnitt 3.2.2). Für die Analysen der *Actinoplanes* sp. SE50/110 Proteine wurden Proben in der späten Wachstumsphase der MT-MM (B) Kultivierung genommen, respektive für AP1 nach 192 Stunden, für AP2



nach 268 Stunden sowie für AP3 nach 168 Stunden (siehe Abbildung 3.9). Weiterhin wurde für den Vergleich zwischen den zwei C-Quellen eine zusätzliche Probe von AP3 bei Wachstum auf Mal-MM (B) nach 168 Stunden genommen. Anschließend wurden die extrazelluläre und cytosolische Proteine der drei Acarboseproduzenten isoliert, im Gel separiert und im Massenspektrometer vermessen. Die Identifizierung der Proteine erfolgte anhand der *BioTools* Software, welche theoretisch *in silico* verdaute Aminosäuresequenzen von *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit den aus der Messung erhaltenen Spektren vergleicht. Dabei können für distinkte Spots auch mehrere Proteine identifiziert werden. Die Parameter in der Methode der Tandemmassenspektrometrie sind so festgesetzt, dass ein zweites Protein nur als identifiziert gilt, wenn das gemessene Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) ein für das Protein einzigartiges Peptid identifiziert. Dadurch wird das Problem der falsch-positiven Mehrfachidentifizierungen aufgrund ähnlicher Domänen umgangen.

Ziel der Analysen war es einen Überblick über die cytosolischen sowie extrazellulären Proteine der drei hier betrachteten *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme bei Wachstum auf Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium zu bekommen. In dem Experiment gelang es, Proteine aus der extrazellulären sowie cytosolischen Fraktion in allen Acarboseproduzenten zu identifizieren. Von 8270 annotierten Proteinen in *Actinoplanes* sp. SE50/110 konnte zwischen 3,7 und 9,2 % der Proteine, resultierend aus der Summe beider Fraktionen, detektiert werden. Von 2215 prognostizierte extrazelluläre Proteine konnten zwischen 6,6 % und 12,6 % der Genprodukte in der extrazellulären Fraktion und von 5463 putative cytosolische Proteine 3,0 % bis 8,8 % identifiziert werden. Die 592 vorhergesagten Transmembranproteine von *Actinoplanes* sp. SE50/110 konnten mit der verwendeten Methode nicht betrachtet werden.

Die Resultate zeigten, dass bei der Analyse des cytosolischen Proteoms im Durchschnitt 80 % und im extrazellulären Proteom 83 % der analysierten Spots Proteine zugeordnet werden konnten (siehe Tabelle A.4 im Anhang). Die höchste Identifizierungsraten mit 90,04 % konnte bei der Analyse der cytosolischen Fraktion des AP3 erzielt werden. Im Vergleich der Acarboseproduzenten fiel auf, dass sowohl in der intrazellulären als auch in der extrazellulären Fraktion die meisten Proteine in AP3 gefunden werden konnten. Dies wird ebenfalls in einer höheren Diversität an identifizierten Proteine in AP3 im Vergleich zu den anderen Stämmen ersichtlich. Jedoch ist anzumerken, dass die Differenzen mit der Anzahl an analysierten Spots kovariert.

Mit den Differenzen in der Anzahl an identifizierten Spots zwischen den drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen korrelieren ebenfalls die Unterschiede in der Anzahl der detektierten Acarbose-Proteine. In der cytosolischen Fraktion konnte von den 16

intrazellulären Acarboseclusterproteinen in AP1 zwei (12,5 %), in AP2 fünf (31,25 %) und in AP3 elf (68,75 %) der Genprodukte identifiziert werden. Die cytosolische Fraktion beziehungsweise die identifizierten Acb-Proteine werden im Folgenden näher betrachtet.

In der Proteomforschung wird zwischen zwei Techniken unterschieden, gel-freie sowie gel-basierte Protokolle. Die hier angewendete Methode folgt dem zuletzt genannten Prinzip. Hierzu werden die Proteine über zwei Dimensionen separiert. Als erster Parameter wird sich die Eigenschaften unterschiedlicher isoelektrischer Punkte von Proteinen zu Nutzen gemacht. In einer zweiten Dimension wird das Protein anhand dessen Molekulargewicht in der Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) getrennt. Die Proteine werden anschließend über kolloidales Coomassie im 2D-Gel angefärbt. Die technischen Grenzen der Methoden liegen zum einen in der Auflösung von sehr hydrophoben sowie Proteinen mit einem Molekulargewicht größer 250 kDa. Des Weiteren können die erwarteten *pI*-Werte im pH-Bereich von 3 bis 13 liegen, während technisch lediglich ein *pI* von 11,5 erreichbar ist (HOFFROGGE, 2011).

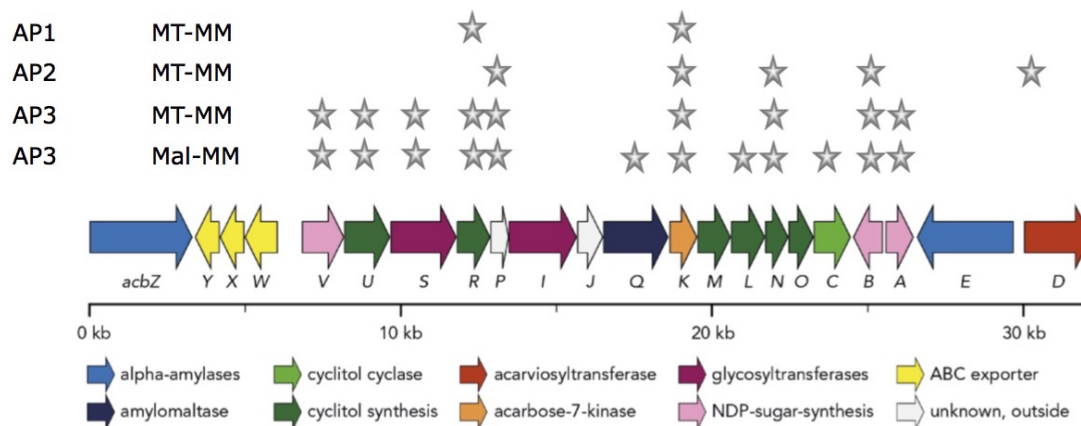
Die angewendete Methode der gel-basierten Proteomforschung mit kolloidalem Coomassie angefärbten Spots weist im Vergleich mit gel-freien Proteomics oder dem Nutzen von Fluoreszenz-basierten Farbstoffen eine geringere Sensitivität auf. Proteine mit einer geringeren Konzentration als 20 ng werden nicht erfasst (NEUMANN, KHALAF und RIMPLER, 1994). Zusätzlich kann das manuelle Ausschneiden der Proteinspots zu Fehlern führen. Alle Techniken in der Proteomforschung, ob gel-frei oder gel-basiert, erlauben lediglich Aussagen über das Vorhandensein von Proteinen, jedoch nicht über das Fehlen einzelner Genprodukte.

#### Vergleich der Acb-Proteine in der cytosolischen Fraktion der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme

Im Folgenden wurden die cytosolischen Proteine unter vier Bedingungen genauer betrachtet, respektive die drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme bei Anzucht auf Maltotriose-Minimalmedium sowie zusätzlich der Acarboseproduzent 3 bei Wachstum auf Maltose-Minimalmedium. Beim Vergleich der cytosolischen Proteome der drei Acarboseproduzenten lag der Fokus auf den Proteinen des Acarbosebiosynthesegenclusters. Die 22 im *acb*-Gencluster kodierten Gene wurden in vorangegangenen Studien unter Verwendung von Locate P v.2.0 (vergleiche Abschnitt 2.2) sowie anhand von experimentellen Studien (WENDLER *et al.*, 2013) den zellulären Fraktionen zugeordnet. Neben drei extrazellulären Genprodukten sowie drei Exportproteinen waren 16 Acarboseproteine

### 3.2 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen (Teil 2)

im Cytosol der Zelle zu erwarten. Diese Zuordnung konnte auch in Proteomstudien bestätigt werden (WENDLER *et al.*, 2015; WENDLER *et al.*, 2016).



**Abbildung 3.11: Darstellung der identifizierten Acarbosebiosynthesepoteine in der cytosolischen Fraktion der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme bei Anzucht auf Minimalmedium mit Maltose und Maltotriose.** In der Abbildung ist das Acarbosebiosynthesegencluster von *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit seinen 22 Genen dargestellt. Die Stern-Symbole in der Abbildung repräsentieren die identifizierten Acarboseclusterproteine zur jeweiligen Bedingung, respektive *Actinoplanes* sp. SE50/110 Acarboseproduzent 1 (AP1), Acarboseproduzent 2 (AP2) und Acarboseproduzent 3 (AP3) Kulturen in Minimalmedium mit Maltose (Mal-MM) sowie Maltotriose (MT-MM) (modifiziert Abbildung nach WENDLER *et al.* (2013)).

Die intrazellulär identifizierten Acarboseproteine in den drei Acarboseproduzenten entsprachen der prognostizierten zellulären Lokalisation (siehe Abbildung 3.11). Die Genprodukte des ABC-Exporters AcbWXY konnten in keiner der hier analysierten cytosolischen Fraktion gefunden werden. Ähnliches galt für die drei extrazellulären Acb-Proteine AcbZ, AcbE sowie AcbD, wobei zuletzt genanntes im Cytosol von AP2 bei Wuchs auf Maltotriose-Minimalmedium identifiziert werden konnte. Das Auffinden von AcbD im intrazellulären Raum könnte auf die hohe Abundanz des Proteins im extrazellulären Raum zurückgeführt werden (vergleiche Abbildung 3.12).

Die Acarbose-7-Kinase AcbK, welche für die Phosphorylierung der Acarbose sowie deren Homologe nach dem Re-Import zuständig ist, konnte unter allen Bedingungen gefunden werden. Des Weiteren wurden die für die Biosynthese der Acarviostyl-Einheit relevanten Proteine AcbR, AcbN sowie AcbB in drei der vier hier betrachteten Konditionen identifiziert. AcbP, dessen Funktion bislang noch unbekannt ist, konnte in AP2 bei Wachstum auf MT-MM (B) und in AP3 sowohl bei Wuchs auf Mal-MM (B) als auch auf

MT-MM (B) detektiert werden. Das Genprodukt von *acbP* konnten jedoch nicht in AP1 gefunden werden. Eine steigende Anzahl an identifizierten cytosolischen Acb-Proteinen von AP1 über AP2 bis hin zu AP3 war zu erkennen.

Erste gel-basierte Ansätze zur Detektion der Proteine des *acb*-Biosynthesegenclusters resultierten in neun Identifizierungen innerhalb der intrazellulären Fraktion (WENDLER *et al.*, 2013). In Wachstumsversuchen des Acarboseproduzenten 1 auf Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen, respektive Maltose, Glucose, Galactose und Mischungen aus Maltose und Glucose sowie Maltose und Galactose, konnten insgesamt vierzehn intrazelluläre Acb-Proteine detektiert werden (ORTSEIFEN, 2012). In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte mit einer sensitiveren gel-freien Methode alle *acb*-Genprodukte identifizieren werden (WENDLER *et al.*, 2015). In dem hier gezeigten Experiment konnten zwischen 2 und 12 intrazellulären Acb-Proteine in den drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen gefunden werden. Ein Grund für die niedrige Anzahl an detektierten Acarbosebiosynthesegenprodukten könnte zum einen in der Sensitivität der Methode liegen und zum anderen in der geringeren Menge an eingesetztem Protein im Vergleich zu vorangegangenen gel-basierten Ansätzen liegen. Die Mikroarray Experimente ließen jedoch auf eine vollständige Expression aller Clustergene schließen (persönliche Kommunikation T. Wolf). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass die Identifizierung eines Acb-Proteins die Expression des gesamten Genclusters anzeigt, da auch in publizierten RNASeq-Experimenten das Cluster entweder im Ganzen oder gar nicht transkribiert wurde (SCHWIENTEK *et al.*, 2013).

Die hier beschriebenen Identifizierungen der intrazellulären Acarbosebiosyntheseproteine stehen im Einklang mit publizierten Resultaten (HÜRTGEN, 2011; ORTSEIFEN, 2012; WENDLER *et al.*, 2015; WENDLER *et al.*, 2016). Die Detektion der Acarbose-7-Kinase AcbK kovariiert mit der beschriebenen Dominanz des Proteins innerhalb der cytosolischen Fraktion durch die Arbeiten von WENDLER *et al.* (2015). Die starke Expression des Proteins könnte auf dessen Rolle im Acarbosemetabolismus zurückgeführt werden (siehe Abschnitt 1.3.3). Um die eigenen Enzyme zu schützen, werden die Acarviostatin-Metabolite, sprich Acarbose sowie deren Homologe, nach dem Re-Import in die Zelle rephosphoryliert (DREPPER und PAPE, 1996; GOEKE, DREPPER und PAPE, 1996; WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004). Da die Acarboseproduktion wachstumsassoziiert verläuft, werden in der Wachstumsphase bereits hohe Konzentrationen des Pseudotetrasaccharids erreicht (vergleiche Abschnitt 3.2.2 und HÜRTGEN (2011); ORTSEIFEN (2012)).

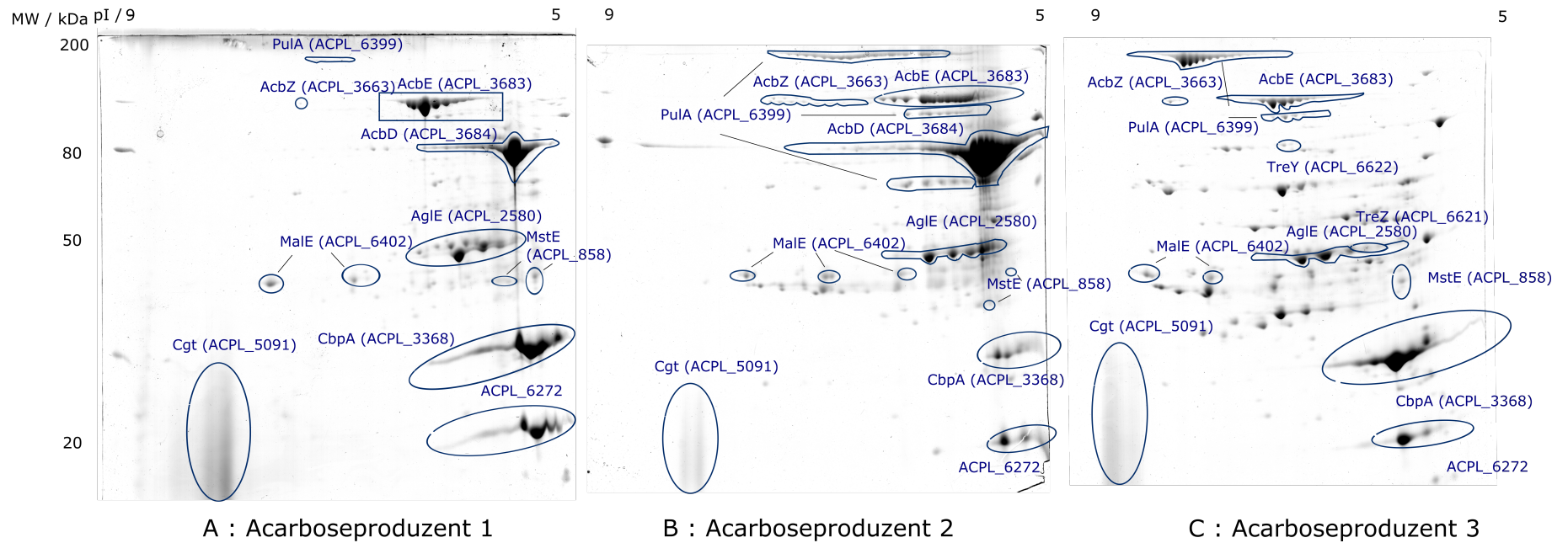
Die Identifizierung des extrazellulären Proteins AcbD im Cytoplasma von AP2 ist konsistent zu anderen wissenschaftlichen Studien (WENDLER *et al.*, 2013; WENDLER *et al.*, 2014; WENDLER *et al.*, 2015). Die Acarviosyltransferase kann entweder eine zusätzliche Rolle im Cytoplasma einnehmen, wie von Zhang *et al.* (2002) postuliert, und / oder die Detektion innerhalb der Zelle fußt auf der hohen Abundanz des Proteins.

In der Studie von WENDLER *et al.* (2015) zeigten sich neben AcbK auch AcbS, AcbR und AcbP im Vergleich zu anderen im Cluster lokalisierten Proteinen als abundant (vergleiche Abbildung 1.9). Die Glykosyltransferase AcbS und die 1-*epi*-Valienol-1,7-Bisphosphat-1-Adenylyltransferase AcbR katalysiert die letzten beiden Schritte zur Bildung der Acarviosyl-Einheit (siehe Abschnitt 1.3.2). Die Rolle der putativen NTP-Pyrophosphohydrolase innerhalb des Acarbosemetabolismus ist bislang unklar. Die Identifizierung der Proteine AcbR sowie AcbP kann aufgrund ihrer Abundanzen in der intrazellulären Fraktion erklärt werden, welche in der Studie von WENDLER *et al.* (2015) dargestellt ist. Zwei weitere Acb-Proteine, welche neben AcbR und AcbP ebenfalls in drei Bedingungen detektiert werden konnten, sind AcbB und AcbN. Die zwei Proteine werden nicht im Acarboseproduzent 1 identifiziert. Überraschenderweise zeigte die dTDP-4-*keto*-6-Deoxyglucose Dehydratase AcbB in der Literatur eine geringe Abundanz im Vergleich zu den anderen Genprodukten des Acarbosebiosyntheseclusters (WENDLER *et al.*, 2015). Das Protein konnte jedoch bereits in anderen gel-basierten Ansätzen detektiert werden (ORTSEIFEN, 2012). Die Cyclitol-Oxidoreductase AcbN zählt in der publizierten Arbeit zu den acht dominantesten Genprodukten in der cytosolischen Fraktion (WENDLER *et al.*, 2015).

Zusammengefasst können die meisten Identifizierungen der intrazellulären Acb-Proteine aufgrund ihrer Abundanz begründet werden. Wie oben bereits beschrieben, wird davon ausgegangen, dass das kompletten Acarbosebiosynthesecluster exprimiert ist. Aufgrund der Rolle der Acarbose im extrazellulären Raum, den putativen Bindestellen für Regulatoren zwischen *acbE* und *acbD* (siehe Abschnitt 1.3.1) sowie der Punktmutationen in der Genomsequenz wurden die größten Unterschiede im Secretom erwartet, welches im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

#### Vergleich der extrazellulären Proteome der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme

Der Vergleich der Exportproteine fokussiert auf die Gegenüberstellung der produzierenden *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme bei Anzucht auf MT-MM (B). Dabei sind die extrazellulären Acarboseproteine, insbesondere die Acarviosyltransferase AcbD, abundant im Secretom von AP1 und AP2 zu finden (siehe Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12: 2D-Gele des extrazellulären Proteoms der unterschiedlichen *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämme, respektive AP1, AP2 und AP3, bei Anzucht in Maltotriose-Minimalmedium in der Wachstumsphase. Zur Isolierung der Proteine wurden die Schüttelkolbenkultivierungen in der späten Wachstumsphase für AP1 nach 192 Stunden, für AP2 nach 268 Stunden und für AP3 nach 168 Stunden beprobt. Prominente Proteinspots wurden in der Darstellung markiert.**

Die Acarbose-insensitiven  $\alpha$ -Amylasen AcbZ und AcbE waren in der extrazellulären Fraktionen aller drei hier analysierten *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme zu finden. Das gleiche gilt für die Pullulanase PulA, welche ebenfalls für die Degradation von Polysacchariden verantwortlich ist. Außerdem waren die Proteine Cgt sowie CbpA, welche putativ an der Kohlenhydrat-Bindung beteiligt sind, unter sämtlichen Bedingungen abundant vorhanden. Dabei wurden Diskrepanzen in den Proteinspots ersichtlich. Zum Beispiel erschienen die  $\alpha$ -Amylase AcbZ in AP1 und in AP3 als distinkter Spot, während mehrere Spots mit kleinen Unterschieden im isoelektrischer Punkt ( $pI$ ) sowie dem Molekulargewicht in AP2 identifiziert werden konnten. Auch zeigten sich Abweichungen in den Spotmustern der Pullulanase A. Während dieses Enzym im AP1 nur von einer Spotregion im Gel vertreten war, erschienen im Gel von AP3 zwei und im Gel von AP2 drei Spotregionen in der 2D-SDS-PAGE.

Weiterhin traten ebenfalls Änderungen im dominanten Spot zum Protein ACPL\_6272 auf, welcher analog zum Kohlenhydrat-binde Protein CbpA abundanter in AP2 und AP3 in Erscheinung tritt. Die Funktion des Genproduktes ist jedoch unbekannt. Bioinformatische Vorhersagewerkzeuge konnten keine konservierten Domänenstrukturen finden.

Eine der markantesten Veränderungen betrifft die Acarviosyltransferase AcbD. Die Analysen des extrazellulären Proteoms zeigt, dass die AcbD in AP2 vermehrt exprimiert wurde und in AP3 gänzlich fehlte. Das Fehlen des Proteins ist konform zu den Resultaten der Genomforschung, welche eine Stopmutation im Gen von AP3 zeigte. Die Differenz zwischen AP1 und AP2 bezogen auf die Quantität von AcbD war jedoch mit der hier verwendeten Methode nicht exakt messbar.

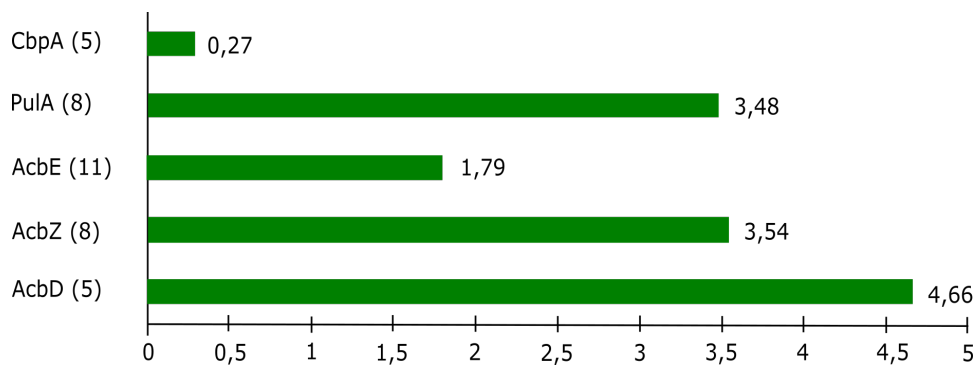
Um Aussagen auf qualitativer Ebene mit quantitativen Messungen zu validieren, können Spots in gel-basierten Ansätzen über das Softwaretool Delta 2D aufgrund ihrer Intensitäten quantifiziert werden. Hierbei ist die statistische Signifikanz und damit einhergehend eine gute Reproduzierbarkeit von Gelläufen essentiell. Die zuvor angewandte Methode der vertikalen 2D-SDS-PAGE erwies sich gegenüber der horizontalen Technik im Bezug auf die Reproduzierbarkeit als nachteilig. Der horizontale Ansatz, auch als *high performance electrophoresis* (HPE) bezeichnet, verspricht darüberhinaus eine Verbesserung der qualitativen Parameter wie Auflösung, Sensitivität und Anzahl an Proteinspots (MOCHE *et al.*, 2013). Zur Bestimmung quantitativer Unterschiede zwischen den zwei Acarboseproduzenten wurde im vierfach-Replikat gearbeitet.

