

**Molekularbiologische Untersuchungen
zur Biosynthese
glykosidierter Arzneistoffe**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau**

vorgelegt von
Anke Frerich

Freiburg, August 2006

Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. G. E. Schulz
Referent:	Prof. Dr. A. Bechthold
Korreferent:	Prof. Dr. I. Merfort
Dekan:	Prof. Dr. A. Bechthold

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses: 14.12.2006

*Am Ziele deiner Wünsche
wirst du jedenfalls eines vermissen:
dein Wandern zum Ziel.*

Marie von Ebner-Eschenbach

Wissenschaftliche Publikationen

Bechthold,A., Weitnauer,G., Luzhetskyy,A., Berner,M., Bihlmeier,C., Boll,R., Dürr,C., Frerich,A., Hofmann,C., Mayer,A., Treede,I., Vente,A. und Luzhetskyy,M. (2005). Glycosyltransferases and other tailoring enzymes as tools for the generation of novel compounds. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* (51), 147-163.

Hofmann,C., Boll,R., Heitmann,B., Hauser,G., Dürr,C., Frerich,A., Weitnauer, G., Glaser, S.J. und Bechthold, A. (2005). Genes encoding enzymes responsible for the biosynthesis of L-lyxose and the attachment of eurekaate during avilamycin biosynthesis. *Chem. Biol.* **12** (10), 1137-1143.

Pélissier,H.C., Frerich,A., Desimone,M., Schumacher,K. und Tegeder,M. (2004). PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of French bean. *Plant Physiol.* **134** (2), 664-675.

Tagungsbeiträge

Vorträge:

Glykosyltransferasen. Seminar des Graduiertenkollegs "Biochemie der Enzyme", Freiburg, Mai 2002

Studies on the function of glycosyltransferases and expression of deoxysugar biosynthetic genes. GENOVA-Projekt-Treffen (5. EU-Forschungsrahmenprogramm), Freiburg, Juni 2002

Glycosyltransferases - Prospects of Combinatorial Biosynthesis. Gemeinsames Seminar der Graduiertenkollegien "Proteinfunktion auf atomarer Ebene" der Universität Marburg und "Biochemie der Enzyme" der Universität Freiburg, Kleinwalsertal, August 2003

Poster:

Frerich,A., Hoffmeister,D. und Bechthold,A. Purification of enzymes involved in dTDP-D-olivose biosynthesis. Workshop der VAAM-Fachgruppe „Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten“, Freiburg, September/Oktober 2002

Frerich,A., Elling,L. und Bechthold,A. Sucrose synthase - a tool for increased avilamycin production? VAAM-Workshop: International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Compounds, Groningen, NL, September 2003

Frerich,A., Welzel,K., Vente,A. und Bechthold,A. Polyketomycin - The biosynthetic gene cluster. VAAM-Workshop: International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Products, Jena, September 2004

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG.....	2
1.1 STREPTOMYCETEN UND IHRE BEDEUTUNG ALS ANTIBIOTIKAPRODUZENTEN.....	2
1.2 STREPTOMYCETEN – GENETISCHE BESONDERHEITEN	2
1.2.1 Genregulation und Regulation der Antibiotikaproduktion.....	3
1.2.2 Streptomyceten als Expressionswirt.....	4
1.3 POLYKETIDSYNTHESE UND PKS-KLASSIFIZIERUNG	5
1.4 POLYKETOMYCIN	7
1.5 AVILAMYCINE	10
1.6 BIOSYNTHESE DER DESOXYZUCKER.....	12
1.6.1 Glykosyltransferasen	13
1.7 ZIELSETZUNG DER VORGELEGTEN ARBEIT	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 BAKTERIENSTÄMME.....	16
2.2 VEKTOREN.....	17
2.3 PLASMIDE UND COSMIDE.....	17
2.4 OLIGONUKLEOTIDE	19
2.5 MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE.....	22
2.5.1 <i>E. coli</i> -Medium	22
2.5.2 Streptomyceten-Medien.....	22
2.5.3 Puffer und Medien für die Streptomyceten-Protoplastentransformation.....	24
2.5.4 <i>Bacillus subtilis</i> -Medien	25
2.5.5 Antibiotika-Stammlösungen	25
2.6 CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	26
2.7 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	26
2.8 SOFTWARE.....	27
2.9 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	28
2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen	28
2.9.2 Kultivierung und Anzucht von <i>E. coli</i>	28
2.9.3 Kultivierung und Anzucht von Streptomyceten	28
2.9.4 Dauerkulturen von Streptomyceten.....	29
2.9.5 Anzucht von <i>Bacillus subtilis</i> und Herstellung einer Sporensuspension.....	30
2.9.6 <i>E. coli</i> -Transformation	30
2.9.7 Streptomyceten-Transformation	31
2.9.7.1 Protoplastierung von Streptomyceten	31
2.9.7.2 Protoplastentransformation	32
2.9.8 Konjugation von <i>Streptomyces</i> sp. Tü6028	32
2.9.8.1 Donorkultur (<i>E. coli</i> ET12567).....	32
2.9.8.2 Rezipientenkultur (<i>Streptomyces</i> -Stamm)	33
2.9.8.3 Konjugationsansatz	33
2.9.9 Screening nach Doppel-Crossing-over-Mutanten	33
2.10 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
2.10.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	34
2.10.2 Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	34
2.10.3 Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	35
2.10.4 QIAGEN Plasmid Midi Kit	35
2.10.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Streptomyceten	35

2.10.6	Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten	35
2.10.7	Phenolextraktion und ethanolische Fällung von DNA	36
2.10.8	Restriktionsspaltung.....	36
2.10.9	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	37
2.10.10	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	37
2.10.11	PCR-Amplifizierungen	37
2.10.11.1	Amplifizierung zur Überprüfung möglicher <i>pokGT1</i> -Mutanten	38
2.10.11.2	Amplifizierung von <i>aviD</i>	38
2.10.11.3	Amplifizierung von <i>urdR</i>	39
2.10.11.4	Amplifizierung von <i>aviS</i>	39
2.10.11.5	Amplifizierung von <i>aviT</i>	40
2.10.11.6	Amplifizierung von <i>simB7</i>	40
2.10.11.7	Amplifizierung von <i>urdS</i>	40
2.10.11.8	Amplifizierung eines Vektorabschnittes.....	41
2.10.12	PCR-basierte Gensynthese	41
2.10.12.1	Amplifizierung der <i>susy_GC</i> -Teilstücke 3A und 3B	41
2.10.12.2	Amplifizierung der <i>aviD</i> -Promotor-Region.....	44
2.10.13	DNA-modifizierende Enzymreaktionen	44
2.10.13.1	Klenow-Fragment	44
2.10.13.2	T4-DNA-Polymerase	45
2.10.13.3	Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase	45
2.10.13.4	T7-Endonuklease I.....	45
2.10.13.5	Ligation von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase	45
2.10.13.6	TA-Klonierung	46
2.10.14	Sequenzierung von Plasmid-DNA	46
2.10.15	Sequenzvergleiche mit Datenbanken	46
2.10.16	Southern-Hybridisierung.....	47
2.10.16.1	Transfer der DNA auf eine Membran („Southern Blot“)	47
2.10.16.2	Markierung, Hybridisierung und Detektion von Sonden-DNA	47
2.10.16.3	Puffer für die Southern-Hybridisierung und für die Sonden-Detektion.....	48
2.10.17	Überexpression und Reinigung heterolog exprimierter Enzyme aus Streptomycceten....	48
2.10.17.1	Herstellung zellfreier Proteinrohextrakte von UrdR, AviS, AviT und SimB7	48
2.10.17.2	Enzymreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie	49
2.10.18	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.11	SEKUNDÄRSTOFFANALYTIK.....	51
2.11.1	Isolierung von Sekundärstoffen.....	51
2.11.1.1	Extraktion im analytischen Maßstab.....	51
2.11.1.2	Extraktion im präparativen Maßstab.....	51
2.11.2	Agardiffusionstest	52
2.11.3	Dünnschichtchromatographie	52
2.11.4	Massenspektrometrische Analyse	52
3	ERGEBNISSE	54
3.1	UNTERSUCHUNG DES POLYKETOMYCIN-CLUSTERS.....	54
3.1.1	Herstellung und Screening einer Cosmidbank	54
3.1.2	Klonierung und Sequenzierung des Polyketomycin-Clusters	54
3.1.3	Auswertung der Sequenzdaten	56
3.1.4	Charakterisierung der Biosynthese-Proteine.....	60
3.1.4.1	Die Polyketomycinon-Biosynthese	60
3.1.4.1.1	Typ-II-PKS	60
3.1.4.1.2	Cyclasen/Aromatasen.....	60
3.1.4.1.3	Ketoreduktasen.....	61

3.1.4.1.4	Oxygenasen	61
3.1.4.1.5	Methyltransferasen.....	61
3.1.4.2	Die 3,6-Dimethylsalicylsäure-Biosynthese	62
3.1.4.3	Die Desoxyzuckerbiosynthese	64
3.1.5	Charakterisierung weiterer Genprodukte	66
3.1.5.1	Regulatorische Proteine	66
3.1.5.2	Resistenz-vermittelnde Proteine	67
3.1.5.3	Biotin-[Acetyl-CoA-Carboxylase]-Synthetase	68
3.1.5.4	Proteine mit unbekannter Funktion aus dem Polyketomycin-Cluster.....	68
3.1.5.5	<i>myo</i> -Inositol-Metabolismus-Proteine	69
3.1.6	Inaktivierung von <i>pokGT1</i>	70
3.1.6.1	Herstellung des Plasmids pKC1132/ Δ <i>pokGT1</i>	70
3.1.6.2	Konjugation von <i>S. diastatochromogenes</i> Tü6028.....	71
3.1.6.3	Kolonien-PCR zum Prüfen der <i>pokGT1</i> -Mutanten.....	71
3.1.6.4	Untersuchung der <i>S. diastatochromogenes-pokGT1</i> -Mutante	72
3.2	ÜBEREXPRESSION VON DESOXYZUCKERBIOSYNTHESEGENEN	74
3.2.1	Homologe Expression der 4-Ketoreduktase UrdR	76
3.2.1.1	Erstellung des Plasmids pAF1/ <i>urdR</i>	76
3.2.1.2	Expression von UrdR in <i>S. fradiae</i> RN-435	76
3.2.2	Heterologe Expression der 3-Ketoreduktase AviT	78
3.2.2.1	Erstellung des Plasmids pAF1/ <i>aviT</i>	78
3.2.2.2	Expression von AviT in <i>S. fradiae</i> A0	78
3.2.3	Heterologe Expression der 2,3-Dehydratase AviS	79
3.2.3.1	Erstellung des Plasmids pAF1/ <i>aviS</i>	79
3.2.3.2	Expression von AviS in <i>S. fradiae</i> A0	79
3.2.4	Homologe Expression der 2,3-Dehydratase UrdS	80
3.2.4.1	Erstellung des Plasmids pAF2/ <i>urdS</i>	80
3.2.4.2	Erstellung des Plasmids pAF3/ <i>urdS</i>	80
3.2.4.3	Expression von UrdS in <i>S. fradiae</i> Δ <i>urdS</i>	80
3.2.5	Heterologe Expression der Glykosyltransferase SimB7	83
3.2.5.1	Erstellung des Plasmids pAF1/ <i>simB7</i>	83
3.2.5.2	Expression von SimB7 in <i>S. fradiae</i> A0	83
3.3	EXPRESSION VON SUS1 UND SYNTHESE EINES CODON-OPTIMIERTEN GENS.....	85
3.3.1	Saccharosesynthese	85
3.3.2	Saccharose als C-Quelle	86
3.3.3	Inaktivierung von <i>aviD</i>	86
3.3.3.1	Erstellung des Plasmids pSP1/ <i>aviD-S</i>	87
3.3.3.2	Transformation von <i>S. viridochromogenes</i> Tü57	87
3.3.3.3	Prüfung der Mutanten per PCR	88
3.3.3.4	Prüfung der Mutanten per Southern-Hybridisierung	88
3.3.3.5	Analyse der Produkte von <i>S. viridochromogenes</i> Δ <i>aviD</i>	89
3.3.4	Komplementierung der <i>aviD</i> -Mutante.....	90
3.3.4.1	Erstellung des Plasmids pSETerm/ <i>aviD</i>	90
3.3.4.2	Erstellung des Plasmids pSET152/ <i>aviD</i>	90
3.3.4.3	Erstellung des Plasmids pSETerm/ <i>susy</i>	90
3.3.4.4	Expression von AviD in <i>S. viridochromogenes</i> Δ <i>aviD</i>	91
3.3.4.5	Expression der Saccharosesynthese Sus1 in <i>S. viridochromogenes</i> Δ <i>aviD</i>	92
3.3.5	Strategie zur Synthese eines Codon-optimierten Gens	92
3.3.5.1	PCR-basierte Gensynthese	92
3.3.5.2	Erstellung des Plasmids pKC1218/ <i>susy_GC</i>	93

4	DISKUSSION.....	95
4.1	POLYKETOMYCIN-BIOSYNTHESEGENCLUSTER	95
4.1.1	Polyketidsynthasen	95
4.1.1.1	PokM1 – iterative Typ-I-PKS	95
4.1.1.2	PokP1-3 – die „minimale“ Typ-II-PKS	97
4.1.1.3	PKS-Aktivierung trotz fehlender Phosphopantetheinyltransferase?.....	97
4.1.2	PokABC1 und PokABC2 – Ein Efflux-System zur Autoresistenz	98
4.1.3	PokAC1-3 – Acetyl-CoA-Carboxylase	100
4.1.4	Vorschlag zur Biosynthese des Polyketomycins	101
4.1.4.1	Mögliche Biosynthese der 3,6-Dimethylsalicylsäure.....	101
4.1.4.2	Hypothetischer Desoxyzuckerbiosyntheseweg	103
4.1.4.3	Zusammenfassung der Polyketomycin-Biosynthese.....	105
4.2	EXPRESSION VON SUS1 AUS SOLANUM TUBEROSUM.....	107
4.3	EXPRESSION VON DESOXYZUCKERBIOSYNTHESE-PROTEINEN	108
5	LITERATURVERZEICHNIS	109
6	ANHANG.....	120
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120
6.2	ÜBERSICHTSKARTE DES POLYKETOMYCIN-CLUSTERS.....	122
6.3	SONDEN-DNA-SEQUENZEN	123
6.4	DNA-SEQUENZEN AUS <i>STREPTOMYCES DIASTATOCHROMOGENES</i> TÜ6028	124
6.4.1	Polyketomycin-Cluster-Sequenz	124
6.4.2	<i>myo</i> -Inositol-Metabolismus-Gensequenz	147
6.5	INFORMATIONEN ZUR SYNTHESE VON <i>SUSY_GC</i>	150
6.5.1	Aminosäure- und DNA-Sequenzen von <i>Sus1_Soltu</i> bzw. <i>Susy_GC1</i>	150
6.5.2	Codon-Präferenz-Tabelle für <i>S. viridochromogenes</i> Tü57	153
6.5.3	Primerkombinationen für die PCR-basierte Gensynthese.....	154
6.6	PLASMIDKARTEN.....	155
6.6.1	Inaktivierungsplasmid pSP1/ <i>aviD-S</i>	155
6.6.2	Expressionsplasmid pSET152/ <i>aviD</i>	155
6.6.3	Inaktivierungsplasmid pKC1132/ Δ <i>pokGT1</i>	155
6.6.4	Expressionsplasmid pAF1/ <i>urdR</i>	156
6.6.5	Expressionsplasmid pAF2/ <i>urdS</i>	156
6.6.6	Expressionsplasmid pAF3/ <i>urdS</i>	156
6.6.7	Expressionsplasmid pAF1/ <i>aviS</i>	157
6.6.8	Expressionsplasmid pAF1/ <i>aviT</i>	157
6.6.9	Expressionsplasmid pAF1/ <i>simB7</i>	157
6.6.10	Expressionsplasmid pSETerm/ <i>susy</i>	158
6.6.11	Expressionsplasmid pKC1218/ <i>susy_GC</i>	158
	DANKSAGUNG	159
	BILDUNGSGANG	160

Zusammenfassung

Polyketomycin ist ein Glykosid-Antibiotikum, das von *Streptomyces diastatochromogenes* Tü6028 gebildet wird. Es ist aus einem linearen tetracyclischen Polyketid mit einem C-glykosidisch verknüpften Disaccharid aus den Desoxyzuckern D-Amicetose und L-Axenose und einer daran gebundenen 3,6-Dimethylsalicylsäure-Einheit aufgebaut.

Um Einblicke in die Biosynthese zu erhalten wurden Sequenzierungen durchgeführt. Es liegen 52,2 kb und 6,9 kb DNA-Sequenzdaten vor, die 41 ORF bzw. 5 ORF beinhalten.

Um nachzuweisen, daß die erhaltenen Gendaten dem Polyketomycin-Cluster zugehörig sind, wurde das Gen *pokGT1* inaktiviert. Die *pokGT1*-Mutante produziert vermehrt Polyketid-Vorstufen, jedoch kein Polyketomycin.

Durch Sequenzvergleiche konnten Aussagen über mögliche Proteinfunktionen gemacht werden. Anhand dieser Daten wurde ein hypothetischer Biosyntheseweg aufgestellt.

Ein Gen, das für die Aminosäuresequenz der Saccharosesynthase Sus1 aus *Solanum tuberosum* codiert, wurde synthetisch hergestellt. Das Codon-optimierte synthetische Gen dient der späteren Expression in *Streptomyces viridochromogenes*-Stämmen. Um die Aktivität des Enzyms untersuchen zu können, wurde ausgehend vom Stamm *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 eine *aviD*-Mutante generiert. Dieser Mutante fehlt die dTDP-Glucose-Synthase, so daß die Desoxyzuckerbiosynthese zum Erliegen kommt. Die Mutante wies keine Avilamycin-Produktion auf.

Zur Bereitstellung für andere Projekte wurden Gene mit Beteiligung an der Zuckersynthese bzw. am Zuckereinbau in Expressionsvektoren kloniert. Die Enzyme wurden als Fusionsproteine mit N- bzw. C-terminalem His-Tag exprimiert. Die 2,3-Dehydratasen AviS bzw. UrdS konnten weder bei Überexpression mit N-terminalem noch mit C-terminalem His-Tag nachgewiesen werden. Die Glykosyltransferase SimB7, die 4-Ketoreduktase UrdR und die 3-Ketoreduktase AviT wurden in *Streptomyces fradiae*-Stämmen exprimiert.

1 Einleitung

1.1 Streptomyceten und ihre Bedeutung als Antibiotika-produzenten

Aus unserer modernen Gesellschaft sind Antibiotika nicht mehr wegzudenken. Jährlich werden in Deutschland rund 42 Millionen Antibiotikum-haltige Präparate zur Therapie von Infekten verordnet. Damit rangieren die Antibiotika auf Rang 3 der meistverordneten Präparate (Quelle: GKV-Arzneimittelindex/WIdO). Das Spektrum an antibiotischen Substanzen und ihre Einsatzgebiete sind breit gefächert. So vereint der Begriff „Antibiotikum“ nicht nur die gängigen Humantherapeutika, sondern auch Pestizide, Herbizide, Immunsuppressiva und Antibiotika, die in der Agrarwirtschaft sowie in der Veterinärmedizin zum Einsatz kommen. Gemeinsam ist vielen natürlich vorkommenden Antibiotika ihre Herkunft.

Etwa 67 % der bekannten aus Mikroorganismen stammenden Naturstoffe wurden aus Bakterien der Ordnung *Actinomycetales* isoliert. Hier ist die Gattung *Streptomyces* hervorzuheben, da sie mit 80 % den Hauptanteil der aus Actinomyceten stammenden antibiotischen Substanzen bildet (Kieser *et al.*, 2000).

Die Gattung *Streptomyces* umfaßt ubiquitär verbreitete Bodenbakterien, die Gram-positiv sind und eine obligat aerobe Lebensweise haben. Kennzeichnend ist auch der ungewöhnliche Lebenszyklus dieser Bakterien. Zumeist kommen sie in ihrer natürlichen Umgebung als Sporen vor. Die Sporen stellen eine Dauerform der Streptomyceten dar, die es ermöglicht, widrige Lebensbedingungen wie Trockenheit und Nährstoffmangel zu überstehen. Verbessern sich die Lebensbedingungen, so wird die Sporenkeimung in Gang gesetzt und die Zellen bilden ein Substratmyzel aus. Durch den Einfluß äußerer Signale erfolgt die Ausbildung eines Luftmyzels. Aus den Lufthyphen gehen durch Abschnüren neue Sporenketten hervor. Dieser Lebenszyklus und die Ausbildung eines pilzähnlichen Myzels führten zunächst zur irrtümlichen Zuordnung der Streptomyceten zu den Pilzen.

1.2 Streptomyceten – genetische Besonderheiten

Auch auf genetischer Ebene weisen die Streptomyceten einige charakteristische Eigenschaften auf. Die genomische DNA der Streptomyceten ist durch einen hohen Guanin/Cytosin-Gehalt zwischen 70 und 74 % gekennzeichnet (Chater und Hopwood, 1993) und liegt meist als lineares Chromosom vor (Voff und Altenbuchner, 2000).

Eine Eigenschaft, die die molekularbiologische Arbeit erleichtert, ist das Vorkommen von sogenannten „Genclustern“ bei den Streptomyceten. So liegen sowohl die Strukturgene, als auch die entsprechenden Resistenz- oder Regulationsgene für einen Naturstoff auf einem zusammenhängenden Genomabschnitt vor (Martin und Liras, 1989).

Die Synthese von antibiotischen Stoffen und anderen Sekundärmetaboliten ist bei den Streptomyceten stark reguliert und unterliegt dem Einfluß äußerer Faktoren. Vermutlich verschaffen sich die Bakterien durch die Freisetzung antibiotischer Substanzen einen Vorteil gegenüber anderen Bakterien bei der Konkurrenz um Nährstoffe.

1.2.1 Genregulation und Regulation der Antibiotikaproduktion

Grundsätzlich ist die Genregulation bei Streptomyceten im Vergleich zu *E. coli* komplexer gestaltet. Die Genexpression wird durch zahlreiche σ -Faktoren, die mit mehreren (bis zu vier) hintereinander geschalteten Promotoren interagieren, reguliert (Kelemen *et al.*, 1996; Missiakas und Raina, 1998). Für den Abschluß der Transkription sind lange GC-reiche „inverted repeats“ am Ende eines Gens oder Operons von Bedeutung (Pulido und Jiménez, 1987; Wright und Bibb, 1992). Der neu synthetisierte mRNA-Strang bildet in dem Bereich mit der palindromen Sequenz eine Haarnadelstruktur aus, die die RNA-Polymerase wahrscheinlich stoppt und so den Abbruch der Transkription herbeiführt (Gusarov und Nudler, 1999).

Die Produkte des Sekundärstoffwechsels, wozu auch die Antibiotika der Streptomyceten zählen, werden zwar in großer Vielfalt, jedoch meist in kleinen Mengen produziert. Die Synthese der Sekundärmetabolite unterliegt Kontrollmechanismen, um zu gewährleisten, daß die Synthese mit einem vertretbaren Verbrauch von Nährstoffen und Energie einhergeht.

Bei den Streptomyceten hat nicht allein der Entwicklungszustand Einfluß auf die Antibiotikaproduktion, sondern auch äußere Faktoren können durch entsprechende Signalwirkung die Antibiotika-Biosynthese fördern oder unterdrücken. Die Sekundärmetabolite werden meistens erst nach Erreichen der stationären Wachstumsphase gebildet. Zudem beeinflusst die Konzentration bestimmter Nährstoffe im Substrat den Sekundärstoffwechsel.

Die Streptomyceten nutzen neben anderen organischen Substraten vor allem Zucker als Kohlenstoffquelle. Die Zucker werden in die Zelle aufgenommen, durch spezifische Kinasen phosphoryliert (Sabater *et al.*, 1972; Ikeda *et al.*, 1984) und hauptsächlich durch Glykolyse, Hexose-Monophosphat-Weg und Krebszyklus verwertet (Salas *et al.*, 1984; Cochrane, 1996). Neben Glucose können auch andere Kohlenstoffquellen den entsprechenden Stoffwechselweg induzieren. Die Kohlenstoff-Katabolit-Repression führt dazu, daß zunächst Glucose verbraucht wird und andere Abbauege solange unterdrückt werden.

Einige Streptomycceten stellen ihren Stoffwechsel während der Sekundärstoffsynthese von der Glykolyse auf den Hexose-Monophosphat-Weg um (Kieser *et al.*, 2000). Hinsichtlich der Antibiotikaproduktion ist bekannt, daß sich ein Überschuß an Glucose im Nährmedium nachteilig auf die Syntheserate des Antibiotikums auswirkt. Die Streptomycceten bleiben bei einer ausreichenden Glucosekonzentration im Medium in der Wachstumsphase. Daher sind oftmals Oligosaccharide als Kohlenstoffquelle zur Optimierung der Antibiotikaproduktion geeignet (Soltero *et al.*, 1953). Auch andere Medienbestandteile wie Phosphat oder Stickstoffquellen, die wachstumsfördernd wirken, können die Antibiotikaproduktion reprimieren (Weinberg, 1978; Martin, 2004).

Hinsichtlich der Antibiotikaproduktion ist bekannt, daß viele Antibiotika-Biosynthesegencluster spezifische Regulatoren enthalten. In Streptomycceten umfaßt die SARP-Familie („*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins“) die meisten Biosyntheseweg-spezifischen Transkriptionsregulatoren (Wietzorrek und Bibb, 1997). Die Expression dieser regulatorischen Proteine unterliegt meist übergeordneten Regulationsmechanismen, die sowohl die Synthese anderer Sekundärmetabolite als auch die Ausbildung des Luftmyzels nebst Sporenbildung beeinflussen. Dies verdeutlichen beispielsweise Mutanten, die nicht sporulieren können und unfähig sind, Sekundärstoffe zu synthetisieren (Chater und Bibb, 1997).

Die übergeordneten Regulatoren wirken oft über Kontrollkaskaden auf die Expression von Biosyntheseweg-spezifischen Regulatorgenen oder Biosynthesegenen ein oder beeinflussen die Aktivität der zugehörigen Enzyme. Zu diesen übergeordneten (pleiotropen) Regulationselementen mit Einfluß auf die Antibiotika-Biosynthese zählen phosphoryliertes Guanosin (ppGpp), γ -Butyrolactone (z.B. der A-Faktor aus *S. griseus*), Proteinkinasen oder regulatorische Zweikomponentensysteme (z.B. AfsR/AfsS aus *S. coelicolor*) (Bibb, 1996; Chater und Bibb, 1997).

1.2.2 Streptomycceten als Expressionswirt

Um ein eukaryotisches Gen in einem Streptomycceten als Wirt zu exprimieren, sind Besonderheiten bezüglich der Streptomyccetengenetik zu beachten. Bei Streptomycceten wird neben dem „typischen“ Methionin-Start-Codon „AUG“ (63 %) der Translationsstart häufig durch das Valin-Codon „GUG“ (36 %) eingeleitet. Die Lysin-Codone „UUG“ oder „CUG“ können auch als Start-Codon fungieren, spielen allerdings nur eine Nebenrolle (≤ 1 %).

Gene aus Eukaryoten müssen in Form von cDNA („complementary DNA“ = ausgehend von mRNA erhaltene DNA-Sequenz eines Gens) in den Streptomycceten-Wirt eingebracht werden, da die Bakterien die mRNA direkt ohne Spleißen in eine Aminosäuresequenz translatieren.

Die Expression von artfremden Genen in Streptomyceten kann auch durch den stark abweichenden GC-Gehalt der DNA erschwert werden. Der GC-Gehalt beträgt innerhalb eines Codons durchschnittlich 71 % für das erste Nukleotid, 50 % für das zweite Nukleotid und 91 % für das dritte Nukleotid (Wright und Bibb, 1992). Der hohe GC-Anteil für das dritte Nukleotid ist bei der Sequenzauswertung von Vorteil, da es die Vorhersage von offenen Leserahmen erleichtert. Untersuchungen zum Codongebrauch der Streptomyceten zeigten, daß einige Codone (wie z.B. die Leucin-Codone „UUA“ und „CUA“) äußerst selten in Gensequenzen vorkommen (Wright *et al.*, 1992). Entsprechend ihrer Codon-Präferenz exprimieren die Streptomyceten nicht alle möglichen tRNA-Moleküle in gleichen Mengen. Vielmehr gibt es sogar Hinweise darauf, daß das Vorkommen seltener Codone innerhalb der Gensequenz die Proteinexpression auf Translationsebene reguliert. Das Leucin-Codon „UUA“ ist auf eine kleine Anzahl von Genen beschränkt, die bei der Differenzierung oder Antibiotikaproduktion eine Rolle spielen (Leskiw *et al.*, 1991a und 1991b). In *S. coelicolor* A3(2) wird die tRNA-Variante, die ausschließlich das seltene Leucin-Codon „UUA“ erkennt, von dem Gen *bldA* codiert (Lawlor *et al.*, 1987). Leskiw und Mitarbeiter stellten fest, daß diese tRNA-Variante abhängig vom Entwicklungszustand der Streptomyceten überwiegend in älteren Kulturen exprimiert wird (Leskiw *et al.*, 1993). Dies hat zur Folge, daß es bei der Translation von mRNA, die das UUA-Codon enthält, besonders während der vegetativen Wachstumsphase Probleme geben kann.

Bei der Überexpression artfremder Gene in einem Streptomyceten-Stamm empfiehlt es sich, die besonders seltenen Basentriplets (wie z.B. TAA, TTT, TTA, CTA, TCT) durch „stille Mutationen“ in häufiger genutzte Codone umzuwandeln. Falls der Wirtstamm über ein Restriktionssystem zur Erkennung und Zerstörung von Fremd-DNA verfügt, sollte darauf geachtet werden, daß das Expressionsplasmid keine entsprechenden Restriktionsschnittstellen enthält.

1.3 Polyketidsynthese und PKS-Klassifizierung

Polyketidsynthasen (PKS) sind maßgeblich an der Synthese der Polyketidgrundgerüste beteiligt. Der bei der Synthese ablaufende Mechanismus, bei dem es zur sequentiellen Kettenverlängerung einer „Starter-Einheit“ (meist Acetyl-CoA) mit CoA-aktivierten Acyl-Einheiten (z. B. Malonyl-CoA) kommt, ähnelt stark den Abläufen bei der Fettsäurebiosynthese (Hopwood und Sherman, 1990).

Anstelle des Acetyl-CoA akzeptieren einige PKS, besonders vom Typ I, andere „Starter-Moleküle“, wie beispielsweise Malonyl-, Methylmalonyl- oder Propionyl-CoA. Dies trägt zur strukturellen Vielfalt der Polyketide bei.

Die Verknüpfung der einzelnen Einheiten erfolgt durch Claisen-Kondensation, wobei β -Keto-Intermediate gebildet werden, die weiteren Modifikationen (wie z.B. Hydroxylierung,

Oxidation, Reduktion, Methylierung oder Glykosylierung) unterliegen (Hopwood, 1997; Staunton und Weissman, 2001).

Generell werden bei den bakteriellen Polyketidsynthasen drei Typen unterschieden. Obwohl sich die drei PKS-Typen in ihrem Aufbau und dem von ihnen katalysierten Reaktionsablauf deutlich unterscheiden, werden stets ausgehend von Acyl-CoA-Einheiten in mehreren decarboxylierenden Kondensationsschritten Polyketide synthetisiert. Dabei katalysiert jeweils eine β -Ketoacyl-Synthase-Domäne oder -Untereinheit (KS) die C-C-Verknüpfung.

Die Polyketidsynthasen vom Typ I sind multifunktionale Enzyme, die sich aus Modulen mit unterschiedlichen katalytischen Domänen zusammensetzen. Neben der Ketoacyl-Synthase kommen Domänen mit Funktion als Acyltransferase (AT), Dehydratase (DH), Enoylreduktase (ER), Ketoreduktase (KR) oder Acyl-Carrier-Protein (ACP) vor. Bei der Verlängerung der Polyketidkette fügt jedes Modul eine Einheit hinzu (Donadio *et al.*, 1991; Bevitt *et al.*, 1992). Die Thioesterase-Domäne (TE) agiert zuletzt und löst durch hydrolytische Spaltung die synthetisierte Polyketidkette von dem Enzym. Die Typ-I-PKS sind vor allem an der Biosynthese reduzierter Polyketide beteiligt, darunter z.B. Polyene, Macrolide und Polyether. Anhand des modularen Aufbaus eignet sich dieser PKS-Typ besonders gut für genetische Manipulationen, die darauf abzielen, die Molekülstruktur des Polyketids zu verändern. Daher wurden an modularen Typ-I-PKS bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die dazu führten, daß veränderte Naturstoffe synthetisiert werden konnten (Marsden *et al.*, 1998; Hutchinson, 1998).

Neben den modularen Typ-I-PKS sind vor rund 10 Jahren die ersten bakteriellen iterativen Typ-I-PKS entdeckt worden. Sie unterscheiden sich von den bislang klassifizierten PKS-Typen, haben aber Ähnlichkeit zu Typ-I-PKS aus Pilzen. Zu dieser PKS-Klasse gehört u.a. AviM aus dem Avilamycin-Produzenten *S. viridochromogenes* Tü57 (Gaisser *et al.*, 1997a). Bei diesen Polyketidsynthasen werden die einzelnen Domänen (enzymatischen Aktivitäten) mehrfach genutzt (Shen, 2003). Es wurden bisher noch keine Studien veröffentlicht, bei denen einzelne Domänen inaktiviert oder ausgetauscht wurden. Es bleibt fraglich, ob sich iterative Typ-I-PKS in ähnlicher Weise wie die modularen PKS eignen, um auf diese Weise veränderte Polyketide zu erhalten.

Die Typ-II-Polyketidsynthasen setzen sich aus mehreren Einzelproteinen mit je einer katalytischen Aktivität zusammen. Die einzelnen Enzymaktivitäten des Multienzymkomplexes laufen bei jedem Kondensationsschritt wiederholt ab (iterativ). Aus der Biosynthese durch Typ-II-PKS entstehen ausgehend von den primär gebildeten Polyketidketten durch Cyclisierung und Dehydratisierung aromatische Polyketide, die mono- oder polycyclisch sein können (z.B. Tetracyclin). Eine gut untersuchte PKS vom Typ II ist die Actinorhodin-PKS aus *S. coelicolor* A3(2) (Malpartida und Hopwood, 1984; McDaniel *et al.*, 1993; McDaniel *et al.*, 1994).

Jede Typ-II-PKS verfügt über drei elementare Enzyme, die die sogenannte Minimal-PKS-Einheit bilden (McDaniel *et al.*, 1994). Nach neuerer Nomenklatur werden diese Enzyme als Ketosynthase α (KS_α ; bisher: KS für Ketosynthase), Ketosynthase β (KS_β ; bisher: CLF für „chain length factor“ oder Kettenlängenfaktor) und Acyl-Carrier-Protein (ACP) bezeichnet (Carreras und Khosla, 1998; Staunton und Weissman, 2001).

Die Syntheseleistung der Typ-II-PKS beginnt üblicherweise damit, daß ein am ACP gebundener Malonylrest decarboxyliert und die Acetyl-Gruppe als Starter-Einheit ins aktive Zentrum der KS_α übertragen wird. Das ACP wird erneut mit einem Malonylrest beladen. Es folgt die Kondensationsreaktion durch die KS_α , die zur Bildung von Acetoacetyl-ACP führt. Der entstandene Ketoester wird vom ACP auf KS_α übertragen und steht als Substrat für weitere Kondensationszyklen bereit (Zhou *et al.*, 1999).

Die „minimale PKS“ ist ausreichend, um eine Polyketidkette mit bestimmter Länge zu synthetisieren. Es gibt Hinweise, daß dabei nicht KS_β allein als „Kontrollinstanz“ für die Kettenlänge fungiert, sondern zusammen mit KS_α Einfluß auf die Anzahl der Kondensationsschritte hat (Shen *et al.*, 1995).

Damit aus der Polyketidkette ein bestimmtes cyclisches Polyketid entsteht, bedarf es weiterer enzymatischer Reaktionen, wie z.B. der spezifischen Faltung und der Aktivität von Cyclasen, damit der erste Ringschluß korrekt ablaufen kann.

Der dritte bei Bakterien festgestellte Polyketidsynthese-Typ ist mit den pflanzlichen Chalkonsynthasen verwandt. Bei den bakteriellen Typ-III-Polyketidsynthasen liegt das Enzym als Homodimer vor. Diese kondensierenden Enzyme arbeiten iterativ. Im Unterschied zu Typ-I- und Typ-II-PKS arbeiten die Typ-III-PKS unabhängig von einem ACP. Diese PKS sind in der Lage, direkt mit den Acyl-CoA-Substraten zu interagieren. (Funa, 1999; Moore *et al.*, 2002).

1.4 Polyketomycin

Das aromatische Polyketid-Antibiotikum Polyketomycin wurde sowohl aus dem *Streptomyces*-Stamm MK227-AF1 (Momose *et al.*, 1998a) als auch aus *Streptomyces diastatochromogenes* Tü6028 isoliert (Paululat *et al.*, 1999). Momose *et al.* (1998b) führten neben der Strukturaufklärung des Polyketomycins Untersuchungen zur Bioaktivität des Polyketomycins durch.

Polyketomycin bildet ein orangefarbenes Pulver (MW 864), das im UV-Spektrum Absorptionsmaxima bei 208 nm, 243 nm, 282 nm und 445 nm aufweist. Die Substanz wirkt bakteriostatisch gegen Gram-positive Keime, darunter auch der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MHK < 0,2 µg/ml). Zudem weist die Substanz cytotoxische Aktivität

auf. Eine Wirkung gegen Gram-negative Bakterien wurde nicht festgestellt. Hinweise auf den möglichen Wirkmechanismus des Polyketomycins gibt es derzeit noch nicht.

Das Polyketomycin setzt sich aus vier Strukturelementen zusammen (s. Abb. 1.1): einem tetracyclischen Polyketid (Polyketomycinon), zwei Desoxyzuckern (β -D-Amicetose und α -L-Axenose) sowie einer 3,6-Dimethylsalicylsäure.

Bei der L-Axenose handelt es sich um eine 2,6-Didesoxyypyranose, die in antibakteriellen Sekundärmetaboliten relativ selten vorkommt (z.B. in Axenomycin; Della Bruna *et al.*, 1973). Bei der D-Amicetose handelt es sich um eine 2,3,6-Tridesoxyypyranose, die etwas häufiger in Antibiotikastrukturen auftritt (z.B. in Amicetin; DeBoer *et al.*, 1953). Erst kürzlich konnten Pérez *et al.* (2005) durch Kombination verschiedener Zuckerbiosynthesegene, die mehreren Antibiotika-Biosynthesegenclustern entstammten, *in vivo* die Nukleotid-aktivierten Zucker D- und L-Amicetose synthetisieren.

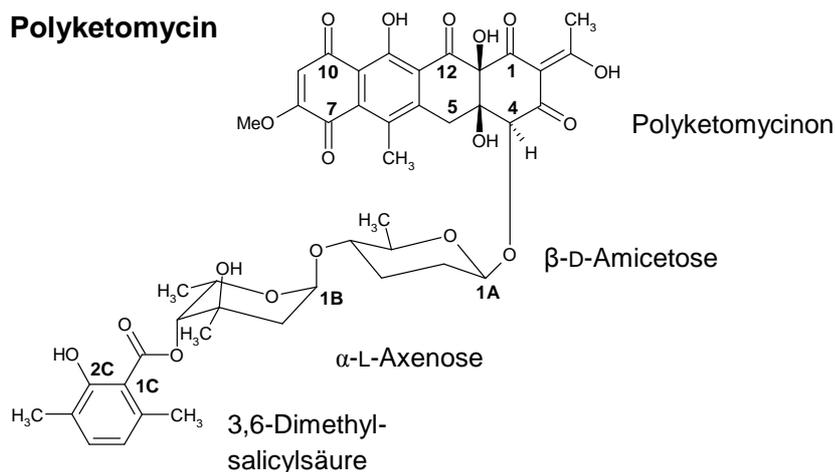


Abb. 1.1: Struktur des Antibiotikums Polyketomycin aus *Streptomyces* sp. MK227-AF1 bzw. *S. diastatochromogenes* Tü6028. Polyketomycin setzt sich aus Polyketomycinon, den Desoxyzuckern β -D-Amicetose und α -L-Axenose sowie einem 3,6-Dimethylsalicylsäurerest zusammen.

Paululat *et al.* (1999) untersuchten an dem Polyketomycin-Produzenten *S. diastatochromogenes* Tü6028 durch Fütterung radioaktiv markierter Vorläufer die Herkunft der Kohlenstoffatome im Polyketomycin. Demnach sind am Aufbau des Polyketomycinons zehn Acetatmoleküle sowie zwei Methylgruppen beteiligt. Die beiden Zucker werden ausgehend von Glucose synthetisiert, wobei die α -L-Axenose noch eine zusätzliche Methylgruppe trägt. Am Aufbau des Dimethylsalicylsäurerestes sind vier Acetatmoleküle sowie eine Methylgruppe beteiligt. Paululat *et al.* (1999) gehen aufgrund ihrer Untersuchungen davon aus, daß zwei Polyketidsynthasen vom Typ II nötig sind, um das Dekaketid des Aglykons Polyketomycinon und das Tetraketid der Salicylsäure zu synthetisieren.

Polyketomycin enthält mit dem Polyketomycinon einen tetracyclischen Strukturteil, der an Tetracyclin- und Anthracyclin-Antibiotika erinnert. Bislang sind jedoch kaum Strukturen bekannt, die der Gesamtstruktur des Polyketomycins ähneln. Die wenigen bekannten Naturstoffe dieser Strukturklasse wurden ebenfalls aus Streptomyces-Kulturen isoliert: Die strukturell mit Polyketomycin verwandten Verbindungen (s. Abb. 1.2) sind das antitumorwirksame Dutomycin aus *Streptomyces* sp. 1725 (Xuan *et al.*, 1992), der DNA-Methyltransferase-Inhibitor DMI-2 (ein Tautomer des Dutomycins) aus dem *Streptomyces*-Stamm Nr. 560 (Nagao *et al.*, 1996) und die aus *Streptomyces tendae* HKI-179 isolierten Cervimycine mit antibakterieller und zytotoxischer Wirkung (Herold, 2005).

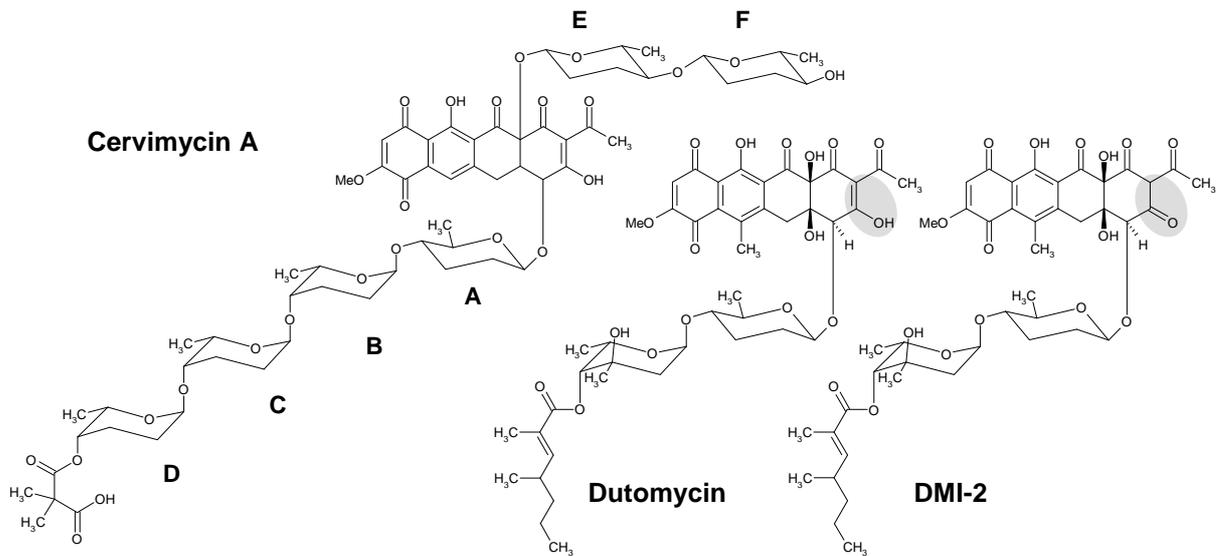


Abb. 1.2: Strukturverwandte Moleküle des Polyketomycins. Cervimycin A aus *S. tendae* HKI-179 mit den Hexosen β -D-Amicitose (A, E und F) und α -L-Rhodosinose (B, C und D). Dutomycin aus *S.* sp. 1725 und das zu Dutomycin tautomere DMI-2 aus dem *Streptomyces*-Stamm Nr. 560 jeweils mit einem Disaccharid aus D-Amicitose und L-Axenose und einer 2,4-Dimethyl-2-heptensäure.

Kennzeichnend für das Polyketomycin und seine strukturell verwandten Moleküle ist das chinoide System des D-Rings am Naphthacengrundgerüst. Eine weitere Gemeinsamkeit ist das Auftreten einer Hydroxylgruppe am C-11 und einer Ketogruppe am C-12 in umgekehrter Position zu den klassischen Tetracyclinen (s. Abb. 1.3). Eine solche Chinonteilstruktur tritt sonst nur noch in Naturstoffen mit größeren Ringsystemen auf, wie z.B. in dem aus *Streptomyces* sp. SF2446 gewonnenen Benz[a]naphthacenderivat SF2446 A1 (s. Abb. 1.3; Gomi *et al.*, 1988).

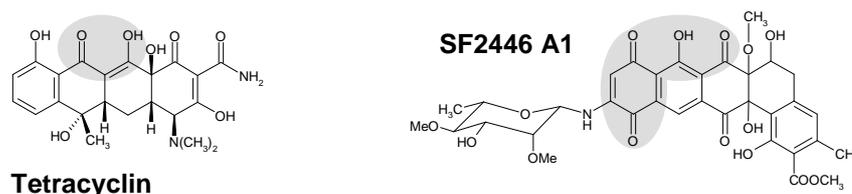


Abb. 1.3: Struktur von Tetracyclin aus *S. aureofaciens* und SF2446 A1 aus *S.* sp. SF2446. Die Struktur des Tetracyclins weist in Positionsumkehr zum Polyketomycin am C-11 eine Ketogruppe und am C-12 eine Hydroxylgruppe auf. Die Verbindung SF2446 A1 ist ein Beispiel für ein Molekül mit chinoidem System im pentacyclischen Grundgerüst.

Erläuterungen zu der Verbindung DMI-2 und den Cervimycinen

DMI-2 (s. Abb. 1.2) wurde aus *S. sp.* Nr. 560 isoliert und ist ein orangefarbiger Feststoff mit einer Molekülmasse von 854 Da. Die Substanz ist ein Tautomer des Antitumor-Antibiotikums Dutomycin, das aus *Streptomyces sp.* 1725 isoliert wurde (s. oben). Das tetracyclische Grundgerüst, das am C4-Atom mit einem Disaccharid aus D-Amicetose und L-Axenose verknüpft ist, entspricht dem Polyketomycinon. In Inhibierungs-Studien zeigte DMI-2 Wirkung als DNA-Methyltransferase-Inhibitor.

Ebenso wurden einige andere getestete Enzyme, darunter die Endonukleasen *ScaI*, *PstI*, *EcoRI* und DNase II durch DMI-2 gehemmt (Nagao *et al.*, 1996). Die Stärke der Inhibierung war abhängig von pH-Wert und Temperatur des Reaktionsansatzes. DMI-2 konnte die N⁶-Methyladenin-DNA-Methyltransferase (*M.EcoRI*) in Gegenwart von Plasmid-DNA (pUC19) in kompetitiver Weise inhibieren. Die Inhibierung bei Zusatz des Methylgruppendonors SAM war nicht kompetitiv. Aus diesen Ergebnissen folgerten Nagao und Kollegen (1996), daß DMI-2 die *M.EcoRI*-Bindestelle von pUC19 blockiert und so die Bindung der Methyltransferase verhindert.

Die Strukturaufklärung der Cervimycine sowie Untersuchungen zur Biosynthese und Wirkweise fanden erst vor kurzem statt (Herold *et al.*, 2004; Herold, 2005; Herold *et al.*, 2005). Neben den Hauptkomponenten Cervimycin A und C wurden auch natürliche und durch Hydrolyse oder O-Methylierung erzeugte Derivate bei den Untersuchungen zur Bioaktivität berücksichtigt. Besonders herausragend sind die antibakteriellen Eigenschaften einiger Verbindungen.

Hinsichtlich antiviraler und zytotoxischer Aktivität wurden keine oder nur schwache Effekte beobachtet. Um zu prüfen, ob Cervimycine ähnlich den Tetracyclinen an Ribosomen wirken oder wie Anthracycline zur DNA-Interkalierung fähig sind, wurden entsprechende Tests durchgeführt. Die Tests verliefen negativ, was darauf schließen läßt, daß die Bioaktivität der getesteten Cervimycine auf einem anderen Wirkprinzip beruht.

1.5 Avilamycine

Bereits 1959 wurde die Produktion des Oligosaccharid-Antibiotikums Avilamycin durch *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 nachgewiesen (Buzzetti *et al.*, 1968). Die Avilamycine zählen zur Klasse der Orthosomycine, da sie als Strukturmerkmal zwei ungewöhnliche Orthoester-Bindungen aufweisen. Weitere Antibiotika aus der Klasse der Orthosomycine sind die Curamycine (Galmarini *et al.*, 1961), die Everninomycine (Weinstein *et al.*, 1965) und die Flambamycine (Ninet *et al.*, 1974).

Das Hauptprodukt Avilamycin A (s. Abb. 1.4) besteht aus einem Dichlorisoeberninsäurerest (Ring A), der esterglykosidisch mit einer Heptasaccharidkette verknüpft ist. Die Saccharidkette des Avilamycins A enthält D-Olivose (Ringe B und C), 2-Desoxy-D-evalose (Ring D), 4-O-Methyl-D-fucose (Ring E), 2,6-Di-O-Methyl-D-mannose (Ring F), L-Lyxose (Ring G) und Eurekanat (Ring H). Zwischen den Ringen C und D sowie G und H kommt es zur Ausbildung der charakteristischen Orthoester-Bindungen.

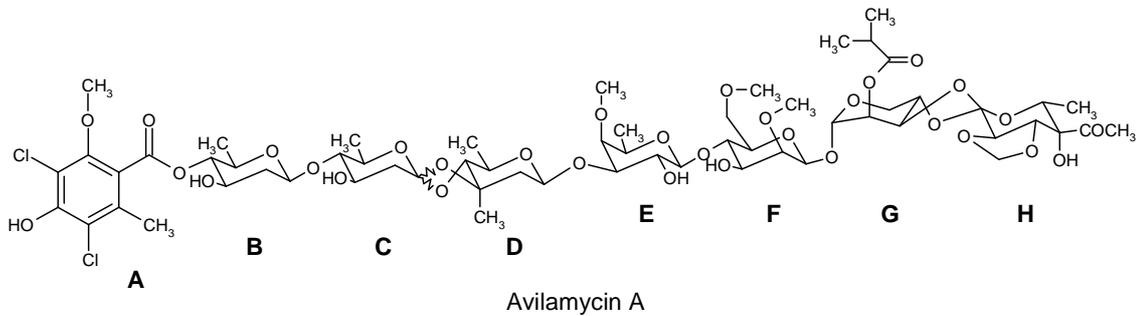


Abb. 1.4: Struktur von Avilamycin A aus *S. viridochromogenes* Tü57. Die Bestandteile des Moleküls sind mit den Buchstaben A-H gekennzeichnet. A: Dichlorisoeberninsäure, B und C: D-Olivose, D: 2-Desoxy-D-evalose, E: 4-O-Methyl-D-fucose, F: 2,6-Di-O-Methyl-D-mannose, G: L-Lyxose, H: Eurekanat

Das Avilamycin-Biosynthesegencluster wurde bereits sequenziert (Gaisser *et al.*, 1997a) und die erhaltenen Daten wurden zur Erstellung eines hypothetischen Avilamycin-Biosyntheseweges genutzt (Weitnauer *et al.*, 2001b).

Neben Avilamycin A wurden weitere Avilamycine identifiziert, deren Strukturen sich nur wenig voneinander unterscheiden (Buzzetti *et al.*, 1968; Mertz *et al.*, 1986). Durch Inaktivierung von Methyltransferasegenen aus dem Avilamycin-Biosynthesegencluster wurden Mutanten geschaffen, die weitere Avilamycin-Derivate produzieren. Die sogenannten Gavibamycine sind im Bereich der Heptasaccharidkette in geringerem Maße methyliert und verfügen gegenüber den Avilamycinen über eine bessere Wasserlöslichkeit (Weitnauer *et al.*, 2004).

Avilamycin A wirkt ebenso wie andere Orthosomycine gegen multiresistente Gram-positive Keime darunter beispielsweise *Staphylococcus aureus*. Zur Wirkweise ist bekannt, daß Avilamycin A die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50S-Untereinheit des Ribosoms hemmt (McNicholas *et al.*, 2000). Untersuchungen an den Resistenz-vermittelnden rRNA-Methyltransferasen AviRa und AviRb zeigten, daß sich der Produzent *S. viridochromogenes* Tü57 durch Methylierung zweier Basen der 23S-rRNA vor der Avilamycin-Wirkung schützt (Treede *et al.*, 2003). Jüngere Röntgenstrukturanalysen mit kristallisierten Ribosomen, die in eine Avilamycin-Lösung gebracht wurden, zeigten, daß das Avilamycin-Molekül eine U-Form annimmt und sich in einem Hohlraum der ribosomalen 23S-Untereinheit anlagert (Hofmann, 2005).

1.6 Biosynthese der Desoxyzucker

Die von Streptomyceten gebildeten Naturstoffe sind, wie die Beispiele in Abb. 1.5 verdeutlichen, oftmals glykosyliert.

Die gezeigten Antibiotika Erythromycin A, Daunomycin, Aclacinomycin A und Amphotericin B enthalten alle als Molekülbestandteil eine oder mehrere Desoxyhexosen, darunter auch Aminozucker.

Für die biologische Aktivität antibiotischer Verbindungen sind diese Zuckermoleküle oftmals sehr bedeutend (Weymouth-Wilson, 1997). Wenn die Zucker fehlen, ändern sich die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der Verbindung. Es kommt infolgedessen oftmals zum Verlust der Aktivität.

Zum Verständnis der Biosyntheseabläufe der natürlich vorkommenden Desoxyzucker haben entsprechende molekularbiologische und biochemische Untersuchungen in den letzten Jahren beigetragen. Aufgrund der festgestellten Gemeinsamkeiten hinsichtlich der vorkommenden Biosyntheseenzyme sind Rückschlüsse auf die Reaktionsabfolge möglich (Liu und Thorson, 1994; Kirschning *et al.*, 1997; Trefzer *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000).

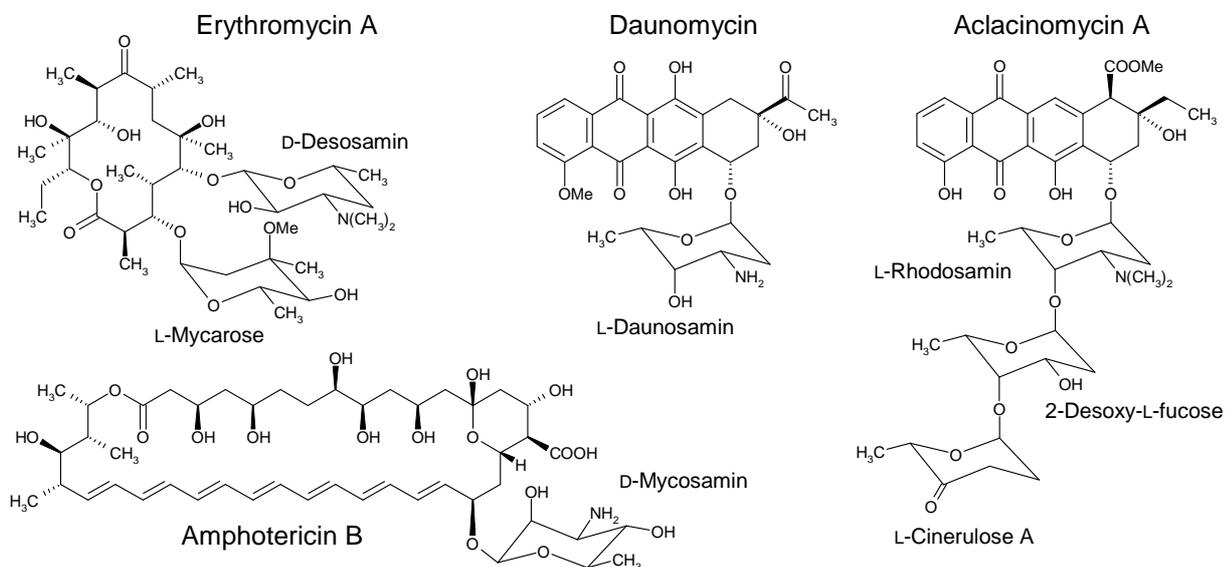


Abb. 1.5: Glykosylierte Antibiotika, bei denen nachweislich der Zuckeranteil bedeutend für die Bioaktivität ist: Erythromycin A aus *Saccharopolyspora erythraea*, Daunomycin aus *S. peucetius*, Aclacinomycin A aus *S. galliaeus* und Amphotericin B aus *S. nodosus*.

Demnach beginnt die Biosynthese der dNDP-aktivierten Desoxyhexosen mit Glucose-1-phosphat, das aus dem Primärstoffwechsel stammt. Ausgehend von Glucose-1-phosphat erfolgt die Aktivierung zu dNDP-D-Glucose durch eine dNDP-Glucose-Synthase. Eine dNDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase katalysiert die Umwandlung der dNDP-D-Glucose zu dNDP-D-4-keto-6-desoxyglucose.

Im Anschluß an diesen Schritt kann sich der Biosyntheseweg bereits in D- und L-Desoxyhexosen teilen. Eine 3,5-Epimerase kann an dieser Stelle die dNDP-D-4-keto-6-desoxyglucose in den entsprechenden L-Zucker überführen. Ohne die katalytische Aktivität der Epimerase gehören die entstehenden Zucker zu den D-Desoxyhexosen.

Sowohl D-, als auch L-Zucker erfahren weitere Enzym-katalysierte Modifikationen, wie z.B. Reduktion, Dehydratisierung, Methylierung oder Isomerisierung. Auf diese Weise wird abhängig von den Zucker-modifizierenden Enzymen, über die der jeweilige Antibiotikaproduzent verfügt, eine Vielfalt an unterschiedlichen aktivierten Desoxyhexosen gebildet. Bislang wurde von mehr als 70 verschiedenen 6-Desoxyhexosen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen berichtet (Kirschning *et al.*, 1997; Trefzer *et al.*, 1999).

Exemplarisch ist in Abb. 1.6 der Syntheseweg der dNDP-D-Olivose und dNDP-2-Desoxy-D-evalose in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 wiedergegeben. Die Übertragung der aktivierten Zuckermoleküle auf das entsprechende Substrat erfolgt durch Glykosyltransferasen, die im nächsten Abschnitt näher beschrieben werden.

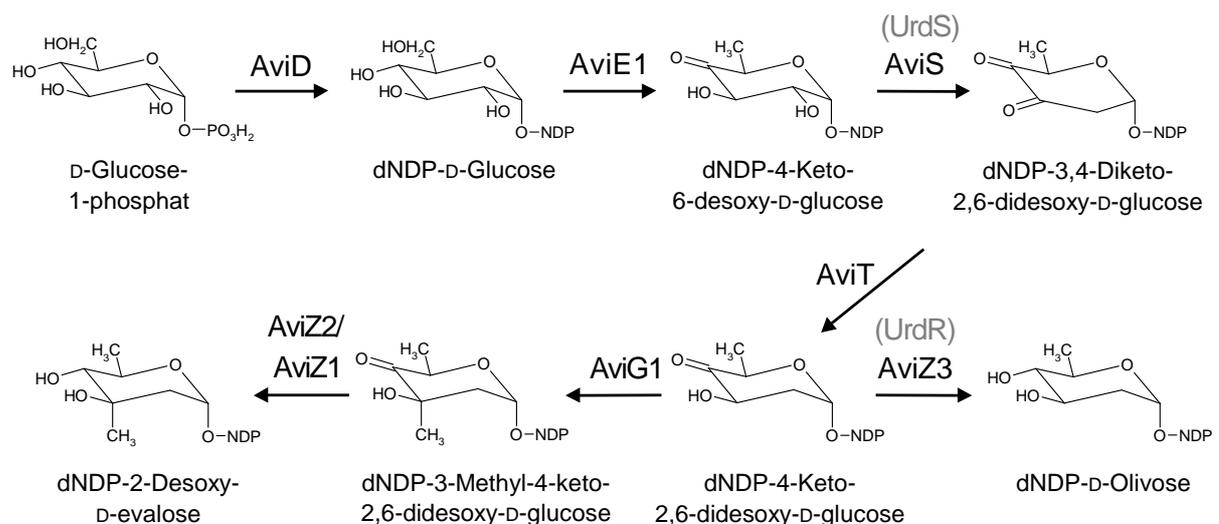


Abb. 1.6: Biosyntheseweg der dNDP-D-Olivose und dNDP-2-Desoxy-D-evalose in *S. viridochromogenes* Tü57 (nach Weitnauer *et al.*, 2001b). Die Enzyme UrdS bzw. UrdR aus *S. fradiae* Tü2717 sind als Homologe von AviS bzw. AviZ3 ebenfalls dargestellt (Hoffmeister *et al.*, 2000). **AviD** = dNDP-Glucose-Synthase; **AviE1** = dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase; **AviG1** = Methyltransferase; **AviS** bzw. **UrdS** = 2,3-Dehydratase; **AviT** = 3-Ketoreduktase; **AviZ2** oder **AviZ1** = 4-Ketoreduktase; **AviZ3** bzw. **UrdR** = 4-Ketoreduktase

1.6.1 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen sind Enzyme, die Zucker auf ein Akzeptor-/Zielmolekül übertragen. Der Zucker bindet zumeist in Nukleotid-aktivierter Form an die Glykosyltransferase, wobei UDP und TDP am häufigsten auftreten. Bei der Knüpfung der überwiegend O-glykosidischen Bindung wird das Nukleotid abgespalten.

Die Übertragung von Zuckergruppen spielt nicht nur bei antibiotischen Sekundärstoffen eine Rolle, sondern es werden die unterschiedlichsten Substrate glykosyliert, wie z.B. Nukleinsäuren, Proteine, Lipide oder Oligosaccharide. Auf diese Weise sind Glykosyltransferasen an der Synthese der Zellwandpolymere Cellulose, Murein und Chitin oder der Speicherstoffe Stärke und Glykogen beteiligt (Hu und Walker, 2002). Auch die für die Zell-Zell-Kommunikation notwendigen und als Rezeptoren dienenden Zelloberflächen-Oligosaccharide werden durch Glykosyltransferasen gebildet (Gagneux und Varki, 1999; Hu und Walker, 2002).

Neben der Syntheseleistung für den Stoffwechsel haben Glykosyltransferasen auch Einfluß auf die Regulation zahlreicher eukaryotischer Gene (Zachara und Hart, 2002), indem sie beispielsweise Transkriptionsfaktoren glykosylieren (Jackson und Tjian, 1988).

Entsprechend den unterschiedlichen Substrat- und Akzeptormolekülen gibt es eine Vielzahl von Glykosyltransferasen, die zumeist sehr spezifische Aktivität aufweisen. Die Ausprägung der Spezifität ist unterschiedlich stark und hängt auch von der biologischen Funktion einer Glykosyltransferase ab. Während einige bekannte Glykosyltransferasen aus Antibiotikabiosynthesewegen wenig Flexibilität hinsichtlich der akzeptierten Zucker und Akzeptormoleküle zeigen, gibt es auch Glykosyltransferasen, die eine Vielfalt an Substraten akzeptieren. Als Beispiel seien einige im endoplasmatischen Reticulum der menschlichen Leber vorkommenden UDP-Glucuronosyltransferasen genannt, die ein breites Spektrum lipophiler Verbindungen wie z.B. Steroide oder ungesättigte Fettsäuren glucuronosidieren, damit diese in wasserlöslicher Form aus dem Körper ausgeschieden werden können (Radominska-Pandya *et al.*, 1999).

Hinsichtlich der katalysierten Reaktion und Sequenzhomologie wurden Glykosyltransferasen innerhalb des CAZy-Systems (CAZy = „carbohydrate-active enzymes“; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) klassifiziert und in bisher 84 Familien eingeteilt (Campbell *et al.*, 1997; Coutinho *et al.*, 2003).

Die Strukturen einiger Glykosyltransferasen wurden bereits aufgeklärt. Die Aminosäuresequenzen der Glykosyltransferasen weisen große Unterschiede auf, die nicht unbedingt auf einen hohen Verwandtschaftsgrad schließen lassen (Hu und Walker, 2002). Trotzdem zeigen sich große Ähnlichkeiten hinsichtlich der dreidimensionalen Proteinstruktur. So weisen z.B. die aus *E. coli* stammende N-Acetylglucosaminyltransferase MurG und die β -Glucosyltransferase BGT aus dem Phagen T4 ähnliche Strukturen auf, obwohl die Sequenzidentität nur 10 % beträgt (Vrieling *et al.*, 1994; Moréra *et al.*, 1999; Ha *et al.*, 2000; Mulichak *et al.*, 2001; Hu und Walker, 2002).

Die Glykosyltransferasen wurden aufgrund der zunächst bekannten Kristallstrukturen in nur zwei Strukturfamilien (GT-A und GT-B) mit identischer Topologie und hoher Strukturähnlichkeit eingeteilt (Ünligil und Rini, 2000; Bourne und Henrissat, 2001). Mittlerweile lassen Strukturvorhersagen auf die Existenz zweier weiterer Strukturfamilien (GT-C und GT-D) schließen (Liu und Mushegian, 2003; Kikuchi *et al.*, 2003).

1.7 Zielsetzung der vorgelegten Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit waren Untersuchungen an Biosynthesegenen aus den Clustern verschiedener glykosidierter Naturstoffe aus Streptomycceten.

Ein Schwerpunkt lag bei der Sequenzierung und Analyse des Polyketomycin-Biosynthesegenclusters. Für Polyketomycin oder einen strukturverwandten Naturstoff wurden bisher noch keine vollständigen Biosynthesegencluster veröffentlicht.

✪ Durch das Screening einer Cosmidbank sollte das Polyketomycin-Cluster detektiert werden. Die Sequenzierung der entsprechenden Cosmide zur Erstellung einer Gesamtsequenz sollte durchgeführt werden. Die erhaltenen Daten sollten zur Annotation der Gene und zur Erstellung eines hypothetischen Biosyntheseweges genutzt werden. Außerdem sollte der Nachweis der Zugehörigkeit der erhaltenen Sequenzdaten zum Polyketomycin-Biosynthesegencluster durch Geninaktivierung erbracht werden. Dazu war es nötig, für den Produzenten *S. diastatochromogenes* Tü6028 eine geeignete Transformations- bzw. Konjugationsmethode zu finden.

✪ Um das Gen für das pflanzliche Protein Sus1 aus *Solanum tuberosum* zur Expression in Streptomycceten einsetzen zu können, sollte die DNA-Sequenz in für Streptomycceten optimierte Codone umgeschrieben und synthetisiert werden. Als Expressionswirt sollte ausgehend vom Avilamycin-Produzenten *S. viridochromogenes* Tü57 eine *aviD*-Mutante hergestellt werden.

✪ Weiterhin sollte die Überexpression unterschiedlicher Desoxyzuckerbiosynthesegene und eines Glykosyltransferasegens in Streptomycceten-Wirtsstämmen durchgeführt werden. Dazu sollten ausgehend von einem Überexpressionsvektor neue Vektoren erstellt werden, die die Möglichkeit bieten, die Zielproteine als Hexahistidin-Fusionsproteine zu exprimieren.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Tab. 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Charakterisierung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F-, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> λ(DE3) [pLysS Cam ^r] ^a	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F-, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> ET12567	F-, <i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm-6 hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>zjj-202::Tn10</i> , <i>recF143</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>xyl-5</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>hisG4</i> , <i>tsx78</i> , <i>mtl-1</i> , <i>glnV44</i>	MacNeil <i>et al.</i> , 1992
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ΔM15, <i>Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> Tü6028	Wildtyp; Polyketomycin-Produzent	Momose <i>et al.</i> , 1998a Paululat <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> Δ <i>pokGT1</i>	<i>pokGT1</i> -Mutante	diese Arbeit
<i>Streptomyces fradiae</i> Tü2717	Wildtyp; Urdamycin A-Produzent	Rohr (1984); Drautz <i>et al.</i> (1986)
<i>Streptomyces fradiae</i> A0	Urdamycin I-, J- und Rabelomycin-Produzent; <i>urdGT1a-</i> , <i>urdGT1b-</i> , <i>urdInt-</i> , <i>urdGT1c-</i> , <i>urdGT2-</i>	Trefzer <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces fradiae</i> RN-435	<i>urdR</i> -Mutante Urdamycin I-, J-, M- und Rabelomycin-Produzent	Hoffmeister <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces fradiae</i> urdSpm	<i>urdS</i> -Mutante keine Urdamycin-Produktion	Domann, 2000
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü57	Wildtyp; Avilamycin-Produzent	Hütter, 1962
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> GW4	<i>aviG4</i> -Mutante, Gavibamycin A-Produzent	Weitnauer <i>et al.</i> , 2001b
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Δ <i>aviD</i>	<i>aviD</i> -Mutante	diese Arbeit
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	Avilamycin-sensibler Testkeim	Ghera <i>et al.</i> , 1992 (American Type Culture Collection)

2.2 Vektoren

Tab. 2.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Vektor	Beschreibung	Resistenzgene	Größe (kb)	Herkunft
Litmus28	<i>lacZ'</i> (α -Komplementation), M13-origin, ColE1-origin	<i>bla</i>	2,8	New England Biolabs Evans <i>et al.</i> , 1995
pSK-	<i>lacZ'</i> (α -Komplementation), f1(-)-origin, ColE1-origin (= pBluescript SK (-))	<i>bla</i>	3,0	Stratagene Short <i>et al.</i> , 1988
pET28a(+)	<i>oriR</i> pBR322, f1 ori, <i>lacI</i> , T7-Promotor His-Tag-Codone beiderseits der MCS	<i>kmr</i>	5,4	Novagen
pKC1132	konjugativer Vektor pMB1-Replikon, <i>oriT</i> , <i>lacZα</i>	<i>aac(3)IV</i>	3,5	Bierman <i>et al.</i> , 1992
pKC1218	pMB1-Replikon, SCP2*-Replikon, <i>oriT</i> , <i>lacZα</i>	<i>aac(3)IV</i>	5,8	Bierman <i>et al.</i> , 1992
pMUN2	<i>lacZ'</i> (α -Komplementation), f1(-)-origin, ColE1-origin	<i>bla</i>	3,0	Trefzer <i>et al.</i> , 2001
pOJ436	Cosmid-Vektor; (<i>cos</i>) ^{3λ} , <i>repSCP2*</i>	<i>aac(3)IV</i>	9,6	Bierman <i>et al.</i> , 1992
pRSETb	<i>E. coli</i> -Überexpressionsvektor, T7-Promotor, f1(-)-origin, ColE1-origin	<i>bla</i>	2,9	Invitrogen Schoepfer, 1993
pSET152	integrativer Vektor pMB1-Replikon, <i>int</i> ϕ C31, <i>oriT</i> , <i>lacZα</i>	<i>aac(3)IV</i>	5,5	Bierman <i>et al.</i> , 1992
pSET-1cerm	pSET152 mit <i>ermE</i> up-Promotor; enthält <i>urdGT1c</i>	<i>aac(3)IV</i>	7,0	Hoffmeister <i>et al.</i> , 2001
pSP1	pT7/T3- α 19; als Inaktivierungsvektor in <i>S. vir.</i> Tü57 einsetzbar	<i>bla</i> , <i>ermE*</i>	4,5	Pelzer <i>et al.</i> , 1997
pUC19	pMB1-Replikon, <i>oriT</i> , <i>lacZα</i>	<i>bla</i>	2,7	New England Biolabs, Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pUCPU21	pUC19-Derivat; <i>NcoI</i> - ersetzt durch <i>NdeI</i> - Schnittstelle; <i>NdeI</i> aus Vektor entfernt	<i>bla</i>	2,7	P. Hammes und Udo F. Wehmeier
pUWL201	Streptomyceten-Expressionsvektor; konstitutiver <i>ermE</i> up-Promotor, pMB1- Replikon, pJ101-Replikon	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	7,0	Udo F. Wehmeier, Uni Wuppertal; Doumith <i>et al.</i> , 2000
pUZ8002	RK2-Derivat	<i>kmr</i> , <i>tcr</i>		Flett <i>et al.</i> , 1997

2.3 Plasmide und Cosmide

Tab. 2.3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sowie Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden.