Aufgrund der Unterschiede im Spotvolumen der Acarviosyltransferase AcbD lag ein Hauptaugenmerk auf den quantitativen Differenzen ausgewählter Proteine zwischen AP1 sowie AP2. Die Abweichung der Proteinmenge wurde als Verhältnisse der gemittelten

normalisierten Spotvolumina zwischen der Test- (AP2) und der Referenzbedingung (AP1) berechnet. Diese Änderung der Proteinquantität ist als *fold change* angegeben. Für statistisch signifikante Aussagen wurde ein ungepaarter zweiseitiger T-Test (Studenten) unter der Annahme der gleichen unbekanntem Varianz sowie dem Vorliegen von ungepaarten Proben angewendet. Die Nullhypothese war, dass beide Gruppen einen gleichen Mittelwert aufweisen.

Die Acarviosyltransferase AcbD war bei den Analysen von besonderem Interesse. Das Protein konnte in insgesamt 13 Spots identifiziert werden. Bei einem gewählten Signifikanzwert von  $p \leq 0,01$  konnten fünf Spots identifiziert werden, die die Kriterien erfüllen. Dabei ergab sich für diese Spots ein Mittelwert des *fold changes* von 4,66, was einer mehr als vierfach erhöhten Expression in AP2 im Vergleich zu AP1 entsprach (vergleiche Abbildung 3.13). Jedoch ist anzumerken, dass in allen fünf Spots neben AcbD auch weitere *Actinoplanes* sp. SE50/110-Proteine gefunden werden konnten.

Weiterhin wurden die Differenzen der zwei weiteren extrazellulären Acb-Proteine, die  $\alpha$ -Amylasen AcbZ und AcbE, betrachtet. Es konnte trotz der gemeinsamen DSE-Box mit AcbD keine relevanten Veränderung in der Expression von AcbE beschrieben werden. Mit einem *fold change* von 1,79 lag der Wert unterhalb des selbstgewählten oberen *cut-offs* von  $\geq 2$ , was einer Steigerung von 100 % in der Proteinmenge entsprach. Dieser festgesetzte Wert für die biologische Differenz ist begründet durch den Ausgleich von Wachstumsunterschieden sowie Effekten von Proteinen, welche im selben Spot



**Abbildung 3.13: Vergleichende Expression einiger für die Acarbosebiosynthese relevanten extrazellulären Proteine von zwei produzierenden *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämmen.** In dem Diagramm ist das Verhältnis der Spotvolumina zwischen Acarboseproduzent 2 und Acarboseproduzent 1 als *fold change* angegeben. Dabei wurden nur Spots betrachtet, deren Signifikanzwert  $p$  basierend auf dem ungepaarten zweiseitigen T-Test (Studenten) einem Wert von  $\leq 0,01$  entsprach. Die Anzahl an Spots, welche in die Berechnung eingeflossen sind, sind jeweils in Klammern angegeben.



identifiziert wurden. Von zwölf Spots, in denen AcbZ detektiert wurde, wurden unter Berücksichtigung der statistischen Relevanz ( $p \leq 0,01$ ) sowie falsch-positiv Treffer innerhalb einer randomisierten *decoy* Datenbank acht Spots betrachtet. Diese Spots zeigten eine höhere Expression in AP2, welche im Mittel eine Steigerung um den Faktor 3,54 widerspiegeln. Genomanalysen zeigten keine Punktmutation in dem Gen *acbZ* in AP2 (siehe Abschnitt 3.2.1). Die Änderung auf Ebene der Proteome muss daher auf andere Effekte zurückgeführt werden. Ein Erklärungsansatz wäre eine veränderte Regulation durch einen mutierten Regulator. Die Differenz sollte im Anschluss an diese Arbeit experimentell untersucht werden.

Weitere Diskrepanzen zwischen AP1 und AP2 betrafen die Proteine CbpA und Pula. Das Kohlenhydratbinde-Protein CbpA konnte in sechs Spots identifiziert werden, wovon fünf als statistisch signifikant zu bewerten waren ( $p \leq 0,01$ ). Im Durchschnitt ergab sich ein *fold change* von 0,27. Aufgrund des gewählten unteren *cut-offs* von  $\leq 0,5$  ergibt sich eine geringere Expression in AP2. Für die Pullulanase Pula ergab sich mit einem *fold change* von 3,48 eine höhere Expression in AP2.

Die hier dargestellten Differenzen decken sich weitgehend mit den oben beschriebenen Beobachtungen des Vergleichs der extrazellulären Proteome zwischen den *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen anhand von vertikalen 2D Gelen. Weiterhin entsprechen die Abundanzen der extrazellulären Acb-Proteine den publizierten Beobachtungen (WENDLER *et al.*, 2013; WENDLER *et al.*, 2015). Das Auftreten von „perlenkettenartigen“ Aneinanderreihungen von Spots desselben extrazellulären Genprodukts von *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit einem Molekulargewicht größer 90 kDa wurde bereits in einer wissenschaftlichen Arbeit beschrieben (WENDLER *et al.*, 2013). Eine mögliche Erklärung für das Spotmuster wäre ein methodischer Effekt, wie bereits bei *Bacillus subtilis* Proteinen vermutet wurde (ANTELMANN *et al.*, 2001). Da solche Aneinanderreihungen in Spotmustern nicht nur unter Einsatz von vertikalen, sondern auch in horizontalen Gelen zu beobachten war, können auch physiologische Gründe nicht ausgeschlossen werden. Unterschiedliche Isoformen der  $\alpha$ -Amylasen AcbZ, AcbE und Pula könnten Vorteile für *Actinoplanes* sp. SE50/110 mit sich bringen. In einer Studie von MITSUI, YAMAGUCHI und AKAZAWA (1996) wurden zehn  $\alpha$ -Amylase Isoformen einer Reiskultur isoliert und charakterisiert, welche nur drei Genen zugeordnet werden konnten und wahrscheinlich durch posttranslationale Modifikationen entstanden sind. Die Isoformen wurden aufgrund eines unterschiedlichen isoelektrischen Punktes isoliert und zeigten verschiedene Temperaturoptima (MITSUI, YAMAGUCHI und AKAZAWA, 1996). Auch in Gerste konnten Isoformen von  $\alpha$ -Amylasen identifiziert und auf post-

translationale Modifikationen zurückgeführt werden (STICHER und JONES, 1992). Eine mögliche physiologische Rolle könnten diese Isoformen in natürlichen Habitaten mit schnell wechselnden Temperaturbedingungen inne haben. Bei den *Bacillus subtilis* Proteinen, welche „perlenkettenartige“ Aneinanderreihungen von Spots im Gel zeigten, handelt es sich unter anderen ebenfalls um eine  $\alpha$ -Amylase (ANTELMANN *et al.*, 2001). Im Falle der  $\alpha$ -Amylase AcbZ konnten in der veröffentlichten Arbeit von WENDLER *et al.* (2013) nur drei Spots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten  $pI$  detektiert werden. Die Vielzahl an Spots mit verschiedenen  $pI$  sowie Molekulargewichten in AP2 konnte bislang nicht beobachtet werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die hier dargestellten Ergebnisse das Secretom der *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme bei Wuchs auf MT-MM (B) zeigen, während die veröffentlichten Ergebnisse der gel-basierten Proteomics auf Kultivierungen mit Mal-MM (A) beruhen (WENDLER *et al.*, 2013). Eine Regulation der Expression der Amylasen in Abhängigkeit von den angebotenen Zuckern wäre denkbar, jedoch gelten Maltose sowie Maltotriose als schlechte Substrate für Amylasen (ROBYT und FRENCH, 1970). In Untersuchungen der Aktivitäten von AcbE und AcbZ zeigte sich, dass die  $\alpha$ -Amylasen aus Amylose primär Maltotriose freisetzen und diese erst nach längerer Inkubation weiter zu Maltose degradiert wird (HEMKER *et al.*, 2001). Auf Grundlage der quantitativen Vergleiche ausgewählter Enzyme zwischen AP1 und AP2, zeigten die  $\alpha$ -Amylase AcbZ und die Pullulanase Pula mit einem *fold change* von 3,5 eine ähnliche Tendenz. Im Gen der  $\alpha$ -Amylase *acbZ* wurde in AP2 keine Punktmutation identifiziert. Ebenso konnten keine Basensubstitutionen im Gen *pulA* in AP2 sowie AP3 detektiert werden, für dessen Genprodukt auch bislang keine Acarbose-Insensitivität nachgewiesen werden konnte. Das Gen *pulA* (ACPL\_6399) liegt benachbart in einem Operon mit dem postulierten Acarbose-Importer Genen *malEFG*. Für den Transporter konnte keine erhöhte Expression festgestellt werden. Derartige Unterschiede zwischen den *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen sind überraschend, da alle hier dargestellten Kulturen im identischen Maltotriose-Minimalmedium angezogen wurden. Über Gründe für die Unterschiede kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Die Analysen des Secretoms der drei produzierenden Stämme bei Wuchs auf Maltotriose zeigte eine erhöhte Expression von AcbD in AP2 und den Verlust des Proteins in AP3. Die Differenz zwischen AP1 und AP2 mit mehr als der vierfachen Menge des Enzyms im Acarboseproduzenten 2 geht einher mit der Beobachtung auf Ebene des Transkriptoms (persönliche Kommunikation T. Wolf). Wie oben bereits geschrieben, sind die Resultate konform mit den beschriebenen Punktmutationen, explizit mit der Stopmutation im Gen von *acbD* in AP3. Auf Genomebene konnte ein weiterer SNP sowohl in AP2 als auch in AP3 detektiert werden, welche einen nicht-konservativen

Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Asparagin an der Position 167 zur Folge hatte. Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 erläutert, konnte diese Mutation bereits in einem weiteren *Actinoplanes* sp. Stamm detektiert und in der Dissertation von HEMKER (1997) untersucht werden. Das mutierte Enzym zeigte einen geringeren mol-Umsatz pro Sekunde und mg (HEMKER, 1997). Der Umsatz könnte dabei auf die Mutation zurückgeführt werden. Die erhöhte Quantität der Acarviosyltransferase AcbD in AP2 könnte im Zusammenhang mit dem geringeren Umsatz des Substrates im Vergleich zum Wildtyp-Protein über eine Rückkopplung (*Feedback*) reguliert werden. Dies geht einher mit der erhöhten Konzentration an Acarbose im Vergleich zu AP1. Auch eine globale Regulation wäre nicht auszuschließen, wodurch die erhöhte Expression von AcbD in AP2 auf einer Punktmutation in einem der über 91 betroffenen transkriptionellen Regulatoren beruhen könnte.

Zusammengefasst können Unterschiede im Secretom der verschiedenen Acarbose produzierenden Stämme festgestellt werden. Aufgrund der eingesetzten Technik der gelbasierten Proteomforschung, konnten ebenfalls putative Isoformen beschrieben werden. Ein vielversprechender Kandidat als Verursacher für die Differenzen in der Acarboseproduktion der Stämme wäre die Acarviosyltransferase AcbD. Ein Fehlen des Enzyms beziehungsweise eine geringere Effizienz hätte Einfluss auf den Aufbau längerer Acarviostatin-Metabolite sowie den Recycling-Prozess des Moleküls. Die Ergebnisse konnten jedoch keine Erklärung für die erhöhte Acarbosebildung im Acarboseproduzent 3 bei Wuchs auf MT-MM (B) im Vergleich zu Mal-MM (B) geben, da derselbe Genotyp vorliegt. Um mögliche Diskrepanzen auf Ebene des Proteoms zu analysieren, werden die gebildeten Proteine unter diesen zwei Bedingungen im nächsten Schritt miteinander verglichen.

#### Vergleichende Betrachtung des Proteoms des Acarboseproduzenten 3 bei Wuchs auf Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium

Die Kultivierung sowie die anschließende Analytik der *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme zeigte eine Steigerung in der Acarbosekonzentration bei Wachstum auf MT-MM (B) im Vergleich zu Mal-MM (B). Die Differenz in der Produktion des Sekundärmetaboliten zwischen den beiden Zuckern war bei AP3 am markantesten. Während bei Supplementierung des Minimalmediums mit Maltose über 3 g/L Acarbose gebildet wurde, erreichte die Kultur unter Zusatz von Maltotriose als C-Quelle über 18 g/L und somit die 6fache Menge (vergleiche Abbildung 3.10). Da sich die genetische Information in den beiden Bedingungen nicht unterscheidet, müssen die Unterschiede aus dem Angebot der unter-

schiedlichen C-Quellen resultieren. Demzufolge soll in diesem Abschnitt die Auswirkung der Zucker auf die Expression verschiedener Proteine betrachtet werden. Hierzu wurden Proben der Schüttelkolbenkultivierungen von AP3 bei Wachstum auf Mal-MM (B) und MT-MM (B) nach 168 Stunden in der Wachstumsphase genommen. Anschließend wurden die cytosolischen sowie extrazellulären Proteine isoliert. Es konnten mit der hier eingesetzten Methode der vertikalen gel-basierten Proteomanalyse nur geringe Unterschiede in der intrazellulären und extrazellulären Fraktion zwischen den beiden Konditionen festgestellt werden. Aufgrund der hohen Dominanz von extrazellulären Proteinen mit Funktionen innerhalb des Kohlenhydratmetabolismus wird im Folgenden das Secretom von AP3 bei Wuchs auf den beiden C-Quellen näher betrachtet.

Trotz der Vielzahl an Proteinen, welche wahrscheinlich mit der Verwertung von Sacchariden in Verbindung stehen, waren nur wenige Unterschiede festzustellen (siehe Abbildung 3.14). Bei Wuchs auf Mal-MM (B) fiel zunächst auf, dass die Acarviosyltransferase AcbD unerwarteterweise detektiert werden konnte. Dabei deckte sich das Molekulargewicht von 78 kDa des Proteins mit der Position im Gel. Jedoch zeigte der für AcbD untypisch kleine Spot nicht den erwarteten  $pI$  von 5,1.

Die Bindeproteine MalE und AglE für die putativen Maltose-Importer MalEFG und AglEFG, sowie das Bindeprotein MstE für das Glucose-Aufnahmesystem MstEAF konnten sowohl bei Wachstum auf Mal-MM (B) als auch auf MT-MM (B) im Secretom nachgewiesen werden. Neben diesen drei Bindeproteinen für ABC-Transporter konnten auch zwei nicht charakterisierte ABC-Transporter Bindeproteine nachgewiesen werden, ACPL\_2481 und ACPL\_6095. Gemäß der Funktionsvorhersage der GenDB-Annotationspipeline werden diese Transporter mit dem Kohlenstofftransport in Verbindung gebracht.

Darüber hinaus konnten in beiden Bedingungen Proteine gefunden werden, welche der Trehalose-Synthese zugeordnet werden, respektive TreY und TreZ. Die postulierte Maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase TreZ (ACPL\_6621) weist unterschiedliche Molekulargewichte in den beiden Gelen auf. Mit einer Länge von 577 Aminosäuren sollte das Enzym eine Größe von 64 kDa zeigen, welche nicht mit der Position im Gel unter Wachstum auf MT-MM (B) übereinstimmte. Auch die Glucosylmutase TreY, die im gleichen Operon lokalisiert ist, konnte unter Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium im Secretom des AP3-Stamms identifiziert werden. Das Molekulargewicht von etwa 84 kDa sowie der  $pI$  von 5,3 wurde durch die Lage des dazugehörigen Spots widerspiegelt.

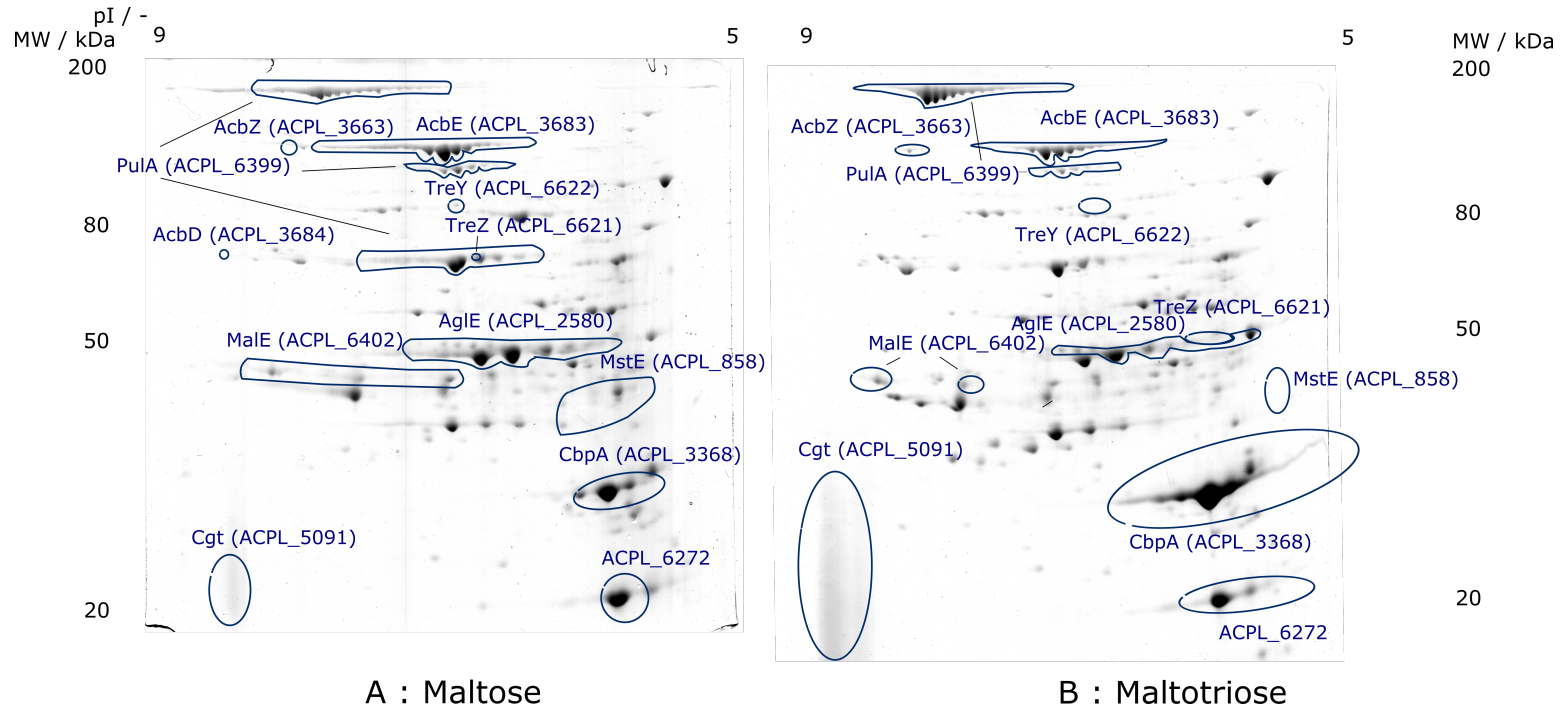


Abbildung 3.14: Extrazelluläres Proteom des Acarboseproduzenten 3 bei Wuchs auf Maltose- (A) sowie Maltotriose-Minimalmedium (B) in der Wachstumsphase. Zur Isolierung der Proteine wurden die Schüttelkolbenkultivierungen in der späten Wachstumsphase jeweils nach 168 Stunden beprobt. Prominente Proteinspots wurden in der Darstellung markiert.

Weitere auffällige Proteine waren die Kohlenhydratbinde-Proteine Cgt sowie CbpA, welche eine hohe Abundanz zeigten. Die Cyclomaltodextrin-Glucanotransferase Cgt weist ein Molekulargewicht von 15 kDa auf. Aufgrund der geringen Größe war das Protein nicht mehr als distinkter Spot im Gel repräsentiert, sondern nur noch als Schweif erkennbar. Beide Proteine waren vermehrt bei Wuchs von AP3 auf MT-MM (B) vorhanden.

Neben Transportern sowie Kohlenhydratbindende-Proteinen waren Variationen im Auftreten der Polysaccharid-degradierenden Enzyme zu erwarten, beispielsweise der Acarbose-insensitiven  $\alpha$ -Amylasen AcbE sowie AcbZ und der Pullulanase Pula. Während AcbZ nur von einem Spot im Gel bei Wuchs auf Mal-MM (B) repräsentiert wurde, konnten mehrere Isoformen bei Wachstum auf MT-MM (B) detektiert werden. Überraschenderweise zeigte sich für die Pullulanase Pula die größten Differenzen. Bei Wachstum auf Mal-MM (B) waren drei Spotgruppen zu erkennen, wohingegen nur zwei solcher Spotreihen für MT-MM (B) beobachtet werden konnten. Bei gleichzeitigem Verschwinden der putativen Isoformen mit einem Molekulargewicht von 75-80 kDa erhöhte sich die Mengen an Isoformen mit einer Größe von 190 kDa. Ein möglicher Zusammenhang mit höheren Sacchariden ist denkbar.

Die abweichenden Spotmuster sowie die Divergenzen in den Quantitäten von Proteinen mit prognostizierten Funktionen innerhalb der Saccharidbindung, deren Degradation sowie des Imports, können durch die Präsenz der verschiedenen Zucker erklärt werden. Die Genprodukte Cgt und CbpA sind der Kategorie der Bindung von Sacchariden zuzuordnen (HEMKER *et al.*, 2001; WENDLER *et al.*, 2013). Wie bereits beschrieben, zählen diese Proteine zu den dominantesten extrazellulären Proteinen und wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (HEMKER *et al.*, 2001; WENDLER *et al.*, 2013; SCHWIENSTEK, 2012; WENDLER *et al.*, 2015). Dabei liegt Cgt als Multimer vor, was das Auftreten des Proteins im Gel in Form eines Schweifs erklärt (HEMKER *et al.*, 2001; WENDLER *et al.*, 2015). In RNASeq-Experimenten zeigten die beiden Gene *cgt* und *cbpA* eine hohe Abundanz in Mal-MM (B), während sie in Glucose-Komplexmedium nur gering transkribiert wurden (WENDLER *et al.*, 2013; SCHWIENSTEK, 2012). Die assoziierten Transkriptomdaten zu dem hier gezeigten Versuch zeigten eine höhere Abundanz bei Wuchs der Kultur auf MT-MM (B), respektive *cgt* M-Wert = 2,53 ( $p = 1,47 \times e^{-29}$ ) und *cbpA* M-Wert = 1,89 ( $p = 5,81 \times e^{-28}$ ). Dies steht im Einklang zu den Beobachtungen auf Ebene des Proteoms (vergleiche Abbildung 3.14). Eine erhöhte Proteinmenge in Gegenwart von Maltotriose unterstreicht ihre putative Rolle innerhalb der Bindung von höheren Maltodextrinen (WENDLER *et al.*, 2013). Cgt steht

aufgrund seiner Abundanz im Verdacht eine Rolle in der Vergrößerung der Oberfläche einzunehmen, um Nahrungsquellen für *Actinoplanes* sp. SE50/110 zu binden und bereitzustellen.

Ebenfalls hält das Disaccharid Trehalose unterschiedliche Funktionen für den Organismus inne. Diese kann als Osmoprotektor für die Zelle fungieren und gleichzeitig als Energielieferant genutzt werden (AVONCE *et al.*, 2006). Auch für die Sporenbildung spielt der Zucker eine übergeordnete Rolle. Für die Acarboseproduktion steht Trehalose im Verdacht, die Bildung der schwer abzutrennenden Komponente C zu begünstigen (siehe Abschnitt 1.2.2). Dabei wird davon ausgegangen, dass die beiden Proteine TreZ und TreY in der Synthese des stabilen Zweifachzuckers involviert sind (AVONCE *et al.*, 2006). Im TreY/TreZ Stoffwechselweg werden Maltooligosaccharide, Stärke oder Glykogen zunächst durch TreY zu Maltooligosyltrehalose und anschließend durch TreZ zu Trehalose umgebaut. In den publizierten Proteomarbeiten wurden die Proteine TreZ und TreY bislang nicht beschrieben (WENDLER *et al.*, 2013; WENDLER *et al.*, 2015; WENDLER *et al.*, 2016). Weiterhin ist die Lokalisierung der zwei Enzyme erstaunlich, da diese keine Signalproteine zeigen und eigentlich der cytosolischen Fraktion zugeordnet werden. Die zwei Proteine konnten nicht in dem extrazellulären Proteomen von AP1 oder AP2 gefunden werden. Weiterhin konnten in den zugehörigen Genen *treZ* und *treY* keine Punktmutationen identifiziert werden. Ein Grund könnte in dem hohen Anteil von 75 % (MT-MM) und 73 % (Mal-MM) cytosolischen Proteinen im Secretom von AP3 zu finden sein. Wie oben bereits geäußert, wäre eine erhöhte Durchlässigkeit der Membran als Erklärung für das Phänomen denkbar. Das Auffinden der beiden Proteine im Secretom müsste in Folgeversuchen näher betrachtet werden.

Mit Hilfe der Proteomforschung können Vorschläge bezüglich Transportsystemen erarbeitet werden. In den Studien von WENDLER *et al.* (2016) wurden *Actinoplanes* sp. SE50/110 Kulturen bei Wuchs auf Minimalmedium A mit Glucose (Glc-MM (A)) sowie Maltose (Mal-MM) miteinander verglichen und der ABC-Transporter für Monosaccharide MstEAF (ACPL\_858-860) als Glucose-Transporter postuliert (vergleiche Abschnitt 3.1.3 Seite 41). Das zugehörige Bindeprotein MstE konnte sowohl bei Anzucht auf Mal-MM (B) als auch auf MT-MM (B) gefunden werden und könnte eine Funktion in der Aufnahme von Degradationsprodukte der  $\alpha$ -Amylasen inne haben.

Ein Aufnahmesystem für Maltotriose konnte aufgrund von Homologien zu anderen Organismen postuliert werden, jedoch fehlt bislang der experimentelle Nachweis (WENDLER *et al.*, 2013). Innerhalb des Genoms wurden zwei Maltodextrin-Aufnahmesysteme beschrieben, MalEFG und AglEFG (WENDLER *et al.*, 2013). Diese Annahme stützten sich ebenfalls auf die Resultate der Charakterisierung vom Maltose- sowie Maltotriose-Transport

im Acarbose-produzierenden Stamm *Actinoplanes* sp. SN223/29 von BRUNKHORST *et al.* (2005) (vergleiche Abschnitt 3.1.3 Seite 43). Neben dem Maltose-Importer MalEFG wurde die Rolle als Acarbose-insensitiven Transporter dem ABC-Transporter AglEFG zugeschrieben (WENDLER *et al.*, 2013). Der erste entdeckte AglEFG Transporter wurde in *Sinorhizobium meliloti* als ABC-Aufnahmesystem für Maltose, Trehalose, Sucrose und Trisaccharide beschrieben (BERTRAM *et al.*, 2004; WENDLER *et al.*, 2013; JENSEN, PETERS und BHUVANESWARI, 2002). Die Kultivierung der *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme auf Maltotriose zeigt trotz steigender Acarbosekonzentrationen keinen Einbruch in den Wuchsverläufen, was die Annahme nahelegt, dass es sich bei der Aufnahme von Maltotriose um ein Aufnahmesystem handelt, welches nicht von Acarbose beeinflusst wird. Die Aufnahme von Maltotriose durch die ABC-Transporter AglEFG erfolgt unter Verbrauch von ATP.

Die Transkriptomdaten des hier gezeigten Vergleiches zwischen dem Wachstum von AP3 auf MT-MM (B) gegen Mal-MM (B) unterstützen die Annahme. Zunächst zeigte keines der gefundenen Bindeproteine MalE, AglE, MstE oder ACPL\_6095 sowie deren zugehörigen Transportproteine eine differenzielle Transkription. Nur für das Bindeprotein ACPL\_2481 wurde eine geringere Expression auf Maltotriose (M-Wert = -1,36,  $p \leq 0,01$ ) festgestellt. Weiterhin zeigten die zum MalEFG-Transporter zugehörigen Permeasen *malG* und *malF* mit M-Werten von -1,2 und -1,14 eine etwas abgeschwächte Expression unter MT-MM (B) Bedingung, was die Annahme, dass der AglEFG-Transporter Maltotriose transportiert, unterstützt (persönliche Kommunikation T. Wolf).

Neben der Aufnahme durch ABC-Transporter sind auch weitere Möglichkeiten zur Aufnahme von Kohlenhydraten in Bakterien bekannt, sogenannte Phosphotransferase-Systeme (PTS). Dabei kommt es neben dem Transport auch zur Phosphorylierung der Kohlenhydrate wie Glucose, Fructose, Laktose oder Maltose (POSTMA, LENGELER und JACOBSON, 1993). In Arbeiten zur Annotation sowie der Rekonstruktion von Stoffwechselwegen in *Actinoplanes* sp. SE50/110 konnte im Genom lediglich ein Phosphotransferase-System (PTS) gefunden werden, welches einen putativen Mannitol-spezifischen Transporter darstellt (TRAN, 2013).

Es ist davon auszugehen, dass in dem Genom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 neben den beschriebenen ABC-Transportern kein weiteres spezifisches Aufnahmesystem für Maltotriose kodiert ist. Das Gen des Substratbindeproteins *aglE* weist eine Punktmutation in AP2 und AP3 auf, die zu einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch an der Position 208 führt, während für das Gen *malE* keine Mutationen festgestellt



werden konnte. Eine Veränderung in der Aufnahme von Maltotriose in AP2 sowie AP3 gegenüber AP1 wäre denkbar und wird im Folgenden noch einmal aufgegriffen. Zusammengefasst verdeutlicht die Proteomforschung den Effekt der zwei Punktmutationen innerhalb der Acarviosyltransferase AcbD und unterstreicht damit die Ergebnisse der Genomforschung. Der Vergleich des Acarboseproduzenten 3 bei Wuchs auf Mal-MM (B) und MT-MM (B) zeigte weitere Differenzen in extrazellulären Proteinen, unter anderem von zwei in die Trehalose-Biosynthese involvierte Enzyme. Die Ergebnisse legen nahe, dass der Transport von Maltotriose vornehmlich über das ABC-Aufnahmesystem AgIEFG bewerkstelligt wird. Jedoch können keine Erklärungen bezüglich der Divergenzen in der Acarbosekonzentration gegeben werden. Um nach weiteren Antwortmöglichkeiten im Hinblick auf unterschiedliche Stoffwechselprozesse innerhalb der Zelle beim Angebot verschiedener Zucker zu forschen, wird im Folgenden die Ebene des Metaboloms untersucht. Dabei liegt der Fokus auf der Analyse der Bildung von Acarviostatin-Metaboliten.

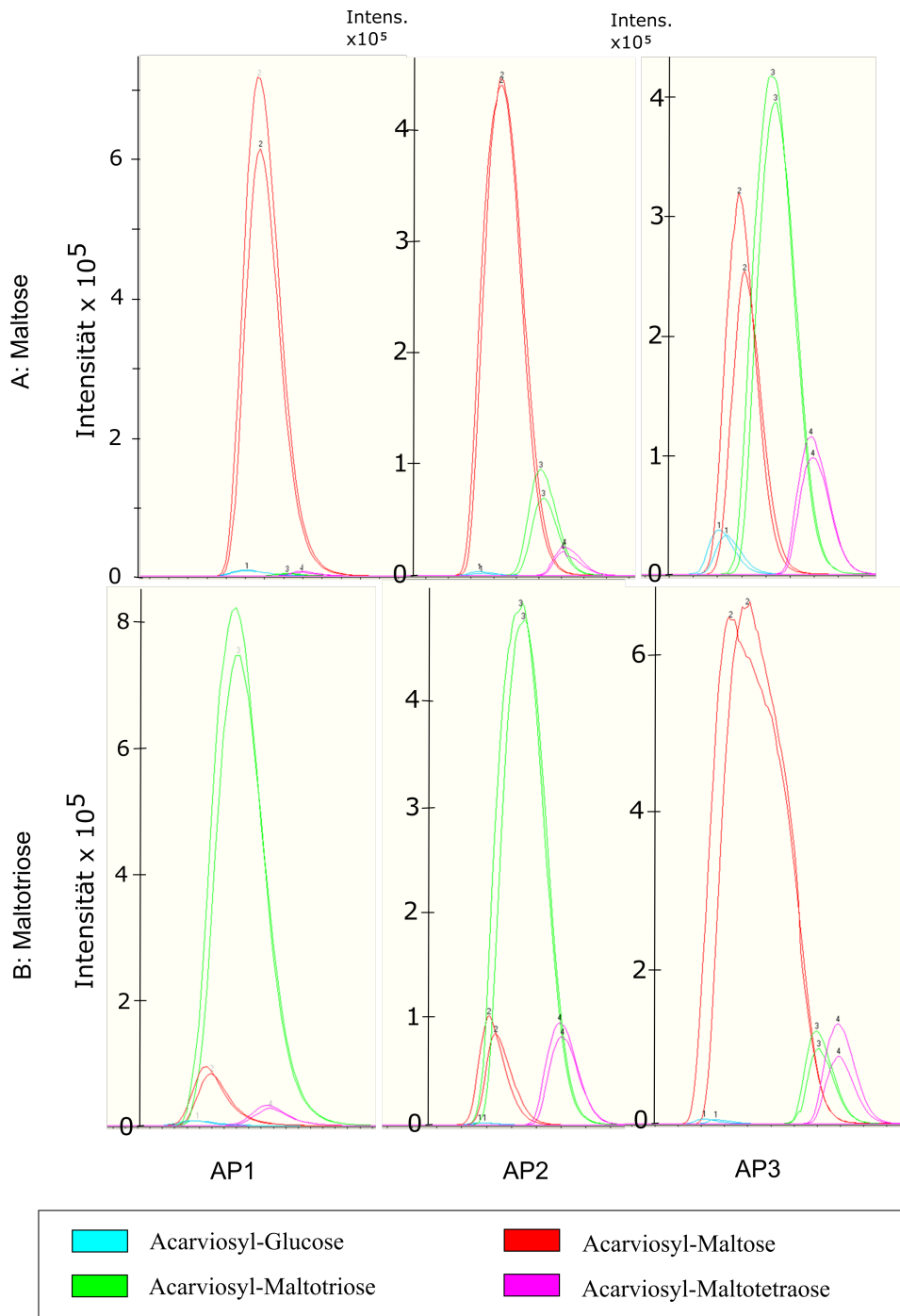
### 3.2.4 Die Bestimmung der Acarviostatin-Metabolite im Kulturüberstand von drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen nach Anzucht in Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium

Die Charakterisierung der Acarboseproduktion der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen nach Anzucht in Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium zeigte klare Differenzen in der Quantität der Acarbose zwischen den Stämmen sowie der angebotenen C-Quelle (vergleiche Abschnitt 3.2.2). Die Analysen auf Ebene des Proteoms konnten Unterschiede zwischen den Proteinen der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen aufzeigen (vergleiche Abschnitt 3.2.3). Einer der prominentesten Unterschiede betraf die Acarviosyltransferase *AcbD*, welche im AP2 überexprimiert und im AP3 gänzlich fehlte. Aufgrund der putativen Rolle der Acarviosyltransferase innerhalb der Formation von Acarbose und dessen Homologen (vergleiche Abschnitt 1.3.3) ist im Folgenden die Untersuchung des Effektes dieser enzymatischen Veränderung auf die Bildung der Acarviostatin-Metabolite von Interesse. Auch kann eine vermehrte Synthese von Acarviostatin-Metaboliten zu Verlusten in der Acarbosekonzentration führen, was eine genauere Betrachtung der Homologen rechtfertigt. Des Weiteren gilt es das existierende Modell zu validieren (vergleiche Abschnitt 3.1.3).

Die zur Messung der Acarviostatin-Metabolite etablierte Methode wurde mit einem modifizierten Protokoll zur Analyse der drei Acarboseproduzenten genutzt (siehe Abschnitt 2.3.2 Seite 25). Die Bildung von Haupt- und Nebenkomponenten bei Zusatz von zwei definierten Kohlenstoffquellen, hier Maltose und Maltotriose als postulierte Induktoren des *acb*-Genclusters (BRUNKHORST *et al.*, 2005), wurde genauer untersucht. Die angereicherten extrazellulären Metabolite wurden gemessen und anhand ihrer Massen detektiert. Wie bereits beschrieben, erfolgt die Annotation anhand der Annahme, dass Glucose sowie  $\alpha$ -1,4-verknüpfte Glucosemoleküle in den Gruppen der Acarviosyl-Saccharide die bevorzugten Isomere bilden.

Die Ergebnisse der drei Stämme zum Kultivierungszeitpunkt 168 Stunden bei Wachstum auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium zeigen, dass die Methode erfolgreich auf die Acarboseproduzenten übertragen werden konnte (siehe Abbildung 3.15). In jeder der sechs Bedingungen konnten alle vier Acarviostatin-Metabolite, genauer gesagt Acarviosyl-Glucose bis -Maltotetraose, identifiziert werden. Die Resultate zeigten die Bildung einer Hauptkomponente und bestätigten damit die Beobachtungen der ersten Studie. Lediglich bei Wachstum von AP3 auf Mal-MM (B) kam es zur Bildung von zwei Haupt-Acarviostatin-Metaboliten.

3.2 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen (Teil 2)



**Abbildung 3.15: Produktion der unterschiedlichen Acarviostatin-Metabolite durch die drei *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämmen bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium nach 168 Stunden.** Die Abbildung zeigt die Ionenchromatogramme der zu den unterschiedlichen Acarviostyl-Metaboliten zugehörigen Masse-zu-Ladung-Verhältnissen bei Wachstum auf Minimalmedium unter Zusatz von Maltose (A) und Maltotriose (B) für die drei Stämme Acarboseproduzent 1 (AP1), Acarboseproduzent 2 (AP2) und Acarboseproduzent 3 (AP3). Die Chromatogramme sind wie folgt eingefärbt: Acarviostyl-Glucose (blau), -Maltose (rot), -Maltotriose (grün) sowie -Maltotetraose (lila). Weiterhin sind die Chromatogramme von beiden biologischen Replikaten dargestellt.

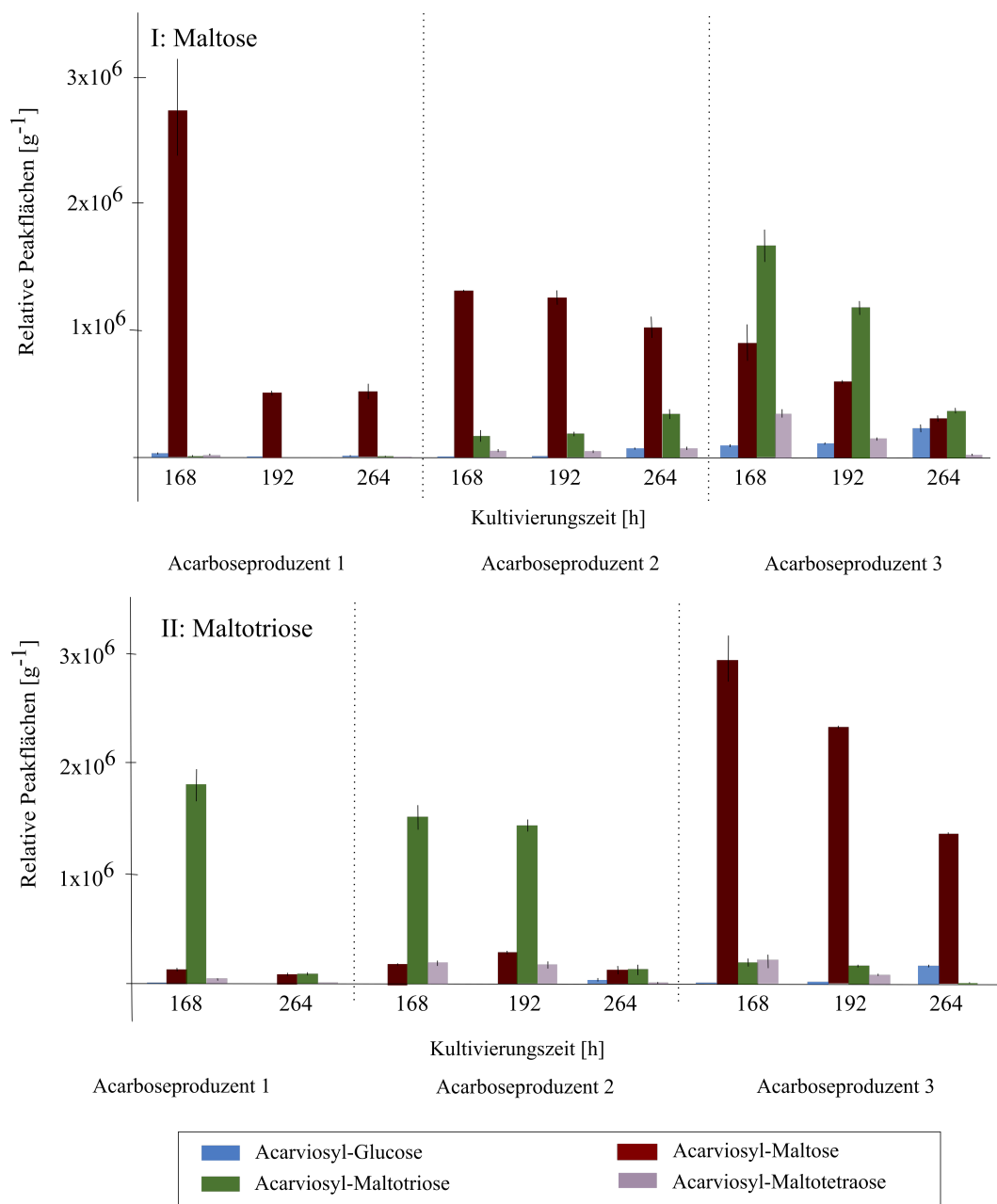
Erwartungsgemäß wurde bei Wachstum auf Mal-MM (B) bei AP1 und AP2 Acarviosyl-Maltose, sprich Acarbose, als Hauptkomponente gebildet. Weiterhin traten die Homologen der Acarbose, genauer Acarviosyl-Glucose, -Maltotriose und Maltotetraose, in kleineren Peaks als Nebenkomponten auf. Dabei wurde deutlich, dass es zu einer erhöhten Synthese von Nebenkomponten in AP2 im Vergleich zu AP1 kommt. Bei Wachstum auf MT-MM (B) erfolgte die primäre Bildung von Acarviosyl-Maltotriose als Hauptkomponente. Alle übrigen Massespuren konnten in kleineren Peaks als Nebenkomponten detektiert werden. Das Acarviostatin-Metabolit-Spektrum von AP3 zeigte Variationen. Einerseits wurde unter Wuchs auf Mal-MM (B) sowohl Acarviosyl-Maltose (Acarbose) als auch Acarviosyl-Maltotriose als Hauptkomponente synthetisiert. Andererseits zeigte sich bei Zugabe von Maltotriose als definierte Kohlenstoffquelle Acarbose (Acarviosyl-Maltose) als alleinige Hauptkomponente. Wie auch schon für AP2 beobachtet, traten die Peakflächen der Nebenkomponten in erhöhter Intensität im Vergleich zu AP1 auf.

Anhand der Resultate wurde ersichtlich, dass die Biosynthese der Acarviostatin-Metabolite in AP3 nicht in Interdependenz mit der angebotenen Kohlenstoffquelle standen wie zuvor für AP1 postuliert wurde (vergleiche Abschnitt 3.1.2). Um die Ergebnisse zu festigen, wurden weitere Zeitpunkte vermessen und die Peakflächen auf die Biotrockenmassen normalisiert, um Abhängigkeiten im Wachstum auszugleichen.

Die Resultate konsolidieren die zuvor beschriebenen Ergebnisse. In allen sechs Ansätzen konnten die vier Acarviostatin-Metabolite detektiert werden (siehe Abbildung 3.16). Dem Modell der Kohlenhydrat-abhängigen Synthese der Acarviostatin-Metabolite folgend, wurde bei Wachstum auf Mal-MM (B) sowohl beim AP1 als auch bei AP2 Acarviosyl-Maltose, sprich Acarbose, als Hauptkomponente gebildet. Analog dazu, zeigte sich bei Anzucht der zwei Stämme auf MT-MM (B) die im Vergleich zu den anderen Acarviostatin-Metaboliten überproportionale Bildung von Acarviosyl-Maltotriose. Entsprechend den Ergebnissen zum Zeitpunkt 168 Stunden zeigte AP3 ein abweichendes Profil. Einerseits wurden unter Wachstum der Kultur auf Mal-MM (B) sowohl Acarviosyl-Maltose (Acarbose) als auch Acarviosyl-Maltotriose als Hauptkomponente synthetisiert und andererseits zeigte sich bei Wuchs auf Maltotriose-Minimalmedium Acarviosyl-Maltose als einzigste Hauptkomponente.

Die Analyse der Acarviostatin-Metabolite indiziert ebenfalls eine Verschiebung des prozentualen Anteils der Nebenkomponten über den Kultivierungsverlauf sowie zwischen den Stämmen (siehe Tabelle 3.6). In allen drei Acarboseproduzenten wurde prozentual zur Hauptkomponente mehr Nebenkomponten bei Anzucht auf MT-MM (B) im Vergleich zu Mal-MM (B) gebildet. Weiterhin kam es in allen Messungen zum Anstieg der

3.2 Die Biosynthese von Acarviostatin-Metaboliten in drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen (Teil 2)



**Abbildung 3.16: Acarviostatin-Metabolit-Bildung bezogen auf die Biotrockenmasse durch Acarboseproduzent 1, Acarboseproduzent 2 und Acarboseproduzent 3 zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten.** Die Abbildung zeigt die relativen Peakflächen der gemessenen Acarviostatin-Metabolite unter Maltose (A) und Maltotriose (B), respektive Acarviosyl-Glucose (blau), -Maltose (rot), -Maltotriose (grün) sowie -Maltotetraose (lila).

Nebenkomponenten gegen Ende der Kultivierung. Dabei wurden überwiegend längere Acarviostatin-Metabolite zu Gunsten von kürzeren Verbindungen abgebaut. Unter Zugabe von Maltose zum Minimalmedium wurde Acarviosyl-Glucose als prozentual häufigste Nebenkomponente in AP1 gebildet. Auf MT-MM (B) wurden in AP1 vermehrt Acarviosyl-Maltose gebildet. AP2 synthetisierte bei Wachstum auf Mal-MM (B) Acarviosyl-Maltotriose als prozentual häufigste Nebenkomponente. Der summierte Anteil aller Nebenkomponente lag dabei mit durchschnittlich 28,3 % um das zehnfache über dem zu beobachtenden Anteil im AP1. Bei Anzucht auf MT-MM (B) wurde in AP2 Acarviosyl-Maltose als prozentual häufigste Nebenkomponente gebildet. Der Acarboseproduzent 3 bildete eine Ausnahme, da die Hauptkomponenten nicht in Dependenz zur angebotenen C-Quelle gebildet wurden.