Plasmid	Beschreibung	Resistenzgene	Größe (kb)	Herkunft
1K3P100	5,1 kb- <i>PstI</i> -Fragment aus Cosmid 1K3 aus <i>S. antibioticus</i> Tü6040 in pSK-; enthält <i>simB7</i>	<i>bla</i>	8,1	Axel Trefzer
Cos10 (\approx pURD10)	Cosmid aus <i>S. fradiae</i> Tü2717 in pKC505	<i>aac(3)IV</i>		Schneider, 1995 Richardson <i>et al.</i> , 1987 (pKC505)
P2S11	ca. 7,7 kb- <i>SacI</i> -Fragment aus <i>S. viridochromogenes</i> Tü57 in pSK-	<i>bla</i>	10,7	Gabriele Weitnauer
pAF1/ <i>aviS</i>	basiert auf pUWL201; enthält <i>aviS</i> zur Expression mit C-terminalem His-Tag	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	8,0	eigenes Konstrukt
pAF1/ <i>aviT</i>	basiert auf pUWL201; enthält <i>aviT</i> zur Expression mit C-terminalem His-Tag	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	7,6	eigenes Konstrukt

Plasmid	Beschreibung	Resistenz-gene	Größe (kb)	Herkunft
pAF1/ <i>simB7</i>	basiert auf pUWL201; enthält <i>simB7</i> zur Expression mit C-terminalem His-Tag	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	8,1	eigenes Konstrukt
pAF1/ <i>urdR</i>	basiert auf pUWL201; enthält <i>urdR</i> zur Expression mit C-terminalem His-Tag	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	7,35	eigenes Konstrukt
pAF2/ <i>urdS</i>	basiert auf pUWL201; enthält <i>urdS</i> zur Expression mit N-terminalem His-Tag	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	8,0	eigenes Konstrukt
pAF3/ <i>urdS</i>	basiert auf pUWL201; enthält <i>urdS</i> zur Expression mit N-terminalem His-Tag und Thrombin-Erkennungssequenz; Entfernung des His-Tags möglich	<i>bla</i> , <i>tsr</i>	8,1	eigenes Konstrukt
pBSK-4E5	ca. 4,5 kb- <i>EcoRI</i> -Fragment aus <i>S. viridochromogenes</i> Tü57	<i>bla</i>	7,5	Gabriele Weitnauer
pSET152/ <i>aviD</i>	<i>aviD</i> in pSET152	<i>aac(3)IV</i>	10,8	eigenes Konstrukt
pSETerm	basiert auf pSET-1cerm (<i>urdGT1c</i> wurde ausgeschnitten und das Plasmid religiert)	<i>aac(3)IV</i>	5,9	eigenes Konstrukt
pSETerm/ <i>aviD</i>	<i>aviD</i> in pSET-1cerm (<i>urdGT1c</i> wurde zuvor durch <i>NdeI</i> / <i>XbaI</i> -Restriktion entfernt)	<i>aac(3)IV</i>	7,1	eigenes Konstrukt
pSETerm/ <i>susy</i>	<i>sus1_Soltu</i> in pSET-1cerm (<i>urdGT1c</i> wurde zuvor durch <i>NdeI</i> / <i>BglII</i> -Restriktion entfernt)	<i>aac(3)IV</i>	8,3	eigenes Konstrukt
pSK-/ <i>urdR</i>	enthält 2,3 kb- <i>PstI</i> -Fragment (Fragment C) aus <i>S. fradiae</i> Tü2717	<i>bla</i>	5,3	Hoffmeister <i>et al.</i> , 2000
pSP1/ <i>aviD-S</i>	<i>aviD</i> mit Deletion in pSP1	<i>bla</i>	7,1	eigenes Konstrukt
pTSSuc	<i>sus1_Soltu</i> über <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in pET28a (Novagen) kloniert	<i>kan</i>	7,7	Thomas Schumacher
pUC19/ <i>aviD</i>	Klonierungsplasmid mit <i>aviD</i>	<i>bla</i>	5,5	eigenes Konstrukt
pUC19/ <i>aviD-S</i>	<i>SacII</i> -Deletion (291 bp) in <i>aviD</i>	<i>bla</i>	5,2	eigenes Konstrukt

Tab. 2.4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Cosmide. Die Cosmide enthalten genomische DNA des Stammes *S. diastatochromogenes* Tü6028 und wurden unter Verwendung des Vektors pOJ436 erstellt. Die durch Fettdruck hervorgehobenen Cosmide wurden für die Sequenzierung verwendet. AC = Anschlußcosmid

Cosmid	Nr.	Beschreibung	Größe (kb)	Resistenz-gene	Herkunft
CB30-6D20	--	„mittleres“ Cosmid; hybridisiert mit 4,6-Dehydratase- und PKS-II-Sonde	~47		
CB30-1J21	1	AC links; hybridisiert mit 30-6D20-L-Sonde			
CB30-4E08	2	AC links; hybridisiert mit 30-6D20-L-Sonde	~35		
CB30-5P07	3	AC links; hybridisiert mit 30-6D20-L-, PKS-II- und 4,6-Dehydratase-Sonde			
CB30-6I07	4	AC links; hybridisiert mit 30-6D20-L- und PKS-II-Sonde		<i>aac(3)IV</i>	Combinature Biopharm AG
CB30-6M07	5	AC links; hybridisiert mit 30-6D20-L-Sonde			
CB30-2A21	6	AC rechts; hybridisiert mit 30-6D20-R-, PKS-II-30- und 4,6-Dehydratase-Sonde	~41		
CB30-5I08	7	AC rechts; hybridisiert mit 30-6D20-R-, PKS-II-30- und 4,6-Dehydratase-Sonde			
CB30-6K13	8	AC rechts; hybridisiert mit 30-6D20-R-, PKS-II-30- und 4,6-Dehydratase-Sonde			

2.4 Oligonukleotide

Tab. 2.5: Die nachfolgend aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Operon Biotechnologies GmbH (Köln) bezogen. Einige Primer enthalten Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, die in der Sequenz kursiv und fett dargestellt sind.

Bezeichnung	Beschreibung	Sequenz 5'→3'	Länge in nt
4,6-DH-for	unspezif. Primerpaar zur	CSGGSGSSGCSGGSTTCATSGG	22
4,6-DH-rev	Amplifiz. einer 4,6-DH-Sonde	GGGWRCTGGYRSGGSCCGTAGTTG	24
Ap1	Primerpaar, das am Apramycin-Resistenzgen	AGCTTCTCAACCTTGGGG	18
Ap2	bindet (z.B. in pSET152)	TCCGCCAAGGCAAAGCGC	18
aviD-BS	Sequenzier-Primer	GCACCACCGTGTCCGGGC	18
aviD-F1	Primer mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle	GCGCGGA AAGCTT TCTGGACCCGGGC	24
aviD-R1	Primer mit <i>BamHI</i> -Schnittstelle	GCGTC GGATCC AGATTGGTCAGCTCG	26
aviD-F2	spezif. Primer zur Prüfung	GGGAAAACCTGAAAAACACGC	21
aviD-R2	möglicher <i>aviD</i> -Mutanten	TCTCGCATGTTCCCGTAAGC	20
aviD_ <i>NdeI</i>	Primer mit <i>NdeI</i> -Schnittstelle	AAACGACCT CATATG ACGG	19
aviD_ <i>XbaI</i>	Primer mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle	CTGCCG TCTAGA ATGTTCC	19
aviS-F2	Primer mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle	GCCGGCGA AAGCTT TTCTCGAACAGG	25
aviS-R2	Primer mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle	CGTTCTTCATG TCTAGAC CAACTCTGC	27
aviT-F2	Primer mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle	GCCCGA AAGCTT GCTCGCCTGCCTG	24
aviT-R2	Primer mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle	GCGCTCG TCTAGAT CGGCCATCTGC	25
ET28a-F1	Primer mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle, PCR-Produkt	TCCCC GAATTC AATAATTTTGTTTAAC	27
ET28a-R2	zur Herstellung des Vektors pAF3/ <i>urds</i>	AGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGG	26
L_213_for	Primerpaar für pSK/213,	GGAGATGGTGGACTACATGG	20
L_213_rev	PCR-Produkt für Sequenzierung	TCCGTGAACGGGCTGATGC	19
L_22_for	Primerpaar für pSK/22,	AAGGACGGTGTGGGCGCG	18
L_22_rev	PCR-Produkt für Sequenzierung	AGCGAGGAGTCCGCAACC	19
L_X3_for	Primerpaar für Cosmid 30-6D20,	TACGACCTCGACTTCGCC	19
L_X3_rev	PCR-Produkt für Sequenzierung	TTCATCGAACCTCCAGGTCC	20
P-aviD-for	Primer mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle zur Amplifizierung des	GGCCAA AAGCTT TCTGGAAGCTGC	23
P-aviD-rev	<i>aviD</i> -Promotors und RBS Primer mit <i>NdeI</i> -Schnittstelle	CGCCTT CATATG CCACACCTTGC	23
PDHF	Primer mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle	GGTCCGA AAGCTT TCACCCCATCACAG	26
PDHR	Primer mit <i>SpeI</i> - und <i>XbaI</i> -Schnittstelle und 6 His-Codone	TAGTAG ACTAGTTCAGTGATGGTGGTGATGGTGTC TAGAGATACCGGACGGCGGAG	52
PKSII-for	unspezif. Primerpaar zur	TSGCSTGCTTCGAYGCSATC	20
PKSII-rev	Amplifiz. einer PKSII-Sonde	TGGAANCCGCCGAABCCGCT	20
pokGT-for	Primerpaar zur Prüfung auf	ACGCGATCGCCGGACTGC	18
pokGT-rev	<i>Single-/Doppel-Crossing-over</i> von <i>pokGT1</i>	GCACCGAACTGCTGCTGAA	19

Bezeichnung	Beschreibung	Sequenz 5'→3'	Länge in nt
pokGT2-for	Primerpaar zur Prüfung auf	AACGGTAAGGAGGTTTCAGG	19
pokGT2-rev	<i>Single-/Doppel-Crossing-over</i> von <i>pokGT2</i>	AAGAGTCCGCACTCATAGC	19
simB7-F1	Primer mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle	AAGCTT CACTGAATGGGGAG	20
simB7-R1	Primer mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle	TCTAGAG ACCAGCTCGGC	19
urdS-F1	Primer mit <i>EcoRI</i> - und <i>BamHI</i> -Schnittstelle und 6 His-Codone	GCCCG GAATTC GAACACGGGAGCCTTCTGATGCA CCATCACCACCATCAC GGATCC TTTCTGAAAGCC TTCTCG	76
urdS-R1	Primer mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle	CCACC TCTAGACT CATCGGCTGTTCCACCGC	30
urdS3-B	Primerpaar zur Prüfung der	TGACCGGCTGGACCCAGCCCC	21
urdS5-B	<i>urdS</i> -Mutante	GTGAGCCGTCCTCACCGCCC	21

Tab. 2.6: Die nachfolgenden Oligonukleotide wurden als Primer zur PCR-basierten Synthese des Gens *susy_GC* eingesetzt und von Biomern (Ulm) bezogen. Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind kursiv und fett dargestellt sind.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Länge in nt
A1	CTGCAGA ACGTCTCGCGAAGGCCG	25
A2	ATGATCAGGTA CTCCTCGGC TTCCGC	27
AB3	AGGAGTACCTGATCATGCTG CCGCCG	26
AB4	CGAAGTACGGGGTGTCCGGCGGCAGC	26
BC5	ACCCCGTACTTCGAGTTCGAGCACAAG	27
BC6	CCGATCTCCTGGA ACTTGTGCTCGAACT	28
CD7	TTCCAGGAGATCGGCCTCGAGAAGGGC	27
CD8	GGTGTCGCCCCAGCC TTCTCGAGG	25
DE9	GGGCGACACcGCCGAGCGCGT CCTCG	26
DE10	GCATGCAGACCA TTTCGAGGACGCGC	26
EF11	AATGGTCTGCATGCTGCTG GACCTGC	26
EF12	GTCCGGCGCCTCCAGCAGGTCCAGCA	26
FG13	GGCGCCG ACTCGTGCACGCTGGAGA	26
FG14	GCGGCCAGGA ACTTCTCCAGCGTGC	26
GH15	CCTGGGCGCATCCCGATGGTCTT	24
GH16	GGATGACGACGTTGAAGACCATCGGGAT	28
HI17	CAACGTCGTATCCTGTCCCGCACG	26
HI18	CCTGCGCGAAGTAGCCGTGCGGGGAC	26
IJ19	TACTTCGCGCAGGAGAACGTCCTGGG	26
IJ20	GGTGTCGGGTAGCCAGGACGTTCT	26
JK21	CTACCCGACACCGGCGGCCAGGT CG	26
JK22	GGTCCAGGATGTAGACGACCTGGCCG	26
KL23	TCTACATCCTGGACCAGGTG CCGCC	26
KL24	GCATCTCGCGCTCCAGGGCCGGCACC	26
LM25	AGCGCGAGATGCTGAAGCGCATCAAG	26
LM26	CAGGCCCTGCTCCTTGATGCGCTTCA	26
MN27	GAGCAGGGCCTGGACATCATCCCG	24
MN28	ACGATCAGGATCCGCGGGATGATGTCCA	28
NO29	CGGATCCTGATCGTCACCCGCCTGCT	26
NO30	CCCACCGCGTCCGGCAGCAGGCGGGT	26
OP31	GACGCGGTGGGCACCACCTGCGGCCA	26
OP32	ACCTTCTCGATCCGCTGGCCGCAGGT	26
PQ33	CGGATCGAGAAGGTGTACGGCGCCGA	26
PQ34	GAGGATGTGGGAGTGCTCGGCGCCGT	26
QR35	GCACTCCACATCCTGCGCGTCC	23

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Länge in nt
QR36	CGGTCCGGAACGGGACGCGCAGGATG	26
RS37	CGTTCCGGACCGAGAAGGGCATCGTC	26
RS38	GAGATCCACTTGCGGACGATGCCCTTCT	28
ST39	CGCAAGTGGATCTCGCGGTTGAGGT	26
ST40	CCATGTACGGCCAGACCTCGAACCGC	26
TU41	TGGCCGTACATGGAGACCTTCATCGAGG	28
TU42	CCTTGGCGACGTCTCGATGAAGTCT	27
U43	ACGTCCGAAGGAAATCTCCGCCGAG	26
U44	CTGCAGCTCGGCCGAGATT	19
A45-2	GACCGCAAGGTGTGG CATATGGC	23
A46-2	AGCACGCGCTCGGC CATATGCCACAC	26
AB47	GAGCGCGTGCTGACCCGCGTCCACTC	26
AB48	CCCCTCGCGCAGGGAGTGGACGCGG	26
BC49	CGCGAGCGGGTCGACGCCACCCTGGC	26
BC50	TCGTTGCGGTGGGCGGCCAGGGTGGC	26
CD51	CCACCGCAACGAGATCCTGCTGTTCC	26
CD52	CGATGCGGGACAGGAACAGCAGGATC	26
DE53	TGTCCCGCATCGAGTCCCACGGCAAG	26
DE54	CTTCAGGATGCCCTTGCCGTGGGA	24
EF55	GGCATCCTGAAGCCCCACGAGCTGC	25
EF56	GTCGAACCTCGGCCAGCAGCTCGTGGG	26
FG57	GCCGAGTTCGACGCCATCCGCCAGGA	26
FG58	AGCTTGTTCTTGTCGTCCTGGCGGATG	27
GH59	CGACAAGAACAAGCTGAACGAGCACGC	27
GH60	GCAGCTCCTCGAAGGCGTGCTCGTTC	26
HI61	TTCGAGGAGCTGCTGAAGTCCACCCAG	27
HI62	GACGATGGCCTCCTGGGTGGACTTCA	26
IJ63	GAGGCCATCGTCCTGCCGCCG	21
IJ64	ATGGCCAGGGCGACCCACGGCGGCAG	26
JK65	CGCCCTGGCCATCCGCCTGCGGCCGG	26
JK66	ATGTACTCCAGACGCCCGGCCGAG	26
KL67	CGTCTGGGAGTACATCCGGGTCAACGT	27
KL68	CGACCAGGGCGTTGACGTTGACCCGG	26
LM69	CGCCCTGGTTCGTCGAGGAGCTGTCCG	26
LM70	AGGTACTCCGGGACGGACAGCTCCTC	26
MN71	TCCCGGAGTACCTCCAGTTCAAGGAAGAG	29
MN72	GTCGACCAGCTCTTCTTGAAGTGG	25
NO73	CTGGTCGACGGCGCCTCCAACGGG	24
NO74	TCCAGGACGAAGTTCCCGTTGGAGGC	26
OP75	AACTTCGTCCTGGAGCTGGACTTCGAAC	28
OP76	AGGCGGTGAACGTTTGAAGTCCAGC	26
PQ77	CGTTCACCGCCTCCTTCCCAAGCCG	26
PQ78	GACTTGGTCAGGGTCGGCTTGGGGAA	26
QR79	ACCCTGACCAAGTCCATCGGCAACGG	26
QR80	TCAGGAACCTCGACGCCGTTGCCGATG	26
RS81	CGTCGAGTTCCTGAACCGCCACCTGT	26
RS82	GAACATCTTCGCGGACAGGTGGCGGT	26
ST83	CGAAGATGTTCCACGACAAGGAGTCCATGA	30
ST84	CAGCAGCGGGGTCATGGACTCCTTGT	26
TU85	CCCCGCTGCTGGAGTTCCTGCGCGCC	26
TU86	TGCCCTTGATGGTGGGCGCGCAGG	26
UV87	CCACTACAAGGGCAAGACCATGATGCTGA	29
UV88	GGATGCGGTGCTTCAGCATCATGGTCT	27
V89	ACGACCGCATCCAGAACTCCAACACCC	27
V90	CTGCAGGGTGTGGAGTCT	20

2.5 Medien und Medienzusätze

2.5.1 *E. coli*-Medium

Für die Anzucht von *E. coli*-Bakterien in Flüssigkultur oder auf Festmedium wurde LB-Medium verwendet. Falls nötig wurde dem abgekühlten autoklavierten Medium eine Antibiotikum-Lösung zugesetzt.

LB-Medium	10 g/l	Trypton	
	5 g/l	Hefeextrakt	
	5 g/l	NaCl	
	15 g/l	Agar für Festmedium	pH 7,5 mit NaOH einstellen

Um eine **Blau-Weiß-Selektion** der mit einem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Zellen durchzuführen, wurden die LB-Nährplatten jeweils mit 100 µl einer IPTG-Lösung (100 mM) und 20 µl einer X-Gal-Lösung (50 mg/ml) supplementiert. (IPTG in Wasser lösen, steril filtrieren und bei 4 °C aufbewahren; X-Gal in N,N'-Dimethylformamid lösen und bei -20 °C lagern.)

2.5.2 Streptomyceten-Medien

Je nach Streptomyceten-Stamm und abhängig davon, ob die Bakterien beispielsweise zur Sekundärstoffproduktion angeregt oder zur Protoplastierung verwendet werden sollten, waren unterschiedliche Fest- und Flüssigmedien erforderlich. Falls nötig wurde den abgekühlten autoklavierten Medien eine Antibiotikum-Lösung zugesetzt.

CRM-Medium (Anzuchtmedium für die Protoplastierung von *S. fradiae* Tü2717)

	103 g/l	Saccharose	
	20 g/l	Tryptic Soy Broth	
	10 g/l	Hefeextrakt	
	10,12 g/l	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	pH 7,0 mit 1 M NaOH einstellen

CRM-Medium wird mit Leitungswasser angesetzt. (Nach dem Autoklavieren wird 0,1 ml einer sterilen 1 M CaCl₂-Lösung pro 10 ml Medium zugesetzt.)

HA-Medium	10 g/l	Malzextrakt	
	4 g/l	Hefeextrakt	
	4 g/l	Glucose	
	21 g/l	Agar für Festmedium	
	[1 mM	CaCl ₂	(Nach dem Autoklavieren hinzugeben; bei Verwendung von Leitungswasser nicht erforderlich)]

Minimalmedium (Brawner *et al.*, 1985)

6 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	
6 g	K ₂ HPO ₄	
1 g	KH ₂ PO ₄	
1,06 g	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	
2 g	NaCl	
0,002 g	FeCl ₃ × 6 H ₂ O	pH 7,0 einstellen; H ₂ O bidest. ad 1000 ml

Nach dem Autoklavieren steril zusetzen:

1,25 ml	Glucose (40 % (w/v))
180 µl	CaCl ₂ (1 M)

Zur Nutzung von Saccharose als C-Quelle wurde das Minimalmedium nach der vorliegenden Rezeptur hergestellt und anstelle der Glucoselösung je Liter Medium 1 ml Saccharoselösung (25 % (w/v)) zugesetzt.

MS-Medium

20 g/l	Mannitol	
20 g/l	Sojamehl	mit Leitungswasser auf 1 l auffüllen;
20 g/l	Agar	Flüssigkultur pH 7,6 mit NaOH einstellen

NL111/V-Medium (Produktionsmedium für *S. fradiae* Tü2717)

20 g/l	Lab Lemco	
100 g/l	Malzextrakt	
10 g/l	CaCO ₃	pH 7,2 einstellen

Das Medium wird mit Leitungswasser angesetzt, in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane gefüllt (je 100 ml), Watte locker stopfen! Für Anzuchten im Kleinmaßstab wurden je 20 ml des Mediums in 100 ml-Kolben gefüllt.

S-Medium (Anzuchtmedium für die Protoplastierung von *S. viridochromogenes* Tü57)**Lösung 1**

103 g/l	Saccharose	
20 g/l	Tryptic Soy Broth	
4 g/l	Pepton	
4 g/l	Hefeextrakt	
4 g/l	K ₂ HPO ₄	
2 g/l	KH ₂ PO ₄	
10 g/l	Glycin	H ₂ O bidest. ad 800 ml

Lösung 2

10 g/l	Glucose	
0,5 g/l	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	H ₂ O bidest. ad 200 ml

Beide Lösungen werden getrennt autoklaviert und unter sterilen Bedingungen vereinigt.

SG-Medium (Produktionsmedium für *S. viridochromogenes* Tü57)

20 g/l	D-Glucose	
10 g/l	Pepton	
2,34 g/l	L-Valin	
2 g/l	CaCO ₃	
1 mg/l	CoCl ₂	pH 7,2 einstellen

Das Medium wird mit Leitungswasser angesetzt, in 300 ml-Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen füllen (je 100 ml), Watte locker stopfen!

TSB-Medium

30 g/l	Tryptic Soy Broth	mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen
--------	-------------------	-------------------------------------

2.5.3 Puffer und Medien für die Streptomyceten-Protoplastentransformation

NB-Weichagar (zum Überschichten mit zugesetztem Antibiotikum)

8 g	Nutrient Broth	
5 g	Agar	H ₂ O bidest. ad 1000 ml

P-Puffer (Protoplastierungspuffer für Streptomyceten; Thompson *et al.*, 1982)

	Endkonzentration	
2 ml	Spurenelemente-Lösung	0,2 % (v/v)
100 ml	TES pH 7,2 (250 mM)	25 mM
10 ml	MgCl ₂ × 6 H ₂ O (1 M)	10 mM
10 ml	K ₂ SO ₄ (140 mM)	1,4 mM
10 ml	KH ₂ PO ₄ (40 mM)	0,4 mM
10 ml	CaCl ₂ × 2 H ₂ O (250 mM)	2,5 mM
103 g	Saccharose (H ₂ O bidest. ad 858 ml)	

Die Lösungen werden einzeln angesetzt und nach dem Autoklavieren steril vereinigt. Dabei wird die CaCl₂-Lösung zuletzt zugegeben. Zur Protoplastierung wird dem P-Puffer zur Auflösung der Zellwand Lysozym zugesetzt. Für *S. fradiae*-Stämme werden 3,5 mg/ml und für *S. viridochromogenes*-Stämme werden 2 mg/ml Lysozym eingesetzt.

R2YE-Medium (modifiziert nach Hopwood *et al.*, 1999)

Lösung A	22 g	Agar	
	10,12 g	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	
	10 g	Glucose	
	3 g	Prolin	
	2,95 g	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	
	0,25 g	K ₂ SO ₄	
	0,1 g	Casaminosäuren	H ₂ O bidest. ad 500 ml
Lösung B	5,73 g	TES	
	5 g	Hefeextrakt	
	103 g	Saccharose	pH 7,4 mit NaOH einstellen; H ₂ O bidest. ad 490 ml
Lösung C	10 ml	KH ₂ PO ₄ (0,5 % (w/v))	
Lösung D	2 ml	Spurenelemente-Lösung	

Alle Lösungen werden getrennt autoklaviert und unter sterilen Bedingungen vereinigt. Die R2YE-Platten sollten nach dem Gießen und vor der Verwendung gut getrocknet werden.

R3-Weichagar (zum Einbetten der Protoplasten auf R2YE-Platten)

171 g	Saccharose	
10 g	Glucose	
4 g	Pepton	
0,5 g	KCl	
8,1 g	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	
1 M	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	
8 g	Agar	H ₂ O bidest. ad 860 ml

Nach dem Autoklavieren folgte die Zugabe der einzeln autoklavierten Komponenten:

40 ml	K ₂ HPO ₄ (0,5 %)
100 ml	TES (250 mM; pH 7,0)

Für das Überschichten der Regenerationsplatten sollte der R3-Agar eine Temperatur von ca. 40 °C haben.

Spurenelemente-Lösung (für R2YE-Medium, P- und T-Puffer; nach Hopwood *et al.*, 1999)

740 µM	FeCl ₃ × 6 H ₂ O
59 µM	CuCl ₂ × 4 H ₂ O
50 µM	MnCl ₂ × 4 H ₂ O
30 µM	ZnCl ₂
26 µM	Na ₂ B ₄ O ₇ × 10 H ₂ O
8 µM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O

Die Lösung wird mit H₂O bidest. angesetzt und autoklaviert.

T-Puffer (Transformationspuffer; nach Thompson *et al.*, 1982)

		Endkonzentration
1,7 ml	H ₂ O steril	
5 ml	PEG 1000 (Roth) (50 % (w/v))	25 %
1 ml	Saccharose (25 % (w/v))	2,5 % (w/v)
1 ml	Tris-Maleat (0,5 M; pH 8,0)	50 mM
30 µl	Spurenelemente-Lösung	0,3 % (v/v)
0,1 ml	K ₂ SO ₄ (140 mM)	1,4 mM
0,1 ml	KH ₂ PO ₄ (40 mM)	0,4 mM
0,1 ml	MgCl ₂ (1 M)	10 mM
1 ml	CaCl ₂ (1 M)	100 mM

Die Lösungen werden getrennt autoklaviert und unter sterilen Bedingungen vereinigt. Der Puffer wird bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.4 Bacillus subtilis-Medien**Sporulationsmedium**

1,0 mg	FeCl ₃ × 6 H ₂ O	
17,73 mg	MnCl ₂ × 4 H ₂ O	
540,0 mg	NH ₄ Cl	
105,0 mg	Na ₂ SO ₄	
87,0 mg	KH ₂ PO ₄	
257,9 mg	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	
96,0 mg	NH ₄ NO ₃	
8,3 mg	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	
2,0 g	Glucose	
1,9 g	Na-L-Glutamat × 1 H ₂ O	pH 7,1 einstellen; H ₂ O bidest. ad 1000 ml, autoklavieren

DM-Medium (nach Davis und Mingioli, 1950)

7,0 g/l	K ₂ HPO ₄	
3,0 g/l	KH ₂ PO ₄	
0,1 g/l	NaCl	
0,1 g/l	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	
1,0 g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄	
10 ml/l	Glucose (40 %)	nach dem Autoklavieren steril zugeben

2.5.5 Antibiotika-Stammlösungen

Abhängig vom verwendeten Vektor in den jeweiligen Versuchen wurden unterschiedliche Antibiotika eingesetzt, die in Tab. 2.7 zusammengefaßt sind. Die Antibiotika wurden dem ausreichend abgekühlten Medium (ca. 50 °C) nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Tab. 2.7: Übersicht über die verwendeten Antibiotika. Angegeben sind neben den Endkonzentrationen im Medium auch die Konzentrationen der angesetzten Stammlösungen. Alle Antibiotika wurden im entsprechenden Lösungsmittel gelöst. Die wäßrigen Stammlösungen wurden steril filtriert und zu 1-2 ml-Aliquots abgefüllt. (Thiostrepton nicht steril filtrieren!) Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Apramycin	100 mg/ml H ₂ O	25 µg/ml für HA-Platten (<i>Strept.</i>), 100 µg/ml für LB-Medium (<i>E. coli</i>)
Carbenicillin	50 mg/ml H ₂ O	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml EtOH	34 µg/ml
Erythromycin	25 mg/ml EtOH	50 µg/ml
Fosfomycin	200 mg/ml H ₂ O	25-30 µg/ml bzw. 1 mg/Platte (Festmedium)
Kanamycin	30 mg/ml H ₂ O	30 µg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml EtOH (70 %)	10 µg/ml
Thiostrepton	50 mg/ml DMSO	25 µg/ml

2.6 Chemikalien und Enzyme

Amersham Biosciences Europe (GE Healthcare), Freiburg: DNase I, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, Protein-Längenstandard, Restriktionsendonukleasen

Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA: Agar, Casaminosäuren, Hefeextrakt, Malzextrakt, Nutrient Broth, Pepton, Stärke, Tryptic Soy Broth, Trypton

Bio-Rad, Richmond CA, USA: Low Molecular Weight Standard (14,4-97 kDa)

Fluka, Buchs, Schweiz: Apramycin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin, Lysozym (aus Hühnereiweiß), Thiostrepton

Macherey-Nagel, Düren: NucleoSpin[®] Extract Kit II

Merck, Darmstadt: Chloroform, Dikaliumhydrogenphosphat, DMSO, Ethanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Methylenblau, Xylencyanol

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen: Restriktionsendonukleasen, Restriktionspuffer

New England Biolabs, Beverly, MA, USA: Restriktionsendonukleasen, T7-Endonuklease I

Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, GB: Lab Lemco (Fleischextrakt)

Promega, Madison, WI, USA: 1 kb-Längenstandard, BSA, CIAP, dNTP-Mix, *Pfu*-DNA-Polymerase, Restriktionsendonukleasen, RNase A, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, *Taq*-DNA-Polymerase, Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System

Qiagen, Hilden: Ni-NTA-Agarose (Suspension), Plasmid Midi Kit (Tip100-Säulen), RNase A

Roche Diagnostics, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz: DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, DIG-markierter DNA-Längenstandard

Roth, Karlsruhe: Aceton, Acetonitril, Acrylamid/Bisacrylamid, Calciumchlorid, Carbenicillin, Dichlormethan, Eisessig, Ethidiumbromid, Ethylacetat, Glucose, Glycerin, Imidazol, IPTG, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumsulfat, L-Prolin, Magnesiumchlorid, Mannit, Membranfilter ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$, steril; $\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$), Methanol, Natriumhydroxid, Nickelsulfat, N,N'-Dimethylformamid, PEG 1000, Phenol/Chloroform (pH 8,0), Saccharose, TEMED, TES, Tris, Tris-Maleat, Tween 80, X-Gal

Serva, Heidelberg: Coomassie[®] Brilliant Blau G250

Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA: β -Mercaptoethanol, APS, Bromphenolblau, EDTA, Fosfomycin, L-Glutamin, L-Glycin, Tetracyclin

Stratagene, La Jolla, CA, USA: Gigapack[®] III Gold Packaging Extract

Südzucker, Mannheim: Saccharose

USB, Cleveland, OH, USA: Agarose ultrapure, Streptomycin

Walter Schoenenberger Pflanzensaftwerk GmbH & Co. KG, Magstadt: Hensel Voll-Soja

2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn: LC-MS-Anlage mit folgenden Komponenten: Autosampler (G1313A), Degasser (G1322A), Diodenarraydetektor (G1315B), Fraktionssammler (G1364A), Massendetektor SL (G1946D), Pumpe (isokratisch; G1310A), Pumpe (quarternär; G1311A), Säulenofen (G1316A), Splitter (G1968D)

Amersham Biosciences Europe (GE Healthcare), Freiburg: Hybridisierungsöfen, Image Master VDS (Video-Dokumentations-System), Sephadex[™] G-25 Säulen, Sephadex[™] LH-20 (Feststoff)

Beckman Coulter, Fullerton CA, USA: Zentrifuge Modell J2-21M

Bio-Rad, Richmond CA, USA: Mini-Protean-3-Elektrophorese-Zelle

Eppendorf, Hamburg: 2 ml-Reaktionsgefäße, Zentrifugen 5417C und 5417R, Mastercycler[®] ep gradient

H. Saur Laborbedarf, Reutlingen: Vakuum-Konzentrator BA-VC-300H

Heidolph Instruments, Schwabach: Magnetrührer MR 3002, Rotationsverdampfer Laborota 4000, Schüttler Rotamax 120
Hewlett-Packard, Palo Alto CA, USA: Diode Array Spectrophotometer 8452A
Infors AG, Bottmingen, Schweiz: Inkubationsschüttler (Multitron)
Macherey-Nagel, Düren: Antibiotika-Testblättchen (MN 827 ATD, Ø 6 mm)
Merck, Darmstadt: Kieselgel 60 F₂₅₄
PerkinElmer (Applied Biosystems), Norwalk, CT, USA: GeneAmp 2400 Thermocycler
Schleicher und Schuell, Dassel: Faltenfilter
Schott Instruments, Mainz: Labor-pH-Meter CG 842
Thermo Spectronic (Thermo Electron Corporation), Rochester, NY, USA: French[®] Pressure Cell Press
Vacuubrand, Wertheim: Chemie-Vakuumpumpstand PC 2002 VARIO
Waters GmbH, Eschborn: 717plus Autosampler, 515 HPLC-Pumpe, 2996 PDA-Detektor
Whatman, Maidstone, UK: 3MM-Papier, Glasfaserfilter

2.8 Software

Artemis Release 5 (Sanger Centre; Rutherford <i>et al.</i> , 2000; http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/)	Auswertung von Sequenzdaten
BLAST Version 2.2.11 (Altschul <i>et al.</i> , 1997; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html)	Vergleich von DNA- und Proteinsequenzen mit Datenbanken-Sequenzen
Chemstation Software, Version Rev. A 09.03 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn)	Steuerung der LC-MS-Anlage und Auswertung der Meßdaten
Chromas 2.24 (Technelysium Ltd., Tewantin, Australien)	Betrachtung von Sequenzier-Chromatogrammen (abi-Dateien)
Clone Manager Version 4.1 (Scientific & Educational Software, Durham, NC, USA)	Erstellen von Plasmidkarten; virtuelle Klonierung
DNASIS für Windows (Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA, USA), Version 2.1	Auswertung von Sequenzdaten
ISIS Draw Version 2.4 (MDL Information Systems)	Erstellen von Strukturformeln
SEARCHPKS (Yadav <i>et al.</i> , 2003; http://www.nii.res.in/searchpks.html)	Analyse von Aminosäuresequenzen
TMHMM-Server Version 2.0 (Krogh <i>et al.</i> , 2001; http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)	Hydrophobizitäts-Blot zur Vorhersage von Protein-Transmembrandomänen

2.9 Mikrobiologische Methoden

2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen

Die Konzentrationsbestimmung von Suspensionskulturen erfolgte photometrisch. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 623 nm (OD_{623}) ca. 4×10^7 Zellen/ml.

2.9.2 Kultivierung und Anzucht von *E. coli*

E. coli-Kulturen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) in LB-Medium bei 37 °C über Nacht angezogen. Dem Medium wurde gemäß des vorliegenden Selektionsmarkers das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (s. Abschnitt 2.5.5).

Zur Kultivierung auf Festmedium wurde eine Einzelkolonie oder eine Dauerkultur mit der Impföse ausgestrichen oder ein Transformationsansatz wurde ausplattiert. Flüssigkulturen wurden im Schüttler bei 180 rpm kultiviert. Für Plasmidisolierungen im Mini-Maßstab wurden Kulturen mit 1-10 ml Medium angeimpft. Für Plasmidpräparationen im Midi-Maßstab wurden 100 ml Medium in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben (mit einer Schikane) mit 1 ml einer Vorkultur inokuliert und angezogen.

Zur Konservierung über einen längeren Zeitraum wurden Dauerkulturen von wichtigen *E. coli*-Stämmen angelegt. Dazu wurden 700 µl aus einer Übernacht-Kultur mit 700 µl sterilem Glycerin in einem Kryogefäß gut vermenget und bei -86 °C eingefroren und gelagert.

2.9.3 Kultivierung und Anzucht von Streptomyceten

Zur Vereinzelung der Bakterien, zur Stammhaltung oder zum gezielten Screening nach Mutanten wurden die Streptomyceten auf Festmedium kultiviert. Die Anzucht der Streptomyceten in Flüssigkulturen erfolgte zur Antibiotikaproduktion, zur Anzucht zwecks Protoplastierung oder zur Proteinextraktion.

Je nach Streptomyceten-Stamm und Verwendungszweck waren unterschiedliche Medien nötig und die jeweiligen Kulturbedingungen zu beachten. Bei Anzucht von Stämmen mit Selektionsmarker wurde dem Nährmedium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Anzucht zur Sekundärstoffextraktion im analytischen Maßstab erfolgte jeweils in 20 ml-Kulturen in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane. Die Anzucht zur Protoplastierung oder Proteinexpression wurde in 100 ml-Kulturen in 300 ml-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen und einer Spiralfeder durchgeführt.

Zur Stammhaltung von *S. diastatochromogenes* und *S. viridochromogenes* wurden die Wildtyp- und Mutanten-Stämme 3-4 Tage bei 37 °C auf HA-Agarplatten kultiviert. Nach Einsetzen der Sporulation wurden die Platten bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zur Protoplastierung wurde *S. viridochromogenes* in S-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert.

Um *S. viridochromogenes* zur **Avilamycin-Produktion** anzuregen, wurde die Kultivierung folgendermaßen durchgeführt:

1. Vorkultur: 20-50 ml HA-Medium für 24 h bei 37 °C und 180 rpm
 2. Vorkultur: 50 ml SG-Medium für 24 h bei 37 °C und 180 rpm
- Hauptkultur: 50-100 ml SG-Medium für 2-3 Tage bei 28 °C und 180 rpm

Die Anzucht von *S. diastatochromogenes* zwecks **Polyketomycin-Produktion** erfolgte drei bis vier Tage in MS-Medium bei 28 °C und 180 rpm.

Zur Stammhaltung von *S. fradiae* (Wildtyp und Mutanten) wurden die Wildtyp- und Mutanten-Stämme für 5-6 Tage bei 28 °C auf HA-Agarplatten kultiviert und anschließend bei RT aufbewahrt. Zur Anzucht des Stammes zwecks Protoplastierung oder Proteinexpression wurde CRM-Flüssigmedium beimpft, und die Inkubation erfolgte bei 28 °C und 180 rpm. Falls der Stamm zur **Urdamycin-Produktion** angeregt werden sollte, wurde NL111/V-Flüssigmedium verwendet. Die Kultivierung erfolgte 5-6 Tage bei 28 °C und 180 rpm.

2.9.4 Dauerkulturen von Streptomyceten

Als Dauerkultur zur Stammerhaltung über längere Zeiträume bietet sich bei gut sporulierenden *Streptomyces*-Stämmen das Herstellen einer Sporensuspension an, die bei -20 °C gelagert werden kann. Bei Stämmen, die nicht sporulieren (z.B. Mutanten-Stämme), wurden Dauerkulturen ausgehend von Myzel angelegt.

Die Sporen einer Streptomyceten-Kultur wurden mittels Impföse abgeschabt und in 9 ml sterilem H₂O aufgenommen. Die Suspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt, und durch Vortexen (1 min) wurden die Sporen vom Myzel gelöst. Zur Abtrennung von Myzelstücken wurde die Suspension durch sterile Watte filtriert. Das Filtrat wurde pelletiert (3500 rpm, 10 min, 4 °C) und das erhaltene Pellet in 1-2 ml 20%iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert.

Um ausgehend von Myzel eine Dauerkultur anzulegen, wurde aus einer Flüssigkultur 1 ml entnommen und abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden in 1 ml 15%iger Glycerinlösung (v/v) gewaschen, erneut pelletiert und anschließend in 1 ml Glycerinlösung resuspendiert.

2.9.5 Anzucht von *Bacillus subtilis* und Herstellung einer Sporensuspension

Um für die Herstellung von Antibiotika-Testplatten Sporen von *Bacillus subtilis* zu erhalten, wurden 100 ml Sporulationsmedium mit einer Sporensuspension inokuliert. Nach Kultivierung dieser Vorkultur für ca. 72 h auf einem Schüttler (120 rpm, 30 °C) wurde der Fortschritt der Sporenbildung überprüft. Ausgehend von der sporulierenden Vorkultur wurden jeweils 100 ml Sporulationsmedium mit 1 ml Zellsuspension angeimpft. Nach 3-5 Tagen Wachstum bestand die Kultur überwiegend aus Sporen. Die Zellmasse wurde durch Zentrifugation (5000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert und dreimal mit Leitungswasser (steril) gewaschen. Es folgte die Resuspension der Sporen durch Zugabe von sterilem Leitungswasser, bis die OD₅₄₆ einen Wert von 1,5 erreicht hatte. Die Sporensuspension wurde aliquotiert (à 12 ml) und zur Abtötung noch vorhandener vegetativer Zellen 45 min auf 70 °C erwärmt. Diese Suspension wurde bei -20 °C gelagert.

2.9.6 *E. coli*-Transformation

Herstellung Ca²⁺-kompetenter *E. coli*-Zellen

Um Plasmid-DNA in Bakterienzellen einschleusen zu können, wurden die Bakterien mit der nachfolgenden Methode (nach Sambrook *et al.*, 1989) kompetent gemacht, d.h. sie können verglichen mit unbehandelten Zellen besser DNA aufnehmen (Dagert und Ehrlich, 1979).

E. coli-Zellen aus einer Dauerkultur wurden zur Vereinzelnung auf LB-Festmedium (mit Antibiotikum) ausgestrichen. 100 ml LB-Medium (mit AB) wurden mit einem Einzelklon beimpft. Aus dieser Vorkultur wurde 1 ml zum Animpfen der Hauptkultur (100 ml LB-Medium ohne AB) eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 (nach 2-3 h) angezogen. Das Kulturmedium wurde in 50 ml-Gefäße überführt, 10 min auf Eis gestellt und 10 min bei 4 °C und 5000 rpm in der Beckman Zentrifuge (Rotor JA 10) sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde jeweils in 30 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 10 min, 3000 rpm) jeweils in 30 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden 20 min auf Eis gestellt und danach 10 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml 15%igem Glycerin mit 0,1 M CaCl₂ resuspendiert (dazu wird eine Gilson-Pipette mit abgeschnittenen blauen Spitzen verwendet). Die Zellsuspension wurde auf Eis in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße zu 120 µl-Aliquots pipettiert und bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Salzlösungen für kompetente Zellen

0,1 M MgCl ₂	20,33 g/l	
0,1 M CaCl ₂	14,7 g/l	in H ₂ O bzw. in 15 % (v/v) Glycerin

Hitzeschock-Transformation

Das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Zellen wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt (Nishimura *et al.*, 1990). Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes bzw. der Plasmid-DNA (ca. 200 ng) folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden für 30 s einer Temperatur von 42 °C (Hitzeschock) ausgesetzt und für weitere 5 min auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurden 800 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) pipettiert, und die Bakterien wurden 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte das Ausplattieren auf Agarplatten mit Selektionsmedium.

2.9.7 Streptomyceten-Transformation

Um Plasmid-DNA in die Streptomyceten-Zellen einzubringen, wurden in Abhängigkeit vom Stamm zwei unterschiedliche Transformationsmethoden angewendet.

Bei *S. fradiae* und *S. viridochromogenes* wurden die Zellen protoplastiert und unter Verwendung PEG-haltiger Puffer transformiert (nach Hopwood *et al.*, 1999). Um Plasmid-DNA in die Zellen von *S. diastatochromogenes* einzuschleusen, wurde die DNA-Übertragung von *E. coli*- auf Streptomyceten-Zellen per Konjugation durchgeführt (nach Flett *et al.*, 1997).

2.9.7.1 Protoplastierung von Streptomyceten

Um DNA in Streptomyceten-Zellen einschleusen zu können, müssen diese zunächst durch eine Lysozymbehandlung protoplastiert werden. Um zu erreichen, daß das Streptomyceten-Myzel möglichst fein grieselig wächst, wurde zum Animpfen der Kultur eine Insulinspritze verwendet. 50 ml der Kultur wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, 4 °C). Die Zellen wurden in 15 ml kaltem P-Puffer resuspendiert und erneut pelletiert (5000 rpm, 5 min, 4 °C). Zur Protoplastierung wurden die Zellen in 15 ml sterilen P-Puffer mit Lysozym resuspendiert. Die Inkubation erfolgte 45 min bei 29 °C im Hybridisierungsofen bei ca. 100 rpm (*S. viridochromogenes*) bzw. 30-50 min bei 37 °C unter gelegentlichem Invertieren (*S. fradiae*). Der Fortschritt der Protoplastierung wurde mikroskopisch verfolgt und bei ausreichender Protoplastierung der Zellen durch Zugabe von 15 ml kaltem P-Puffer abgestoppt. Um Myzelstücke abzutrennen, wurde die Suspension unter sterilen Bedingungen durch Watte filtriert. Das Filtrat wurde pelletiert (2750 rpm, 10 min, 4 °C) und in 800-1600 µl kaltem P-Puffer resuspendiert. Die Protoplasten wurden zu 200 µl aliquotiert und zur Transformation verwendet oder zwecks Lagerung bei -86 °C eingefroren. Um die Protoplasten zu schonen, wurden zum Pipettieren abgeschnittene blaue Pipettenspitzen verwendet.

2.9.7.2 Protoplastentransformation

Zur Transformation wurden die *Streptomyces*-Protoplasten direkt nach der Herstellung verwendet oder gelagerte Protoplasten wurden rasch aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 200 µl Protoplasten mit 200 µl P-Puffer verdünnt. Nach Zusatz von 10-20 µg DNA (Plasmid-DNA oder leerer Vektor aus Plasmid-Midi-Präparation) erfolgte die Zugabe von 500 µl T-Puffer. Nach vorsichtigem Vermischen wurde der Transformationsansatz auf 2-3 Regenerationsplatten (R2YE-Medium) ausplattiert. Nach 12-16 h Inkubation, die je nach Stamm bei 28 °C bzw. 37 °C erfolgte, wurde den Platten zwecks Selektion ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Das Antibiotikum wurde dazu in Wasser oder in NB-Weichagar aufgenommen und vorsichtig auf den Regenerationsplatten verteilt. Die Inkubation wurde im Brutschrank bei 28 °C bzw. 37 °C fortgesetzt.

Zusätzlich zur eigentlichen Transformation wurden unterschiedliche Kontrollen durchgeführt. Zur Überprüfung der Protoplasten wurden zwei Ansätze ohne Zugabe von Plasmid-DNA auf R2YE-Platten ausplattiert und ein Protoplasten-Aliquot wurde nach Zentrifugation (3000 rpm, 3 min, 4 °C) in 200 µl sterilem H₂O bidest. aufgenommen und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden mit R3-Weichagar überschichtet und im Brutschrank inkubiert. Bei dem Wasseransatz platzen die Protoplasten und auf der Platte kann nur eventuell vorhandenes Myzel anwachsen. Von den zwei direkt ausplattierten Protoplasten-Aliquots wurde eine Platte nach 12-16 h mit NB-Weichagar mit geeignetem Antibiotikum überschichtet und weiter inkubiert. Die AB-haltige Platte sollte kein Wachstum aufweisen, da der Streptomycet kein Plasmid mit dem AB-Resistenzgen enthält. Anhand der Antibiotika-freien Platte lässt sich die Protoplastenmenge überprüfen.

Die nach zwei bis fünf Tagen erscheinenden Transformanten wurden auf HA-Platten mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und bei 28 °C im Brutschrank inkubiert, um für weitere Untersuchungen mehr Zellmasse zu erhalten.

Die Einzelklone können nach ausreichendem Wachstum auch direkt in Produktionsmedium angeimpft werden, um z.B. die Analyse gebildeter Sekundärmetabolite schneller durchführen zu können.

2.9.8 Konjugation von *Streptomyces* sp. Tü6028

2.9.8.1 Donorkultur (*E. coli* ET12567)

Das zu transferierende Plasmid (pKC1132 mit Insert) wurde zunächst per Hitzeschock-Transformation in kompetente Zellen von *E. coli* ET12567 mit dem Helferplasmid pUZ8002 (*oriT*) eingeschleust. Dieses Plasmid hilft *oriT*-tragende Plasmide zu übertragen, wird jedoch aufgrund einer Mutation im *oriT* selbst nicht übertragen. Ein transformierter Einzelklon wurde über Nacht in LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin und dem entsprechenden

Plasmid-Antibiotikum kultiviert. 100 µl der ÜN-Kultur wurden in 8 ml LB-Medium (mit AB-Zusatz) überimpft und inkubiert. Nach 7 h wurde die Kultur abzentrifugiert und das Pellet in 800 µl LB-Medium (ohne AB-Zusatz) resuspendiert.

2.9.8.2 Rezipientenkultur (*Streptomyces*-Stamm)

Von einer sporulierenden *Streptomyces*-Kultur wurden die Sporen mit der Impföse losgekratzt und durch Zugabe von 3-4 ml HA-Medium (oder TSB-Medium) eine Sporensuspension gewonnen. Die Suspension wurde auf zwei 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation der Sporensuspension bei 45 °C im Wasserbad. Die Suspension wurde 3-4 Stunden bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kulturlösung wurde abzentrifugiert (7000 rpm, 10 min, RT), und das erhaltene Pellet wurde in 200 µl HA-Medium (oder TSB-Medium) resuspendiert.

2.9.8.3 Konjugationsansatz

Die beiden Suspensionen aus Donor- und Rezipientenkultur wurden zusammengegeben und gemischt. Der Ansatz wurde auf einer MS⁺-Platte (mit 10 mM MgCl₂) ausgestrichen und 14-16 h bei 28 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte das Überschichten des Mediums mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (500 µg Apramycin; 25 µg/ml) und Fosfomycin (1 mg in 1 ml sterilem H₂O; 30 µg/ml), welches gezielt das Wachstum der *E. coli*-Zellen hemmt.

2.9.9 Screening nach Doppel-Crossing-over-Mutanten

Bei diesem Screening wird ausgehend von *Single-Crossing-over*-Mutanten nach Klonen gesucht, die durch ein weiteres homologes Rekombinationsereignis den Vektoranteil und im Idealfall das native Gen aus dem Genom verloren haben.

Die *Single-Crossing-over*-Mutanten wurden abwechselnd in Flüssigmedium und zur Vereinzelung der Streptomyceten auf Agarplatten ohne AB-Zusatz kultiviert. Die Doppel-*Crossing-over*-Mutanten konnten aufgespürt werden, indem die Einzelklone parallel auf einem AB-haltigen und einem AB-freien Festmedium angezogen wurden. Einige Klone waren nicht mehr gegen das Selektionsantibiotikum resistent. Um zu unterscheiden, ob es sich um eine Rückmutation zum Wildtyp oder um eine Doppel-*Crossing-over*-Mutante handelte, wurde jeweils eine „Kolonien-PCR“ durchgeführt. Dazu wurde anstelle von isolierter DNA etwas Myzel zu dem PCR-Ansatz gegeben. Falls erforderlich wurden die jeweiligen PCR-Produkte per Restriktion näher untersucht.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA mit Wasser verdünnt (100-200fach) und in eine geeignete Quarzküvette überführt. Die Absorption der DNA-Lösung wurde im Photometer bei 260 nm bestimmt. Anhand von empirischen Vergleichsdaten konnte die Konzentration bestimmt werden:

Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA

Zur Reinheitsbestimmung wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sollte im Bereich von 1,8-2,0 liegen. Abweichende Werte zeigen eine Verunreinigung der DNA-Lösung mit Proteinen oder Phenol an.

2.10.2 Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*

Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen mit nachfolgender Neutralisierung unter hohen Salzbedingungen (Sambrook *et al.*, 1989). Bakterien-DNA denaturiert durch eine Behandlung mit NaOH und fällt aus. Im Gegensatz zur chromosomalen DNA hybridisieren die Stränge der Plasmid-DNA nach der Neutralisierung vollständig und bleiben gelöst. Nach der SDS-Behandlung werden die gesamte chromosomale DNA, ein großer Teil der zellulären RNA und Proteine durch Zentrifugation abgetrennt.

Zur Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurden 1-10 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Aus dieser Kultur wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 rpm, 5 min, RT) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 und Invertieren des Gefäßes folgten 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die klare Lösung wurde mit 150 µl Lösung 3 versetzt, gut gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Proteine und Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, 4 °C) abgetrennt. Die Plasmid-haltige Lösung wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. [Je nach gewünschter Reinheit der Plasmid-DNA wurde an dieser Stelle eine Phenolextraktion mit der Probe durchgeführt.] Die DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol ausgefällt und durch Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und 20 min bei 50 °C unter Schütteln in 50 µl TE-RNase-Lösung gelöst.

Lösung 1	50 mM	Glucose	Lösung 3	3 M	Kaliumacetat
	10 mM	EDTA		pH 4,8	mit Essigsäure eingestellt
	25 mM	Tris HCl pH 8,0	TE-RNase	100 µg/ml	RNase A
Lösung 2	200 mM	NaOH		1 mM	EDTA
	1 % (w/v)	SDS		10 mM	Tris HCl pH 8,0

2.10.3 Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Zur Sequenzierung wurde besonders reine Plasmid-DNA benötigt. Dazu erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mit dem „Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System“ (Promega) nach Anleitung des Herstellers aus 5-10 ml einer *E. coli*-Kultur.

2.10.4 QIAGEN Plasmid Midi Kit

Wurden größere Mengen eines Plasmids benötigt, so fand die Kultivierung der *E. coli*-Zellen in 100 ml LB-Medium statt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte dann mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit nach Anleitung des Herstellers.

2.10.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Streptomyceten

Zur Plasmidisolierung aus Streptomyceten wurde eine modifizierte Form der alkalischen Lyse mit zusätzlicher Lysozymbehandlung durchgeführt.

Die Zellen aus 1-5 ml einer Streptomyceten-Kultur wurden pelletiert (6000 rpm, 7 min, RT). Die Zellen wurden mit 500 µl Lösung 1 gewaschen, anschließend in 300 µl Lysozym-haltiger Lösung 1 (4 mg Lysozym/ml) resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zusatz von 300 µl Lösung 2 und Schwenken des Gefäßes wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde mit 300 µl Lösung 3 vermischt und 10 min auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation (14000 rpm, 15 min, RT) wurden Proteine und Zellfragmente abgetrennt. Der Überstand wurde mit 500 µl Phenol ausgeschüttelt, um noch enthaltene Verunreinigungen wie Proteine oder Saccharide durch Extraktion aus der wässrigen Phase zu entfernen. Die wässrige Phase wurde nach einem Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 10 min, 4 °C) mit 0,7 Vol. Isopropanol gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Die ausgefällte DNA wurde pelletiert (14000 rpm, 20 min, 4 °C) und mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in 50 µl TE-RNase gelöst und zum Abbau der RNA für 20 min bei 50 °C inkubiert.

Die verwendeten Lösungen 1, 2 und 3 sowie die TE-RNase-Lösung haben die gleiche Zusammensetzung, wie die bereits in Abschnitt 2.10.2 genannten Lösungen.

2.10.6 Isolierung von genomischer DNA aus Streptomyceten

Zur Isolierung genomischer DNA wurden die zu untersuchenden *S. viridochromogenes*-Stämme ein bis zwei Tage bei 37 °C und 180 rpm in Flüssigmedium kultiviert. Das Zellmaterial wurde durch Zentrifugation (5000 rpm, 10 min, 4 °C) vom Medium abgetrennt. 50 mg der Zellmasse wurden in ein 2 ml-Gefäß eingewogen und mit 1 ml TSE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl TSE-Puffer mit 3 mg/ml Lysozym und 100 µg/ml RNase resuspendiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Der Ansatz wurde mit 250 µl einer 2%igen SDS-Lösung (w/v) versetzt

und anschließend 10 min bei 60 °C erhitzt, so daß sich die Lösung klärte. Die Lösung wurde mit 250 µl Phenol/Chloroform (pH 8,0) versetzt, 1-2 min durch Vortexen vermischt und zentrifugiert (14000 rpm, 20 min, 4 °C). Die wäßrige Oberphase wurde abgenommen, mit 150 µl TE-Puffer (pH 8,0) und 250 µl Phenol/Chloroform versetzt, 1-2 min durch Vortexen vermischt und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Die wäßrige Oberphase wurde abgenommen und zur Fällung der DNA mit 0,1 Vol. 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,2) und 1 Vol. Isopropanol vermengt und 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde das DNA-Pellet mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) über Nacht gelöst.

Zur Bestimmung der Qualität und Konzentration der genomischen DNA wurde diese nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel betrachtet und am Spektralphotometer vermessen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

TSE-Puffer	103 g/l	Saccharose	
	25 mM	Tris-HCl	
	25 mM	EDTA	pH 8,0 einstellen

Saccharoselösung einzeln autoklavieren; nach dem Autoklavieren Lösungen mischen

2.10.7 Phenolextraktion und ethanolische Fällung von DNA

Um Proteine und andere Verunreinigungen aus einer Nukleinsäure-Präparation zu entfernen, wurde die Phenolextraktion mit anschließender ethanolischer Fällung der DNA durchgeführt. Die Lösung wurde mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform (pH 8,0) gemischt und anschließend bis zur Phasentrennung zentrifugiert (14000 rpm, 3 min, RT). Die wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung möglicher Phenolreste in der wäßrigen Phase wurde mit gleichem Volumen Chloroform extrahiert und wiederholt zentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. absolutem Ethanol 1 h bei -86 °C oder über Nacht bei -20 °C aus der wäßrigen Phase gefällt und abzentrifugiert (14000 rpm, 30 min, 4 °C). Das DNA-Pellet wurde zweimal in 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert.

2.10.8 Restriktionsspaltung

Restriktionsspaltungen wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller (Promega; New England Biolabs; Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Aktivitätsdefinition für Restriktionsendonukleasen besagt, daß 1 Einheit (*Unit*) Enzym ausreicht, um 1 µg DNA in 1 Stunde zu spalten. Die verwendeten Enzyme erreichen ihr Aktivitätsoptimum meist bei 37 °C. Die Lagerungspuffer der Endonukleasen enthalten in der Regel 50 % Glycerin. Die Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz muß unterhalb von 10 % liegen, da sonst eine Inhibierung der Enzymaktivität auftreten kann. Bei nicht optimalen Salzkonzentrationen oder zu langer Inkubationsdauer kann bei manchen Enzymen sogenannte "star activity" auftreten, bei der die DNA unspezifisch geschnitten wird.

2.10.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Je nach Fragmentgröße der aufzutrennenden DNA-Moleküle variierte die Agarosekonzentration der verwendeten Gele zwischen 0,7 und 2,0 % (w/v). Die Agarose wurde in 1× Elektrophoresepuffer (TAE) aufgekocht. Die Agaroselösung wurde zum Erstarren in eine Gelform mit Geltaschenformern gegossen. Die Proben wurden mit 1/10 Vol. Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Größenauftrennung im Agarosegel wurde in 1× TAE-Puffer bei einer Feldstärke von 5-10 V/cm durchgeführt. Zur Größenbestimmung der DNA-Banden wurde als Referenz ein DNA-Größenstandard (1 kb-DNA-Leiter; Promega bzw. 100 bp-DNA-Leiter; New England Biolabs) verwendet. Nach der Elektrophorese folgte die Anfärbung der DNA im Ethidiumbromid-Färbepad (1 µg/ml). Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit dem Image Master[®] VDS (Amersham/Pharmacia) unter UV-Durchlicht bei 312 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit der integrierten Digitalkamera fotografiert.

TAE-Puffer (50×, Elektrophoresepuffer)	2 M	Tris-Acetat	
	1 M	Eisessig	
	50 mM	EDTA	pH 8,3 mit Eisessig einstellen
Probenpuffer (10×)	50 % (v/v)	Glycerin	
	100 mM	EDTA	
	0,2 % (w/v)	Bromphenolblau oder Xylencyanol	

2.10.10 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Um eine UV-Licht-Exposition der DNA zu vermeiden, wurde das mit DNA beladene Agarosegel nach der Gelelektrophorese statt mit Ethidiumbromid in einem 0,02%igen Methylenblau-Färbepad gefärbt. Das gefärbte Gel wurde anschließend zum Entfärben in Wasser geschwenkt, bis die angefärbten DNA-Banden deutlich sichtbar hervortraten. Die benötigten DNA-Fragmente wurden mit einer sauberen Skalpellklinge ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Extract Kit II (Macherey-Nagel) nach Anleitung des Herstellers.

2.10.11 PCR-Amplifizierungen

Die Amplifizierung von DNA-Bereichen erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Diese Methode beruht auf der Fähigkeit hitzestabiler DNA-Polymerasen *in vitro* neue, zum Matrizenstrang (Template) komplementäre DNA-Stränge zu synthetisieren. Dazu benötigen DNA-Polymerasen kurze Oligonukleotide (Primer), die mit der Matrizen-DNA an komplementären Sequenzen hybridisieren (annealen) können. Von dort aus startet die Neusynthese bzw. die Kettenverlängerung (Elongation). Es folgt die Auftrennung des entstandenen Doppelstranges durch Erhitzen (Denaturierung) und die anschließende Temperaturabsenkung für ein erneutes Hybridisieren. Die Amplifizierung eines DNA-Abschnitts erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen von Denaturierung, spezifischer

Primerbindung und Elongation. Dabei wird eine exponentiell wachsende Anzahl von Kopien eines DNA-Fragmentes gebildet, die genau so lang sind, wie es der Abstand des Primerpaares vorgibt.

Die Reaktionen mit 50-100 µl Gesamtvolumen wurden in 200 µl PCR-Gefäßen durchgeführt. Die für eine Reaktion notwendigen Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert. Das Enzym wurde jeweils zum Schluß, teilweise erst nach der 5-minütigen Denaturierung („hot start“) zum Ansatz gegeben. Es folgt eine beispielhafte Auflistung für ein 50 µl-Reaktionsvolumen, wobei die Konzentrationsangaben als Endkonzentrationen zu verstehen sind:

ca. 50 ng	Plasmid-DNA
1 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Promega, 5 U/µl) oder <i>Pfu</i> -Polymerase (Promega, 3 U/µl)
5 µl	10x PCR-Puffer Glycerin (10 %) dNTP (200 µM) Primer 1 (1 µM) (vorwärts gerichtet) Primer 2 (1 µM) (rückwärts gerichtet) H ₂ O zum Auffüllen

Die anschließende Inkubation mit den erforderlichen Temperaturwechseln wurde in einem automatischen Thermocycler durchgeführt.

2.10.11.1 Amplifizierung zur Überprüfung möglicher *pokGT1*-Mutanten

Amplifizierung eines Abschnitts aus *pokGT1* zur Unterscheidung zwischen dem Wildtyp und möglicher *pokGT1*-Mutanten von *S. diastatochromogenes*.

In dem Ansatz wurde statt Template-DNA Zellmaterial der möglichen Mutanten verwendet. Als Positivkontrolle wurde pSK/213Δ*NcoI* und als Negativkontrolle wurde pSK/213 eingesetzt. Die verwendeten Primer waren *pokGT*-for und *pokGT*-rev. Die *Taq*-Polymerase wurde den PCR-Ansätzen sofort zugesetzt.

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	98 °C	95 °C	52 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	10'00"	0'30"	0'30"	1'30"	10'00"	∞
		40 Zyklen				

2.10.11.2 Amplifizierung von *aviD*

Amplifizierung von *aviD* zur Herstellung eines Inaktivierungskonstruktes für *S. viridochromogenes* Tü57.

In dem Ansatz wurden P2S11 (geschnitten mit *SacI*) als Template-DNA und die Primer *aviD-F1* und *aviD-R1* verwendet. Die Zugabe der *Pfu*-Polymerase fand erst nach Erhitzen auf 98 °C statt.

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	98 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	5'00"	0'30"	1'00"	4'00"	10'00"	∞
30 Zyklen						

2.10.11.3 Amplifizierung von *urdR*

Amplifizierung von *urdR* zur Überexpression und Komplementierung in *S. fradiae* RN-435 (*urdR*-Mutante).

In dem Ansatz wurden pSK-/*urdR* (geschnitten mit *PstI*) als Template-DNA und die Primer PDHF/PDHR verwendet. Die Zugabe der *Pfu*-Polymerase fand erst nach Erhitzen auf 98 °C statt.

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	98 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	5'00"	1'30"	1'00"	2'00"	10'00"	∞
30 Zyklen						

2.10.11.4 Amplifizierung von *aviS*

Amplifizierung von *aviS* zur Überexpression in *S. fradiae* A0.

In dem Ansatz wurden pBSK-4E5 (geschnitten mit *EcoRI*) als Template-DNA und die Primer *aviS-F2/aviS-R2* verwendet. Die Zugabe der *Pfu*-Polymerase fand erst nach Erhitzen auf 98 °C statt.

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	98 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	5'00"	1'30"	1'00"	2'00"	10'00"	∞
30 Zyklen						

2.10.11.5 Amplifizierung von *aviT*

Amplifizierung von *aviT* zur Überexpression in *S. fradiae* A0.

In dem Ansatz wurden pBSK-4E5 (geschnitten mit *EcoRI*) als Template-DNA und die Primer *aviT*-F2/*aviT*-R2 verwendet. Die Zugabe der *Pfu*-Polymerase fand erst nach Erhitzen auf 98 °C statt.

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	98 °C	95 °C	65 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	5'00"	1'30"	1'00"	2'00"	10'00"	∞
30 Zyklen						

2.10.11.6 Amplifizierung von *simB7*

Amplifizierung von *simB7* zur Überexpression in *S. fradiae* RN-435 (*urdR*-Mutante).

In dem Ansatz wurden 1K3P100 als Template-DNA und die Primer *simB7*-F1/*simB7*-R1 verwendet. Die Zugabe der *Pfu*-Polymerase fand erst nach Erhitzen auf 98 °C statt.

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	98 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	5'00"	0'30"	1'00"	2'00"	10'00"	∞
30 Zyklen						

2.10.11.7 Amplifizierung von *urdS*

Amplifizierung von *urdS* zur Überexpression in *S. fradiae* *urdSpm* (= *urdS*-Mutante). In dem Ansatz wurden Cos10 (geschnitten mit *Bam*HI) als Template-DNA und die Primer *urdS*-F1/*urdS*-R1 verwendet. Die *Pfu*-Polymerase wurde dem PCR-Ansatz sofort (ohne „hot start“) zugesetzt.

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	98 °C	95 °C	62 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	5'00"	0'30"	1'00"	2'00"	10'00"	∞
30 Zyklen						

2.10.11.8 Amplifizierung eines Vektorabschnittes

Amplifizierung eines Vektoranteils zur Generierung eines Streptomyceten-Expressionsplasmids (pAF3/*urdS*), welches das Protein um einen N-terminalen His-Tag und eine Thrombin-Erkennungsstelle zur Abspaltung des Hexahistidins erweitert.

In dem Ansatz wurden pET-28a(+) (Novagen) als Template-DNA und die Primer ET28a-F1/ET28a-R2 verwendet. Die Zugabe der *Pfu*-Polymerase fand erst nach Erhitzen auf 98 °C statt.

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	98 °C	95 °C	54 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	5'00"	0'30"	1'00"	0'45"	10'00"	∞
		35 Zyklen				

2.10.12 PCR-basierte Gensynthese

Die Synthesestrategie für die Gensynthese wird im Ergebnisteil unter Abschnitt 3.3.5 beschrieben.

Nachfolgend die Beschreibung der PCR-Bedingungen bei der Herstellung des synthetischen Gens *susy_GC*.

2.10.12.1 Amplifizierung der *susy_GC*-Teilstücke 3A und 3B

Für die Synthese wurden 90 Primer eingesetzt, die in Tab. 2.6 aufgeführt sind. Aus jeweils acht bzw. zehn zusammenhängenden Primern wurde ein Mix mit einer Gesamtendkonzentration von 1 pmol/μl hergestellt. Dazu wurden die Primer in Anlehnung an Gao *et al.* (2003) im Verhältnis 5:3:2:1:1:2:3:5 bzw. 5:3:2:1:1:1:1:2:3:5 in der numerischen Reihenfolge (s. Tab. 6.2 im Anhang) gemischt. Mit dem Mix wurde folgender PCR-Ansatz zusammenpipettiert:

5 μl Puffer (10×)
 1 μl dNTP (200 μM)
 1 μl *Pfu*-Polymerase
 43 μl Primer-Mix

Für den ersten PCR-Schritt mit den Ausgangsprimern wurde das Programm „**Schritt 1**“ verwendet:

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	95 °C	94 °C	50 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	3'00"	0'20"	0'20"	0'30"	2'00"	∞
		35 Zyklen				

Diese PCR-Bedingungen führten in den meisten Fällen zur Synthese des gewünschten PCR-Produktes mit einer Länge von ca. 120-140 bp. In einigen Reaktionen wurden mehrere Produkte gebildet. In diesen Fällen wurde die Synthese des gewünschten Produktes durch Zusatz von Glycerin (10 % Endkonzentration) zum PCR-Ansatz erreicht.

Die im ersten Schritt gebildeten PCR-Produkte 1-7 und 8-14 wurden in Anlehnung an Young und Dong (2004) jeweils als Primer im zweiten PCR-Schritt eingesetzt. Dazu wurden jeweils 20 µl der Primer 1-7 (Mix 3B) oder 8-14 (Mix 3A) vereinigt und durch Phenolextraktion mit anschließender ethanolischer Fällung gereinigt und in Wasser aufgenommen.

Für den zweiten PCR-Schritt zur Synthese der 0,6 kb-Produkte wurde jeweils die optimale Primermenge ermittelt und ein Reaktionsansatz mit folgender Zusammensetzung pipettiert:

- 5 µl Puffer (10×)
 - 1 µl dNTP (200 µM)
 - 1 µl *Pfu*-Polymerase
 - 1-4 µl Mix 3A bzw. 3B
- Mit H₂O auf 50 µl auffüllen.

Die PCR lief unter den Temperaturbedingungen des Programms „**Schritt 2**“ ab:

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing & Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	95 °C	94 °C	68 °C	72 °C	8 °C
Dauer	2'00"	0'30"	2'00"	3'00"	∞
		20 Zyklen			

Um für die nachfolgende Behandlung der PCR-Produkte mit T7-Endonuklease ausreichend Ausgangsmaterial zu haben, wurde jedes der entstandenen 0,6 kb-PCR-Produkte in einem zusätzlichen PCR-Schritt vervielfältigt.

- 0,5 µl DNA (0,6 kb-PCR-Produkt)
- 2 µl dNTP
- 10 µl Puffer
- 1 µl *Pfu*-Polymerase
- 0,2 µl Primer A1 bzw. A45-2
- 0,2 µl Primer U44 bzw. V90
- 86,1 µl H₂O

Die PCR lief unter den Temperaturbedingungen des Programms „**Zusatz-PCR**“ ab:

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	95 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	3'00"	0'30"	0'20"	1'10"	5'00"	∞
		30 Zyklen				

Die PCR-Produkte (Teilstücke 3A und 3B) wurden gefällt und anschließend in Wasser mit T7-Endonuklease-Puffer aufgenommen. Die Behandlung mit T7-Endonuklease ist in Abschnitt 2.10.13.4 beschrieben.

Die Proben wurden nach der Inkubation mit T7-Endonuklease in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Dadurch konnten die durch T7-Endonuklease entstandenen kleineren Fragmente abgetrennt werden. Die 0,6 kb entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert.

Nun wurde ein Aliquot der DNA zusammen mit *Taq*-Polymerase, dNTP (laut Protokoll nur dATP) und dem entsprechenden Puffer für 5 min bei 72 °C inkubiert. Die *Taq*-Polymerase fügt an das 3'-Ende der DNA jeweils ein Adenosin an. Die auf diese Weise behandelte DNA kann mit dem Vektor pGEM-Teasy ligieren. Alternativ dazu erfolgte die Ligation mit dem Vektor pSK-, der mit *EcoRV* linearisiert wurde. Bei dieser Restriktion wurden glatte Enden gebildet, so daß die mittels *Pfu*-Polymerase synthetisierten PCR-Produkte nach der Gelelution ohne weitere Zwischenschritte für die Ligation verwendet werden konnten.

Nach Überprüfung der DNA-Sequenzen mußten noch ein bzw. drei Fehler aus den synthetisierten 0,6 kb-Genfragmenten „entfernt“ werden. Die Fehlerbehebung erfolgte durch erneute PCR. Dazu wurden aus den vorhandenen Primern (A1-V90) jene ausgewählt, die den fehlerhaften Bereich abdecken.