Infolge der hier konzipierten Experimente mit definierten C-Quellen wird deutlich, dass nicht nur Acarbose im Cytosol von *Actinoplanes* sp. SE50/110 synthetisiert wird, weil die Bildung von den detektierten höhere Acarviostatin-Metabolite nicht in einer Reaktion im Außenraum erfolgen kann (vergleiche Abschnitt 3.1.3). Die Bildung von Acarviosyl-Maltotriose und -Maltotetraose bei Wuchs auf Mal-MM (B) sowie die Bildung von Acarviosyl-Maltotetraose bei Wuchs auf MT-MM (B) weist auf einen intrazellulären Prozess hin, da die Acarviosyltransferase AcbD nicht spontan aus freien Monosacchariden längere Acarviostatin-Metabolite synthetisieren kann (HEMKER *et al.*, 2001; ALLABY, 1998). Dabei kommen die Substrate für die intrazelluläre Synthese höherer Acarviostatin-Metabolite mutmaßlich aus dem Maltodextrin-/Glykogenstoffwechsel (vergleiche Abbildung 3.5). Damit wurden die Folgerungen in Abschnitt 3.1.3 der Studien zum Acarboseproduzent 1 bei Wuchs auf definierten C-Quellen bestätigt.

Ebenso wird die Bildung von Hauptkomponenten in Abhängigkeit zur angebotenen Kohlenstoffquelle konsolidiert. Dabei ist es biologisch sinnvoll die Entscheidung über die Bildung der Inhibitoren an die angebotene Nahrungsquelle anzupassen. Die Homologen von Acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110 unterscheiden sich nicht nur durch ihre Anzahl an Glukoseeinheiten, sondern ebenfalls in ihrem inhibitorischen Potential (FROMMMER *et al.*, 1979; HEMKER *et al.*, 2001; ROCKSER und WEHMEIER, 2009). Zum Beispiel zeigt Acarviosyl-Maltotriose eine geringere Inhibierung von  $\alpha$ -Saccharasen im Vergleich zu Acarbose, aber gleichzeitig kann Acarviosyl-Maltotriose im Gegensatz zu Acarbose auch zur Inhibierung von  $\alpha$ -Amylasen eingesetzt werden (TRUSCHEIT *et al.*, 1981).

Tabelle 3.6: Prozentualer Anteil der Nebenkomponenten bezogen auf die in Abhängigkeit von der C-Quelle gebildete Hauptkomponente.

Stamm Zeitpkt. (h)	AP1			AP2			AP3		
	168	192	264	168	192	264	168	192	264
<i>Acarviostatin-Metabolite im Maltose-Minimalmedium</i>									
Acarviosyl-Glucose (%)	1,2	1,0	1,9	0,4	0,6	7,0	10,6	18,1	76,4
<i>Acarviosyl-Maltose<sup>a</sup></i> (%)	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>
Acarviosyl-Maltotriose (%)	0,4	0,8	1,4	13,3	15,0	33,8	186,7	195,8	121,4
Acarviosyl-Maltotetraose (%)	0,7	0,5	0,7	3,5	4,0	7,4	38,5	25,0	7,0
<i>Acarviostatin-Metabolite im Maltotriose-Minimalmedium</i>									
Acarviosyl-Glucose (%)	0,7	7,1	0,2	0,3	23,0	4,6	9,1	1261,7	
Acarviosyl-Maltose (%)	7,5	100,3	11,4	19,7	99,4	1459,4	1436,8	10141,9	
<i>Acarviosyl-Maltotriose<sup>c</sup></i> (%)	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>
Acarviosyl-Maltotetraose (%)	2,7	14,3	12,8	12,2	6,7	106,4	49,0	16,9	

*a* Die normalisierte Peakfläche der in Dependenz zur angebotenen Kohlenstoffquelle Maltose erwarteten Hauptkomponente Acarviosyl-Maltose wurde als 100 % festgesetzt

*b* Die normalisierte Peakfläche der in Dependenz zur angebotenen Kohlenstoffquelle Maltotriose erwarteten Hauptkomponente Acarviosyl-Maltotriose wurde als 100 % festgesetzt

In der Folge der Aktivität von Acarviosyl-Maltotriose könnte das Trisaccharid im Außenraum nicht mehr durch artfremde Bakterien genutzt werden, sofern diese kein Maltotriose-Aufnahmesystem besitzen. Acarviosyl-Maltotetraose wiederum zeigt eine stärkere Inhibierung zu  $\alpha$ -Amylasen, insbesondere gegen  $\alpha$ -Amylasen von *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens* und die aus dem Schwein stammende Pankreas  $\alpha$ -Amylase (LEE, PARK und ROBYT, 2001; ROBYT und FRENCH, 1967). Hingegen konnte nur eine geringe Wirkung auf  $\alpha$ -Glucosidasen und  $\alpha$ -Saccharasen bestimmt werden (TRUSCHEIT *et al.*, 1981). Es wird angenommen, dass Acarbose und dessen Homologe in erster Linie als Inhibitor von artfremden  $\alpha$ -Glucosidasen,  $\alpha$ -Saccharasen oder  $\alpha$ -Amylasen fungieren und lediglich in hohen Konzentrationen wieder recycelt werden und die Funktion als „Carbophor“ einnehmen (MERETTIG, 2009). Dabei wird entschieden, ob die Energie der Biomassenbildung oder der Produktion von Sekundärmetaboliten zur Verfügung gestellt wird.

Um eine breite Inhibierung artfremder Enzyme zu ermöglichen, ist die Bildung eines breiten Spektrums an Acarviostatin-Metaboliten für den Organismus von Vorteil, welche im späteren Verlauf wieder verstoffwechselt werden können. Ein solches Profil des Acarviostatin-Metabolit-Spektrums wurde bei Wuchs des Acarboseproduzent 3 auf MT-MM (B) gezeigt. Zum ersten Zeitpunkt (168 Stunden) war zunächst Acarviosyl-Maltotetraose als prozentual häufigste Nebenkomponente detektiert worden. Im Verlauf der Kultivierung kam es zu einer Verschiebung des Spektrums zu Acarviosyl-Maltotriose zum Zeitpunkt 192 Stunden bis hin zu Acarviosyl-Glucose zum Ende der Kultivierung, sprich 264 Stunden. Eine Reduzierung der Kettenlänge gefolgt von der Freisetzung von Sacchariden würde mit einem Bedarf an Kohlenstoffquellen einhergehen.

Weiterhin stellt sich die Frage, wieso der prozentuale Anteil an Nebenkomponenten über den Kultivierungsverlauf von AP1 bis zu AP3 ansteigt. Die Bildung der Acarviostatin-Metabolite erfolgt intrazellulär vermutlich durch die Katalyse des Proteins AcbI (WENDLER *et al.*, 2013). Die Ergebnisse der Gegenüberstellung der Genome der drei hier analysierten Acarboseproduzenten zeigten, dass keine Punktmutationen in diesem Gen detektiert werden konnten (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Ein verändertes Akzeptorspektrum dieser Genprodukte ist daher unwahrscheinlich. Ein weiterer Parameter in der cytosolischen Synthese der Nebenkomponenten wäre die Bereitstellung der Substrate, zum Beispiel aus dem intrazellulären Vorrat an Maltodextrinen. Die Substrate zur Bildung der mengenmässig geringeren Acarviostatin-Metabolite, sprich Nebenkomponenten, stammen höchstwahrscheinlich aus dem Maltodextrin-/Glykogenmetabolismus (vergleiche auch Abbildung 3.5). Eine mögliche Erklärung für den steigenden Anteil der Nebenkomponente in AP2 und AP3 im Vergleich zu AP1 wäre eine erhöhte Konzen-



tration von intrazellulären Maltodextrinen. Eine Akkumulation von Maltodextrinen in AP2 und AP3 infolge von Mutationen in Genen des Maltodextrin-/ Glykogenmetabolismus wäre denkbar, zum Beispiel durch die Punktmutationen innerhalb des Gens der Amylomaltase *malQ* (vergleiche Tabelle A.5 im Anhang).

Die hier eingesetzte Analytik eignet sich für die Identifizierung der Acarviostatin-Metabolite. Dabei ist zu beachten, dass die Methode lediglich der Betrachtung von Verhältnissen zwischen den Acarviostatin-Metaboliten diene und nicht deren Quantifizierung, da bereits die Acarboseanalytik die Frage nach den quantitativen Unterschieden beantworten konnte (vergleiche Abschnitt 3.2.2). Die Limitierung begründet sich durch das Defizit an verfügbaren Referenzsubstanzen. Die Methode der LC-MS hat jedoch zahlreiche Vorteile. Zwei Parameter, sprich die Retentionszeit sowie das Masse-zu-Ladungsverhältnis, sorgen für eine deutlich höhere Selektivität der Methode, welche die Detektion von co-eluierenden Substanzen erlaubt (ELMASHNI, 2013). Dieser Aspekt ist aufgrund der überlagernden Peaks der Acarviostatin-Metabolite von besonderer Bedeutung (siehe Abbildung 3.2 und 3.15). Des Weiteren erleichtert die zusätzliche Information des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses die Peak-Zuordnung. Ein Bias in der Methode ist die fehlende Unterscheidung von Isomeren der gleichen Masse. Eine zusätzliche kontrollierte Fragmentierung, respektive die MS/MS-Messung, ermöglicht bei Bedarf eine Strukturaufklärung des Moleküls (ELMASHNI, 2013). Nach der Evaluierung der Analytik mit isotopen-gelabeltem Stickstoff steht hier der prozentuale Anteil der unterschiedlichen Acarviostatin-Metabolite im Vordergrund, was eine qualitative Analyse mittels LC-MS als eingesetzte Methode rechtfertigt.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Ergebnisse für AP1 und AP2 die Bildung der Acarviostatin-Metabolite in einer Kohlenhydrat-abhängigen Weise indizieren und damit das Modell bestätigen (siehe Abbildung 3.4). Der hier gewählte Ansatz der vergleichenden extrazellulären Metabolomics zeigte eine Veränderung in der Bildung der Haupt- und Nebenkomponten im Acarboseproduzenten 3. Die Ergebnisse sollen im Folgenden zur Erweiterung des postulierten Modells auf die drei Acarboseproduzenten genutzt werden.

### 3.2.5 Modellvorschlag zur Bildung von Hauptkomponenten der Acarviostatin-Metabolite in drei Acarboseproduzenten

Lediglich das Acarviostatin-Metabolit-Spektrum von AP1 sowie AP2 können durch das zuvor aufgestellte Modell erklärt werden, während die Ergebnisse von AP3 den zuvor getroffenen Annahmen der Kohlenhydrat-abhängigen Acarviostatin-Metabolit-Bildung widersprechen. Wie in Abschnitt 3.1.3 erwähnt, beschränkt sich das Modell lediglich auf die grundlegenden Synthesereaktionen und betrachtet nicht die Transglykosylierung im Außenraum, den Reimport in die Zelle sowie das intrazelluläre Recycling des Pseudotetrasaccharids. Im Hinblick darauf, dass die Ergebnisse der Metabolitmessungen von AP3 nicht durch das in Abbildung 3.4 dargestellte Modell erklärt werden können, werden diese Reaktionen im Folgenden näher betrachtet. Um sich in den Modellen auf die wesentlichen Kernpunkte zu beschränken, wird nachfolgend von der Darstellung der Synthese von Nebenkomponenten abgesehen.

Die Modelle beziehen sich dabei auf zuvor präsentierte Ergebnisse auf den unterschiedlichen *omics*-Ebenen. Hier sind zu nennen: I) für die Acarviosyltransferase AcbD konnten zwei Mutationen identifiziert werden, welche in AP2 in einem niedrigeren Umsatz und in AP3 in einem defekten Enzym resultiert, II) in dem Substratbindeprotein Agle des ABC-Transporters AgleFG, welcher putativ in der Aufnahme von Maltotriose involviert ist, konnte eine Mutation detektiert werden, welche den Import des Trisaccharids in AP2 und AP3 beeinflussen könnte und III) während in AP1 und AP2 bei Wachstum auf Mal-MM Acarbose und auf MT-MM Acarviosyl-Maltotriose als Hauptkomponente synthetisiert werden, zeigt sich bei AP3 bei Wuchs auf Mal-MM zwei Hauptkomponenten und auf MT-MM Acarbose als Hauptkomponente.

Aufgrund der Komplexität werden die Modelle zur Biosynthese der Hauptkomponenten für die drei Stämme bei Wachstum auf Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium getrennt dargestellt (siehe Abbildung 3.17, 3.18 und 3.19). Weiterhin werden neue Aspekte in den jeweiligen Abschnitten eingeführt.

#### Modellvorschlag zur Bildung von Acarviostatin-Hauptkomponenten in Acarboseproduzent 1

In dem Modell zur Synthese von Acarviostatin-Metaboliten in AP1 in Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium werden analog zur vorangegangenen Modellvorstellung (vergleiche Abbildung 3.4) die Situation sowohl im extrazellulären als auch im intrazellulären Raum dargestellt (siehe Abbildung 3.17). Im Außenraum liegen hohe Konzentrationen der zum Minimalmedium supplementierten C-Quelle gemäß der in der Kultivierung eingesetzten Stoffmengenkonzentrationen von 0,3 mol/L Maltose sowie

0,2 mol/L Maltotriose vor. Bekanntlich begünstigt eine hohe Konzentration an Zuckern und damit einhergehend eine hohe Osmolalität des Mediums die Bildung von Acarbose (CHENG *et al.*, 2014). Die Zucker werden anschließend durch die Zelle aufgenommen. Im Folgenden wird zunächst die Situation bei Wachstum auf Mal-MM (B) beschrieben.

#### Synthese von Acarviostatin-Metaboliten bei Wachstum auf Maltose-Minimalmedium im Acarboseproduzenten 1

**Transport der angebotenen C-Quelle - MalEFG-MsiK** Das Modell zur Bildung von Hauptkomponenten in AP1 zeigt die Aufnahme von Maltose in die Zelle durch den ABC-Transporter **MalEFG** assoziiert mit der ATPase Untereinheit **MsiK** (vergleiche Modell Teil 1 Abschnitt 3.1.3). Dabei wird ATP verbraucht. Es wird weiterhin das Suppositum getroffen, dass der Transport keinen limitierenden Faktor darstellt und demzufolge ebenfalls hohe Konzentrationen an Maltose innerhalb der Zelle vorliegen.

**Intrazelluläre Synthese von Maltotriose - MalL / MalZ** Aufgrund der hohen Konzentrationen an Maltose im Cytosol wird vermutet, dass Maltotriose sowie höhere Maltodextrine innerhalb der Zelle aufgebaut werden. Wie in Abschnitt 3.1.3 erläutert, können intrazellulär höherwertige Maltodextrine unter Freisetzung von Glucose synthetisiert werden (vergleiche Abbildung 3.5). Dabei spielt das Trisaccharid Maltotriose zum einen als Co-Substrat und zum anderen als Induktor der *mal*-Gene eine wichtige Funktion (RAIBAUD und RICHEL, 1987; BOOS und SHUMAN, 1998; DIPPEL und BOOS, 2005; LENGSELD *et al.*, 2009; SEIBOLD, WURST und EIKMANN, 2009). Daher wird angenommen, dass der Aufbau eines Maltotriose-Vorrats in der Zelle stattfinden muss. Dabei kann Maltotriose auf unterschiedliche Weisen im Maltodextrin-/ Glykogenmetabolismus synthetisiert werden (BESCHKOV, MARC und ENGASSER, 1984; BOOS und SHUMAN, 1998; DIPPEL *et al.*, 2005; ALONSO-CASAJÚS *et al.*, 2006; LENGSELD *et al.*, 2009; SEIBOLD, WURST und EIKMANN, 2009). Bisher ist hauptsächlich die Maltotriosebildung durch die intrazelluläre Degradation von Glykogen beziehungsweise Maltodextrinen beschrieben. Diese Reaktion wird durch Maltodextrin-Glucosidasen wie **MalZ** katalysiert (vergleiche Abbildung 3.5; BOOS und SHUMAN (1998); PARK *et al.* (2011)). Eine weitere Option ist die Synthese des Trisaccharids aus den Substraten Glucose und Glucose-1-Phosphat. Dabei soll die Katalyse der Reaktion unter Beteiligung einer bislang unbekanntes Maltose/Maltotriose Phosphorylase verlaufen (DECKER *et al.*,

1993). Ein möglicher Kandidat für die Synthese wäre die Maltodextrin Phosphorylase GlgP (ACPL\_6920; vergleiche Tabelle A.5 im Anhang).

Weiterhin ist auch eine cytosolische Synthese von Maltotriose ausgehend von Maltose denkbar. Ein solcher Aufbau wurde in der Hasenniere, im Menschen sowie in der Ratte beschrieben (ITO, HARA und SHIBATA, 1991; YUGE *et al.*, 1983; GIRI *et al.*, 1955). Das betrachtete Enzym besitzt nicht nur eine Maltase-Aktivitäten sondern auch Amylomaltase-Aktivitäten, sprich auch eine Funktion im Aufbau von Maltotriose aus Maltose (ITO, HARA und SHIBATA, 1991). Der Aufbau von Maltotriose aus Maltose und Glucose wurde auch für Pilze und Prokaryonten beschrieben, respektive in *Purpureocillium lilacinum*, *Bacillus cereus*, *Penicillium purpurogenum* sowie zwei Spezies der Gattung *Mucor* (KOBAYASHI *et al.*, 2003; BRENDA, Release 2016.1 (January 2016)).

Die komplementäre Reaktion des Abbaus von Maltotriose zur Synthese von Maltose wurde beispielsweise in *E. coli* und *C. glutamicum* beschrieben (BOOS und SHUMAN, 1998; DIPPEL *et al.*, 2005; SEIBOLD, WURST und EIKMANN, 2009). Diese Hydrolysereaktion wird durch eine Maltodextrin-Glucosidase (EC 3.2.1.20) katalysiert. Hydrolysen sind reversible Reaktionen, sodass je nach Gleichgewichtslage gleichzeitig sowohl eine Kondensation- als auch eine Hydrolysereaktion stattfinden kann (CONTRIBUTORS, 2014). Aufgrund der hohen cytosolischen Konzentration von Maltose kann davon ausgegangen werden, dass Maltotriose in einer Rückreaktion aus Maltose gebildet werden kann.

In *E. coli* wird die Hydrolysereaktion von Maltose zu Maltotriose durch **MalZ** katalysiert (ALONSO-CASAJÚS *et al.*, 2006; LENGSELD *et al.*, 2009; CASPI *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Maltodextrin-Glucosidase **MalZ** nicht nur den Abbau, sondern auch den Transfer von Zuckern katalysiert (SONG *et al.*, 2010). Ein entsprechendes Maltodextrin-Glucosidase-Analogon wird im Genom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 kodiert, respektive **MalZ** (ACPL\_4500 ; siehe Tabelle A.5 im Anhang). Außerdem weist das Protein eine hohe Sequenzhomologie zum **MalZ**-Protein aus *C. glutamicum* auf (SEIBOLD, WURST und EIKMANN, 2009). Zudem ist **MalL** neben **MalZ** ein vielversprechender Kandidat für die geforderte Kondensationsreaktion. Dieses Enzym wurde bereits in komparativen Proteomanalysen bei Wachstum von *Actinoplanes* sp. SE50/110 auf Maltose- und Glucose-Minimalmedium beschrieben (WENDLER *et al.*, 2016). Die Maltose-induzierte  $\alpha$ -Glucosidase/Maltase **MalL** (ACPL\_2547, EC 3.2.1.10) konnte in signifikant höheren Mengen unter Zusatz von Maltose identifiziert werden und spielt putativ eine Rolle im Abbau von höheren Maltodextrinen unter Freisetzung von Glucose. Eine reverse Reaktion zum Aufbau von Maltotriose aufgrund der hohen Produktmengen wäre auch hier denkbar.

**Beladen des dTDP-Acarviosine-7-Phosphats - *AcbI*** Sowohl Maltose als auch Maltotriose sind Substrat für die Bildung von Hauptkomponenten in AP1. Dabei wird das Beladen von dTDP-Acarviosine-7-Phosphat nach derzeitigen Modellvorstellungen durch das Enzym ***AcbI*** katalysiert (ZHANG *et al.*, 2002; WENDLER *et al.*, 2013). Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, gibt es keine Hinweise darauf, dass zur Inkorporation der variablen Saccharideinheit aktivierte Zucker benötigt werden (LEE *et al.*, 1997). Es ist anzunehmen, dass das Protein ***AcbI*** Glucose sowie Glucose-basierte Moleküle präferiert, was zusätzlich durch die Experimente mit den definierten Zuckern Maltose, Glucose sowie Galactose konsolidiert wurde.

Nach der intrazellulären Synthese der Acarviostatin-Metabolite werden diese durch den ABC-Exporter ***AcbWXY*** in den Außenraum exportiert (siehe Abschnitt 3.1.3; Teil 1).

**Transglykosylierung im Außenraum - *AcbD*** Nach dem Export der Acarviostatin-Metabolite aus der Zelle kann im Secretom ein Umbau der Acarviostatin-Metabolite durch die extrazelluläre Acarviosyltransferase ***AcbD*** erfolgen. Wie in Abschnitt 1.3.3 bereits beschrieben, katalysiert die extrazelluläre Acarviosyltransferase ***AcbD*** das Beladen von Acarbose sowie deren Homologe mit Sacchariden, dabei vorwiegend mit Glucose-basierten Molekülen (HEMKER *et al.*, 2001). Das Enzym wird demnach für das Spektrum an Acarviostatin-Metaboliten verantwortlich gemacht (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2004; ROCKSER und WEHMEIER, 2009; WENDLER *et al.*, 2013). Jedoch ist die Verknüpfung von Monosacchariden an Acarviostatin-Metaboliten im Secretom aufgrund der hohen negativen freien Energie ( $-\Delta G$ ) der Hydrolysereaktion nicht möglich (vergleiche Abschnitt 3.1.2; ALLABY (1998)). Die beschriebene Aktivität von ***AcbD*** im Umbau von Acarbose und deren Homologe (HEMKER *et al.*, 2001) muss daher auf einer Transglykosylierungsreaktion beruhen, sprich die variable Saccharideinheit des Acarviostatin-Metabolits wird durch ein im Medium vorliegendes Saccharid ausgetauscht.

Der Mechanismus der Transglykosylierung verläuft in zwei Schritten. Zunächst erfolgt ein nucleophiler Angriff auf das anomere C-Atom. Dabei wird der Aglycon-Teil des Glykosids freigesetzt und ein kovalentes Intermediat zwischen dem Enzym und dem Glycon, respektive ***AcbD*** mit der Acarviosyl-Einheit, gebildet. Im zweiten Schritt dient das Glycon als Donor-Verbindung für den Akzeptor, beispielsweise andere Saccharide (ROSENGREN *et al.*, 2014). Dabei bleiben die Energie ihrer glycosidischen Bindung in den Reaktionsprodukten teilweise erhalten (ALLABY, 1998). Aufgrund der schlechten  $K_M$ -Werte der Acarviosyltransferase ***AcbD*** in *Actinoplanes* sp. SE50/110 benötigt die

Reaktion hohe Mengen an Substrat (HEMKER *et al.*, 2001; LEEMHUIS, WEHMEIER und DIJKHUIZEN, 2004).

Daher zeigt die Modellvorstellung die Substitution der variable Saccharideinheit von Acarviosyl-Maltotriose mit Maltose katalysiert durch die extrazelluläre Acarviosyltransferase **AcbD**. Diese Reaktion wird von zwei Faktoren getrieben, zum einen von der hohen Konzentration an Maltose im Medium und zum anderen von der Präferenz des Enzyms **AcbD** zu dem Akzeptor Maltose gegenüber Maltotriose (HEMKER *et al.*, 2001).

#### Synthese von Acarviostatin-Metabolit bei Wachstum auf Maltotriose-Minimalmedium im Acarboseproduzenten 1

**Abbau von Maltotriose im Außenraum - ACPL\_3725** In den Kultivierungen von AP1 in MT-MM (B) liegen hohe Konzentrationen des Trisaccharids im Außenraum vor. Es wird angenommen, dass Maltotriose nicht nur direkt von der Zelle aufgenommen werden kann, sondern auch zu Teilen im extrazellulären Raum abgebaut wird. Die Degradation des Trisaccharids könnte durch die Produkte der beiden im *acb*-Biosynthesegencluster lokalisierten Gene *acbE* und *acbZ* katalysiert werden. Die Enzyme sind als Acarbose-insensitive  $\alpha$ -Amylasen beschrieben (WEHMEIER und PIEPERSBERG, 2009). Eine Insensitivität gegen Acarbose ist ein essentieller Faktor bezogen auf die steigende Konzentration des Inhibitors über die Kultivierung (vergleiche Abschnitt 3.2.2). Jedoch werden Maltose und Maltotriose als schlechte Substrate für die Enzymaktivität der Amylasen eingestuft (ROBYT und FRENCH, 1970). Im Gegensatz dazu können Maltasen beziehungsweise Glykosidhydrolasen (EC 3.2.1.20) den Abbau auch von kleineren Maltodextrinen wie Maltotriose katalysieren. Extrazelluläre Maltasen konnten bereits in verschiedenen Gram-positiven Bakterien charakterisiert werden, respektive in den Stämmen *Clostridium acetobutylicum*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus brevis* (FRENCH und KNAPP, 1950; WANG und HARTMAN, 1976; MCWETHY und HARTMAN, 1979). Basierend auf der Genomannotation wird von *Actinoplanes* sp. SE50/110 eine extrazelluläre Maltase/Glykosidhydrolase kodiert, respektive **acpl\_3725**. Die Abbauprodukte können mittels dem ABC-Transporter **MalEFG-MsiK** sowie **MstEAF-MsiK** importiert werden und stehen dem Aufbau der Hauptkomponenten zur Verfügung.



**Transport von Maltotriose - AgIEFG-MsiK** In einem Versuch zur Induktion des *acb*-Genclusters konnte eine positive Verstärkung der Transkription einzelner *acb*-Gene bei Zugabe von Maltotriose im Vergleich zu Maltose beobachtet werden (persönliche Kommunikation U. Wehmeier). Daher wird davon ausgegangen, dass das Trisaccharid von der Zelle aufgenommen werden muss. Wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, ist neben dem ABC-Transporter MalEFG ein zweiter Maltodextrin-Transporter im Genom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 kodiert. Der ABC-Transporter **AgIEFG** wurde als Aufnahmesystem für Maltotriose aufgrund von Homologien zu anderen Organismen postuliert (WENDLER *et al.*, 2013). Der erste entdeckte **AgIEFG**-Transporter wurde in *Sinorhizobium meliloti* als ABC-Aufnahmesystem für Maltose, Trehalose, Sucrose und Trisaccharide beschrieben (BERTRAM *et al.*, 2004; WENDLER *et al.*, 2013; JENSEN, PETERS und BHUVANESWARI, 2002). Im Genom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 konnte bislang neben den zwei beschriebenen ABC-Transportern **AgIEFG** und MalEFG kein weiteres spezifisches System für die Aufnahme von Maltodextrinen identifiziert werden (vergleiche Abschnitt 3.2.3). In Proteomanalysen konnte das Substratbindeprotein **AgIE** unter allen Bedingungen detektiert werden. Die Aufnahme von Maltotriose durch die ABC-Transporter **AgIEFG** erfolgt unter Verbrauch von ATP mit Hilfe der assoziierten ATPase-Untereinheit **MsiK**.

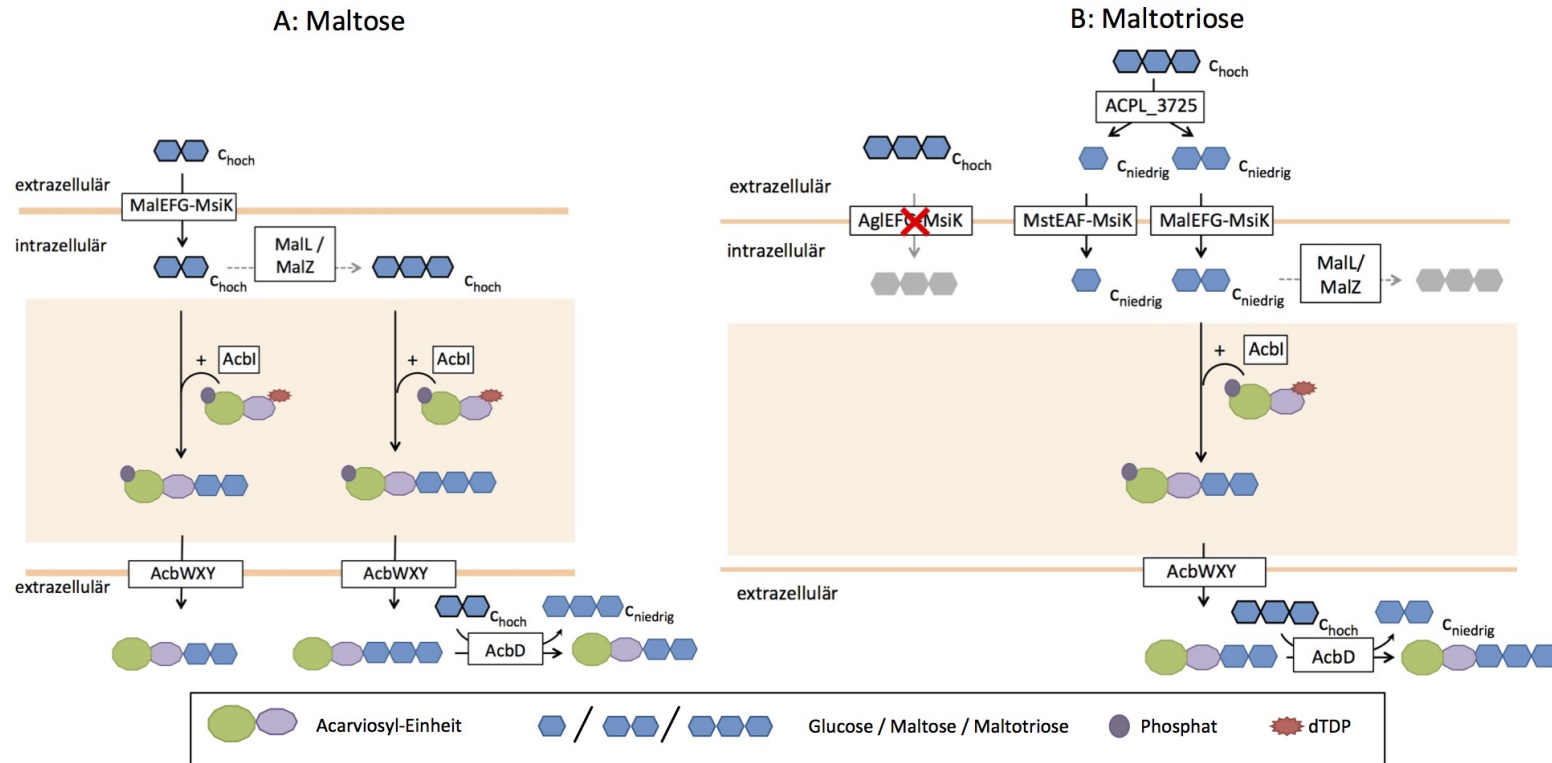
Nach dem Import der Zucker in die Zelle werden diese zur direkten Glykosylierung von dTDP-Acarviosine-7-Phosphat durch **AcbI** verwendet. Anschließend werden die Acarviostatin-Metabolite aus der Zelle mittels **AcbWXY** exportiert. In einer extrazelluläre Transglykosylierungsreaktion katalysiert durch **AcbD** erfolgt der Umbau von Acarbose zu Acarviosyl-Maltotriose. Dabei ist die treibende Kraft der Reaktion die hohe Konzentration des Trisaccharids im Außenraum. Die Hauptkomponente ist demzufolge Acarviosyl-Maltotriose und alle weiteren identifizierten Acarviostatin-Metabolite treten als Nebenkomponenten in Erscheinung. Dabei ist Acarbose die anteilmässig größte Nebenkomponente unter dieser Bedingung wie auch in den Metabolitmessungen deutlich wurde (vergleiche Tabelle 3.6).



#### Modellvorschlag zur Bildung von Acarviostatin-Hauptkomponenten in Acarboseproduzent 2

Das Modell zur Synthese der Hauptkomponenten bei Wachstum des Acarboseproduzenten 2 auf Maltose-Minimalmedium ist identisch zum Acarboseproduzenten 1 und wird daher nur kurz beschrieben. Änderungen ergeben sich lediglich unter Maltotriose-Bedingungen hinsichtlich der Aufnahme des Trisaccharids (siehe Abbildung 3.18).

Synthese von Acarviostatin-Metabolit bei Wachstum auf Maltose-Minimalmedium im Acarboseproduzenten 2 Wie bereits für AP1 erläutert, wird Maltose zunächst von der Zelle durch den ABC-Transporter **MalEFG-MsiK** aufgenommen. Nach dem Import des Disaccharids erfolgt der intrazelluläre Aufbau von Maltotriose durch eine reversible Hydrolysereaktion katalysiert durch **MalL** sowie **MalZ**. Sowohl Maltose als auch Maltotriose gelten als Substrate für die Synthese der Hauptkomponenten der Acarviostatin-Metabolit-Familie, katalysiert durch das **AcbI**-Protein. Nach dem Export der Metabolite ins Secretom durch **AcbWXY** erfolgt die Transglykosylierung von Acarviosyl-Maltotriose zu Acarbose durch die Acarviosyltransferase **AcbD**. Damit deckt sich die Modellvorstellung zur Bildung der Hauptkomponente bei Zusatz von Maltose zum Minimalmedium gänzlich mit der von AP1. An dieser Stelle sollte jedoch deutlich gemacht werden, dass in dem Gen *acbD* eine Punktmutationen sowohl in AP2 als auch in AP3 identifiziert wurde (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Diese Basentransition führt zu einem niedrigeren Umsatz des Enzyms (HEMKER *et al.*, 2001). Ein geringerer Umbau von Acarviosyl-Maltotriose zu Acarbose durch die Acarviosyltransferase AcbD in AP2 im Vergleich zu AP1 würde zu einem höherem Anteil des Acarviostatin-Metabolits im Acarboseproduzenten 2 führen. Dies ist kongruent zu den Metabolitmessungen, welche einen gestiegenen prozentualen Anteil der Acarviosyl-Maltotriose als Nebenkomponente im Vergleich zu AP1 zeigen (siehe Tabelle 3.6).



**Abbildung 3.18: Erweiterte Modellvorstellung zur Synthese von Hauptkomponenten im Acarboseproduzenten 2 bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium.** In dem Modell ist die Aufnahme und die Bildung von Acarviostatin-Metaboliten aus Maltose (A) sowie Maltotriose (B) in AP2 dargestellt. Unter Maltose-Bedingungen (A) kommt es analog zum Acarboseproduzenten 1 intrazellulär zum Aufbau von Maltotriose. Bei Wachstum auf Maltotriose (B) wird angenommen, dass die C-Quelle aufgrund eines Defektes im ABC-Transporter AgIEFG nicht mehr von der Zelle aufgenommen werden kann, was zu einer Degradation im Außenraum führt. Der Abbau erfolgt durch Maltasen oder  $\alpha$ -Amylasen, z.B. ACPL\_3725. Die Abbauprodukte Glucose sowie Maltose werden unmittelbar von der Zelle aufgenommen. Da Maltose nur in geringen Konzentrationen innerhalb der Zelle vorliegt, kommt es nicht zum Aufbau von Maltotriose. Während bei Wuchs auf Maltose (A) sowohl Acarbose als auch Acarviosyl-Maltotriose gebildet wird, erfolgt bei Zusatz von Maltotriose als C-Quelle (B) ausschließlich die Synthese von Acarbose. Nach dem Ausschleusen der Acarviostatin-Metabolite wird die variable Saccharideinheit durch die Acarviosyltransferase AcbD mit dem extrazellulär vorliegenden Zucker ausgetauscht. Die Konzentrationen der Zucker sind im Modell angegeben, unter anderem werden Saccharide mit hoher Konzentration zur Verdeutlichung schwarz umrandet.

**Synthese von Acarviostatin-Metabolit bei Wachstum auf Maltotriose-Minimalmedium im Acarboseproduzenten 2** Das Modell zur Synthese der Hauptkomponenten bei Wachstum des Acarboseproduzenten 2 auf Maltotriose-Minimalmedium unterscheidet sich vom zuvor gezeigten Modell in der Annahme, dass Maltotriose nicht mehr von diesem Stamm aufgenommen werden kann. Wie oben bereits erläutert, wird die Funktion des Imports des Trisaccharids dem ABC-Transporter **AgIEFG** zugeschrieben. Die Genomvergleiche konnten im Gen *aglE* in AP2 und AP3 eine Punktmutation identifizieren, welche in einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch an der Position 208 resultiert. Es wird daher das Suppositum getroffen, dass Maltotriose zunächst im Außenraum abgebaut werden muss.

**Abbau der Maltotriose im Außenraum - ACPL\_3725** Es wird angenommen, dass Maltotriose in AP2 und AP3 vor dem Transport in die Zelle in Maltose und Glucose gespalten werden muss. Wie zuvor beschrieben, wird im Genom von *Actinoplanes* sp. SE50/110 eine extrazelluläre Maltase/ Glykosidhydrolase kodiert, respektive *acpl\_3725*. Das Enzym konnte in den Proteomanalysen in der extrazellulären Fraktion von AP2 und AP3 bei Wuchs auf Maltotriose-Minimalmedium detektiert werden. Ob die Maltase gegenüber Acarbose insensitiv ist, gilt es im Anschluss an diese Arbeit experimentell zu überprüfen.

Dabei ist ein weiterer wichtiger Faktor die Reaktionsgeschwindigkeit des Abbaus, welche über die Kenngröße der Michaelis-Menten-Konstante charakterisiert wird. Die Aktivität einer Maltase/  $\alpha$ -Glucosidase aus *Bacillus* sp. SAM1606 wurde untersucht und  $K_M$ -Werte für unterschiedliche Substrate determiniert (NAKAO *et al.*, 1994). Das beste Substrat mit einem  $K_M$ -Werte von 2,4 mM stellte Isomaltose dar. Für Maltose und Maltotriose wurden die schlechtesten  $K_M$ -Wert von 10,8 mM beziehungsweise 13,3 mM gemessen (NAKAO *et al.*, 1994). Der Gram positive Mikroorganismus *Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis* MB4 hat eine Umsatzrate von 217,2 1/s für Maltotriose (BRENDA, Release 2016.1 (January 2016)). Daher wird die Annahme getroffen, dass die Degradation von Maltotriose im extrazellulären Raum keine Limitierung darstellt. Die treibende Kraft für die Reaktion der Maltase wäre die hohe Konzentration der Maltotriose im Außenraum. Es wird davon ausgegangen, dass die Abbauprodukte Maltose und Glucose unmittelbar durch die Zelle aufgenommen werden, sodass nur eine geringe Konzentration extrazellulär vorliegt.

Nach der Degradation werden die Spaltprodukte Glucose und Maltose über die Importer **MstEAF-MsiK** sowie **MalEFG-MsiK** aufgenommen (vergleiche Modell 1

Abschnitt 3.1.3). Anschließend können die Zucker primär für den Aufbau von Biomasse genutzt werden. Außerdem erfolgt die Synthese von Acarviosyl-Maltose durch das Anhängen an dTDP-Acarviosine-7-Phosphat katalysiert durch die Glykosyltransferase **AcbI**. Aufgrund der geringen Konzentration von Maltose im Cytosol, limitiert durch die Degradation des Trisaccharids im Außenraum, kommt es intrazellulär nicht zum Aufbau von Maltotriose.

**Kein intrazellulärer Aufbau von Maltotriose** Wie oben bereits beschrieben, kann Maltotriose intrazellulär in einer reversiblen Hydrolysereaktion ausgehend von dem Substrat Maltose gebildet werden. Als treibende Kraft dieser Reaktion gilt die hohe Konzentrationen an Maltose. Durch die Limitierung im extrazellulären Abbau der Maltotriose wird davon ausgegangen, dass die intrazelluläre freie Maltosekonzentration in AP2 und AP3 gering ist. Des Weiteren gilt das zweite Abbauprodukt, respektive Glucose, als Repressor der *mal* Gene (BOOS und SHUMAN, 1998). Zum Beispiel konnte beschrieben werden, dass in *E. coli* bereits eine Konzentration von 0,1 mM Glucose die Enzymaktivität von MalQ beeinträchtigt (LENGSFELD *et al.*, 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass Glucose die Expression des Transkriptionsaktivators MalT in *E. coli* induziert, jedoch war in einer Fermentation mit hoher Glucosekonzentration eine starke Katabolitrepression für die Transkription von *malT* sowie *malT*-abhängigen Genen wie *malK*, *lamB*, *malM* sowie des *malEFG*-Operons erkennbar (BOOS und SHUMAN, 1998). Demzufolge wird angenommen, dass es aufgrund eines kombinierten Effekts aus geringer Maltosekonzentration und Glucoserepression zu keinem cytosolischen Aufbau von Maltotriose in AP2 und AP3 kommt.

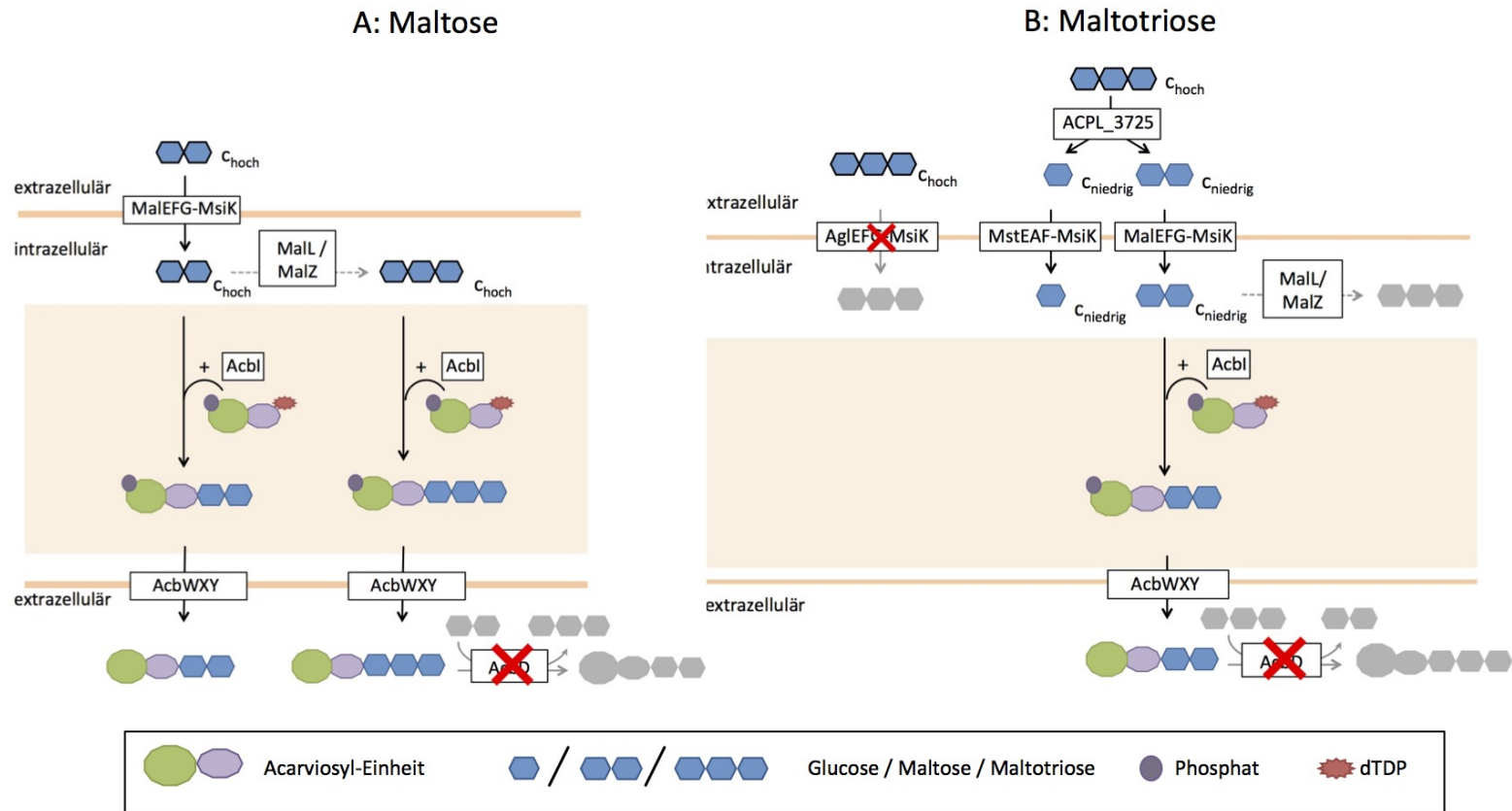
Nach dem Export der Acarviostatin-Metabolite aus der Zelle durch den Transporter **Acb-WXY** führt die hohe Konzentration an Maltotriose im Medium zu einer Umlagerung der variablen Saccharideinheit durch die Katalyse von **AcbD**. Als Hauptkomponente liegt im Überstand anstelle von Acarbose Acarviosyl-Maltotriose vor. Acarbose kann als abundante Nebenkomponente detektiert werden (siehe Tabelle 3.6). Auch hier ist anzumerken, dass die Acarviosyltransferase AcbD in AP2 aufgrund einer Punktmutation einen geringeren Umsatz aufweist.

### Modellvorschlag zur Bildung von Acarviostatin-Hauptkomponenten in Acarboseproduzent 3

Das Modell zur Synthese der Hauptkomponenten bei Wachstum von AP3 auf Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium stimmt in vielen Aspekten mit den Annahme in AP1 sowie AP2 überein (siehe Abbildung 3.19). Varianzen zu den zuvor beschriebenen Modellvorstellungen ergeben sich hinsichtlich der Umlagerung der Acarviostatin-Metabolite im Außenraum, welche im Folgenden näher beschrieben werden.

**Synthese von Acarviostatin-Metaboliten bei Wachstum auf Maltose-Minimalmedium im Acarboseproduzenten 3** Bei Zusatz von Maltose zum Minimalmedium als einzige C-Quelle kommt es zunächst zur Aufnahme des Disaccharids in die Zelle durch den ABC-Transporter **MalEFG-MsiK**. Analog zum Modell von AP1 sowie AP2 kommt es im Cytosol zur Synthese von großen Mengen an Maltotriose aus Maltose, mutmaßlich durch eine reversible Hydrolyse-reaktion von **MalZ** oder **MalL**. Die in einer **AcbI**-katalysierten Reaktion gebildeten Acarviostatin-Metabolite werden aus der Zelle über das ABC-Exportersystem **AcbWXY** ausgeschleust. Im Gegensatz zum Modell in AP1 und AP2 kommt es extrazellulär nicht zur Umlagerung zwischen den Acarviostatin-Metaboliten.