Im Fall des Teilstücks 3A war der einzelne Fehler nah am 5'-Ende gelegen, so daß eine PCR mit den äußersten Primern (A45-2 und V90) und der fehlerhaften DNA als Template unter Verwendung des Programms „**Zusatz-PCR**“ zur Herstellung des fehlerfreien Produktes genügte.

Im Fall des Teilstücks 3B wurden in einem ersten Schritt vier Teilstücke synthetisiert. Dabei diente die fehlerhafte DNA als Template und je PCR-Ansatz wurden zwei geeignete Primer ausgewählt. Zur Amplifizierung wurde das Temperaturprogramm „**Schritt 1**“ verwendet.

Die entstandenen Produkte wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Produkte 1 & 4 und 2 & 3 wurden jeweils in einem Ansatz aus dem Agarosegel eluiert.

In einem zweiten PCR-Schritt wurden die vier synthetisierten Teilstücke als Primer zur Synthese des vollständigen 0,6 kb-Fragmentes eingesetzt. Der PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

3 µl	PCR-Produkte 1 und 4 (außen)
1 µl	PCR-Produkte 2 und 3 (innen)
1 µl	dNTP
5 µl	Puffer
0,5 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase
39,5 µl	H ₂ O

Zur Synthese wurde das folgende Temperaturprogramm verwendet:

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	95 °C	94 °C	58,8 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	3'00"	0'30"	0'30"	1'20"	5'00"	∞
		35 Zyklen				

2.10.12.2 Amplifizierung der *aviD*-Promotor-Region

Amplifizierung der *aviD*-Promotor-Region zur Herstellung eines Expressionsplasmids mit *susy_GC* zur Expression in *S. viridochromogenes* Δ *aviD*.

In dem Ansatz wurden P2S11 (geschnitten mit *SacI*) als Template-DNA und die Primer P-*aviD*-for/P-*aviD*-rev verwendet. Die Zugabe der *Pfu*-Polymerase fand erst nach Erhitzen auf 98 °C statt.

	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
Temperatur	98 °C	95 °C	62 °C	72 °C	72 °C	8 °C
Dauer	5'00"	0'30"	0'30"	0'30"	5'00"	∞
		30 Zyklen				

2.10.13 DNA-modifizierende Enzymreaktionen

Herstellung glatter Enden an DNA-Molekülen

Viele Restriktionsendonukleasen spalten DNA so, daß an einem der beiden Stränge Überhänge entstehen. Für die Ligation von DNA-Molekülen müssen entweder Überhänge vorliegen, die miteinander kompatibel sind oder es müssen „glatte Enden“ ohne Überhang vorliegen. Nach Restriktionen kann es nötig sein, an DNA mit Einzelstrang-Überhängen glatte Enden zu erzeugen. Hierzu können das Klenow-Fragment oder die T4-DNA-Polymerase eingesetzt werden.

2.10.13.1 Klenow-Fragment

Das Klenow-Fragment ist die C-terminale große Untereinheit der DNA-Polymerase I (aus *E. coli*). Es besitzt 5'→3'-Polymeraseaktivität und 3'→5'-Exonukleaseaktivität und kann somit zum Auffüllen von 5'-Überhängen oder zum Entfernen von 3'-Überhängen verwendet werden.

Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurde die DNA (bis zu 0,25 µg/µl) in 1× Klenow-Puffer gelöst, dNTP-Mix hinzugegeben (0,2 mM Endkonzentration) und mit Klenow-Fragment (1 U/µg DNA) 15 min bei 37 °C inkubiert.

Zum Entfernen von 3'-Überhängen wurden DNA und Klenow-Fragment 5 min bei 37 °C inkubiert und erst dann folgte die Zugabe der dNTP.

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanol-Fällung der DNA durchgeführt oder die DNA wurde per Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert.

2.10.13.2 T4-DNA-Polymerase

Die T4-DNA-Polymerase (aus dem Phagen T4) besitzt ebenfalls 5'→3'-Polymeraseaktivität und 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Dieses Enzym eignete sich ebenso zum Entfernen von 5'-Überhängen und ist die bessere Wahl zum Entfernen von 3'-Überhängen. Die Enzymreaktion kann unter den Bedingungen, wie sie oben für das Klenow-Fragment genannt wurden eingesetzt werden. Dieses Enzym besitzt den Vorteil, daß es auch in den Puffern aus einer vorausgehenden Restriktionsspaltung gute Aktivität aufweist und ein Umpuffern nicht unbedingt erforderlich ist.

2.10.13.3 Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Um zu unterbinden, daß bei einer Ligation ein Großteil des linearisierten Vektors (mit kompatiblen Enden) religiert, wurde die Vektor-DNA mittels alkalischer Phosphatase (CIAP) an den 5'-Enden dephosphoryliert.

Nach einer Restriktionsspaltung (50 µl-Ansatz) und gegebenenfalls Hitzeinaktivierung der Endonuklease wurden 5 µl einer 1:10-Verdünnung des Enzyms (entspricht 0,5 U) hinzugegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Phenolextraktion mit anschließender ethanolischer Fällung oder durch Gelelektrophorese und Gelelution entfernt.

2.10.13.4 T7-Endonuklease I

Um mit PCR-Fehlern behaftete DNA gezielt zu zerschneiden, bietet sich eine Behandlung mit der T7-Endonuklease I an. Die in Puffer aufgenommene DNA wurde 3 min bei 95 °C denaturiert und 5 min bei 75 °C renaturiert, so daß sich die DNA-Stränge neu zusammenlagern. Falls nun zwei DNA-Stränge miteinander hybridisieren, von denen einer Sequenzfehler enthält, können aufgrund der Basenfehlpaarungen an diesen Stellen keine Wasserstoffbrücken-Bindungen gebildet werden. Zu dem Ansatz wurden 10-15 U des Enzyms pipettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym erkennt die Heteroduplex-Bereiche der DNA und schneidet die DNA spezifisch an diesen Stellen. Durch anschließende gelelektrophoretische Auftrennung und Gelelution konnten die verkürzten DNA-Stränge abgetrennt werden.

2.10.13.5 Ligation von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase

Für die Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase eingesetzt. Das Enzym bildet eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-Phosphat-Ende

doppelsträngiger DNA. Ein typischer Ligationsansatz enthielt linearisierten Vektor und zu klonierendes Insert im molaren Verhältnis 1:3, 1 U T4-DNA-Ligase und 1x Ligationspuffer in einem Endvolumen von 10 µl. Die Ansätze wurden 3-4 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Bei glatten Enden wurde über Nacht bei 4 °C ligiert. Anschließend wurde die DNA aus dem Ligationsansatz direkt für die Transformation in *E. coli* verwendet.

2.10.13.6 TA-Klonierung

Zur direkten Insertion eines PCR-Produktes in einen Plasmidvektor wurde das „pGEM-T Easy Vector System“ (Promega) verwendet. Das linearisierte Vektormolekül trägt am 3'-Ende je ein ungepaartes Desoxythymidin. Für die PCR oder im Anschluß an diese muß eine DNA-Polymerase eingesetzt werden, die unabhängig von der Matrizen-DNA dem 3'-Ende des synthetisierten PCR-Produktes ein einzelnes Desoxyadenosin-Molekül hinzufügt (z.B. *Taq*-Polymerase). Diese Eigenschaft wurde für die Klonierung des PCR-Produktes in den Vektor pGEM-T Easy genutzt. Die Ligationen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt, wobei in Abwandlung zum Protokoll nur 0,2 µl Vektor für einen 10 µl-Ligationsansatz eingesetzt wurden. Nach der Ligasereaktion wurde der gesamte Ligationsansatz zur Transformation von *E. coli* verwendet.

Um das PCR-Produkt aus einer Synthese mit *Pfu*-Polymerase für die TA-Ligation vorzubereiten, wurde ein Aliquot der DNA zusammen mit *Taq*-Polymerase, dNTP (laut Protokoll nur dATP) und dem entsprechenden Puffer für 5 min bei 72 °C inkubiert. Die *Taq*-Polymerase fügt an das 3'-Ende der DNA jeweils ein Adenosin an. Die auf diese Weise behandelte DNA kann mit dem Vektor pGEM-T Easy ligieren.

2.10.14 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Sequenzierung der in dieser Arbeit erstellten Plasmidkonstrukte wurde die Dienstleistung der Firma 4base lab (Reutlingen) in Anspruch genommen.

2.10.15 Sequenzvergleiche mit Datenbanken

Sequenzvergleiche mit Datenbanken wurden mit dem BLAST-Programm durchgeführt (NCBI GenInfo Network, USA; Altschul *et al.*, 1997). Diese Software ist unter der Webadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> zugänglich.

2.10.16 Southern-Hybridisierung

Diese Methode macht sich die Tatsache zunutze, daß zwei Nukleinsäurestränge (DNA-DNA), die zueinander komplementär sind, durch spezifische Basenpaarung einen Doppelstrang ausbilden können. Die zu untersuchende DNA wird dabei zunächst aus einem Agarosegel durch das „Blotten“ auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und anschließend fixiert. Eine markierte, spezifische DNA-Sonde kann dann mit der DNA auf der Membran hybridisieren, sofern komplementäre Nukleotidsequenzen vorhanden sind. Anschließend kann die auf der Membran gebundene Sonden-DNA aufgrund der Markierung detektiert werden.

Die DNA-Restriktionsfragmente wurden in einem Agarosegel (0,8 %) elektrophoretisch bei niedriger Spannung aufgetrennt. Zur späteren Identifizierung und Bestimmung der Größe bestimmter hybridisierter Fragmente wurde ein DIG-markierter Längenstandard aufgetragen. Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel kurz in EtBr-Lösung gefärbt und auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Das Agarosegel wurde 10 min in Salzsäure (250 mM) inkubiert. Danach wurde es jeweils 2 × 15 min mit Denaturierungspuffer bzw. Neutralisierungspuffer behandelt.

2.10.16.1 Transfer der DNA auf eine Membran („Southern Blot“)

Mit dem neutralisierten Gel wurde der „Southern Blot“ aufgebaut werden. Das Gel wurde mit der Unterseite nach oben auf eine Lage Whatman-3MM-Papier, dessen Enden in eine mit 20× SSC-Puffer gefüllte Schale tauchen, möglichst luftblasenfrei überführt. Auf das Gel wurde eine auf Gelgröße zugeschnittene mit 20× SSC-Puffer benetzte Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) gelegt. Die Membran wurde mit zwei weiteren Lagen Whatman-3MM-Papier in Gelgröße bedeckt. Darauf wurde ein ca. 10 cm hoher Stapel saugfähiger Papierhandtücher gelegt. Obenaufl wurden zum Beschweren eine Glasplatte und ein Zusatzgewicht von ca. 0,5 kg gelegt. Die DNA-Fragmente werden durch Kapillarkräfte aus dem Agarosegel herausgelöst und auf die Nylonmembran übertragen. Nach ca. 12 h wurde die auf die Nylonmembran transferierte DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm; Vorderseite 1 min, Rückseite 30 s) fixiert. Mit dieser Membran wurden die Hybridisierung mit Sonden-DNA und die anschließende Detektion durchgeführt.

2.10.16.2 Markierung, Hybridisierung und Detektion von Sonden-DNA

Die für die Southern-Hybridisierung eingesetzten Sonden (PCR-Produkt oder per Restriktion aus Inaktivierungskonstrukt gewonnenes Gen) wurden nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des „DIG High Prime DNA Labeling and Detection-Kit II“ (Roche Molecular Biochemicals) durch Einbau von Digoxigenin-dUTP markiert, hybridisiert und detektiert. Nach Hybridisierung der DIG-markierten DNA-Sonde mit der membrangebundenen DNA erfolgte der Nachweis der Hybride. Dabei binden Antikörper-Konjugate (Anti-DIG mit

alkalischer Phosphatase) an das Digoxigenin. Das Detektionsreagenz CSPD wird durch die AP dephosphoryliert, was mit einer Lichtemission einhergeht. Diese Chemilumineszenz ist mittels Röntgenfilm nachweisbar.

2.10.16.3 Puffer für die Southern-Hybridisierung und für die Sonden-Detektion

Antikörper-Lösung	50,0 ml	Blocking-Puffer	
	5 µl	Anti-DIG-AP-Konjugat	
Blocking-Puffer	10 ml	10x Blocking solution (Roche Diagnostics)	
		Mit Maleinsäurepuffer auf 100 ml auffüllen.	
Denaturierungspuffer	20 g	NaOH	
	87,66 g	NaCl	H ₂ O bidest. ad 1000 ml
Detektionspuffer	12,1 g	Tris in 980 ml H ₂ O	pH 9,5 mit konz. HCl einstellen
	20 ml	5 M NaCl	
Hybridisierungspuffer	25 ml	20x SSC-Puffer	
	0,2 ml	SDS [10 % (m/v)]	
	10 ml	N-Laurylsarkosin [1 % (m/v)]	H ₂ O bidest. ad 100 ml
	1,5 g	Magermilchpulver	zum Lösen kurz erwärmen
Maleinsäurepuffer	11,60 g	Maleinsäure	
	8,77 g	NaCl	H ₂ O bidest. ad 900 ml
		Mit NaOH-Plätzchen pH 7,5 einstellen und auf 1000 ml auffüllen.	
Neutralisierungspuffer	60,55 g	Tris	
	175,32 g	NaCl	pH 7,5 mit konz. HCl einstellen; H ₂ O bidest. ad 1000 ml
Prähybridisierungspuffer	25 ml	20x SSC-Puffer	
	0,2 ml	SDS [10 % (m/v)]	
	10 ml	N-Laurylsarkosin [1 % (m/v)]	H ₂ O bidest. ad 100 ml
	3 g	Magermilchpulver	zum Lösen kurz erwärmen
SSC-Puffer (20x)	175,32 g	NaCl	
	88,23 g	tri-Natriumcitrat x 2 H ₂ O	pH 7,0 einstellen
Tween-Waschpuffer	200 ml	Maleinsäurepuffer	
	0,6 ml	Tween 20	
2x Waschpuffer	10 ml	20x SSC-Puffer	
	1 ml	SDS [10 % (m/v)]	
	89 ml	H ₂ O bidest.	
1x Waschpuffer	0,5 ml	20x SSC-Puffer	
	1 ml	SDS [10 % (m/v)]	
	98,5 ml	H ₂ O bidest.	

2.10.17 Überexpression und Reinigung heterolog exprimierter Enzyme aus Streptomyceten

2.10.17.1 Herstellung zellfreier Proteinrohextrakte von UrdR, AviS, AviT und SimB7

Ausgehend von einer Streptomyceten-Vorkultur wurden 100 ml CRM-Medium (mit Thiostrepton) in einem 300 ml-Kolben mit einer Schikane beimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 100 rpm auf einem Schüttler inkubiert.

Die mit Expressionsplasmiden transformierten *S. fradiae*-Mutanten A0 und RN-435 wurden in CRM-Medium kultiviert. Nach vier Tagen Wachstum wurde die Kulturlösung abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde gewogen und anschließend in 2-3 ml Lysepuffer/g resuspendiert. Dem Lysepuffer wurde zuvor Lysozym (1 mg/ml) zugesetzt. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich geschwenkt, damit das Lysozym die Bakterienzellwände auflösen kann. Anschließend folgte der mechanische Zellaufschluß in einer vorgekühlten Standardzelle (40 kpsi, 35 ml) unter Verwendung der „French Press“-Apparatur mit einem Maximaldruck von 18000 psi (\approx 1241 bar). Zu dem entstandenen Lysat wurden RNase A (10 µg/ml) und DNase I (5 µg/ml) gegeben. Durch Zentrifugation (5000 rpm, 30 min, 4 °C) wurden feste Zellbestandteile pelletiert. Pellet und Überstand wurden getrennt und direkt weiter verwendet oder zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

Lysepuffer (Ni-NTA)	50 mM	NaH ₂ PO ₄	
	300 mM	NaCl	
	10 mM	Imidazol	pH 8,0 mit NaOH einstellen

2.10.17.2 Enzymreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

4 ml der proteinhaltigen löslichen Zellsubstanz wurden gemäß der Herstellerbeschreibung mit 1 ml Nickel-NTA-Agarose (Qiagen; NTA = Nitriltriessigsäure) versetzt.

Die Suspension wurde mittels Magnetührer für 2 Stunden bei 4 °C gerührt und anschließend in eine Säule überführt. Eine Fritte hielt dabei die Ni-NTA-Agarose mit den daran gebundenen Proteinen zurück und der Durchlauf wurde aufgefangen. Die Ni-NTA-Agarose wurde zweimal mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen und nachfolgend viermal mit je 500 µl Elutionspuffer eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt gesammelt und für die Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet.

Waschpuffer (Ni-NTA)	50 mM	NaH ₂ PO ₄	
	300 mM	NaCl	
	20 mM	Imidazol	pH 8,0 mit NaOH einstellen

Elutionspuffer (Ni-NTA)	50 mM	NaH ₂ PO ₄	
	300 mM	NaCl	
	250 mM	Imidazol	pH 8,0 mit NaOH einstellen

2.10.18 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Laemmli, 1970).

Für die Elektrophorese wurde die Elektrophorese-Apparatur „Mini Protean 3“ von Bio-Rad verwendet. Die Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele mit Sammel- und Trenngel, die Probenvorbereitung und die elektrophoretische Proteinauftrennung wurden gemäß dem Benutzerhandbuch durchgeführt.

Der Proteinextrakt wurde vor dem Auftragen auf das Gel im Verhältnis 1:1 mit Protein-Ladepuffer versetzt und 5 min bei einer Temperatur von 95 °C denaturiert. Ein definierter Proteinstandard (Bio-Rad; 14,4-97 kDa) diente zur Abschätzung des Molekulargewichts. Zum Anfärben der Proteine wurde das Sammelgel etwa 5-10 min in Färbelösung geschwenkt. Die Entfernung des ungebundenen Farbstoffs erfolgte durch dreimaliges Waschen in Entfärbelösung für jeweils 1 h. Nach dem Entfärben wurden die Gele über Nacht in eine ca. 5%ige Glycerinlösung gelegt. Zur Konservierung wurden die Gele zwischen Cellophanfolie eingebettet, in einen Rahmen gespannt und getrocknet.

Die Polyacrylamidgele (8,0 cm × 7,3 cm × 0,075 cm) hatten folgende Zusammensetzung:

Sammelgel (4 %)	6,1 ml	H ₂ O bidest.
	2,5 ml	Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)
	100 µl	SDS (10 % (w/v))
	1,33 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 % (w/v); Rotiphorese® Gel 30)
	50 µl	APS (10 % (w/v))
	10 µl	TEMED

Trenngel (12 %) für 10-100 kD-Proteine		
	3,35 ml	H ₂ O bidest.
	2,5 ml	Tris/HCl (0,5 M; pH 8,8)
	100 µl	SDS (10 % (w/v))
	4,0 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 % (w/v))
	50 µl	APS (10 % (w/v))
	5 µl	TEMED

Die 10%ige APS-Lösung (50 mg in 500 µl H₂O bidest.) stets frisch zubereiten; vor Zugabe von APS und TEMED mind. 15 min bei RT entgasen.

Probenpuffer für Acrylamidgele	3,8 ml	H ₂ O bidest.
	1,0 ml	Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)
	1,6 ml	SDS (10 % (w/v))
	0,8 ml	Glycerin
	0,4 ml	Bromphenolblau (1 % (w/v))
	0,4 ml	β-Mercaptoethanol (zum Schluß zugeben)

Die Probe mindestens 1:4 mit Ladepuffer verdünnen und 4 min bei 95 °C denaturieren.

Laufpuffer für Acrylamidgele (5 x)	15 g/l	Tris	
	72 g/l	Glycin	
	5 g/l	SDS	pH 8,3 einstellen

Bei 4 °C lagern; falls Ausfällung vor Gebrauch auf RT erwärmen. 60 ml der 5fach konzentrierten Lösung mit 240 ml H₂O bidest. verdünnen und für die Elektrophorese verwenden.

Färbelösung	2,5 g/l	Coomassie Brilliant Blau G250
	45 % (v/v)	H ₂ O bidest.
	45 % (v/v)	Methanol bzw. Ethanol (vergällt)
	10 % (v/v)	Essigsäure

Den Farbstoff in Wasser und Ethanol unter Rühren (ca. 1 h) auflösen; Lösung filtrieren und Essigsäure zum Schluß hinzugeben.

Entfärbelösung	45 % (v/v)	H ₂ O bidest.
	45 % (v/v)	Methanol bzw. Ethanol (vergällt)
	10 % (v/v)	Essigsäure

Das gefärbte Proteingel zunächst mit VE-Wasser abspülen, anschließend ca. 1 h entfärben (evtl. die Entfärbelösung erneuern).

2.11 Sekundärstoffanalytik

2.11.1 Isolierung von Sekundärstoffen

Die verwendeten Streptomycceten-Arten schleusen die gebildeten Sekundärmetabolite aus der Zelle aus, so daß sie durch Extraktion aus dem Kulturmedium gewonnen werden können.

2.11.1.1 Extraktion im analytischen Maßstab

Zur Extraktion von Sekundärstoffen aus Streptomycceten-Kulturen im analytischen Maßstab wurde jeweils 1 ml aus einer Produktionskultur entnommen und mit 1 ml Ethylacetat vermischt. Die Extraktion erfolgte durch wiederholtes Schütteln über einen Zeitraum von ca. 20 min und anschließender Phasentrennung durch Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, RT). Die organische Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und zur Trockene einrotiert. Der trockene Rohextrakt wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.11.1.2 Extraktion im präparativen Maßstab

Bei Aufarbeitung größerer Volumina wurde das Myzel durch Zentrifugation (5000 rpm, 10 min, 4 °C) oder Filtration über HDC-Membranfilter (Pall Gelman, Dreieich; Porengröße 40 µm) von der Kulturlösung getrennt. Die Extraktion der Sekundärstoffe aus der Kulturlösung wurde mit Ethylacetat im Volumenverhältnis 1:1 durchgeführt. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

Bei *S. viridochromogenes* wurde zur Untersuchung von Mutanten zusätzlich das Myzel in Aceton suspendiert und mittels Magnetrührer für 30 min extrahiert. Das Aceton wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in 100 ml Wasser aufgenommen und zwei Mal mit demselben Volumen Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde unter Vakuum vollständig entfernt. Der Myzelextrakt wurde mit dem Extrakt aus dem Kulturmedium vereinigt.

Der Rohextrakt wurde in trockenem Zustand bei -20 °C gelagert. Für analytische Untersuchungen wurden die Extrakte in Methanol oder Acetonitril gelöst und für DC- oder LC-MS-Analysen eingesetzt.

2.11.2 Agardiffusionstest

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Extrakten aus *S. viridochromogenes* und *S. diastatochromogenes* wurden Agardiffusionstests durchgeführt. Um Platten mit dem Testkeim *Bacillus subtilis* herzustellen, wurden 500 ml DM-Agar auf 40-45 °C abgekühlt, mit 12 ml Sporensuspension vermischt und Platten gegossen. Der Rohextrakt aus Avilamycin- oder Polyketomycin-produzierenden Stämmen oder deren Mutanten wurde in Methanol gelöst. 10-20 µl der Lösung wurden auf ein Antibiotika-Testblättchen pipettiert. Als Positivkontrolle wurde eine Avilamycin-Standard-Lösung und als Negativkontrolle reines Methanol eingesetzt. Die getrockneten Testblättchen wurden auf eine Testplatte mit *B. subtilis*-Sporen aufgelegt und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.11.3 Dünnschichtchromatographie

Zur qualitativen Auswertung der Rohextrakte aus Avilamycin-, Polyketomycin- oder Urdamycin-produzierenden Stämmen und deren Mutanten wurde die dünnschichtchromatographische Analytik eingesetzt. Mit einer Glaskapillare wurden die in Methanol gelösten Proben als Bande auf die Kieselgelplatte aufgetragen. Als Laufmittel wurde für Urdamycine und Avilamycine eine Mischung aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 9:1 (v/v) und für Polyketomycine eine Mischung aus Dichlormethan, Methanol und Eisessig im Verhältnis 10:1:0,03 (v/v) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte über eine Laufstrecke von 15 cm.

Zur Detektion von Avilamycin wurde die Kieselgelplatte nach der Entwicklung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (1 % Anisaldehyd in Methanol/Eisessig/Schwefelsäure (8:1:1)) besprüht und auf 110 °C erhitzt. Durch den hohen Zuckeranteil tritt eine Schwarzfärbung der Avilamycine auf. Für andere Proben erfolgte die Auswertung durch Betrachtung der entwickelten DC-Platte bei Tageslicht oder unter UV-Licht (254 nm).

2.11.4 Massenspektrometrische Analyse

Zur qualitativen Analyse der Extrakte, die aus dem Polyketomycin-Produzenten *S. diastatochromogenes* Tü6028 und der *pokGT1*-Mutante gewonnen wurden, erfolgten Messungen an der LC-MS-Anlage „Agilent 1100 Series System“ mit einer Elektrospray-Kammer und einem Quadrupol-Detektor (Agilent Technologies, Waldbronn). Die Messungen wurden freundlicherweise von Andreas Günther durchgeführt.

Der Diodenarraydetektor (DAD) war direkt mit dem Massendetektor (MSD) gekoppelt. Zur Steuerung der Anlage und Auswertung der Analysen wurde die Software Chemstation verwendet. Als analytische Säule wurden eine Zorbax XDB-C8 (150 mm × 4,6 mm; 5 µm) und als Vorsäule eine Zorbax SB-C18 (12,5 mm × 4,6 mm; 5 µm) verwendet. Die Temperatur des Säulenofens betrug 35 °C. Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung

eines nichtlinearen Gradienten aus den Laufmitteln Acetonitril und 0,5%iger Essigsäure, der in Tab. 2.8 angegeben ist.

Zur Detektion des Polyketomycins und möglicher Vorläufer-Produkte wurden $\lambda_1=214$ nm, $\lambda_2=245$ nm, $\lambda_3=282$ nm und $\lambda_4=446$ nm für die DAD-Aufzeichnung gewählt. Die Messungen erfolgten im negativen Modus im Massenbereich von 300 bis 1000 Dalton. Die Parameter sind in Tab. 2.9 zusammengefaßt.

Tab. 2.8: HPLC-Gradient unter Verwendung der Laufmittel Acetonitril (A) und 0,5 % Essigsäure (B) zur Auftrennung von Extrakten aus dem Wildtyp- bzw. $\Delta pokGT1$ -Stamm von *S. diastatochromogenes* Tü6028.

Zeit (min)	Fluß (ml/min)	% A	% B
0	0,7	35	65
5,0	0,7	35	65
20,0	0,7	70	30
23,0	0,7	95	5
27,0	0,7	95	5
30,0	0,7	35	65
35,0	0,7	35	65

Tab. 2.9: MSD-Einstellungen für analytische Messungen unter Verwendung der ESI-Quelle.

MSD-Parameter	
Massenbereich	300-1000 Da
Fragmentor-Spannung	70 V
Trockengas-Strom	12 l/min
Trockengas-Temperatur	350 °C
Vernebler-Druck	50 psig
Kapillarspannung	± 3000 V

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Polyketomycin-Clusters

3.1.1 Herstellung und Screening einer Cosmidbank

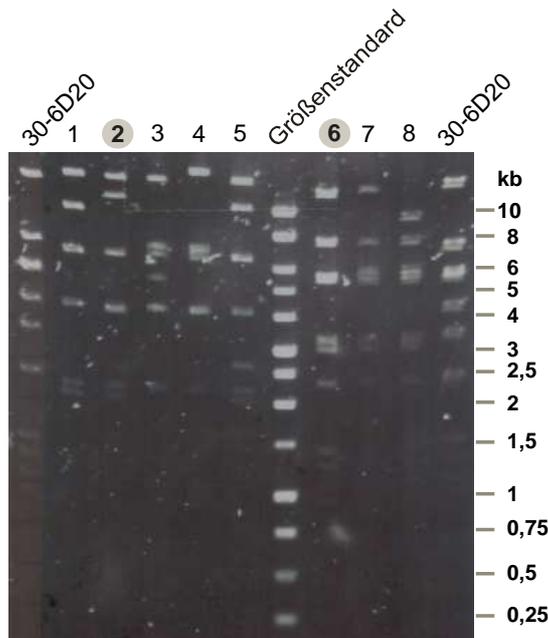
Das Polyketomycin-Biosynthesegencluster sollte im Genom des Produzenten-Stammes *S. diastatochromogenes* Tü6028 lokalisiert werden. Dazu wurde ausgehend von genomischer DNA des Bakteriums eine Cosmidbank erstellt. Die Cosmid-Inserts wurden durch partielle Spaltung der genomischen DNA mit *Sau3AI* gewonnen und in die *Bam*HI-Schnittstelle des Cosmid-Vektors pOJ436 ligiert, verpackt (Gigapack[®] III Gold Packaging Extract) und in *E. coli* DH5 α transfiziert. Die Herstellung und das Screening der Cosmidbank wurden durch die Firma Combinature Biopharm AG (Berlin) durchgeführt.

Zum Screening nach Cosmiden, die mögliche Polyketomycin-Biosynthesegene tragen, wurden eine Typ-II-PKS-Sonde und eine 4,6-Dehydratase-Sonde eingesetzt. Da die Struktur des Polyketomycins bereits bekannt war, ist eine Beteiligung dieser Enzyme an der Polyketomycin-Biosynthese sehr wahrscheinlich. Zur PCR-Amplifizierung der Sonden-DNA wurden degenerierte Primer, die an konservierten Bereichen von Typ-II-PKS- bzw. 4,6-Dehydratase-Genen binden, und genomische DNA aus *S. diastatochromogenes* als Template eingesetzt. Die dabei verwendeten Primerpaare PKSII-for/-rev und 4,6-DH-for/-rev sind in Tab. 2.5 aufgeführt.

Das Cosmid CB30-6D20 hybridisierte mit diesen Sonden und wurde für die Sequenzierung zur Verfügung gestellt. Als deutlich wurde, daß dieses Cosmid nicht alle Strukturgene für die Polyketomycin-Biosynthese enthält, wurde ein weiteres Screening unter Verwendung der zwei spezifischen Sonden 30-6D20-L und 30-6D20-R (s. Abschnitt 6.3 im Anhang) durchgeführt. Dabei wurden acht mögliche Anschlußcosmide detektiert. Einige der Cosmide hybridisierten nicht nur mit einer der spezifischen Sonde, sondern auch mit der Sonden-DNA für Typ-II-PKS-Gene und/oder für 4,6-Dehydratase-Gene. In Tab. 2.4 sind die bereitgestellten Cosmide aus der Cosmidbank aufgelistet.

3.1.2 Klonierung und Sequenzierung des Polyketomycin-Clusters

Mit dem zuerst bearbeiteten Cosmid CB30-6D20 wurde durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) eine „Shotgun“-Sequenzierung mit 4facher Abdeckung durchgeführt. Aus den so gewonnenen Daten erstellte Dr. Tilmann Weber (AK Prof. Dr. Wohlleben, Universität Tübingen) unter Verwendung der Software Artemis sechs sogenannte „Contigs“ (von *contiguous* = zusammenhängend). Die Anordnung der sechs *Contigs* mit einer Gesamtgröße



von 32,2 kb und deren Orientierung konnten im Verlauf der weiteren Sequenzauswertungen geklärt werden.

Nachdem sich abzeichnete, daß das Cosmid CB30-6D20 nicht das vollständige Cluster enthält, wurden acht mögliche Anschluß-cosmide per Restriktionsanalyse untersucht. Die Analyse (s. Abb. 3.1) ergab, daß alle acht Cosmide mit CB30-6D20 überlappen. Die Cosmide CB30-4E08 (Nr.2) und CB30-2A21 (Nr.6) wurden ausgewählt und in die Sequenzierungsarbeit mit einbezogen.

Abb. 3.1: Auftrennung der neun Cosmide aus *S. diastatochromogenes* Tü6028 im Agarosegel nach Restriktion mit *Bam*HI. Die markierten Cosmide Nr.2 und 6 wurden neben 30-6D20 für die weitere Bearbeitung ausgewählt.

Um DNA-Abschnitte innerhalb der sehr großen Cosmid-Inserts sequenzieren zu können, wurden Subklone erstellt. Zunächst wurden die Subklone ausgehend von *Bam*HI-Restriktionsfragmenten und Ligation derselben mit pSK- erstellt. In einigen Fällen entstanden jedoch sehr große Fragmente, die nicht einfach zu sequenzieren waren. Daher wurden auch Subklone ausgehend von *Sac*I-, *Not*I- und *Nco*I-Fragmenten erstellt, die in den Vektor pSK- bzw. Litmus28 eingebracht wurden. Die Subklone, die ausgehend von den drei untersuchten Cosmiden erstellt wurden, sind in Tab. 3.1 aufgelistet.

Tab. 3.1: Subklone aus *S. diastatochromogenes* Tü6028. Übersicht über die Plasmide, die ausgehend von *Bam*HI-, *Not*I-, *Sac*I- oder *Nco*I-Fragmenten aus den Cosmiden CB30-6D20, CB30-4E08 und CB30-2A21 erstellt wurden. Die Fragmente wurden entweder in den Vektor pSK- oder Litmus28 ligiert und ansequenziert.

Cosmid	Subklon	Insert-Größe	Enzym	Anmerkung
CB30-6D20	pSK/14	~5,6 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/15	~4,2 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/22	~2,3 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/61	224 bp und ~5,6 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/93	~3,4 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/50	12 bp, 53 bp, 224 bp und 1086 bp	<i>Bam</i> HI	
	pSK/74	1086 bp	<i>Bam</i> HI	
	pSK/81	1262 bp	<i>Bam</i> HI	
	pSK/1-24	~2,3 kb + Cosmid-Vektor	<i>Bam</i> HI, <i>Sau</i> 3AI	

Cosmid	Subklon	Insert-Größe	Enzym	Anmerkung
CB30-4E08	pSK/213	~6,5 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/226	~2,1 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/240	~2,0 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/2-250-3	~0,3 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/2-750-9	~0,75 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/2-412	~4,1 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/2-110	~11 kb	<i>Bam</i> HI	mit Cosmid-Vektor pOJ436
	pSK/2-110-55	~2,5 kb		verkürzt mit <i>Spe</i> I/ <i>Xba</i> I
	pSK/2-140	~14 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/2-54	~6,4 kb	<i>Not</i> I	
	pSK/2-64	50 bp und ~4,1 kb	<i>Not</i> I	
	pSK/2-81	~1,7 kb	<i>Sac</i> I	
	pSK/2-85	~3,5 kb	<i>Sac</i> I	
	pLitmus/2N5	~0,4 kb	<i>Nco</i> I	<i>myo</i> -Inositol-Metabolismus-Protein
	pLitmus/2N7	~1,8 und ~4,7 kb	<i>Nco</i> I	hyp. Protein; Glykosyltransferase (<i>pokGT1</i>)
	pLitmus/2N11	~0,6 kb	<i>Nco</i> I	<i>myo</i> -Inositol-Metabolismus-Protein
	pLitmus/2N14	~2,3 kb	<i>Nco</i> I	Eisen-Transportprotein (<i>E. coli</i>)
	pLitmus/2N15	~5,3 kb	<i>Nco</i> I	<i>myo</i> -Inositol-Metabolismus-Protein
pLitmus/2N20	~6,6 kb	<i>Nco</i> I	2,3-Dehydratase (<i>pokS3</i>)	
CB30-2A21	pSK/6-72	~7,2 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/6-120	~12 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/6-28/30	~3,0 kb	<i>Bam</i> HI	
	pSK/6-76	~2,2 kb	<i>Sac</i> I	

3.1.3 Auswertung der Sequenzdaten

Die erhaltenen Sequenz-Rohdaten wurden mit entsprechender Software (s. 2.8) bearbeitet und ausgewertet. Durch „Alignen“ der Einzelsequenzen konnten die Lücken zwischen den „Contigs“ geschlossen werden. Die resultierende Gesamtsequenz hat eine Größe von 52,2 kb, und es konnten 41 vollständige ORF identifiziert werden. Des weiteren wurde ein 6,9 kb großer randständiger Sequenzabschnitt von Cosmid CB30-4E08 analysiert, der weitere fünf vollständige ORF umfaßt. Der durchschnittliche GC-Gehalt beträgt in dem sequenzierten 52,1 kb-Bereich 72,3 % und im 6,9 kb-Abschnitt 73,3 %. Diese Werte entsprechen dem bei Streptomycceten üblichen hohen GC-Gehalt (Wright und Bibb, 1992). Zur Bestimmung der Lage der Start- und Stopp-Codone der putativen Gene wurde besonders der GC-Gehalt der jeweils dritten Base in den Basentriplets aller drei Leserahmen betrachtet. Ist der GC-Gehalt sehr hoch, so gibt dies Hinweis darauf, daß es sich um den Leserahmen mit genetischer Information handelt. Auf diese Weise konnten auch Sequenzierfehler, die zu Leserahmenverschiebungen führten, auffindig gemacht und korrigiert werden.

Die nachfolgende Abb. 3.2 zeigt die sequenzierten Bereiche mit Lage der ORF. Eine entsprechende Karte mit Angabe der Lage der Cosmide und Subklone befindet sich im Anhang unter Abschnitt 6.2.

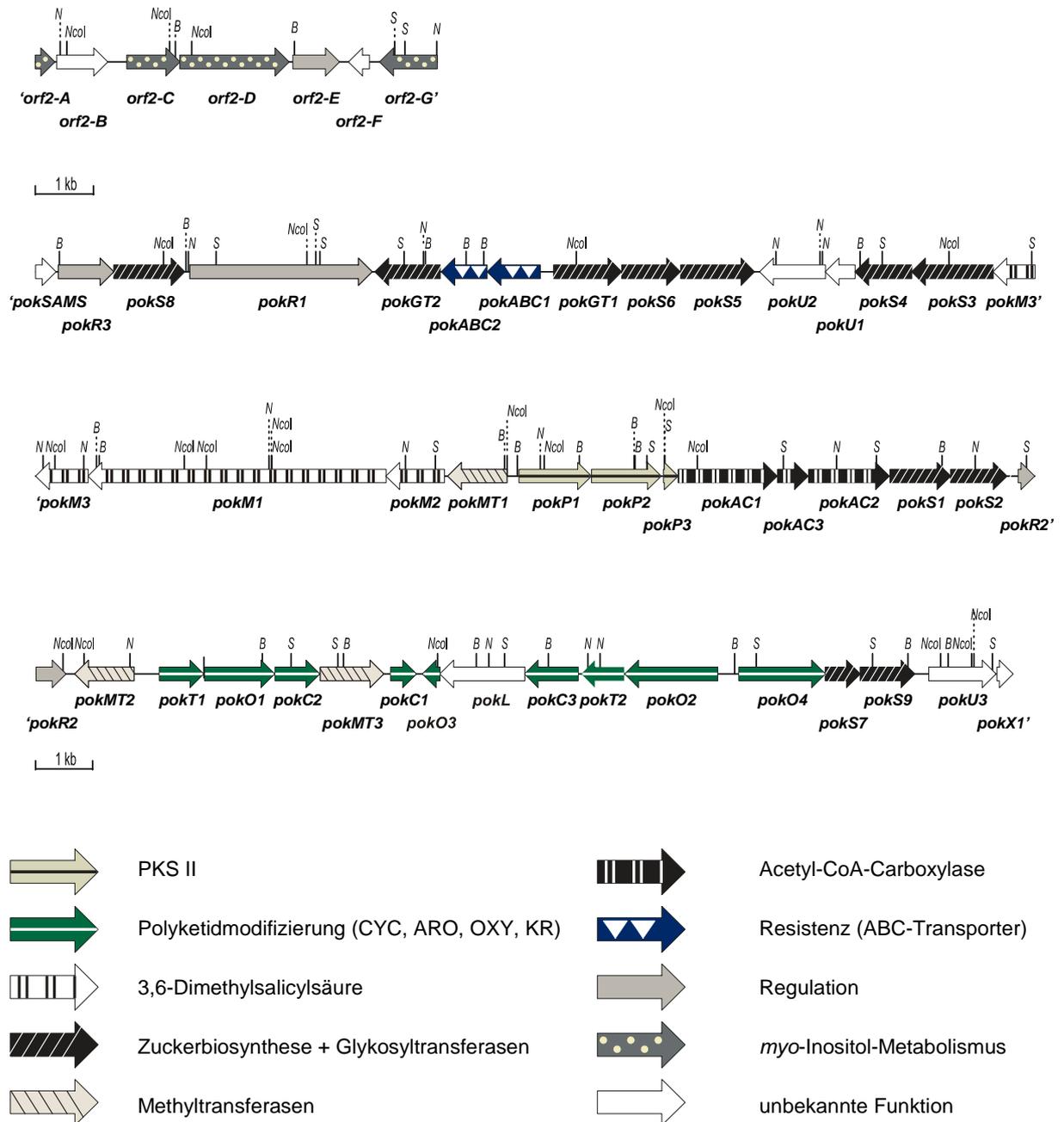


Abb. 3.2: Physikalische Karte der sequenzierten Bereiche aus den Cosmiden CB30-6D20, CB30-4E08 und CB30-2A21. Neben der 52,1 kb-Sequenz mit 41 vollständigen ORF ist im oberen Teil der Abbildung ein 6,9 kb-Abschnitt mit fünf vollständigen ORF dargestellt. Die Lage der Restriktionsschnittstellen, die bei der Erstellung von Subklonen von Bedeutung waren, ist ebenfalls angegeben (*B* = BamHI, *N* = NotI, *NcoI* und *S* = SacI).

Ausgehend von den ORF wurden die zugehörigen Aminosäuresequenzen abgeleitet und zum Abgleich mit Datenbanksequenzen verwendet. Daraufhin konnten Vorhersagen über die mögliche Funktion der Proteine gemacht werden. Die daraus resultierenden Daten sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2: Übersicht über das Polyketomycin-Cluster mit abgeleiteten Proteinen und deren möglicher Funktion; AS = Länge der Aminosäuresequenz, ID = Zahl identischer Aminosäuren; PO = Zahl ähnlicher Aminosäuren

Protein	AS	mögliche Funktion	Sequenzähnlichkeit zu	Stamm	ID/PO in %	„Accession“-Nr./Referenz
PokSAMS	>118	S-Adenosylmethionin-Synthetase (unvollst.)	S-Adenosylmethionin-Synthetase	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	84/88	NP_625757; Bentley <i>et al.</i> , 2002
PokR3	326	Carbohydratkinase (Regulation)	putative Carbohydratkinase RemJ (Kinase)	<i>S. sp.</i> AM-7161 <i>S. resistomylicicus</i> DSM 40133 ^T	65/76 63/73	BAC79034; Ichinose <i>et al.</i> , 2003 CAE51179; Jakobi und Hertweck, 2004
PokS8	415	NDP-Hexose-3-C-Methyltransferase	NDP-Hexose-3-C-Methyltransferase (TylCIII) ORF1	<i>S. fradiae</i> T59235 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	66/77 62/72	AAD41823; Bate <i>et al.</i> , 2000 CAA42926; Haydock <i>et al.</i> , 1991
PokR1	1065	Transkriptionsregulator	putativer Transkriptionsregulator putatives regulatorisches Protein (AfsR-ähnlich)	<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152 <i>S. coelicolor</i> A3(2)	40/54 34/44	BAD58294; Ishikawa <i>et al.</i> , 2004 NP_628294; Bentley <i>et al.</i> , 2002
PokGT2	382	Glykosyltransferase	putative NDP-Rhamnosyltransferase (SpnG) putative Glykosyltransferase	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> <i>S. cyanogenus</i> S136	35/48 37/51	AAG23268; Waldron <i>et al.</i> , 2001 AAD13555; Westrich <i>et al.</i> , 1999
PokABC2	269	ABC-Transporter (Transmembran-Komponente)	ORF2 putativer ABC-Transporter (Transmembran-Komponente)	<i>S. rochei</i> F20 <i>S. coelicolor</i> A3(2)	41/66 39/63	CAA75762; Fernández-Moreno <i>et al.</i> , 1998 NP_628014; Bentley <i>et al.</i> , 2002
PokABC1	310	ABC-Transporter (ATP-bindende Komponente)	putativer ABC-Transporter (ATP-bindende Komponente) ATP-bindendes Protein	<i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>S. antibioticus</i> ATCC 11891 <i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	53/69 52/69 43/55	NP_626505; Bentley <i>et al.</i> , 2002 AAA26793; Rodríguez <i>et al.</i> , 1993 CAE17547; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
PokGT1	397	Glykosyltransferase	Glykosyltransferase	<i>S. argillaceus</i> ATCC 12956 <i>S. griseoruber</i>	42/53 47/58	CAK50788; Blanco <i>et al.</i> , 2000 AAP85346; Billign <i>et al.</i> , 2004
PokS6	342	Reduktase	Diphospho-4-keto-2,3,6-tridesoxyhexulose-Reduktase NanG4 (NDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase; -4-Epimerase; -4-Reduktase)	<i>S. nanchangensis</i> NS3226	46/58	AAP42863; Sun <i>et al.</i> , 2003
PokS5	432	NDP-Hexose-3-Dehydratase	putative C-3-Dehydratase (AknP) Rdml	<i>S. galilaeus</i> ATCC 31615 <i>S. purpurascens</i>	74/84 74/83	AAF73452; Rätty <i>et al.</i> , 2000 AAL24451; Halo <i>et al.</i>
PokU2	384	Hydroxylase	Hydroxylase (NcnH)	<i>S. arenae</i> DSM 40737	44/55	AAG44124; Brünker <i>et al.</i> , 2001
PokU1	173	Flavinreduktase	putative Flavinreduktase (ActVB)	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	45/59	NP_629242; Bentley <i>et al.</i> , 2002
PokS4	333	NDP-3-Keto-6-desoxyhexose-3-Ketoreduktase	Oxidoreduktase-Homolog NDP-3-Ketoreduktase	<i>S. cyanogenus</i> S136 <i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	55/66 53/63	AAD13550; Westrich <i>et al.</i> , 1999 CAE17522; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
PokS3	476	dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose-2,3-Dehydratase	SimB3	<i>S. antibioticus</i> Tü6040	55/68	AF322256; Trefzer <i>et al.</i> , 2002
PokM3	551	Salicyl-AMP-Ligase	Adenylatligase Salicyl-AMP-Ligase (SdgA)	<i>S. carzinostaticus</i> subsp. <i>neo-carzinostaticus</i> ATCC 15944 <i>Streptomyces</i> sp. WA46	55/67 54/68	AAM77987; Liu <i>et al.</i> , 2005 BAC78380; Ishiyama <i>et al.</i> , 2004
PokM1	1739	Iterative PKS1, 6-Methylsalicylsäure-Synthase	iterative Typ-I-Polyketidsynthase NcsB CalO5	<i>S. carzinostaticus</i> subsp. <i>neo-carzinostaticus</i> ATCC 15944 <i>Micromonospora echinospora</i> ssp. <i>calichensis</i>	48/62 46-52/58-63	AAM77986; Liu <i>et al.</i> , 2005 AAM70355; Ahlert <i>et al.</i> , 2002
PokM2	342	β -Ketoacyl-ACP-Synthase	AviM AviN CalO4	<i>S. viridochromogenes</i> Tü57 <i>S. viridochromogenes</i> Tü57 <i>Micromonospora echinospora</i> ssp. <i>calichensis</i>	40-52/59-63 42/61 42/58	AAK83194; Weitnauer <i>et al.</i> , 2001b AAK83178; Weitnauer <i>et al.</i> , 2001b AAM70354; Ahlert <i>et al.</i> , 2002
PokMT1	347	(O-)Methyltransferase	SAM-abhängige Methyltransferase putative Methyltransferase (GrhL) Ketosynthase	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101 <i>Streptomyces</i> sp. JP95 <i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	38/58 28/46 74/81	EAO29425; Copeland <i>et al.</i> , A) AAM33664; Li und Piel, 2002 CAE17527; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
PokP1	422	Ketosynthase α	Ketoacyl-Synthase (MtmP)	<i>S. argillaceus</i> ATCC 12956	74/82	CAA61989; Lombó <i>et al.</i> , 1996
PokP2	407	Ketosynthase β (CLF)	putative Ketosynthase (SimA2) putativer CLF (UrdB)	<i>S. antibioticus</i> Tü6040 <i>S. fradiae</i> Tü2717	63/75 60/76	AAK06785; Trefzer <i>et al.</i> , 2002 CAA60570; Decker und Haag, 1995
PokP3	85	Acyl-Carrier-Protein	Acyl-Carrier-Protein	<i>S. arenae</i> DSM 40737	50/67	AAD20269; Brünker <i>et al.</i> , 1999
PokAC1	579	Acetyl-CoA-Carboxylase/Carboxyltransferase (α - und β -Untereinheit)	Acetyl-Carboxylase (α u. β) Acetyl-Carboxylase (α u. β) Acetyl-Carboxylase (β -Untereinheit) Acetyl-Carboxylase (α -Untereinheit)	<i>S. sp.</i> R1128 <i>Clostridium tetani</i> E88 <i>Deinococcus radiodurans</i> R1 <i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	60/70 41/61 53/65 54/66	AAG30193; Marti <i>et al.</i> , 2000 AAO34787; Brüggemann <i>et al.</i> , 2003 AAF10788; White <i>et al.</i> , 1999 AAR34777; Methé <i>et al.</i> , 2003
PokAC3	178	Biotin-Carboxylase-Carrier-Protein	Biotin-Carboxylase-Carrier-Protein	<i>S. sp.</i> R1128 <i>Saccharopolyspora hirsuta</i> 367	45/56 39/54	AAG30192; Marti <i>et al.</i> , 2000 AAA26486; Le Gouill <i>et al.</i> , 1993
PokAC2	470	Biotin-Carboxylase	Biotin-Carboxylase	<i>S. sp.</i> R1128	63/74	AAG30191; Marti <i>et al.</i> , 2000

Protein	AS	mögliche Funktion	Sequenzähnlichkeit zu	Stamm	ID/PO in %	„Accession“-Nr./Referenz
PokS1	354	dNDP-Glucose-Synthase	Mannose-1-phosphat-Guanlyltransferase (StrD)	<i>S. griseus</i> N2-3-11	64/78	A26984; Distler <i>et al.</i> , 1987
			Glucose-1-phosphat-Thymidyltransferase	<i>S. sp.</i> TP-A0274	62/78	BAC55207; Onaka <i>et al.</i> , 2002
PokS2	329	dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase	putative dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (AviE1)	<i>S. viridochromogenes</i> Tü57	70/81	AAK83196; Weitnauer <i>et al.</i> , 2001b
			dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase	<i>S. sp.</i> TP-A0274	70/79	BAC55206; Onaka <i>et al.</i> , 2002
PokR2	270	Regulator (SARP)	putatives Regulatorprotein der SARP-Familie	<i>S. rochei</i> 7434AN4 <i>S. ambifaciens</i> ATCC 23877	47/61 46/64	BAC76529; Mochizuki <i>et al.</i> , 2003 AAR30164; Pang <i>et al.</i> , 2004
PokMT2	345	O-Methyltransferase	putative O-Methyltransferase	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	56/71	CAB76315; Bentley <i>et al.</i> , 2002
				<i>S. avermitilis</i> MA-4680	57/70	BAB69170; Omura <i>et al.</i> , 2001
PokT1	259	Ketoreduktase	Ketoreduktase	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	46/59	CAE17519; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
			Ketoreduktase	<i>S. argillaceus</i> ATCC 12956	46/57	CAK50780; Lombó <i>et al.</i> , 1996; Prado <i>et al.</i> , 1999
PokO1	409	FAD-bindende Monooxygenase	Oxygenase	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	57/70	CAE17524; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
PokC2	261	(Polyketid-)Cyclase	putative Cyclase (AknW)	<i>S. galilaeus</i> ATCC 31615	73/86	AAF73459; Rätý <i>et al.</i> , 2000
PokMT3	371	(O-)Methyltransferase	TcmN (ab AS 166; N-Terminus nicht homolog)	<i>S. glaucescens</i> ETH 22794	51/64	S27696; Bibb <i>et al.</i> , 1989; Summers <i>et al.</i> , 1992
			MetLC1	<i>S. tubercidicus</i> ATCC 25502	41/53	AAT45298; Jungmann <i>et al.</i> , 2005; Molnár <i>et al.</i> , 2005
PokC1	150	Cyclase	Cyclase	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	58/69	CAE17525; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
PokO3	109	(Mono-)Oxygenase	Oxygenase	<i>S. argillaceus</i> ATCC 12956	43/61	CAK50778; Lombó <i>et al.</i> , 1996; Prado <i>et al.</i> , 1999
PokL	495	Acyl-CoA-Ligase/ Acyl-CoA-Synthetase	Acyl-CoA-Ligase	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	53/65	CAE17553; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
PokC3	314	Cyclase/Aromatase	putative Aromatase	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	46/59	BAB69280; Omura <i>et al.</i> , 2001
			bifunkt. Cyclase/Dehydrase (MtmQ)	<i>S. argillaceus</i> ATCC 12956	46/61	CAA61987; Lombó <i>et al.</i> , 1996
PokT2	251	Ketoreduktase	Ketoreduktase	<i>S. argillaceus</i> ATCC 12956	57/67	CAK50776; Lombó <i>et al.</i> , 1996; Prado <i>et al.</i> , 1999
			Ketoreduktase	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	51/62	CAE17551; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
PokO2	541	FAD-abhängige Oxidoreduktase	Oxygenase	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	52/65	CAE17550; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
PokO4	506	FAD-abhängige Oxidoreduktase	RubN	<i>S. collinus</i> DSM 2012	47/59	AAM97364; Saito <i>et al.</i>
			Oxygenase	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> ATCC 13273	46/57	CAE17536; Menéndez <i>et al.</i> , 2004
PokS7	204	dNDP-4-Keto-2,6-desoxyglucose-5-Epimerase	putative TDP-4-Keto-6-desoxyglucose-3,5-Epimerase (EryBVII)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	71/79	CAA72086; Gaisser <i>et al.</i> , 1997b; Doumith <i>et al.</i> , 2000
			3,5-Epimerase	<i>S. sp.</i> TP-A0274	59/72	BAC55217; Onaka <i>et al.</i> , 2002
PokS9	319	4-Ketoreduktase	dTDP-4-Keto-2,3,6-tridesoxyhexulose-Reduktase	<i>S. peucetius</i> ATCC 29050	49/61	AAB63047; Otten <i>et al.</i> , 1997
			putative dTDP-4-Keto-6-desoxyhexose-Reduktase (SnoG)	<i>S. nogalater</i> ATCC 27451	47/60	CAA12010; Torkkell <i>et al.</i> , 1997
PokU3	393	Acyl-CoA-Dehydrogenase	putative Acyl-CoA-Dehydrogenase	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	92/96	BAC68977; Omura <i>et al.</i> , 2001 Ikeda <i>et al.</i> , 2003
			putative Acyl-CoA-Dehydrogenase	<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	52/69	YP_116741; Ishikawa <i>et al.</i> , 2004
PokX1	>96	unbekannt	hypothet. Protein	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	87/93	BAC68976; Omura <i>et al.</i> , 2001 Ikeda <i>et al.</i> , 2003
			hypothet. Protein SCO7239	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	92/93	CAB94053; Bentley <i>et al.</i> , 2002

Tab. 3.3: Übersicht über den 6,9 kb-Sequenzabschnitt mit abgeleiteten Proteinen und deren möglicher Funktion; AS = Länge der Aminosäuresequenz, ID = Zahl identischer Aminosäuren; PO = Zahl ähnlicher Aminosäuren

Protein	AS	mögliche Funktion	Sequenzähnlichkeit zu	Stamm	ID/PO in %	„Accession“-Nr./Referenz
Orf2-A	>112	Kinase	putatives lolC-Protein	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	86/93	BAC74861; Omura <i>et al.</i> , 2001; Ikeda <i>et al.</i> , 2003
			putative Carbohydratkinase	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	84/91	CAB88955; Bentley <i>et al.</i> , 2002
			hypothet. Protein	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	88/92	BAC74860; Omura <i>et al.</i> , 2001; Ikeda <i>et al.</i> , 2003
Orf2-B	292	unbekannt		<i>S. coelicolor</i> A3(2)	87/92	CAB88954; Bentley <i>et al.</i> , 2002
Orf2-C	303	<i>myo</i> -Inositol-Metabolismus	putatives lolB-Protein	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	79/84	BAC74859; Omura <i>et al.</i> , 2001; Ikeda <i>et al.</i> , 2003
			hypothet. Protein	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	78/83	CAB88953; Bentley <i>et al.</i> , 2002
Orf2-D	624	Acetolactatsynthase	putatives lolD-Protein	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	86/90	BAC74858; Omura <i>et al.</i> , 2001; Ikeda <i>et al.</i> , 2003
			putative Acetolactatsynthase	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	81/88	CAD55394; Bentley <i>et al.</i> , 2002
Orf2-E	266	Regulator	putativer Transkriptionsregulator der GntR-Familie	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	82/87	BAC74857; Omura <i>et al.</i> , 2001; Ikeda <i>et al.</i> , 2003
				<i>S. coelicolor</i> A3(2)	77/84	CAB89035; Bentley <i>et al.</i> , 2002
Orf2-F	119	unbekannt	hypothet. Protein SC9C7.27c	<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	83/88	ZP_00573401; Copeland <i>et al.</i> , B)
			hypothet. Protein SC9C7.27c	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	38/54	CAA22739; Bentley <i>et al.</i> , 2002
Orf2-G	>332	<i>myo</i> -Inositol-2-Dehydrogenase	putative Oxidoreduktase	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	82/89	CAB88965; Bentley <i>et al.</i> , 2002
			putative Oxidoreduktase	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	83/87	BAC74866; Omura <i>et al.</i> , 2001; Ikeda <i>et al.</i> , 2003

3.1.4 Charakterisierung der Biosynthese-Proteine

3.1.4.1 Die Polyketomycinon-Biosynthese

3.1.4.1.1 Typ-II-PKS

Relativ zentral in dem bisher sequenzierten 52,1-kb-Abschnitt liegen drei benachbarte Gene, mit einheitlicher Leserichtung. Der Datenbankabgleich zeigte, daß die Genprodukte von *pokP1*, *pokP2* und *pokP3* für die Minimaleinheit einer Typ-II-Polyketidsynthese codieren. Eine „minimale PKS“ katalysiert die Synthese des Polyketidgrundgerüsts. Im Fall des Polyketomycins wären diese drei Proteine an der Synthese eines linearen Dekaketids beteiligt, das als Polyketomycinon-Vorstufe gebildet wird.

Das 422 AS umfassende Protein **PokP1** weist jeweils 74 % identische Aminosäuren zu den α -Ketosynthasen aus dem Chromomycin A3-Produzenten *S. griseus* subsp. *griseus* ATCC 13273 (Menéndez *et al.*, 2004) und aus dem Mithramycin-Produzenten *S. argillaceus* ATCC 12956 (MtmP; Lombó *et al.*, 1996) auf. Für **PokP2** (407 AS) liegt mit 63 % identischen Aminosäuren hohe Sequenzübereinstimmung zur β -Ketosynthase SimA2 aus dem Simocyclinon-Cluster von *S. antibioticus* Tü6040 (Trefzer *et al.*, 2002) vor. Mit 60 % Übereinstimmung auf Proteinebene ist die Sequenzähnlichkeit zur β -Ketosynthase UrdB aus *S. fradiae* Tü2717 ähnlich hoch (Decker und Haag, 1995). Für **PokP3** ergibt der Vergleich der 85 AS langen Sequenz mit 50 % Identität die höchste Homologie zu einem Acyl-Carrier-Protein aus *S. arenae* DSM 40737, der Naphthocyclinon synthetisiert (Brünker *et al.*, 1999).

3.1.4.1.2 Cyclasen/Aromatasen

Stromabwärts der PKS-II-Gene etwa 10,4 kb entfernt liegen die drei Gene *pokC2*, *pokC1* und *pokC3*. Sie sind nicht unmittelbar benachbart, sondern durch ein Gen bzw. zwei Gene getrennt. Die Leserichtung von *pokC2* und *pokC1* liegt in 5'→3'-Orientierung, wohingegen *pokC3* die entgegengesetzte Leserichtung aufweist. Die drei Genprodukte sind aufgrund ihrer Sequenzhomologien wahrscheinlich an der Cyclisierung des linearen Polyketids beteiligt.

PokC2 (261 AS) fungiert wahrscheinlich ebenso wie das an der Aklavinon-Synthese beteiligte Protein AknW aus *S. galilaeus* ATCC 31615, mit dem es 73 % identische Aminosäuren teilt, als Cyclase (Räty *et al.*, 2000). Das 150 Aminosäuren umfassende Protein **PokC1** stimmt auf Aminosäureebene zu 58 % mit einer Cyclase aus *S. griseus* subsp. *griseus* ATCC 13273 überein (Menéndez *et al.*, 2004). Das 314 AS große Protein **PokC3** weist jeweils 46 % Übereinstimmung zu einer putativen Aromatase aus *S. avermitilis* MA-4680 (Omura *et al.*, 2001) und zu der bifunktionellen Cyclase/Dehydrase MtmQ aus dem Mithramycin-Cluster von *S. argillaceus* ATCC 12956 auf (Lombó *et al.*, 1996).

3.1.4.1.3 Ketoreduktasen

Eine weitere Klasse von Polyketid-modifizierenden Enzymen ist mit zwei Genen im Polyketomycin-Cluster vertreten. Die Gene *pokT1* und *pokT2* liegen zusammen mit anderen *post*-PKS-Genen im letzten Drittel der Sequenz. Die abgeleiteten Proteine fungieren dem Sequenzvergleich zufolge als Ketoreduktasen.

Die Sequenz von **PokT1** umfaßt 259 AS und es besteht zu 46 % Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz einer Ketoreduktase aus *S. griseus* subsp. *griseus* ATCC 13273 (Menéndez *et al.*, 2004). Die zweite putative Polyketid-modifizierende Ketoreduktase ist **PokT2** (251 AS). PokT2 ist auf Proteinebene zu 57 % Sequenz-identisch zu einer Ketoreduktase aus dem Mithramycin-Produzenten *S. argillaceus* ATCC 12956 (Lombó *et al.*, 1996; Prado *et al.*, 1999).

3.1.4.1.4 Oxygenasen

Es folgt die Beschreibung der vier Gene *pokO1*, *pokO3*, *pokO2* und *pokO4*, deren Genprodukte nach Vergleich mit Datenbanksequenzen vermutlich als Oxygenasen das Polyketid modifizieren. Diese Gene liegen ebenfalls zusammen mit anderen Genen, die für PKS-modifizierende Enzyme codieren, im letzten Sequenzdrittel. Die beiden letztgenannten Gene sind benachbart und werden ausgehend von einem rund 0,4 kb großen nicht-codierenden Abschnitt in unterschiedliche Richtungen transkribiert.

Das von **pokO1** abgeleitete Protein weist 409 AS auf und hat 57 % identische Aminosäuren mit einer FAD-bindenden Monooxygenase aus *S. griseus* subsp. *griseus* ATCC 13273 (Menéndez *et al.*, 2004). Mit nur 109 AS ist **PokO3** die kleinste unter den vier Oxygenasen. Die AS-Sequenz ist zu 43 % identisch zu einer (Mono-)Oxygenase aus *S. argillaceus* ATCC 12956 (Lombó *et al.*, 1996; Prado *et al.*, 1999). Die beiden übrigen Genprodukte mit möglicher Funktion als Oxygenasen **PokO2** und **PokO4** umfassen 541 AS bzw. 506 AS. Sie zeigen im Sequenzvergleich auf Proteinebene mit 52 % bzw. 47 % die höchste Homologie zu FAD-abhängigen Polyketidoxygenasen aus *S. griseus* subsp. *griseus* ATCC 13273 (Menéndez *et al.*, 2004) bzw. aus *S. collinus* DSM 2012 (RubN; Saito *et al.*; nur Sequenz veröffentlicht).

3.1.4.1.5 Methyltransferasen

Sowohl das Polyketomycinon, der Desoxyzucker L-Axenose, als auch die 3,6-Dimethylsalicylsäure tragen Methylgruppen, die im Verlauf der Synthese durch Methyltransferasen auf das Molekül übertragen werden. Die Methyltransferase PokMT1 wird zusammen mit den Enzymen, die an der 3,6-Dimethylsalicylsäure-Synthese beteiligt sind, erläutert (s. Abschnitt 3.1.4.2). Die Methyltransferase PokS8 aus dem Desoxyzuckerbiosyntheseweg wird in Zusammenhang mit weiteren „Zucker-Enzymen“ in Abschnitt 3.1.4.3 erläutert.

An dieser Stelle folgt das Ergebnis der Sequenzanalyse der putativen Methyltransferasen PokMT2 und PokMT3 aus dem Polyketomycin-Cluster. Die Gene *pokMT2* und *pokMT3* liegen benachbart zu Genen, deren Genprodukte an der Polyketidmodifizierung beteiligt sind. *pokMT2* wird als einziges Gen in dem Cluster-Abschnitt in 3'-5'-Richtung gelesen. *pokMT3* liegt zwischen den Cyclasegenen *pokC2* und *pokC1*. Das abgeleitete 345 AS umfassende Protein **PokMT2** ist zu 57 % bzw. 56 % identisch mit putativen Methyltransferasen aus *S. avermitilis* MA-4680 (Omura *et al.*, 2001) und *S. coelicolor* A3 (Bentley *et al.*, 2002). Das 371 Aminosäuren große Genprodukt von **pokMT3** hat 51 % bzw. 41 % Sequenzidentität mit Methyltransferasen aus dem Tetracenomycin C-Produzenten *S. glaucescens* ETH 22794 (Bibb *et al.*, 1989; Summers *et al.*, 1992) und aus *S. tubercidicus* ATCC 25502 (Jungmann *et al.*, 2005; Molnár *et al.*, 2005).

Die zwei zuvor beschriebenen Methyltransferasen sowie PokMT1 und PokS8 methylieren zwar unterschiedliche Substrate, teilen jedoch drei gemeinsame AS-Sequenzmotive (s. Tab. 3.4), die typisch sind für S-Adenosyl-L-Methionin-abhängige Methyltransferasen (Kagan und Clarke, 1994). Lediglich in der Desoxyzucker-MT PokS8 fehlt das Motiv II.

Aufgrund der Sequenzmotive ist es wahrscheinlich, daß an der Methylierung der Methylgruppdonor S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) beteiligt ist.

Tab. 3.4: Sequenzmotive der Methyltransferasen. In Anlehnung an Kagan und Clarke (1994) wurden drei Sequenzmotive lokalisiert. In Fettdruck wurden die Aminosäuren hervorgehoben, die besonders häufig innerhalb der Sequenzmotive auftreten. Das Motiv I besteht aus zwei Bereichen: Hellgrau unterlegt ein Nukleotid-bindendes Motiv und in dunkelgrau der Bereich, der im Abstand von 19 AS (bei PokS8 nur 17 AS) ein konserviertes Aspartat (D) enthält.

Protein	Motiv I		Motiv II		Motiv III			
PokMT1	180	V ID IGGGD G	203	V T V FD	243	G AD G IMF	271	AL P PG G V C LV
PokMT2	176	V VD VAGGH G	199	G AL F D	239	E AD V FIL	266	SAR P GG R V V
PokMT3	207	V AD VGGGR G	230	G V L FD	270	G CD A YVL	299	IGD S AAR L LV
PokS8	104	V LD IG SNDS	125	L V G ID			190	LDD D GV L LE

3.1.4.2 Die 3,6-Dimethylsalicylsäure-Biosynthese

Den Fütterungsversuchen von Paululat *et al.* (1999) zufolge wird als Vorläufer der 3,6-Dimethylsalicylsäure zunächst 6-Methylsalicylsäure synthetisiert, die später am C3-Atom methyliert wird. Die Synthese der 6-Methylsalicylsäure, deren Methylierung und Adenylierung sowie möglicherweise auch die Übertragung des Salicylrestes auf den L-Axenose-Rest werden wahrscheinlich durch die Expression vier hintereinander angeordneter Gene ermöglicht. Dabei handelt es sich um *pokM3*, *pokM1*, *pokM2* und *pokMT1*, die zum Teil im Bereich der Start-/Stopp-Codone miteinander überlappen. Die vier Gene weisen 3'-5'-Leserichtung auf, so daß die Transkription mit *pokMT1* beginnt.

Mit 5220 bp besitzt **pokM1** den größten ORF innerhalb des Polyketomycin-Clusters. Das abgeleitete Protein weist 48 % identische AS zu der iterativen Typ-I-Polyketidsynthese NcsB aus *S. carzinostaticus* subsp. *neocarzinostaticus* ATCC 15944 auf, die die Synthese von

2-Hydroxy-5-methoxy-1-naphthoesäure katalysiert (Sthapit *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2005). Des weiteren beträgt die AS-Sequenzidentität zu den Orsellinsäure-Synthasen CalO5 aus *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis* (Ahlert *et al.*, 2002) und AviM aus *S. viridochromogenes* Tü57 (Gaisser *et al.*, 1997a; Weitnauer *et al.*, 2001b) 46 % bzw. 40 %. Das 1739 Aminosäuren große Protein setzt sich aus mehreren funktionellen Domänen zusammen. Werden beim Vergleich nur die katalytischen Domänen berücksichtigt, die auch in CalO5 und AviM vorkommen, beträgt die AS-Sequenzidentität in beiden Fällen sogar 52 %.

Eine Analyse der Aminosäuresequenz mit der Software SEARCHPKS ermöglichte es, die einzelnen Domänen einem Vergleich mit bereits bekannten PKS zu unterziehen.

Auf diese Weise konnten PokM1 vier katalytische Domänen zugeordnet werden, die aufgrund ihrer Homologie als Ketosynthase (KS; 426 AS), Acyltransferase (AT; 293 AS), Ketoreduktase (KR; 192 AS) bzw. Acyl-Carrier-Protein (ACP; 64 AS) fungieren könnten. Eine weitere Domäne mit möglicher Dehydratase-Funktion (DH; ~120 AS) wurde durch direkten Vergleich mit ähnlichen PKS zugeordnet. Der Domänenaufbau von PokM1 ist zur Veranschaulichung in Abb. 3.3 dargestellt.

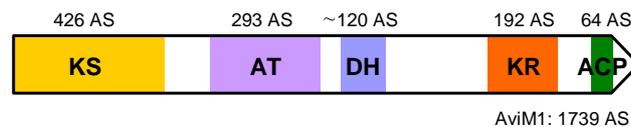


Abb. 3.3: Übersicht über Größe und Lage der katalytischen Domänen von PokM1. Die anhand von SEARCHPKS bestimmten Domänen sind mit einer Größenangabe versehen. KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, DH = Dehydratase, KR = Ketoreduktase, ACP = Acyl-Carrier-Protein

Das von **pokM2** abgeleitete Protein umfaßt 342 AS und ist jeweils zu 42 % Sequenzidentisch mit AviN aus *S. viridochromogenes* Tü57 (Weitnauer *et al.*, 2001b) und CalO4 aus *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis* (Ahlert *et al.*, 2002). Die zu PokM2 homologen Proteine AviN und CalO4 sind putative β -Ketoacyl-ACP-Synthasen. Es ist also denkbar, daß auch PokM2 eine vergleichbare Enzymaktivität besitzt und den initialen Schritt der 6-Methylsalicylsäuresynthese katalysiert. Das würde bedeuten, daß PokM2 möglicherweise die Starter-Einheit Acetyl-CoA erkennt, als initiale KS agiert und eine Acetyl-KS-Bindung entsteht.

PokM3 mit seinen 551 Aminosäuren stimmt zu 55 % mit der AS-Sequenz einer putativen Adenylatligase aus *S. carzinostaticus* subsp. *neocarzinostaticus* ATCC 15944 überein (Liu *et al.*, 2005). Dies gibt Hinweis auf die mögliche Funktion von PokM3 als Dimethyl- oder Methylsalicylsäure-AMP-Ligase. Die Sequenzidentität zu dem Protein SdgA aus einem Salicylsäure-Abbauweg in *Streptomyces* sp. WA46 ist mit 54 % ähnlich hoch (Ishiyama *et al.*, 2004). Ein weiteres Enzym mit 42 % Sequenzähnlichkeit zu PokM3 ist das aus *Yersinia pestis* stammende YbtE (AAC69591; Gehring *et al.*, 1998a und 1998b).

Direkt in Leserichtung vor den drei „Methylsalicylsäuregenen“ liegt **pokMT1**. Die abgeleitete Aminosäuresequenz (347 AS) zeigt im Sequenzvergleich 38 % Übereinstimmung zu einer SAM-abhängigen Methyltransferase aus *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (nur Sequenzdaten: Copeland *et al.*, A). Unter den homologen Streptomyceten-Proteinen zeigt die Methyltransferase GrhL aus dem Griseorhodin A-Cluster (*Streptomyces* sp. JP95) mit 28 % identischen Aminosäuren die höchste Übereinstimmung zu PokMT1 (Li und Piel, 2002). Die benachbarte Lage von *pokMT1* zu den Methylsalicylsäuregenen und die gemeinsame Transkriptionsrichtung deuten darauf hin, daß diese Methyltransferase an der Synthese der 3,6-Dimethylsalicylsäure beteiligt ist.

3.1.4.3 Die Desoxyzuckerbiosynthese

Bisher wurden noch keine Biosynthesegene untersucht, die an der Synthese der Desoxyzucker D-Amicetose oder L-Axenose beteiligt sind. Allerdings wurden kürzlich D- und L-Amicetose durch heterologe Expression geeigneter Desoxyzuckerbiosynthesegene in einem *S. lividans*-Stamm synthetisiert (Pérez *et al.*, 2005). Ausgehend von den Daten bisher bekannter Desoxyzuckerbiosynthesewege und daran beteiligter Enzyme konnten innerhalb des Polyketomycin-Clusters neun Desoxyzuckerbiosynthesegene sowie zwei Glykosyltransferasegene identifiziert werden. Die elf Gene liegen über das Cluster verteilt vor, meist in kleineren Gruppen mit unterschiedlicher Leserichtung.

Etwa 1,4 kb entfernt vom 5'-Ende des sequenzierten Bereiches liegt *pokS8*. Das **PokS8**-Protein (415 AS) zeigt auf Proteinebene 66 % bzw. 62 % Übereinstimmung mit der NDP-Hexose-3-C-Methyltransferase TylCIII aus dem Tylosin-Produzenten *S. fradiae* T59235 (Bate *et al.*, 2000) bzw. dem ORF1 aus dem Erythromycin-Cluster von *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 (Haydock *et al.*, 1991).

Das **pokGT2**-Gen folgt mit 3,3 kb Abstand in entgegengesetzter Leserichtung. Bei dem abgeleiteten Protein PokGT2 handelt es sich um eine 382 Aminosäuren umfassende Glykosyltransferase mit vergleichsweise geringer Sequenzhomologie. Die Aminosäuresequenz ist zu 35 % mit SpnG einer NDP-Rhamnosyltransferase aus *Saccharopolyspora spinosa* (Waldron *et al.*, 2001) und zu 37 % mit einer Glykosyltransferase des Landomycin-Produzenten *S. cyanogenus* S136 (Westrich *et al.*, 1999) identisch.

Im Abstand von 6,5 kb folgen drei weitere Gene mit 5'→3'-Leserichtung. Am Anfang der Dreiergruppe liegt *pokGT1*, dessen Start-Codon mit dem des benachbarten Gens *pokS6* überlappt. Daran grenzt *pokS5* an. Das 397 Aminosäuren große Protein **PokGT1** ist zu 43 % identisch mit einer Glykosyltransferase von *S. griseus* subsp. *griseus* ATCC 13273 (Menéndez *et al.*, 2004) und zu 42 % mit einer GT aus dem Mithramycin-Produzenten *S. argillaceus* ATCC 12956 (Blanco *et al.*, 2000). Die Sequenz von **PokS6** (342 AS) hat mit 47 % identischen AS die höchste Homologie zu einer 4-Ketoreduktase aus *S. griseoruber* (Bililign *et al.*, 2004) und 46 % Übereinstimmung mit NanG4 aus dem Nanchangmycin-

Produzenten *S. nanchangensis* NS3226 (Sun *et al.*, 2003). Für das Protein **PokS5** (432 AS) ergab der Datenbankabgleich 74 % AS-Identität mit einer NDP-Hexose-3-Dehydratase (AknP) aus dem Aklavinon-Produzenten *S. galilaeus* ATCC 31615 (Räty *et al.*, 2000).

In geringem Abstand von 1,8 kb folgen die beiden nächsten Gene in gegenläufiger Leserichtung. Sie liegen 1,7 kb vom PKS-I-Gen *pokM1* entfernt im Cluster. Es handelt sich dabei um *pokS4* und *pokS3*, deren Start- und Stopp-Codone miteinander überlappen. Das Protein **PokS4** (333 AS) ist dem Sequenzvergleich zufolge eine 3-Ketoreduktase mit 55 % Sequenzübereinstimmung zu einem als Oxidoreduktase klassifizierten Protein aus *S. cyanogenus* S136 (Westrich *et al.*, 1999) und 53 % Übereinstimmung mit einer NDP-3-Ketoreduktase aus *S. griseus* subsp. *griseus* ATCC 13273. Das abgeleitete 476 AS große Protein **PokS3** weist 55 % Sequenzidentität mit einer dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose-2,3-Dehydratase (SimB3) aus dem Simocyclinon-Cluster von *S. antibioticus* Tü6040 auf (Trefzer *et al.*, 2002).

Zentral gelegen etwa 3,7 kb stromabwärts von den PKS-II-Genen liegt das Start-Codon von *pokS1*. Unmittelbar angrenzend mit überlappendem Start-Codon schließt sich *pokS2* an. Die abgeleiteten Proteinsequenzen umfassen 354 bzw. 329 Aminosäuren. Die Sequenz von **PokS1** weist 64 % identische Aminosäuren zu einer Mannose-1-phosphat-Guanylyltransferase (StrD) aus dem Streptomycin-Produzenten *S. griseus* N2-3-11 auf (Distler *et al.*, 1987). Dem Sequenzvergleich zufolge handelt es sich bei **PokS2** um eine dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase mit 70 % AS-Identität zu AviE1 aus dem Avilamycin-Produzenten *S. viridochromogenes* Tü57 (Weitnauer *et al.*, 2001b).

Nahe dem 3'-Ende der Sequenz liegen die beiden benachbarten Gene *pokS7* und *pokS9*. Das abgeleitete Protein **PokS7** (204 AS) ist zu 71 % identisch mit der AS-Sequenz von EryBVII aus dem Erythromycin-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338. Bei dem homologen Protein handelt es sich um eine putative TDP-4-Keto-6-desoxy-glucose-3,5-Epimerase (Gaisser *et al.*, 1997b; Doumith *et al.*, 2000). Aufgrund der Struktur der L-Axenose ist für PokS7 Aktivität als 5-Epimerase zu erwarten. Bei dem letzten im Polyketomycin-Cluster vorliegenden Zuckerbiosynthesegen *pokS9* liegt auf Proteinebene eine 49%ige Sequenzübereinstimmung mit der 4-Ketoreduktase DnmV aus *S. peucetius* ATCC 29050 vor (Otten *et al.*, 1997). DnmV ist an der Synthese des Zuckers Daunosamin beteiligt, der Bestandteil des Daunorubicins ist. Das 319 AS umfassende Protein PokS9 fungiert bei der Zuckerbiosynthese wahrscheinlich als 4-Ketoreduktase.

Den aufgeführten Proteinen PokS1-PokS9 kann aufgrund von Homologievergleichen mit hoher Wahrscheinlichkeit jeweils eine Enzymfunktion zugeordnet werden. Entsprechend dem in Abschnitt 4.1.4.2 vorgeschlagenen Desoxyzuckerbiosyntheseweg würden die elf Gene im Polyketomycin-Cluster zur Synthese und Übertragung der beiden im Polyketomycin enthaltenen Zucker genügen. Voraussetzung für den postulierten Ablauf ist, daß

dNDP-D-Amicetose und dNDP-L-Axenose aus dNDP-4-Keto-2,6-dideoxyglucose als gemeinsamem Vorläufer hervorgehen und sich der Biosyntheseweg erst nach diesem Zwischenprodukt verzweigt.

3.1.5 Charakterisierung weiterer Genprodukte

Für einige Gene und deren abgeleitete Proteine kann anhand der Übereinstimmungen im Sequenzvergleich noch keine konkrete Enzymfunktion zugeordnet werden oder aber es gibt Hinweise auf die Enzymaktivität, die sich jedoch nicht eindeutig der Polyketomycin-Biosynthese zuordnen läßt.

3.1.5.1 Regulatorische Proteine

Die Synthese von Sekundärmetaboliten erfolgt meist unter bestimmten Umweltbedingungen. Die Expression der entsprechenden Biosynthesegene unterliegt daher regulatorischen Mechanismen. Auch im Polyketomycin-Cluster konnten drei Gene mit putativen regulatorischen Funktionen identifiziert werden. Die Gene *pokR3* und *pokR1* liegen nahe dem 5'-Ende der Sequenz. Zwischen den beiden Genen liegt *pokS8*, dessen Genanfang mit dem Stopp-Codon von *pokR3* überlappt. Die genannten Gene werden in einheitlicher Richtung transkribiert. Das dritte mögliche Regulationsgen ist *pokR2*, das rund 200 bp stromabwärts von *pokS2* liegt.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ***pokR3*** umfaßt 326 AS. Das Protein ist zu 65 % identisch zu einer putativen Carbohydratkinase aus *Streptomyces* sp. AM-7161 (Ichinose *et al.*, 2003). Ein in PokR3 vorkommendes Sequenzmotiv deutet die Zugehörigkeit der Kinase zur PfkB-Familie (PfkB = Phosphofruktokinase B) an. Eine Beteiligung von PokR3 an der Polyketomycin-Biosynthese erscheint unwahrscheinlich. Möglicherweise ist das Enzym im Kohlenhydratstoffwechsel (Glykolyse) aktiv und nimmt als Phosphofruktokinase regulatorisch Einfluß auf den Primärstoffwechsel. Mehr Anhaltspunkte bezüglich der Funktionsweise gibt es für **PokR1**. Dieses Protein ist mit seinen 1065 AS das zweitgrößte im Polyketomycin-Cluster und stimmt zu 40 % mit einem putativen Transkriptionsregulator aus *Nocardia farcinica* IFM 10152 überein (Ishikawa *et al.*, 2004). Die Sequenzhomologie zu einem putativen AfsR-ähnlichen Regulatorprotein aus *S. coelicolor* A3(2) fällt mit 34 % geringer aus (Bentley *et al.*, 2002). Aus Untersuchungen an AfsR aus *S. coelicolor* ist bereits bekannt, daß AfsR durch das Membran-assoziierte Sensor-Protein AfsK phosphoryliert wird. Das phosphorylierte AfsR setzt darauf die Transkription eines weiteren Gens (*afsS*) in Gang (Hong *et al.*, 1991; Horinouchi und Beppu, 1992; Matsumoto *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2002). AfsS steigert in bisher noch ungeklärter Weise die Antibiotikaproduktion. Die Wirkung des AfsS ist dabei nicht spezifisch auf ein Biosynthesegencluster gerichtet, sondern es beeinflusst als übergeordneter Regulator die Produktion unterschiedlicher Antibiotika.

Das abgeleitete Protein von ***pokR2*** ist 270 AS lang und zu 47 % Sequenz-identisch mit einem putativen Regulatorprotein aus *S. rochei* 7434AN4 (Mochizuki *et al.*, 2003). PokR2

läßt sich aufgrund der Aminosäuresequenz den Antibiotika-Biosynthese-spezifischen regulatorischen Streptomyceten-Proteinen (SARP = „*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins“) zuordnen. Die Proteine der SARP-Familie enthalten im N-terminalen Bereich ein „Helix-Turn-Helix-Loop-Helix“-DNA-Bindemotiv, wie es in dem Sequenzvergleich in Abb. 3.4 gezeigt ist. Auch PokR2 weist dieses Sequenzmotiv auf.

ORF75	1	MDIDVLTGLAVKENDVSVTPRAPKPRQVLALLALHADQVVP	IASLIDELWGRPPRSARTTLQTYILQLREMI	AKALEQD	80
SAR	1	MKTQVLGALNAEFNGISVPTAGKPRQILALLALCFGRVVPV	PTLNEEIWGTLPQSSMTTLQTYILQLRRLLGTAMGPD		80
TyIS	1	MDIIVLGPPLDVRENGLSVTPPTAPKPRQVLALLALHADQVVP	SALTEELWGERPPRSARTTLQTYVYLQLRELSAAITND		80
DnrI	1	MDIIVLGPPLVAHHNGTSVTPPTARKPRQVFSLLALQAGTVVP	PALMDELWGTQPPASALITLQTYILQVRRGITVALGAS		80
PokR2	1	MKLCVLTGLTIDDEVAEILITAPKPRSVLAMLLEPGRV	STASLIQELWDERPPRSASITTLQTYVYLQLRRMFRDVAQVV		80

Helix Turn Helix Loop Helix

Abb. 3.4: Sequenzvergleich der N-terminalen Region einiger Proteine aus der SARP-Familie in Anlehnung an Mochizuki *et al.* (2003). Die α -Helix-Regionen im DNA-Bindemotiv sind grau unterlegt. Die verglichenen Proteine (in Klammern die „Accession“-Nr.) sind folgende: ORF75 aus *S. rochei* (NP_851497), SAR aus *S. ambofaciens* (Y18862), TyIS aus *S. fradiae* (AF145049), DnrI aus *S. peucetius* (M80237) und PokR2 aus *S. diastatochromogenes* Tü6028.

3.1.5.2 Resistenz-vermittelnde Proteine

Innerhalb von Antibiotika-produzierenden Mikroorganismen finden sich je nach Wirkprinzip des gebildeten Antibiotikums meist ein oder mehrere Resistenzgene im Biosynthesegencluster. Diese Resistenzgene, die auch außerhalb des Clusters liegen können, vermitteln bei Expression Schutz vor dem synthetisierten Wirkstoff. Im Polyketomycin-Cluster konnten die benachbarten Gene *pokABC2* und *pokABC1* zwischen den Genen *pokGT2* und *pokGT1* lokalisiert werden, die aufgrund der Ergebnisse aus dem Homologievergleich als Resistenz-vermittelnde Gene in Frage kommen.

PokABC2 (269 AS) stimmt zu 41 % bzw. 39 % mit der AS-Sequenz eines ABC-Transport-Proteins aus *S. rochei* F20 bzw. *S. coelicolor* A3(2) überein (Fernández-Moreno *et al.*, 1998; Bentley *et al.*, 2002). Die homologen Proteine bilden jeweils die Transmembran-Komponente eines ABC-Transporters. Die AS-Sequenz von PokABC2 wurde zur Vorhersage von Transmembran-Domänen durch eine Hydrophobizitätsanalyse (mit der TMHMM-Software) näher charakterisiert. Die Analyse ergab, daß PokABC2 mit hoher Wahrscheinlichkeit sechs Transmembran-Bereiche besitzt, wie es für Transmembran-Komponenten eines ABC-Transporters typisch ist.

Das von **pokABC1** abgeleitete 310 AS große Protein zeigt bei der Suche nach homologen Proteinen 53 % bzw. 52 % Sequenzidentität mit den ATP-bindenden Komponenten von ABC-Transportern aus *S. antibioticus* ATCC 11891 (Oleandomycin-Cluster; Rodríguez *et al.*, 1993) und aus *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002). Innerhalb der PokABC1-Sequenz konnten die für Nukleotid-bindende Proteine typischen Motive Walker A und Walker B festgestellt werden (Walker *et al.*, 1982).

PokABC1 bildet wahrscheinlich zusammen mit PokABC2 ein Efflux-System zur Ausschleusung des Polyketomycins aus der Streptomyceten-Zelle.

3.1.5.3 Biotin-[Acetyl-CoA-Carboxylase]-Synthetase

Im Anschluß an die PKS-II-Gene befinden sich in derselben Transkriptionsrichtung die drei Gene *pokAC1*, *pokAC3* und *pokAC2*. Der Sequenzanalyse zufolge bilden die drei resultierenden Proteine wahrscheinlich eine funktionelle Einheit.

Bei **PokAC1** mit seinen 579 AS handelt es sich um eine putative Acetyl-CoA-Carboxylase, die sich in zwei Untereinheiten (α und β) gliedern läßt. Die Sequenz stimmt zu 60 % mit einer Acetyl-Carboxylase aus *Streptomyces* sp. R1128 überein, die ebenfalls die α - und β -Untereinheit umfaßt (Marti *et al.*, 2000). Zwei weitere Sequenzhomologe entsprechen jeweils nur einer Untereinheit. Die Acetyl-Carboxylase- α -Untereinheit aus *Geobacter sulfurreducens* PCA ist zu 54 % identisch zu PokAC1 (Methé *et al.*, 2003), während die Acetyl-Carboxylase- β -Untereinheit aus *Deinococcus radiodurans* R1 zu 53 % mit PokAC1 übereinstimmt (White *et al.*, 1999). Die abgeleitete AS-Sequenz von **pokAC3** ergibt mit 178 Aminosäuren ein relativ kleines Protein. Im Sequenzvergleich steht mit 45 % Übereinstimmung wieder ein Protein aus *Streptomyces* sp. R1128 an erster Stelle (Marti *et al.*, 2000). Des weiteren zeigt PokAC3 Homologie (39 % identische AS) zu einem Biotin-Carboxylase-Carrier-Protein (BCCP) aus *Saccharopolyspora hirsuta* 367 (Le Gouill *et al.*, 1993). Dementsprechend könnte auch PokAC3 als BCCP fungieren. Das 470 Aminosäuren große Protein **PokAC2** ergibt im Sequenzvergleich höchste Übereinstimmung (63 %) mit einer Biotin-Carboxylase aus *Streptomyces* sp. R1128 (Marti *et al.*, 2000). Es ist anzunehmen, daß sich die drei Proteine zu einer Acetyl-CoA-Carboxylase ergänzen, die den Polyketid-Baustein Malonyl-CoA synthetisiert.

Bisher ist ein solches Enzym innerhalb eines Antibiotika-Biosynthesegenclusters nur im Fall des Jadomycin B-Produzenten *S. venezuelae* ISP5230 näher untersucht worden. Das untersuchte Gen *jadJ* codiert laut Sequenzvergleich für zwei Untereinheiten und umfaßt sowohl die Biotin-Carboxylase als auch das Biotin-Carboxylase-Carrier-Protein. Han und Mitarbeiter (2000) erzeugten eine *jadJ*-Mutante und stellten bei ihr eine deutlich reduzierte Jadomycin-Produktion fest, die nur noch 10-13 % der Wildtyp-Produktion erreichte. Demnach nutzt der Streptomycet zur Jadomycin-Synthese nicht nur Malonyl-CoA aus dem Primärmetabolismus, sondern die PKS wird zusätzlich mit Malonyl-CoA aus dem Sekundärmetabolismus versorgt.

3.1.5.4 Proteine mit unbekannter Funktion aus dem Polyketomycin-Cluster

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Homologievergleichen von sechs Genprodukten beschrieben. Drei der Gene (*pokL*, *pokU2* und *pokU1*) liegen verteilt im Polyketomycin-Cluster in Nachbarschaft zu Strukturgenen. Eine mögliche Funktion kann den resultierenden Proteinen aufgrund des Sequenzvergleiches zwar zugeordnet werden, doch welche Rolle sie bei der Polyketomycin-Synthese spielen könnten, ist unklar. Die drei weiteren Gene (*pokSAMS*, *pokU3* und *pokX1*) liegen am 5'- bzw. 3'-Ende der Sequenz und

sind daher zum Teil unvollständig. Die abgeleiteten Proteine haben möglicherweise auch Einfluß auf die Polyketomycin-Biosynthese.

Das Gen ***pokL*** weist dieselbe Transkriptionsrichtung wie die benachbarten Gene *pokO3* und *pokC3* auf. Das Genprodukt ist 495 AS groß und zu 53 % identisch mit einer Acyl-CoA-Ligase/Acyl-CoA-Synthetase aus *S. griseus* subsp. *griseus* ATCC 13273 (Menéndez *et al.*, 2004).

Die Gene *pokU2* und *pokU1* liegen zwischen den Desoxyzuckerbiosynthesegenen *pokS5* und *pokS4*. Die Lage der Gene deutet an, daß sie zusammen mit fünf stromaufwärts gelegenen Genen transkribiert werden. Das Protein **PokU2** umfaßt 384 AS und weist 44 % Sequenzübereinstimmung mit einer Hydroxylase aus dem Naphthocyclinon-Produzenten *S. arenae* DSM 40737 (Brünker *et al.*, 2001) auf. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ***pokU1*** (173 AS) stimmt mit einer putativen Flavinreduktase aus *S. coelicolor* A3(2) zu 45 % überein (Bentley *et al.*, 2002).

Das bisher unvollständige Gen ***pokSAMS*** liegt am 5'-Ende der Sequenz und codiert für ein 118 AS umfassendes Protein. Der bislang bekannte Anteil von PokSAMS stimmt zu 84 % mit der Aminosäuresequenz einer SAM-Synthetase aus *S. coelicolor* A3(2) überein (Bentley *et al.*, 2002). In der Nähe des 3'-Endes der Sequenz liegt zwischen *pokS9* und *pokX1* das Gen ***pokU3***. Der Homologie-vergleich des 393 AS umfassenden Proteins PokU3 deutet auf eine mögliche Funktion als Acyl-CoA-Dehydrogenase hin, da PokU3 eine 92%ige Übereinstimmung mit einer putativen Acyl-CoA-Dehydrogenase aus *S. avermitilis* MA-4680 aufweist (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003).

Ein weiteres noch unvollständig sequenziertes Gen mit Lage am 3'-Ende der Sequenz ist ***pokX1***. Das abgeleitete Genprodukt umfaßt derzeit 96 AS. Die Sequenzidentität zu dem hypothetischen Protein SCO7239 aus *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002) fällt mit 92 % sehr hoch aus. Einen Hinweis auf die mögliche Funktion des Proteins ergibt sich daraus allerdings nicht.

3.1.5.5 *myo*-Inositol-Metabolismus-Proteine

In dem 6,9 kb großen sequenzierten Abschnitt am 5'-Ende des Cosmids CB30-4E08 wurden fünf vollständige ORF und zwei am Rand gelegene unvollständige Leserahmen bestimmt. Die ersten fünf Gene haben einheitliche Transkriptionsrichtung, während die beiden übrigen am 3'-Ende des Sequenzabschnitts in Gegenrichtung abgelesen werden.

Der Aminosäuresequenzvergleich der entsprechenden Proteine zeigte, daß in diesem Sequenzabschnitt, mit Ausnahme von *orf2-F*, Gene liegen, deren Genprodukte zu 79-88 % mit Proteinen aus *S. coelicolor* oder *S. avermitilis* identisch sind. Vier der Proteine (Orf2-A, Orf2-C, Orf2-D und Orf2-G) können aufgrund der Sequenzidentität mit einem *myo*-Inositol-Abbauweg in Verbindung gebracht werden. In dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* wurde das *iol*-Operon mit ähnlichen Genen bereits untersucht (Yoshida *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2004).

Es folgen zunächst die Ergebnisse aus dem Sequenzvergleich der vollständigen Gene *orf2-C*, *orf2-D* und *orf2-E*. Das Genprodukt von **orf2-C** umfaßt 303 AS und weist 79 % Identität zu einem putativen IolB-Protein aus *S. avermitilis* MA-4680 auf (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003). Bei **Orf2-D** mit seinen 624 AS besteht 86 % Sequenzidentität zu einem putativen IolD-Protein (Acetolactatsynthase) aus *S. avermitilis* MA-4680 (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003). Das Protein **Orf2-E** (266 AS) könnte regulatorische Funktion haben, da es zu 82 % mit einem putativen Transkriptionsregulator (Repressor) der GntR-Familie aus *S. avermitilis* MA-4680 übereinstimmt (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003).

Orf2-B gehört mit seinen 292 AS zusammen mit **Orf2-F** (119 AS) zu den Proteinen, denen bislang keinerlei Funktion zugeordnet werden kann. Beide Proteine zeigen im Sequenzvergleich große Übereinstimmung zu „hypothetischen Proteinen“. Orf2-B ist zu 88 % mit einem Protein aus *S. avermitilis* MA-4680 identisch (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003). Orf2-F hingegen ist zu 83 % bzw. 38 % Sequenz-identisch mit zwei hypothetischen Proteinen aus dem symbiotisch lebenden Actinomyceten *Frankia* sp. EAN1pec (nur Sequenzdaten: Copeland *et al.*, B) bzw. *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002), die wiederum Homologie zu dem Protein SC9C7.27c aufweisen.

Die beiden unvollständigen Sequenzen ergeben für **Orf2-A** bisher 112 AS und für **Orf2-G** ein Protein mit mehr als 322 AS. Orf2-A fungiert möglicherweise als Kinase innerhalb des *myo*-Inositol-Abbaus und zeigt in der bisher bekannten Sequenz 86 % Homologie zu einem putativen IolC-Protein aus *S. avermitilis* MA-4680 (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003). Orf2-G weist im bekannten Sequenzabschnitt 83 % bzw. 82 % identische Aminosäuren zu den putativen *myo*-Inositol-2-Dehydrogenasen (Oxidoreduktasen) aus *S. avermitilis* MA-4680 (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003) bzw. *S. coelicolor* A3(2) auf (Bentley *et al.*, 2002).

3.1.6 Inaktivierung von *pokGT1*

Um den Nachweis zu erbringen, daß es sich bei den sequenzierten Genen, um Biosynthesegene aus dem Polyketomycin-Cluster handelt, wurde das Gen *pokGT1* (1194 bp), das Homologie zu Glykosyltransferasegenen aufweist, inaktiviert. Die Inaktivierung müßte zur Unterbrechung der Polyketomycin-Synthese führen. Eine Anhäufung von Vorläufermolekülen wäre denkbar.

3.1.6.1 Herstellung des Plasmids pKC1132/ Δ *pokGT1*

Um *pokGT1* (1194 bp) zu inaktivieren, wurde das Plasmid pSK/213 mit einer Länge von ca. 9,5 kb verwendet. Dieses Plasmid enthält ein 6,5 kb-*Bam*HI-Fragment (s. Abb. 6.4 im Anhang) aus dem Gencluster. Rund 400 bp stromabwärts vom *pokGT1*-Start-Codon liegt eine *Nco*I-Schnittstelle, die zum Linearisieren des Plasmids genutzt wurde. Die Überhänge wurden mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Es folgte die Religation des Plasmids. Durch

die Auffüllreaktion und Religation erhielt die Sequenz vier zusätzliche Basenpaare, was zu einer Leserasterverschiebung führte. Anstelle der *Nco*I-Schnittstelle entstand eine *Eco*T22I-Schnittstelle. Diese Mutation verhindert, daß im Verlauf der Proteinbiosynthese das funktionale Protein PokGT1 gebildet wird. Das so konstruierte Plasmid, wurde zusätzlich sequenziert, um die DNA-Sequenz im Bereich der Mutation zu überprüfen.

Alte Sequenz mit ***Nco***I-Schnittstelle:

GTCCACGACGTGCTGGCCATGGCCGGGCCGGTGCTGGCCG

Neue Sequenz mit vier zusätzlichen Nukleotide (in grau) und ***Eco***T22I-Schnittstelle:

GTCCACGACGTGCTGGCCATGCATGGGCCGGGCCGGTGCTGGCCG

Der so veränderte DNA-Abschnitt wurde in die *Bam*HI-Stelle des Vektors pKC1132 kloniert. Dieser Vektor trägt ein Apramycin-Resistenzgen zur Selektion. Er ist nicht replikativ und eignet sich somit, das native Gen mittels homologer Rekombination durch das mutierte Gen zu ersetzen.

3.1.6.2 Konjugation von *S. diastatochromogenes* Tü6028

Der *E. coli*-Stamm ET12567 mit dem Plasmid pUZ8002 wurde mit dem Plasmid pKC1132/ Δ *pokGT1* (s. Abb. 6.4 im Anhang) transformiert. Der *E. coli*-Stamm fungierte als Donor-Stamm für die Konjugation von *Streptomyces diastatochromogenes* Tü6028 (s. Abschnitt 2.9.8). Zur Selektion der Konjuganten und zum Entfernen der *E. coli*-Bakterien wurde mit 500 µg Apramycin und 1 mg Fosfomycin je Platte überschichtet.

Ausgehend von einem Konjugationsansatz wuchsen 53 *Streptomyces*-Klone. 14 Klone wurden auf einer Apramycin-haltigen HA-Platte ausgestrichen. Von diesen Klonen wurden acht ausgewählt und in TSB-Medium inkubiert. Das Medium wurde mit Apramycin (25 µg/ml) und Fosfomycin (30 µg/ml) versetzt, zum einen, um nur Streptomyceten mit Resistenz zu kultivieren und zum anderen, um noch vorhandene *E. coli*-Bakterien abzutöten. Ausgehend von diesen Kulturen wurde eine Kolonien-PCR durchgeführt.

3.1.6.3 Kolonien-PCR zum Prüfen der *pokGT1*-Mutanten

Durch Amplifizierung eines DNA-Abschnitts aus der *pokGT1*-Sequenz und anschließende Restriktion des PCR-Produktes mit *Eco*T22I konnte zwischen Wildtyp und Integrationsmutanten bzw. Doppel-*Crossing-over*-Mutanten unterschieden werden (s. Abschnitt 2.10.11.1).

Es konnte in allen Fällen ein 0,9 kb-DNA-Fragment amplifiziert werden. Um zu prüfen, ob es sich um Wildtyp- oder Mutanten-DNA handelt, wurden jeweils 2 µl des PCR-Produktes mit *Eco*T22I geschnitten. Das Wildtyp-PCR-Produkt war nicht schneidbar, während die Restriktion des Mutanten-PCR-Produktes zu einem 228 bp- und einem ca. 0,7 kb-Fragment führte.

Von den acht untersuchten Klonen konnten sechs als Integrationsmutanten identifiziert werden. In diesen Fällen traten nach der Restriktion drei Banden von 0,23 kb, 0,7 kb bzw. 0,9 kb auf. Ein Klon wurde für das Screening nach einer Doppel-Crossing-over-Mutante ausgewählt (s. Abschnitt 2.9.9).

Nach der 2. Passage wurden bereits Einzelkolonien auf Verlust der Apramycin-Resistenz getestet. Nach der 4. Passage waren 19 von 77 Klonen Apramycin-sensibel. Alle 19 Klone wurden per Kolonien-PCR überprüft. Dabei zeigte sich, daß 15 Klone zum Wildtyp rückmutiert sind, während die übrigen vier Klone Doppel-Crossing-over-Mutanten entsprechen.

3.1.6.4 Untersuchung der *S. diastatochromogenes-pokGT1*-Mutante

Nachdem sich durch Analyse der PCR-Produkte bestätigte, daß vier *pokGT1*-Mutanten vorliegen, sollte deren Antibiotikaproduktion untersucht werden. Dazu wurden Wildtyp, *Single-Crossing-over*-Mutante und die vier Doppel-Crossing-over-Mutanten, wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben ist, in MS-Medium kultiviert. Die Kulturen wurden abzentrifugiert, und der Überstand wurde mit Ethylacetat extrahiert. Das Zellpellet wurde zunächst mit Aceton aufgeschlossen und nach Entfernen des Acetons ebenfalls mit Ethylacetat extrahiert.

Die Extrakte wurden mittels Dünnschichtchromatographie und per LC-MS analysiert. Nach Auftrennung der Extrakte trat jeweils ein orangefarbiger Fleck auf. Die Laufhöhe der Substanzflecken war unterschiedlich. Der Rf-Wert betrug für den Wildtyp-Extrakt 0,81 und bei den untersuchten Mutanten-Extrakten 0,79 (Integrationsmutante) bzw. 0,78 (*pokGT1*-Mutante). Momose *et al.* (1998a) haben für Polyketomycin einen Rf-Wert von 0,53 ermittelt, wobei das Laufmittel allerdings Chloroform anstatt Dichlormethan enthielt.

Um die Unterschiede zwischen Wildtyp und *pokGT1*-Mutanten zu untersuchen, wurden zwei Proben (Wildtyp und *pokGT1*-Mutante) per LC-MS analysiert. Für die Messung wurden die Extrakte jeweils in 150 µl Acetonitril:H₂O = 1:1 aufgenommen. Die Parameter der Messung, die im negativen Modus durchgeführt wurde, sind in Abschnitt 2.11.4 aufgeführt.

Die Resultate aus der LC-MS-Analyse wurden tabellarisch zusammengefaßt (s. Tab. 3.5) und zusätzlich sind in Abb. 3.5 die HPLC-Chromatogramme wiedergegeben. Durch die Messungen wurde deutlich, daß sich Wildtyp und *pokGT1*-Mutante in ihrer Sekundärstoffproduktion unterscheiden. Der Wildtyp-Extrakt weist vier markante Peaks mit Retentionszeiten von 19,998 min, 25,616 min, 26,063 min bzw. 26,981 min auf. Der größte Peak mit einer Retentionszeit von 26,063 min läßt sich aufgrund des zugehörigen UV/VIS-Spektrums und der festgestellten Massenzahl von 864 *amu* zweifelsfrei dem Polyketomycin zuordnen. Bei den übrigen Peaks wurden jeweils unterschiedliche Massen festgestellt, so daß in diesen Fällen unterschiedliche Moleküle mit gleicher Retentionszeit vorliegen.

Tab. 3.5: Ergebnisse aus der LC-MS-Analyse. Die Messungen wurden mit Rohextrakten aus *S. diastatochromogenes* Tü6028 (Wildtyp und *pokGT1*-Mutante) im negativen Modus durchgeführt.

Zellextrakt aus	Retentionszeit (in min)	detektierte Masse (als m/z)	mögliche Molekülstruktur
WT	19,998	329,3 (-)	
WT	19,998	396,0 (-)	putativer Polyketomycinon-Vorläufer (s.Abb. 3.5)
WT	25,616	428,3 (-)	
WT	25,616	592,3 (-)	
WT	25,616	850,2 (-)	Polyketomycin, dem wahrscheinl. Methylgruppe od. Sauerstoff fehlt (-14)
WT	26,063	864,2 (-)	Polyketomycin
WT	26,981	695,8 (-)	
WT	26,981	596,4 (-)	
WT	26,981	422,3 (-)	
$\Delta pokGT1$	19,967	329,3 (-)	
$\Delta pokGT1$	19,967	396,1 (-)	putativer Polyketomycinon-Vorläufer (s.Abb. 3.5)

Im Extrakt aus der *pokGT1*-Mutante tritt mit einer Retentionszeit von 19,967 min nur ein markanter Peak auf. Das Flächenintegral ergibt eine etwa zweifache Fläche im Vergleich zum Wildtyp. Bei der Präparation der Extrakte wurde die Bakterienzellmasse zuvor nicht festgestellt, so daß eine exakte quantitative Bestimmung nicht möglich ist. Dennoch waren die Bedingungen recht ähnlich, so daß der größere Peak im Chromatogramm der Mutante sehr wahrscheinlich von Polyketomycin-Vorläufern herrührt, die aufgrund des unterbrochenen Syntheseweges akkumulieren. Es wurden an dieser Stelle zwei unterschiedliche Massen (329 und 396) detektiert, die auch schon beim Wildtyp-Extrakt auftraten. Da noch keine Strukturdaten vorliegen, ist zur Veranschaulichung in Abb. 3.5 für die Hauptkomponente mit 396 *amu* eine hypothetische Struktur dargestellt. Eine dem Polyketomycin entsprechende Masse konnte im Extrakt der Mutante nicht festgestellt werden.

Der Extrakt (30 μ l des Acetonitril/Wassergemischs) wurde außerdem verwendet, um einen Aktivitätstest durchzuführen. Als Testkeim wurde *Bacillus subtilis* auf DM-Medium eingesetzt. Der Wildtyp-Extrakt war deutlich wachstumshemmend und erzeugte einen Hemmhof mit einem Durchmesser von 1,8 cm. Bei dem Extrakt der Integrationsmutante (mit einem funktionalen und einem mutierten Allel) betrug der Hemmhofdurchmesser 1,6 cm. Die Extrakte aus den vier Mutanten waren antibiotisch inaktiv gegenüber dem Testkeim, so daß sich keine Hemmhöfe bildeten.

Die Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, daß die *pokGT1*-Mutante unfähig ist, Polyketomycin zu synthetisieren. Daraus läßt sich folgern, daß *pokGT1* für ein Protein codiert, das für die Polyketomycin-Biosynthese essentiell ist. Der erwünschte Nachweis, daß

die analysierten Gene zum Polyketomycin-Cluster gehören, konnte auf diese Weise erbracht werden.

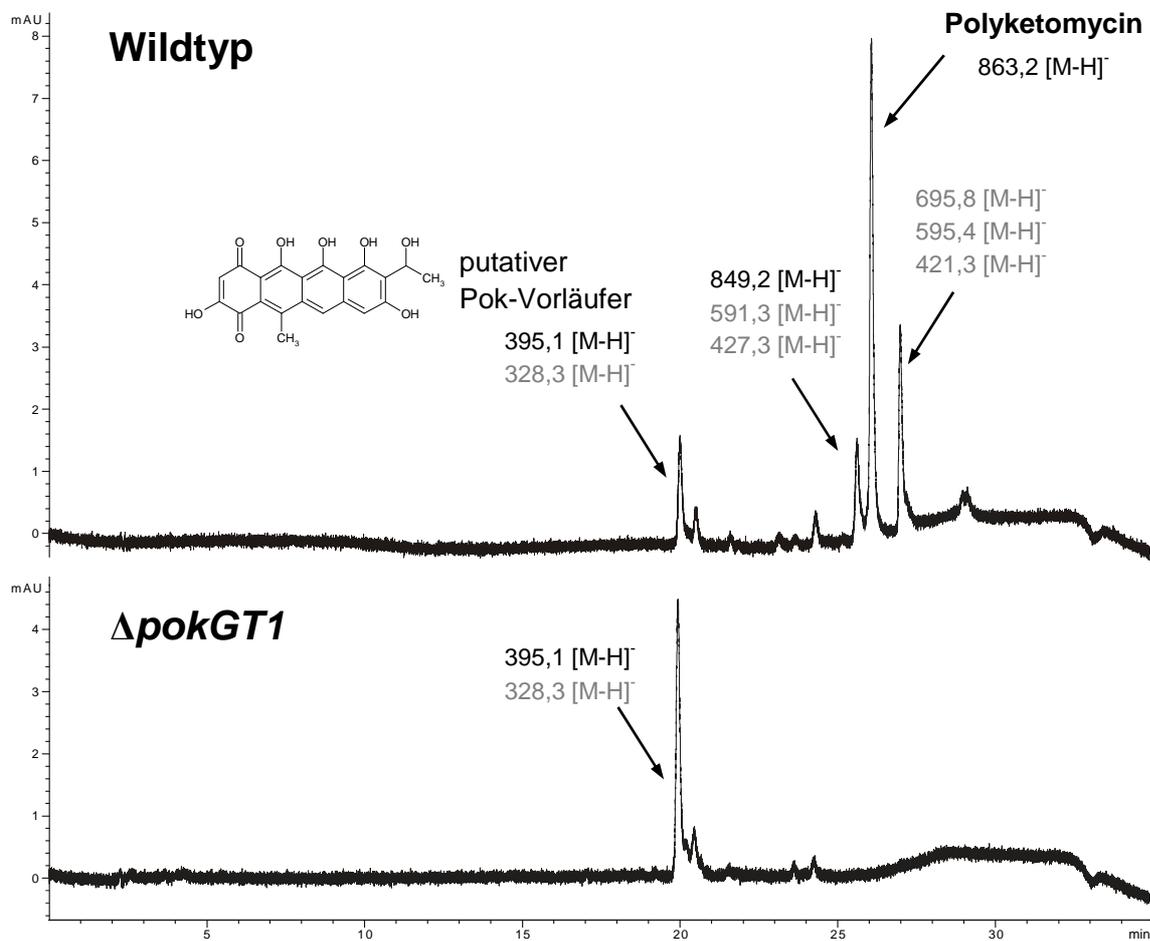


Abb. 3.5: HPLC-Chromatogramme zur Analyse der Rohextrakte aus dem Wildtyp bzw. der *pokGT1*-Mutante von *S. diastatochromogenes* Tü6028. Zur Verdeutlichung der Unterschiede sind die Chromatogramme von Wildtyp und *pokGT1*-Mutante untereinander angeordnet. Neben den Peaks sind noch die detektierten Massen der deprotonierten Moleküle angegeben. Die häufig vorkommenden Massen sind schwarz, die weniger häufig auftretenden Massen sind grau geschrieben.

3.2 Überexpression von Desoxyzuckerbiosynthesegenen

Als Werkzeuge für die kombinatorische Biosynthese wurden zahlreiche Enzyme aus Antibiotika-Clustern eingehend untersucht und charakterisiert. Durch Veränderungen im Cluster z.B. durch Genmutation oder Expression artfremder Gene konnten bereits neue Naturstoffe aus den jeweiligen Produzenten-Stämmen isoliert werden. Bereits 1985 gelang es Hopwood und Kollegen, durch Expression von Antibiotika-Biosynthesegenen aus unterschiedlichen *Streptomyces*-Stämmen, die an der Synthese von Actinorhodin und Granaticin bzw. Medermycin beteiligt sind, die ersten „hybriden“ Antibiotika Mederrhodin A und Dihydrogranatirhodin zu generieren (Hopwood *et al.*, 1985).

Eine weitere Möglichkeit, veränderte Molekülstrukturen zu erhalten, ist die Fütterung von Substanzen an den natürlichen oder bereits genetisch modifizierten Produzenten-Stamm.

Falls die an der Antibiotika-Biosynthese beteiligten Enzyme die alternativen Substrate akzeptieren und es anstelle des natürlichen Substrates in die Sekundärstoffe einbauen, entstehen neue „Naturstoffe“, die teilweise antibiotisch aktiv sind. So gelang beispielsweise Jacobsen und Kollegen bei Fütterungsversuchen an einer Mutante von *Saccharopolyspora erythraea* die Synthese von Erythromycin-Analoga (Jacobsen *et al.*, 1997).

Für ähnliche Untersuchungen oder auch für *In-vitro*-Tests z.B. zur Untersuchung der Substratspezifität von Glykosyltransferasen ist es von Interesse, Zugang zu Nukleotid-aktivierten Desoxyzuckern zu erhalten. Die chemische Synthese dieser Zuckerklasse wird durch die Notwendigkeit von Schutzgruppen zur Kontrolle der Regio- und Stereoselektivität erschwert. Zudem sind die Ausbeuten geringer als bei enzymatischer Synthese und eine Übertragung in den Großmaßstab wird dadurch aufwendig und teuer (Klaffke, 1994; Khan und Hindsgaul, 1994). Die chemische Synthese bietet jedoch die Möglichkeit funktionelle Gruppen (z.B. Thiol- oder Azidgruppen) in das Molekül einzubringen, die zum Teil durch enzymatische Synthese nicht zugänglich sind (Fu *et al.*, 2003).

Eine Alternative bietet möglicherweise die Enzym-katalysierte *In-vitro*-Synthese der dNDP-Desoxyzucker. Versuche, einige dieser Zuckerbiosynthesegene in dem klassischen Expressionswirt *E. coli* heterolog zu exprimieren, scheiterten jedoch oftmals daran, daß die Streptomyceten-Proteine durch Mißfaltung unlösliche „inclusion bodies“ bildeten (pers. Mitteilung Prof. Dr. L. Elling).

Für eine Kooperation mit Prof. Dr. Elling (RWTH Aachen) sollten die drei Enzyme UrdR, AviS bzw. UrdS und AviT aus den Desoxyzuckerbiosynthesewegen von *S. fradiae* Tü2717 und *S. viridochromogenes* Tü57 als Histidin-Fusionsproteine in Mutanten-Stämmen des Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 exprimiert werden. Wichtig war dabei, festzustellen, ob sich die Zielproteine in löslicher Form isolieren lassen und wenn möglich zu prüfen, ob die Enzymaktivität durch den Histidin-Tag (His-Tag) beeinträchtigt wird.

Zur Aufklärung der Funktionsweise von Enzymen kann die Kenntnis der dreidimensionalen Enzymstruktur von Nutzen sein. Wenn bekannt ist, welche Proteinstrukturen aufgrund der räumlichen Anordnung in den katalytischen Prozeß eingreifen, können die Enzyme gezielt im Bereich der katalytischen Domäne oder an Substratbindestellen durch Genmanipulation verändert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte SimB7, eine Glykosyltransferase aus *S. antibioticus* Tü6040, die C-C-glykosidische Bindungen knüpft, als Histidin-Fusionsprotein überexprimiert werden. Das lösliche Protein sollte für ein Kooperationsprojekt zur Verfügung gestellt werden mit dem Ziel, das Protein zu kristallisieren und die Enzymstruktur mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären.

3.2.1 Homologe Expression der 4-Ketoreduktase UrdR

3.2.1.1 Erstellung des Plasmids pAF1/urdr

Um das Gen *urdr* mit einem C-terminalen His-Tag zu versehen, wurde es unter Verwendung der Primer PDHF und PDHR ausgehend von einem 2,3 kb großen *Pst*I-Fragment aus dem Urdamycin-Cluster per PCR amplifiziert (s. Abschnitt 2.10.11.3). Das 0,8 kb große PCR-Produkt wurde mit *Hind*III und *Spe*I geschnitten und in den Expressionsvektor pUWL201 (geschnitten mit *Hind*III/*Xba*I) ligiert. Das resultierende Plasmid wurde pAF1/*urdr* (s. Abb. 6.5 im Anhang) genannt. Das *urdr*-Gen kann durch Restriktion mit *Hind*III und *Xba*I entfernt und durch eine andere Gensequenz ersetzt werden. Auf diese Weise eignet sich das Plasmid zur Expression anderer Proteine, die mit einem C-terminalen His-Tag versehen werden sollen.

3.2.1.2 Expression von UrdR in *S. fradiae* RN-435

Protoplasten der *S. fradiae*-Mutante RN-435, die kein funktionales *urdr*-Gen besitzt, wurden mit pAF1/*urdr* transformiert. Durch Verwendung dieses Mutanten-Stammes war es möglich, zu prüfen, ob das klonierte Gen mit dem C-terminalen His-Tag noch funktional ist.

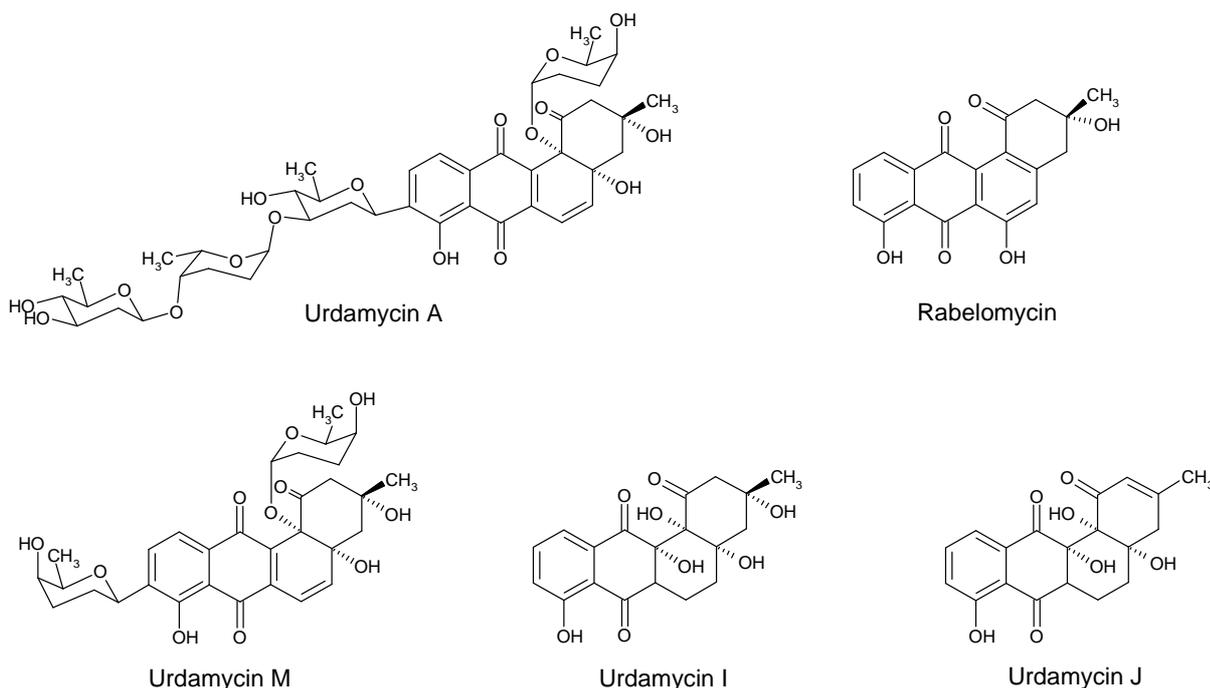


Abb. 3.6: Strukturformeln von Urdamycin A aus *S. fradiae* Tü2717, von den Verbindungen Rabelomycin, Urdamycin I und J aus der *S. fradiae* RN435-Mutante.

Die RN-435-Mutante ist unfähig, D-Olivose-haltige Urdamycinderivate zu produzieren, da sie den Molekülbestandteil dTDP-D-Olivose nicht synthetisieren kann. Stattdessen wurden im Extrakt der *urdr*-Mutante die zuckerfreien Polyketide Rabelomycin, Urdamycin I und J sowie Urdamycin M, das mit zwei Rhodinosose-Molekülen verknüpft ist, nachgewiesen (s. Abb. 3.6; Hoffmeister *et al.*, 2000).

Im Komplementierungsversuch zeigte sich, daß das eingebrachte *urdR*-Gen den Genverlust in der Mutante ausgleicht und die von UrdR abhängigen Syntheseprozesse wieder stattfinden. Zur Überprüfung wurden jeweils ausgehend von Wildtyp, Mutante und transformierter Mutante Kulturextrakte gewonnen. Die Extrakte wurden per DC aufgetrennt und es war erkennbar, daß die mit *pAF1/urdR* transformierte Mutante Urdamycin A (gelb), Urdamycin C (rot) und D (blauviolett) (s. Abb. 3.7) in geringem Maß produzierten. Außerdem wurde die Bildung von Urdamycin A per HPLC-Analyse bestätigt. Auf diese Weise konnte die Funktionalität von UrdR mit einem C-terminalen His-Tag nachgewiesen werden.

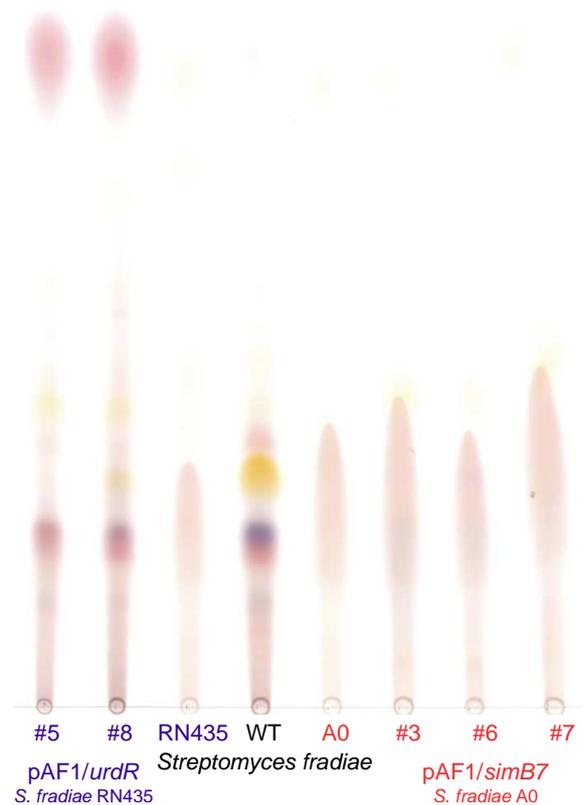


Abb. 3.7: Dünnschichtchromatogramm. Laufmittel Dichlormethan:Methanol = 9:1. Die Proben stammen von *S. fradiae* (RN-435 transformiert mit *pAF1/urdR* (#5 und #8), RN-435, Wildtyp sowie A0 und A0 mit *pAF1/simB7* (#3, #6 und #7)).

Um das UrdR-Histidin-Fusionsprotein zu isolieren, wurde die Expression ebenfalls in *S. fradiae* RN-435 durchgeführt. Nach der Anzucht der mit *pAF1/urdR* transformierten Bakterien konnte das Protein isoliert und per Affinitätschromatographie angereichert werden. Nach Auftrennung der gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE (s. Abb. 3.8) trat im Proteingel in den Elutionsfraktionen eine Proteinbande deutlich hervor, die der berechneten Masse des UrdR-Histidin-Fusionsproteins von ca. 28 kDa entspricht.

S. fradiae RN-435 mit *pAF1/urdR*

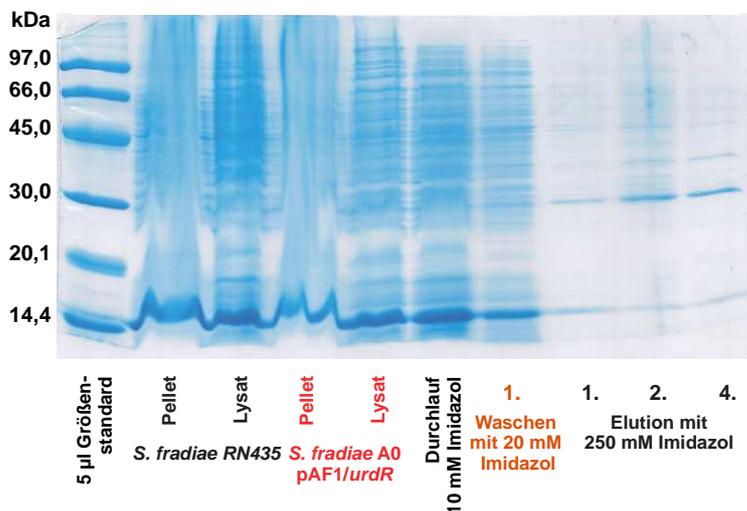


Abb. 3.8: SDS-PAGE. Expression von *pAF1/urdR* in *S. fradiae* RN-435. Detektion der Proteine durch Coomassie-Färbung.

3.2.2 Heterologe Expression der 3-Ketoreduktase AviT

3.2.2.1 Erstellung des Plasmids pAF1/aviT

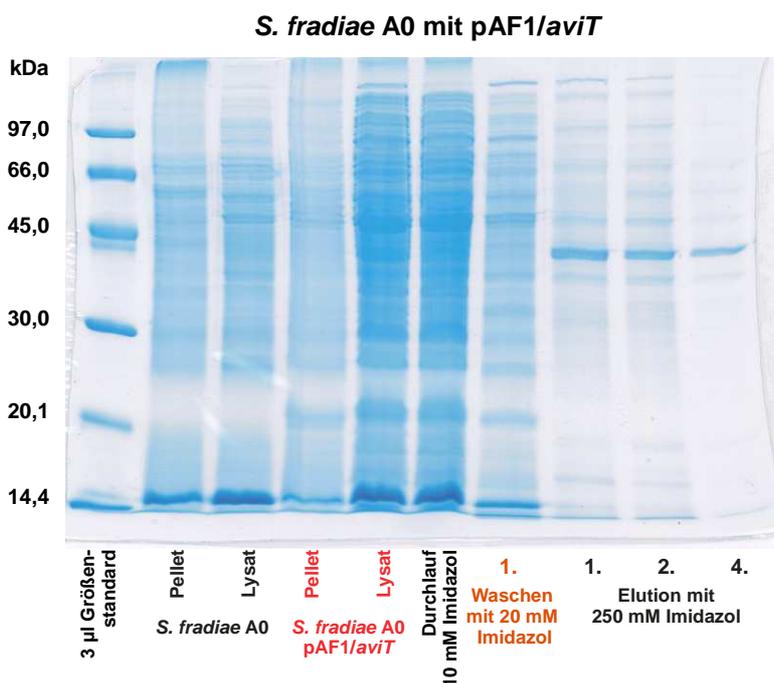
Zur Expression der 3-Ketoreduktase AviT aus *S. viridochromogenes* Tü57 wurde das Gen per PCR ausgehend von dem Subklon pBSK-4E5 amplifiziert (s. Abschnitt 2.10.11.5). Das 1,0 kb große PCR-Produkt wurde in den Vektor pAF1 ligiert. Für die Klonierung wurden Vektor (pAF1/urdR) und Insert jeweils mit *Hind*III und *Xba*I geschnitten. Das generierte Plasmid pAF1/aviT (s. Abb. 6.9 im Anhang) wurde zur Transformation von Protoplasten der *S. fradiae*-A0-Mutante verwendet.

3.2.2.2 Expression von AviT in *S. fradiae* A0

In der *S. fradiae* A0-Mutante wurden alle vier Glykosyltransferasegene inaktiviert. Die Mutante synthetisiert überwiegend Urdamycin I und J sowie Rabelomycin anstelle der glykosidierten Urdamycin-Verbindungen (Trefzer *et al.*, 2001). Bei der Auswahl wurde vor allem berücksichtigt, daß vom Vektor pUWL201 abgeleitete Expressionsplasmide in *S. fradiae*-Stämmen gut repliziert werden und sie außerdem gute Transformationsraten aufweisen.

Die Expression von AviT sollte keinen Einfluß auf das Produktspektrum der Mutante haben, da das zu *aviT* homologe Gen *urdT* in der A0-Mutante nicht verändert wurde. Die Enzymaktivität von AviT kann folglich nicht durch Expression von AviT in *S. fradiae* A0 anhand des Kulturextraktes nachgewiesen werden.

Der mit pAF1/aviT transformierte *Streptomyces*-Stamm A0 wurde vier Tage in CRM-Medium kultiviert, um die Bakterienzellmasse zur Proteinextraktion zu nutzen. Zum Nachweis des His-Tag-AviT-Fusionsproteins wurden die Proteine per Affinitätschromatographie ausgehend



von dem Bakterienzell-Lysat aufgereinigt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine trat in den Elutionsfraktionen eine deutliche Proteinbande hervor (s. Abb. 3.9). Der Vergleich mit dem Größenstandard zeigte, daß es sich dabei um das etwa 37 kDa große AviT mit His-Tag handelt.

Abb. 3.9: SDS-PAGE. Expression von pAF1/aviT in *S. fradiae* A0. Detektion der Proteine durch Coomassie-Färbung.

3.2.3 Heterologe Expression der 2,3-Dehydratase AviS

3.2.3.1 Erstellung des Plasmids pAF1/aviS

Um das Gen *aviS* aus *S. viridochromogenes* Tü57, das für eine 2,3-Dehydratase codiert, heterolog zu exprimieren, wurde es zunächst per PCR amplifiziert (s. Abschnitt 2.10.11.4). Das 1,4 kb große PCR-Produkt wurde durch Restriktion mit *HindIII* und *XbaI* für die Ligation vorbereitet. Das Plasmid pAF1/*urdR* (s. Abb. 6.5 im Anhang) wurde auch mit diesen Restriktionsendonukleasen gespalten, wobei das Gen *urdR* aus dem Plasmid entfernt wurde. Nach erfolgreicher Ligation von pAF1 mit dem *aviS*-Insert wurde das entstandene Plasmid pAF1/*aviS* (s. Abb. 6.8 im Anhang) zur Protoplastentransformation der A0-Mutante (*S. fradiae*) eingesetzt.

3.2.3.2 Expression von AviS in *S. fradiae* A0

Die A0-Mutante kann durch AviS nicht komplementiert werden, da bei ihr die Zuckerbiosynthesegene intakt sind und lediglich die Glykosyltransferasen fehlen (s. Abschnitt 3.2.2.2). Also läßt sich zwar die Expression von *aviS* überprüfen, aber der Nachweis der Enzymfunktion ist auf diese Weise nicht zu erbringen. Eine weitere Methode, die Enzymaktivität der veränderten Proteine nachzuweisen, wäre die enzymatische Umsetzung eines geeigneten Substrats.

Zur Isolierung und Aufreinigung von AviS wurde zunächst ein Klon vier Tage in CRM-Medium kultiviert. Das His-Tag-AviS-Fusionsprotein sollte durch Affinitätschromatographie angereichert und gereinigt werden. Bei Betrachtung der aufgetrennten Banden im Proteingel konnte keine stärker ausgeprägte Bande ausgemacht werden, die etwa der Proteingröße von 53 kDa entsprach. Um auszuschließen, daß ein „falsch positiver“ Klon, Ursache für das schlechte Expressionsresultat war, wurde ein weiterer transformierter Klon zur Proteinextraktion herangezogen. Nach Auftrennung der Proteine fiel in den Elutionsfraktionen eine Bande auf, die etwa die Laufhöhe des 45 kDa-Proteins im Größenstandard aufwies. Diese Größe weicht deutlich von der errechneten Größe von 53 kDa für AviS mit His-Tag ab. Eine analoge Bande ist im Proteinspektrum der nicht transformierten A0-Mutante nicht zu erkennen. Letztendlich wurde zur Klärung ein Western-Blot unter Verwendung eines Hexahistidin-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Dazu verwendete Carsten Rupprath aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elling (RWTH Aachen) den Proteinrohextrakt und die unlöslichen Zellbestandteile aus zwei *S. fradiae*-Klonen mit pAF1/*aviS*. Dieser Versuch ergab, daß die *Streptomyces*-Klone kein nachweisbares Protein mit His-Tag bildeten.

3.2.4 Homologe Expression der 2,3-Dehydratase UrdS

3.2.4.1 Erstellung des Plasmids pAF2/urds

Die Expression von AviS mit C-terminalem His-Tag konnte nicht nachgewiesen werden. Es wurde nun mit der zu AviS homologen 2,3-Dehydratase UrdS aus *S. fradiae* Tü2717 gearbeitet, da eine *urds*-Mutante von *S. fradiae* Tü2717 zur Verfügung stand, die eine Aktivitätsprüfung des Histidin-UrdS-Proteins durch Komplementierung erlaubte. Das Gen *urds* wurde per PCR amplifiziert und durch entsprechende Primer mit Codonen für einen N-terminalen His-Tag versehen (s. Abschnitt 2.10.11.7). Das PCR-Produkt wurde über die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstelle in den Vektor pUWL201 integriert. Der so entstandene Vektor wurde pAF2/urds (s. Abb. 6.6 im Anhang) genannt.

Dieser Vektor eignet sich dazu, auch andere Proteine mit einem N-terminalen His-Tag zu versehen, wobei das entsprechende Gen per PCR am 5'-Ende mit einer *BamHI*-Schnittstelle und am 3'-Ende mit einer *XbaI*-Schnittstelle versehen werden muß.

3.2.4.2 Erstellung des Plasmids pAF3/urds

Bei Verwendung von pAF2/urds in der *urds*-Mutante *S. fradiae* urdSpm konnte keine Expression von UrdS mit N-terminalem His-Tag festgestellt werden (s. Abschnitt 3.2.4.3). Für einen weiteren Versuch wurde das Plasmid pAF3/urds generiert. Das Plasmid ermöglicht es, den N-terminalen His-Tag nach Aufreinigung des Proteins per Affinitätschromatographie durch Verwendung von Thrombin abzuspalten. Zu diesem Zweck wurde das Fusionsprotein um eine Thrombin-Erkennungsstelle zwischen dem His-Tag und dem eigentlichen N-Terminus des Enzyms erweitert. Dazu wurde ein von pAF2/urds abgeleitetes Plasmid erstellt. Per PCR wurde ein 0,5 kb-Teilstück aus dem Vektor pET-28a(+) (Novagen) amplifiziert, das für einen N-terminalen His-Tag und eine Thrombin-Erkennungsstelle codiert (s. Abschnitt 2.10.11.8).

Das synthetisierte PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten. Der Vektor pAF2/urds wurde ebenfalls mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten. Dabei fiel ein 46 bp-Fragment, welches die Ribosomenbindestelle, das Start-Codon und den His-Tag enthält, heraus. Die übrige Vektor-DNA (8,3 kb) wurde mit dem PCR-Amplifikat ligiert, so daß das Plasmid pAF3/urds (s. Abb. 6.7) gebildet wurde. Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr zur Transformation eingesetzt, da AviS in der Zwischenzeit von den Kooperationspartnern in löslicher Form exprimiert werden konnte (pers. Mitteilung Prof. Dr. Elling).

3.2.4.3 Expression von UrdS in *S. fradiae* Δ urds

Die Expressionsversuche mit *urds* wurden mit dem Wirtstamm *S. fradiae* urdSpm durchgeführt, der im folgenden auch als *S. fradiae* Δ urds bezeichnet wird. Diese Mutante entstand durch das Einfügen von vier zusätzlichen Nukleotiden im Bereich einer

*Nco*I-Restriktionsschnittstelle in der *urdS*-Gensequenz (Domann, 2000). Diese Veränderung führte zu einer Leserasterverschiebung, wodurch die *urdS*-Mutante laut Hoffmeister *et al.* (2000) keinerlei Urdamycinderivate mehr akkumuliert. Die Expression von UrdS sollte zur Komplementierung der *urdS*-Mutante *S. fradiae* *urdSpm* führen.

Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde eine Kultur der *urdS*-Mutante zur Protoplastierung angezogen. Nach erfolgreicher Transformation der Bakterien mit *pAF2/urdS* sollte die Komplementierung der Mutante überprüft werden. Die dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Kulturextrakte aus sechs transformierten Mutanten, drei untransformierten Mutanten und drei Wildtyp-Kulturen lieferten widersprüchliche Resultate

(s. Abb. 3.10).

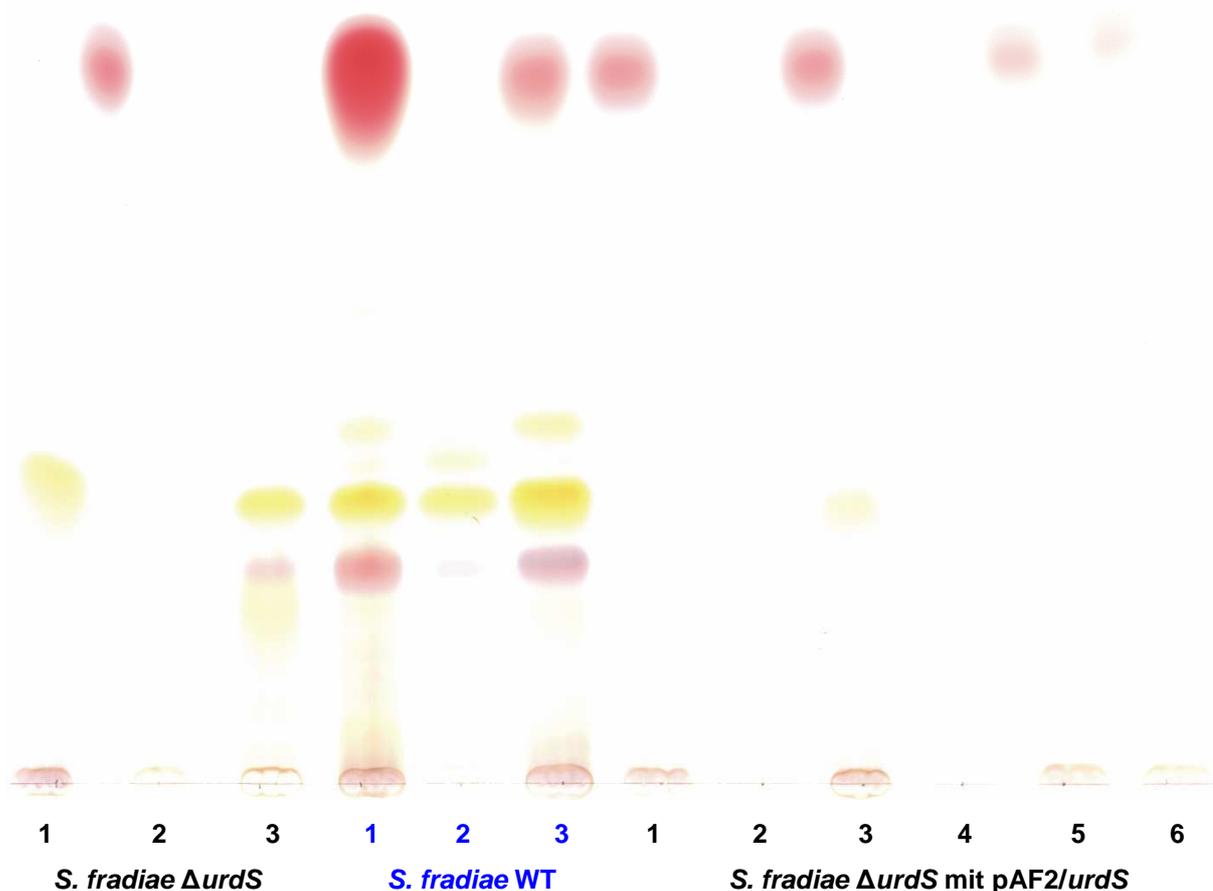


Abb. 3.10: Dünnschichtchromatogramm. Laufmittel Dichlormethan:Methanol = 9:1. Die Proben stammen von *S. fradiae* Δ *urdS* (1-3), *S. fradiae* Wildtyp (1-3) sowie *S. fradiae* Δ *urdS* mit *pAF2/urdS* (1-6).

Nur einer der sechs Kulturextrakte aus den mit *pAF2/urdS* transformierten Mutanten führte nach Auftrennung per DC zu einem erkennbaren Produkt, das als blaßgelber Fleck hervortrat. Bei den übrigen fünf Plasmid-tragenden Klonen war keine Antibiotikaproduktion erkennbar. Die drei nicht transformierten *urdS*-Mutanten verhielten sich uneinheitlich bezüglich der Sekundärstoffproduktion. In einem Fall war keine Produktion erkennbar, eine Mutante wies einen ähnlichen gelben Fleck auf, wie zuvor beschrieben, und im dritten Kulturextrakt waren mehrere farbige Flecken (gelblich und rötlich-violett) erkennbar, die

auch im Wildtyp-Extrakt zu finden waren, wobei es sich um Urdamycine des A-, C- bzw. D-Typs handeln könnte. Von diesen drei untersuchten *urdS*-Mutanten war keine identisch mit der zur Protoplastierung verwendeten Mutante.

Um das Phänomen zu ergründen, wurden weitere Klone der *urdS*-Mutante angezogen. Nach Auftrennung per DC waren ungewöhnlicherweise in den Kulturextrakten von *S. fradiae* Δ *urdS* erneut Urdamycinderivate feststellbar (ohne Abb.). Die sechs untersuchten Δ *urdS*-Klone zeigten allerdings keine einheitliche Syntheseleistung. Es wurden teilweise Urdamycinderivate synthetisiert und zum Teil wurde kein erkennbares Produkt gebildet.

Um zu gewährleisten, daß es sich bei dem verwendeten Stamm um die *urdS*-Mutante handelt, wurden sechs nicht transformierte Δ *urdS*-Klone, sechs mit pAF2/*urdS* transformierte Δ *urdS*-Klone und zwei *S. fradiae*-Wildtyp-Mischkulturen per PCR überprüft. Dazu wurde mit den Primern *urdS3-B* und *urdS5-B* eine „Kolonien-PCR“ mit anschließender *NcoI*-Restriktion der PCR-Produkte durchgeführt, wie es in der Dissertation von Silvie Domann (2000) beschrieben ist. In allen Fällen, bis auf einen getesteten Wildtyp-Ansatz, konnte ein 1,2 kb-Fragment amplifiziert werden. Lediglich die aus dem Wildtyp amplifizierte DNA ließ sich mittels *NcoI* schneiden, so daß ein 760 bp- und ein 440 bp-Fragment entstanden. Die übrigen PCR-Amplifikate waren nicht schneidbar, was bestätigt, daß die Mutanten im Bereich der *urdS*-internen *NcoI*-Schnittstelle tatsächlich eine Mutation aufweisen.

Zwei mit pAF2/*urdS* transformierte Mutanten wurden in CRM-Medium angezogen, um aus den Zellpellets Proteine zu gewinnen. Die Anreicherung des Histidin-Fusionsproteins erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Die anschließend durchgeführte SDS-PAGE verdeutlichte,

daß sich das gewünschte 53 kDa-Protein UrdS nicht aus dem Rohextrakt aufreinigen ließ (s. Abb. 3.11). Um Fehler bei der Aufreinigung ausschließen zu können, wurden Anzucht und Proteinisolierung wiederholt. Das Resultat war erneut negativ. Die Sequenzdaten sprechen dafür, daß *urdS* korrekt im Plasmid vorliegt und exprimierbar sein müßte.

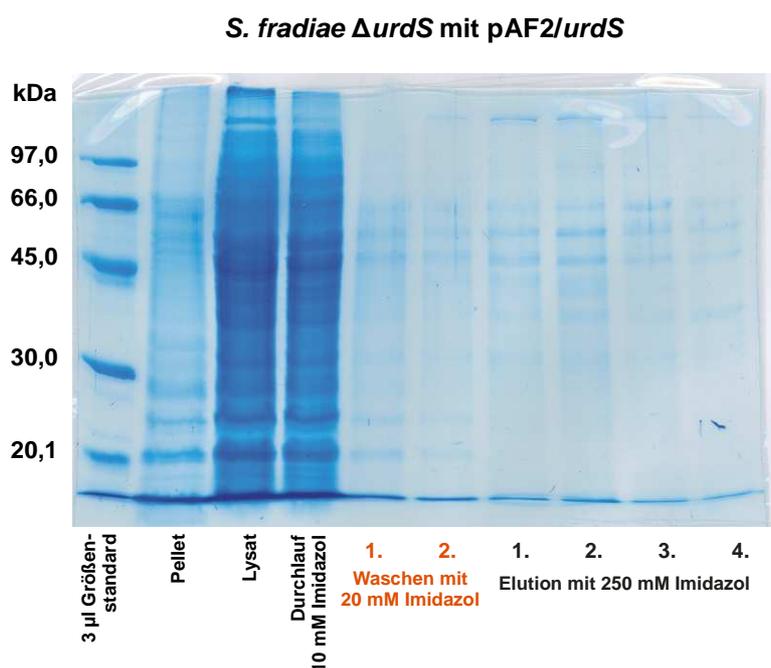


Abb. 3.11: SDS-PAGE. Expression von pAF2/*urdS* in *S. fradiae* Δ *urdS*. Detektion der Proteine durch Coomassie-Färbung.