**Fehlende Transglykosylierungsaktivität im Außenraum - **AcbD**** Die Genomanalysen der drei Acarboseproduzenten lieferten die Erkenntnis, dass eine frühzeitige Stopmutation zu einem Defekt der Acarviosyltransferase in AP3 führt (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Die Resultate konnten auf Ebene der Proteomforschung insofern bestätigt werden, als das Enzym in der extrazellulären Fraktion von AP3 nicht identifiziert wurde. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Enzym in AP3 nicht mehr funktionsfähig ist. Dementsprechend können Metabolite der Acarviostatin-Metabolit-Familie im Außenraum nicht mehr umgelagert werden. Dies führt zur Detektion von zwei Hauptkomponenten im Überstand von AP3.



**Abbildung 3.19: Erweiterte Modellvorstellung zur Synthese von Hauptkomponenten im Acarboseproduzenten 3 bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium.** In dem Modell ist die Aufnahme und die Bildung von Acarviostatin-Metaboliten aus Maltose (A) sowie Maltotriose (B) dargestellt. Unter Maltose-Bedingungen (A) kommt es analog zu AP1 und AP2 intrazellulär zum Aufbau von Maltotriose. Sowohl Maltose als auch Maltotriose können an dTDP-Acarviosine-7-Phosphat durch *Acbl* angehängt werden und anschließend ins Secretom exportiert werden. In AP3 kommt es resultierend aus einem Defekt in der Acarviostyltransferase *AcbD* zu keinem Austausch der variablen Saccharideinheit im Außenraum. Bei Wachstum auf Maltotriose (B) wird angenommen, dass die C-Quelle aufgrund eines Defektes im ABC-Transporter *AgIEFG* nicht mehr von der Zelle aufgenommen werden kann. Das Trisaccharid muss zunächst in die Produkte Glucose und Maltose degradiert werden, bevor es importiert werden kann. Da Maltose nur in geringen Konzentrationen innerhalb der Zelle vorliegt, erfolgt kein Aufbau von Maltotriose und es kommt ausschließlich zur Synthese von Acarbose. Die Konzentrationen der Zucker sind im Modell angegeben, unter anderem werden Saccharide mit hoher Konzentration zur Verdeutlichung schwarz umrandet.

Synthese von Acarviostatin-Metabolit bei Wachstum auf Maltotriose-Minimalmedium im Acarboseproduzenten 3 Bei Wachstum von AP3 auf Maltotriose-Minimalmedium wird analog zu AP2 angenommen, dass aufgrund einer Mutation im Gen des Substratbindeproteins **AglE** Maltotriose nicht mehr direkt von der Zelle aufgenommen werden kann. Nach der Degradation des Trisaccharids werden Maltose sowie Glucose unmittelbar durch die Transporter **MstEAF-MsiK** und **MalEFG-MsiK** importiert und verstoffwechselt. Dabei kommt es aufgrund der geringen Konzentration an Maltose nicht zum Aufbau von Maltotriose. Maltose und Glucose können zum Aufbau von Biomasse genutzt werden sowie durch die Enzymaktivität von **AcbI** an dTDP-Acarviose-7-Phosphat angehängt werden. Die synthetisierte Acarbose wird anschließend exportiert. Infolge der defekten Acarviosyltransferase **AcbD** kommt es im Gegensatz zu AP1 und AP2 nicht zu einer Substitution der variablen Saccharideinheit. Demzufolge wird nur Acarbose als Hauptkomponente detektiert.

Zusammengefasst konnte im zweiten Teil der vorliegenden Promotionsarbeit die Synthese von Acarviostatin-Metaboliten in Interdependenz zum Genotyp analysiert werden. Zunächst wurde der Genotyp der drei Stämme analysiert. Basierend auf dem Genomvergleich konnte ein Defekt in der Acarviosyltransferase **AcbD** in AP3 festgestellt werden. Darüberhinaus zeigten sich weitere Mutationen im *acb*-Biosynthesegencluster sowie in weiteren für den Acarbosemetabolismus relevanten Proteinen, zum Beispiel dem ABC-Transporter **AglEFG**. Anschließend konnte das Wachstumsverhalten und die Acarboseproduktion der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämme charakterisiert werden. Die Analysen der extrazellulären Proteinfraction der drei Stämme verdeutlichten den Effekt der zwei Punktmutationen innerhalb von **AcbD**. Weiterhin konnten Metabolitanalysen Divergenzen zu der in Teil 1 postulierten Kohlenhydrat-abhängigen Acarviostatin-Metabolit-Synthese in AP3 darlegen. Vor dem Hintergrund der Resultate wurden neue Modelle aufgestellt. Kurzgefasst werden drei Annahmen getroffen: I) die Acarviosyltransferase **AcbD** fehlt in AP3, II) innerhalb der Zelle erfolgt der Aufbau von Maltotriose aus Maltose durch eine Maltodextrin-Glucosidase sowie III) Maltotriose kann in AP2 und AP3 nicht mehr aufgenommen werden. Die drei Aspekte des ersten Modells, sprich die intrazelluläre Bildung (I) von Haupt- und Neben-Acarviostatin-Metaboliten (II) in Abhängigkeit von der angebotenen Kohlenstoffquelle (III), wurden an die neuen Modellvorstellungen adaptiert (vergleiche Abschnitt 3.1.3). Demzufolge konnte eine Erklärung für die Varianz im Acarviostatin-Metabolit-Spektrum in AP3 postuliert werden, welche nicht im Widerspruch zu den bereits publizierten Arbeiten steht.

## KAPITEL 4

---

### Ausblick

---

In dieser Arbeit konnten *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämme mit unterschiedlichen *omics*-Technologien analysiert und eine Modellvorstellung zur Synthese von Haupt- und Nebenkomponten der Acarviostatin-Metabolit-Familie entwickelt werden. Dabei kann das Modell helfen, die Acarbosebiosynthese und dessen Faktoren besser zu verstehen sowie in Zukunft gezielt in den Metabolismus einzugreifen.

Im Anschluss an diese Arbeit gilt es, die Modellvorstellung zu validieren. Durch die kürzliche Etablierung von gentechnischen Methoden für den *Actinoplanes* sp. SE50/110 Wildtyp-Stamm, insbesondere die Techniken der Konjugation durch T. Gren sowie CRISPR-Cas durch T. Wolf, können gezielt Mutationen in den Mikroorganismus eingebracht werden. Dabei wären unterschiedliche Aspekte des Modells durch die Erstellung folgender Mutanten zu evaluieren: 1) *Actinoplanes* sp. SE50/110  $\Delta acbD$ , 2) *Actinoplanes* sp. SE50/110  $\Delta aglE$ , 3) *Actinoplanes* sp. SE50/110  $\Delta acbD \Delta aglE$ . Eine *Knockout*-Mutante in der Acarviosyltransferase AcbD sollte unter dem Aspekt der Acarviostatin-Metabolit-Synthese charakterisiert werden. Außerdem sollte der Aufbau von Maltotriose aus Maltose in *Actinoplanes* sp. SE50/110 durch *Knockout*-Mutationen in den Genen *malZ* und *malL* näher untersucht werden. Ziel dieser Analysen wäre die Reduzierung der Bildung von Nebenkomponten, insbesondere der Bildung von Acarviosyl-Maltotriose. Außerdem könnten die identifizierten Punktmutationen innerhalb des Acarbosebiosynthesegenclusters mit Hilfe gentechnischer Methoden analysiert werden.



## KAPITEL 5

---

### Literaturverzeichnis

---

- Allaby, M. (1998): Transglycosylation. (URL: <http://www.encyclopedia.com/doc/107-transglycosylation.html>).
- Alonso-Casajús, N., Dauvillée, D., Viale, A. M., Muñoz, F. J., Baroja-Fernández, E., Morán-Zorzano, M. T., Eydallin, G., Ball, S. und Pozueta-Romero, J. (2006): Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* Gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol*, 188, Nr. 14, 5266–5272.
- American Diabetes Association (2010): Diagnosis and classification of diabetes mellitus. In: *Diabetes Care*, 28, 62–69.
- Antelmann, H., Tjalsma, H., Voigt, B., Ohlmeier, S., Bron, S., van Dijl, J. M. und Hecker, M. (2001): A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. In: *Genome Res*, 11, Nr. 9, 1484–1502.
- Arakawa, K., Bowers, S. G., Michels, B., Trin, V. und Mahmud, T. (2003): Biosynthetic studies on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose: the chemical synthesis of isotopically labeled 2-*epi*-5-*epi*-valiolone analogs. In: *Carbohydr Res*, 338, Nr. 20, 2075–82, ISSN 0008–6215.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. und Iturriaga, G. (2006): Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. In: *BMC Evol Biol*, 6, 0–109.
- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Finn, R. D. und Sonnhammer, E. L. (1999): Pfam 3.1: 1313 multiple alignments and profile HMMs match the majority of proteins. In: *Nucleic Acids Res*, 27, Nr. 1, 260–262.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiller, L., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M. und Sonnhammer, E. L. L. (2002): The Pfam protein families database. In: *Nucleic Acids Res*, 30, Nr. 1, 276–280.

- Bayer AG (2015):** Zwischenbericht 2. Quartal 2015.  $\langle$ URL: <http://www.quartalsbericht-2015-q2.bayer.de/de/bayer-zwischenbericht-2015-q2.pdf> $\rangle$ .
- Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Nothhaft, H., Saier, Jr, M. H. und Titgemeyer, F. (2004):** In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: *J Bacteriol*, 186, Nr. 5, 1362–1373.
- Beschkov, V., Marc, A. und Engasser, J. M. (1984):** A kinetic model for the hydrolysis and synthesis of maltose, isomaltose, and maltotriose by glucoamylase. In: *Biotechnol Bioeng*, 26, Nr. 1, 22–26.
- Bischoff, H. (1994):** Pharmacology of  $\alpha$ -glucosidase inhibition. In: *Eur J Clin Invest*, 24 Suppl 3, 3–10.
- Blom, J., Jakobi, T., Doppmeier, D., Jaenicke, S., Kalinowski, J., Stoye, J. und Goesmann, A. (2011):** Exact and complete short-read alignment to microbial genomes using Graphics Processing Unit programming. In: *Bioinformatics*, 27, Nr. 10, 1351–1358.
- Boos, W. und Shuman, H. (1998):** Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. In: *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, Nr. 1, 204–229.
- Borodina, I., Krabben, P. und Nielsen, J. (2005):** Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. In: *Genome Res*, 15, Nr. 6, 820–829.
- BRENDA (Release 2016.1 (January 2016)):** EC 3.2.1.10.  $\langle$ URL: <http://www.brenda-enzymes.org> $\rangle$ .
- Bruheim, P., Sletta, H., Bibb, M. J., White, J. und Levine, D. W. (2002):** High-yield actinorhodin production in fed-batch culture by a *Streptomyces lividans* strain overexpressing the pathway-specific activator gene *actll-ORF4*. In: *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28, Nr. 2, 103–111.
- Brunkhorst, C. (2004):** Untersuchung zum Acarbose-Metabolismus von *Actinoplanes* sp.: Charakterisierung der Maltose/Maltotriose-Transportaktivität sowie eines potentiellen ABC-Transporters für Acarbose. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin, Berlin,, 1–131.

- Brunkhorst, C., Andersen, C. und Schneider, E. (1999):** Acarbose, a pseudooligosaccharide, is transported but not metabolized by the maltose-maltodextrin system of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol*, 181, Nr. 8, 2612–9, ISSN 0021–9193.
- Brunkhorst, C., Wehmeier, U. F., Piepersberg, W. und Schneider, E. (2005):** The *acbH* gene of *Actinoplanes* sp. encodes a solute receptor with binding activities for acarbose and longer homologs. In: *Res Microbiol*, 156, Nr. 3, 322–7–, ISSN 0923–2508 (Print) 0923–2508 (Linking).
- Buescher, J. M. und Driggers, E. M. (2016):** Integration of omics: more than the sum of its parts. In: *Cancer Metab*, 4, 1–8.
- Butler, M. J., Bruheim, P., Jovetic, S., Marinelli, F., Postma, P. W. und Bibb, M. J. (2002):** Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. In: *Appl Environ Microbiol*, 68, Nr. 10, 4731–4739.
- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C. A., Holland, T. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Kubo, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., Weerasinghe, D., Zhang, P. und Karp, P. D. (2014):** The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases - Glycogen Degradation I. In: *Nucleic Acids Res*, 42, 459–471.
- Challis, G. L. und Hopwood, D. A. (2003):** Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 Suppl 2, 14555–14561.
- Chaudhary, A. K., Dhakal, D. und Sohng, J. K. (2013):** An insight into the -omics based engineering of *streptomyces* for secondary metabolite overproduction. In: *Biomed Res Int*, 2013, 1–15.
- Chen, Y., Ding, Y., Yang, L., Yu, J., Liu, G., Wang, X., Zhang, S., Yu, D., Song, L., Zhang, H., Zhang, C., Huo, L., Huo, C., Wang, Y., Du, Y., Zhang, H., Zhang, P., Na, H., Xu, S., Zhu, Y., Xie, Z., He, T., Zhang, Y., Wang, G., Fan, Z., Yang, F., Liu, H., Wang, X., Zhang, X., Zhang, M. Q., Li, Y., Steinbüchel, A., Fujimoto, T., Cichello, S., Yu, J. und Liu, P. (2014):** Integrated omics study delineates the dynamics of lipid droplets in *Rhodococcus opacus* PD630. In: *Nucleic Acids Res*, 42, Nr. 2, 1052–1064.

- Cheng, X., Peng, W.-F., Huang, L., Zhang, B. und Li, K.-T. (2014):** A novel osmolality-shift fermentation strategy for improving acarbose production and concurrently reducing byproduct component C formation by *Actinoplanes* sp. A56. In: *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41, Nr. 12, 1817–1821.
- Chiasson, J. L., Josse, R. G., Hunt, J. A., Palmason, C., Rodger, N. W., Ross, S. A., Ryan, E. A., Tan, M. H. und Wolever, T. M. (1994):** The efficacy of acarbose in the treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A multicenter controlled clinical trial. In: *Ann Intern Med*, 121, Nr. 12, 928–935.
- Choi, B. T. und Shin, C. S. (2003):** Reduced formation of byproduct component C in acarbose fermentation by *Actinoplanes* sp. CKD485-16. In: *Biotechnol Prog*, 19, Nr. 6, 1677–82, ISSN 8756–7938.
- Choi, W. S., Wu, X., Choeng, Y.-H., Mahmud, T., Jeong, B. C., Lee, S. H., Chang, Y. K., Kim, C.-J. und Hong, S.-K. (2008):** Genetic organization of the putative salbostatin biosynthetic gene cluster including the 2-*epi*-5-*epi*-valiolone synthase gene in *Streptomyces albus* ATCC 21838. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, Nr. 4, 637–645.
- Christiano, R., Nagaraj, N., Fröhlich, F. und Walther, T. C. (2014):** Global proteome turnover analyses of the Yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*. In: *Cell Rep*, 9, Nr. 5, 1959–1965.
- Coggill, P., Finn, R. D. und Bateman, A. (2008):** Identifying protein domains with the Pfam database. In: *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 2, 2–5.
- Contributors, N. W. E. (2014):** Hydrolysis – New World Encyclopedia. (URL: <http://www.newworldencyclopedia.org/p/index.php?title=Hydrolysis&oldid=979745>).
- Couch, J. (1963):** Some new genera and species of the *Actinoplanaceae*. In: *Elisha Mitchell Sci.Soc.*, 53–70.
- Cox, R. A. (2004):** Quantitative relationships for specific growth rates and macromolecular compositions of *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Escherichia coli* B/r: an integrative theoretical approach. In: *Microbiology*, 150, Nr. Pt 5, 1413–1426.

- Cross, T. (1981):** Aquatic *actinomycetes*: a critical survey of the occurrence, growth and role of *actinomycetes* in aquatic habitats. In: *J Appl Bacteriol*, 50, Nr. 3, 397–423.
- Crueger, A., Apeler, H., Schröder, W., Pape, H., Goeke, K., Piepersberg, W., Distler, J., Diaz-Guardamino Uribe, P., Jarling, M. und Stratman, A. (1998):** EP0968294 A1: Acarbose (Acb) cluster from *Actinoplanes* sp. SE50/110. CRUEGER, Anneliese Ruhrstrasse 35 D-40699 Erkrath / DE.
- Cuthbertson, L. und Nodwell, J. R. (2013):** The TetR family of regulators. In: *Microbiol Mol Biol Rev*, 77, Nr. 3, 440–475.
- Danne, T. (2014):** Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2015 - Die Bestandsaufnahme. In: *Diabetologie und Stoffwechsel*, 1, Nr. 01, 1–216, ISSN 1614–824X.
- Danne, T. (2015):** Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2016 - Die Bestandsaufnahme. In: *Diabetologie und Stoffwechsel*, 1–244, ISBN 1614–824X.
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R. und Perna, N. T. (2004):** Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. In: *Genome Res*, 14, Nr. 7, 1394–1403.
- Decker, K., Peist, R., Reidl, J., Kossmann, M., Brand, B. und Boos, W. (1993):** Maltose and maltotriose can be formed endogenously in *Escherichia coli* from glucose and glucose-1-phosphate independently of enzymes of the maltose system. In: *J Bacteriol*, 175, Nr. 17, 5655–5665.
- Diaz-Guardamino Uribe, P. M. (2001):** Untersuchungen zum Einbau des Stickstoffes in der Acarviose-Einheit der Acarbose bei *Actinoplanes* sp. 50/110: die Aminotransferase AcbV. Dissertation, Fachbereich C-Mathematik und Naturwissenschaften.
- Dippel, R., Bergmiller, T., Böhm, A. und Boos, W. (2005):** The maltodextrin system of *Escherichia coli*: glycogen-derived endogenous induction and osmoregulation. In: *J Bacteriol*, 187, Nr. 24, 8332–8339.
- Dippel, R. und Boos, W. (2005):** The maltodextrin system of *Escherichia coli*: metabolism and transport. In: *J Bacteriol*, 187, Nr. 24, 8322–8331.

- Drepper, A. und Pape, H. (1996):** Acarbose 7-phosphotransferase from *Actinoplanes* sp.: purification, properties, and possible physiological function. In: *J Antibiot (Tokyo)*, 49, Nr. 7, 664–8, ISSN 0021–8820 (Print) 0021–8820 (Linking).
- Droste, J. (2015):** Charakterisierung des Transkriptionsregulators MalR in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Masterarbeit Universität Bielefeld.
- Elias, J. E., Haas, W., Faherty, B. K. und Gygi, S. P. (2005):** Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. In: *Nat Methods*, 2, Nr. 9, 667–675.
- Elmashni, D. (2013):** LC/MS detection: powerful tool for organic compound analysis. [⟨URL: http://www.scientistlive.com/content/13865⟩](http://www.scientistlive.com/content/13865).
- Farina, G. und Bradley, S. G. (1970):** Reassociation of deoxyribonucleic acids from *Actinoplanes* and other *actinomycetes*. In: *J Bacteriol*, 102, Nr. 1, 30–35.
- Finn, R., Griffiths-Jones, S. und Bateman, A. (2003):** Identifying protein domains with the Pfam database. In: *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 2, 2–5.
- Finn, R. D., Mistry, J., Schuster-Böckler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. L. und Bateman, A. (2006):** Pfam: clans, web tools and services. In: *Nucleic Acids Res*, 34, Nr. Database issue, 247–251.
- French, D. und Knapp, D. W. (1950):** The maltase of *Clostridium acetobutylicum*; its specificity range and mode of action. In: *J Biol Chem*, 187, Nr. 2, 463–471.
- Frommer, W., Junge, B., Muller, L., Schmidt, D. und Truscheit, E. (1979):** [New enzyme inhibitors from microorganisms (author’s transl)]. In: *Planta Med*, 35, Nr. 3, 195–217, ISSN 0032–0943.
- Frommer, W., Puls, W., Schaefer, D. und Schmidt, D. (1975):** Glycoside-hydrolase enzyme inhibitors. In: *Patent US 3,876,766*,, 1–29.
- Gaden, Jr, E. (2000):** Fermentation process kinetics. Reprinted from Journal of Biochemical Microbiological Technology and Engineering. In: *Biotechnol Bioeng*, 67, Nr. 6, 629–635.
- Garrity, G., Heimbuch, B. und Gagliardi, M. (1996):** Isolation of zoosporegenous *actinomycetes* from desert soils. In: *J Ind Microbiol*, 17, Nr. 3-4, 260–267.

- Gerard, J., Luyckx, A. und Lefebvre, P. (1981):** Improvement of metabolic control in insulin dependent diabetics treated with the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose for two months. In: *Diabetologia*, 21, Nr. 5, 446–451.
- Giri, K., Nagabhushanam, A., Nigam, V. und Belavadi, B. (1955):** Synthesis of oligosaccharides from maltose by rat liver. In: *Science*, 121, Nr. 3156, 898–899, ISSN 0036–8075.
- Goeke, K., Drepper, A. und Pape, H. (1996):** Formation of acarbose phosphate by a cell-free extract from the acarbose producer *Actinoplanes* sp. In: *J Antibiot (Tokyo)*, 49, Nr. 7, 661–3, ISSN 0021–8820.
- Guo, X., Geng, P., Bai, F., Bai, G., Sun, T., Li, X., Shi, L. und Zhong, Q. (2012):** Draft genome sequence of *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 reveals the putative biosynthetic gene cluster of acarviostatin family  $\alpha$ -amylase inhibitors. In: *Lett Appl Microbiol*, 55, Nr. 2, 162–169.
- Hansmeier, N., Chao, T.-C., Pühler, A., Tauch, A. und Kalinowski, J. (2006):** The cytosolic, cell surface and extracellular proteomes of the biotechnologically important soil bacterium *Corynebacterium efficiens* YS-314 in comparison to those of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. In: *Proteomics*, 6, Nr. 1, 233–250.
- Heiker, F., Böshagen, H., Junge, B., Müller, L. und Stoltefuss, J. (1982):** Studies designed to localize the essential structural unit of glycoside-hydrolase inhibitors of the acarbose type. In: *Excerpta Medica*,, 137–141.
- Hemker, M. (1997):** Pseudooligosaccharide und Stärkestoffwechsel bei *Actinoplanes* sp. Dissertation, Westfaelische Wilhelms-Universität Münster, Muenster.
- Hemker, M., Stratmann, A., Goeke, K., Schroder, W., Lenz, J., Piepersberg, W. und Pape, H. (2001):** Identification, cloning, expression, and characterization of the extracellular acarbose-modifying glycosyltransferase, AcbD, from *Actinoplanes* sp. strain SE50. In: *J Bacteriol*, 183, Nr. 15, 4484–92, ISSN 0021–9193.
- Hoffrogge, R. (2011):** Vorlesung Proteinmesstechnik und Analytik/Proteomics. Bielefeld.