Nachdem Mitarbeiter des AK Prof. Dr. Elling AviS in löslicher Form aus *E. coli* isolieren konnten, wurden die zuvor beschriebenen Expressionsversuche abgebrochen. Die *urdS*-Mutante (*urdSpm*) erscheint als Expressionswirt wenig geeignet, da sie entgegen früheren Untersuchungen doch Urdamycinderivate produzieren kann. Es bleibt unklar, ob der verwendete Stamm der *urdS*-Mutante entspricht oder ob weitere Mutationen vorliegen.

3.2.5 Heterologe Expression der Glykosyltransferase SimB7

Streptomyces antibioticus Tü6040 ist der Produzent der sogenannten Simocyclinone. Das Hauptprodukt ist Simocyclinon D8, das antibakteriell und zytostatisch wirksam ist. (Schimana *et al.*, 2000) Am Molekülaufbau ist u.a. die Glykosyltransferase SimB7 beteiligt, das die Übertragung des Didesoxyzuckers D-Olivose auf das C9-Atom des Polyketids katalysiert (s. Abb. 3.12; Trefzer *et al.*, 2002).

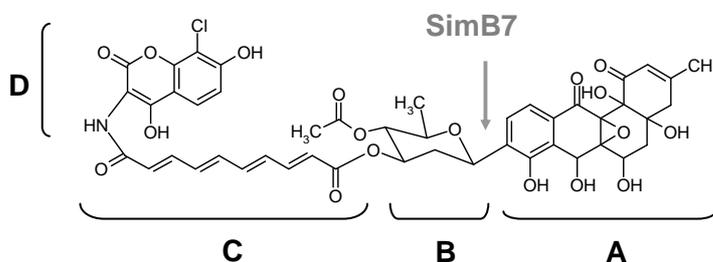


Abb. 3.12: Molekülaufbau des Simocyclinons D8 aus *S. antibioticus* Tü6040; **A**: angucyclisches Polyketid; **B**: D-Olivose; **C**: Tetraen-Seitenkette; **D**: halogeniertes Aminocumarin. SimB7 katalysiert die Verknüpfung von dNDP-D-Olivose mit dem Angucyclinon (nach Trefzer *et al.*, 2002)

3.2.5.1 Erstellung des Plasmids pAF1/*simB7*

Unter Verwendung eines *Pst*I-Fragmentes aus dem Simocyclinon-Cluster als Template-DNA wurde *simB7* per PCR amplifiziert (s. Abschnitt 2.10.11.6). Das 1,2 kb große PCR-Produkt wurde mit *Hind*III und *Xba*I geschnitten. Aus dem Plasmid pAF1/*urdR* wurde durch Restriktion mit *Hind*III und *Xba*I die für *urdR* codierende DNA-Sequenz entfernt. Nach der Ligation von Vektor und Insert konnte das entstandene Plasmid pAF1/*simB7* (s. Abb. 6.10 im Anhang) zur Protoplastentransformation der *S. fradiae*-A0-Mutante verwendet werden.

3.2.5.2 Expression von SimB7 in *S. fradiae* A0

Von den mit pAF1/*simB7* transformierten A0-Mutanten wurden aus zwei unabhängigen Ansätzen drei bzw. acht Klone kultiviert. Nach 6-tägigem Wachstum wurden jeweils 2 ml Kulturlösung mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Der trockene Extrakt wurde in 50 µl Methanol aufgenommen. Bei der Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie waren zwischen den ersten drei transformierten A0-Mutanten, Wildtyp und A0-Mutante aufgrund der geringen Konzentration im Kulturrextrakt kaum Unterschiede erkennbar (rechts in Abb. 3.7). Die Analyse per HPLC ergab, daß die Klone mit dem Plasmid pAF1/*simB7* geringe Mengen eines D-Typ-Urdamycins produzieren können.

Nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Extrakte aus den anderen acht Kulturmedien (ohne Abb.) konnte in sechs Fällen die Synthese der glykosidierten Verbindungen Urdamycinon D, Urdamycinon B, Urdamycinon C und Aquayamycin nachgewiesen werden (Strukturformeln s. Abb. 3.13).

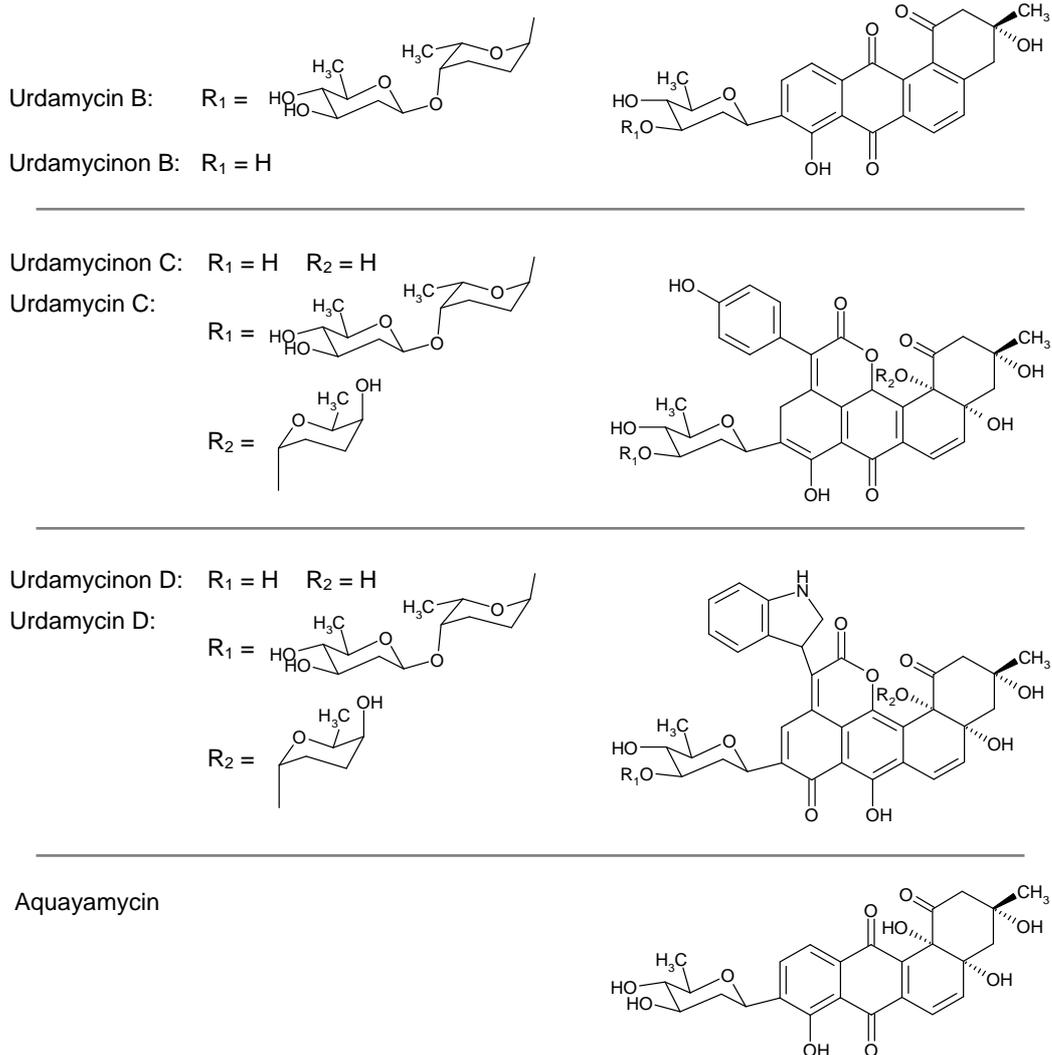
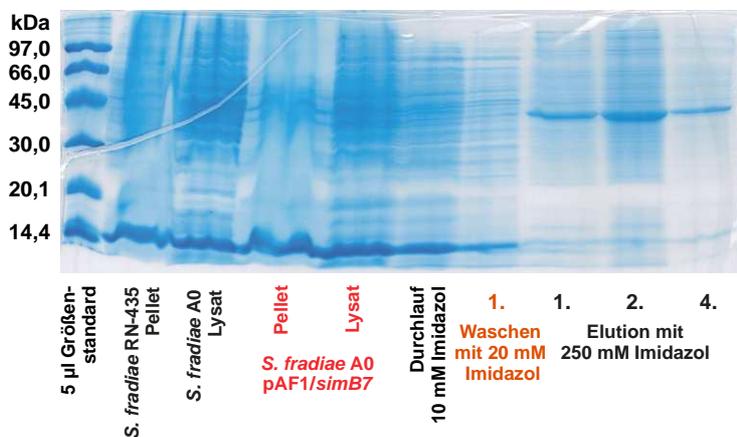


Abb. 3.13: Strukturformeln einiger Urdamycin-Verbindungen. Die Urdamycine B, C und D lassen sich aus dem Wildtyp *S. fradiae* Tü2717 isolieren. Die entsprechenden Urdamycinone B, C und D sowie Aquayamycin, können nach Expression von SimB7 in *S. fradiae* A0 im Kulturextrakt detektiert werden.

Zur Isolierung des SimB7-Proteins wurden die transformierten Streptomyceten 4 Tage in

S. fradiae A0 mit pAF1/simB7



CRM-Medium angezogen. Das mittels Affinitätschromatographie angereicherte Enzym SimB7 mit His-Tag trat im Proteingel (s. Abb. 3.14) als deutliche Bande in den Elutionsfraktionen hervor. Die berechnete Proteingröße beträgt etwa 42 kDa, was der Laufrhöhe des Proteins im SDS-Polyacrylamid-Gel entspricht.

Abb. 3.14: SDS-PAGE. Expression von pAF1/simB7 in *S. fradiae* A0. Detektion der Proteine durch Coomassie-Färbung.

3.3 Expression von Sus1 und Synthese eines Codon-optimierten Gens

3.3.1 Saccharosesynthase

Die Saccharosesynthase (Susy = *sucrose synthase*) ist ein Enzym, das im pflanzlichen Kohlenhydratstoffwechsel eine wichtige Rolle einnimmt. Die katalysierte Reaktion ist die Spaltung des Transportmetaboliten Saccharose unter Einbau eines Nucleosiddiphosphates zu dNDP-Glucose und Fructose (s. Abb. 3.15) oder die entsprechende Rückreaktion (Pontis *et al.*, 1981). Während *in vitro* sowohl Hin- als auch Rückreaktion ablaufen, deuten Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* an, daß die Saccharosesynthase *in vivo* nur am Saccharoseabbau beteiligt ist (Avigad, 1982).

Es wurde festgestellt, daß das Enzym zwar unterschiedliche Nucleosiddiphosphate akzeptiert, die Akzeptanz jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Römer *et al.*, 2004). Die katalytische Umsetzung der Saccharosesynthase 1 (Sus1) aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) ist am höchsten, wenn das natürliche Substrat UDP zur Verfügung steht. In Relation zu UDP beträgt die Enzymaktivität 34 % bei Zugabe von dTDP, 12 % bei ADP und 0,5 %, wenn CDP oder GDP als Nucleosiddiphosphat zur Verfügung stehen. Auch bei der Synthesereaktion zeigt Sus1 ein analoges Aktivitätsmuster mit der höchsten Aktivität für das Substrat UDP-Glucose (Römer *et al.*, 2004).

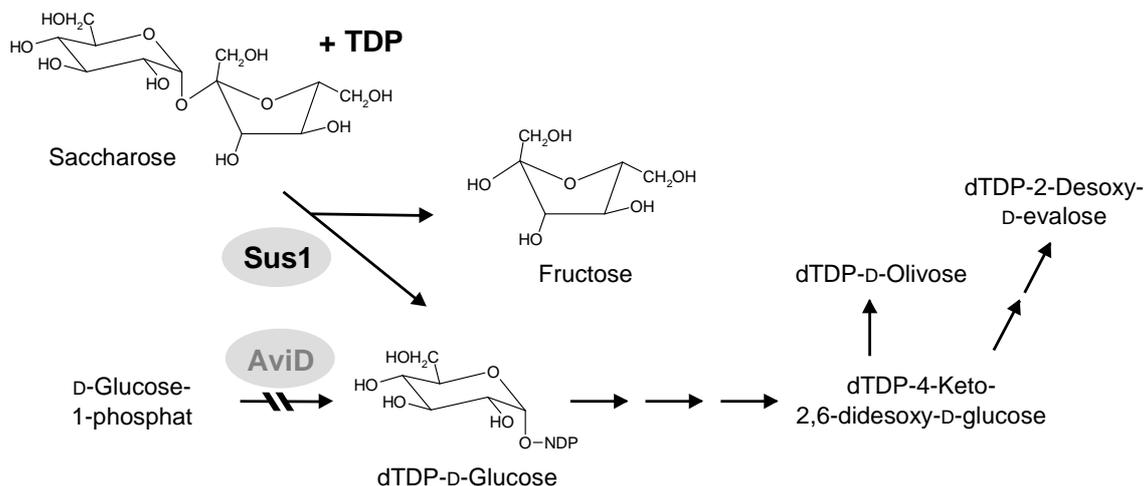


Abb. 3.15: Umsetzung von Saccharose zu Fructose und dTDP-D-Glucose durch Sus1 unter Einbezug der dTDP-D-Olivose- und dTDP-2-Desoxy-D-evalose-Biosynthese in *S. viridochromogenes* Tü57. **Sus1** = Saccharosesynthase; **AviD** = dTDP-Glucose-Synthase.

Durch Überexpression der Saccharosesynthase 1 aus *Solanum tuberosum* in *S. viridochromogenes* Tü57 soll die Synthese von dTDP-D-Glucose verstärkt werden. Die Aktivität des Enzyms könnte auch Auswirkung auf die Desoxyzuckerbiosyntheserate haben und Sus1 bietet die Möglichkeit Saccharose anstelle von Glucose als Substrat zu nutzen.

Um die Aktivität der heterolog exprimierten Saccharosesynthase leichter überprüfen zu können, wurde eine *aviD*-Deletionsmutante ausgehend von *S. viridochromogenes* Tü57 hergestellt. In der *aviD*-Mutante würde theoretisch die Synthese von 2-Desoxy-D-erythrose und D-Olivose, die Bestandteil des Avilamycin-Moleküls sind, unterbrochen oder eingeschränkt, wenn nicht aus anderen Stoffwechselprozessen dTDP-D-Glucose zur Verfügung steht (s. Abb. 3.15). Die Avilamycin-Biosynthese würde also erheblich beeinträchtigt. *Sus1* sollte in der *aviD*-Mutante auf Funktionalität getestet werden, da bei ausreichender Versorgung mit den Substraten Saccharose und dTDP eine Komplementierung der Mutante erwartet wurde. Die dann wieder stattfindende Avilamycin-Produktion wäre durch Analyse des Kulturextraktes nachweisbar.

3.3.2 Saccharose als C-Quelle

Zur Funktionsprüfung der Saccharosesynthase *Sus1* nach dem Expressionsversuch in einer *S. viridochromogenes*-Mutante sollte der Expressionswirt idealerweise Saccharose aus dem Kulturmedium als Substrat nutzen können. Es ist bislang unklar, ob Streptomyceten ein Aufnahmesystem für Saccharose besitzen. Der einzige Vertreter aus der Gattung *Streptomyces*, der bisher hinsichtlich eines möglichen Transportsystems für Zuckerverbindungen untersucht wurde, ist *S. coelicolor* A3(2). Parche *et al.* (2000) untersuchten das Phosphotransferase-System (PTS) von *S. coelicolor*. Das PTS ist bei anderen Bakterienarten (z.B. *E. coli*) an der Aufnahme von Kohlenhydraten sowie an regulatorischen Prozessen beteiligt (Postma *et al.*, 1993; Stülke und Hillen, 1998).

Um festzustellen, ob *S. viridochromogenes* Tü57 prinzipiell in der Lage ist, Saccharose in die Zelle aufzunehmen, wurden die Bakterien in Minimalmedium mit reiner Saccharose als einziger C-Quelle kultiviert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz Minimalmedium ohne Zusatz von Saccharose ebenfalls mit Streptomyceten beimpft. Nach Inkubation für zwei bis vier Tage bei 37 °C und 180 rpm war deutlich zu erkennen, daß im Kolben ohne Saccharose kein Bakterienwachstum möglich war. In den Kolben, die Saccharose enthielten, konnten die Bakterien entweder durch Aufnahme der Saccharose ins Zellinnere oder durch Aufnahme der daraus hervorgehenden Monosaccharide ihren Kohlenstoffbedarf decken.

3.3.3 Inaktivierung von *aviD*

AviD katalysiert als dTDP-Glucose-Synthase einen frühen Reaktionsschritt innerhalb des Desoxyzuckerbiosyntheseweges (s. Abb. 1.6 und Abb. 4.4; Weitnauer *et al.*, 2001b). Die Synthese von dTDP-Glucose sollte durch Generierung einer entsprechenden Mutante unterbunden oder wenigstens reduziert werden.

3.3.3.1 Erstellung des Plasmids pSP1/*aviD-S*

Um eine *aviD*-Deletionsmutante zu generieren, wurde ein 2,8 kb großes PCR-Fragment amplifiziert, welches *aviD* (1068 bp) beinhaltet. Das Fragment wurde nach Restriktion mit *Bam*HI und *Hind*III in den vorbereiteten Vektor pUC19 (geschnitten mit *Bam*HI und *Hind*III) ligiert.

Ausgehend von dem neuen Plasmid pUC19/*aviD* wurde per Restriktion mit *Sac*II ein 291 bp-Fragment ausgeschnitten. Das verbliebene Plasmid wurde religiert, so daß das Gen eine *in-frame*-Deletion von 291 bp erhält (s. Abb. 3.16).

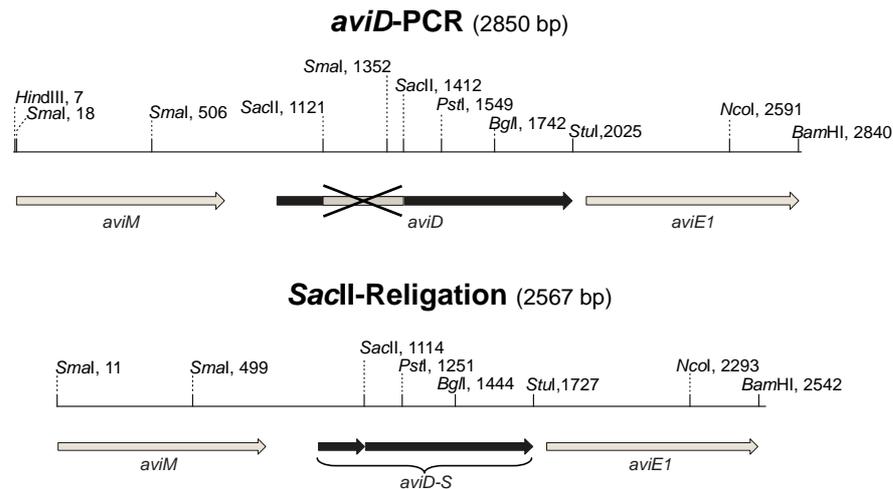


Abb. 3.16: Übersichtsskizze zur Herstellung eines Inaktivierungskonstruktes für *aviD*. Im oberen Teil der Abbildung ist das 2,8 kb große PCR-Fragment gezeigt. Neben dem vollständigen Gen *aviD* wurden Teile der Gene *aviM* und *aviE1* amplifiziert. Nach Restriktion mit *Hind*III und *Bam*HI wurde das Fragment zur weiteren Bearbeitung in den Vektor pUC19 ligiert. Durch Restriktion mit *Sac*II und anschließende Religation wurde ein 291 bp-Fragment entfernt. Das Konstrukt mit dem verkürzten Gen ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt.

Das pUC19/*aviD-S* genannte *Sac*II-Deletionskonstrukt wurde unter Verwendung des Primers *aviD*-BS1 sequenziert. Die Deletion des 291 bp-*Sac*II-Fragments wurde dadurch bestätigt.

Das Gen *aviD-S* und die benachbarten Bereiche wurden mit *Hind*III und *Eco*RI ausgeschnitten und in den mit *Pst*I und *Eco*RI geschnittenen Vektor pSP1 überführt. Zuvor wurde das Klenow-Fragment eingesetzt, um an Vektor und Insert glatte Enden zu erzeugen. Durch die Ligation entstand das Inaktivierungsplasmid pSP1/*aviD-S* (s. Abb. 6.2 im Anhang).

3.3.3.2 Transformation von *S. viridochromogenes* Tü57

Das entstandene Inaktivierungsplasmid pSP1/*aviD-S* wurde zur Transformation von *S. viridochromogenes* Tü57-Protoplasten verwendet. Das Plasmid mit dem mutierten Sequenzabschnitt sollte durch homologe Rekombination ins bakterielle Genom integrieren. Die Selektion „positiver“ Klone wird dabei durch die Vermittlung einer Antibiotikums-Resistenz (Erythromycin) durch pSP1 vereinfacht. Nach der Transformation wuchsen je Platte ca. 20 Streptomyeten-Klone. Acht Klone wurden per Kolonien-PCR überprüft und erwiesen sich als Integrationsmutanten.

Eine Integrationsmutante wurde für die Passagierung und das Screening nach einer Doppel-*Crossing-over*-Mutante ausgewählt. Jeder Passagierungsschritt umfaßte eine Anzucht in

Flüssig- und auf Festmedium. Schon nach der 3. Passage gab es fünf Klone, die Erythromycin-sensibel waren. Nach der 4. Passage kamen acht weitere Klone hinzu.

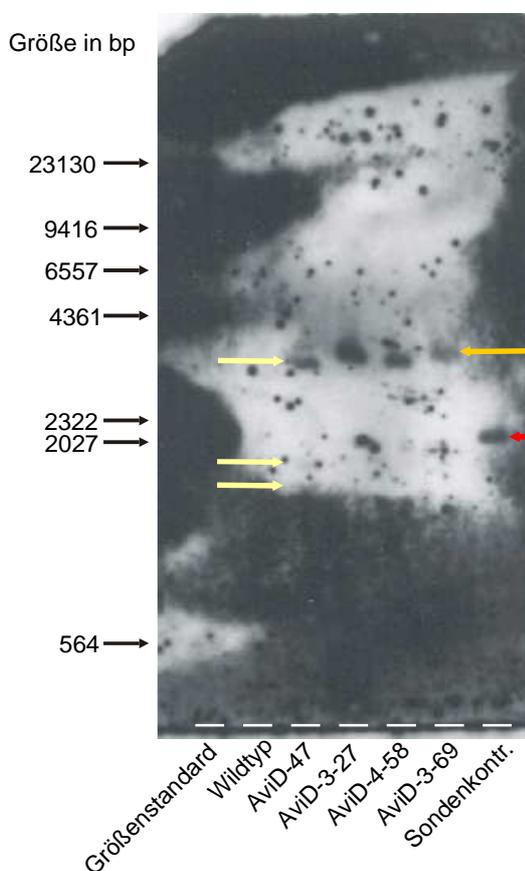
3.3.3.3 Prüfung der Mutanten per PCR

Im Falle eines *Single-Crossing-overs* ergibt die PCR mit den Primern *aviD-F2/aviD-R2* ein 949 bp- und ein 1240 bp-Fragment, da zwei unterschiedliche Allele des *aviD*-Gens vorliegen. Beim Wildtyp sollte sich nur das 1240 bp-Fragment amplifizieren lassen, während sich bei einer *Doppel-Crossing-over*-Mutante nur noch ein 949 bp-PCR-Produkt synthetisieren lassen sollte.

Die Überprüfung der Klone per Kolonien-PCR lieferte positive Resultate. Bei den *Single-Crossing-over*-Mutanten ließ sich allerdings meist nur eines der beiden möglichen Fragmente amplifizieren. Daher war das Vorhandensein von nur einem 949 bp-Fragment nicht zwangsläufig als *Doppel-Crossing-over* zu werten.

3.3.3.4 Prüfung der Mutanten per Southern-Hybridisierung

Um abzusichern, daß *Doppel-Crossing-over*-Mutanten vorliegen, wurde zusätzlich eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde die genomische DNA des *S. viridochromogenes*-Wildtyps, einer Integrationsmutante und von drei möglichen *Doppel-*



Crossing-over-Mutanten isoliert und jeweils mit *SmaI* geschnitten. Das intakte Gen *aviD* enthält diese Schnittstelle, während sie im verkürzten Gen *aviD-S* fehlt. Als Sonde diente ein Digoxigenin-markiertes 2,05 kb-Fragment aus dem Inaktivierungskonstrukt *pSP1/aviD-S*, welches durch Restriktion mit *SmaI* erhalten wurde.

Der Blot (Abb. 3.17) lieferte leider kein Signal für die Wildtyp-DNA. Bei der Sondenkontrolle ist ein deutliches Signal von ca. 2 kb zu sehen. Die übrigen Signale stammen von den drei zu prüfenden *aviD*-Mutanten 3-27, 4-58 und 3-69. Ein etwa 3,2 kb großes DNA-Fragment aus den drei genannten Mutanten hybridisiert jeweils mit der Sonden-DNA.

Abb. 3.17: Signale des Southern Blots zum Nachweis der *aviD*-Integrations- bzw. *Doppel-Crossing-over*-Mutanten. Mittels Röntgenfilm waren die Signale des Größenstandards, der Integrationsmutante Nr. 47, der drei Mutanten 3-27, 4-58 und 3-69 sowie der Sondenkontrolle detektierbar. Der rote Pfeil deutet auf die Laufhöhe der DNA bei ca. 2 kb. Der orangene Pfeil weist auf die ca. 3,2 kb-Bande der *aviD*-Mutanten und die gelben Pfeile weisen auf die drei Banden der *Single-Crossing-over*-Mutante.

Die Auswertung (s. Tab. 3.6) hat ergeben, daß alle drei überprüften Klone nur noch das verkürzte Gen *aviD-S* enthalten und es sich folglich um die gewünschte *aviD*-Mutante handelt. Die drei Signale, die bei der Integrationsmutante auftraten, entsprachen in zwei Fällen den erwarteten Fragmentgrößen von 1,5 kb und 3,2 kb. Das dritte zu erwartende Fragment hatte eine berechnete Größe von etwa 0,9 kb. Stattdessen trat ein Signal bei etwa 1,8 kb auf. Leider war ein Vergleich mit dem Wildtyp nicht möglich, da die eingesetzte DNA-Menge zu gering war. Vielleicht handelt es sich bei dem 1,8 kb-Signal um ein Artefakt und die 0,9 kb-Bande ist wegen der starken Schwärzung nicht erkennbar.

Tab. 3.6: Berechnete und erhaltene Fragmentgrößen aus der *Southern*-Hybridisierung von genomischer DNA aus *S. viridochromogenes* (Wildtyp und Mutanten) nach Restriktion mit *Sma*I.

Probe	Erwartete Fragmente	Ergebnis des Blots
Wildtyp	846 bp und 2638 bp	kein Signal
Integrationsmutante	846 bp, 2048 bp und 2638 bp oder 846 bp, 1493 bp und 3193 bp	etwa 1,5 kb, 1,8 kb und 3,2 kb
<i>aviD</i> -Mutante	3193 bp	3,2 kb
Sondenkontrolle	2048 bp	2,0 kb

Für die weitere Arbeit wurde ein Klon (Nr. 3-27) ausgewählt. Ausgehend von dieser *aviD*-Mutante wurden Protoplasten hergestellt und mit pSETerm/*aviD* bzw. pSET152/*aviD* (Komplementierung), pSETerm/*susy* oder dem Vektor pSETerm (als Negativkontrolle), transformiert.

3.3.3.5 Analyse der Produkte von *S. viridochromogenes* Δ *aviD*

Die *aviD*-Mutanten sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Avilamycin zu produzieren, untersucht werden. Dazu wurden fünf Mutanten zusammen mit dem *S. viridochromogenes* Tü57-Wildtyp im SG-Produktionsmedium angezogen.

Ein Teil des Kulturextraktes wurde für die DC-Analyse eingesetzt. Nur im Wildtyp-Extrakt konnten auf der DC-Platte (ohne Abb.) nach Behandlung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz Avilamycine durch die charakteristische Schwarzfärbung nachgewiesen werden. In den Extrakten der fünf getesteten Mutanten konnte kein Avilamycin nachgewiesen werden.

Die Extrakte wurden zusätzlich mittels Agardiffusionstest auf ihre Aktivität gegen *B. subtilis* getestet. Hemmhöfe traten nur beim Avilamycin-Standard (Eli-Lilly) und bei dem Wildtyp-Extrakt auf. Der Extrakt aus den *aviD*-Mutanten zeigte keine biologische Aktivität gegenüber dem Testkeim. Die Avilamycin-Produktion ist also wie erwartet in den getesteten Δ *aviD*-Klonen zusammengebrochen.

3.3.4 Komplementierung der *aviD*-Mutante

Die zuvor beschriebene *aviD*-Mutante sollte unter Verwendung von geeigneten Plasmiden mit *aviD* bzw. *sus1* komplementiert werden. Die Expression von AviD dient der Absicherung, daß der Zusammenbruch der Avilamycin-Biosynthese allein durch die *aviD*-Inaktivierung verursacht wurde. Die Expression von Sus1 soll ebenfalls in der *aviD*-Mutante durchgeführt werden. Falls die Saccharosesynthase Sus1 funktional exprimierbar wäre, müßte dies zur Synthese von dTDP-D-Glucose führen. Dies würde den unterbrochenen Biosyntheseweg komplementieren und zur Produktion von Avilamycin führen.

3.3.4.1 Erstellung des Plasmids pSETerm/*aviD*

Das Gen, das für die dTDP-Glucose-Synthase AviD codiert, wurde ausgehend von dem Cosmid-Subklon P2S11 aus *S. viridochromogenes* Tü57 per PCR amplifiziert. Das 1,2 kb große PCR-Produkt wurde durch die Primer *aviD_NdeI* und *aviD_XbaI* an den Enden mit Restriktionsschnittstellen versehen. Nach Restriktion von Vektor und PCR-Produkt mit *NdeI* und *XbaI* wurde *aviD* in den Vektor pSET-1cerm ligiert. Das im Vektor vorliegende *urdGT1c*-Gen wurde durch die Restriktion entfernt. Das fertiggestellte Expressionsplasmid pSETerm/*aviD* (ohne Abb.) wurde zur Transformation von Protoplasten der *aviD*-Mutante verwendet.

3.3.4.2 Erstellung des Plasmids pSET152/*aviD*

Nach der Feststellung, daß sich die mit pSETerm/*aviD* transformierte *aviD*-Mutante nicht komplementieren ließ, wurde ein zweites Expressionsplasmid mit *aviD* erstellt. In diesem Fall wurde per Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* ein 5 kb großes Fragment aus dem Cosmid-Subklon P2S11 ausgeschnitten. Neben *aviD* enthält dieses Fragment auch das vollständige Gen *aviE1* sowie einen Teil des Gens *aviM* und die *aviD*-Promotor-Region. Nach Ligation von Vektor und Insert wurde das resultierende Plasmid pSET152/*aviD* (s. Abb. 6.3 im Anhang) zur Protoplastentransformation der *aviD*-Mutante verwendet.

3.3.4.3 Erstellung des Plasmids pSETerm/*susy*

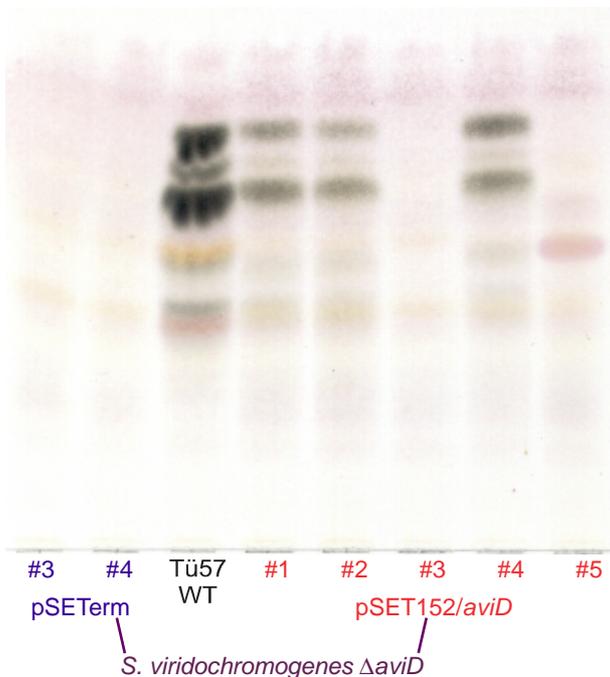
Das Intron-freie Saccharosesynthasegen *sus1_Soltu* wurde mit *NcoI* und *BamHI* aus dem Plasmid pTSSuc (bereitgestellt von Thomas Schumacher, AK Prof. Dr. L. Elling) geschnitten und in den Vektor pSET-1cerm eingefügt. Um das Gen *urdGT1c* aus dem Vektor zu entfernen, wurde eine Restriktion mit *BglII* und *NdeI* durchgeführt. Die 5'-Überhänge wurden jeweils mittels Klenow-Fragment aufgefüllt. Nach der Ligation wurde die Orientierung des Inserts geprüft. Das entstandene Expressionsplasmid pSETerm/*susy* (s. Abb. 6.11 im Anhang) wurde zur Transformation von Protoplasten der *aviD*-Mutante verwendet.

3.3.4.4 Expression von *AviD* in *S. viridochromogenes* $\Delta aviD$

Fünf Klone, die das Plasmid pSETerm/*aviD* aufgenommen hatten, wurden kultiviert, um festzustellen, ob sich die *aviD*-Mutante komplementieren lässt. Zum Vergleich wurden eine Wildtyp-Kultur (*S. viridochromogenes* Tü57) und zwei mit pSET152 transformierte *aviD*-Mutanten angezogen. Die aus diesen Kulturen isolierten Extrakte wurden mittels DC und Agardiffusionstest mit dem Testkeim *B. subtilis* untersucht. Es konnte mit Ausnahme der Wildtyp-Kultur kein Avilamycin im Kulturextrakt festgestellt werden.

Die Gensequenz von *aviD* wurde ausgehend von dem Plasmid pUCPU21/*aviD* sequenziert und auf eventuelle PCR-Fehler überprüft. Die Sequenz entsprach der bekannten Wildtyp-Sequenz. Außerdem wurde per Kolonien-PCR geprüft, ob die untersuchten Transformanten tatsächlich das Plasmid pSETerm/*aviD* tragen. Dazu wurden die Primer Ap1 und Ap2 (zur Verfügung gestellt von Corina Bihlmaier) eingesetzt, die am Apramycin-Resistenzgen des Plasmids pSETerm binden. Das amplifizierte PCR-Produkt wies die erwartete Größe von 0,55 kb auf.

Nach erfolgreicher Transformation der *aviD*-Mutanten mit dem zweiten Expressionsplasmid pSET152/*aviD* mit *aviD* unter Kontrolle des nativen Promotors wurden acht Kulturen angeimpft. Dabei handelte es sich um fünf Transformanten mit pSET152/*aviD*, zwei



Transformanten mit pSETerm und den Wildtyp. (Das Plasmid pSETerm enthält zwar den *ermE* up-Promotor, entspricht ansonsten pSET152 und dient daher als Negativkontrolle.) Nach sechs Tagen Inkubation in 30 ml SG-Medium wurden jeweils 3 ml der Kultur mit 3 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Der trockene Extrakt wurde in Methanol aufgenommen und für die DC-Analytik eingesetzt. Drei der getesteten Klone wurden durch das Konstrukt pSET152/*aviD* komplementiert und produzieren wieder Avilamycin, wie bei der DC-Untersuchung gezeigt werden konnte (s. Abb. 3.18).

Abb. 3.18: Dünnschichtchromatogramm zum Nachweis der *aviD*-Komplementierung. Die Avilamycine sind nach Behandlung der DC-Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure an ihrer Schwarzfärbung erkennbar.

3.3.4.5 Expression der Saccharosesynthase *Sus1* in *S. viridochromogenes* Δ *aviD*

Die mit pSETerm/*susy* transformierten Streptomycceten wurden in SG-Medium mit Saccharose-Zusatz kultiviert. Aus den Kulturen wurde mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Weder für die *aviD*-Mutante noch für die mit pSETerm/*susy* transformierten Mutanten konnte Avilamycin-Produktion nachgewiesen werden. Einzig der zu Kontrollzwecken kultivierte Wildtyp-Stamm *S. viridochromogenes* Tü57 produzierte Avilamycin.

3.3.5 Strategie zur Synthese eines Codon-optimierten Gens

Das aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) stammende Gen *sus1_soltu* konnte in seiner nativen Gensequenz nicht in *S. viridochromogenes* Tü57 exprimiert werden. Ein wahrscheinlicher Grund ist der mit 45 % geringe GC-Gehalt in dem Kartoffelgen. Um diese Problematik zu umgehen, wurde ein synthetisches Gen mit Streptomycceten-tauglichen Codonen hergestellt.

Wie in Abb. 3.19 dargestellt ist, wurde die für *Sus1* codierende Sequenz zwecks Synthese dreigeteilt. Ein 1,2 kb großer Abschnitt des Gens von einer mittig im Gen gelegenen *PstI*-Schnittstelle bis zum Stopp-Codon wurde als Auftragsarbeit durch die Firma 4base lab synthetisiert. Der vordere 1,2 kb große Abschnitt vom Start-Codon bis zu der *PstI*-Schnittstelle wurde noch in zwei rund 0,6 kb-Abschnitte unterteilt und im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.

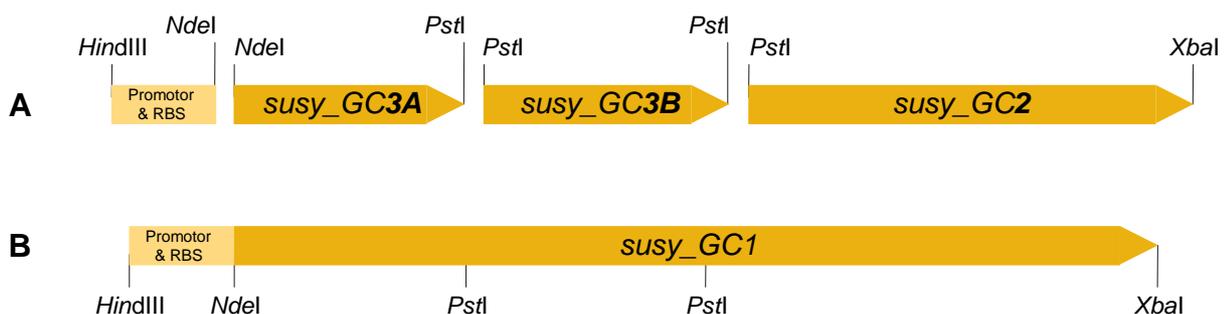


Abb. 3.19: Skizze der vier synthetisierten Teilstücke mit den relevanten Restriktionsschnittstellen (A). Der *aviD*-Promotor sowie die Teilstücke 3A und 3B wurden per PCR synthetisiert. Das Teilstück 2 wurde durch 4base lab synthetisiert. Zusammengesetzt entstand das Gen *susy_GC1* mit vorgeschaltetem *aviD*-Promotor und RBS (B).

3.3.5.1 PCR-basierte Gensynthese

Die angewandte Synthesemethode war PCR-basiert und zur Synthese waren zwei PCR-Schritte erforderlich. Im ersten Schritt wurden ausgehend von 90 Oligonukleotid-Primern in 14 unterschiedlichen PCR-Ansätzen etwa 120-140 bp große Fragmente synthetisiert. Die genaue Zusammensetzung des jeweiligen Primer-Mixes ist im Anhang (Abschnitt 6.5.3, Tab. 6.2) aufgelistet. Jeweils 7 der 14 PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung in einem

weiteren PCR-Schritt wieder als Primer zur Synthese der Fragmente 3A und 3B mit einer Größe von rund 0,6 kb eingesetzt (s. Schema in Abb. 3.20).

Zur Ableitung der Primersequenzen wurde die Software „DNABWorks“ (<http://molbio.info.nih.gov/dnaworks>; Hoover und Lubkowski, 2002) eingesetzt. Dieses Programm berechnet ausgehend von der gewünschten Aminosäuresequenz, den Daten aus einer artspezifischen Codon-Präferenz-Tabelle (s. Abschnitt 6.5.2, Tab. 6.1 im Anhang) und der gewünschten Länge und Schmelztemperatur der Oligonukleotide die „optimalen Primer“. Bestimmte Modifikationen auf DNA-Ebene, wie Restriktionsschnittstellen am Sequenzanfang und -ende oder der Ausschluß bestimmter Restriktionsschnittstellen innerhalb der Sequenz konnten festgelegt werden.

Die Aminosäuresequenz wurde zur Berechnung der Primer in zehn überlappende Abschnitte unterteilt. Dieses Vorgehen war notwendig, da das Programm bei Eingabe der rund 400 Aminosäuren umfassenden Teilsequenz keine brauchbaren Ergebnisse lieferte.

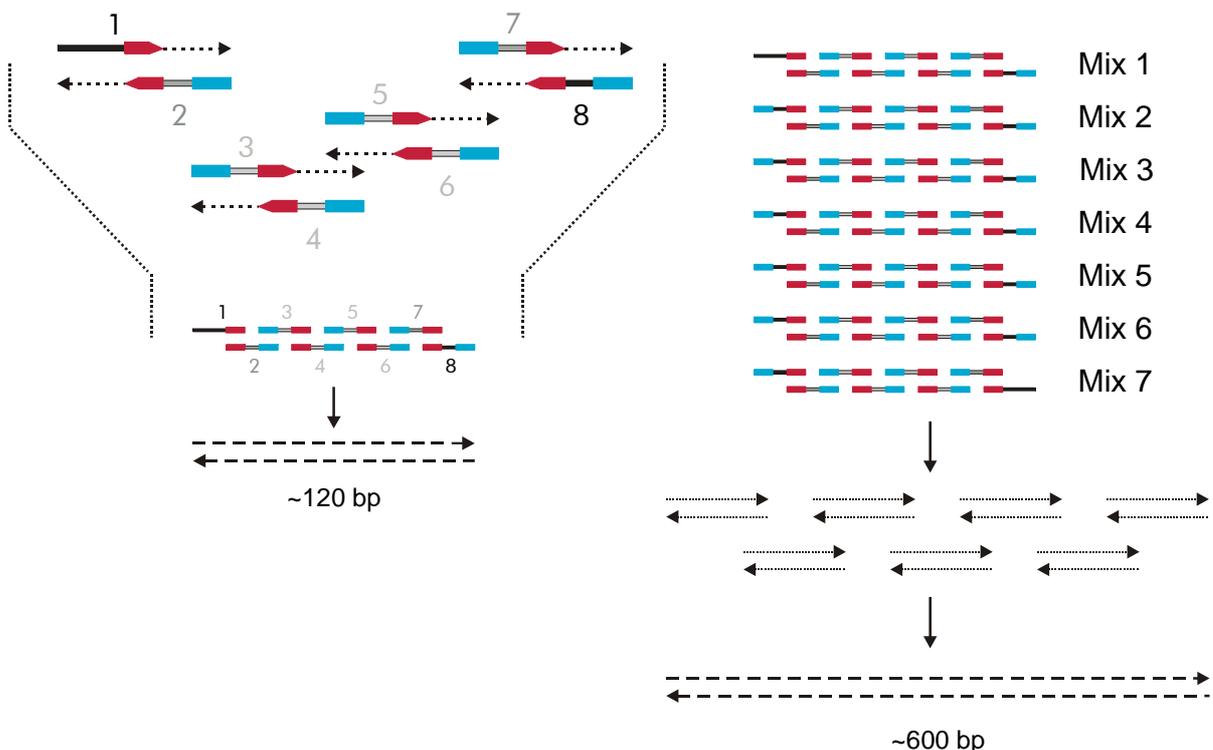


Abb. 3.20: Schematische Darstellung der PCR-basierten Gensynthese in zwei Schritten. In der linken Bildhälfte ist schematisch der 1. PCR-Schritt dargestellt, bei dem aus 8-10 Primern ein ca. 120 bp großes Amplifikat entsteht. Die Bereiche, in denen die Oligonukleotid-Primer überlappen, sind rot und blau gezeichnet. Nach einem Reinigungsschritt wurden die PCR-Produkte ausgehend von Mix 1 bis Mix 7 (bzw. Mix 8 bis Mix 14) als Primer für den 2. PCR-Schritt (s. rechte Bildhälfte) eingesetzt.

3.3.5.2 Erstellung des Plasmids pKC1218/susy_GC

Zuerst wurden per PCR der *aviD*-Promotor bzw. die *susy_GC*-Stücke 3A und 3B (s. Abb. 3.19) amplifiziert, wie es in den Abschnitten 2.10.12.2 und 2.10.12.1 beschrieben ist. Der *aviD*-Promotor und die beiden Teilstücke des Gens *susy_GC* mußten nach der Synthese zunächst in einen Zwischenvektor ligiert und sequenziert werden. Die Ligation der

0,3 kb großen PCR-amplifizierten *aviD*-Promotor-Region mit dem Vektor pGEM T-easy ergab das Plasmid pGEM/*aviD*-Pr (ohne Abb.). Die jeweils 0,6 kb großen PCR-Produkte *susy_GC3A* und *susy_GC3B* wurden zur Ligation mit dem Vektor pSK- eingesetzt, der nach Restriktion mit *EcoRV* über glatte Enden verfügte. Die entstandenen Plasmide wurden als pSK-/*susy3A* bzw. pSK-/*susy3B* (ohne Abb.) bezeichnet.

Nach Überprüfung der DNA-Sequenzen erfolgte durch geeignete Restriktionen und Ligationen die schrittweise Verknüpfung der vier DNA-Fragmente (s. Abb. 3.19) miteinander. Abschließend wurden Promotor und Gen in den Vektor pKC1218 überführt.

Der *aviD*-Promotor wurde aus dem Plasmid pGEM/*aviD*-Pr ausgeschnitten und mit dem Vektor pUCPU21 ligiert. In beiden Fällen erfolgten die Restriktionen mit *NdeI* und *HindIII*. Das resultierende Plasmid pUCPU21/*aviD*-Pr (ohne Abb.) wurde mit *PstI* und *XbaI* geöffnet. Aus dem Plasmid pSK-/*susy2*, das in Auftragsarbeit synthetisiert wurde, wurde der Genanteil *susy_GC2* durch Restriktion mit *PstI* und *XbaI* ausgeschnitten. Durch Ligation wurde das *susy_GC*-Teilstück in das Plasmid aufgenommen und ergab pUCPU21/*aviD*-Pr+*susy2* (ohne Abb.).

Für den nächsten Schritt wurden jeweils Restriktionen von pUCPU21/*aviD*-Pr+*susy2* und pSK-/*susy3A* mit *NdeI* und *PstI* durchgeführt. Auf diese Weise konnte *susy_GC3A* mit dem wachsenden Konstrukt verknüpft werden. Das resultierende Plasmid wurde pUCPU21/*aviD*-Pr+*susy3A*+2 (ohne Abb.) genannt. Das verbliebene Teilstück *susy3B* konnte nach Restriktion von pSK-/*susy3B* und pUCPU21/*aviD*-Pr+*susy3A*+2 mit *PstI* und anschließender Ligation hinzugefügt werden. Bei dieser Ligation konnte das Insert in zwei Orientierungen mit dem Plasmid ligieren, so daß nach einer Restriktionsanalyse ein Plasmid ausgewählt wurde, bei dem das Insert in der gewünschten Orientierung vorliegt. Dieses Plasmid mit der Bezeichnung pUCPU21/*susy_GC* (ohne Abb.) wurde abschließend ebenso wie der Vektor pKC1218 mit *HindIII* und *XbaI* geschnitten. Das Genkonstrukt und der Vektor wurden mittels Ligation zum Expressionsplasmid pKC1218/*susy_GC* zusammengefügt (s. Abb. 6.12).

Die Durchführung der Expression und die damit verbundenen Studien wurden kürzlich von Iris Peintner übernommen. Die Arbeiten hierzu sind noch nicht abgeschlossen.

4 Diskussion

4.1 Polyketomycin-Biosynthesegencluster

Sequenzierung des Polyketomycin-Biosynthesegenclusters

Ausgehend von drei überlappenden Cosmiden aus *S. diastatochromogenes* Tü6028 wurde ein 52,1 kb großer Sequenzabschnitt mit Polyketomycin-Biosynthesegenen sequenziert. Nach Datenbankabgleich konnte den putativen Proteinen aufgrund von Sequenzähnlichkeiten eine mögliche Funktion zugeordnet werden.

Zu den putativen Enzymen gehören u.a. eine PKS vom Typ II, eine 6-Methylsalicylsäuresynthase, Glykosyltransferasen, aber auch Enzyme, die an der Desoxyzuckerbiosynthese beteiligt sind. Die aufgefundenen Strukturgene sprechen dafür, daß der Sequenzabschnitt dem Polyketomycin-Cluster zugeordnet werden kann.

Die Inaktivierung von *pokGT1* führte zu einer Unterbrechung der Polyketomycin-Synthese bei gleichzeitiger Anreicherung von Polyketidvorläufern des Polyketomycinons. Auf diese Weise konnte die Zugehörigkeit der untersuchten Cosmidsequenzen zum Polyketomycin-Cluster belegt werden.

Ausgehend von den in dieser Arbeit annotierten Proteinen und deren möglichen Funktionen, wurde ein hypothetischer Polyketomycin-Biosyntheseweg aufgestellt (s. Abschnitt 4.1.4.3). Dabei wurden die Daten aus vorausgegangenen Arbeiten zur Strukturaufklärung des Polyketomycins berücksichtigt (Momose *et al.*, 1998b; Paululat *et al.*, 1999).

Nachfolgend werden einige im Polyketomycin-Cluster vorgefundenen Gene bzw. Genprodukte näher betrachtet, um Besonderheiten aufzuzeigen.

Mit der Erschließung der Polyketomycin-Cluster-Sequenz und den künftig zu erwartenden Kenntnissen bezüglich einzelner Proteinfunktionen, bietet sich die Möglichkeit dieses Wissen z.B. bei der Synthese von Hybridantibiotika mittels kombinatorischer Biosynthese zu nutzen.

4.1.1 Polyketidsynthasen

4.1.1.1 PokM1 – iterative Typ-I-PKS

Auf dem Cosmid CB30-6D20 liegt benachbart zu *pokM2* und *pokM3* das 5220 bp umfassende Gen *pokM1*. Die Aminosäuresequenz (1739 AS) weist Homologie zu der Polyketidsynthase NcsB aus *S. carzinostaticus* subsp. *neocarzinostaticus* ATCC 15944 auf (Sthapit *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Ein weiteres homologes Protein ist die aus dem Pilz *Penicillium patulum* (Bainier; synonym: *P. griseofulvum* Dierckx) stammende 6-Methylsalicylsäure-Synthase (MSAS), welche eingehend charakterisiert wurde (Dimroth *et al.*, 1970; Beck *et al.*, 1990; Spencer und Jordan, 1992; Child *et al.*, 1996). Das Enzym katalysiert die Synthese von 6-Methylsalicylsäure.

Das Protein setzt sich aus mehreren funktionellen Domänen zusammen. Diese fungieren als Ketosynthase (KS), Acyltransferase (AT), Dehydratase (DH), Ketoreduktase (KR) und Acyl-Carrier-Protein (ACP).

Bei Berücksichtigung der einzelnen Domänen aus PokM1 konnten hinsichtlich der identischen Aminosäuren höhere Übereinstimmungen festgestellt werden. Diese Daten sind in Tab. 4.1 zusammengefaßt.

Tab. 4.1: Vergleich der PokM1-Domänen mit anderen PKS-Domänen. AviM und CalO5: Orsellinsäure-Synthasen aus *S. viridochromogenes* Tü57 (T30871) bzw. *Micromonospora echinospora* (AAM70355); *P.g.*-MSAS (*Penicillium griseofulvum*; AAB49684); *P.p.*-MSAS (*Penicillium patulum*; P22367); *A.p.*-MSAS (*Aspergillus parasiticus*; AAC23536); *A.t.*-MSAS (*Aspergillus terreus*; BAA20102). KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, DH = Dehydratase, KR = Ketoreduktase, ACP = Acyl-Carrier-Protein; Ident. = identische Aminosäuren; Posit. = ähnliche Aminosäuren.

	AviM		CalO5		<i>P.g.</i> -MSAS		<i>P.p.</i> -MSAS		<i>A.p.</i> -MSAS		<i>A.t.</i> -MSAS	
	Ident.	Posit.	Ident.	Posit.	Ident.	Posit.	Ident.	Posit.	Ident.	Posit.	Ident.	Posit.
KS	62%	74%	64%	78%	54%	69%	58%	70%	56%	72%	56%	70%
AT	62%	70%	61%	72%	44%	60%	51%	63%	39%	57%	48%	62%
DH	38%	50%	43%	53%	34%	50%	40%	55%	41%	53%	37%	57%
KR	---	---	---	---	55%	68%	52%	64%	52%	69%	56%	71%
ACP	44%	60%	53%	70%	38%	55%	44%	66%	37%	55%	46%	67%

Das besondere an diesen Polyketidsynthasen ist, daß sie zwar aufgrund des Domänenaufbaus dem PKS-Typ I zugehören, aber hinsichtlich der katalytischen Aktivität iterativ arbeiten.

Neben dem bereits genannten NcsB gehören auch AviM aus *S. viridochromogenes* Tü57 (Gaisser *et al.*, 1997a; Weitnauer *et al.*, 2001b) sowie CalO5 aus *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis*. (Ahlert *et al.*, 2002) zu den bakteriellen iterativen PKS vom Typ I (Shen, 2003). Die zuvor genannten Enzyme sind an der Synthese aromatischer Polyketide beteiligt. Weitere iterative Typ-I-PKS sind NcsE aus *S. carzinostaticus* subsp. *neocarzinostaticus* ATCC 15944 (Liu *et al.*, 2005), SgcE aus *S. globisporus* (Liu *et al.*, 2002) und CalE8 aus *M. echinospora* ssp. *calichensis* (Ahlert *et al.*, 2002), die an der Synthese von Endiin-Grundgerüsten beteiligt sind.

In Abb. 4.1 gibt die Skizze die Größe und relative Lage der katalytischen Domänen von PokM1 und vier weiteren iterativen Typ-I-PKS wieder. Dieser Vergleich macht deutlich, daß PokM1, die 6-MSAS aus *P. patulum* sowie NcsB aus *S. carzinostaticus* subsp. *neocarzinostaticus* ATCC 15944 die gleichen Domänen (KS, AT, DH, KR und ACP) in gleicher Anordnung aufweisen.

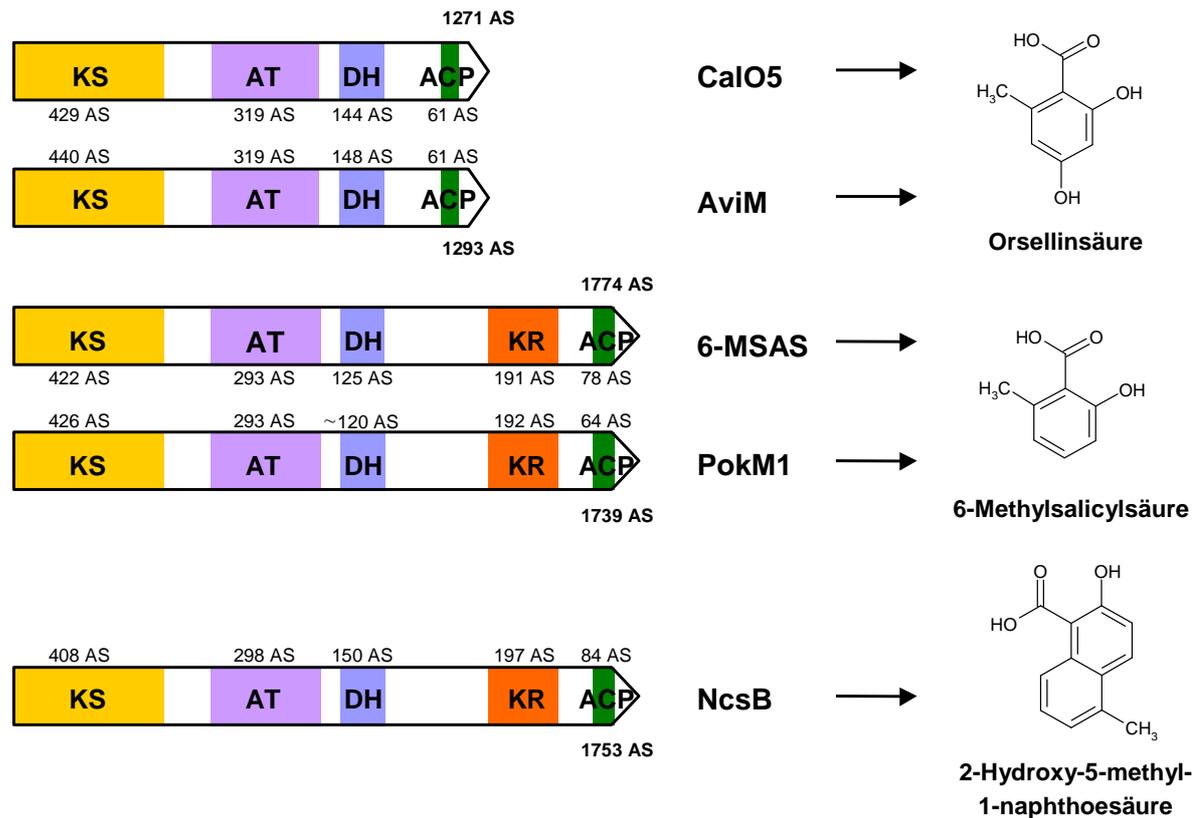


Abb. 4.1: Organisation der funktionalen Proteindomänen verschiedener iterativer Polyketidsynthasen vom Typ I. CalO5 und AviM sind Orsellinsäure-Synthasen aus *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis* (AAM70355) bzw. *S. viridochromogenes* Tü57 (T30871); 6-MSAS und PokM1 aus *Penicillium patulum* (P22367) bzw. *S. diastatochromogenes* Tü6028 sind 6-Methylsalicylsäuresynthasen und NcsB aus *S. carzinostaticus* subsp. *neocarzinostaticus* ATCC 15944 (AAM77986) ist eine Naphthoesäure-Synthase. KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, DH = Dehydratase, KR = Ketoreduktase, ACP = Acyl-Carrier-Protein; die „Accession“-Nr. ist jeweils in Klammern angegeben.

4.1.1.2 PokP1-3 – die „minimale“ Typ-II-PKS

Die drei Proteine PokP1, PokP2 und PokP3 bilden wahrscheinlich zusammen den Multienzymkomplex einer Typ-II-Polyketidsynthase. Auf diese Funktion deutet jeweils die Sequenzähnlichkeit der drei Proteine zu einer Ketosynthase α ($KS\alpha$), einer Ketosynthase β ($KS\beta$) und einem Acyl-Carrier-Protein (ACP) hin.

Die mögliche Syntheseleistung der „minimalen PKS“ soll an dieser Stelle nicht vertieft werden, da nicht zu erwarten ist, daß die katalysierte Reaktion von dem typischen Ablauf, wie bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.3) beschrieben wurde, abweicht. Zudem wird die Polyketomycinon-Biosynthese unter Berücksichtigung der PKS-Enzyme PokP1-3 in Abschnitt 4.1.4.3 behandelt.

4.1.1.3 PKS-Aktivierung trotz fehlender Phosphopantetheinyltransferase?

Im Zusammenhang mit den Polyketidsynthase-Genen fällt auf, daß im bisher bekannten Sequenzabschnitt kein Gen mit Homologie zu einer Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) identifiziert werden konnte. Die PPTasen sind bei allen Polyketidsynthasen, Fettsäuresynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen notwendig, um das Apoenzym

in die aktive Holo-Form zu überführen. Dies geschieht durch Übertragung eines 4'-Phosphopantetheinylrestes von Coenzym A auf den Hydroxylrest eines konservierten Serins der Acyl-Carrier-Protein-Domäne (Lambalot und Walsh, 1995; Lambalot *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1997).

Untersuchungen von Kealey und Kollegen (1998) deuten an, daß auch die 6-Methylsalicylsäuresynthase (6-MSAS) posttranslational in die aktive Holo-Form überführt werden muß. Bei heterologer Expression eines 6-MSAS-Gens aus dem Pilz *Penicillium patulum* in *E. coli* oder Hefezellen konnte die Produktion der 6-Methylsalicylsäure deutlich erhöht werden, wenn zusätzlich das aus *Bacillus subtilis* stammende *sfp*-Gen, das für eine Phosphopantetheinyltransferase kodiert, exprimiert wurde.

In anderen Fällen kann es durch Phosphopantetheinyltransferasen des Expressionswirtes, die geringe Substratspezifität aufweisen, zur Aktivierung des Apoenzyms kommen, wie Yalpani *et al.* (2001) im Fall einer heterolog in Tabak exprimierten 6-MSAS vermuten. Neben PPTasen mit hoher Spezifität gibt es PPTasen, wie die bereits erwähnte Sfp aus *B. subtilis*, mit hoher Substratflexibilität. Sfp kann neben dem natürlichen Substrat auch andere Peptidyl-Carrier-Proteine und darüber hinaus auch die ACP-Domänen oder -Untereinheiten von Fettsäure- oder Polyketidsynthasen in effizienter Weise aktivieren (Lambalot *et al.*, 1996; Kealey *et al.*, 1998; Reuter *et al.*, 1999). Da im Polyketomycin-Cluster noch kein PPTase-Gen identifiziert werden konnte, besteht die Möglichkeit, daß die bisher bekannte Sequenz nicht das vollständige Polyketomycin-Cluster umfaßt oder aber, daß *S. diastatochromogenes* Tü6028 zur Aktivierung der Acyl-Carrier-Proteine ebenfalls PPTasen aus anderen Stoffwechselwegen mit entsprechender Substratflexibilität nutzt.

4.1.2 PokABC1 und PokABC2 – Ein Efflux-System zur Autoresistenz

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *pokABC1* und *pokABC2* weisen jeweils hohe Identität (50 % bzw. 40 %) zu Proteinen auf, die entweder als ATP-bindende oder als Transmembran-Domäne eines ABC-Transporters gelten.

Die ABC-Transporter sind prinzipiell aus vier Domänen aufgebaut. Es gibt je zwei hydrophobe Domänen, die jeweils sechs Transmembranbereiche enthalten und zwei ATP-bindende Domänen, die dem Cytoplasma zugewandt sind und ATP hydrolysieren. Diesen sogenannten ATP-Bindungskassetten (engl. „**A**TP **b**inding **c**assette“) ist der Name ABC-Transporter entlehnt. Falls es sich um ein Aufnahmesystem handelt, sind zusätzlich noch Substratbindepoteine vorhanden, die bei den Effluxsystemen nicht vorkommen.

Die ATP-bindende und die hydrophobe Domäne der ABC-Transporter liegen meist fusioniert auf einem Protein vor. Die funktionelle Einheit besteht in diesem Fall aus einem Proteindimer (s. Abb. 4.2 B). Von dieser „Grundform“ gibt es verschiedene Abwandlungen. So gibt es beispielsweise ABC-Transporter, die sich aus vier Proteinen zusammensetzen, da die Domänen von zwei individuellen benachbarten Genen kodiert werden (A). Bei Eukaryoten

liegen oft alle vier Domänen fusioniert auf einem einzigen großen Protein vor (C). Der funktionale ABC-Transporter ist in diesem Fall ein Monomer mit zwei Transmembran- und zwei ATP-bindenden Domänen.

Im Fall von *pokABC1* und *pokABC2* sind die Gene unmittelbar benachbart und werden wahrscheinlich gemeinsam transkribiert. Die daraus hervorgehenden Proteine bilden vermutlich einen ABC-Transporter mit tetramerer Struktur.

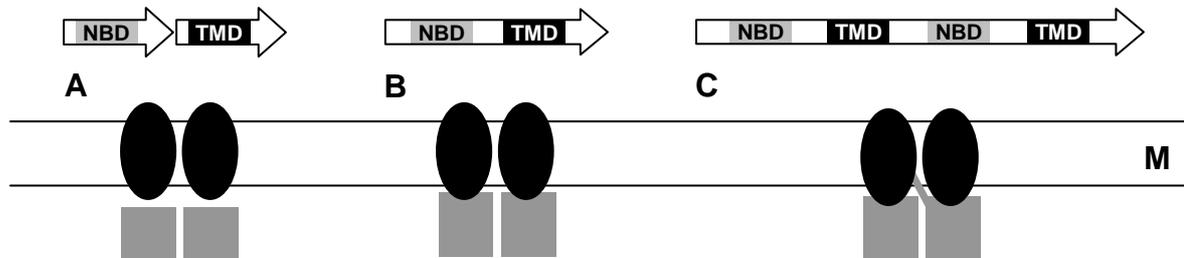


Abb. 4.2: Beispiele für Gene und Domänenarchitektur von ABC-Transportern. Der Transporter hat einen tetrameren Aufbau, wenn jede Domäne auf einem Protein vorliegt (A); Nukleotid-bindende und Transmembran-Domäne werden von einem Gen kodiert und der aktive Transporter besteht aus einem Dimer (B); der ABC-Transporter besteht aus einem einzigen Protein, das alle vier Domänen umfaßt (C). NBD = Nukleotid-bindende Domäne; TMD = Transmembran-Domäne; M = Membran.

ABC-Transporter sind in fast allen Organismen von Bakterien bis hin zu Säugetieren verbreitet und am Transport recht unterschiedlicher Moleküle beteiligt, wie beispielsweise Zucker, Aminosäuren, Vitamine oder Sekundärstoffe. Die ABC-Transporter nehmen eine wichtige Rolle ein, da sie unter anderem an Transportvorgängen zur Nährstoffaufnahme oder Exkretion von toxischen Substanzen beteiligt sind. Besondere Beachtung finden derzeit ABC-Transporter, die zur Ausbildung von Multiresistenzen führen können (Chang, 2003).

Zur Untersuchung der Resistenz-vermittelnden Eigenschaften durch ABC-Transporter wurden unter anderem die Gene *drxA* und *drxB* aus dem Daunorubicin-/Doxorubicin-Produzenten *S. peucetius*, die jeweils für eine ABC-Transporter-Domäne kodieren, in *S. lividans* exprimiert (Guilfoile und Hutchinson, 1991). Dabei zeigte sich, daß die Koexpression von DrrA und DrrB dem Expressionswirt eine erhöhte Resistenz gegenüber beiden Antibiotika (Daunorubicin und Doxorubicin) verlieh. Unter den Antibiotika-transportierenden Proteinen finden sich weitere näher charakterisierte Vertreter aus den Antibiotika-Clustern anderer Streptomyceten (Fernández-Moreno *et al.*, 1998; Méndez und Salas, 2001; Kaur *et al.*, 2005; Stumpp *et al.*, 2005).

Es ist relativ wahrscheinlich, daß der ABC-Transporter aus den Untereinheiten PokABC1 und PokABC2 an der Ausschleusung des Polyketomycins aus dem Cytoplasma beteiligt ist. Für diesen Transportprozeß wird die durch ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie genutzt, um das Antibiotikum durch Membranporen, die aus den Transmembrandomänen gebildet werden, aus der Zelle zu sekretieren. So wird verhindert, daß die Substanz in der Zelle schädliche Konzentrationen erreicht oder sich die antibiotische Aktivität gegen den Produzenten richtet.

Daß ein solcher Transportmechanismus bedeutend für den Ablauf der Antibiotika-Biosynthese sein kann, zeigt folgendes Beispiel. Sletta und Kollegen stellten fest, daß die putativen ABC-Transporter-Proteine NysH und NysG (jeweils mit TMD und NBD) essentiell für eine effiziente Nystatin-Biosynthese sind (2005). Sind die entsprechenden Gene deletiert, kann der Produzent *S. noursei* ATCC 11455 Nystatin nur noch in geringerer Rate (65 %) synthetisieren, wobei es zur Anreicherung des Vorläufers 10-Desoxynystatin kommt.

Im Fall der Proteine DrrA und DrrB aus *Streptomyces peucetius*, die dem Produzenten Resistenz gegen Daunorubicin und Doxorubicin verleihen, zeigten Transkriptionsstudien, daß die entsprechenden Gene *drrA* und *drrB* nur während der Antibiotikaproduktionsphase exprimiert werden (Guilfoile und Hutchinson, 1991).

4.1.3 PokAC1-3 – Acetyl-CoA-Carboxylase

Die drei Gene *pokAC1*, *pokAC2* und *pokAC3* codieren für eine Acetyl-CoA-Carboxylase (Carboxyltransferase), ein Biotin-Carboxylase-Carrier-Protein und eine Biotin-Carboxylase (α -Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase).

Dieser Enzymkomplex ist eigentlich dem Primärstoffwechsel (Fettsäurebiosynthese) zuzuordnen. Die katalytische Reaktion ist folgende:



Das Vorkommen der drei Gene inmitten der Polyketomycin-Biosynthesegene ist ungewöhnlich. Bisher wurde innerhalb von Streptomyceten-Antibiotika-Genclustern nur im Fall des Jadomycin-Clusters aus *Streptomyces venezuelae* ISP5230 von dem Vorhandensein eines Gens berichtet, welches die zwei katalytische Domänen Acetyl-CoA-Carboxylase und Biotin-Carboxylase umfaßt (Han *et al.*, 2000). Han und Kollegen führten Experimente durch, die belegen, daß die Inaktivierung des Acetyl-CoA-Carboxylase-Gens *jadJ* bei normaler Morphologie und normalem Wachstum der Streptomyceten zu einer reduzierten Jadomycin-Produktion führt (s. Abschnitt 3.1.5.3). Das entsprechende Protein nimmt also Einfluß auf die Antibiotika-Biosynthese, während eine Beeinträchtigung der Fettsäurebiosynthese unwahrscheinlich ist. Das durch die Acetyl-CoA-Carboxylase generierte Malonyl-CoA dient möglicherweise als Substrat für die Jadomycin-Synthese.

Übertragen auf *S. diastatochromogenes* Tü6028 könnte dies bedeuten, daß durch Expression der drei im Polyketomycin-Cluster gelegenen „Acetyl-CoA-Carboxylase“-Gene *pokAC1-3* ebenfalls zusätzliches Malonyl-CoA für die Polyketomycin-Biosynthese bereitgestellt wird.

4.1.4 Vorschlag zur Biosynthese des Polyketomycins

4.1.4.1 Mögliche Biosynthese der 3,6-Dimethylsalicylsäure

Aufgrund der bekannten Daten zu PokM1, PokM2 und PokM3 und Vergleichen mit anderen iterativen Typ-I-Polyketidsynthasen läßt sich für die Synthese der 6-Methylsalicylsäure als Vorläufer der 3,6-Dimethylsalicylsäure ein hypothetischer Biosyntheseweg aufstellen (s. Abb. 4.3; Dimroth *et al.*, 1970; Shoolingin-Jordan und Campuzano, 1999).

Neben der eigentlichen Polyketidsynthase PokM1 ist möglicherweise auch PokM2 an der Synthese beteiligt. Für die zu PokM2 homologen Proteine AviN bzw. DpsC gibt es Hinweise, daß sie essentiell für die Erkennung der Starter-Einheit sind (Rajgarhia und Strohl, 1997; Bao *et al.*, 1999). Ebenso könnte PokM2 für die Erkennung von Acetyl-CoA als Starter-Einheit relevant sein, so daß eine initiale Acetyl-KS-Einheit entsteht. Gaisser und Kollegen (1997a) konnten durch alleinige Expression der zu PokM1 homologen Orsellinsäure-Synthase AviM aus *S. viridochromogenes* Tü57 in den Wirten *S. lividans* TK24 und *S. coelicolor* CH999 die Orsellinsäure-Synthese nachweisen. Bei diesem Versuch wurde das zu *pokM2* homologe Gen *aviN* nicht koexprimiert. Demnach ist die Enzymaktivität von AviN zur Synthese nicht unbedingt erforderlich, aber durch die Diskriminierung „falscher“ Acyl-CoA-Moleküle läuft die Synthese wahrscheinlich effizienter ab. Möglicherweise gilt dies in analoger Weise für das AviN-homologe Protein PokM2.