- Holden, H. M., Rayment, I. und Thoden, J. B. (2003):** Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. In: *J Biol Chem*, 278, Nr. 45, 43885–43888.
- Horii, S., Fukase, H., Matsuo, T., Kameda, Y., Asano, N. und Matsui, K. (1986):** Synthesis and  $\alpha$ -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral antidiabetic agents. In: *J Med Chem*, 29, Nr. 6, 1038–1046.
- Hürtgen, D. (2011):** Die Analyse der zeitlichen Dynamik der Acarbose-Biosynthese in *Actinoplanes* sp. SE50/110 mittels Proteomforschung. Bachelorarbeit. Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) , D-33594 Bielefeld, Germany.
- Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D. und Morosoli, R. (1995):** A cellulase/xylanase-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. In: *Mol Microbiol*, 17, Nr. 2, 367–377.
- Husemann, P. und Stoye, J. (2010):** r2cat: synteny plots and comparative assembly. In: *Bioinformatics*, 26, Nr. 4, 570–571.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W. und Hauser, L. J. (2010):** Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. In: *BMC Bioinformatics*, 11, 1–11.
- Immel, A. (2013):** Establishment of a comparative Gas Chromatography-Mass Spectrometry based Analysis of the Central Metabolism for *Actinoplanes* sp. SE50/110. Masterarbeit Bielefeld University.
- International Diabetes Federation (2014):** Diabetes Atlas. In: *International Diabetes Federation*, 18, 1–160.
- Itoh, K., Hara, T. und Shibata, N. (1991):** Synthesis of maltotriose by maltase purified from rabbit kidney. In: *Biochem Int*, 24, Nr. 5, 969–979.
- Jensen, J. B., Peters, N. K. und Bhuvaneshwari, T. V. (2002):** Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. In: *J Bacteriol*, 184, Nr. 11, 2978–2986.



- Jensen, P. R., Dwight, R. und Fenical, W. (1991):** Distribution of *actinomycetes* in near-shore tropical marine sediments. In: *Appl Environ Microbiol*, 57, Nr. 4, 1102–8–, ISSN 0099–2240 (Print) 0099–2240 (Linking).
- Källberg, M., Margaryan, G., Wang, S., Ma, J. und Xu, J. (2014):** RaptorX server: a resource for template-based protein structure modeling. In: *Methods Mol Biol*, 1137, 17–27.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H. und Xu, J. (2012):** Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. In: *Nat Protoc*, 7, Nr. 8, 1511–1522.
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C. A. und Palladino, M.; Wilbur, B. (Hrsg.) (2012):** Genomics, Bioinformatics and Proteomics. 10. Auflage. Pearson, 547–620.
- Knippers, R.; Knippers, R. (Hrsg.) (1997):** Arten der Mutation: Ein Überblick. 8. Auflage. Georg Thieme Verlag, 247, ISBN 3–13–477008–3.
- Kobayashi, I., Tokuda, M., Hashimoto, H., Konda, T., Nakano, H. und Kitahata, S. (2003):** Purification and characterization of a new type of  $\alpha$ -glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce  $\alpha$ -1,3- and  $\alpha$ -1,2-linked oligosaccharides. In: *Biosci Biotechnol Biochem*, 67, Nr. 1, 29–35.
- Köpfer, A. (2013):** Analyse der transkriptionellen Regulation des *acb*-Genclusters in *Actinoplanes* sp. SE50/110 mittels Regulator Fishing. Masterarbeit Universität Bielefeld.
- Krause, L., McHardy, A. C., Nattkemper, T. W., Pühler, A., Stoye, J. und Meyer, F. (2007):** GISMO–gene identification using a support vector machine for ORF classification. In: *Nucleic Acids Res*, 35, Nr. 2, 540–549.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. und Marinelli, F. (2000):** Rare genera of *actinomycetes* as potential producers of new antibiotics. In: *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, Nr. 3-4, 399–405.
- Lechevalier, H. A., Lechevalier, M. P. und Gerber, N. N. (1971):** Chemical composition as a criterion in the classification of *actinomycetes*. In: *Adv Appl Microbiol*, 14, 47–72, ISSN 0065–2164 (Print) 0065–2164 (Linking).

- Lee, J. S. (2002):** Molekulare Analysen zur Oligosaccharidbildung in *Actinoplanes* sp. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster,, 1–178.
- Lee, S., Sauerbrei, B., Niggemann, J. und Egelkrout, E. (1997):** Biosynthetic studies on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose in *Actinoplanes* sp.: source of the maltose unit. In: *J Antibiot (Tokyo)*, 50, Nr. 11, 954–60, ISSN 0021–8820.
- Lee, S. B., Park, K. H. und Robyt, J. F. (2001):** Inhibition of  $\beta$ -glycosidases by acarbose analogues containing cellobiose and lactose structures. In: *Carbohydr Res*, 331, Nr. 1, 13–18.
- Leemhuis, H., Wehmeier, U. F. und Dijkhuizen, L. (2004):** Single amino acid mutations interchange the reaction specificities of cyclodextrin glycosyltransferase and the acarbose-modifying enzyme acarviosyl transferase. In: *Biochemistry*, 43, Nr. 41, 13204–13, ISSN 0006–2960.
- Lengsfeld, C., Schönert, S., Dippel, R. und Boos, W. (2009):** Glucose- and glucokinase-controlled *mal* gene expression in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol*, 191, Nr. 3, 701–712.
- Li, C., Hung, Y.-J., Qamruddin, K., Aziz, M. F. A., Stein, H. und Schmidt, B. (2011):** International noninterventional study of acarbose treatment in patients with type 2 diabetes mellitus. In: *Diabetes Res Clin Pract*, 92, Nr. 1, 57–64.
- Li, R. und Townsend, C. A. (2006):** Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. In: *Metab Eng*, 8, Nr. 3, 240–252.
- Licht, A., Bulut, H., Scheffel, F., Daumke, O., Wehmeier, U. F., Saenger, W., Schneider, E. und Vahedi-Faridi, A. (2010):** Crystal structures of the bacterial solute receptor AcbH displaying an exclusive substrate preference for  $\beta$ -D-galactopyranose. In: *J Mol Biol*, 406, Nr. 1, 92–105, ISSN 1089–8638.
- Liu, H.-w. und Thorson, J. S. (1994):** Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. In: *Annual Reviews in Microbiology*, 48, Nr. 1, 223–256.
- Ludwig, W., Euzéby, J. und Whitman, W. B.; Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., Ludwig, W., Suzuki, K.-i. und Parte, A. (Hrsg.) (2012):** Taxonomic outline of the phylum *Actinobacteria*. Springer Verlag, New York, 29–31, ISBN 978–0–387–95043–3.

- Mahmud, T., Lee, S. und Floss, H. G. (2001):** The biosynthesis of acarbose and validamycin. In: *Chem Rec*, 1, Nr. 4, 300–10, ISSN 1527–8999.
- Mahmud, T. (2009):** Progress in aminocyclitol biosynthesis. In: *Curr Opin Chem Biol*, 13, Nr. 2, 161–170.
- Makkar, N. und Cross, T. (1982):** Actinoplanetes in soil and on plant litter from freshwater habitats. In: *J Appl Bacteriol*, 52, Nr. 2, 209–218.
- Maul, W., Müller, L., Pfitzner, J., Rauenbusch, E. und Schutt, H. (1989):** Radiosynthesis of [<sup>14</sup>C]acarbose. In: *Arzneimittelforschung*, 39, Nr. 10, 1251–3, ISSN 0004–4172 (Print) 0004–4172 (Linking).
- McWethy, S. J. und Hartman, P. A. (1979):** Extracellular Maltase of *Bacillus brevis*. In: *Appl Environ Microbiol*, 37, Nr. 6, 1096–1102.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E. und Breitling, R. (2011):** antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. In: *Nucleic Acids Res*, 39, Nr. Web Server issue, W339–W346.
- Merettig, N. (2009):** Acarbose als Carbophor: Biochemische Charakterisierung Acarbose-resistenter  $\alpha$ -Glucosidasen und ihre Bedeutung für die Produzentenstämme. Dissertation, Bergische Universität Wuppertal, Wuppertal., 1–172.
- Mertes, G. (2001):** Safety and efficacy of acarbose in the treatment of Type 2 diabetes: data from a 5-year surveillance study. In: *Diabetes Res Clin Pract*, 52, Nr. 3, 193–204.
- Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A. C., Bartels, D., Bekel, T., Clausen, J., Kalinowski, J., Linke, B., Rupp, O., Giegerich, R. und Pühler, A. (2003):** GenDB—an open source genome annotation system for prokaryote genomes. In: *Nucleic Acids Res*, 31, Nr. 8, 2187–2195.
- Mikhailets, G. und Polyak, M. (1989):** Acarbose (review). In: *Pharm Chem J*, 23, Nr. 1, 82–87.
- Milo, R. und Phillips, R.; Milo, R. und Phillips, R. (Hrsg.) (2015):** How fast do RNAs and proteins degrade? Draft Auflage. Garland Science, 294–299.

- Mitsui, T., Yamaguchi, J. und Akazawa, T. (1996):** Physicochemical and serological characterization of rice  $\alpha$ -amylase isoforms and identification of their corresponding genes. In: *Plant Physiol*, 110, Nr. 4, 1395–1404.
- Moche, M., Albrecht, D., Maaß, S., Hecker, M., Westermeier, R. und Büttner, K. (2013):** The new horizon in 2D electrophoresis: new technology to increase resolution and sensitivity. In: *Electrophoresis*, 34, Nr. 11, 1510–1518.
- Mooradian, A. D. und Thurman, J. E. (1999):** Drug therapy of postprandial hyperglycaemia. In: *Drugs*, 57, Nr. 1, 19–29.
- Nakao, M., Nakayama, T., Harada, M., Kakudo, A., Ikemoto, H., Kobayashi, S. und Shibano, Y. (1994):** Purification and characterization of a *Bacillus* sp. SAM1606 thermostable  $\alpha$ -glucosidase with transglucosylation activity. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, 41, Nr. 3, 337–343.
- Nature (2016):** Transcriptomics. (URL: <http://www.nature.com/subjects/transcriptomics>).
- Neumann, U., Khalaf, H. und Rimpler, M. (1994):** Quantitation of electrophoretically separated proteins in the submicrogram range by dye elution. In: *Electrophoresis*, 15, Nr. 7, 916–921.
- Nonomura, H. (1969):** Distribution of *actinomycetes* in soil.(VI) A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil (part I). In: *J Ferment Technol*, 47, 463–469.
- Ortseifen, V. (2012):** Untersuchung des Auftretens von Acarbosebiosynthesegenerprodukten in *Actinoplanes* sp. SE50/110 bei Wachstum auf Minimalmedien mit unterschiedlichen C-Quellen mittels Proteomforschung. Masterarbeit Universität Bielefeld.
- Ortseifen, V., Winkler, A., Albersmeier, A., Wendler, S., Pühler, A., Kalinowski, J. und Rückert, C. (2015):** Complete genome sequence of the actinobacterium *Streptomyces glaucescens* GLA.O (DSM 40922) consisting of a linear chromosome and one linear plasmid. In: *J Biotechnol*, 194, 81–83.
- Parenti, F. und Coronelli, C. (1979):** Members of the genus *Actinoplanes* and their antibiotics. In: *Annu Rev Microbiol*, 33, 389–411, ISSN 0066–4227 (Print) 0066–4227 (Linking).

- Park, J.-T., Shim, J.-H., Tran, P. L., Hong, I.-H., Yong, H.-U., Oktavina, E. F., Nguyen, H. D., Kim, J.-W., Lee, T. S., Park, S.-H., Boos, W. und Park, K.-H. (2011):** Role of maltose enzymes in glycogen synthesis by *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol*, 193, Nr. 10, 2517–2526.
- Patterson, S. D. und Aebersold, R. H. (2003):** Proteomics: the first decade and beyond. In: *Nat Genet*, 33 Suppl, 311–323.
- Penninga, D., Strokopytov, B., Rozeboom, H. J., Lawson, C. L., Dijkstra, B. W., Bergsma, J. und Dijkhuizen, L. (1995):** Site-directed mutations in tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity. In: *Biochemistry*, 34, Nr. 10, 3368–3376.
- Piepersberg, W., Diaz-Guardamino, P., Stratmann, A., Thomas, H., Wehmeier, U. und Zhang, C.; Fierro, F. und Marin, J. (Hrsg.) (2002):** Recent developments in the biosynthesis and regulation of aminoglycosides. Research Signpost, Kerala, 1–26.
- Piepersberg, W. und Distler, J.; Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P. (Hrsg.) (1997):** Aminoglycosides and Sugar Components in Other Secondary Metabolites. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 416.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. und Jacobson, G. R. (1993):** Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. In: *Microbiol Rev*, 57, Nr. 3, 543–594.
- 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 tests in rats, dogs and man. In: *Diabetologia*, 9, Nr. 2, 97–101.
- Raibaud, O. und Richet, E. (1987):** Maltotriose is the inducer of the maltose regulon of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol*, 169, Nr. 7, 3059–3061.
- Robyt, J. F. und French, D. (1967):** Multiple attach hypothesis of  $\alpha$ -amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylases. In: *Arch Biochem Biophys*, 122, Nr. 1, 8–16.
- Robyt, J. F. und French, D. (1970):** Multiple attack and polarity of action of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. In: *Arch Biochem Biophys*, 138, Nr. 2, 662–670.

- Rockser, Y. und Wehmeier, U. F. (2009):** The *gac*-gene cluster for the production of acarbose from *Streptomyces glaucescens* GLA.O: identification, isolation and characterization. In: *J Biotechnol*, 140, Nr. 1-2, 114–23–, ISSN 1873–4863 (Electronic) 0168–1656 (Linking).
- Rosengren, A., Reddy, S. K., Sjöberg, J. S., Aurelius, O., Logan, D. T., Kolenová, K. und Stålbrand, H. (2014):** An *Aspergillus nidulans*  $\beta$ -mannanase with high transglycosylation capacity revealed through comparative studies within glycosidase family 5. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, Nr. 24, 10091–10104.
- Schlösser, A., Weber, A. und Schrempf, H. (2001):** Synthesis of the *Streptomyces lividans* maltodextrin ABC transporter depends on the presence of the regulator MalR. In: *FEMS Microbiol Lett*, 196, Nr. 1, 77–83.
- Schmidt, D., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Wingender, W. und Truscheit, E. (1977):**  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin. In: *Naturwissenschaften*, 64, Nr. 10, 535–6, ISSN 0028–1042 (Print) 0028–1042 (Linking).
- Schwientek, P., Szczepanowski, R., Rückert, C., Stoye, J. und Pühler, A. (2011):** Sequencing of high G+C microbial genomes using the ultrafast pyrosequencing technology. In: *J Biotechnol*, 155, Nr. 1, 68–77, ISSN 1873–4863 (Electronic) 0168–1656 (Linking).
- Schwientek, P. (2012):** Genomics and Transcriptomics of the Industrial Acarbose Producer *Actinoplanes* sp. SE50/110. Dissertation, Bielefeld University, Germany.
- Schwientek, P., Neshat, A., Kalinowski, J., Klein, A., Rückert, C., Schneiker-Bekel, S., Wendler, S., Stoye, J. und Pühler, A. (2014):** Improving the genome annotation of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110 by sequencing enriched 5'-ends of primary transcripts. In: *J Biotechnol*, 190, 85–95.
- Schwientek, P., Szczepanowski, R., Rückert, C., Kalinowski, J., Klein, A., Selber, K., Wehmeier, U. F., Stoye, J. und Pühler, A. (2012):** The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110. In: *BMC Genomics*, 13, 0–122.
- Schwientek, P., Wendler, S., Neshat, A., Eirich, C., Rückert, C., Klein, A., Wehmeier, U. F., Kalinowski, J., Stoye, J. und Pühler, A. (2013):** Com-

parative RNA-sequencing of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110 cultivated in different growth media. In: *J Biotechnol*, 167, Nr. 2, 166–177.

**Seibold, G. M., Wurst, M. und Eikmanns, B. J. (2009):** Roles of maltodextrin and glycogen phosphorylases in maltose utilization and glycogen metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Microbiology*, 155, Nr. 2, 347–358.

**Selber, K., Weingaertner, B., Wehlmann, H., Rosen, W., Pühler, A., Schwientek, P., Kalinowski, J. und Wehmeier, U. (2011):** WO 2012016960 A1: Genomics of *actinoplanes utahensis*. Bayer Pharma Aktiengesellschaft Müllerstrasse 178, 13353 Berlin.

**SEQC/MAQC-III Consortium (2014):** A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium. In: *Nat Biotechnol*, 32, Nr. 9, 903–914.

**Serva Electrophoresis (2015):** HPE™-FlatTop Tower User Manual. 2015 [⟨URL: http://www.serva.de/servaWeb/www\\_root/documents/Tower%20Manual%20v4.pdf⟩](http://www.serva.de/servaWeb/www_root/documents/Tower%20Manual%20v4.pdf) – Zugriff am 24.01.2016.

**Serva Electrophoresis (2016):** LavaPurple™ - Protein Staining for Polyacrylamide Gels and Blotting Membranes. 2016 [⟨URL: http://www.interchim.fr/ft/6/674332.pdf⟩](http://www.interchim.fr/ft/6/674332.pdf) – Zugriff am 24.01.2016.

**Shepherd, M. D., Kharel, M. K., Bosserman, M. A. und Rohr, J. (2010):** Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. In: *Curr Protoc Microbiol.*, 1–8.

**Shin, S. und Park, J. (2016):** Characterization of sequence-specific errors in various next-generation sequencing systems. In: *Mol Biosyst*, 12, Nr. 3, 914–922.

**Solans, M., Vobis, G., Cassán, F., Luna, V. und Wall, L. G. (2011):** Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycetes isolated from the actinorhizal plant *Ochetophila trinervis*. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, Nr. 9, 2195–2202.

**Song, K.-M., Shim, J.-H., Park, J.-T., Kim, S.-H., Kim, Y.-W., Boos, W. und Park, K.-H. (2010):** Transglycosylation properties of maltodextrin glucosidase (MalZ) from *Escherichia coli* and its application for synthesis of a nigerose-containing oligosaccharide. In: *Biochem Biophys Res Commun*, 397, Nr. 1, 87–92.

- Spence, E., Bryan, S. J., Lisfi, M., Cullum, J., Dunlap, W. C., Shick, J. M., Mullineaux, C. W. und Long, P. F. (2013):** 2-*epi*-5-*epi*-Valiolone synthase activity is essential for maintaining phycobilisome composition in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 when grown in the presence of a carbon source. In: *Photosynth Res*, 116, Nr. 1, 33–43.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. und Ward-Rainey, N. L. (1997):** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. In: *Int J Syst Bacteriol*, 47, Nr. 2, 479–491.
- Sticher, L. und Jones, R. L. (1992):**  $\alpha$ -Amylase Isoforms are Posttranslationally Modified in the Endomembrane System of the Barley Aleurone Layer. In: *Plant Physiol*, 98, Nr. 3, 1080–1086.
- Stockmann, M. und Piepersberg, W. (1992):** Gene probes for the detection of 6-deoxyhexose metabolism in secondary metabolite-producing *Streptomyces*. In: *FEMS Microbiol Lett*, 69, Nr. 2, 185–189, ISSN 0378–1097 (Print) 0378–1097 (Linking).
- Storhas, W.; Storhas, W. (Hrsg.) (2003):** Beschreibung der Produktbildung. 2. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN 978–3527288663.
- Stratmann, A. (1997):** Identifizierung eines Acarbose-Biosynthesegenclusters in *Actinoplanes* sp. und Charakterisierung ausgewählter Enzyme des Acarbose-Stoffwechsels. Dissertation, Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal, Wuppertal.
- Stratmann, A., Mahmud, T., Lee, S., Distler, J., Floss, H. G. und Piepersberg, W. (1999):** The AcbC protein from *Actinoplanes* species is a C7-cyclitol synthase related to 3-dehydroquinone synthases and is involved in the biosynthesis of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose. In: *The Journal of biological chemistry*, 274, Nr. 16, 10889–96–, ISSN 0021–9258 (Print) 0021–9258 (Linking).
- Strittmatter, G. und Bonk, M. (1999):** Promotor Lexikon der Biologie.  $\langle$ URL: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/promotor/53961> $\rangle$ .
- Szaniszlo, P. J. und Gooder, H. (1967):** Cell wall composition in relation to the taxonomy of some Actinoplanaceae. In: *J Bacteriol*, 94, Nr. 6, 2037–2047.
- Thomas, H. (2001):** Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Dissertation, Bergischen Universität Gesamthochschule, Wuppertal,, 1–132.



- Tran, N. (2013):** Genome annotation and metabolic pathway reconstruction of *Actinoplanes* sp. SE50/110 based on comparative genome analysis. Masterarbeit Universität Bielefeld.
- Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D. D. und Wingender, W. (1981):** Chemistry and Biochemistry of alpha-Glucosidase Inhibitors. In: *Angew Chem Int Ed*, 20, Nr. 9, 744–761.
- Vahedi-Faridi, A., Licht, A., Bulut, H., Scheffel, F., Keller, S., Wehmeier, U. F., Sängler, W. und Schneider, E. (2010):** Crystal structures of the solute receptor GacH of *Streptomyces glaucescens* in complex with acarbose and an acarbose homolog: comparison with the acarbose-loaded maltose-binding protein of *Salmonella typhimurium*. In: *J Mol Biol*, 397, Nr. 3, 709–723.
- van Wezel, G. P., White, J., Bibb, M. J. und Postma, P. W. (1997):** The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. In: *Mol Gen Genet*, 254, Nr. 5, 604–608.
- Waksman, S. A. und Henrici, A. T. (1943):** The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. In: *J Bacteriol*, 46, Nr. 4, 337–341.
- Wang, L. H. und Hartman, P. A. (1976):** Purification and some properties of an extracellular maltase from *Bacillus subtilis*. In: *Appl Environ Microbiol*, 31, Nr. 1, 108–118.
- Wang, Y., Liu, L., Feng, Z., Liu, Z. und Zheng, Y. (2011):** Optimization of media composition and culture conditions for acarbose production by *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196. In: *World J Microbiol Biotechnol*, 27, 2759–2766.
- Wang, Y., Liu, C. L., Storey, J. D., Tibshirani, R. J., Herschlag, D. und Brown, P. O. (2002):** Precision and functional specificity in mRNA decay. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, Nr. 9, 5860–5865.
- Wang, Z., Gerstein, M. und Snyder, M. (2009):** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. In: *Nat Rev Genet*, 10, Nr. 1, 57–63.
- Wehmeier, U. F. (2003):** The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110: A progress report. In: *Biocatal Biotransform*, 21, Nr. 4-5, 279–284, ISSN 1024–2422.