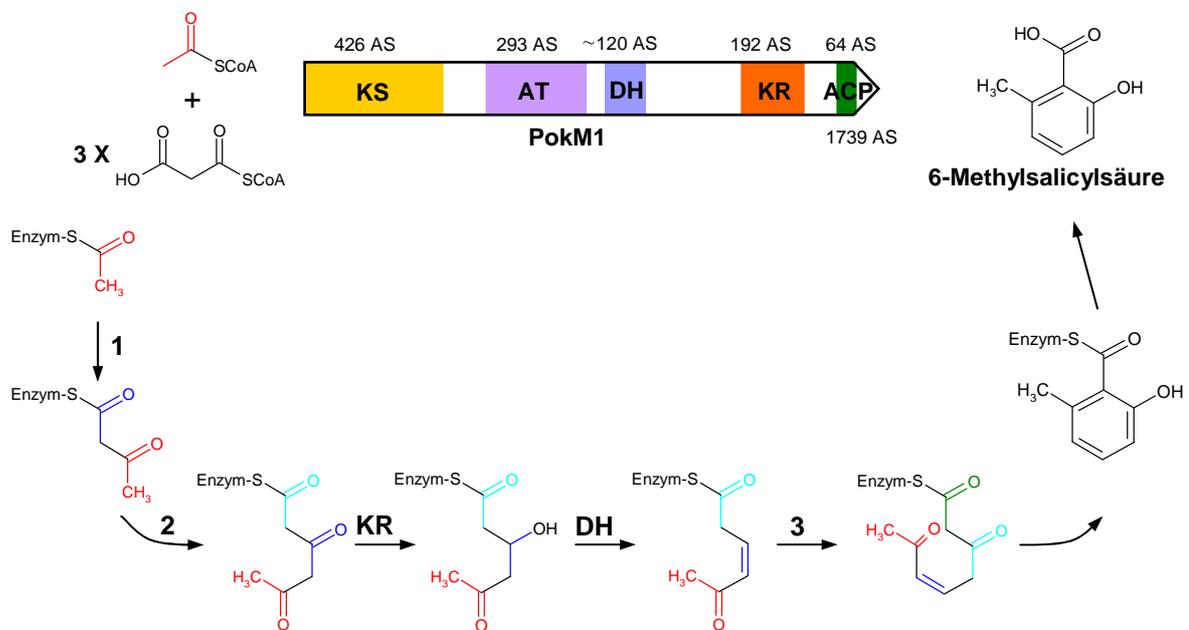


Abb. 4.3: Vorschlag zum Syntheseweg der 6-Methylsalicylsäure in *S. diastatochromogenes* Tü6028. Die eingebauten Acetateinheiten sind farbig hervorgehoben und die drei Kondensationschritte wurden mit 1-3 gekennzeichnet. KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, DH = Dehydratase, KR = Ketoreduktase, ACP = Acyl-Carrier-Protein; in Anlehnung an Dimroth *et al.* (1970) und Shoolingin-Jordan und Campuzano (1999).

Aufgrund der in PokM1 vorliegenden katalytischen Domänen und unter Berücksichtigung der Ähnlichkeit zu der 6-MSAS aus *P. patulum* (Shoolingin-Jordan und Campuzano, 1999) folgt

nun eine Beschreibung der wesentlichen Reaktionsschritte für die PokM1-katalysierte Synthese (s. Abb. 4.3):

PokM1 katalysiert ausgehend von der Starter-Einheit Acetyl-CoA drei Kondensationsschritte, wobei Acetateinheiten, die aus Malonyl-CoA stammen, zur Kettenverlängerung genutzt werden. Die katalytischen Domänen KS, AT und ACP sind bei jedem Reaktionszyklus wiederholt aktiv. Während sich an die erste Kondensation die zweite Kondensation direkt anschließt, wird nach der zweiten Kondensation die Ketogruppe durch Reduktion (KR-Domäne) und Dehydratisierung (DH-Domäne) unter Bildung einer Doppelbindung entfernt. Nach dem dritten Kondensationsschritt entsteht durch Cyclisierung, Dehydratisierung und Enolisierung die aromatische 6-Methylsalicylsäure. Da im Enzym keine Thioesterase-Domäne vorliegt, erfolgt die Abspaltung der 6-MSAS wahrscheinlich nicht hydrolytisch, sondern es könnte ein Keten-Intermediat entstehen, das unter Bildung einer Carboxylgruppe dehydratisiert wird. Ob die Methylierung am C3-Atom vor oder nach der Verknüpfung mit dem Zuckerrest stattfindet, lässt sich ohne nähere Untersuchungen nicht feststellen.

Die 6-Methyl- oder 3,6-Dimethylsalicylsäure wird wahrscheinlich durch PokM3 adenyliert. Auch für die Verknüpfung des (Di-)Methylsalicyloylrestes mit dem Disaccharidrest aus Amicetose und Axenose kommt PokM3 in Frage. Diese Enzymaktivität weist z.B. das verwandte Protein YbtE aus *Yersinia pestis*, das an der Synthese von Yersiniabactin beteiligt ist, auf. In diesem Fall wird Salicylsäure durch Adenylierung mittels YbtE aktiviert und mit einer Aryl-Carrier-Protein-Domäne der nichtribosomalen Peptidsynthetase HMWP2 verknüpft (Gehring *et al.*, 1998a und 1998b).

Innerhalb der bekannten Sequenzdaten aus dem Polyketomycin-Produzenten konnte mit *pokL* ein weiteres Gen identifiziert werden, dessen Genprodukt für die beschriebene Transferaktivität in Frage kommt. Es handelt sich dabei um ein Protein mit Ähnlichkeit zu Acyl-CoA-Ligasen/Acyl-CoA-Synthetasen. Innerhalb der PokL-Sequenz sind konservierte Motive enthalten, die in adenylierenden Enzymen wie z.B. in Peptidsynthetasen (A8 und A10; Marahiel *et al.*, 1997) oder in 4-Coumarat:CoA-Ligasen (Box I und Box II; Stuible *et al.*, 2000) vorkommen. Das Box-I-Motiv tritt in ähnlicher Form unter anderem auch in Acyl-CoA-Ligasen, Acetyl-CoA-Ligasen und Peptidsynthetasen auf. Ogasawara und Kollegen diskutieren daher im Fall des zu PokL ähnlichen Proteins VinN aus *S. halstedii* zwei mögliche Enzymfunktionen: Entweder agiert VinN als CoA-Ligase und aktiviert auf diese Weise 3-Methylaspartat zu 3-Methylaspartat-CoA oder VinN verknüpft 3-Methylaspartat mit AMP (Ogasawara *et al.*, 2004).

Möglicherweise treffen die oben genannten Hypothesen nicht zu und die Funktion von PokL besteht darin, zusätzliches Acetyl-CoA für die Polyketomycin-Synthese bereit zu stellen, wie es Prado *et al.* (1999) für MtmL aus *S. argillaceus* vermuten, das zu 48 % mit der Proteinsequenz von PokL übereinstimmt.

4.1.4.2 Hypothetischer Desoxyzuckerbiosyntheseweg

Im sequenzierten DNA-Abschnitt des Polyketomycin-Produzenten konnten 9 Gene detektiert werden, die der Zuckerbiosynthese zugeordnet werden können. Des weiteren liegen zwei Glykosyltransferasene vor. Ausgehend von den vorhandenen Enzymen, läßt sich für die im Polyketomycin vorkommenden Zuckerbausteine dNDP-D-Amicetose und dNDP-L-Axenose ein hypothetischer Biosyntheseweg (s. Abb. 4.4) aufzeichnen.

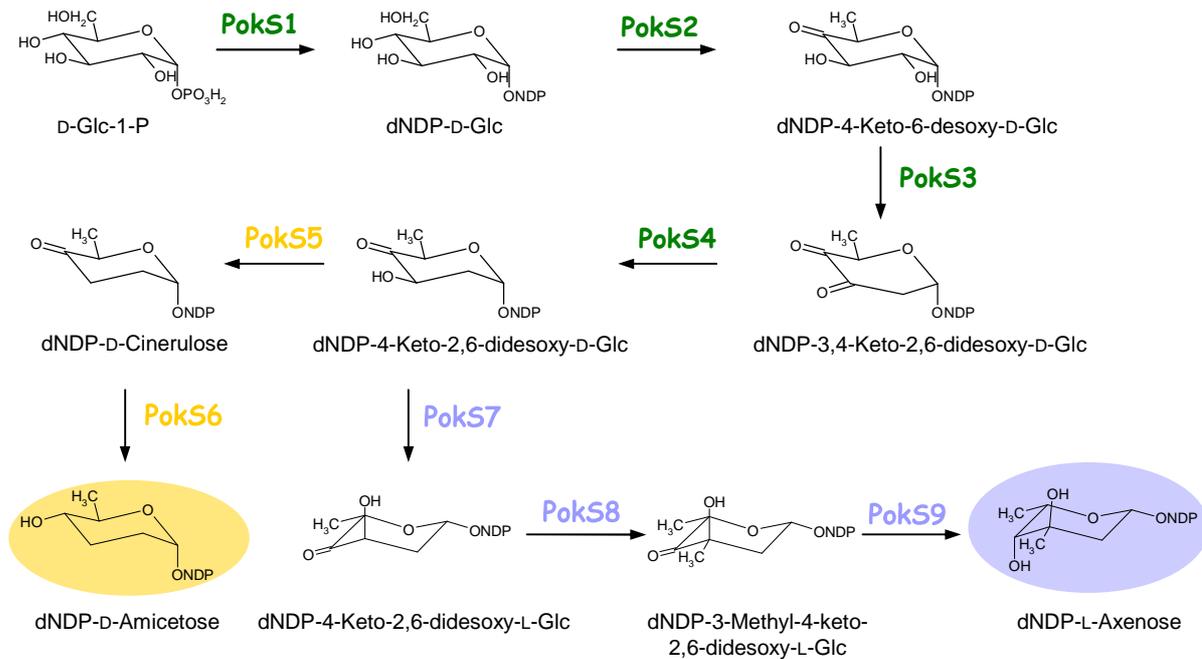


Abb. 4.4: Hypothetischer Biosyntheseweg der dNDP-D-Amicetose und dNDP-L-Axenose aus *S. diastatochromogenes*.

PokS1 = dNDP-Glucose-Synthase; **PokS2** = 4,6-Dehydratase; **PokS3** = 2,3-Dehydratase; **PokS4** = 3-Ketoreduktase; **PokS5** = 3-Dehydratase; **PokS6** = 4-Ketoreduktase; **PokS7** = 5-Epimerase; **PokS8** = C3-Methyltransferase; **PokS9** = 4-Ketoreduktase.

Wie für die Synthese anderer aktivierter Desoxyhexosen bereits postuliert wurde (Liu und Thorson, 1994; Trefzer *et al.*, 1999), ist anzunehmen, daß auch die beiden Zucker dNDP-D-Amicetose und dNDP-L-Axenose aus dem gemeinsamen Vorläufer dTDP-D-4-Keto-2,6-dideoxyglucose hervorgehen.

Ausgehend von Glucose-1-phosphat katalysieren die Enzyme PokS1 und PokS2 nacheinander die Synthese der dNDP-D-Glucose und dTDP-D-4-Keto-6-desoxyglucose. Der Biosyntheseweg verzweigt sich in diesem Fall noch nicht, sondern es wird durch die Enzymleistung der Proteine PokS3 und PokS4 die dNDP-D-4-Keto-2,6-dideoxyglucose gebildet. Erst an dieser Stelle trennen sich die Biosynthesewege der beiden Zucker.

Die Synthese der dNDP-D-Amicetose wird durch die Aktivität der 3-Dehydratase PokS5 und der 4-Ketoreduktase PokS6 vervollständigt. Die 5-Epimerase PokS7, die C3-Methyltransferase PokS8 und die 4-Ketoreduktase PokS9 katalysieren die Bildung der dNDP-L-Axenose. Die Zuordnung der beiden 4-Ketoreduktasen PokS6 und PokS8 zu dem jeweiligen Zuckerbiosyntheseweg stützt sich derzeit nur auf die benachbarte Lage der

entsprechenden Gene zu *pokS5* bzw. *pokS7* im Polyketomycin-Cluster (s. Abb. 3.2). Da die Ketoreduktionsschritten durch PokS6 und PokS9 stereospezifisch ablaufen, werden jeweils die gebildeten Hydroxylgruppen am C4 des Zuckers in die äquatoriale Ebene überführt.

Der Ablauf der Syntheseschritte in der genannten Reihenfolge wird gestützt durch die Zahl und die möglichen Proteinfunktionen der im Cluster lokalisierten Zuckerbiosynthesegene. Es läßt sich ohne experimentelle Nachweise jedoch nur spekulieren, ob die vorgeschlagene Reihenfolge zutrifft. Bezüglich der Abfolge der Epimerisierung und Methylgruppenübertragung durch PokS7 und PokS8 ist eine umgekehrte Reihenfolge ebenso denkbar. Die Ketoreduktion als jeweils letzten Schritt des Syntheseweges der beiden Desoxyzucker zu betrachten, stimmt mit bereits beschriebenen Zuckerbiosynthesewegen für die Synthese von dTDP-L-Mycarose in *Saccharopolyspora erythraea* (Summers *et al.*, 1997, Salah-Bey *et al.*, 1998) oder dTDP-L-Epivancosamin in *Amycolatopsis orientalis* (Chen *et al.*, 2000) überein. Zudem ist die Reaktivität des Zuckermoleküls nach der Ketoreduktion herabgesetzt, so daß es wahrscheinlich ist, daß dieser Schritt erst nach Abschluß der übrigen Reaktionen am Ende des Syntheseweges steht.

Bezüglich der Stereochemie in Position C1 der aktivierten Zucker ist zu ergänzen, daß diese sich bei der Übertragung der Zuckermoleküle durch die Glykosyltransferasen PokGT1 und PokGT2 ändert, da der Glykosyltransfer sehr wahrscheinlich nach dem invertierenden Mechanismus (s. Abb. 4.5) abläuft.

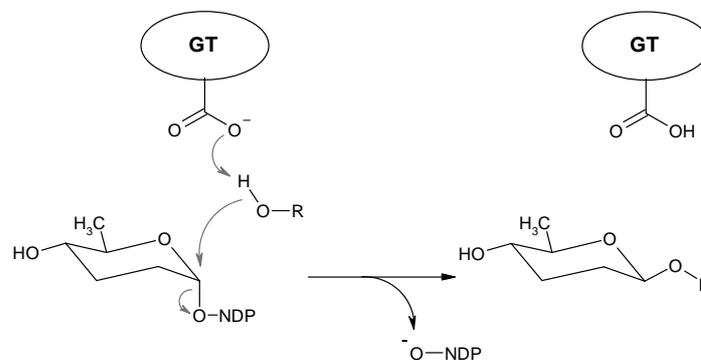


Abb. 4.5: Schema zur Übertragung eines Desoxyzuckers auf eine Hydroxylgruppe unter Ausbildung einer O-glykosidischen Bindung nach dem invertierenden Mechanismus (in Anlehnung an Davies, 2001). GT = Glykosyltransferase; R-OH = Hydroxylgruppe des Aglykons.

Bei der Zuckerübertragung durch Glykosyltransferasen werden zwei Reaktionsmechanismen unterschieden, die entweder unter Erhalt oder Umkehrung der Zuckerkonfiguration ablaufen. Bei dem invertierenden Mechanismus erfolgt der Zuckertransfer durch bimolekulare nukleophile Substitution (S_N2). Dabei wird das Akzeptormolekül durch eine Base im katalytischen Zentrum des Enzyms deprotoniert und das entstandene Anion reagiert als Nukleophil mit dem C1-Atom des Zuckers. Die Konfiguration des Zuckers wird bei diesem Mechanismus umgekehrt (Sinnot, 1990; Quirós *et al.*, 2000, Ünligil und Rini, 2000).

Bei den Glykosyltransferasen, die die Ausbildung glykosidischer Bindungen unter Beibehaltung der Konfiguration katalysieren, finden vermutlich zwei S_N2 -Reaktionen unter Bildung einer Glykosyl-Enzym-Zwischenstufe nacheinander statt (Ly und Withers, 1999; Zechel und Withers, 2000). Ein solches kovalentes Glykosyl-Enzym-Intermediat konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Erste Untersuchungen an der *pokGT1*-Mutante, bei der die Zuckerübertragung beeinträchtigt ist, deuten an, daß die Desoxyzucker D-Amicetose und L-Axenose im Polyketomycin notwendig für die biologische Aktivität sind. Die Derivate im Extrakt aus der *pokGT1*-Mutante waren inaktiv gegenüber *B. subtilis* (s. Abschnitt 3.1.6.4). Dieses Resultat deutet an, daß der tetracyclische Polyketomycin-Vorläufer (putative Struktur in Abb. 3.5), der wahrscheinlich von der *pokGT1*-Mutante synthetisiert wird, nicht über die Bioaktivität des Polyketomycins verfügt. Dies läßt vage Vermutungen hinsichtlich des Reaktionsmechanismus zu: Zum einen können auch im Fall des Polyketomycins die Zuckerreste bedeutend für die antibiotische Aktivität sein, wie dies bereits von anderen glykosidierten Antibiotika bekannt ist (Flynn *et al.*, 1954; Weymouth-Wilson, 1997). Die Testresultate zum Wirkmechanismus der Cervimycine (s. Abschnitt 1.4) lassen darauf schließen, daß die antibiotische Wirkung weder auf DNA-Interkalierung noch auf Ribosomen-Interaktion beruht. Dies könnte ebenso für Polyketomycin zutreffen, bedarf aber noch eingehender Untersuchung. Aufgrund der Strukturverwandtschaft zwischen Polyketomycin und DMI-2, dessen hemmende Wirkung auf DNA-Methyltransferasen bereits geschildert wurde (s. Abschnitt 1.4), ist eine ähnliche Wirkweise für das Polyketomycin denkbar, zumal dies in Einklang mit der cytotoxischen Aktivität steht.

4.1.4.3 Zusammenfassung der Polyketomycin-Biosynthese

Zusammenfassend soll hier der hypothetische Ablauf der Polyketomycin-Biosynthese, wie auch in Abb. 4.6 dargestellt, geschildert werden.

Das für die Polyketomycinon-Synthese nötige Dekaketid wird vermutlich in einer PKS-katalysierten Reaktion vom Typ II ausgehend von einem Acetyl-CoA-Molekül und neun Malonyl-CoA-Molekülen synthetisiert. Diese Syntheseleistung wird mutmaßlich durch PokP1, PokP2 und PokP3 katalysiert, die die „minimale PKS“ bilden.

Die durch Aktivität der PKS-Einheit gebildete Polyketonkette wird in spezifischer Weise gefaltet und durch modifizierende Reaktionen, die auch als „post PKS modifications“ bezeichnet werden, erfolgt die Ausbildung des Polyketomycinons. Die Aktivität der Cyclasen/Aromatasen (PokC1, PokC2, PokC3) trägt vermutlich zur Bildung des viergliedrigen Ringsystems bei. Außerdem erhält das Polyketomycinon seine Struktur durch Reduktionen, Methylgruppen-Übertragungen und Oxygenierungen.

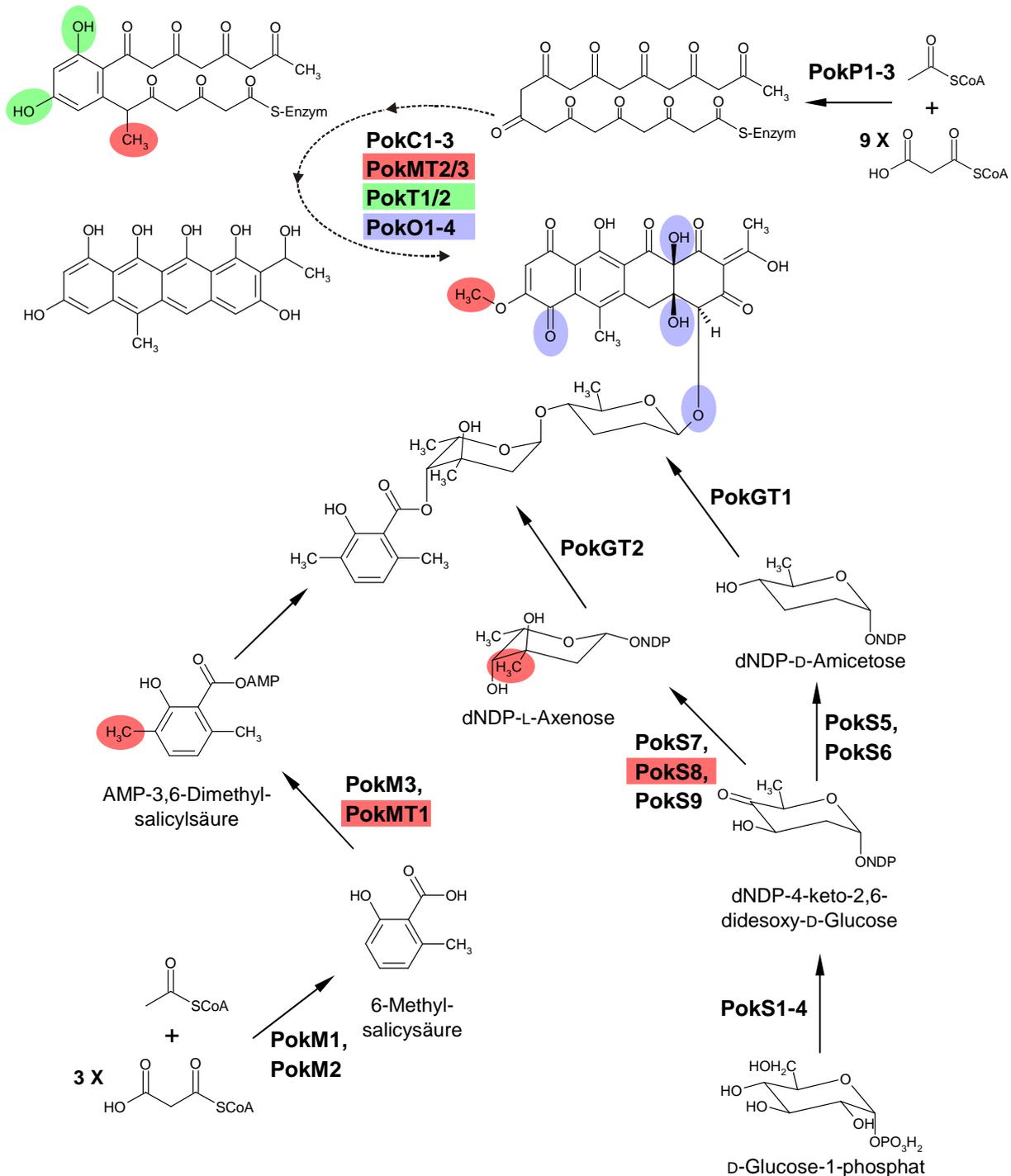


Abb. 4.6: Schema zum möglichen Ablauf der Polyketomycin-Biosynthese in *S. diastatochromogenes* Tü6028.

Auf die Hydroxylgruppe am C8-Atom und auf das C6-Atom wird jeweils eine Methylgruppe übertragen. Als Methylgruppendonator kommt aufgrund der vorgefundenen charakteristischen Motive in der Aminosäuresequenz der beiden möglichen beteiligten Enzyme PokMT2 bzw. PokMT3 S-Adenosylmethionin in Frage. Weiterhin konnten im Cluster fünf Oxygenase-/Hydroxylase-Gene identifiziert werden. Die Enzyme (PokO1-4) führen wahrscheinlich an den C-Atomen 4, 4b, 7 und 12b (s. Abb. 1.1) jeweils ein Sauerstoffatom (meist als Hydroxylgruppe) ein. Es ist unklar, ob auch die putative Hydroxylase PokU2 involviert ist.

Die Desoxyzucker D-Amicetose und L-Axenose werden in sechs bzw. sieben Reaktionsschritten ausgehend von D-Glucose-1-phosphat synthetisiert. Die Glykosyltransferasen PokGT1 und PokGT2 verbinden die Zucker unter Ausbildung einer O-glykosidischen Bindung mit dem entsprechenden Akzeptormolekül. Dabei ist es aufgrund der identifizierten Biosynthesegene sehr wahrscheinlich, daß zunächst die Desoxyzucker nacheinander beginnend mit der D-Amicetose übertragen werden und die Verknüpfung mit dem (Di-)Methylsalicylsäurerest erst im Anschluß stattfindet.

Die 6-Methylsalicylsäure geht aus der Synthese durch eine iterative PKS vom Typ I aus vier Acetateinheiten hervor. Das Molekül wird durch Methylierung zur 3,6-Dimethylsalicylsäure vervollständigt. Diese Einheit wird an die Disaccharidkette angehängt.

Zur endgültigen Klärung der genauen Abfolge der Biosyntheseschritte und Enzymfunktionen bedarf es weiterer Untersuchungen an Deletionsmutanten sowie Expressionsstudien mit einzelnen Proteinen.

4.2 Expression von Sus1 aus *Solanum tuberosum*

Die von Sus1, das aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) stammt, katalysierte Reaktion ist die Spaltung von Saccharose in dNDP-Glucose und Fructose wie in Abb. 3.15 zu sehen ist. Das entsprechende Gen *sus1_soltu* sollte in *S. viridochromogenes* Tü57 exprimiert werden, um ausgehend von Saccharose dNDP-Glucose als Substrat für die Desoxyzuckerbiosynthese bereitzustellen. Für die Expression wurde eine *aviD*-Mutante erstellt, bei der die dNDP-Glucose-Synthase inaktiviert wurde. Die Expression von Sus1 sollte zur Komplementierung der Mutante führen, was leicht zu prüfen wäre.

Das Gen *sus1_soltu* ließ sich jedoch in seiner nativen Gensequenz (cDNA) nicht im Streptomyceten-Wirt exprimieren. Dies beruht wahrscheinlich auf dem geringen GC-Gehalt im Kartoffelgen von 45 % im Vergleich zu dem durchschnittlichen GC-Gehalt von 72 % in *Streptomyces*-Genen. Prinzipiell ist es nicht ungewöhnlich, daß sich ein Gen aus einem eukaryotischen Organismus mit einem geringen GC-Gehalt (*sus1_Soltu*: 45,2 %) nicht in einem Bakterium mit einem hohen genomischen GC-Gehalt exprimieren läßt.

Bei der Proteinbiosynthese wird für jedes Codon der mRNA die tRNA mit dem entsprechenden Anticodon benötigt. Der Streptomycet verfügt vor allem über jene tRNA, die er entsprechend seiner spezifischen Codon-Präferenz benötigt. Besonders für einige Codone, die an dritter Position ein Adenin oder Thymin aufweisen, kann es daher bei der Proteinbiosynthese aufgrund mangelnder tRNA zum Abbruch kommen.

Weiterhin kann es nach der Synthese des Polypeptids zu Problemen bei der Proteinfaltung kommen, so daß es aufgrund der Fehlkonformation zum Ausbleiben der katalytischen Aktivität kommt. Teilweise lassen sich Faltungsprobleme durch Optimierung des

Wachstumsmediums verringern, indem Bedingungen geschaffen werden, die dem natürlichen Milieu angeglichen werden.

Um die Expression von *sus1* im Streptomyceten-Wirt zu ermöglichen, wurde die *sus1*-Sequenz im Rahmen dieser Arbeit umgeschrieben und das synthetische Gen *susy_GC* hergestellt. Die Untersuchungen zur Expression des Codon-optimierten Gens *susy_GC* sind noch nicht abgeschlossen.

4.3 Expression von Desoxyzuckerbiosynthese-Proteinen

Die an der Desoxyzuckerbiosynthese beteiligten Proteine UrdR, AviS bzw. UrdS und AviT aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 bzw. dem Avilamycin-Produzenten *S. viridochromogenes* Tü57 waren für die Überexpression als Histidin-Fusionsproteine in Streptomyceten-Wirten vorgesehen.

UrdR und AviT konnten ohne Schwierigkeiten als lösliche Proteine nachgewiesen werden. Im Fall der dTDP-4-Keto-2,6-didesoxy-D-glucose-Reduktase UrdR konnte zudem der Nachweis der Enzymaktivität erbracht werden.

Die 2,3-Dehydratasen AviS bzw. UrdS konnten trotz unterschiedlicher Expressionskonstrukte weder mit N-terminalem noch mit C-terminalem His-Tag in löslicher Form exprimiert und aufgereinigt werden.

Da sich die Expression einer 2,3-Dehydratase in Streptomyceten nicht umsetzen ließ, wurde durch Mitarbeiter von Prof. Dr. L. Elling (RWTH Aachen) das *aviS*-Gen verwendet, um es in *E. coli* zu exprimieren. Obwohl *E. coli*-Bakterien zur Expression von Streptomyceten-Proteinen nicht immer optimal geeignet sind, konnte AviS in löslicher Form isoliert werden.

Die Enzyme AviS und AviT konnten erfolgreich bei der chemoenzymatischen Synthese von dNDP-4-Keto-2,6-didesoxy-D-glucose im analytischen Maßstab eingesetzt werden. Der letzte Reaktionsschritt zum Erhalt der dNDP-D-Olivose, der durch die 4-Ketoreduktase UrdR katalysiert werden soll, konnte unter den gewählten Bedingungen bisher nicht vollzogen werden.

Wenn weitere Optimierungen die chemoenzymatische Synthese von Desoxyzuckern im präparativen Maßstab ermöglichen, so wäre dies die Grundlage zur Erschließung anderer Desoxyzucker-Strukturen sowie deren Einsatz in Fütterungsexperimenten zur Untersuchung von Enzymfunktionen und zur Generierung neuer Antibiotikastrukturen.

5 Literaturverzeichnis

Vorab vier Verweise auf Autoren, die Sequenzdaten veröffentlicht haben, zu denen bisher keine Publikation erschienen ist.

Copeland,A., Lucas,S., Lapidus,A., Barry,K., Detter,J.C., Glavina,T., Hammon,N., Israni,S., Pitluck,S. und Richardson,P. A) Sequencing of the draft genome and assembly of *Trichodesmium erythraeum* IMS101.

Copeland,A., Lucas,S., Lapidus,A., Barry,K., Detter,J.C., Glavina,T., Hammon,N., Israni,S., Pitluck,S. und Richardson,P. B) Sequencing of the draft genome and assembly of *Frankia* sp. EAN1pec.

Halo,L., Wang,Y., Mäntsälä,P., Hakala,J. und Ylihonko,K. Characterization of the gene cluster involved in rhodomycin biosynthesis

Saito,H., Brünker,P., Martin,R. und Minas,W. *Streptomyces collinus* DSM2012 rubromycin biosynthesis gene cluster.

Ahlert,J., Shepard,E., Lomovskaya,N., Zazopoulos,E., Staffa,A., Bachmann,B.O., Huang,K., Fonstein,L., Czisny,A., Whitwam,R.E., Farnet,C.M. und Thorson,J.S. (2002). The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. *Science* **297** (5584), 1173-1176.

Altschul,S.F., Madden,T.L., Schäffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W. und Lipman,D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25** (17), 3389-3402.

Avigad, G. (1982). Sucrose and other disaccharides. In: Encyclopedia of plant physiology. **Herausg.: Loewus,T.A., Tanner W.**, Springer, Heidelberg, 217-347.

Bao,W., Sheldon,P.J., Wendt-Pienkowski,E. und Hutchinson,C.R. (1999). The *Streptomyces peuceitius* *dpsC* gene determines the choice of starter unit in biosynthesis of the daunorubicin polyketide. *J. Bacteriol.* **181** (15), 4690-4695.

Bate,N., Butler,A.R., Smith,I.P. und Cundliffe,E. (2000). The mycarose-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin. *Microbiology* **146** (1), 139-146.

Beck,J., Ripka,S., Siegner,A., Schiltz,E. und Schweizer,E. (1990). The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. *Eur. J. Biochem.* **192** (2), 487-498.

Bentley,S.D. und andere (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417** (6885), 141-147.

Bevitt,D.J., Cortés,J., Haydock,S.F. und Leadlay,P.F. (1992). 6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*. Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. *Eur. J. Biochem.* **204** (1), 39-49.

Bibb,M.J., Biró,S., Motamedi,H., Collins,J.F. und Hutchinson,C.R. (1989). Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens* *tcmI* genes provides key information about the enzymology of polyketide antibiotic biosynthesis. *EMBO J.* **8** (9), 2727-2736.

Bierman,M., Logan,R., O'Brien,K., Seno,E.T., Rao,R.N. und Schoner,B.E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116** (1), 43-49.

Bililign,T., Hyun,C.G., Williams,J.S., Czisny,A.M. und Thorson,J.S. (2004). The hedamycin locus implicates a novel aromatic PKS priming mechanism. *Chem. Biol.* **11** (7), 959-969.

Blanco,G., Fernández,E., Fernández,M.J., Braña,A.F., Weissbach,U., Künzel,E., Rohr,J., Méndez,C. und Salas,J.A. (2000). Characterization of two glycosyltransferases involved in early glycosylation steps during biosynthesis of the antitumor polyketide mithramycin by *Streptomyces argillaceus*. *Mol. Gen. Genet.* **262** (6), 991-1000.

Bourne,Y. und Henrissat,B. (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 593-600.

- Brawner, M.E., Auerbach, J.I., Fornwald, J.A., Rosenberg, M. und Taylor, D.P.** (1985). Characterization of *Streptomyces* promoter sequences using the *Escherichia coli* galactokinase gene. *Gene* **40** (2-3), 191-201.
- Brüggemann, H., Bäumer, S., Fricke, W.F., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martínez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A. und Gottschalk, G.** (2003). The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (3), 1316-1321.
- Brünker, P., McKinney, K., Sterner, O., Minas, W. und Bailey, J.E.** (1999). Isolation and characterization of the naphthocyclinone gene cluster from *Streptomyces arenae* DSM 40737 and heterologous expression of the polyketide synthase genes. *Gene* **227** (2), 125-135.
- Brünker, P., Sterner, O., Bailey, J.E. und Minas, W.** (2001). Heterologous expression of the naphthocyclinone hydroxylase gene from *Streptomyces arenae* for production of novel hybrid polyketides. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79** (3-4), 235-245.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5** (4), 376-379
- Buzzetti, F., Eisenberg, F., Grant, H.N., Keller-Schierlein, W., Voser, W. und Zähler, H.** (1968). Avilamycin. *Experientia* **24** (4), 320-323.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V. und Henrissat, B.** (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **326** (3), 929-939 [Erratum in *Biochem. J.* (1998). **329** (3), 719].
- Carreras, C.W. und Khosla, C.** (1998). Purification and *in vitro* reconstitution of the essential protein components of an aromatic polyketide synthase. *Biochemistry* **37**(8), 2084-2088.
- Chang, G.** (2003). Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Lett.* **555** (1), 102-105.
- Chater, K.F. und Bibb, M.J.** (1997). Regulation of bacterial antibiotic production. In: *Biotechnology* **7**, 57-105. Products of secondary metabolism. Herausg.: **Kleinkauf, H. und Dören, H.V.**, VCH, Weinheim.
- Chater, K.F. und Hopwood, D.A.** (1993). *Streptomyces* genetics. In: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: physiology, biochemistry, and molecular genetics. Herausg.: **Sonenshein, A.L.**, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 83-99
- Chen, H., Thomas, M.G., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Walsh, C.T. und Burkart, M.D.** (2000). Deoxysugars in glycopeptide antibiotics: enzymatic synthesis of TDP-L-epivancosamine in chloroeremomycin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (22), 11942-11947.
- Child, C.J., Spencer, J.B., Bhogal, P. und Shoolingin-Jordan, P.M.** (1996). Structural similarities between 6-methylsalicylic acid synthase from *Penicillium patulum* and vertebrate type I fatty acid synthase: evidence from thiol modification studies. *Biochemistry* **35** (38), 12267-12274.
- Cochrane, V.W.** (1996). Physiology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **15**, 1-26.
- Cortés, J., Liras, P., Castro, J.M. und Martin, J.F.** (1986). Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* is exerted on the formation of alpha-amino adipyl-cysteiny-valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *J. Gen. Microbiol.* **132** (7), 1805-1814.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., Henrissat, B.** (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328** (2), 307-317.
- Dagert, M. und Ehrlich, S.D.** (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6** (1), 23-28.
- Davies, G.J.** (2001). Sweet secrets of synthesis. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 98-100.
- Davis, B.D. und Mingioli, E.S.** (1950). Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriol.* **60** (1), 17-28.
- DeBoer, C., Caron, E.L. und Hinman, J.W.** (1953). Amicetin, a new *Streptomyces* antibiotic. *J. Am. Chem. Soc.* **75** (2), 499-500.
- Decker, H. und Haag, S.** (1995). Cloning and characterization of a polyketide synthase gene from *Streptomyces fradiae* Tü2717, which carries the genes for biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A and a gene probably involved in its oxygenation. *J. Bacteriol.* **177** (21), 6126-6136.
- Della Bruna, C., Ricciardi, M.L. und Sanfilippo, A.** (1973). Axenomycins, new cestocidal antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3** (6), 708-710.

- Dimroth,P., Walter,H. und Lynen,F.** (1970). Biosynthese von 6-Methylsalicylsäure [Biosynthesis of 6-methylsalicylic acid]. *Eur. J. Biochem.* **13** (1), 98-110.
- Distler,J., Ebert,A., Mansouri,K., Pissowotzki,K., Stockmann,M. und Piepersberg,W.** (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* **15** (19), 8041-8056.
- Domann,S.** (2000). Dissertation: Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Landomycine und zur Biosynthese der Desoxyzucker D-Olivose und L-Rhodinose in den Angucyclin-Antibiotika Landomycin A und Urdamycin A. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Donadio,S., Staver,M.J., McAlpine,J.B., Swanson,S.J. und Katz,L.** (1991). Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*, **252** (5006), 675-679.
- Doumith,M., Weingarten,P., Wehmeier,U.F., Salah-Bey,K., Benhamou,B., Capdevila,C., Michel,J.M., Piepersberg,W. und Raynal,M.C.** (2000). Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* **264** (4), 477-485.
- Drautz,H., Zähner,H., Rohr,J. und Zeeck,A.** (1986). Metabolic products of microorganisms. 234. Urdamycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces fradiae*. I. Isolation, characterization and biological properties. *J. Antibiot.* **39** (12), 1657-1669.
- Evans,P.D., Cook,S.N., Riggs,P.D. und Noren,C.J.** (1995). LITMUS: multipurpose cloning vectors with a novel system for bidirectional *in vitro* transcription. *Biotechniques* **19** (1), 130-135.
- Fernández-Moreno,M.A., Carbó,L., Cuesta,T., Vallin,C. und Malpartida,F.** (1998). A silent ABC transporter isolated from *Streptomyces rochei* F20 induces multidrug resistance. *J. Bacteriol.* **180** (16), 4017-4023.
- Flett,F., Mersinias,V. und Smith,C.P.** (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **155** (2), 223-229.
- Fu,X., Albermann,C., Jiang,J., Liao,J., Zhang,C. und Thorson,J.S.** (2003). Antibiotic optimization via *in vitro* glycorandomization. *Nat. Biotechnol.* **21** (12), 1467-1469.
- Funa,N., Ohnishi,Y., Fujii,I., Shibuya,M., Ebizuka,Y. und Horinouchi,S.** (1999). A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* **400** (6747), 897-899.
- Gagneux,P. und Varki, A.** (1999). Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* **9** (8), 747-755.
- Gaisser,S., Trefzer,A., Stockert,S., Kirschning,A. und Bechthold,A.** (1997a). Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. *J. Bacteriol.* **179** (20), 6271-6278.
- Gaisser,S., Bohm,G.A., Cortés,J. und Leadlay,P.F.** (1997b). Analysis of seven genes from the *eryA1-eryK* region of the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* **256** (3), 239-251.
- Galmarini,O.L. und Deulofeu,V.** (1961). Curamycin. I. Isolation and analysis of some hydrolysis products. *Tetrahedron* **15**, 76-88.
- Gao,X., Yo,P., Keith,A., Ragan,T.J. und Harris,T.K.** (2003). Thermodynamically balanced inside-out (TBIO) PCR-based gene synthesis: a novel method of primer design for high-fidelity assembly of longer gene sequences. *Nucleic Acids Res.* **31** (22), e143
- Gehring,A.M., DeMoll,E., Fetherston,J.D., Mori,I., Mayhew,G.F., Blattner,F.R., Walsh,C.T. und Perry,R.D.** (1998a). Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.* **5** (10), 573-586.
- Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D. und Walsh, C.T.** (1998b). The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of Yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry* **37** (33), 11637-11650.
- Gherna,R., Pienta,P. und Cote,R.** (Herausg.) (1992). Catalogue of bacteria and phages. 18. Auflage, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA.
- Gomi,S., Sasaki,T., Itoh,J. und Sezaki,M.** (1988). SF2446, new benzo[a]naphthacene quinone antibiotics. II. The structural elucidation. *J. Antibiot.* **41** (4), 425-432.
- Guilfoile,P.G. und Hutchinson,C.R.** (1991). A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (19), 8553-8557.

- Gusarov, I. und Nudler, E.** (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell* **3** (4), 495-504.
- Ha, S., Walker, D., Shi, Y. und Walker, S.** (2000). The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Prot. Sci.* **9**, 1045-1052.
- Han, L., Yang, K., Kulowski, K., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C.R. und Vining, L.C.** (2000). An acyl-coenzyme A carboxylase encoding gene associated with jadomycin biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *Microbiology* **146** (4), 903-910.
- Haydock, S.F., Dowson, J.A., Dhillon, N., Roberts, G.A., Cortés, J. und Leadlay, P.F.** (1991). Cloning and sequence analysis of genes involved in erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: sequence similarities between EryG and a family of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Mol. Gen. Genet.* **230** (1-2), 120-128.
- Herold, K.** (2005). Dissertation: Untersuchungen zur Struktur, Wirkungsweise und Biosynthese der Cervimycine als Verbindungen einer besonderen Klasse aromatischer Polyketide aus Streptomyceten. Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Herold, K., Xu, Z., Gollmick, F.A., Gräfe, U. und Hertweck, C.** (2004). Biosynthesis of cervimycin C, an aromatic polyketide antibiotic bearing an unusual dimethylmalonyl moiety. *Org. Biomol. Chem.* **2** (17), 2411-2414.
- Herold, K., Gollmick, F.A., Groth, I., Roth, M., Menzel, K.D., Mollmann, U., Gräfe, U. und Hertweck, C.** (2005). Cervimycin A-D: A polyketide glycoside complex from a cave bacterium can defeat vancomycin resistance. *Chemistry* **11** (19), 5523-5530.
- Hoffmeister, D., Ichinose, K., Domann, S., Faust, B., Trefzer, A., Dräger, G., Kirschning, A., Fischer, C., Künzel, E. und Bearden, D.W.** (2000). The NDP-sugar co-substrate concentration and the enzyme expression level influence the substrate specificity of glycosyltransferases: cloning and characterization of deoxysugar biosynthetic genes of the urdamycin biosynthetic gene cluster. *Chem. Biol.* **7** (11), 821-831.
- Hoffmeister, D., Ichinose, K. und Bechthold, A.** (2001). Two sequence elements of glycosyltransferases involved in urdamycin biosynthesis are responsible for substrate specificity and enzymatic activity. *Chem. Biol.* **8** (6), 557-567.
- Hofmann, C.** (2005). Dissertation: Charakterisierung neuer Avilamycin-Derivate und Klinische Studie zur antibiotischen Sequentialtherapie bei Patienten mit Fieber in der Neutropenie. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.
- Hong, S.K., Kito, M., Beppu, T. und Horinouchi, S.** (1991). Phosphorylation of the AfsR product, a global regulatory protein for secondary-metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **173**, 2311-2318.
- Hoover, D.M. und Lubkowski, J.** (2002). DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res.* **30** (10), e43.
- Hopwood, D.A.** (1997). Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem. Rev.* **97** (7), 2465-2498.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. und Schrempf, H.** (1999). Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, U.K.
- Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujui, I., Rudd, B.A.M., Floss, H.G. und Omura, S.** (1985). Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature* **314** (6012), 642-644.
- Hopwood, D.A. und Sherman, D.H.** (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 37-66.
- Horinouchi, S. und Beppu, T.** (1992). Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene* **115**, 167-172.
- Hutchinson, C.R.** (1998). Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* **1** (3), 319-329.
- Hu, Y. und Walker, S.** (2002). Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem Biol.* **9** (12), 1287-1296.
- Hütter, R.** (1962). Zur Systematik der Actinomyceten. 7. Streptomyceten mit blauem, blaugrünem und grünem Luftmycel. *Archiv für Mikrobiologie* **43**, 23-49.

- Ichinose, K., Ozawa, M., Itou, K., Kunieda, K. und Ebizuka, Y.** (2003). Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanequinone gene clusters. *Microbiology* **149** (7), 1633-1645.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. und Omura, S.** (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21** (5), 526-531.
- Ikeda, H., Seno, E.T., Bruton, C.J. und Chater, K.F.** (1984). Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **196** (3), 501-507.
- Ishikawa, J., Yamashita, A., Mikami, Y., Hoshino, Y., Kurita, H., Hotta, K., Shiba, T. und Hattori, M.** (2004). The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (41), 14925-14930.
- Ishiyama, D., Vujaklija, D. und Davies, J.** (2004). Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (3), 1297-1306.
- Jackson, S.P. und Tjian, R.** (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* **55** (1), 125-133.
- Jacobsen, J.R., Hutchinson, C.R., Cane, D.E. und Khosla, C.** (1997). Precursor-directed biosynthesis of erythromycin analogs by an engineered polyketide synthase. *Science* **277** (5324), 367-369.
- Jakobi, K. und Hertweck, C.** (2004). A gene cluster encoding resistomycin biosynthesis in *Streptomyces resistomycificus*; exploring polyketide cyclization beyond linear and angucyclic patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **126** (8), 2298-2299.
- Jungmann, V., Molnár, I., Hammer, P.E., Hill, D.S., Zirkle, R., Buckel, T.G., Buckel, D., Ligon, J.M. und Pachlatko, J.P.** (2005). Biocatalytic conversion of avermectin to 4"-oxo-avermectin: characterization of biocatalytically active bacterial strains and of cytochrome p450 monooxygenase enzymes and their genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (11), 6968-6976.
- Kagan, R.M. und Clarke, S.** (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **310** (2), 417-427.
- Kaur, P., Rao, D.K. und Gandlur, S.M.** (2005). Biochemical characterization of domains in the membrane subunit DrrB that interact with the ABC subunit DrrA: identification of a conserved motif. *Biochemistry* **44** (7), 2661-2670.
- Kealey, J.T., Liu, L., Santi, D.V., Betlach, M.C. und Barr, P.J.** (1998). Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (2) 505-509.
- Kelemen, G.H., Brown, G.L., Kormanec, J., Potuckova, L., Chater, K.F. und Buttner, M.J.** (1996). The positions of the sigma-factor genes, *whiG* and *sigF*, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **21** (3), 593-603.
- Khan, S.H. und Hindsgaul, O.** (1994). Chemical synthesis of oligosaccharides. In: *Molecular Glycobiology: Frontiers in molecular biology*. Herausg.: **Fukuda, M. und Hindsgaul, O.**, Oxford University Press, Oxford, 206-229.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. und Hopwood, D.A.** (2000). General introduction to actinomycete biology. In: *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, U.K., 1-42.
- Kikuchi, N., Kwon, Y.D., Gotoh, M. und Narimatsu, H.** (2003). Comparison of glycosyltransferase families using the profile hidden Markov model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310** (2), 574-579.
- Kirschning, A., Bechthold, A. und Rohr, J.** (1997). Chemical and Biochemical Aspects of Deoxysugars and Deoxysugar Oligosaccharides. *Top. Curr. Chem.* **188**, 1-84.
- Klaffke, W.** (1994). Application of enzymes in the synthesis of saccharides and activated sugars. *Carbohydr. Europe* **10**, 9-17
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E.L.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305** (3), 567-580.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., Lacelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. und Walsh, C.T.** (1996). A new enzyme superfamily: The phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3** (11), 923-936.
- Lambalot, R.H. und Walsh, C.T.** (1995). Cloning, overproduction, and characterization of the *Escherichia coli* holo-acyl carrier protein synthase. *J. Biol. Chem.* **270** (42), 24658-24661.

- Lawlor, E.J., Baylis, H.A. und Chater, K.F.** (1987) Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes Dev.* **1** (10), 1305-1310.
- Le Gouill, C., Desmarais, D. und Dery, C.V.** (1993). *Saccharopolyspora hirsuta* 367 encodes clustered genes similar to ketoacyl synthase, ketoacyl reductase, acyl carrier protein, and biotin carboxyl carrier protein. *Mol. Gen. Genet.* **240** (1), 146-150.
- Lee, P.C., Umeyama, T. und Horinouchi, S.** (2002). *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **43** (6), 1413-1430.
- Leskiw, B.K., Bibb, M.J. und Chater, K.F.** (1991a). The use of a rare codon specifically during development? *Mol. Microbiol.* **5** (12), 2861-2867.
- Leskiw, B.K., Lawlor, E.J., Fernandez-Abalos, J.M. und Chater, K.F.** (1991b). TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (6), 2461-2465.
- Leskiw, B.K., Mah, R., Lawlor, E.J. und Chater, K.F.** (1993). Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **175** (7), 1995-2005.
- Li, A. und Piel, J.** (2002). A gene cluster from a marine *Streptomyces* encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A. *Chem. Biol.* **9** (9), 1017-1026.
- Liu, H.W. und Thorson, J.S.** (1994). Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 223-256.
- Liu, J. und Mushegian, A.** (2003). Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci.*, **12** (7), 1418-1431.
- Liu, W., Christenson, S.D., Standage, S. und Shen, B.** (2002). Biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027. *Science* **297** (5584), 1170-1173.
- Liu, W., Nonaka, K., Nie, L., Zhang, J., Christenson, S.D., Bae, J., Van Lanen, S.G., Zazopoulos, E., Farnet, C.M., Yang, C.F. und Shen, B.** (2005). The neocarzinostatin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC 15944 involving two iterative type I polyketide synthases. *Chem. Biol.* **12** (3), 293-302.
- Lombó, F., Blanco, G., Fernández, E., Méndez, C. und Salas, J.A.** (1996). Characterization of *Streptomyces argillaceus* genes encoding a polyketide synthase involved in the biosynthesis of the antitumor mithramycin. *Gene* **172** (1), 87-91.
- Ly, H.D. und Withers, S.G.** (1999). Mutagenesis of glycosidases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 487-522.
- MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H. und MacNeil, T.** (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111** (1), 61-68.
- Malpartida, F. und Hopwood, D.A.** (1984). Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* **309** (5967), 462-464.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. und Mootz, H.D.** (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97** (7), 2651-2673.
- Marsden, A.F.A., Wilkinson, B., Cortés, J., Dunster, N.J., Staunton, J. und Leadlay, P.F.** (1998). Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase. *Science* **279** (5348), 199-202.
- Marti, T., Hu, Z., Pohl, N.L., Shah, A.N. und Khosla, C.** (2000). Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for R1128, a non-steroidal estrogen receptor antagonist. Insights into an unusual priming mechanism. *J. Biol. Chem.* **275** (43), 33443-33448.
- Martin, J.F.** (2004). Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J. Bacteriol.* **186** (16), 5197-5201.
- Martin, M.F. und Liras, P.** (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 173-206.
- Matsumoto, A., Hong, S.K., Ishizuka, H., Horinouchi, S. und Beppu, T.** (1994). Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**, 47-56.

- McDaniel,R., Ebert-Khosla,S., Hopwood,D.A. und Khosla,C. (1993). Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science* **262** (5139), 1546-1550.
- McDaniel,R., Ebert-Khosla,S., Hopwood,D.A. und Khosla,C. (1994). Engineered biosynthesis of novel polyketides: *actVII* and *actIV* genes encode aromatase and cyclase enzymes, respectively *J. Am. Chem. Soc.* **116** (24), 10855-10859.
- McNicholas,P.M., Najarian,D.J., Mann,P.A., Hesk,D., Hare,R.S., Shaw,K.J. und Black,T.A. (2000). Evernimicin binds exclusively to the 50S ribosomal subunit and inhibits translation in cell-free systems derived from both gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44** (5), 1121-1126.
- Méndez,C. und Salas,J.A. (2001). The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res. Microbiol.* **152** (3-4), 341-350.
- Menéndez,N., Nur-e-Alam,M., Braña,A.F., Rohr,J., Salas,J.A. und Méndez,C. (2004). Biosynthesis of the antitumor chromomycin A3 in *Streptomyces griseus*: analysis of the gene cluster and rational design of novel chromomycin analogs. *Chem. Biol.* **11** (1), 21-32.
- Mertz,J.L., Peloso,J.S., Barker,B.J., Babbitt,G.E., Oocolowitz,J.L., Simson,V.L., Kline,R.M. (1986). Isolation and structural identification of nine avilamycins. *J. Antibiot.* **39** (7), 877-887.
- Méthé,B.A., Nelson,K.E., Eisen,J.A. et al. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science* **302** (5652), 1967-1969.
- Missiakas,D. und Raina,S. (1998). The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* **28** (6), 1059-1066.
- Mochizuki,S., Hiratsu,K., Suwa,M., Ishii,T., Sugino,F., Yamada,K. und Kinashi,H. (2003). The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism. *Mol. Microbiol.* **48** (6), 1501-1510.
- Molnár,I., Hill,D.S., Zirkle,R., Hammer,P.E., Gross,F., Buckel,T.G., Jungmann,V., Pachlatko,J.P. und Ligon,J.M. (2005). Biocatalytic conversion of avermectin to 4"-oxo-avermectin: heterologous expression of the *ema1* cytochrome P450 monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (11), 6977-6985.
- Momose,I., Chen,W., Kinoshita,N., Iinuma,H., Hamada,M. und Takeuchi,T. (1998a). Polyketomycin, a new antibiotic from *Streptomyces* sp. MK277-AF1. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.* **51** (1), 21-25.
- Momose,I., Chen,W., Nakamura,H., Naganawa,H., Iinuma,H. und Takeuchi,T. (1998b). Polyketomycin, a new antibiotic from *Streptomyces* sp. MK277-AF1. II. Structure determination. *J. Antibiot.* **51** (1), 26-32.
- Moore,B.S., Hertweck,C., Hopke,J.N., Izumikawa,M., Kalaitzis,J.A., Nilsen,G., O'Hare,T., Piel,J., Shipley,P.R., Xiang,L., Austin,M.B. und Noel,J.P. (2002). Plant-like biosynthetic pathways in bacteria: From benzoic acid to chalcone. *J. Nat. Prod.*, **65** (12), 1956-1962.
- Moréra,S., Imberty,A., Aschke-Sonnenborn,U., Rüger,W. und Freemont,P.S. (1999). T4 phage β -glucosyltransferase: substrate binding and proposed catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* **292** (3), 717-730.
- Mulichak,A.M., Losey,H.C., Walsh,C.T. und Garavito,R.M. (2001). Structure of the UDP-glucosyltransferase GtfB that modifies the heptapeptide aglycone in the biosynthesis of vancomycin group antibiotics. *Structure* **9** (7), 547-557.
- Nagao,K., Suzuki,K., Tokunaga,J., Miyazaki,H., Katayama,N., Mitsuyama,R. und Uyeda,M. (1996). DMI-2 and DMI-3, DNA methyltransferase inhibitors produced by *Streptomyces* sp. strain no. 560. *J. Enzyme Inhib.* **10** (2), 115-124.
- Nakamura,Y., Gojobori,T. und Ikemura,T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* **28** (1), 292.
- Ninet,L., Benazet,F., Charpentie,Y., Dubost,M., Florent,J., Lunel,J., Mancy,D., Preud'Homme,J. (1974). Flambamycin, a new antibiotic from *Streptomyces hygrosopicus* DS 23 230. *Experientia* **30** (11), 1270-1272.
- Nishimura,A., Morita,M., Nishimura,Y. und Sugino,Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* **18** (20), 6169.
- Ogasawara,Y., Katayama,K., Minami,A., Otsuka,M., Eguchi,T. und Kakinuma,K. (2004). Cloning, sequencing, and functional analysis of the biosynthetic gene cluster of macrolactam antibiotic vicenistatin in *Streptomyces halstedii*. *Chem. Biol.* **11** (1), 79-86.

- Omura,S., Ikeda,H., Ishikawa,J., Hanamoto,A., Takahashi,C., Shinose,M., Takahashi,Y., Horikawa,H., Nakazawa,H., Osonoe,T., Kikuchi,H., Shiba,T., Sakaki,Y. und Hattori,M.** (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (21), 12215-12220.
- Onaka,H., Taniguchi,S., Igarashi,Y. und Furumai,T.** (2002). Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *J. Antibiot.* **55** (12), 1063-1071.
- Otten,S.L., Gallo,M.A., Madduri,K., Liu,X. und Hutchinson,C.R.** (1997). Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius* *dnmZUV* genes encoding three enzymes required for biosynthesis of the daunorubicin precursor thymidine diphospho-L-daunosamine. *J. Bacteriol.* **179** (13), 4446-4450.
- Pang,X., Aigle,B., Girardet,J.M., Mangenot,S., Pernodet,J.L., Decaris,B. und Leblond,P.** (2004). Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (2), 575-588.
- Paululat,T., Zeeck,A., Gutterer,J.M. und Fiedler,H.P.** (1999). Biosynthesis of polyketomycin produced by *Streptomyces diastatochromogenes* Tü 6028. *J. Antibiot.* **52** (2), 96-101.
- Pelzer,S., Reichert,W., Huppert,M., Heckmann,D. und Wohlleben,W.** (1997). Cloning and analysis of a peptide synthetase gene of the balhimycin producer *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908 and development of a gene disruption/replacement system. *J. Biotechnol.* **56** (2), 115-128.
- Pérez,M., Lombó,F., Zhu,L., Gibson,M., Braña,A.F., Rohr,J., Salas,J.A. und Méndez,C.** (2005). Combining sugar biosynthesis genes for the generation of L- and D-amictose and formation of two novel antitumor tetracenomycins. *Chem. Commun.* (12), 1604-1606.
- Pontis,H.G., Babio,J.R. und Salerno,G.** (1981). Reversible unidirectional inhibition of sucrose synthase activity by disulfides. *PNAS* **78** (11), 6667-6669.
- Postma,P.W., Lengeler,J.W., Jacobson,G.R.** (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57** (3), 543-594.
- Prado,L., Lombó,F., Braña,A.F., Méndez,C., Rohr,J. und Salas,J.A.** (1999). Analysis of two chromosomal regions adjacent to genes for a type II polyketide synthase involved in the biosynthesis of the antitumor polyketide mithramycin in *Streptomyces argillaceus*. *Mol. Gen. Genet.* **261** (2), 216-225.
- Pulido,D. und Jiménez,A.** (1987). Optimization of gene expression in *Streptomyces lividans* by a transcription terminator. *Nucleic Acids Res.*, **15** (10), 4227-4240.
- Quirós,L.M., Carbajo,R.J. und Salas,J.A.** (2000). Inversion of the anomeric configuration of the transferred sugar during inactivation of the macrolide antibiotic oleandomycin catalyzed by a macrolide glycosyltransferase. *FEBS Lett.* **476** (3), 186-189.
- Radomska-Pandya,A., Czernik,P.J., Little,J.M., Battaglia,E. und Mackenzie,P.I.** (1999). Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Rev.* **31** (4), 817-899.
- Räty,K., Kunnari,T., Hakala,J., Mäntsälä,P. und Ylihonko,K.** (2000). A gene cluster from *Streptomyces galilaeus* involved in glycosylation of aclarubicin. *Mol. Gen. Genet.* **264** (1-2), 164-172.
- Rajgarhia,V.B. und Strohl,W.R.** (1997). Minimal *Streptomyces* sp. strain C5 daunorubicin polyketide biosynthesis genes required for aklanonic acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179** (8), 2690-2696.
- Reuter,K., Mofid,M.R., Marahiel,M.A. und Ficner,R.** (1999). Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *EMBO J.* **18** (23), 6823-6831.
- Richardson,M.A., Kuhstoss,S., Solenberg,P., Schaus,N.A. und Rao,R.N.** (1987). A new shuttle cosmid vector, pKC505, for streptomycetes: its use in the cloning of three different spiramycin-resistance genes from a *Streptomyces ambofaciens* library. *Gene* **61** (3), 231-241.
- Rodríguez,A.M., Olano,C., Vilches,C., Méndez,C. und Salas,J.A.** (1993). *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily. *Mol. Microbiol.* **8** (3), 571-582.
- Römer,U., Schrader,H., Gunther,N., Nettelstroth,N., Frommer,W.B. und Elling,L.** (2004). Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase 1 from *Solanum tuberosum* L. for carbohydrate engineering. *J. Biotechnol.* **107** (2), 135-149.

- Rohr, J. (1984). Dissertation: Strukturaufklärung und Struktur-Wirkungs-Beziehungen neuer, cytostatisch wirkender Antibiotika: Elloramycine und Urdamycine, Georg-August-Universität, Göttingen.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. und Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. **16** (10), 944-945.
- Sabater, B., Sebastian, J. und Asensio, C. (1972). Identification and properties of an inducible mannokinase from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochim. Biophys. Acta* **284** (2), 406-413.
- Salah-Bey, K., Doumith, M., Michel, J.M., Haydock, S., Cortés, J., Leadlay, P.F. und Raynal, M.C. (1998). Targetted gene inactivation for the elucidation of deoxysugar biosynthesis in the erythromycin producer *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* **257** (5), 542-553.
- Salas, J.A., Quiros, L.M. und Hardisson, C. (1984). Pathways of glucose catabolism during germination of *Streptomyces* spores. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 229-233
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schimana, J., Fiedler, H.P., Groth, I., Süßmuth, R., Beil, W., Walker, M. und Zeeck, A. (2000). Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* **53** (8), 779-787
- Schneider, P. (1995). Diplomarbeit: Klonierung einer dTDP-Glucose-Synthetase und einer dTDP-Glucose-Dehydratase aus dem Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* Tü2717 sowie Untersuchungen zur Herstellung hybrider Naturstoffe. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Schoepfer, R. (1993). The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* **124** (1), 83-85.
- Shen, B., Summers, R.G., Wendt-Pienkowski, E. und Hutchinson, C.R. (1995). The *Streptomyces glaucescens* *tcmKL* polyketide synthase and *tcmN* polyketide cyclase genes govern the size and shape of aromatic polyketides. *J. Am. Chem. Soc.* **117** (2), 6811-6821.
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7** (2), 285-295.
- Shoolingin-Jordan, P.M. und Campuzano, I.D.G. (1999). Biosynthesis of 6-Methylsalicylic Acid. In: Comprehensive Natural Products Chemistry: Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives. Herausg.: Sankawa, U., Barton, D.H.R. und Nakanishi, K., Elsevier, Oxford, 345-365.
- Short, J.M., Fernández, J.M., Sorge, J.A. und Huse, W.D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16** (15), 7583-7600.
- Sletta, H., Borgos, S.E., Bruheim, P., Sekurova, O.N., Grasdalen, H., Aune, R., Ellingsen, T.E. und Zotchev, S.B. (2005). Nystatin biosynthesis and transport: *nysH* and *nysG* genes encoding a putative ABC transporter system in *Streptomyces noursei* ATCC 11455 are required for efficient conversion of 10-deoxynystatin to nystatin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** (11), 4576-4583.
- Soltero, F.V. und Johnson, M.J. (1953). The effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillium chrysogenum* Q-176. *Appl Microbiol.* **1** (1), 52-57.
- Spencer, J.B. und Jordan, P.M. (1992). Purification and properties of 6-methylsalicylic acid synthase from *Penicillium patulum*. *Biochem. J.* **288** (3), 839-846.
- Staunton, J. und Weissman, K.J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millenium review. *Nat. Prod. Rep.* **18** (4), 380-416.
- Sthapit, B., Oh, T.J., Lamichhane, R., Liou, K., Lee, H.C., Kim, C.G. und Sohng, J.K. (2004). Neocarzinostatin naphthoate synthase: an unique iterative type I PKS from neocarzinostatin producer *Streptomyces carzinostaticus*. *FEBS Lett.* **566** (1-3), 201-206.
- Stülke, J. und Hillen, W. (1998). Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften.* **85** (12), 583-592.
- Stuible, H.P., Büttner, D., Ehling, J., Hahlbrock, K. und Kombrink, E. (2000). Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. *FEBS Lett.* **467** (1), 117-122.
- Stumpp, T., Himbert, S. und Altenbuchner, J. (2005). Cloning of the netropsin resistance genes from *Streptomyces flavopersicus* NRRL 2820. *J. Basic Microbiol.* **45** (5), 355-362.

- Summers,R.G., Donadio,S., Staver,M.J., Wendt-Pienkowski,E., Hutchinson,C.R. und Katz,L.** (1997). Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiology* **143** (10), 3251-3262.
- Summers,R.G., Wendt-Pienkowski,E., Motamedi,H. und Hutchinson,C.R.** (1992). Nucleotide sequence of the *tcmII-tcmIV* region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* and evidence that the *tcmN* gene encodes a multifunctional cyclase-dehydratase-O-methyl transferase. *J. Bacteriol.* **174** (6), 1810-1820.
- Sun,Y., Zhou,X., Dong,H., Tu,G., Wang,M., Wang,B. und Deng,Z.** (2003). A complete gene cluster from *Streptomyces nanchangensis* NS3226 encoding biosynthesis of the polyether ionophore nanchangmycin. *Chem. Biol.* **10** (5), 431-441.
- Thompson,C.J., Ward,J.M. und Hopwood,D.A.** (1982). Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. *J. Bacteriol.* **151** (2), 668-677.
- Torkkell,S., Ylihonko,K., Hakala,J., Skurnik,M. und Mäntsälä,P.** (1997). Characterization of *Streptomyces nogalater* genes encoding enzymes involved in glycosylation steps in nogalamycin biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **256** (2), 203-209.
- Treede,I., Jakobsen,L., Kirpekar,F., Vester,B., Weitnauer,G., Bechthold,A. und Douthwaite,S.** (2003). The avilamycin resistance determinants AviRa and AviRb methylate 23S rRNA at the guanosine 2535 base and the uridine 2479 ribose. *Mol. Microbiol.* **49** (2), 309-318.
- Trefzer,A., Salas,J.A. und Bechthold,A.** (1999). Genes and enzymes involved in deoxysugar biosynthesis in bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **16** (3), 283-299.
- Trefzer,A., Fischer,C., Stockert,S., Westrich,L., Künzel,E., Girreser,U., Rohr,J. und Bechthold,A.** (2001). Elucidation of the function of two glycosyltransferase genes (*lanGT1* and *lanGT4*) involved in landomycin biosynthesis and generation of new oligosaccharide antibiotics. *Chem. Biol.* **8** (12), 1239-1252.
- Trefzer,A., Pelzer,S., Schimana,J., Stockert,S., Bihlmaier,C., Fiedler,H.P., Welzel,K., Vente,A. und Bechthold,A.** (2002). Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46** (5), 1174-1182.
- Ünlügil,U.M. und Rini,J.M.** (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** (5), 510-517.
- Volff,J.N., und Altenbuchner,J.** (2000). A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol. Lett.* **186** (2), 143-150.
- Vrielink,A., Rüger,W., Driessen,H.P.C., Freemont,P.S.** (1994). Crystal structure of the DNA modifying enzyme β -glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. *EMBO J.* **13**, 3413-3422.
- Waldron,C., Matsushima,P., Rosteck,P.R. Jr., Broughton,M.C., Turner,J., Madduri,K., Crawford,K.P., Merlo,D.J. und Baltz,R.H.** (2001). Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. *Chem. Biol.* **8** (5), 487-499.
- Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M. J. und Gay,N.J.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1** (8), 945-951.
- Walsh,C.T., Gehring,A.M., Weinreb,P.H., Quadri,L.E. und Flugel,R.S.** (1997). Posttranslational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1** (3), 309-315.
- Weinberg,E.D.** (1978). Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. *Folia Microbiol.* **23** (6), 496-504.
- Weinstein,M.J., Wagman,G.H., Oden,E.M., Luedemann,G.M., Sloane,P., Murawski,A., Marquez,J.** (1965). Purification and biological studies of evernimycin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* (5), 821-827.
- Weitnauer,G., Gaisser,S., Trefzer,A., Stockert,S., Westrich,L., Quirós,L.M., Méndez,C., Salas,J.A. und Bechthold,A.** (2001a). An ATP-binding cassette transporter and two rRNA methyltransferases are involved in resistance to avilamycin in the producer organism *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (3), 690-695.
- Weitnauer,G., Hauser,G., Hofmann,C., Linder,U., Boll,R., Pelz,K., Glaser,S.J. und Bechthold,A.** (2004). Novel avilamycin derivatives with improved polarity generated by targeted gene disruption. *Chem. Biol.* **11** (10), 1403-1411.

- Weitnauer,G., Mühlenweg,A., Trefzer,A., Hoffmeister,D., Süssmuth,R.D., Jung,G., Welzel,K., Vente,A., Girreser,U. und Bechthold,A.** (2001b). Biosynthesis of the orthosomycin antibiotic avilamycin A: deductions from the molecular analysis of the avi biosynthetic gene cluster of *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 and production of new antibiotics. *Chem. Biol.* **8** (6), 569-581.
- Westrich,L., Domann,S., Faust,B., Bedford,D., Hopwood,D.A. und Bechthold,A.** (1999). Cloning and characterization of a gene cluster from *Streptomyces cyanogenus* S136 probably involved in landomycin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **170** (2), 381-387.
- Weymouth-Wilson,A.C.** (1997). The role of carbohydrates in biologically active natural products. *Nat. Prod. Rep.* **14** (2), 99-110.
- Wietzorrek,A. und Bibb,M.** (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol. Microbiol.* **25** (6), 1181-1184.
- White,O. und andere** (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286** (5444), 1571-1577.
- Wright,F. und Bibb,M.J.** (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113** (1), 55-65.
- Xuan,L.J., Xu,S.H., Zhang,H.L., Xu,Y.M. und Chen,M.Q.** (1992). Dutomycin, a new anthracycline antibiotic from *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **45** (12), 1974-1976.
- Yadav,G., Gokhale,R.S. und Mohanty,D.** (2003). SEARCHPKS: A program for detection and analysis of polyketide synthase domains. *Nucleic Acids Res.* **31** (13), 3654-3658.
- Yalpani,N., Altier,D.J., Barbour,E., Cigan,A.L. und Scelonge,C.J.** (2001). Production of 6-methylsalicylic acid by expression of a fungal polyketide synthase activates disease resistance in tobacco. *Plant Cell* **13** (6), 1401-1410.
- Yanisch-Perron,C., Vieira,J. und Messing,J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33** (1), 103-119.
- Yoshida,K., Yamaguchi,M., Ikeda,H., Omae,K., Tsurusaki,K. und Fujita,Y.** (2004). The fifth gene of the *iol* operon of *Bacillus subtilis*, *iolE*, encodes 2-keto-*myo*-inositol dehydratase. *Microbiology* **150** (3), 571-580.
- Yoshida,K.I., Aoyama,D., Ishio,I., Shibayama,T. und Fujita,Y.** (1997). Organization and transcription of the *myo*-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179** (14), 4591-4598.
- Young,L. und Dong,Q.** (2004). Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res.* **32** (7), e59
- Zachara, N.E. und Hart, G.W.** (2002). The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem. Rev.* **102** (2), 431-438.
- Zechel,D.L. und Withers,S.G.** (2000). Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* **33** (1), 11-18.
- Zhou,P., Florova,G. und Reynolds,K.A.** (1999). Polyketide synthase acyl carrier protein (ACP) as a substrate and a catalyst for malonyl ACP biosynthesis. *Chem. Biol.* **6** (8), 577-584.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Nicht angegeben sind die Abkürzungen der Restriktionsendonukleasen, der geläufigen Einheiten und abgeleiteten Einheiten des *Système Internationale d'Unités* sowie der Elemente des Periodensystems.

Abkürzungen für Nukleobasen

A	Adenin	K	Guanin oder Thymin	U	Uracil
B	Cytosin, Guanin oder Thymin	M	Adenin oder Cytosin	V	Adenin, Cytosin oder Guanin
C	Cytosin	N	jede Base	W	Adenin oder Thymin
D	Adenin, Guanin oder Thymin	R	Adenin oder Guanin	Y	Cytosin oder Thymin
G	Guanin	S	Cytosin oder Guanin		
H	Adenin, Cytosin oder Thymin	T	Thymin		

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

Abkürzungen

6-MSAS	6-Methylsalicylsäuresynthase	<i>bla</i>	β -Lactamasegen (Resistenzgen)
<i>aac</i> (3)IV	(3')-N-Aminoglykosidacetyltransferase	bp	Basenpaar(e)
AB	Antibiotikum/Antibiotika	BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Abb.	Abbildung	<i>cam</i> ^R	Chloramphenicol-Resistenz
ABC	ATP-Bindungskassette (ATP <i>binding cassette</i>)	cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ACN	Acetonitril	CIAP	alkalische Phosphatase aus Rinderdarm (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
ACP	Acyl-Carrier-Protein	CoA	Coenzym A
AK	Arbeitskreis	CYC	Cyclase
<i>amu</i>	atomare Masseneinheit = Da (<i>atomic mass unit</i>)	Da	Dalton
AP	alkalische Phosphatase	DAD	Diodenarraydetektor
APS	Ammoniumpersulfat	DC	Dünnschichtchromatographie
ARO	Aromatase	dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
AS	Aminosäure(n)	DH	Dehydratase
AT	Acyltransferase	DIG	Digoxigenin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	DMSO	Dimethylsulfoxid
attP	<i>phage attachment site</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Avi	Avilamycin	DNase	Desoxyribonuklease
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	dNDP	Desoxynukleosiddiphosphat(e)
BC	Biotin-Carboxylase	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat(e)
BCCP	Biotin-Carboxylase-Carrier-Protein	dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double stranded</i>)
bidest.	zweifach destilliert	dTDP	Desoxythymidin-5'-diphosphat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PDA	Photodioden-Array
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PEG	Polyethylenglykol
ER	Enoylreduktase	PKS	Polyketidsynthase(n)
<i>ermE</i>	Erythromycin-Resistenzgen aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Pok	Polyketomycin
ESI	Elektrospray-Ionisierung	PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)	psig	<i>pounds-force per square inch gauge</i>
EtBr	Ethidiumbromid	RBS	Ribosomenbindestelle
EtOH	Ethanol	Rf	Retentionsfaktor
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	RNA	Ribonukleinsäure
Glc	Glucose	RNase	Ribonuklease
Glc-1-P	Glucose-1-phosphat	rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
GT	Glykosyltransferase	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)	RT	Raumtemperatur
IMP	Inosinmonophosphat	S.	<i>Streptomyces</i>
<i>Int</i>	Integrase	SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid	SARP	<i>Streptomyces antibiotic regulatory protein(s)</i>
<i>kmr</i>	Kanamycin-Resistenzgen	SDS	Natriumdodecylsulfat
kb	Kilobasenpaar ϵ (= 1000 bp)	sp.	Spezies (<i>sg.</i>)
KR	Ketoreduktase	spp.	Spezies (<i>pl.</i>)
KS	β -Ketoacyl-Synthase	subsp.	Subspezies (<i>sg.</i>)
LB	Luria-Bertani	ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded</i>)
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)	Tab.	Tabelle
m/z	Masse zu Ladung	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>M.</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>tcr</i>	Tetracyclin-Resistenzgen
MHK	minimale Hemmkonzentration	TE	Tris-EDTA
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
MS	Massenspektrometrie	TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2- aminoethansulfonsäure
MSAS	6-Methylsalicylsäure-Synthase	TMD	Transmembran-Domäne
MSD	Massendetektor	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
MT	Methyltransferase	tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
MW	relative Molmasse, Molekulargewicht	<i>tsr</i>	Thiostrepton-Resistenzgen
NBD	Nukleotid-bindende Domäne	U	Unit(s) = Maßeinheit für die Enzymaktivität
nt	Nukleotid(e)	ÜN	Übernacht-
NTA	Nitriltriessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>)	UDP	Uridin-5'-diphosphat
OD	optische Dichte	Urd	Urdamycin
ORF	offene(r) Leserahmen (<i>open reading frame(s)</i>)	UV	Ultraviolett
<i>oriR</i>	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)	Vol.	Volumenteil
<i>oriT</i>	Transferursprung (<i>origin of transfer</i>)	v/v	Volumen/Volumen
OXY	Oxygenase	w/v	Gewicht/Volumen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	WT	Wildtyp
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D- galactopyranosid

6.2 Übersichtskarte des Polyketomycin-Clusters

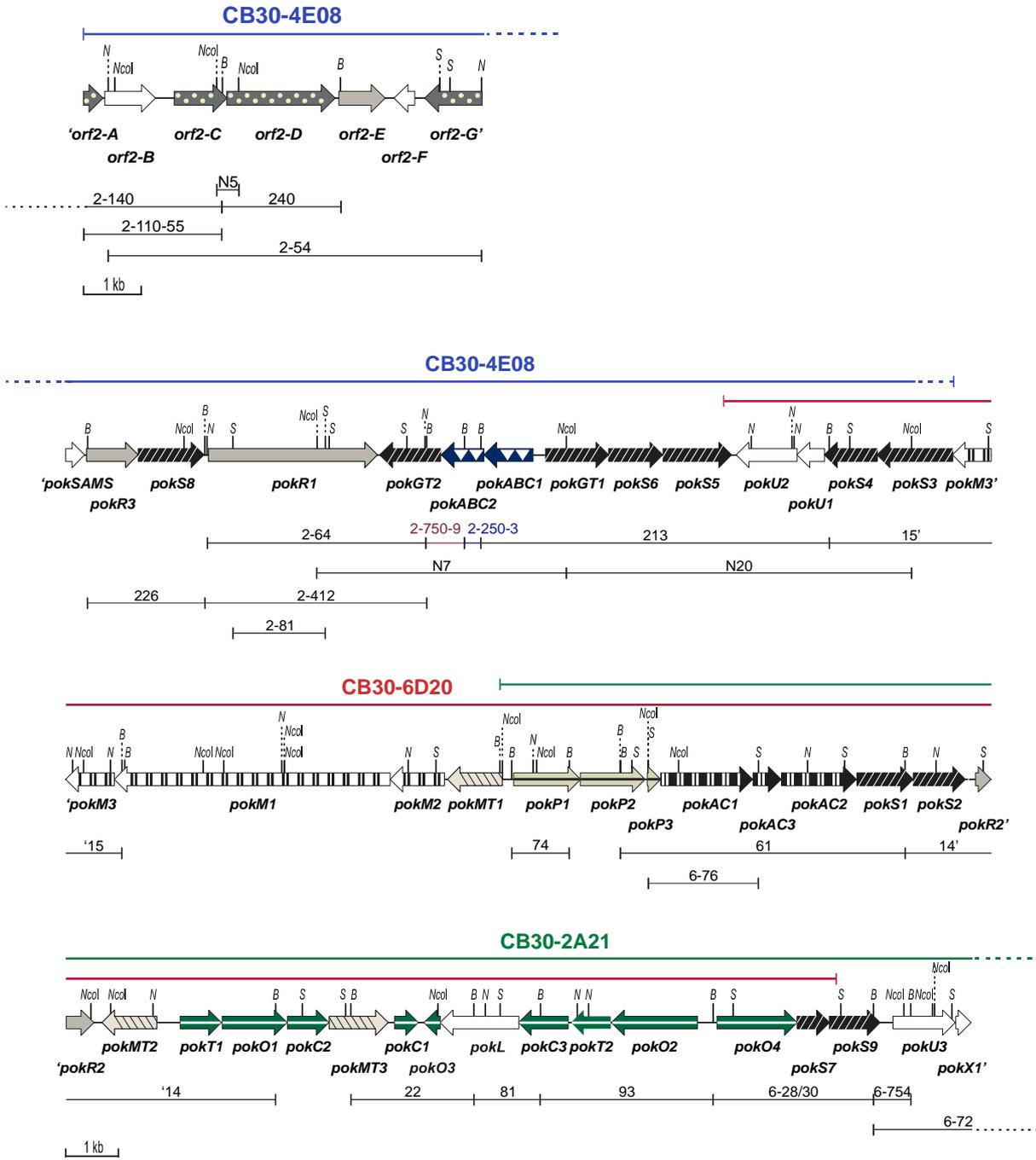


Abb. 6.1: Physikalische Karte der sequenzierten Bereiche aus den Cosmiden **CB30-6D20**, **CB30-4E08** und **CB30-2A21**. Neben der 52,1 kb-Sequenz mit 41 vollständigen ORFs ist im oberen Teil der Abbildung ein 6,9 kb-Abschnitt mit fünf vollständigen ORFs dargestellt. Die ungefähre Lage der Cosmide ist dargestellt durch die farbigen Linien oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Die Lage der Restriktionsschnittstellen, die bei der Erstellung von Subklonen von Bedeutung waren, ist ebenfalls angegeben (*B* = *Bam*HI, *N* = *Not*I, *Nco*I und *S* = *Sac*I). Um die Lage der Subklone zu verdeutlichen, sind diese jeweils unterhalb der Sequenz angegeben. Die Subklone sind in der Grafik nur mit der Nummer des Inserts bezeichnet. Die entsprechenden Plasmide sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

6.3 Sonden-DNA-Sequenzen

Nachfolgend die Sequenzen der spezifischen Sonden, die zur Suche nach Anschlußcosmiden für das Cosmid CB30-6D20 aus *S. diastatochromogenes* Tü6028 verwendet wurden. Grau unterlegt sind die Bereiche, von denen Primer abgeleitet wurden.

Sonde für Anschlußcosmid in 5'-Richtung

CTCATGCCTC TCCGATACTC CTCGTCCGCC CGCCCGTGTC GCGGCCGGGA CCGTGTCATT CCTCGCCGAG CGCGTGCTTC GCCCAGCCGT CGGCGTTCAC GTCCGGCTGG
 AGCGCGGCGT GCCCGGCCAT GCAGTGACG TCCCGCCACA CCCGCTGAAC CGGGTGGGAC AGGGCCTGGC CCCGGGCGCC GTCATCCGC ATCAGCCCGT TCACGGAGTC
 GAGCAGCAGG TCCACCGCGG TCGAGTAGTC ACGCGTGACC CGCAGCGTCA GGGCCGGGGT CGGCTCCGCC TCGTCGGCCT CGGCCGCCGC GTGGTCGACG ATCAGCCGTG
 CCGCGTCGAG GCGGGCCGCG GCCCGGGCCA GCGTCAGGCG CACGCCGGGC CGGGACCCGG TCCGGACGCC GTTGATCTCG ACGCGGCTCG CGGTCCATCG GGTCCATGCC
 CCGAGAGCGC CCTCGACCGC ACCGATGCCG GGGGCCACGA **AGAACAGGCC GTTGATCAGC** TTGAGCG

Sonde für Anschlußcosmid in 3'-Richtung

GCAGGCAGCT TCGAGTTAC CCCCAGATC CACACGGACG CGCGGGGGCT GTTCGTGTCTG CCCCTTCAGG AGGAGGCGTT CGTCGCGGCG GTCGGCGAGC CGTTCGTGAC
 CGCGCAGACG AACACAGCC GCTCCGCCCG GGGCGTGCTG CGCGGGCTGC ACTTCACGAC CACACCTCCC GGCCAGGCCA AGTACGTGTA CTGCGCGCAG GGCCGGGCCC
 TCGACGCGGT CGTCGACATC CGGCTCGGCT CACCGACCTT CGGCAAGTGG GACATCGTGG AGATGGACGC CGTCTCCTAC CGTGCCGTGT ACATCCCCGA CGGCGCCGGG
 CACGCCTTCC TCGCGCTCGA CGACGACACC GTGATGTCTG **ACCTCGTCTC CAGCGCCTA**

6.4 DNA-Sequenzen aus *Streptomyces diastatochromogenes* Tü6028

6.4.1 Polyketomycin-Cluster-Sequenz

Die DNA-Sequenz ist größtenteils in 5'→3'-Leserichtung wiedergegeben. In Bereichen mit Genen, die auf dem Gegenstrang codiert sind, ist der Gegenstrang auch aufgeführt. Die Start-Codone **ATG**, **GTG**, **TTG** und die Stopp-Codone **TGA**, **TAA**, **TAG** sind hervorgehoben.

	CCCCTCCAAG	GTGGACCGTT	CGGCGGCCTA	CGCCATGCGG	TGGGTTMCCA	AGAACGTCGT	CGCCGCCTCG	CTCGCGCGCC	GCTGGGAGGT	CCAGTCCGCC	100
	TACGCGATCG	GCAAGGCCGA	TCCCGTCGGG	CTCTTGGTGG	AGACCTTCGG	CACCCGCGACC	GTCGACCCGG	AGAAGATCGA	GAACGCCGTC	TCGGCGGTCT	200
	TCGACCTCCG	GCCCGCCGCC	CTCATCCGCG	ACCTCGACCT	GGTGCGGCCG	ATCTACGCCC	AGACCGCGGC	CTACGGCCAC	TTCGGGCGMG	AGATGCCGGA	300
↓ Stopp <i>pokSAMS</i>	CTTCACCTGG	GAGCGCACCG	ACCGCGTCGA	CGCGCTGCGC	CGGGCCGCCG	GTCTCTGACC	CCCACCCGCC	GACCGACGGT	TCAAGGAGAT	CCCCGTGCGC	400
	ATCGCCGTCA	CCGGATCCAT	CGCGACGGAC	CACCTCATGG	CCTTTCCCGG	GCGCTTCGTC	GACCAGCTCA	TGAGCGAGCA	CCTGGAGAAG	GTGTGCTGT	500
	CGTTCCTCGC	CGACACGCTG	GAGATCAGGC	GCGGCGGGGT	GGCCGCCAAC	ATCGCCGTGG	GCCTCGGCCG	CCTCGGGCTC	ACTCCGTCC	TGGTGGGCGC	600
	GGCCGGCACC	GACTTCGCCG	AGTACCGCGA	CTGGCTGCGC	GCCAACGGCG	TCGACACCGG	GTCGGTGC GG	GTGAGCGCCA	CCCGGCACAC	CGCCCGCTTC	700
	GTGTGCACCA	CCGACGCCGA	CCAGAACCAG	ATCGCCACCT	TCTACGCCGG	CGCGATGGTC	GAGGCACGGG	AGATCGCGCT	GGCCGGCGTC	GTCGAACGGG	800
	TCGGCGGCGT	CGGCCTGGTG	ATGGTGGGAC	CCGACGACCC	CGAGGCCATG	CTCCGGCACA	CCGACGCGTG	CCGGACACTC	GGACTGGACT	TCGCGGCCGA	900
	CCCCTCGCAG	CAACTCGCCC	GACTGGGACG	GGAGGAGACC	CGGCGGCTCG	TCGACGGGGC	CCGCTTCCTG	TTCACCAACG	CTTACGAGGC	GGCCCTGCTC	1000
	CAGGAACGAA	CGGGCTGGAG	CAGGGCCGAG	GTCCTCGAAC	GGGTCGGCAG	CTGGCTCGTC	ACCCACGGCC	CCGAGGGCGT	CGCCGTGCTC	CGCTCCGGAC	1100
	ACCCGGAGTT	GCGGCTGCC	GCGGTGCGAG	CGGCCGAGGT	CGTGGACCCC	ACCGGCGCCG	GCGACGGTTC	CCGCGCCGGA	TTCCTGGCCG	GCGCCGCACG	1200
	GGGATGGCCG	CAGGAACGGG	CCGCCCGGCT	CGGGTGCGCC	CTGGCGACCC	TCGTGCTGGA	GTCCCTCGGC	ACCCAGGAGT	ACAAGCTGTC	CGCCGCCGAA	1300
	CTGCACCTGA	GGACCGAGCA	GGCCTACGGG	GCCGCCGCTG	CCGCCGAGAT	CACCCACGAC	CTGGAGAGGC	GATGACGATC	AAAGAGTGCC	GCATCTGCGG	1400
	CAACCGCACC	CTGCTGCCGA	TACTCGACCT	GGGCGAACAG	GCCCTACCG	GCATCTTCCC	CCGCACCCGC	GACGAGGTGG	TCCCCTCCGT	ACCCCTCGAA	1500
	CTCGTGCGCT	GCTCACCGGA	CGGCTGCGGA	CTCGTCCAAC	TGCGGCACAC	CGCCGACTTC	GGGCTGATGT	ACGGCGAGGG	CTACGGATAC	CGGTCCGGAC	1600
	TCGGTGAGTT	CATGATCCGG	CACCTCGCGG	GCAAGGCCGC	CCTGCTCACC	GACCTGGTGC	GCCCCGGCCC	CGACGACCTC	GTCCTGGACA	TCGGCAGCAA	1700
	CGACTCCACC	CTCCTGCGGG	CCTACCCCGC	GGACGGACCC	ACCCTGGTCG	GCATCGACCC	GACCGGAGAG	AACTTCCGCG	AGTACTATCC	CGAACACGTC	1800
	AGGCTCGTTC	CCGAGTTCTT	CTCCCGCGAG	GTCTTACCCG	GGCACTTCGG	CCGGCGCAAG	GCCAAGATCG	TCACCTCGAT	CGCGATGTTT	TACGACCTGC	1900
	CGCGCCCCCT	CGACTTCATG	CGGGACGTCC	ACGACATCCT	CGACGACGAC	GGGGTGTGGC	TGCTGGAACA	AGAGTACAA	TGCCCGCGAT	TGNTCGAAAAG	2000
	CCCACCCGCG	TACGACGTTG	TTGTGCCAC	GAAGCACCTG	GAGTACTACG	CGCTGCGGCC	AGATTGAGAT	GGATGGCGGG	CGCGACCCGG	ACTGAGCGTC	2100
	ATCCGGGCGG	AGCTTAAACT	TCCGTGTACG	GCGGCAAGCC	TCTGCGTCGT	GCTCGCCAAG	AACCCCGCAC	GCCACCAGT	CGACGAGGCC	GGGATCGCCG	2200
	CGGTCCGCGC	CCACGAGGCA	CAGCTGGGTC	TGGACACCAT	GGCCCCCTTC	GAGGCCTTCG	CCCACCGGGC	GGCCGAGTAC	CGCGACGGGC	TGCGCGCCTT	2300
	CCTCGACACC	TCCCGCGAGG	CCGGCCGGCT	GACCCTCGGG	TACGGCGCGT	CGACCAAGGG	CAACGTCATC	CTCCAGTACT	GCGGCATCAC	CGAACCGGAC	2400
	CTGCCCTGCA	TCGGCGAGGT	CAACAAGGAC	AAGGACGGCT	GCTTACCCCC	CGGCACCGGC	ATTCCCCTCG	TCACCGAGTC	CGAGGCCAAG	TCCCGCGGCG	2500
	CCGACCAGCT	GCTCGTGCTG	CCCTGGATCT	ACCGGGACGG	CTTCGTCGAA	CGGGAGCGTG	CGTACCGCGA	GAGCGCGGGC	AAGCTGGTCT	TCCCGCTACC	2600
↓ Stopp <i>pokS8</i>	CGAACTCAGC	ATCGTGTAGC	CCCCGTTGAC	CGGGATCCGA	TGACCACAT	TTGATCAGCG	GTTGGGGTTC	GGGCGCGGCC	GCTGCGGCAC	AATGAGGGCA	2700

Start	TGCCCCACCGG	TGCTGCCATC	CGCATCCTCG	GACCGCTGCG	CGTACGCACG	GCGGACGGCG	GGACGGCCGA	CGTGCGCGGG	GCGCGGCTGC	AGACACTGGT	2800		
<i>pokR1</i>	CGCGGTCTCT	GCGCTGGCGG	CGGGCAGGGA	AGTGGCGCGC	TCCGACCTCC	TCGAAGCGCT	CTGGGACGAC	GCCCTGCCGT	CCGCTCCGGA	CAACGCGCTC	2900		
	CAGGCCCTGA	CCTCCCGGAT	GCGGCGCGCC	CTGCCCGGGC	TCGTCTGCGA	CTCCAGCCCC	ACCGGCTACC	GGCTCGTCTG	ACGGCGGGAC	GACGTCGACG	3000		
	CGCTCCGCTT	CGAGTCGCAG	GTGTCTGGCCG	TCGCCGCGGT	GCGGGGCGAC	CACGCGCGGC	GCGCCGCCGT	GCTGCGGGAC	GCCCTCGACC	TGTGGCACGG	3100		
	CCCCGCCCTG	GCGGGACTCA	CCTCCACCCG	GGTGGTGC	GCCCACGCGA	CACGGCTCGA	AGAGTCTCCG	CGCCGCGCCC	GCGAGGACCG	GATCGACGCC	3200		
	GAACTCGCCC	TGGGCGGCGG	GCCC	GCGCTC	TGCGCCGAAC	TGGCGGGCCT	GGTCTCCGAG	GACCCGTTCC	GCGAGAAGCT	GCGCGTCCAG	CTCATGCACG	3300	
	CCCTGCAGAC	CGACGGCCGA	CAGACCGAGG	CGCTGGGCGT	GTACACGGAG	GCGAGAACCC	TGCTCGCCGA	GACGTACGGG	ATCGACCCCT	CGGCGGAACT	3400		
	CCATCAGGCG	TACCTCGACG	TCCTGCGCGG	CGAAGTCACC	GCGGCACCGC	CCCGACTCGC	GCCGCGCGAG	ACACGGCTGC	CGGTCCCCTG	CACCGAACTC	3500		
	GTGCGCAGGG	AGGCCGACGT	GGAGCGGGTG	CGGGA	ACTGC	TGCA	CCGACTCG	ACCGTCTCG	GCCCCGCGG	CGTGGGCAAG	ACCCGGTGG	3600	
	CCCTCGAAGC	GGCCGACGC	GTCGACGAGC	GCGGCACCCA	GCGCGTCGTT	CTCGTCGAAC	TCGCCTCGGT	CGCCGACCCG	GCCAACGTGC	CGCGTACCGT	3700		
	CCTCGACACC	CTCGGCGCGG	GCGAGGGCGG	ACTGCTGTCC	GCGCCGGGAT	TCGAGACACC	CGAGCACGGG	CCCCTGCTGC	GCCGCCTCAT	GAGCCTGCTG	3800		
	GCGGGCGAAC	CGGCCCTGCT	CGTCTCGAC	AACTGCGAAC	ACCTCGTGGA	AGCCGTGCGG	GAGACCGCCG	CGACCCTGCT	CGCCACTGC	CCCGACTGT	3900		
	GCGTCTCGC	CGCCGGCAGA	CAGCCGTTGG	GGGTCAGCGG	CGAACGGCTG	CACCGGCTCA	CCGGTCTCGC	CCTGCCAAAG	GGGCCACGG	ACGCGCCGGG	4000		
	CTCGCCCGCG	GTGCGCCTCT	TCGCCGACCG	CGCCCTCGCC	GTCCGCCCCG	CGTTCACCCT	CGACGGGCGC	ACGGTGGACA	CGGTGGTCGC	GATCTGCCGC	4100		
	GCCCTCGACG	GGCTGCCGTT	GGCCCTCGAA	CTCGCCCGCG	CCCGGCTGCA	GTCGCTGTCC	GCCGAGCAGA	TACGCGACCG	GCTCGACGAC	CGGTTCCGGC	4200		
	TGCTGGGCGC	CGAGGGCCGG	CCGGCCGACG	GGCGGCGCGG	CACCCTGCGG	GCCGTGATGG	ACTGGACCTG	GGACTGCTG	GACGACGCCG	AGCGCACCTT	4300		
	CGCCCGGCGC	CTCGCCGTGT	TCGCGGGCCG	CGTCGACCTC	CCGCTCGTCG	AGCGGGTGTG	CGCGGGCGAC	GGACTCGACC	CCGCCGACCT	CGACATGCTG	4400		
	CTCGCCTCCC	TCGTGCGCAA	GTCCGTCTGT	CAGACGGAGG	AGACCGGCCG	GCGGGTCGGC	TACCGCATGC	CCGAGACCGT	ACGGCTCTAC	GCCGCCGAGC	4500		
	AACTCGCCGC	GGCAGGGGAC	GAGGCACCGC	TGCGCACGCG	CCACGCCCGG	ACCCTCCTCG	CGATCGCCGA	GACCGCCGAA	CCGGGGCTCC	GCCGCCACGG	4600		
	CCAGGCCGCC	GA	ACTCGCCC	GGTTGAGCGC	TCTGGTGGAC	GACTTCCACG	CCGCCCTGCG	CTGGT	CGCTC	GCTC	4700		
	CTCGTCGCCT	CGCTGGAGTG	GTTCTGGCTG	CTCGGCGGGC	GCCGCGCGGA	GGCCATGGAA	TGGACACGCC	GCGCACTCGA	CCTGCCGTGC	GACAGCCGGC	4800		
	CCCGGGACCG	GGCGATCGTC	TGCGCCGTCG	GGGACTTCA	GCACGGGGCA	CTGCTCGGCG	AGGAAGCAGG	CGTCGCCTAC	CTCTTCGAGG	CGCTGGCGCT	4900		
	GATCCAGGAG	CTCCCGGAAG	CCGACCACCC	GGTGCTCGTG	GCCG	CAGGCA	TCCTCGGCTC	ACTCGCCTCC	GGCTCCCCTG	AGCTCGTGAG	CGAACAACTG	5000	
	CGTGCGCTCG	GCGGCCACCG	CGACCCCTGG	ATCGCCTCCC	TCGCCCGGAT	GCTGGGGGCC	CGCATGCTCG	CCAACGCCGG	ACAGCCGCAC	GCGGCACGGG	5100		
	ACGAACTCCT	CGCCGCCCTC	GACGGGTTCC	GGACCCTCGG	CGAGCGCCTC	GGCCTGACCT	ACACGCTCTC	CGCGCTCGCC	GAGTCCGAGA	GCGCCCGGGG	5200		
	CGACCACGTG	GGCGGATCG	GCGCGCTGGA	GGAGGCGCTG	CGCGCCGTGA	CCGAACTGGG	CCACGCCGAG	GACCGGCCCA	TGCTCATGGT	GCGCCTGGCG	5300		
	GTCGAGCAGG	CCAGGTCGGG	CCGCCCCGAA	GCGGCGGAGG	CCGGACTGCT	GGACGCGGCG	GCCGAGGCGT	CCC	GTTGGG	CCTCGGCGAG	ACCC	5400	
	TCGCCACCA	CGCGCTCGGC	GACCTGCGCC	GTACGCAGGG	CCGGACGGCC	GAGGCACGCA	GGCTGCTCGA	CCGGGCCCTC	GCCGAGGTCA	TGGCACACGG	5500		
	CCCCGGCGTC	GGTATCGCC	CTGCAGTCTT	CACCAGCCAG	GGCCACCTCG	CCGTGCGCCGA	GAGCCGCTC	CCC	GCGGCG	TGGAGCCTG	CACGCGGGC	5600	
	CTGGACCTCG	CCCGG	CAGGT	CGACGAGGCA	CAACTGCTGG	CCCAGGTCCT	GGT	GCTGGCC	GCGGACATCG	CCCTCGCCA	GGCCGAACCC	AAGCACGCGG	5700
	CGGTCTCTCT	GACACCGCC	GCGGACGTCC	GCGGCCAGCC	GCTCGATGCC	GACCCGGACG	TCCACCGGGT	GGCGCGGGCG	ACCCGGCTGG	CCCTCGGGGA	5800		
Stopp	CGACCGGTAC	GGGGCCGCGC	GCCCCGTACG	CCCCGACGAG	ATCGAGGGCC	TGGT	CGCGGG	CCTCGCCGGC	CGGCTGGCGC	CACCGCAGGC	CGGGTGA	5900	

Stopp
pokGT2



Start
pokGT2

Stopp
pokABC2



GCGCGGCCGG	CCGTCCACGG	GGACAGCCGG	CCGCGCGGGT	CAGCGGCCCA	CAGGAGCCGC	CGCCAGCTCC	GCGAGCAACG	GCACCACGTC	GCTCGGCGCC	6000
CGCGCCGGCC	GGCAGGTGCC	CCTGTCGGCC	GGCGCGCCCA	<u>GT</u> CGCCGGGT	GTCCTCGGCG	GCGGTCGAGG	CGCTCGTTGC	CGTGGTGACG	CGAGCCGCGG	
GGGAGCCGCC	TGATCTCGTC	GGCCAGCGAC	TCGGCGGGCG	AGCGGTAACC	GGGAGCGGAG	AGCACCGACT	CCACCGTCGC	CCGCAGCCCC	GCCGAAGAGT	6100
CCCTCGGGCG	ACTAGAGCAG	CCGGTCTGCTG	AGCCGCCGCG	TCGCCATTGG	CCCTCGCCTC	TCGTGGCTGA	GGTGGCAGCG	GGCGTCGGGG	CGGCTTCTCA	
CCGCACTCAT	AGCCGCGTCG	AGGTCGAGGA	CCACGCCTGC	CCC GCGCGCC	GCGACGCGCT	CGCCGACCGC	CGCCACGAA	GGGTTGACT	GGGCGAGGAC	6200
GGCGTGAGTA	TCGGCGCAGC	TCCAGCTCCT	GGTGCAGGAC	GGGCGCGCGG	CGCTGCGCGA	GCGGCTGGCG	GCGGGTGCTT	CCCAAGCTGA	CCCCTCTCTG	
CAGCTGCGGC	ACCCGAAGG	CCAGACCGGT	CAGGGCCGTC	CCC GCGCCGC	CGTGATGCAG	CAGCGCGTCG	CAGTCACCGA	GGAACAGGTC	CAGCGGAACC	6300
GTCGACGCCG	TGGGGCTTCC	GGTCTGGCCA	GTCCCGGCAG	GGGCGCGCGG	GCACTACGTC	GTCGCGCAGC	GTCAGTGGCT	CCTTGTCAG	GTCGCCTTGG	
GCGCCC GGCG	CGTGACAGA	GGCGGGCAGA	CCGCGCCGCT	CGTGCGGGAC	CGCGGTGACG	ACCGACTCCA	TGTCCGCAC	GGCGGCGAGC	TCACGGATCA	6400
CGCGGGCCGC	GCACGTGTCT	CCGCCCGTCT	GGCCGGCGCA	GCACGCCCTG	GCGCCACTGC	TGGCTGAGGT	ACAGGGCGTG	CCGCCGCTCG	AGTGCCTAGT	
GCGCGTCCCA	GATCTCCGGC	CGCGTCAGCA	TCGGGGTCTC	GCCGCCGAAG	CTGACGCACA	GGCGCTGCC	CGCGTCCGGC	CGCGGCGCCC	AACGAGGCGG	6500
CGCGCAGGGT	CTAGAGGCCG	GCGCAGTCGT	AGCCCCAGAG	CGGCGGCTTC	GACTGCGTGT	CCGCGGACGG	GCGCAGGCCG	GCGCCGCGGG	TTGCTCCGCC	
TGAACCCGCC	CCGTTGAAGG	GCACGAAGCG	CACCGGCTGG	GCCGCCGAGG	CCTCCGGGCA	CTGCAGACTC	GGCGGGCACG	GGTCCAGCAC	CAGCGAGGGC	6600
ACTTGGGCGG	GGCAACTTCC	CGTGCTTCGC	GTGGCCGACC	CGGCGGCTCC	GGAGGCCCGT	GACGTCTGAG	CCGCCCGTGC	CCAGGTCGTG	GTCGCTCCCG	
AGCGCCGGAC	CCGAGTCCAC	ACCGCGCCGG	GCGGCCACCT	CGCCGAGCGC	CTCGACGGCC	CGCGAACGG	ACTGGGAGCT	GATCCGTCC	GGCCCCCAGC	6700
TCGCGGCCTG	GGCTCAGGTG	TGGCGCGGCC	CGCCGGTGGG	GCGGCTCGCG	GAGCTGCCGG	GCGCCTTGCC	TGACCTCGA	CTAGGCCAGG	CCGGGGTCCG	
GGTGCAGCAC	GGCCGGCACC	CGCAGGGCGG	CCGCCACGAT	CAGACCGCTG	AACTCGATCG	GATCCACCAG	CACCAGATCC	GGCCGCCACC	GGCGGGCGAC	6800
CCACGTCGTG	CCGGCCGTGG	GCGTCCC GCC	GGCGGTGCTA	GTCTGGCGAC	TTGAGCTAGC	CTAGGTGGTC	GTGGTCTAGG	CCGGCGGTGG	CCGCCCGCTG	
GTCCAGATGC	TCGTCGAGCA	CGCCGTCGAC	GCGCTGTCGC	CACCTCTCCT	GGAGCAGCGC	CCAGTCCGGA	CCGGCGCCGG	GCAGCCCTGA	GGGCGCCGCC	6900
CAGGTCTACG	AGCAGCTCGT	GCGGCAGCTG	CGCGACAGCG	GTGGAGAGGA	CCTCGTCGCG	GGTCAGGCCT	GGCCGCGGCC	CGTCGGGACT	CCCCGCGGCG	
GACCGCCGTA	CCGGCCGGCC	CGGTGGCTCG	CTCACCACGG	CGCCGACAG	ACCGGCCGCC	GCGGCGCGCT	CCACCACGGG	AGCGCCGCCG	GCGACCAGGA	7000
CTGGCGGCAT	GGCCGGCCCG	GCCACCGAGC	GAGTGGTGCC	GCGGGCTGTC	TGGCCGGCGG	CGCCGCGCGA	GGTGGTGCC	TCGCGCGCGC	CGCTGGTCTT	
CCTCGTGCCC	GGCCGACCGC	AGGGCCAGG	CGACCGGGAC	CATCGACATC	AGATGACTCG	GTACCAGGGC	GACGACCAGC	ACCCTCATCC	CTGAACCTCC	7100
GGAGCACGGG	CCGGCTGGCG	TCCC GGGTCC	GCTGGCCCTG	GTAGCTGTAG	TCTACTGAGC	CATGGTCCCG	CTGCTGGTCG	TGGGAGTAGG	GACTTGAGG	
TTACCGTTCA	CGGTGGTAGG	CGCGCAGGGC	CAGCGGGGCG	AAGACCACGA	GGAGGACCGC	CGCGGCGATC	AGCGTCTTCG	TCACGGGCTG	CCCCACCGGA	7200
<u>AAI</u> GGCAAGT	GCCACCATCC	GCGCGTCCCG	GTCGCCCCGC	TTCTGGTGCT	CCTCCTGGCG	GCGCCGCTAG	TCGCAGAAGC	AGTGCCCGAC	GGGGTGGCCT	
CGCCCGACCA	GGAGACCGCG	GATCGAATCG	GCCAGCATGG	TCACCGGGTT	GAGCTTGACG	ACCGCTGGA	GCCAGCCCGG	CATGGTCTCC	ACCCGCACGA	7300
GGCGGCTGGT	CCTCTGGCGC	CTAGCTTAGC	CGGTCGTACC	AGTGGCCCAA	CTCGAACTGC	TGGCGGACCT	CGGTCGGGCC	GTACCAGAGG	TGGGCGTGCT	
AGGCGTCACT	GATGAACGTC	AGCGGCAGCA	TGAGCCCGAA	GGCCAGGGCC	TGCACGCTCT	CCGGTCCCTT	GGAGAGCAGC	CCGGCCAGCA	CCGAGGCCCA	7400
TCCGCACTGA	CTACTTGACG	TCGCCGTCGT	ACTCGGGCTT	CCGGTCCCGG	ACGTGCGAGA	GGCCACAGAA	CCTCTCGTCG	GGCCGGTCTG	GGTCCGGGT	
GGACAGCGCG	AACGAGAACG	CCAGGAGCAG	CAGGAACATC	GGGATCAGCT	GACCCAGTTC	GGTCTCGATC	CGGAAACCCA	GCAGCATGCC	GAAGGCGAGC	7500
CCTGTGCGCG	TTGCTCTTGC	GGTCTCTGTC	GTCCTTGTAG	CCCTAGTCGA	CTGGGGTCAA	CCAGAGCTAG	GCCTTTGGGT	CGTCGTACGG	CTTCCGCTCG	
AGCAGACCA	CGGACCAGAC	CAGCATCAGC	TAGTCCGCCA	GGATCCTGCC	GATGAGCGGT	GCCGTACGCG	AGATCGGCAG	GCTGCGGAAG	CGGTCGAAGA	7600
TCGTGCTGGT	GCCTGGTCTG	GTCGTAGTGC	ATCAGGCGGT	CCTAGGACGG	CTACTCGCCA	CGGCATGCGC	TCTAGCCGTC	CGACGCCTTC	GCCAGCTTCT	

		GACCCTTGGT	GACATCGGTG	TTCATCCCGA	TGGCCGTGCG	CGCGGTGACC	AGGACGGTGC	TCTGCACGAT	CAGCCCCGGG	ACGACGAACT	GCAGATAGGC	7700
		CTGGGAACCA	CTGTAGCCAC	AAGTAGGGCT	ACCGGCACGC	GCGCCACTGG	TCCTGCCACG	AGACGTGCTA	GTCGGGGCCC	TGCTGCTTGA	CGTCTATCCG	
		CTCACGCGAG	CCGGCCATCT	GACCGGCGAG	CACGAAGGCG	AAGAGGAAGA	CGAAGATGAC	CGGCTGGATG	CCGACCTCCA	CCAGCGTCTC	CGGGCTGTGC	7800
		GAGTGCCTC	GGCCGGTAGA	CTGGCCGCTC	GTGCTTCCGC	TTCTCCTTCT	GCTTCTACTG	GCCGACCTAC	GGCTGGAGGT	GGTCGCAGAG	GCCCGACACG	
		TTGATCTGCA	CGAGCTGTCT	CCAGGCCACC	GTCGCGCTCT	GCCGCACGGC	GGATCCGGGC	CCGCGACGCC	GCACCTGCGG	CGCCTCCTCG	GTCGTGGTGA	7900
		AACTAGACGT	GCTCGACAGC	GGTCCGGTGG	CAGCGCGAGA	CGGCGTGCCG	CCTAGGCCCG	GGCGCTGCGG	CGTGGACGCC	GCGGAGGAGC	CAGCACCACT	
	Start	TGGCCGTCAT	ACCGCCGCTC	CCGTCACTGT	CAGCTGCTTG	AAGACCTCGT	CGAGGCTCGG	TTCCCGCACC	GAGAGTTCGG	CGACCTCGAT	CCC GGCGTCG	8000
	<i>pokABC2</i>	ACCGGCAGTA	TGGCGGCGAG	GGCAGTGACA	GTCGACGAAC	TTCTGGAGCA	GCTCCGAGCC	AAGGGCGTGG	CTCTCAAGCC	GCTGGAGCTA	GGGCCGAGC	
	Stopp	TCGAGCCGCC	GCACGATCGC	CGACATCGCC	GCCGTGTCCC	GCACCCGCGC	CTTGACCACC	CGGCCGTGCG	TCGTGTGCTC	GCCGATCACC	TCGGACACCA	8100
	<i>pokABC1</i>	AGCTCGGCGG	CGTGCTAGCG	GCTGTAGCGG	CGGCACAGGG	CGTGGGCGCG	GAAGTGGTGG	GCCGGCAGCG	AGCACACGAG	CGGCTAGTGG	AGCCTGTGGT	
		GCGCGGCCAC	CCGGTCCACC	TGCGCACCGT	CCGCGGGACG	CACCTGGAGA	GTGGGCTGCG	CGACCTCCCG	CTTGAGCGTC	TCAGGGGTTT	CTCGAGCCAC	8200
		CGCGCCGGTG	GGCCAGGTGG	ACGCGTGCCA	GGCGCCCTGC	GTGGACCTCT	CACCCGGACG	GCTGGAGGGC	GAAGTCCGAG	AGTCCCCAAG	GAGCTCGGTG	
		GACCGAGCCC	TGGTCGACGA	CCACGATGTC	GTCGGCGAGC	TGGTCGGCCT	CCTCCAGGTA	CTGGGTCGTC	AGCAGACCCG	TCACCCCGCG	CCGGACCTCG	8300
		CTGGCTCGGG	ACCAGCTGCT	GGTGCTACAG	CAGCCGCTCG	ACCAGCCGGA	GGAGGTCCAT	GACCCAGCAG	TCGTCTGTGG	AGTGGGGCGC	GGCCTGGAGC	
		CCGCGGATGA	TGTCCACAAC	TGGTTCGCGG	GCATTGGGGT	CCAGCCCCGT	GGTCGGCTCG	TCCAGGAAGA	TCACCCGCGG	CTCGCCACC	AGGCAGGCCG	8400
		GGCGCCTACT	ACAGGTGTTG	ACCAAGCGCC	CGTAACCCCA	GGTCGGGGCA	CCAGCCGAGC	AGTCCCTTCT	AGTGGGCGCC	GAGCGGGTGG	TCCGTCCGGC	
		CCAGGTCCAG	CCGCTGCGC	ATACCGCCGG	AGTACGTCTT	GGCGGTGCGG	TCCGCCCGCT	CGGACAGCCC	GAACCGTTCG	AGCAGGCTCA	GCGCCGTACC	8500
		GGTCCAGGTC	GGCGGACGCG	TATGGCGGCC	TCATGCAGAA	CCGCCACGCC	AGGCGGCGCA	GCCTGTGCGG	CTTGGAAGC	TCGTCCGAGT	CGCGCATGG	
		GCGCGCGTCG	GCACGGGACT	TGCCAGCAG	CCGGCCGAGG	AACAGCAGGT	TCTCGACGCC	GGTGAGGCTG	TCGTGACCCG	CCGCGAACTG	GCCGGTGAGG	8600
		CGCGCGCAGC	CGTGCCCTGA	ACGGGTCGTC	GGCCGGCTCC	TTGTCTGTTA	AGAGCTGCGG	CCACTCCGAC	AGCAGCTGGC	GGCGTTGAC	CGGCCACTCC	
		CCGATGATCT	CGCGGACCCG	GTCCGGGGAC	TTGGTCACTG	CGTGGCCGTG	GATGAAGGCC	TGTCCGGCAT	CGGGCCGTAG	AAGGGTGGCG	AGGATACGGA	8700
		GGCTACTAGA	GCGCCTGGGC	CAGGCCCTG	AACCACTGCA	GCACCGGCAC	CTACTTCCGG	ACAGGCCGTA	GCCCGGCATC	TTCCACC	TCCTATGCTT	
		CGACCGTGGT	CTTGCCCGCG	CCGTTGGGGC	CCAGCAGCCC	GAGCACGGTC	CCCGCTCGA	CATCGAGGTC	GACGGAGGTG	AGCGCGCCG	TCTCACCGAA	8800
		GCTGGCACCA	GAACGGGCGC	GGCAACCCCG	GGTCGTGCGG	CTCGTGCCAG	GGGCGGAGCT	GTAGCTCCAG	CTGCCTCCAC	TCGCGCCGGC	AGAGTGGCTT	
	Start	GCGTTTGGCC	AGACCACGGG	CCTGGATCGC	GGATGTCACA	GGATTCCCCT	TCTCTCTCCT	CCCGAACCCG	ACGTCCC	TCGGACGGGG	TCGCTTTGGA	8900
	<i>pokABC1</i>	CGAAACCCG	TCTGGTGCCC	GGACCTAGCG	CCTACAGTGT	CCTAAGGGGA	AGAGAGAGGA	GGGCTTGGCC	TGCAGGGCCG	AGCCTGCCCC	AGCGAAACCT	
		TGCTAGGAAC	AGGTA	ATGTCGCTGA	CACGGCGCTG	ATACGCATCC	GGGGCGAGTG	TGGGGGCCGG	TCCTGGATCG	GAGTTCCAGC	CCCGCTTGAG	9000
	Start	CCCGGCCGAC	GAAGCTGGCC	GGGACTTCAG	GCGCCGACCG	GGCGCCGCAT	GCTCCGGGCG	AGGTGAGGGC	GTATGCGCGT	GCTGTTACAG	ACCTGGGCGG	9100
	<i>pokGT1</i>	CACCGGGGCA	CTTGTTCCCG	ATGGTTCCGC	TGGCGTGGGC	CTTCCAGGCC	GCCGGGCACG	ACGTCCGGGT	CGCCGGCCCG	CCC GGCTGTC	GGGACGCCGT	9200
		GACCCGAGCC	GGGCTGTGCG	CGGTCGCCGT	CGGCGACCAG	GACGCGATCG	CCGACTGCC	CAAGCCGCC	GAAGTGGCCG	CCTGGGGCCG	CCCGGCCCGG	9300
		TGGCCACACG	GCTGGTCCGC	CCACCTCGAC	CTCCTGGACA	GCGGCGGGCG	CCGGGTGATC	CGCGCTCTGT	ACGAGAAGCA	GTGCGCGGTC	GCCGGGCTGA	9400
		TGCTGGACGA	TCTGGTCCGAC	TTCGGCCGCT	GGTGGCGGCC	GGACCTGGTC	GTCCACGACG	TGCTGGCCAT	GGCCGGGCCG	GTGCTGGCCG	CCGTGCTCGG	9500
		GGTCCCCGCG	GTCGGCCACG	GCTGGGAGAT	CGGCAGCACC	CTGCACCCGC	CGACCGGCGA	CACGGACAGC	GAGCCGCTGC	CCGCCTACCT	CGGCTGTTC	9600
		GAGCGGTTTCG	GCGCCGACGT	CACGGCGCCG	GCCGGCTGGG	TCGACCCGTG	CCCTCCGTCG	CTGCGGCCCC	CGGACGGAGC	GCCCGTGGCG	CGGCTGCCCA	9700

		TGCGCTGCGT	GCCGTACAAC	GGTTCGGGTC	CCCAGCCGGA	CTGGCTCGCG	CGGCCCGAGC	GCCCCCGCCG	GGTGTGCGTG	ACCGCCGGAG	TCGCGGGCGC	9800
		ACGCTATCGG	GACCCCGGCG	GCCCCGACGT	ACTCGCCCTG	ACGCTGGAGT	CGCTGGACTC	CGTCGACGCC	GAGATCGTGC	TGGCGCCGGG	CGGACCCGTC	9900
		GCGACGGACG	CCCTGCCCGG	GCATGTGCGC	GTCGCCCGGG	ACGTCCCCTT	CCGCACGCTG	CTGCCGACCT	GCGACCTGGT	GGTCCACCAC	GGCGGGGCGG	10000
		GCACCGCACT	CACCGCGGTC	GTCATGGGCG	TACCGCAGCT	CGTCGTGCCG	CCCTCCCCGA	TCTGTACGGA	GATCGGCCAC	GGCATCGCCC	GCTCCGGAGC	10100
		GGGCGTCATG	CTGGACCGGC	TCGACAGCAC	CGAACTGCTG	CTGAAGACGG	TCACCGAGAT	GCTGGCGGAC	CCCGTCCCT	GCCGGGAGGC	CGCCGGCCGG	10200
		GTGGCCTCGG	AGACGGCGGC	GCTGCCGTCC	CCGAGCGCCC	TGGCGGCCGG	ACTCGCGGCG	CTGA CCGC	GCCGGACGTG	AACGGCGTCG	TGACCGCGCC	10300
		GGAGCCGAAC	GGCGTTCTGA	CCGGGCCGCA	GTTGGGCGGT	GCCGCGTCCG	GACCGGGGCC	GAACGCCGTC	GTGGTCGGCG	GCAGCGGCTT	TTTGGGGCGG	10400
		CACGTCTGCG	CCGCGCTCAC	CGCGCACGGA	GCCCCGCTCC	TGTCGGTCCG	CCGGCGCCCC	GCGCCCCGTG	TGGCGTCCGC	GCGGATCGAC	CTCGTCGGCG	10500
		GACCTCCGGC	CGCCCTCGCC	GATCTCCTCG	TCGAACACGG	CGCGACCGTC	GTCGTGAACG	CCGCCGGCGC	GGTCTGGGAC	TACGACGGGC	GGGCCCTGGA	10600
		CGAAGCCAAC	GTGACGCTCG	TGGAGCGGCT	GCGCGACGCC	GTCGCCAAGG	TGCCCCACCG	GGTCCGCTG	GTGCAGCTCG	GCTCGGTCTT	CGAGTACGAG	10700
		ATGCCCGCGC	GGGGACGGCC	CCTGACGGAG	GAGGCGCCGA	CGGACCCGTC	GACCGCATA	GGCAGAAGCA	AACTGAGGGG	CAGTGAGATC	GTCCTCGACG	10800
		CCACCCGGGC	GGGCTGCTC	GACGGGGTCG	TGCTCCGCGC	GACGAGCTGT	GCGGGACCCG	GGCTGCCGCG	CTCCAGCTG	CTGGGCCGGG	TGGCCGCCCG	10900
		GCTGCGCGAC	GCGGCGGTGC	GGGGCGAGCC	GGCGGTGGTG	ACGCTCGCGC	CCCTGACCGC	CGAACGCGAC	TACGTGGACT	GCCGCGACCT	CGCCGCCGCC	11000
		GTGGCCGCCG	CCGCGACCCT	TCCCGTCGTC	GGACGGACGG	TCAACATCGG	CAGCGGCACG	GCCGTCGGAG	TGCGCCGGCT	GGTGGACCTG	CTCGTCGCCG	11100
		TGAGCGGAGT	GCCCCGCGAG	GTCGTGAGG	AGGGCAACGC	CACCGGGCGC	AGCGCCGGGA	TGACTGGCT	CGCCGTGGAC	GGCGGGCTCG	CCGCGCGACT	11200
		GCTCGGGTGG	CACCCGCGGC	ACAGCCTGGC	CTCGACGGTG	CGGGCGATGT	GGAGCGAGGT	CATCAACAA	GCCGAGGAAG	GGCCTGACTG	AGCCGATGGA	11300
		CATACGCAGC	GCACTGCTGG	AACTGACCCG	GAAATTCCAC	CAGGAGCAGA	CCGAGGACAG	CTTCGTCCC	GGACAGACGG	CGATCCTCAC	CTCGGGCGCG	11400
		GTGCTGGACG	AGGAGGACCG	GGTGCCTTC	GTCGAAGCGG	CCCTGGACAT	GACGATCGCC	GCCGGAGCGC	GGGCCCGGAC	CTTCGAGAGC	CGGTTGCGCC	11500
		GCGCGATGAA	GGCGCGCAAG	GCACATCTCA	CCAACTCCGG	TTCCTCGGCC	AACCTCCTCG	CGCTCAGCGC	CCTCACCTCG	CCGCAGCTGG	AGGATGCCCG	11600
		GCTGGTCCCC	GGCGACGAGG	TGATCACGGT	CGCGACGGGC	TTCCCCACGA	CCGTCAACCC	GGTGCTGCAG	AACGGCCTCG	TACCGTCTT	CGTCGACATC	11700
		GAACTCGGCA	CGTACAACAC	GACGCTGGAG	CGCGTCGAGG	AGGCCATCGG	GCCGCGGACC	CGCGCCATCA	TGGTCGCGCA	CGCGCTCGGC	AACCCCTTCC	11800
		CGGGCGCCGA	GATCGCCGAA	CTCGCCTCCC	GGCACGGCCT	GTTCTCTGTC	GAGGACAACT	GCGACGCCGT	CGGCTCGCTC	TACCAGGGCC	GGCTCACCGG	11900
		CACCTTCGGC	GACCTGTCCA	CCGTGAGCTT	CTATCCCGCC	CACCACCTCA	CGATGGGGGA	GGGCGGCTGC	GTAATGACCG	GGAATCTGGC	GCTCGCGCGG	12000
		ATCGTCGAGT	CGATGCGGGA	CTGGGGACGC	GACTGCTGGT	GCGAACCGGG	CGAGGACAAC	CGCTGCCTGC	GCCGTTTCCA	CTACAGTTC	GGCACGCTCC	12100
		CGCAGGGATA	CGACCACAAG	TACGTGTTCT	CGCACGTCGG	CTACAACCTC	AAGACGACGG	ACGTCCAGGC	GGCCCTCGGC	CTGAGCCAGC	TGCGCCGCTT	12200
		GGAGGAGTTC	GGCGCGGCAC	GGCGGCGCAA	CTGGCAGCGC	CTGCGCGACG	GGCTCCAGGA	CGTCCCCGGG	CTGCTGCTGC	CCGAGGCGAC	GCCCCGCGAGC	12300
		GATCCCAGCT	GGTTCGGCTT	CGTCTCAC	GTCCTGCCCG	ACGCCCCCTT	CACCCGCACC	GCCCTGGTGT	CCTTCTGGA	GGACCACAAG	ATCCGCACCC	12400
		GGAGGCTGTT	CGCGGGCAAC	CTCACCCGGC	ATCCCGCTTA	CGAGGGACGG	CATTCCGGG	TGGTGGGGGA	GCTGACCAAC	AGCGACGTCA	CCACCGAGGC	12500
		GACGTTCTGG	ATCGGCGTCT	ACCCCGGCAT	CACCCCGGAG	ATGGTGGACT	ACATGGTCGC	CTCGATACGC	GAGTTCGTGG	CGGCGGCGTC	CTGA CCGGC	12600
		GGCCTGACA	CAACGAGGAG	ACCTCGTGCC	TCTCCGTGTC	TCCTCGTCCG	CCCGCCCGTG	TCGCGGCCGG	GACCGTGTCA	TTCCTCGCCG	AGCGGTGCT	12700
		CCCGACTGT	GTTGCTCCTC	TGGAGCACGG	AGAGGCACAG	AGGAGCAGGC	GGGCGGGCAC	AGCGCCGGCC	CTGGCAC AGT	AAGGAGCGGC	TCGCGCACGA	12800
		TCGCCAGCC	GTCGGCGTTC	ACGTCCGGCT	GGAGCGCGGC	GTGCCCGGCC	ATGCAGTGCA	CGTCCCCTCA	CACCCGCTGA	ACCGGTGGG	ACAGGCCTG	12800
		AGCGGGTCGG	CAGCCGCAAG	TGCAGGCCGA	CCTCGCGCCG	CACGGGCCGG	TACGTACGCT	GCAGGGCGGT	GTGGGCGACT	TGGCCACCC	TGTCGGGAC	

Start
pokS6

Stopp
pokS6

Stopp
pokGT1

Start
pokS5

Stopp
pokS5

Stopp
pokU2

	GCCCCGGGCG CCGTCATCC GCATCAGCCC GTTCACGGAG TCGAGCAGCA GGTCCACCGC GGTTCGAGTAG TCACGCGTGA CCCGCAGCGT CAGGGCCGGG 12900
	CGGGGCCCGC GGCGAGTAGG CGTAGTCGGG CAAGTGCCTC AGCTCGTCGT CCAGGTGGCG CCAGCTCATC AGTGCCTACT GGGCGTCGCA GTCCCGGCC
	GTCGGCTCCG CCTCGTCGGC CTCGGCCGCC GCGTGGTCA CGATCAGCCG TGCCGCGTCG AGGGCGGCCG CGGCCGGGC CAGCGTCAGG CGCACGCCGG 13000
	CAGCCGAGGC GGAGCAGCCG GAGCCGGCGG CGCACCAGCT GCTAGTCGGC ACGGCGCAGC TCCCCGCCGGC GCCGGGCCCG GTCGCGATCC GCGTGCGGCC
	GCCGGGACCC GGTCCGGACG CCGTTGATCT CGACGCGGCT CGCGGTCCAT CGGGTCCATG CCCCCGAGAGC GCCCTCGACC GCACCGATGC CGGGGCCAC 13100
	CGGCCCTGGG CCAGGCCTGC GGCAACTAGA GCTGCGCCGA GCGCCAGGTA GCCCAGGTAC GGGGCTCTCG CGGGAGCTGG CGTGGCTACG GCCCCGGTG
	GAAGAACAGG CCGTTGATCA GCTTGAGCGG TACGCGGTGC AGGCGCGGAG CGGAGGGGGC CGGGTCGCCG GCGAGAACCG TACGGTGCTC GAAGCTGCGG 13200
	CTTCTTGTC GGCAACTAGT CGAACTCGCC ATGCGCCACG TCCGCGCCTC GCCTCCCCCG GCCCAGCGGC CGCTCTTGGC ATGCCACGAG CTTGACGCC
	TGCGCCGGCA CGAAGACGTC GTCGAGGACC AACTGTTGC TGCCCGTGCC GCGCAGCCCC ACATTGCGCC AGGTGTCCAG CACCCGGTAG TCACGGCGCG 13300
	ACGCGGCCGT GCTTCTGCAG CAGCTCCTGG TGTGACAACG ACGGGCACGG CGCGTCGGGG TGTAACGCGG TCCACAGGTC GTGGGCCATC AGTGCCGCGC
	GACGACGAA GTGCCGAGC GCGGGCGGAC CTTGCGGACC GCGGACCAGA CCGCCCACCA TCGTCCACTG CGCGTGTCC ACCCCGCTGG CGAAGTCCCA 13400
	CGTCGTGCTT CACGGCGTCG CGCCCGCCTG GAAGCCCTGG CGCCTGGTCT GGCGGGTGGT AGCAGGTGAC GCGCACCAGG TGGGGCGACC GCTTCAGGGT
	GGTGCCGCTC AGTCGCCAGC CGCCCGGCAC CGTGTGCACC GTGCCGACG GTGCCAGCGA TCCGGCGAGC GGTACGTCG GCCCGTCGCC CCACAGTTCC 13500
	CCACGGCGAG TCAGCGGTG GCGGGCCGTG GCACAGCTGG CACGGGCTGC CACGGTCGCT AGGCCGCTCG CCATGCAGGC CGGGCAGCGG GGTGTCAAGG
	GCCTGCCCT CCTCGGGCAG GTGCGAGCAC ATGCGGCCCA CGGCGGCGAG CACCCCGCGC CACCAGGCCG CCGACATGCA TCCGGCGCCC ACCACGGACA 13600
	CGACGGGGA GGAGCCCGTC CACGCTCGTG TACGCCGGGT GCCGCCGCTC GTGGGGCCGC GTGGTCCGGC GGCTGTACGT AGGCCCGGG TGGTGCCTGT
GCGCCCGCGC GAGGTCACGC ACCGCGCCCG GGGCGGCTGC CGAACCGCC CATCGCGGGC CCACCAGATG GCGCGGAAT CCGGCGCTCA CCAGGCCTC 13700	
CGCGGGCGCG CTCCAGTGCG TGCGCGGGC CCCGCCGACG GCTTGCGGGG GTAGCGCCG GGTGCTTAC CGCGCGCTTA GGCCGCGAGT GGTCCCGGAG	
GGCGACGGTG GCGGACAGCC GGTGTCGGA GTCCGCGGCC GCCGCGTGT CCGCGGCCAG CTCGGCCACC TTGCCCGCGG CCGCCGACAG ACCGGTGTCC 13800	
CCGCTGCCAC CGCCTGTCGG CCAGCAGCCT CAGGCGCCGG CGGCGCACGA GGCGCCGTC GAGCCGTTGG AACGGCGCC GCGGCTGTC TGCCACAGG	
GCCGGGGGAG CGGTGGGCGT CGCGTTCGTC ATGAGGGGTC CGCCTCTCTG TGGTGGGTCG GGGGCTGCAG GCCGTGGAAC GACCGCGCA AATACACCAG 13900	
CGGCCCTC GCCACCCGCA GCGCAAGC <u>AG TA</u> CTCCCCAG GCGGAGAGAC ACCACCCAGC CCCCAGCTC CGGCACCTTG CTGGCGCGCT TTATGTGGTC	
CGGAGCACCC GTGAACGACT CACAGCGGTG CACCAGACCG ACGAGGATCA CGTGGTCCC GGCATCGATC CGGCGTGA GCACGATTC GATGCGGGCC 14000	
GCCTCGTGG CACTTGCTGA GTGTCGCCAC GTGGTCTGGC TGCTCCTAGT GCACCAGGGG CCGTAGCTAG GCCCGCAGT CGTGCGTAAG CTACGCCCGG	
ACCACGCCCG CCAGCAGCGG CACTCCGCC AGGCCCGCGG AGACCGGCAG CCCTTCGTAC TTGTCGATGT CTTGGTGGC GAAGCGCTGC GCCAGGTGTG 14100	
TGGTGCGGCG GGTGTCGCC GTGAGGCGGG TCCGGGCGCC TCTGGCCGTC GGAAGCATG AACAGTACA GGAACCACCG CTTGCGACG CGTCCACAC	
CCTGGTCTC GCGCAGCAGA TGCACGGCCA TCACGCCGGC CGTCTGAAC GCCGGGCGGC AGTCGGCTCC CCGGTCCAGA CAGACCAGCA CCATCGGCGG 14200	
GGACCAGGAG CGCGTCGTCT ACGTGCCGGT AGTGCGGCCG GCAGAGCTTG CGGCCCGCCG TCAGCCGAGG GGCCAGGTCT GTCTGGTCTG GGTAGCCGCC	
GTCCATCGAC AGTGACGAGA AGGCCGTCG GGTGAAGCCG CGCGGCGCC GGGACTCGTC CACCGTGGTC ACCACGGCGA CCCCCTGGG CCACCGGAC 14300	
CAGGTAGCTG TCACTGCTCT TCCGGCAGCG CCACTTCGGC GCGCCGCGGG CCCTGAGCAG GTGGCACCAG TGGTGCCGT GGGGCGACCC GGTGGCCCTG	
AGCGAGTCG GCAGGAGGGT CCGGTCGACG CCGGTGGACG CGGTGGTCAT GGCAGACTTC CCGGACCCGG GCCGGCCGCC GCGCGCACGG CGTCCACCAG 14400	
TCGCTCAGCG CGTCTCCA GGCCAGCTGC GGCCACCTGC GCCACC <u>AGTA</u> CCGCTGAAG GGCCTGGGCC CGGCCGCGG CGCGCTGCC GCAGGTGGTC	
CTCGGCCTGC CGCACGGCCG CCGCGCGCTC CACCGCCGGA TCCGCGCGGC CTCGCACCAG ATCCGCGAAA CGGGCCGCGA TGTTGGCGAA CTGGTCGTG 14500	
GAGCCGGACG GCGTGCCGGC GCGCGCGAG GTGGCGGCT AGGCGCGCCG GAGCGTGGTC TAGGCGCTTT GCCCGCGCT ACAACCGCT GACCAGCAGC	

 Start <i>pokS4</i>	GCCGCGAGCG TCAGTCTCTC CACCCGGTCC TGCCGTTCTGA CGCGCAGGAC GGGACGGTGC TCCGGGGGAG GGGTGAAGGC GCGGTTCGAGG ACATCCGGC 14600
	CGGCGCTCGC AGTCGAGGAG GTGGGCCAGG ACGGCAAGCT GCGCGTCTTG CCCTGCCACG AGGCCCCCTC CCCACTTCCG CGCCAGCTCC TGCTAGGCCG
	CGGCACTGCC CCACAGGGTG TACGCCGACC GGTAGGCGTG GCGGAAGCCG AACGACACAT GGGAGGTGAC GCCGTGCGCC CCGCGCAGCA GTGCGTCGCC 14700
	GCCGACGTCC ACGCCCGTGG ACGCGTCGGC CGTCAGGGCC GCGCCGACCA CCGACACCGT CCCGCCGAGC AGGTGCTGGG TGACGCGCAG CGTGTAGACG 14800
	CGGCGTGCAGG TCGGGGCACC TGCAGCAGCC GCAGTCCCAG CGCGGCTGGT GGCTGTGGCA GGGCGGCTCG TCCACGACCC ACTGCGCGTC GCACATCTGC
	CCGGCGTCTGA GCAGGGCGCC GCCGCCGAGC TCGGGGCGGT GCCGGATGTC CTGGGCGGGC AGCGGCGGGA AGCCGAAGTC GGGGCTCACC TGGCGCAGTT 14900
	GGCCGCAGCT CGTCCCAGCG CGGCGGCTCG AGCCCCGCCA CGGCCTACAG GACCCGCCCG TCGCCGCCCT TCGGCTTGA G CCGGAGTGG ACCGCGTCAA
	CGCCGATCTC GCCGCGTTTC AGCAGCTCCG TGACGGTGGC GTGCTGGGAG TGGTGGAGGA ACATGAAGCT CTCCATCAGC ACGAGCCGTC CCTCTTCGGC 15000
	GCGGCTAGAG CGGCGCAAGC TCGTCGAGGC ACTGCCACCG CACGACCCCT ACCACTCTCT TGTACTTCGA GAGGTAGTCG TGCTCGGCAG GGAGAAGCCG
	GAGCCGGGCC AGGTGCGCGC CCTCCCCGGC GCAGGTGACC ATCGGCTTCT CGACCAGGAC GTGCTTGCCC GCCTTCAGCG CCCGCGCGGC CCAGGGGGCG 15100
	CTCGGCCCGG TCCAGCGCGC GGAGGGGCCG CGTCCACTGG TAGCCGAAGA GCTGGTCTCTG CACGAACGGG CGGAAGTCGC GGGCGCGCCG GGTCCCCCGC
	TGCAGCGCGG GCGGCAGCGG TAGGTACACC GCGGTGATGT CGTCGCGTTC CAGGAGTCGT TCGTATCCGT GCACGGGGTC CGCGTCGAAG CGGTTTCGCCG 15200
	ACGTCGCGCC CGCCGTCGCC ATCCATGTGG CGCCACTACA GCAGCGCAAG GTCCTCAGCA AGCATAGGCA CGTGCCCCAG GCGCAGCTTC GCCAAGCGGC
	CCGACGCGGC GCGGTCCCAG TCCCAGGCTCG CGATCGCGGT GACGCGGACC TCCGGGGTCC GCGCCATCGC GGGCAGCATG CCGCGCATGG CGATGCCGCC 15300
	GGCTGCGCCG CGCCAGGGCC AGGGCCGAGC GCTAGCGCCA CTGCGCCTGG AGGCCCCAGG CGCGGTAGCG CCCGTGCTAC GCCCGGTACC GCTACGGCGG
	GCATCCGAGG ACACCGACCG GCAGGGGTGC CGTCCGCCC GTCACCACAG ACTGTGCAGA CATGCGACGA GGCTGCGCGC CTGGACGTTG AGATAGTGAC 15400
	CGTAGGCTCC TGTGGCTGGC CGTCCCCACG GCAGGCGGGC CAGTGGTGTC TGACACGTCT GTACGCTGCT CCGACGCGCG GACCTGCAAC TCTATCACTG
	TGTGCCGCGC CAGCCCGGTC ACCTGATGGA CCGTCAACCA TCGGTATCCC TCCGGTTCTT CGACGGGGAA GCCGTCTCTG ACCTCGATCA CCGTGTAAACG 15500
	ACACGGCGTC GTCGGGCCAG TGGACTACCT GGCAGTTGGT AGCCATAGGG AGGCCAAGAA GCTGCCCTT CCGCAGGAGC TGGAGCTAGT GGCACATTGC
	GCACTCGGCG TGGTGAATC GGCCGCCCTC CTCGGAAGTC ACCGCGTCTGA AGCGCACCCG GTCGCGGGGG ACGCCGTCA CGTAGTCGAG GAACGCGGC 15600
CGTGAGCCGC ACCACCTTAG CCGGCGGGAG GAGCCTGACG TGGCGCAGCT TCGCGTGGGC CAGCGCCCC TGCGGCCAGT GCATCAGCTC CTTGCCGCCG	
CGGTGGTCTG CGGGCAGCCC CCGGTAGGTG TCCGGGGTGC ACTGCACGGT GGGGCCAGT TCGACGCGCT GCGGGAATCC CGCCTCGGGA CGGGCGTGGG 15700	
GCCACCAGCA GCCCGTCGGG GGCCATCCAC AGGCCCCACG TGACGTGCCA CCCCAGGTCA AGCTGCGGCA CGCCCTTAGG GCGGAGCCCT GCCCGCACCT	
ACAGCAGATG GGTCACGTCG CCGATGGTGC GCACCAGCAG TCGGACAGG CCCAGGCCGT GCGGGGCCAG TAGCGGCTGC GTCCAGTTGA GCACCTCGCG 15800	
TGTCGTCTAC CCAGTGCAGC GGCTACCACG CGTGGTCGTC ACGCCTGTCC GGGTCCGGCA CGCCCCGGT CCGCCCGGTC ATCGCCGACG CAGGTCAACT CGTGGAGCGC	
GCTGCCGGCC GTCACCCGGG CGCCGATGAT GGAGAAGTGC CGTCCCTCCG CATGGGTGAT CGCGTCCGCG GTGCGGTTCC AGCCCTCGAC GCGGTTCAAC 15900	
CGACGGCCCG CAGTGGGCC GCGGCTACTA CCTCTTACG GCAGGGAGGC GTACCGACTA GCGCAGGCGC CACGCCAAGG TCGGGAGCTG CGCCAAGTTG	
GGGATGCGTT CCGTGCAGC TTCGTGGCGG GCCGTGGTGT CGGCGAACCA GCTCAGCACC GACGGCGTGC TGTGCAGCGC CCCCTCTCC GGCGCCATGG 16000	
CCCTACGCAA GGCACGCGTC AAGCACCGCC CGGCACCACA GCCGCTTGGT CGAGTCTGTG CTGCCGACG ACACGTCGCG GGGGAGGAGG CCGCGGTACC	
AGCGGCGCAG GCCCGCGCGG AACTCGCCGT GCGGACCGGG CGGCGGCGCT CCCGTGGGCC GGGCGAACCG CACACAGGAC AGGACGGTCC TGGGTCAT 16100	
TCGCCGCGTC CGGGCGCGCC TTGAGCGGCA CGCCTGGCCC GCCGCCGCGA GGGCACCCGG CCCGCTTGCC GTGTGTCCTG TCCTGCCAGG ACCGAGGTA	
GTTACCATG TTGTCCAGGC GCAGGAGTTC CTGGATCTCG CCGATCGTCA TCCAGCGGTA GTCGTCGTGC GCGGGACGT CCTCGTCTG CTCCACCAG 16200	
CAAGTGGTAC AACAGGTCCG CGTCTCAAG GACCTAGAG GGCTAGCAGT AGGTCGCCAT CAGCAGCACG CCGCCCTGCA GGAGCCAGCA GAGGTGGTGC	

Stopp
pokS3



Stopp
pokM3

Start
pokS3

ATGTTGCGGT	TGCGCTTGCC	GAGGAACCAC	GAGCCCTGTT	CGGACTGGAG	GACGTCGACG	AGCACCCGTG	CCCGCCCGGG	ATCGGTGAAG	TACTCCAGGT	16300
TACAACGCCA	ACGCGAACCG	CTCCTTGTTG	CTCGGGACAA	GCCTGACCTC	CTGCAGCTGC	TCGTGGGCAC	GGGCGGGCCC	TAGCCACTTC	ATGAGGTCCA	
ACCTGACGCC	CGAACCTGG	TGCACCCGCT	TCTGTTGCT	CCGGGTCGCC	TGCACGGTCG	GTGACAGCTG	TACGACGTTG	ACGTTGCCGG	GCTCCATCTT	16400
TGGACTGCGG	GCTTGGGACC	ACGTGGGCGA	AGACCAACGA	GGCCAGCGG	ACGTGCCAGC	CACTGTCGAC	ATGCTGCAAC	TGCAACGGCC	CGAGGTAGAA	
GGCTGCATC	AGGCAGTGCA	GGACGCCGTC	GATCTCCTTG	ACCAGGAAGC	CGAGCATGCC	GATCTCGGGC	TGGTTGATGA	TCGGCTGGTC	CCAGCGGGGC	16500
CCGGACGTAG	TCCGTACAGT	CCTGCGGCAG	CTAGAGGAAC	TGGTCCTTCG	GCTCGTACGG	CTAGAGCCCG	ACCAACTACT	AGCCGACCAG	GGTCGCCCCG	
ACCTTCCCCT	GGTCGGTGTG	CACGCGATGG	CCCTCGACCG	TGAAGAACCG	GCCGCTGCGG	TGGCCGAGAT	CGCCGGTGTG	AGGCCGGAAG	GACCACTCCG	16600
TGAAGGGCA	CCAGCCACAC	GTGCGCTACC	GGGAGCTGGC	ACTTCTTGGC	CGGCGACGCC	ACCGGCTCTA	GCGGCCACAG	TCCGGCCTTC	CTGGTGAGGC	
CCAGCTCGGC	GAAGGGGACC	CGGGTGACCT	CGAAGGTGTG	GGCCTCCCTG	CGTGCGGTCA	GCCAGGCGAG	CGTGCCCTTG	ACCGACGCC	GGTCTCGGC	16700
GGTCGAGCCG	CTTCCCCTGG	GCCCACTGGA	GCTTCCACAC	CCGGAGGGAC	GCACGCCAGT	CGGTCCGCTC	GCACCCGAA	TGGCTGCGGG	CCAGGAGCCG	
CGCGGCTCCC	GACTCGGTGA	ACCGCGCCTG	CGGACCGGGT	CCGCCGGCTG	TGAGTGTGCG	CTCGGTGTCG	ATGGGGTAC	CTCGACCCTC	GTCCCGTCCA	16800
GCGCCGAGGG	CTGAGCCA	TGGCGCGGAC	GCCTGGCCCA	GGCGGCCGAC	ACTCACACGC	GAGCCACCAG	TAACCCAGTG	GAGCTGGGAG	CAGGGCAGGT	
GCAGACCCCG	CAGCGCCTTC	TTGTGCGGGT	TGCCGACGGG	TGTGTGCGGG	AGGTGCGGCA	GGATCTCCAG	GCGCTCGGGA	ATCTTGAACG	CGGCCAGCCC	16900
CGTCTGGGGC	GTGCGGAAG	AACAGCCCGA	ACGGCTGCC	ACACACGCC	TCCAGCCCGT	CCTAGAGGTC	CGCGAGCCCT	TAGAACTTGC	GCCGTCGGG	
TCGCCCCTC	AGCGCCCGG	ACACGTCTC	CAGGGTGAGC	GCGGACCCCT	CGTGGAGACG	GACGAACAGG	CAGACCCGCT	CGCCGACTTC	GGGGTCCGGC	17000
AGCGGGCGAG	TCGCGGCGGC	TGTGCAGGAG	GTCCCACTCG	CGCGCTGGGA	GCACCTCTGC	CTGCTTGTC	GTCTGGGCGA	GCGGCTGAAG	CCCCAGGCCG	
GCCGGGACCG	CGGCCACCTC	GGCGACCTCG	GGCATCTCCT	GCACCAGGGT	CTCTATCTCC	CCGGCCGCGA	TCTTCTCGCC	CCCGCGTTG	ATCAGTCTCT	17100
CGGCCCTGGC	GCCGGTGGAG	CCGCTGGAGC	CCGTAGAGGA	CGTGGTCCCA	GAGATAGAGG	GGCCGGCGCT	AGAAGAGCGG	GGGCGCCAAC	TAGTCCAGGA	
TGACCCGGCC	GCACACCACC	ACATGGCCCT	GCGCGGTGAT	CCGCACCAGG	TCACCCGTGC	GGTACCAGCC	GTCGGGCGTG	AACGACAGGG	CGTTCTGGTC	17200
ACTGGGCCGG	CGTGTGGTGG	TGTACCGGGA	CGCGCCACTA	GGCGTGGTCC	AGTGGGCACG	CCATGGTCCG	CAGCCCGCAC	TTGCTGTCCC	GCAAGACCAG	
GGGACGCGG	TAGTAGCCAC	GGGGCGTGTA	GGGGCCGCGG	GTGAGGAGTT	CGCCCGTCTC	GCCGGGCCGC	ACCGGACGGC	CGTCCGGGCC	GACGACCAGC	17300
CCCGTGCGGC	ATCATCGGTG	CCCCGCACAT	CCCCGGCGCC	CACTCCTCAA	GCGGGCAGAG	CGGCCCGGCG	TGGCTGCCG	GCAGGCCCGG	CTGCTGGTGC	
AGTTCGTCGT	ACGCGCTGAC	GGGGGCGCCC	TGCGTGCCGT	GGGCGACCTC	GTCCGTCGCG	TCGGGAGCCG	TGTAGCAGAT	GAGGCCCTCG	GCCATCCCGT	17400
TCAAGCAGCA	TGCGCGACTG	CCCCCGCGGG	ACGCACGGCA	CCCGCTGGAG	CAGGCAGCGC	AGCCCTCGGC	ACATCGTCTA	CTCCGGGAGC	CGGTAGGGCA	
ACACCTGCTG	GACCCGGCAG	CCCAGGGCGG	GCCCATCCG	GGCGGCGAGC	TCGGGTGAGA	GCACCGAACC	GCCCACGTGC	ACATGGCGCA	GACTCGACAG	17500
TGTGGACGAC	CTGGGCCGTC	GGGTCCCGCC	CGGGCTAGGC	CCGCCGCTCG	AGCCACTCT	CGTGGCTTGG	CGGGTGACAG	TGTACCGCT	CTGAGCTGTC	
GTCGCGTCCG	CAACCGGGCG	CGGCCTCCGT	CCACTTCAGG	GCCACCAGCG	GCACCGCCGA	GGTGGTCGTG	ACGCCCTCCC	GTTCGATGGC	GGCGAACACC	17600
CAGCGCAGGC	GTTGGCCCGC	GCCGGAGGCA	GGTGAAGTCC	CGGTGGCGCC	CGTGGCGGCT	CCACCAGCAC	TGCGGGAGGG	CAAGTACCG	CCGCTTGTGG	
GCGTCGGGCC	GCGGCGAGGA	CAGCAGCACG	ACGCGGCCGC	CGGCCGAGAG	GGTGCCGAGG	ATGCCCGGGC	TGGCGAGCGG	GTAGTTGTGG	CCGGCGGGCA	17700
CGCAGCCCGG	CGCCGCTCCT	GTCGTGCTGC	TGCGCCGGCG	GCCGGCTCTC	CCACGGCTCC	TACGGGCCCG	ACCGCTCGCC	CATCAACACC	GGCCGCCCGT	
GGACCGTCAG	GTAGACGGTC	TCCGCGGTGA	CGGCACACGC	GGCGGCGGAC	TGCCGGATGT	TGTA	CTCGTTGTGC	GTCCGGCTGA	TCACCTTCGG	17800
CCTGGCAGTC	CATCTGCCAG	AGGCGCCACT	GCCGTGTGCG	CCGCCGCTTG	ACGGCTACA	ACATGAGCAT	CAGCAACACG	CAGGCCGACT	AGTGAAGCC	
CAGGCCGGTG	GTGCCGCCGG	ACAGCAGGAA	CAGGGCCACC	TCCATGGCGT	CGGGGGCGGC	CTTGTCCAGC	CTCCCGCGCC	GCGCGCCCGT	GTCGCCGTCC	17900
GTCCGGCCAC	CACGGCGGCC	TGTCGTCTTT	GTCCCGTGG	AGGTACC	GCCCGGCCG	GAACAGGTCG	GAGGGCGCGG	CGCGCCGGCA	CAGCGGCAGG	