- Wehmeier, U. F. und Piepersberg, W. (2004):** Biotechnology and molecular biology of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, Nr. 6, 613–25, ISSN 0175–7598 (Print) 0175–7598 (Linking).
- Wehmeier, U. F. und Piepersberg, W. (2009):** Enzymology of aminoglycoside biosynthesis-deduction from gene clusters. In: *Methods Enzymol*, 459, 459–491.
- Wendler, S. (2015):** Comprehensive proteome analysis of *Actinoplanes* sp. SE50/110, the producer of the medically important secondary metabolite acarbose. Dissertation, Universität Bielefeld.
- Wendler, S., Hürtgen, D., Kalinowski, J., Klein, A., Niehaus, K., Schulte, F., Schwientek, P., Wehlmann, H., Wehmeier, U. F. und Pühler, A. (2013):** The cytosolic and extracellular proteomes of *Actinoplanes* sp. SE50/110 led to the identification of gene products involved in acarbose metabolism. In: *J Biotechnol*, 167, 178–189.
- Wendler, S., Ortseifen, V., Persicke, M., Klein, A., Neshat, A., Niehaus, K., Schneiker-Bekel, S., Walter, F., Wehmeier, U. F., Kalinowski, J. und Pühler, A. (2014):** Carbon source dependent biosynthesis of acarbose metabolites in *Actinoplanes* sp. SE50/110. In: *J Biotechnol*, 191, 113–120.
- Wendler, S., Otto, A., Ortseifen, V., Bonn, F., Neshat, A., Schneiker-Bekel, S., Walter, F., Wolf, T., Zemke, T., Wehmeier, U. F., Hecker, M., Kalinowski, J., Becher, D. und Pühler, A. (2015):** Comprehensive proteome analysis of *Actinoplanes* sp. SE50/110 highlighting the location of proteins encoded by the acarbose and the pyochelin biosynthesis gene cluster. In: *J Proteomics*, 125, 1–16.
- Wendler, S., Otto, A., Ortseifen, V., Bonn, F., Neshat, A., Schneiker-Bekel, S., Wolf, T., Zemke, T., Wehmeier, U. F., Hecker, M., Kalinowski, J., Becher, D. und Pühler, A. (2016):** Comparative proteome analysis of *Actinoplanes* sp. SE50/110 grown with maltose or glucose shows minor differences for acarbose biosynthesis proteins but major differences for saccharide transporters. In: *J Proteomics*, 131, 140–148.
- Xue, Y.-P., Qin, J.-W., Wang, Y.-J., Wang, Y.-S. und Zheng, Y.-G. (2013):** Enhanced production of acarbose and concurrently reduced formation of impurity c by addition of validamine in fermentation of *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196. In: *Biomed Res Int*, 2013, 1–9.

- Yachdav, G., Kloppmann, E., Kajan, L., Hecht, M., Goldberg, T., Hamp, T., Hönigschmid, P., Schafferhans, A., Roos, M., Bernhofer, M., Richter, L., Ashkenazy, H., Punta, M., Schlessinger, A., Bromberg, Y., Schneider, R., Vriend, G., Sander, C., Ben-Tal, N. und Rost, B. (2014):** PredictProtein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features. In: *Nucleic Acids Res*, 42, Nr. Web Server issue, W337–W343.
- Youard, Z. A., Mislin, G. L. A., Majcherczyk, P. A., Schalk, I. J. und Reimann, C. (2007):** *Pseudomonas fluorescens* CHA0 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. In: *J Biol Chem*, 282, Nr. 49, 35546–35553.
- Yuge, O., Morio, M., Fukui, T., Fujii, K., Kikuchi, H. und Takahashi, S. (1983):** Maltotriose and maltotetraose excreted in urine following intravenous administration of maltose to human volunteers. In: *Jpn J Surg*, 13, Nr. 4, 296–303.
- Zhang, C. S., Podeschwa, M., Block, O., Altenbach, H. J., Piepersberg, W. und Wehmeier, U. F. (2003):** Identification of a 1-*epi*-valienol 7-kinase activity in the producer of acarbose, *Actinoplanes* sp. SE50/110. In: *FEBS Lett*, 540, Nr. 1-3, 53–7, ISSN 0014–5793 (Print) 0014–5793 (Linking).
- Zhang, C. S., Stratmann, A., Block, O., Bruckner, R., Podeschwa, M., Altenbach, H. J., Wehmeier, U. F. und Piepersberg, W. (2002):** Biosynthesis of the C<sub>7</sub>-cyclitol moiety of acarbose in *Actinoplanes* species SE50/110. 7-O-phosphorylation of the initial cyclitol precursor leads to proposal of a new biosynthetic pathways. In: *J Biol Chem*, 277, Nr. 25, 22853–62, ISSN 0021–9258 (Print) 0021–9258 (Linking).
- Zhang, W., Li, F. und Nie, L. (2010):** Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. In: *Microbiology*, 156, Nr. Pt 2, 287–301.
- Zhi, X.-Y., Li, W.-J. und Stackebrandt, E. (2009):** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. In: *Int J Syst Evol Microbiol*, 59, Nr. Pt 3, 589–608.

---

## Abbildungsverzeichnis

---

1.1	Mikroskopische Aufnahmen von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110. . . . .	3
1.2	Struktur des Pseudotetrasaccharids Acarbose bestehend aus der Acarviostatin-Einheit sowie einer Maltose . . . . .	6
1.3	Bezeichnung und Struktur der Acarbose sowie der Acarbose-Homologe aus der Acarviostatin-Metabolit-Familie . . . . .	7
1.4	Darstellung des Acarbosebiosyntheseclusters in <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 . . . . .	8
1.5	Darstellung der Acarbosebiosynthese in <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 . . . . .	10
1.6	Darstellung der Acarbose in der Funktion als Carbophor . . . . .	12
1.7	Übersicht der Forschung im Gebiet der Acarbosebiosynthese von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 mit unterschiedlichen <i>omics</i> Technologien . . . . .	16
1.8	Vergleichende Transkriptomics des Acarbosebiosyntheseclusters von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 mit RNASeq. . . . .	18
1.9	Umfassende Analyse der Acarbosebiosyntheseproteine von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 in unterschiedlichen Fraktionen . . . . .	19
3.1	Wuchsverläufe des Acarboseproduzenten 1 bei Anzucht in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen . . . . .	33
3.2	Extrahierte Ionenchromatogramme der detektierten Acarviostatin-Metabolite aus den Überständen des Acarboseproduzenten 1 bei Wuchs auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen . . . . .	37
3.3	Die Produktion von extrazellulären Acarviostatin-Metabolite bei Wuchs des Acarboseproduzenten 1 auf Minimalmedium mit unterschiedlichen C-Quellen . . . . .	39
3.4	Modellvorstellung über die Synthese von Haupt- und Nebenkomponenten der Acarviostatin-Metabolit-Familie durch den Acarboseproduzenten 1 . . . . .	42
3.5	Modell des Maltodextrin-/ Glykogen-Stoffwechsels in <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 . . . . .	45
3.6	Genomplot von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 . . . . .	49
3.7	Lokalisierung der Punktmutationen im Acarbosebiosynthesecluster der Acarboseproduzenten 2 und 3. . . . .	58

---

3.8	Bioinformatische Betrachtung der Domänen der Acarviosyltransferase AcbD mit Markierung der SNP-Positionen . . . . .	64
3.9	Wuchsverlauf unterschiedlicher <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämme bei Kultivierung auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium . . . . .	69
3.10	Acarboseproduktion unterschiedlicher <i>Actinoplanes</i> sp. Stämme bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium. . . . .	72
3.11	Darstellung der identifizierten Acarbosebiosyntheseproteine in der cytosolischen Fraktion der drei <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämme bei Anzucht auf Minimalmedium mit Maltose und Maltotriose . . . . .	79
3.12	2D-Gele des extrazellulären Proteoms der unterschiedlichen <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110-Stämme, respektive AP1, AP2 und AP3, bei Anzucht in Maltotriose-Minimalmedium in der Wachstumsphase . . . . .	82
3.13	Vergleichende Expression einiger für die Acarbosebiosynthese relevanten extrazellulären Proteine von zwei produzierenden <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110-Stämmen . . . . .	84
3.14	Extrazelluläres Proteom des Acarboseproduzenten 3 bei Wuchs auf Maltose- (A) sowie Maltotriose-Minimalmedium (B) in der Wachstumsphase . . . . .	89
3.15	Produktion der unterschiedlichen Acarviostatin-Metabolite durch die drei <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110-Stämmen bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium nach 168 Stunden . . . . .	95
3.16	Acarviostatin-Metabolit-Bildung bezogen auf die Biotrockenmasse durch Acarboseproduzent 1, Acarboseproduzent 2 und Acarboseproduzent 3 zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten. . . . .	97
3.17	Angepasste Modellvorstellung zur Synthese der Hauptkomponenten in Acarboseproduzent 1 bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium . . . . .	107
3.18	Erweiterte Modellvorstellung zur Synthese von Hauptkomponenten im Acarboseproduzenten 2 bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium . . . . .	110
3.19	Erweiterte Modellvorstellung zur Synthese von Hauptkomponenten im Acarboseproduzenten 3 bei Wuchs auf Maltose- sowie Maltotriose-Minimalmedium . . . . .	114
A.1	Syntenie-Plot zwischen den assemblierten Genomen von Acarboseproduzent 1 und 3 . . . . .	III

---

## Tabellenverzeichnis

---

3.1	Eigenschaften des <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Genoms . . . . .	50
3.2	Identifizierte Mutationen der Acarboseproduzenten 2 (AP2) und 3 (AP3) im Vergleich zum Referenzgenom <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 . . . . .	51
3.3	Auflistung aller Punktmutationen deren Substitution zu einem frühzeiti- gen Stop der Translation führen . . . . .	52
3.4	Auflistung aller Punktmutationen im Acarbosebiosynthesecluster der Acarboseproduzenten 2 und 3 . . . . .	60
3.5	Anzahl an biologischen Replikaten für unterschiedliche Zeitpunkte, Stäm- me und verwendete C-Quelle . . . . .	67
3.6	Prozentualer Anteil der Nebenkompenten bezogen auf die in Abhän- gigkeit von der C-Quelle gebildete Hauptkomponente . . . . .	99
A.1	Top 25 der besten C-Quellen bezogen auf die Atmung vom Acarbosepro- duzent 1 ermittelt anhand phänotypischer Microarrays . . . . .	II
A.2	Punktmutationen, die ausschließlich im Acarboseproduzenten 2 vorkommen	IV
A.3	Spezifische Produktbildungsgeschwindigkeiten für die Acarboosesynthese der drei <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen bei Wachstum auf Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium . . . . .	V
A.4	Systematische Erfassung der cytosolischen sowie extrazellulären Proteine von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110-Stämmen auf Minimalmedien supplē- mentiert mit Maltose beziehungsweise Maltotriose . . . . .	VI
A.5	Auflistung von Punktmutationen innerhalb von Genen des Maltodextrin- / Glykogenstoffwechsels von <i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 Stämmen. . . .	VII

## Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn **Prof. Dr. Alfred Pühler** für die Betreuung meiner Promotionsarbeit und die Möglichkeit die vorliegende Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am Centrum für Biotechnologie anfertigen zu dürfen. Weiterhin will ich mich für all seine Unterstützung sowie Gesprächsbereitschaft bedanken. Ich bedanke mich ebenfalls bei **Prof. Dr. Jörn Kalinowski**, der als Zweitbetreuer meine Arbeit begleitete und darüberhinaus mir stets mit Rat zur Seite stand. Ebenfalls danke ich **Prof. Dr. Karsten Niehaus** und **Dr. Raimund Hoffrogge** für die wissenschaftlichen Hilfestellungen.

Mein Dank gilt auch dem CLIB Graduierten Cluster für Industrielle Biotechnologie, gefördert durch das Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich bei Bayer AG, insbesondere bei Herrn **Till Zemke**, Herrn **Dr. Winfried Rosen** und deren Team für die Kooperation bedanken und die Möglichkeit an dem interessanten Thema mitzuarbeiten. Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei **PD Dr. Udo Wehmeier** für die produktiven wissenschaftlichen Diskussionen.

Ich danke der *Coryne*-Gruppe für das tolle Arbeitsklima, die tatkräftige Unterstützung und die schöne Zeit. Mein besonderer Dank gilt **Dr. Sergej Wendler** für seine große Hilfsbereitschaft, seine vielfältige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Ebenfalls Bedanken möchte ich mich bei der *Actinoplanes*-Arbeitsgruppe, **Tetiana Gren**, **Timo Wolf**, **Julian Droste**, **Dr. Susanne Schneiker-Bekel**, **Dr. Armin Neshat** und **Dr. Marcus Persicke**. Weiterhin gilt mein Dank meinem Bürokollegen **Manuel Wittchen** und meinen moralischen Stützen **Tim Steffens** und **Nils Lübke**.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Menschen herzlich bedanken, die mich in meinem Studium unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt dabei **Julia Fischbach**, **Rebecca Schuy**, **Lena Dresrüsse**, **Lene Schumann**, **Anna Köpfer**, **Luise Winkler** und **Robert Braun**. Ebenfalls Bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Mutter **Inge**, meinem Vater **Friedel** und meinen Geschwistern **Bettina** und **Joachim**. Und nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Partner **Felix Seibert** bedanken für seine Unterstützung und all die aufbauenden Worte. Ich bin allen Genannten sehr dankbar.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen sowie Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen der Arbeit, die anderen Quellen im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, sind durch Angaben der Herkunft kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Abbildungen und Tabellen.

Die Dissertation wurde weder in der vorgelegten noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht. Ich bewerbe mich hier erstmalig um den Doktorgrad der Naturwissenschaften.

Bielefeld, den 23.05.2016

Vera Ortseifen



---

## Anhang

---

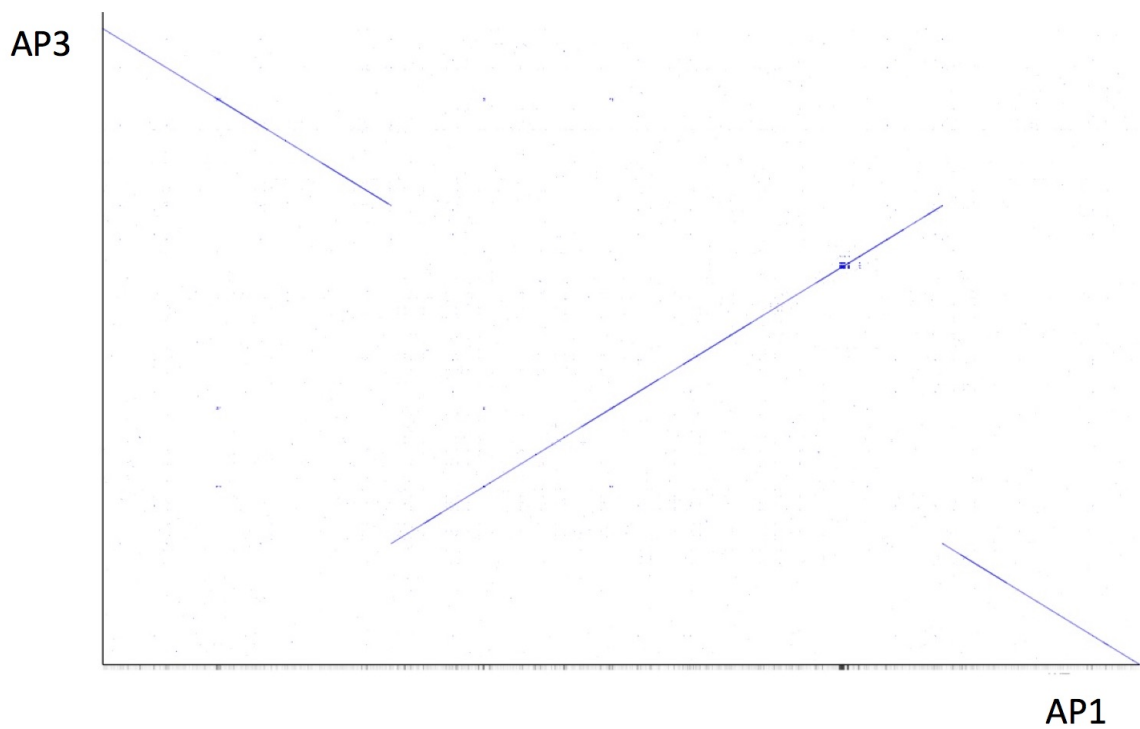
Ergänzende Tabellen und Abbildungen

**Tabelle A.1: Top 25 der besten C-Quellen bezogen auf die Atmung vom Acarboseproduzent 1 ermittelt anhand phänotypischer Microarrays.**

Nr. <sup>a</sup>	C-Quelle <sup>b</sup>
1	Arbutin
2	D-Mannitol Phosphate
3	L-Proline
4	Gelatin
5	Gentiobiose
6	Glycerol
7	Glycogen
8	D-Mannose
9	D-Trehalose
10	<i>D-Galactose</i>
11	Dextrin
12	Laminarin
13	Turanose
14	Tween 80
15	Maltotriose
16	Sucrose
17	Dihydroxy-Acetone
18	Tween 40
19	Salicin
20	Methyl-Pyruvate
21	Palatinose
22	<i><math>\alpha</math>-D-Glucose</i>
23	<i>Maltose</i>
24	L-Ornithine
25	D-Cellobiose

*a* Die besten 25 C-Quellen aus 192 vorgelegten Substraten in den phänotypischen Microarrays 1 und 2

*b* Die zur Anzucht von Acarboseproduzenten 1 eingesetzten C-Quellen in Minimalmedium (A) sind kursiv geschrieben



**Abbildung A.1: Syntenie-Plot zwischen den assemblierten Genomen von Acarboseproduzent 1 und 3.** Der Graph wurde mittels der Software r2cat erstellt (HUSEMANN und STOYE, 2010) und zeigt die umgedrehte Orientierung eines größeren DNA-Bereichs in AP3 im Vergleich zu AP1.

**Tabelle A.2: Punktmutationen, die ausschließlich im Acarboseproduzenten 2 vorkommen.** In der Tabelle sind fünf Gene aufgelistet, welche eine veränderte Base in AP2 aufweisen aber nicht in AP3.

<i>acpl</i> Nr.	Ref. <sup>a</sup>	Neu <sup>d</sup>	AS-Substitution <sup>e</sup>	Art des AS-Austauschs	Genname	Genprodukt
<i>acpl_6052</i>	GAG	GCG	Glu822Ala	nicht konservativ	<i>pks1D</i>	Polyketide Synthase in cACPL_2
<i>acpl_6055</i>	TTC	TTT	Phe		<i>pks1A</i>	Polyketide Synthase in cACPL_2
<i>acpl_6078</i>	GTG	GGG	Val2434Gly	nicht konservativ	<i>pks2A</i>	Polyketide Synthase in cACPL_3
<i>acpl_6267</i>	GCC	GAC	Ala114Asp	nicht konservativ		hypothetisches Protein
<i>acpl_6694</i>	<i>Pos.</i> 7347535	intergenische Region vor Zwei-Komponenten System Regulator				

*a* Referenz Aminosäuretriplett im Acarboseproduzent 1

*b* Neue Aminosäuretriplett im Acarboseproduzenten 2

*c* Aminosäuresubstitution mit Angabe der Position in der Aminosäuresequenz

**Tabelle A.3: Spezifische Produktbildungsgeschwindigkeiten für die Acarbose-synthese der drei *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen bei Wachstum auf Maltose- und Maltotriose-Minimalmedium.**

Stämme	Zeitpunkt (h)	$\sigma$ - Mal-MM ( $\text{h}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$\sigma$ - MT-MM ( $\text{h}^{-1}$ ) <sup>g</sup>
AP1 <sup>h</sup>	96	0,00071	0,00000
	120	0,00000	0,00000
	144	0,00066	0,00000
	168	0,00076	0,00040
	192	-0,00102	-0,00006
	264	0,00030	0,00074
	288	0,00089	0,00040
	AP2 <sup>i</sup>	96	0,00654
120		0,00379	-0,00093
144		0,00147	0,00056
168		0,00454	0,00136
192		0,00000	0,00171
264		0,00070	0,00373
288		-0,00055	0,00236
AP3 <sup>j</sup>		96	0,00000
	120	0,00492	0,01636
	144	0,00522	0,02807
	168	0,00763	0,03928
	192	0,00208	0,02484
	264	0,00182	-0,00137
	288	-0,00118	-0,00295

*a* Spezifische Produktbildungsgeschwindigkeiten bei Wachstum auf Maltose-Minimalmedium

*b* Spezifische Produktbildungsgeschwindigkeiten bei Wachstum auf Maltotriose-Minimalmedium

*c* *Actinoplanes* sp. SE50/110 Acarboseproduzent 1

*d* *Actinoplanes* sp. SE50/110 Acarboseproduzent 2

*e* *Actinoplanes* sp. SE50/110 Acarboseproduzent 3

Tabelle A.4: Systematische Erfassung der cytosolischen sowie extrazellulären Proteine von *Actinoplanes* sp. SE50/110-Stämmen auf Minimalmedien supplementiert mit Maltose beziehungsweise Maltotriose.

Stamm <sup>a</sup>	C-Quelle <sup>b</sup>	Zeitpkt. (h)	Anz. analysierter Spots	Anz. identifizierter Spots (%) <sup>c</sup>	Anz. Acb-Proteine <sup>d</sup>	vers. Proteine <sup>e</sup>
<b>Cytosolische Fraktion</b>						
AP1	MT	192	119	78,99	2	147
AP2	MT	264	192	69,79	5	183
AP3	Mal	168	325	81,23	11	381
AP3	MT	168	271	90,04	11	482
<b>Extrazelluläre Fraktion</b>						
AP1	MT	192	239	69,46	3	162
AP2	MT	264	288	87,50	3	190
AP3	Mal	168	288	88,19	2	249
AP3	MT	168	343	87,17	2	280

<sup>a</sup> Betrachteter *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stamm; AP1 - Acarboseproduzent 1; AP2 - Acarboseproduzent 2; AP3 - Acarboseproduzent 3

<sup>b</sup> C-Quelle des Minimalmediums, Mal - Maltose; MT - Maltotriose

<sup>c</sup> Anzahl an identifizierten Spots bezogen auf die Anzahl der analysierten Spots in Prozent

<sup>d</sup> Anzahl der gefundenen *acb*-Biosynthesecluster Proteinen

<sup>e</sup> Anzahl der identifizierten Proteine

**Tabelle A.5: Auflistung von Punktmutationen innerhalb von Genen des Maltodextrin-/ Glykogenstoffwechsels von *Actinoplanes* sp. SE50/110 Stämmen.** Die Zuordnung der Proteine zum Maltodextrin-/Glykogenstoffwechsels in *Actinoplanes* sp. SE50/110 basieren auf den Aminosäuresequenzen homologer Proteine in anderen Organismen (BOOS und SHUMAN, 1998; DIPPEL *et al.*, 2005; SEIBOLD, WURST und EIKMANN, 2009)

Name <sup>a</sup>	<i>acpl</i> Num- mer <sup>b</sup>	Name	AS Aus- tausch <sup>c</sup>	Art des AS- Austauschs	AP2 <sup>d</sup>	AP3 <sup>e</sup>
<i>malZ</i>	<i>acpl_4500</i>					
<i>malQ</i>	<i>acpl_3674</i>	<i>acbQ</i>	His504Tyr	nicht kon- servativ	-	+
	<i>acpl_7581</i>	<i>malQ</i>	Ser180Asn	konservativ	-	+
<i>malP</i>						
<i>glgP</i>	<i>acpl_6920</i>	<i>glyP</i>	Gly14Asp	nicht kon- servativ	-	+
<i>glgX</i>	<i>acpl_2845</i>	<i>glgX</i>	Ala13Val His57Tyr	konservativ nicht kon- servativ	+ -	+ +
	<i>acpl_4688</i>	<i>glgX</i>				
	<i>acpl_6623</i>	<i>treX</i>				

*a* Genamen im Maltodextrin-/ Glykogenstoffwechsels von *E. coli* (BOOS und SHUMAN, 1998)

*b* *acpl* Nummer des Homologs in *Actinoplanes* sp. SE50/110

*c* Aminosäuresubstitution resultierend aus detektierter Punktmutation in Acarboseproduzent 2 und 3

*d* Punktmutation im Acarboseproduzenten 2 detektiert (+) bzw. nicht detektiert (-)

*e* Punktmutation im Acarboseproduzenten 3 detektiert (+) bzw. nicht detektiert (-)