Start
pokM3

Stopp
pokM1

GGCCTCAGCA	GGGCGCGCAC	GTCGACGCCG	CCGGGCCGTA	CGTCGTCGCC	GACGACCAGC	ACCAAGGGCT	CGTCGGGCAG	CCGTTTCGGCG	ACCCGGTGGG	18000
CCGGAGTCGT	CCCgcgcgtg	CAGCTGCGGC	GGCCCCGCAT	GCAGCAGCGG	CTGCTGGTCG	TGGTTCCCGA	GCAGCCCCTC	GGCAAGCCCG	TGGGCCACCC	
CGAGGGCCTG	ATGGTCGTAG	CCCCGCCAGG	TGCCGGGCAC	GACGAGCGCC	TTGGCGCGCA	CATGGGCCCC	GATCGAGGCC	AGTTCGTA CT	CGCGGTGCGG	18100
GCTCCCGGAC	TACCAGCATC	GGGGCGGTCC	ACGGCCCCGTG	CTGCTCGCGG	AACCGCGCGT	GTACCCGGGG	CTAGCTCCGG	TCAAGCATGA	GCGCCACGCC	
CGGCAGCATC	ATCACCGGCG	CCACACCGAG	CCGGAACAG	GCCAGCGTCA	CGACGACGAA	CTCCAGCAG	TTCGGCAACT	GCACGAGAAC	CGTGTGCGCG	18200
GCCGTCGTAG	TAGTGGCCGC	GGTGTGGTCT	GGCCTTTGTC	CGTCTCGAGT	GCTGCTGCTT	GAGGGTCGTC	AAGCCGTTGA	CGTGTCTTTG	GCACAGCGGC	
TCGGCCAGCC	CTTGGCCCGC	GAGCCGCTCG	GCCAGGGCGT	CCGCCGAGGC	GGCCAGCTCC	GCGTAGCCGA	GCCGGACGTC	GCCGTCGACC	AGCGCGGTCC	18300
AGCCGGTCGG	GAACCGGGCG	CTCGGCGAGC	CGTCCCCGCA	GGCGGCTCCG	CCGGTCGAGG	CGCATCGGCT	CGGCCTGCAG	CGGCAGCTGG	TCGCGCCAGG	
GGTCGGCCCA	GGCGTCCGCC	CAGTCCCACA	TCAGTGCGCC	CAGCGGGCGG	CCGCGCCAGC	AGTCCGCCTC	GACGTAACGA	CGCGCCGCGT	CTGCGGGCCA	18400
CCAGCCGGGT	CCGcagggcg	GTCAGGGTGT	AGTCACGCGG	GTCGCCCCGC	GGCGCGGTCG	TCAGGCGGAG	CTGCATTGCT	GCGCGGCGCA	GACGCCCGGT	
GGGCACGAAC	CCTTCGCGTT	TCACCGTGCG	CTCCTCTCGT	CGGCCGGGTC	GGGATCGGGG	GTGTCGACGC	GCTGCGCGAG	CAGATCGGCG	ACCGCGTGGA	18500
CCCGTGCTTG	GGAAGCGCAA	AGTG GcAcGc	GAGGAGAGCA	GCCGGCCCCAG	CCCTAGCCCC	CACAGCTGCG	CGACGCGCTC	GTCTAGCCGC	TGGCGCACCT	
CGGTGGGGCG	GTCCcagaag	AGCGTCGCGG	GCAGCGGCAT	CCTGAACTGC	CTTTCGAGAC	CGCGCCGGAT	CCGCACGGTC	ATCACCGAGT	CGAGGCCCAT	18600
GCCACCCCGC	CAGGGTCTTC	TCGcagcgcc	CGTCGCCGTA	GGACTTGACG	GAAAGCTCTG	GCGCGGCCTA	GGCGTGCCAG	TAGTGGCTCA	GCTCCGGGTA	
CTCGGCCAGG	GCCCGGTGCG	GATCCACCTC	GGACGCCGAC	AGCCGGGTCT	CGGCCCGGAC	CTGTGCGGTC	ACCTCGGAGG	TGAGGAAGGT	GCGCAGCTCC	18700
GAGCCGGTCC	CGGGCCACGC	CTAGGTGGAG	CCTGCGGCTG	TCGGCCcAGA	GCCGGCGCTG	GACAGCCGAG	TGGAGCCTCC	ACTCCTTCCA	CGCGTCGAGG	
TCGCCCGCCA	GGCCGGCCCA	CGGGGcCTCG	GCCTCGTCGT	CCTCCTGGTC	GTGCGGCGCG	TCCGTGGGCA	CCTCGCCcAG	CAGCGGGAGC	CGCCGTTGAC	18800
AGCGGGCGGT	CCGGCCGGGT	GCCCCGgAGC	CGGAGCAGCA	GGAGGACCAG	CACGCCCGCG	AGGCACCCGT	GGAGCGGGTC	GTCGCCCTCG	GCGGCAACTG	
CGGGTTCCGG	CGGCAGCGTG	CGCAACACGG	CCGCGTAGCC	GAGGCCGTAG	CGGTCCGCCA	GCTCCcAGGA	GGCGAAGGCC	TCCAGGGCAC	TGATGTCGGC	18900
GCCCAAGGCC	GCCGTGCGAC	GCGTTGTGCC	GGCGCATCGG	CTCCGGCAtC	GCCAGGCGGT	CGAGGGTCTT	CCGCTTCCGG	AGGTCCCGTG	ACTACAGCCG	
GGTGCCGTGC	GCGGCCAGCT	CGGCGTCGAT	GACCTCGGAC	GAGGTcGACA	TGCCGAGCCC	CCGCCACGAC	GTCCAGCCGA	AGCTGACGGT	GCCGGTGTCC	19000
CCACGGCACG	CGCCGGTcGA	GCCCGAGCTA	CTGGAGCCTG	CTCCAGCTGT	ACGGCTCGGG	GGCGGTGCTG	CAGGTcGGCT	TCGACTGCCA	CGGCCACAGG	
CCGGCGGCC	CGCGGTGCGC	CGCCAGCGCG	TCCAGGAACG	CGTTGCCCGC	CGCGTAGCTG	GACTGCCCCG	GCAGGCCcAG	CAGTTGACCG	CAGGACGAGA	19100
GGCCGCGGG	GCGCCACGCG	GCGGTcGCGC	AGGTCCTTGC	GCAACGGGCG	GCGCATCGAC	CTGACGGGGC	CGTCCGGGTC	GTCAACTGGC	GTCCTGCTCT	
ACAGCACCAG	GAAGTCGAGA	CTGCCGGGCG	GGAACAGCTG	GTGCAGCACC	CAGGCACCCT	CGGCCTTCGG	CCGCAGCACC	GCCCCGAGCG	AGTCTCTGTC	19200
TGTCGTGGTC	CTTcAGCTCT	GACGGCCCCG	CCTTGTcGAC	CACGTcGTGG	GTCCGTGGGA	GCCGGAAGCC	GGCGTCGTGG	CGGGCGTCGC	TCAGGAGCAG	
GAGCGCGCGC	AGCGGCCGGT	CGTCCAGGAC	GCCGGCGGCG	TGCACGACGC	CTCGGACGGG	CGGCAGCCC	AGCGCGGTcG	GCGACAGGAG	CTTCTCCGCG	19300
CTCGCGCGCG	TCGCCGGCCA	GCAGGTcCTG	CGGCCGCGCG	ACGTGCTGCG	GAGCCTGCCC	GCCGTcGGGG	TCGCGCCAGC	CGCTGTcCTC	GAAGAGGCGC	
GCGTCCCGCT	CCGCGAGGTC	CAGCGCGACC	GTGACCACGG	TGCTGCCcAG	CCGCTCCAGG	GACCTGACCg	CTTCCACCCG	GCTCCGGACC	AGCGGATCGG	19400
CGCAGGCGCA	GCGGCTCCAG	GTCGCGCTGG	CACTGGTGCC	ACGACGGGTC	GGCGAGGTCC	CTGGACTGGC	GAAGGTGGGC	CGAGGCCTGG	TCGCCTAGCC	
TGACGTcGTC	CCACTCGTCC	CGTGGCGGCA	GCGACCGCCG	TCCGGTcAGC	ACGAGACGGC	GTGCGCCCCG	CTCGGCCAGC	CAGTGCcGGA	CCTCCAGCCC	19500
ACTGCAGCAG	GGTGAGCAGG	GCACCGCCGT	CGCTGGCGGC	AGGCCAGTCG	TGCTCTGCCG	CACCGGGGGC	GAGCCGGTCG	GTCACGCGCT	GGAGGTcGGG	
GAGGGCGCCG	AGTCCGCCGG	TGACCAGATA	CGTGCCGTCC	GGGCGGcAGG	TGGTCGCGGG	CCGACCcGGC	TCGCCGTCCA	GCAGGGCGAG	CCGAGCCACC	19600
CTCCCGCGGC	TCAGGCGGCC	ACTGGTCTAT	GCACGGCAGG	CCCcCGCTCC	ACCAGCGCCC	GGCCTGGCCG	AGCGGCAGGT	CGTCCCGCTC	GGCTCGGTGG	

TCGGGCTGTC	CCTCGGCAC	CGCCACGACG	TCCTCGCCGT	GCGTCGTGCC	GAGCAGGTCC	ACGAACCCCG	CGACGTCCCG	GGGCGAGGAC	CCGAGGTCCA	19700
AGCCCGACAG	GGAGCGCGTG	GCGGTGCTGC	AGGAGCGGCA	CGCAGCACGG	CTCGTCCAGG	TGCTTGGGGC	GCTGCAGGGC	CCCCTCCTG	GGCTCCAGGT	
CGATGCCGCC	CCACAGGTCC	GGATGCTCAC	CGGCGATGAC	CCGGCCAGC	CCCCACAGGG	GACCGTGGGC	GAGCGAGGCC	TCGGTGC	TCTCGGCAC	19800
GCTACGGCGG	GGTGTCCAGG	CCTACGAGTG	GCCGCTACTG	GGCCGGTCTG	GGGGTGTCCC	CTGGCACCCG	CTCGTCCGG	AGCCAGCGCG	AGAGCGCGTG	
TCCCTGCGTG	ACGCACCACA	GCCGGGGCGG	ACGCGGGGCC	GGGGCCAGCC	GCTGCGCCGT	CCGCGCGAGC	AGCCAGGACG	CCCGCAGGGA	CGCCCTGCCG	19900
AGGGACGCAC	TGCGTGGTGT	CGGCCCGCC	TGCGCCCCGG	CCCCGGTCTG	CGACGCGGCA	GGCGCGCTCG	TCGGTCTGCT	GGGCGTCCCT	GCGGGACGGC	
ACCGGTTCT	GAGGCCGTCC	CGGAGCCGGC	ACGACCACCA	CGGTGTGGTC	GTCGGAGAGT	TCACCCTCGC	GCAGCTCGTC	CGGGTCGGAC	GCGATCCGGT	20000
TGCCAAGGA	CTCCGGCAGG	GCCTCGGCCG	TGCTGGTGGT	GCCACACCAG	CAGCCTCTCA	AGTGGGAGCG	CGTCGAGCAG	GCCCAGCCTG	CGTAGGCCA	
GCGGCACCGC	CTCGGCGACC	AGCCGGCGGC	TCAACCGCTC	CACCAGGGAG	CGGTCGTGCG	CGACGAGCAC	CACCGTCCGA	TGCGCACCGG	GGTCTGCTG	20100
CGCCGTGGCG	GAGCCGCTGG	TCGGCCGCCG	AGTTGGCGAG	GTGGTCCCTC	GCCAGCAGCG	GCTGCTCGTG	GTGGCAGGCT	ACGCGTGGCC	CCAGGACGAC	
TTCCATGGGG	CGCCATCGCA	TGCGGTGGAC	GAGCCGGCGG	GGACCGGTGG	TGGTCCCAGC	GTCGCCCTCC	AGCAGTCCGT	ACCGCAGCCC	GTCGAGCCGG	20200
AAGGTACCCC	GCGGTAGCGT	ACGCCACCTG	CTCGGCCGCC	CCTGGCCACC	ACCAGGGCTG	CAGCGGGAGG	TCGTAGGCA	TGGCGTCGGG	CAGCTCGGCC	
CCCACCAGCG	TGCCCTGCGG	GCCCTCGATC	TCCACGTCTGA	CGACGTCCTC	GCCGGCCAGC	CGCACGTTGA	TGCGGGCGGT	GGCCGGGCAC	GCCCCTTCTGA	20300
GGGTGGTCTG	ACGGGACGCC	CGGGAGCTAG	AGGTGCAGCT	GCTGCAGGAG	CGGCCGGTCTG	GCGTGCCACT	ACGCCCGCCA	CCGGCCCGTG	CGGGGAAGCT	
GCGCGACCCG	TTTGATGTGC	GCGGGCATGC	GCAGCACCGG	CGGACCCGGG	AACACCACGG	ACGCGGTGGA	CAGCGCGGGC	TCCAGGACCG	AGGCCAGGT	20400
CGCGCTGGGC	AAACTACACG	CGCCCGTACG	CGTCTGGGCC	GCCTGGGCC	TTGTGGTGCC	TGCGCCACCT	GTCGCGCCG	AGGTCCTGGC	TCCGGGTCCA	
GGCCGGCGGC	TCCGAGGACT	TGGGGTCCGC	GGCGACCCGG	GCCACCAGGA	CGCCCTCGCC	GCCGCGCAGT	TCGGTATCT	CCCAGGCGAA	GCCATGGCG	20500
CCGGCCGCCG	AGGCTCCTGA	ACCCAGGGC	CCGCTGGGCC	CGGTGGTCTT	GCGGGAGCGG	CGGCGGTCA	AGCCTAGTA	GGGTCCGCTT	CGGGTACCCG	
GCGACGCCGA	GTTCCGCGAG	GCGGTCCACC	ACACGCCCGG	TGGGCAGTAC	GTCCGGTGGC	ACGACCGGGC	TCGCCTCGCC	GAGAGCGCCG	TGCGGCTCGA	20600
CGCTGCGGCT	CAAGGCGCTC	CGCCAGGTGG	TGTGCGGGCC	ACCCGTCATG	CAGGCCACGC	TGCTGGCCCG	AGCGGAGCGG	CTCTCGCGGC	ACGCCGAGCT	
CGCCGGCCGT	GGTGTGGGTG	ACCAGACCCC	TGTCGTGCGC	GGGTTCCCCG	ACGATGCGCG	AGGTGAGCCG	GAGCGTGGCG	TCCTGGCTGA	CGACTGGAC	20700
GCGGCCGGCA	CCACACCCAC	TGGTCTGGGG	ACAGCAGCGG	CCCAAGGGGC	TGCTACGCGC	TCCACTCGGC	CTCGCACCGC	AGGACCGACT	GCTGGACCTG	
CTCACGCGGC	TGGGACACCG	ACACGGGCAC	GCGCAGCGCC	ACATCGGTGA	GATCCGGCAG	GGTGCCTCC	GAGGCGGCGG	CGTTCAGGAA	GGTGTTCAGC	20800
GAGTGCGCCG	ACCCTGTGGC	TGTGCCCGTG	CGCGTCGCGG	TGTAGCCACT	CTAGGCCGTC	CCACGGAGGG	CTCCGCCGC	GCAAGTCCTT	CCACAAGTCG	
AGCACGGCGG	CCGGGATGAT	CTCCACCTCG	CGGACCGGAT	GGTCACCCGG	GTAGGGCCTG	CTGCCGCGGT	CGAGGTGGGT	CCGCCACGCC	TGCGCCGGGG	20900
TCGTGCCGCC	GGCCCTACTA	GAGGTGGAGC	GCCTGGCCTA	CCAGTGGGCC	CATCCCGGAC	GACGGCGCCA	GCTCCACCCA	GGCGGTGCGG	ACGCGGCCCC	
TCGTGCCCGC	GAACGTGGTC	CGTCCGCCGA	GCAGGGTGTG	CGTGCTGACG	TCGTGCCGGT	CGCCGGCGGC	GGAGCGCGGC	GGCGGCTCCT	CCAGCCAGTA	21000
AGCACGGGCG	CTTGACACAG	GCAGGCGGCT	CGTCCACAC	GCACGACTGC	AGCACGGCCA	GCGGCCGCCG	CCTCGCGCCG	CCGCCGAGGA	GGTCCGTCAT	
CGGCTTGCGC	TGCCAGGCGA	CGCACGGCAG	CTCGGCGGGG	GCGGTGCGCG	GCCAGGAACG	CGACCAGTCC	ACGTCGGCGC	CGTGGCAGTA	CAGCTGTCCG	21100
GCCGAACCGC	ACGGTCCGCT	GCGTGCCGTC	GAGCCGCCCC	CGCCAGCGGC	CGGTCTTGC	GCTGGTCAGG	TGCAGCCCG	GCACCGTCAT	GTCGACAGGC	
AGACCGGCCA	GCAGTGTCTC	GCGCTCGGGC	CGGCGGCGAC	GCAGCGAGTG	GGTGACGAAG	GCGTCTCTGA	CGCCAGGTG	GTCGAGCGTC	TGCCGACCG	21200
TCTGGCCGGT	CGTCACAGAG	CGCGAGCCCC	GCCGCCGCTG	CGTCGCTCAC	CCACTGCTTC	CGCAGGAGCT	GCGGGTCCAC	CAGCTCGCAG	AGCGGCTGGC	
AGTGCTCGAC	CACCGGATGC	GGCGACACCT	CCAGGAAGAG	CCGGTACCCG	TCCTCGACGG	CCGCCGCGAC	ACCCTGCGCG	AACCGCACCC	GGCCGCCGAG	21300
TCACGAGCTG	GTGGCCTACG	CCGCTGTGGA	GGTCCTTCTC	GGCCATGGGC	AGGAGCTGCC	GGCGGCGCTG	TGGGACGCGC	TTGGCGTGGG	CCGGCGGCTC	

GTTGGCGGCC	CAGTAGCCGC	CGTCGCGCGG	GGCGCCGCTG	CGGGGGTCTG	CCAGAGCCGT	GCTGTAGACG	GGAAGCGTGG	CGGGTGACGG	CACCAGGTCTG	21400
CAACCGCCGG	GTCATCGGCG	GCAGCGCGCC	CCGCGGCGAC	GCCCCAGCA	GGTCTCGGCA	CGACATCTGC	CCTTCGCACC	GCCCACTGCC	GTGGTCCAGC	
GCCGCCGCGG	CCGTCAGGTC	GTCGAGGAGC	GGGTCCATGT	GCGGGCTGTG	GAACGCCACG	TCCGAATCCA	CGGCCCGCAC	CGCGACCCCC	TCGGCGCGCC	21500
CGGCGGCGCC	GGCAGTCCAG	CAGCTCCTCG	CCCAGGTACA	CGCCCGACAC	CTTGCGGTGC	AGGCTTAGGT	GCCGGGCGTG	GCGCTGGGGG	AGCCGCGCGG	
ACCGCTCGGA	GATCTCCACG	ACCGCGGGGA	CGTCCCCGGA	GACGACGGTG	GAGCCGGGCG	ACGCGGTGAT	CGCCACGGTC	ACGTCCCGGC	GGCCGCCGAG	21600
TGGCGAGCCT	CTAGAGGTGC	TGGCGCCCCT	GCAGGGGCCT	CTGCTGCCAC	CTCGGCCCGC	TGCGCCACTA	GCGGTGCCAG	TGCAGGGCCG	CCGCGGGCTC	
ACGGCGTGCG	GCCTCCTCGG	CCGTCAGACC	CACCATGGCC	ATGGCTCCCC	GTCCGGCCAC	CCGGCGCAGC	AGCAGGGAGC	GTCGGCACAC	CAGCCGGGCG	21700
TGCCGCACGC	CGGAGGAGCC	GGCAGTCTGG	GTGGTACCGG	TACCGAGGGG	CAGGCCGGTG	GGCCCGCTCG	TCGTCCCTCG	CAGCCGTGTG	GTCGGCCCGC	
CCCTGCTCCC	GCGTGAGCAT	CCCGGCGGCC	ACCGCGGGCG	CGATCTCACC	GACCGAGTGG	CCGATGACCG	CGTCGGGGCG	CAGCCCGCGC	TCCCGCCACA	21800
GGGACGAGGG	CGCACTCGTA	GGGCCGCGCG	TGGCGCCGCC	GCTAGAGTGG	CTGGCTCACC	GGCTACTGGC	GCAGCCCCGC	GTCGGGCGCG	AGGGCGGTGT	
GTGCGCTCAG	CGCCGTCTGC	ACGGCGAAGA	TCAGCGGCTG	CACCACGTCG	ACGGGCTGCG	GGGCGTCGTC	CAGGAGGGCG	GCGGTGAGGG	AGACGCCCAT	21900
CACGCGAGTC	GCGGCAGACG	TGCCGTTTCT	AGTCGCCGAC	GTGGTGACAG	TGCCCGACGC	CCCGCAGCAG	GTCCTCCCGC	CGCCACTCCC	TCTGCGGGTA	
CTCCTCCAGG	AAGACGGGCT	CCAGTCTCTC	CACGACCCGC	GCGAACACCG	GTTCTCTGAC	GAGGAGTTCA	CGTCCCATGC	CGGTCCACTG	CGAGCCGTGC	22000
GAGGAGGTCC	TTCTGCCCGA	GGTCGAGGAG	GTGCTGGGCG	CGCTTGTGGC	CAAGGAGCTG	CTCCTCAAGT	GCAGGGTACG	GCCAGGTGAC	GCTCGGCACG	
CCGGAGAACA	CCCAGACCAG	ACCGCGCCCG	GCCGACGGCA	GCACCGCGCC	GGTGCCGACA	CCCGGCGCGC	CACCCGAGTT	CGTGAATCC	CTCAGCCGGG	22100
GGCCTCTTGT	GGGTCTGGTC	TGGCGCGGGC	CGGCTGCCGT	CGTGCGCGG	CCACGGCTGT	GGGCCGCGCG	GTGGGCTCAA	GCACTTGAGG	GAGTCGGCCC	
AGACGAGTTG	GTTGCCGTTT	GCGGCCACCA	CGGCGGCCCG	GTGGAGCAGA	TGCGTGCGCC	GCGTGGCCAG	TGTGTGGCCC	ACCTCCGCGA	GATCCGTGCG	22200
TCTGCTCAAC	CAACGGCAAG	CGCCGGTGGT	GCCGCCGGGC	CACCTCGTCT	ACGCACGCGG	CGCACCCGTC	ACACACCGGG	TGGAGGCGCT	CTAGCGACGG	
GGGGGTCTCG	TCGAGCCGGT	CGGCGAGCCT	GCCCCGCTAC	TCCCGCACCG	CGGCCTCGCT	CGCGCCCGAC	AGCGGATACA	CGGCGGGCTC	CGCGTCCCGC	22300
CCCCAGAGC	AGCTCGGCCA	GCCGCTCGGA	CGGGCGCATG	AGGGCGTGGC	GCCGGAGCGA	GCGCGGGCTG	TCGCCTATGT	GCCGCCCGAG	GCGCAGGGCG	
ACGGCGCGCG	GTCCCTCGTC	CAGGGCCTGC	GGACCCTCGG	GGTCCGGTGC	CTGCTCCAGG	ACGACGTGCG	CGATGGTGCC	GCCGTATCCG	TAGCCGAGGA	22400
TGCCGCGCGC	CAGGGAGCAG	GTCCCGGACG	CCTGGGAGCC	CCAGGCCACG	GACGAGGTCC	TGCTGCACGC	GCTACCACGG	CGGCATAGGC	ATCGGGCTCT	
CCCCGGCCCG	CCGCGGACCG	TCGGACGCGG	GCCAGGGCGT	CGGCTCGGTG	ACCACCCGAA	GGCCCGAAGT	CGCCACGGG	ACGGCGGGGT	TGGGCTCGGT	22500
GGGGCCGGGC	GCGCCTGGC	AGCCTGCGCC	CGGTCCCPCA	GCCGAGCCAC	TGGTGGGCTT	CCGGGCTTCA	GCGGGTGCCC	TGCCGCCCCA	ACCCGAGCCA	
GAAGTTCAGA	CTGGGCGGGA	TCTCGGCGTG	CTGGAGAGCG	AGGACCGTCT	TGATCACACC	GGCGATGCC	GCGCCCGCCT	CCAGATGCC	GATGTTGGGT	22600
CTTCAAGTCT	GACCCGCCCT	AGAGCCGCAC	GACCTCTCGC	TCCTGGCAGA	ACTAGTGTGG	CCGCTACGGG	CGCGGGCGGA	GGTCTACGGG	CTACAACCCA	
TTGACGGACC	CGATCAGACA	CGGCCGGTCC	TGCGGCCGGT	TCACGCCGAA	GACCGAGGCC	ATCGCCCCGG	CCTCCAGCGG	ATCGCCCCGG	CGGGTACCCG	22700
AACTGCCTGG	GCTAGTCTGT	GCCGGCCAGG	ACGCCGGCCA	AGTGCGGCTT	CTGGCTCCGG	TAGCGGGGCC	GGAGGTGCGC	TAGCGGGCGC	GCCCATGGGC	
TCCCGTGCGC	CTCGACGTAG	CCGACGGTGA	CCGGGTCGAG	CCCCGCGTGC	TCGTACGTCC	GGCGCATGAG	ATGGGCCTGC	GCCTCGCCGT	TGGGCGCCAT	22800
AGGGCACGCG	GAGCTGCATC	GGCTGCCACT	GGCCAGCTC	GGGGCGCACG	AGCATGCAGG	CCGCTACTC	TACCCGACG	CGGAGCGGCA	ACCCGCGGTA	
GATGCCGCTG	GTCCTGCCGT	CCTGGTGGAC	CGCGCTGCCC	CGGATCAGGG	CGAGGACGCG	GTCCCGTCTG	CGCCGGGCGT	CCGACAGCCG	CTTGAGGACG	22900
CTACGGCGAC	CAGGACGGCA	GGACCACCTG	GCGCGACGGG	GCCTAGTCCC	GCTCCTGCGC	CAGGGGCGAG	GCGGCCCGCA	GGCTGTCGGC	GAACTCCTGC	
ACGACCCCGC	CGCCCTCACC	GCGGCCGTAG	CCGTCGCCGT	TCGCGTCGAA	GGACTTGACG	CGCCCGTCTG	GTGCCGTGCG	GCCCGCCGCG	TCCAGACCA	23000
TGCTGGGGCG	GCGGGAGTGG	CGCCGGCATC	GGCAGCGGCA	AGCGCAGCTT	CCTGAACGTC	GCGGGCAGCC	CACGGCAGCG	CGGGCGGCGC	AGGTCGTGGT	

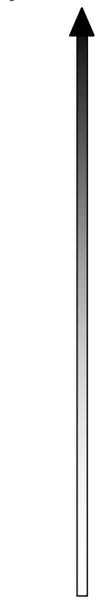
	GCGACAGACC	GGGTGACGCC	ATCACGAGCA	CACCGCCC	CAGCGCCACC	GGGCACTCGC	CGGCCCGCAG	GCTCTGCACC	GCCATGTGGA	CGGACACCAG	23100
	CGCTGTCTGG	CCCACTGCGG	TAGTGCTCGT	GTGGCGGGCG	GTCGCGGTGG	CCCGTGAGCG	GCCGGGCGTC	CGAGACGTGG	CGGTACACCT	GCCTGTGGTC	
	CGACGACGAG	CACGCCGTGT	CGACGGCGAC	GCTGGGCCCG	CGCAGGTCCA	GCGTGTACGA	GACCCGGTTG	GCGACCCCGC	AATAGGCGCC	GCCGATGCCG	23200
	GCTGCTGCTC	GTGCGGCACA	GCTGCCGCTG	CGACCCGGGC	GCGTCCAGGT	CGCACATGCT	CTGGGCCAAC	CGCTGGGGCG	TTATCCGCGG	CGGCTACGGC	
	GTCCACGCCT	CGATACGAGG	CAGGTCCTCC	AGCATCCGGC	GCCCCTAGTC	GTCCGAACCG	ACGCCCATGA	ACACACCGGC	GTCGCTGCCC	GCGAGATCCC	23300
	CAGGTGCGGA	GCTATGCTCC	GTCCAGGAGG	TCGTAGGCCG	CGGGCATCAG	CAGGCTTGGC	TGCGGGTACT	TGTGTGGCCG	CAGCGACGGG	CGCTCTAGGG	
	GCGGCGGGAT	GCCCCGCTGC	TCCAGCGCCT	CCCAGGCCAG	CTCCAGGACG	ATCCGCTGCT	GCGGGTCCAT	CAGCGCGGCC	TCGCGCGGGG	TGACATCGAA	23400
	CGCCGCCCTA	CGGGCGCACG	AGGTCGCGGA	GGGTCCGGTC	GAGGTCCTGC	TAGGCGACGA	CGCCCAGGTA	GTCGCGCCGG	AGCGCGCCCC	ACTGTAGCTT	
	GAAGTCGGCG	TCGAATCCCT	TGATGTCGTC	GAGGAACGCA	CCGTAGCGCG	TCACGCCGTC	CAGGGCCGCC	GCGTTCTCCC	GGTCGAGCGT	TCCGTACCAC	23500
	CTTCAGCCGC	AGCTTAGGGA	ACTACAGCAG	CTCCTTGCGT	GGCATCGCGC	AGTGCGGCAG	GTCCCGGCGG	CGCAAGAGGG	CCAGCTCGCA	AGGCATGGTG	
	TCCCAGCGGC	CCTCGGGTAC	TTCGCCGATC	GCGTCCCGCC	CCTCGACGAG	CAGCGACCAG	AACTCCTTCG	GCGAATCGAT	CCCTCCGGCG	AACCGGCACG	23600
	AGGGTCGCCG	GGAGCCCATG	AAGCGGCTAG	CGCAGGGCGG	GGAGCTGCTC	GTCGCTGGTC	TTGAGGAAGC	CGCTTAGCTA	GGGAGGCCGC	TTGGCCGTGC	
	CCATGCCCCAC	CACGGCGACG	GGTTCGGGCG	CCGTATCAC	CGCGTCCACG	ACGGCACCTC	GGTGATCTCG	AACATCGCTC	CCGCCACCGT	CATACCGGGC	23700
	GGTACGGGTG	GTGCCGCTGC	CCAAGCCCGC	GGCAGT AGTG	GCGCAGGTGC	TGCCGTGGAG	CCACTAGAGC	TTGTAGCGAG	GGCGGTGGCA	GTATGGCCCC	
	CCGAGCCCGT	ACATCAGGTA	GTGGTCGCC	GGCTTACGCC	TGCCGTGCGA	CAGCAGCCGG	TGAGCGCGA	CGAGCTGGTC	GCTGACGCCG	AGATGCCCGA	23800
	GGCTCGGGCA	TGTAGTCCAT	CACCAGCGGG	CCGAAGTCGG	ACGGCAGCGT	GTCGTGCGCC	AGCTCGCGCT	GCTCGACCAG	CGACTGCGGC	TCTACGGGCT	
	TGTGCGCGCC	CACCTCCCAG	GTGGTGCCT	CCGCGGGCAG	CCCCAGCAGG	GGAAGCAGCC	GCTTCTCGAT	CGTGGTGC	GAGGTGTTCA	TGTAGCTGAG	23900
	ACAGCGCGGG	GTGGAGGGTC	CACCACGCGA	GGCGCCCGTC	GGGGTCTGCC	CCTTCGTGCG	CGAAGAGCTA	GCACCACGCG	CTCCACAAGT	ACATCGACTC	
	GAAGGTGACG	TCCTCGACAC	CGAGGCCGGT	CGCCGCCGTC	CACCGGTCGT	ACAGGTCCTG	GTGGGCCTTC	ATCAGGAGCG	GCCGCATCTG	CTCCCCCTCG	24000
	CTTCCACTGC	AGGAGCTGTG	GCTCCGGCCA	GCGGCGGCAG	GTGGCCAGCA	TGTCCAGGAC	CACCCGGAAG	TAGTCTCGC	CGGCGTAGAC	GAGGGGGAGC	
	TACTTGAGGA	AGTGCTGGTT	GCGTTCGGAG	AAATCGAGCC	GCCGCCCGAT	CGTGGCACCC	GGCGGGAACA	TCGGCTCTCC	GCTGCGGTGC	ATCGCCTCCA	24100
	ATGAACTCCT	TCACGACCAA	CGCAAGCCTC	TTTAGCTCGG	CGGCGGGCTA	GCACCGTGGG	CCGCCCTTGT	AGCCGAGAGG	CGACGCCACG	TAGCGGAGGT	
	GTTGCGGGTAC	GGCGACGCAG	TCGACCCACA	GCAGCTTGGC	GAAGCCGGGT	TCCTTGCCGA	GCAGCAGCGC	GCTCGCGCCG	TCGCCGACCA	GCATGCCGCC	24200
	CAAGCCCATG	CCGCTGCGTC	AGCTGGGTGT	CGTGAACCG	CTTCGGCCCA	AGGAACGGCT	CGTCTGCGCG	CGAGCGCGGC	AGCGGCTGGT	CGTACGGCGG	
	GCCGGTGGCC	CGCCAGCGGT	CGATCAGCGG	GGTGCCGAAG	TTCTCCGCGC	CGAGCAGCAG	CGCGTCCGAC	GACTGCGGAT	TGCCGCGCAG	GAAGCCGGCG	24300
	CGGCCACCGG	GCGGTCGCCA	GCTAGTCGCC	CCACGGCTTC	AAGAGGCGCG	GCTCGTCGTC	GCGCAGGCTG	CTGACGCCTA	ACGGCGCGTC	CTTCGGCCGC	
	GCGAGCTGCA	GACCGCTGAA	CACCCCGGTG	CAGCCGTGCC	GCAGCTCGAC	CGCGAGTGCC	TCGCCCCCGA	GGTGGGCTG	CACATACGAC	TGCGGGCCCC	24400
	CGCTCGACGT	CTGGCGACTT	GTGGGGCCAC	GTCGGCACGG	CGTCGAGCTG	GCGCTCACGG	AGCGGGGGCT	CCACCGCGAC	GTGTATGCTG	ACGCCCGGGG	
	AGCCGTCCGG	GCCCTGGTGC	CACACGCTCG	CGTACAGGAT	CAGATCGACG	ACCGACGGGT	CGGCTCCGAC	CCGTTTGAAC	AGCTGGCGGG	CCGCGCGCAC	24500
	TCGGCAGGCC	CGGGACCACG	GTGTGCGAGC	GCATGTCTTA	GTCTAGCTGC	TGGCTGCCCA	GCCGAGGCTG	GGCAAGCTTG	TCGACCGCCC	GGCGCGCGTG	
	CGCGAGCTCC	GGGGCGGGCA	CGTCACCGGC	GACCCGCACG	CCCGTCAGCT	CGCCGTCGGC	GACGTCCTCG	GCATCCAGGC	GGCCCTCGGC	CACCGCTGTC	24600
	GCGCTCGAGG	CCCCGCCCGT	GCAGTGGCCG	CTGGGCGTGC	GGGCAGTCGA	GCGGCAGCCG	CTGCAGGAGC	CGTAGGTCG	CCGGGAGCCG	GTGGCGGACG	
	GCGGTGCTCA	CGGGCTCCGG	CAGATGCACC	CCGAGGGACC	TCACGTACAG	GTCTTGTCTT	TGCACTGAAC	TCTCCTTCTC	CTGTGGGCC	GGGGGCTGCC	24700
	CGCCACGAGT	GCCCCAGGCC	GTCTACGTGG	GGCTCCCTGG	AGTGCATGTC	CAGAACAGGA	AC GTG ACTTG	AGAGGAAGAG	GACACCCGGG	CCCCCGACGG	

Start
pokM1

Stopp
pokM2

Start
pokM2

Stopp
pokMT1



Start
pokMT1

Start
pokP1



GCCGGCCCCG	ACGAGGCGCC	TACTTGTGGC	CGACGACCAG	GGAGTGGCTG	AACCCGAGGC	CGTCGTAGCG	CTCGACGCGG	GAGAAGCCGG	CGTCGCGAAT	24800
CGGCCGGGCC	TGCTCCGCGG	<u>AT</u> GAACACCG	GCTGCTGGTC	CCTCACCGAC	TTGGGCTCCG	GCAGCATCGC	GAGCTGCGCC	CTCTTCGGCC	GCAGCGCTTA	
GGCCTTGTCC	ATGTCCTTCG	GGGCGTACGT	CATGCCCTCT	CCGGAGGCGA	GGGTGAGGAA	GTAGGGCGAG	ACCAGCCC GC	CGCTCATCGA	GCCGTGCCCC	24900
CCGGAACAGG	TACAGGAAGC	CCC GCATGCA	GTACGGGAGA	GGCCTCCGCT	CCC ACTCCTT	CATCCC GCTC	TGGTCGGGGC	GCGAGTAGCT	CGGCCACGGG	
TCGTCGTTCC	AGACGAAGTT	GTAGACCAGG	CAGACACCGC	CGGGCGGCAG	GGCCTCGTAG	CAC TTGCGCA	GCAGCTCGGT	GTTCCGCTCC	AGCGACCAGA	25000
AGCAGCAAGC	TCTGCTTCAA	CATCTGGTCC	GTCTGTGGCG	GCCCCCGTTC	CCGGAGCATC	GTGAACGCGT	CGTCGAGCCA	CAAGGCGAGG	TCGCTGGTCT	
TCTCGAAGAT	GTGGAAGAAC	ATGATCCCCT	CGGCGCCCTC	GGGCAGCGCG	TCGGTGAACA	GGTCGCCCGG	GTGGAAGTGC	ACCCGCTTGC	TCAGCTCGGC	25100
AGAGCTTCTA	CACCTTCTTG	TACTAGGGCA	GCCGCGGGAG	CCCCTCGCGC	AGCCACTTGT	CCAGCGGGCC	CACCTTCACG	TGGGCGAACG	AGTCGAGCCG	
GTCCTCGGTC	CGCTGCGCCG	CGATGCGGGT	GACGCTCTCC	TGGTCTGAAGA	CCGTACCTTC	CAGGTGCGGG	TAGCGGCGGG	CCAGTTCGAT	GCTGTTGGTG	25200
CAGGAGCCAG	GCGACGCGGC	GCTACGCCCA	CTGCGAGAGG	ACCAGCTTCT	GGCAGTGGAG	GTCCACGCCC	ATCGCCGCCC	GGTCAAGCTA	CGACAACCAC	
CCGTCGCCCC	CGCCGATGTC	GATGACATGG	TGCAGCCC GG	AGAAGTCGTA	CCGGTCGAGG	ATCTGCGCGA	ACGCCTTCTT	CGACGCGTCG	CCCATGTTCC	25300
GGCAGCGGCG	GCGGCTACAG	CTACTGTACC	ACGTGCGGGC	TCTTCAGCAT	GGCCAGCTCC	TAGACGCGCT	TGCGGAAGAA	GCTGCGCAGC	GGGTACAAGG	
GGTAGAACAC	CTCCTGCAAC	TCGGGGTGGC	CCGTGAGCCG	TTCGTACAGC	GTGTCGCCCG	GACCCTCGAT	GTGGCGCAGG	CCCACGTTGG	TGTTCTGCCG	25400
CCATCTTGTG	GAGGACGTTG	AGCCCCACGC	GGCACTCGGC	AAGCATGTCT	CACAGCGGCC	CTGGGAGCTA	CACCCGCTCC	GGGTGCAACC	ACAAGACGGC	
CATCGACTCG	GCGAAGTCGC	CGAGGGAGCG	GTTGATGATG	TCGGCCTGGA	TGTCCACCAG	CGGGCCCAGG	AAGCGCGGGC	TGCACCTGAG	CAGCTTGCGC	25500
GTAGCTGAGC	CGCTTCAGCG	GCTCCCTCGC	CAACTACTAC	AGCCGGACCT	ACAGGTGGTC	GCCCCGGTCC	TTCGCGCCCC	AGCTGGACTC	GTCGAACCGG	
CGCACCATCT	CGCTGTTGAC	GTA CTTGTTG	TCCTTCTTCT	CCAGAAGCCG	CAGCGAGGCG	AGCCCGAGGA	GCAGGATGCG	GGCGGGCTGG	GCCTCGGTGC	25600
GCGTGGTAGA	GCGACA A CTG	CATGAACAAC	AGGAAGAAGA	GGTCTTCGGC	GTCGCTCCGC	TCGGGCTCCT	CGTCCTACGC	CCGCCGACC	CGGAGCCACG	
CGATCGCCTC	CGCGACCTCC	TCGACATCCA	TGCCCTCGGC	CGCCTCCAGG	CGCTCGAAGA	GGTCGAACTC	AAGCCCCGTG	CGCAGCAGTT	CGAACCGGGT	25700
GCTAGCGGAG	GCGCTGGAGG	AGCTGTAGGT	ACGGGAGCCG	GCGGAGGTCC	GCGAGCTTCT	CCAGCTTGAG	TTCGGGGCAC	GCGTCGTCAA	GCTTGCGCCA	
CGTGCCGTGA	ATGAGGATCC	GCAGGTAGTC	CGCTTCGCTG	ACGGTGATGG	TGCCGCTGGC	CATGGACGTC	CCTTCCGATG	TGGGGAAGGC	GAGCGGGCGC	25800
GCACGGCACT	TACTCTAGG	CGTCCATCAG	GCGAAGCGAC	TGCCACTACC	ACGGCGACCG	<u>GTA</u> CTGCAG	GGAAGGCTAC	ACCCCTTCCG	CTCGCCCGC	
TCGCGGGCAC	ACCGTCGCAA	GGGCCTCTAG	CGCGCGCCTC	GACGCCCCGCT	CGAATCGAAC	CGGCGGCTGT	CCTTCAACTT	GCGTTCGAGG	TCGCCTCAAG	25900
CGGTGCCCCG	AATGCTTCGG	GACGCGGCAT	TGCAGGCTGG	ATCCACTTCA	GATATCGGGG	GATGAGACAG	<u>CATG</u> GCCCGA	GACGTAGTGA	TAACGGGTGT	26000
CGGCGTCGTC	GCTCCAGGAG	GCATCGGCAG	CAAACCGTTC	TGGGACCTGC	TCGTCTCCGG	CCGCACCGCG	ACCCGCACCA	TCACCCACTT	CGACGCCTCG	26100
CCCTTTCGGT	CGACCGTGGC	CGCCGAGTGC	GACTTTCGACG	CGCAGGCCGA	AGGGCTCACG	GCCGAGGAGG	CCGACCGGCT	GGACCGGGCC	ACCCAGTTCG	26200
CGCTGGTCCG	CGCCCGCGAA	GCACTGGAGG	ACAGCGGCCT	CGCCGGCGAC	GGGCCGGACC	CGTGCCGCAC	GGGCGTCACG	CTCGGCAGCG	CGGTGCGCTG	26300
CACCACGAGC	CTGGAACGCG	AGTACGTCGT	CACCAGTCAC	GGCGGCCGCG	ACTGGCTCGT	CGACCCGGAC	CTCGCGGTCC	CGCACCTCTA	CGACTACTTC	26400
GTCCCCAGCT	CCATGGCCGC	CGAGGTGGCC	TGGGCCGCCG	GCGCGCAGGG	CCCCTGCTCC	GTGGTCTCCA	CGGGCTGCAC	CTCCGGGCTC	GACGCGGTCC	26500
GCCACGCCGT	ACGGCTCATC	GAGGAGGGCT	CGGCGGACGT	CATGGTCGCG	GGCGGTACCG	ACGCGCCCAT	CTCGCCCATC	ACGGTCGCTT	GTTTCGACGC	26600
GATCCGGGGC	ACCACGCCCC	GCAACGACGA	ACCGGCCACC	GCCTCCCGCC	CGTTCGACCG	CACCCGCAAC	GGCTTCGTCC	TGGGCGAGGG	CTGCGCCGTG	26700
TTCGTCTCTG	AGGAACGGGA	GCGGGCCAGG	GCCCCGCGTG	CCCATGTGTA	CGCCGGTGTC	GGCGGGTTCG	CCTCGCGGTG	CAACGCCTTC	CACATGACCG	26800
GACTGCGCCC	GGACGGCAAG	GAGATGGCCG	CCGCCATCGA	GACGGCCCTG	GACGAGGCC	GGGTGCGCCC	GGACGAAGTG	AGCTACGTCA	ACGCACACGG	26900
CTCCGGCACC	AAACAGAACG	ACCGGCACGA	GACGGCCGCG	TTCAAGAAGG	CGCTGGGCGA	CCACGCCCGC	CGTACGCCCG	TCAGCTCCAT	CAAGTCGATG	27000

Stopp <i>pokP1</i>		ATCGGCCACT	CGCTCGGCGC	CATCGGATCC	GTCGAACTCG	CGGCCTGCGC	GCTCGCCATC	GAGAACGGCG	CCGTCCC GCC	GACGGCCAAC	CTGTACGAGC	27100
	Start <i>pokP2</i>	CGGACCCGGA	ATGCGACCTC	GACTACGTGC	CGTTGACGGC	ACGCGAGGCC	CGGCTCGACG	TCGTCTCAG	CGTCGGCAGC	GGATTTCGGCG	GCTTCCAGAG	27200
		CGCGATGGTG	CTCACCCGTC	CCGGTTCGGG	GGAACA <u>GTGA</u>	ACGCTGTCTG	CGTCACGGGC	CTGGGCGTCG	TCGCGCCGAA	CGGCCTGAGC	ACCGAGGAGT	27300
		ACTGGAACGC	CACTCTCGCG	GCCCCGCTCCG	GCATCGGGCG	CATCACCCGC	TTCGAAACCCG	AGCGCTACCC	CGCCACCCTG	GCCGGCGAGA	TCCGCGGCTT	27400
		CGAACCCGCC	GCCCATCTGC	CGGGCCGCCT	CGTCCC GCAG	ACCGACCACT	CCACCAGGCT	CTCCCTGGTC	GCCGCCGACG	AGGCCGTCCG	CGACGCCGGC	27500
		CTGGACACCG	GACAAC TGCC	CGAGTACGGC	GTGGGCGTGG	TGACCGCGAA	CAGCGCGGGC	GGCTTCGAGT	TCGGTACCA	GGAAC TCGAC	AACCTGTGGC	27600
		GCAAGGGACC	CGAGTACGTC	AGCGCGTACC	AGTCCTTCGC	CTGGTTCTAC	GCGGTCAACA	CCGGACAGAT	CTCCATCCGG	CACGGCTGC	GCGGCTCCAG	27700
		CGGGGTGCTG	GTCGCCGACG	AGGCGGGCGG	CCTCGACGCG	CTCGCCAGG	CCAGGCGGCT	GCTGCGCCGT	GACCTGGACG	CCGTGCTCAC	CGGCGCGGTC	27800
		GACGGCTCGC	TGTGTCCCTG	GGGCTGGATC	GCCCAGACCT	CGACCGGGCA	GCTGAGCACG	GCCGAGGACC	CGGCTCTCGC	GTACCGGCCG	TTCGACGAGC	27900
		GGGCCGCGGG	CTTCGTGCCG	GGAGAGGGCG	GCGCCATCCT	GGTCGTGAG	GACGAGGCGA	AGGCCCGCGC	GCGGCACGCA	CCCCGGATCC	ACGGCAGGAT	28000
		CCTCGGACAC	GCCGCCACGT	TCGACCCGAG	ACCGGGCACC	GTGCCCGCGG	ACGACGCGTC	CGCCCTGACC	AGGGCCGTCG	AACTCGCCCT	CGCCGACGCC	28100
		GGTGCCGTGC	CCGATGACAT	CGATGCCGTC	TTCGCCGACG	CGGCCGGTGT	CCCGCACCTG	GACCGGGCGG	AGGCCGCCGC	GCTCGGCGCG	GTCTTCGGCG	28200
		CGCGCGAGCT	CCCGGTCGCC	GTGCCAAGA	CGCTGACCGG	ACGACTGTGT	GCGGGCGCAG	GTCCCTCGA	CGTCGCCACC	GCGCTGCTCG	CCCTGCGCGA	28300
	Stopp <i>pokP2</i>	CGGGGTCTTT	CCCCCTGCGG	CACACACCCA	GCCGTCCCC	CGGTACGGGC	TCCGTGTGGT	CGTCGGCCGG	CCGCTGGAAC	TGCGCCTGCG	TGCCGTGCTG	28400
Start <i>pokP3</i>		GTCGTGCCCC	GCGGCCTCGG	CGGCTTCAAC	TCCGCGATGG	TCGTGGGCGC	CTCCAC <u>TGA</u>	GCCCTGACCA	CGCTCGGCAA	CCCCACTAGG	AGACCCAGCC	28500
		<u>ATG</u> CCAGAAC	TGACCATGGG	AGAGCTCACC	CGCATCCTGC	GTGAGTGCCG	GGGCGAGGGC	GAAGGCGTCG	CCCACGACGG	GGAGTTCGCG	GACACGCTCT	28600
		TCACCGACCT	CGGCTACGAC	TCGCTGGCCG	TACTGGAGAC	CGCGTCCC GC	CTCAAACGGG	ACTACGGCGT	CGAGCTGACC	GACGACGAGG	TCGTGACGCT	28700
		CGGCACCCCG	GCCCGGCTCC	TCGAACTGGC	CAGGCGCCAG	ATCGCCGCGC	GTTCA <u>ATGA</u>	GCCCCGGCCG	AGACGACCAC	GCCCCGCGCC	TGGTGGCTGT	28800
		GCGACCACTG	CCGACGGCCT	GTCTACGCCA	AGCGGCTCGC	CCGGTCTCTC	GGTGTGTGCC	CGGAGTGCCG	CCACCACCGG	AGACTGTCGG	CCCCGGAGCG	28900
Stopp <i>pokP3</i>	Start <i>pokAC1</i>	GCTCGACCAG	CTGCTCGACC	CGGGGTCGTC	CCAAGCCCTG	GGCGTGCCGC	GCACCGCCGA	CGACGTCCTC	GGCTTACCGG	ACACCCGGCC	CTACCACGAG	29000
		CGACTCGCCG	AGGCGCGCGA	CCGGACCGGA	CTCGACGACG	CCGCGATCGC	CGTCCGCGGC	CGGATCGGCG	GTTGCGAAGT	GGCGGTCGTC	GCCATGGAGT	29100
		TCGGCTTCAT	GGGCGGCAGC	CTCAGCGGCG	GCGTCGGCGA	ACTCATCACG	CTGACCGCCG	AGACGGCCCT	GGCCGAACGG	CGCCCGCTGG	TCATCGTCTG	29200
		CGCGTCCGGG	GGCGCCCGGA	TGCAGGAGGG	CCTGATCTCG	CTGATGCAGA	TGGCGAAGAC	GAGCCAGGCC	CTGCTCGCCC	TCGACGAGGC	CGGCATCCCC	29300
		ACCGTCTCCG	TCATCACCGA	CCCGGTGTAC	GGCGGAGTGG	CCGCCTCGTT	CGCCACGCTC	TGCGACGTGA	TCGTGGCCGA	ACCGGGAGCC	CGCATGGGGT	29400
		TCGCGGGACC	GCGCGTCATC	GAGCGGACCA	TCGGCGAGCG	GCTCCC GGAG	AACTTCCAGC	GCGCCGAGTT	CCTCCGCGAG	CATGGTCAGG	TCGACGTGGT	29500
		CGCACCGCGC	CAGGAACTGC	GCGCGACCCT	GATCCGGCTG	CTCCGCGCGC	TGGTCCACC	GCGGGACACC	CGGGCGGGAC	GTCCTCGGGC	GGAACAGGCC	29600
		GAGCCGGAGT	CCACCGGCAC	GGCACTCGGC	GCACCGGACC	CCGGCCTGCT	CACCCGTCCC	GAACAGGTCC	CCGACCTCGA	CCCCTGGCAG	GCGGTGCGCC	29700
		TGGCGAGGAA	CCTCGAACGC	CCCACCGCGC	TCGACTACAT	CGCCCTGCTC	GTCGACGACT	TCCAGGAACT	GCACGGTGAC	CGGCTCGGCG	GCGACTGCCC	29800
		GGCCACCGTC	GGAGGAGTCG	GCCTCCTCGA	CGGCCGGCCC	GTGATGGTGA	TCGGCCAGCA	GAAAGGACAC	ACCGCGGCGG	CGCTGCGAGA	ACGGAAC TTC	29900
		GGCATGCCGG	TGCCCGCCGG	CTACCGCAAG	GCCGCCCGGC	TGATGCGCCT	GGCCGCGAAG	GTGGGCATCC	CGGTGCTCAC	CCTCGTCGAC	ACCAGCGGTG	30000
		CCTTCCCCGG	CATCGAGGCG	GAGCGCGGGG	GCCAGGCCGT	GGCCATCGCG	GAGAACCTGC	GGCTGATGTC	CGGGCTGCCC	GTGCCGATCG	TTGCTGTGAT	30100
		CGTCTCGGAG	GGCGGCAGCG	GCGGCGCCCT	GGGACTCGCC	GTCGCCGACC	GGGTGCTCGC	GCTCAGCAAC	GCCGTCTACT	CGGTGATCAG	CCCCGAGGGA	30200

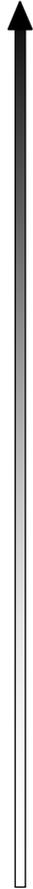
	Stopp	TGTGCCGCGA	TCCTGTGGCG	CGATCCC	GGG	GCGGCACCGC	ATGCCGCTCG	TGAACTCGGT	CTGCACGCAC	GGGAGTTGCT	TGCACAGGGG	GTGGTCGATG	30300
	<i>pokAC1</i>	GAGTCGTCCT	CGAACCCGAG	GGCGGCGCGC	AGAGCGATCA	CCGCGTCGCG	GCGGAGCGCC	TCGCCGGCGC	CGTACGGCCG	CTGCTGGAGG	AACTGACAGT		30400
Start <i>pokAC3</i>		GCTGACCACC	GATCAACTGC	TGGCCGGACG	ACGGGCCCGC	TTCCGCGGCT	TCGGCAGCCC	GGCACCGGCC	GGCCGCCCCG	CGCCGGAAAAG	GTGATGAGAT		30500
		G CCACGCCC	GACAGCGTCG	CCACCCTCGA	CGCCCTGCTG	AGTGACGGAC	GCCCCGACAG	TCTTCCCTCC	GTCCTGGAGG	CCGCCAAGAC	GAGCATGATC		30600
↓		GAGCTCTTCT	CGGAGGCTCC	CGTACCGCCG	TCCGCCGTCC	GCGTGACGGT	CGGGCCGGTC	ACCATCGAGA	TGGACTGGCC	GGGCGGGACC	GGCGCAGGCA		30700
		CCACGGCGCC	GCAGCTCGCA	GTTCCCTCGC	AGGCAGGGAC	CGCACCGGTC	GCGACGCCCG	CGGCGTCGCC	GACCGGACAG	CCCCCGCTCG	ACCACATCCA		30800
		CGCCCCGACG	GTCGGGGTCT	TCTACCGCGC	GCCCCAACCG	GGTGCCAAAC	CCTTCGTGAC	CGAGGGTGAC	ACTGTGCTCC	CCGGTCAACA	GGTGGGCCTC		30900
	Stopp	<i>pokAC3</i>	ATCGAGGCGA	TGAAGCTGAT	GATCCCCGTC	GAGTCGGACC	GGCACGGTGT	CATCGGCGAG	TTCCTCCAGC	CCAACGCGGG	CCTCGTCGAG	TACGGCGACC	31000
		CGTTGTGCTC	CCTCGTCCCG	GCCGACGGGC	GGTGAG GGCG	AGTG TTCGCG	ACCGTCCTCG	TCGCCAACCG	GGGCGAGATC	GCCCTGCGTG	TCGCGCGCGC		31100
	CTGCCGTGAA	CTGGGGATCA	GGGTCGCCGT	CGTGTACTCC	ACCGAGGACA	CCGACAGCGA	GGTCGTGCGG	TACGCCGACG	AGGCGGTCCG	CATCGGCCCG		31200	
	GGGTCGGCGC	AGGCGAGCTA	CCTCAGCATC	CCCGCCGTCA	TCGAGGCCGC	CCGGCGCGTC	GGCGCGGACG	CGATCCACCC	CGGGTACGGA	TTCCTCTCCG		31300	
	AGAACGCCGA	CTTCGCCGAG	GTGTGCGCGG	CCGAGGGCAT	CACCTTCATC	GGCCCCCCCC	CGGAGGTGAT	GGAGGCGCTG	GGCGACAAGT	CCACCTGCCG		31400	
	CGGCCTCATG	GCCGACGCGG	GGCTGCCCT	GCTGCCCGGC	ACGCTGGACC	CCGTGTCGTC	GCCGCGCGAG	GCCGAGGCGT	TCGCCCCGA	GATCGGCTAC		31500	
	CCGGTGGTGG	TGAAGGCGGT	GGCCGGGGGC	GGCGGCCGCG	GGATCGGAGT	GGCGCACTCG	GCCGACGAGT	TCCCCGCCGT	CTACCGGGAG	ACGCGACGCC		31600	
	ACGCCGCCGC	CGTGTTCCGG	GACGGCAGGG	TCTATCTGGA	GCGCTATCTG	CAGTCCGCAC	GGCACGTGGA	GATCCAGATA	CTCGCCGACC	GCTTCGGCAA		31700	
	TGTGATCCAT	CTCGGCGAGC	GCGACTGCTC	GGTGCAGCGC	CGCCATCAGA	AGTCTATCGA	GGAGACCCCG	GCTCCCGGGC	TGGACCGCCA	TGTGCTCGCC		31800	
	GCGATGGCGG	AACACGCCGT	GCAGGGAGCC	AAGGCCCGCG	GATACGTCGG	CGCGGGGACC	TTCGAGTTCC	TGTACGACGA	CAGCGGACGC	TTCTACTTCA		31900	
	TGGAGGTCAA	CTGCCGTATC	CAGGTCGAGC	ATCCGGTCAC	AGAAATGGTC	ACCGGCGTCG	ACCTGGTCCA	TGAGCAGCTG	TGGGTCGCCG	CCGGGCATCC		32000	
	GCTGCGGCTC	GGCCGGCGTG	ACGTCGTGCC	CCCGGGGTGC	GCCGTCGAGT	GCCGTATCAA	CGCGGAGGAC	GCCGACCGGG	ACTTCACCCC	GACGCCCGGG		32100	
	CTCATCGACG	AACTCACCT	GCCGGCGGGC	CCGTTCTGTC	GCGTGGACAC	GCATGTGCGG	GACGGCTCGC	GCATCTCCGT	CTTCTACGAT	CCGCTGCTCG		32200	
	CCAAGGTCGC	CGTCTGGGCC	CCCGACCGGG	AGCTCGCGCT	GGCCCGTATG	CGCCGTGCC	TGGACGAGGT	CCGGATCGAG	GGCAAGGGCA	TGCACACCAC		32300	
	GGCGGGTTTC	CTCCGCTCGG	TCGTCGAGAG	CGACGAGTTC	AGCACGGCCC	GGCACGACAC	CGGGCTCGTC	GGCCGGCTCC	TGGAGCCCGA	GCCGGCTGCC		32400	
	GCAGGGACCC	GGGACCCGGG	GCCCTCGCAG	GCGCAACCAC	CGAACGCCTC	G TAGG GAAGG	TTCAGCT CAT	G AAAGCGCTC	GTGCTTTCCG	GCGGTTCCAGG		32500	
Start <i>pokS1</i>		AACCCGGCTG	CGGCCGATCA	CCCACACGCT	GGCCAAACAA	CTCGTGCCCG	TGGGCAACAA	ACCGGTGCTG	TTCCACGGCC	TGGAAGCGAT	CGCCGCCGCG		32600
		GGGGTGACGG	AGACCGGCAT	CGTCGTCGGG	GACACCCGTG	CCCAGATCGA	GGCCGCGGTC	GGCGACGGAT	CGCGTTCCGG	CCTGGAGGTC	TCCTATCTGT		32700
	GGCAGCGGCA	GCCGCTCGGT	CTGGCCACG	CTGTGAAGAT	AGCCCGTGAC	TTCCTCGGTG	ACGACGACTT	CGTGATGTAT	CTGGGGGACA	ACATCGTCTT		32800	
	CGACGGCATC	ACCGACTTCG	TGGAGCGGTT	CCGGGTCCAT	CGGCCGGCCG	CGCAGATCAT	GCTCGCCCAG	GTCGACGACC	CCCCGGCAGTT	CGGCGTGGCC		32900	
	GAGGTGTCCG	CGGAGGGCCG	CGTCACGGGG	CTCCAGGAAA	AACCGCGCCG	GCCGCGGAGC	GATCTCGCCG	TCGTGGGCGT	CTATCTGTTC	AGCTCGGCCG		33000	
	TGCACAAGGC	GGTCGCCGAG	GTGGAGCCCT	CGGCGCGCGG	CGAACTGGAG	ATCACGGATG	CGGTGCAGTG	GCTCATCGAC	CACGACTGC	GGACCGACGC		33100	
	CGCCGTCATG	ACCGGCTGCT	GGAAGGACAC	GGGAAACGTG	CCGGACATGC	TGGAGGTCAA	CCGGCTGGTG	CTGCGATCCC	TCGATCCCTC	CAGCGCCGGG		33200	
	ATCGTGCGCG	ACAGTGAGAT	CAGCGGCCAG	GTGGTCGTCG	AGCCGGGGGC	GCGGGTGACC	GGTTCCTGGG	TCGTCGGCCC	GGCCGTGATC	GGCTCGGGAG		33300	
	CGACCGTCAC	CAACTCGCGT	GTCGGCCCCG	ACACCTCGAT	CGCGGAGGAC	TGCCGTATCA	CCGACAGCTG	GATCCGCGAC	TCGATCGTGA	TGCCCGGTGC		33400	

Stopp		CTCGATCACC	GGTGTCCGGC	CGCTGGAGTC	CTCCCTGATC	GGTCAGGACG	TCGAGATCGC	CCGCACCCCC	GAACCGCCGG	GTGCACACAA	CCTCGTCCTC	33500
<i>pokS1</i>	Start	GGGGACCGCA	GCCGGGTGCG	GATCGCGTCA	TGAG CGGACC	GCGCATTCTG	GTCACCGGCG	GCGCCGGTTT	CATCGGCTCC	CACTACGTGC	GTGCCGTGCT	33600
	<i>pokS2</i>	GGCCGGGGAG	TATCCCCTT	TTGCGGACGC	GGAGGTGACA	GTCCTCGACA	AACTGACCTA	CGCCGAAAT	CCCGCCAATT	TGGGCGAAGT	ACGGTGCGAG	33700
		TTCGTGTGGG	GCGATTTATG	TGATCCTGAG	CTGCTGAGCA	AGGTGATACC	CGGCCAAGAT	GTCGTGTC	ATTTTGCCGC	GGAATCCCAC	GTGGACCGCT	33800
		CCATCGCCGG	TTCCGCGGAA	TTCGTGCGGA	CCAATGTGCT	CGGGGTCCAC	GCCCTGCTCC	AGGCCTGTCT	GGAGGCGGGA	ACGCCCCGTG	TCGTACAGGT	33900
		CTCGACGGAC	GAGGTGTACG	GGTCGATCGA	CGCCGGCTCG	TGGGACGAGG	AGGCCCCGCT	GCGGCCGCGT	TCGCCCTATG	CGGCGTCAA	GGCCGGCGGA	34000
		GACCTGGTGG	CCCGTGCCTA	CGCGGTCACC	CACGGCCTGC	CGGTGTCCAT	CACCCGCTGC	GGAAACAAC	ACGGACCGCG	CCAGTACCCC	GAGAAGGTCA	34100
		TTCCGCTCTT	CATCACCAGG	CTGCTGGAGG	GCCGGAAGGT	GCCGCTGTAC	GGCGACGGTG	GCAACGTCCG	GGACTGGGTG	CACGTGAGG	ACCACTGCCG	34200
		TGGCGTGCAG	CTCGTCGCGG	AGCGCGGCGA	GCCGGGCGAG	ATCTACCACA	TCGCGGGCAC	CGCGGAATTG	ACCAATCGTC	AATTGACCGA	GCGTCTTCTC	34300
		GAAGCCTGCG	GTCGTGACTG	GGACATGGTG	GAACACGTCA	CGGACCGCAA	GGGACACGAC	CGGCGTACA	GCCTCGACGA	CGGCAAGCTG	CGCGCTCTCG	34400
	Stopp	GTTTTGCTCC	ACGCATACCT	TTCGCCACGG	GACTGGCCGA	GACTGTTGCG	TGGTACGCGG	ATCACCCAGA	GTGGCGTATA	GGGCAGAGCT	TTGTTTCACG	34500
	<i>pokS2</i>	AGAGGGGGAT	CAGTCG TAA C	GGACGGTGTC	CACGTTTGAA	GCATGCCGCC	GGTTTTTTGC	GAGCTGCGCA	TTCGTGTGCA	GTCCTGATCG	CAATACTCAC	34600
		GAGTAAGACA	TGGTTTTTTT	GTCCGCTCGT	GATAATCTGA	TCCATCTCGG	ATTGCCTTAG	CAGCACTGAC	TGCGGGGGTA	AGTTGTTTTT	GGCCATCCTG	34700
		GGGGTAAGCA	AG ATGA AGCT	CGGAGTGCTC	GGTACATTAA	CCATCGATGA	TGTCGAAGTA	GCCGAAATCC	TGACGGCGCC	CAAGCCTCGC	AGCGTACTGG	34800
		CGATGCTGAT	GCTCGAACCC	GGCCGCGCGG	TGTCCACGGC	CTCCCTGATC	CAGGAGCTCT	GGGACGAGCG	CCC GCCGCGC	AGCGGTCCA	CGACGCTCCA	34900
		GACGTACGTC	CTGCAACTGC	GGAGGATGTT	CCGCGACGTC	GCACAGGTGG	TGGGCCAGCC	TCCGACGGAC	GCGCTGTC	CCC GGGTACC	CGGGTACCTC	35000
		CTCCAGGCGG	ACCACACCGA	ACACGACCTC	AGCGCCTACG	AGAACCTGGT	CGAGCAGGGA	CAGAAGTTCC	TGGAGCAGGG	CGACAACGAA	AGAGCCGAAG	35100
		AGTGCTGTC	CCGAGCGCTC	GAACTCTGGC	GCGGCGCCCC	GCTGAGCGAC	GTACGCCCCG	GCCCCTGCT	CTATCCGAG	ATCTGCGGCC	TGGAGGAGAG	35200
		CCGGCTGGCC	GCGACCGAGA	TGCGCATCGA	GGCCAACCTG	CGGCTCGGCC	GGCACCGCGA	GGTACAGAGC	GAAGTACCG	TCCTGGTGGG	CAGTTACCCC	35300
		CTGCACGAGG	GTATCCGCGT	CAAGCACATG	CTGGCCCTGT	TCCGGGCCGG	CCGGCTGTCC	GCCGCGCTCG	ACTCGTTCCA	CCAGTACCGG	CACCGGCTGG	35400
		TGACCGACCT	GGGCTGGAA	CCGTCCCCAC	GCATACGGGG	CCTCCAGCAC	GCCATGCTGT	GCTTCGACCC	CATGGCCGAC	TCGCTGGCGA	TACTCGACCG	35500
		TGTGGCATCG	GGCGTTTCCC	ACTGA ATATT	CCTTGAATGG	AATCGGGGGA	AATCCAGACG	TGTTTTATGT	GTGTCATTGG	GTTTGAGAGG	TCCCGACCAA	35600
		GAAATGCTCG	CCGGGCGCGC	TCCGCCCGGG	GCGTGCAGCC	CCGGACGGAG	GTGGACGGCC	GGCGTGTGCG	CGGAGTCAAG	CGACCGGTGT	CCCCGCCTTC	35700
	<i>pokMT2</i>	CTTTACGAGC	GGCCCGCGCG	AGGCGGGCCC	CGCACGTGCG	GGCCTGCCTC	CACCTGCCGG	CCGCAGCAGC	GCCTCC AGTC	GCTGGCCACA	GGGGCGGAAG	
		GGGAACCCGG	CTGTCGATCA	TGTGCAGATA	CGGGCCGACC	GGCCGGACGT	CGGTACCCTG	CAACCCGGCC	TCCTCGACCA	GGCGCAGCAG	ACTGCGGGC	35800
		CCCTTGGGCC	GACAGCTAGT	ACACGTCTAT	GCCC GGCTGG	CCGGCCTGCA	GCCAGTGGCA	GTTGGGCGCG	AGGAGCTGGT	CCGCGTCGTC	TGACGCCGCG	
		AGGTGCTTGC	GGCCGTCGAC	GTTGAGCAGC	AGGAGCAGGT	CCATGGCAGT	GGTGAACCCG	GTCTCGGGGC	TTCCGTGAC	CAGGTTCTCG	ATGACGACGA	35900
		TCCACGAACG	CCGGCAGCTG	CAACTCGTCG	TCCTCGTCCA	GGTACCCTCA	CCACTTGGGC	CAGAGCCCCG	AAGGCAGCTG	GTCCAAGAGC	TACTGCTGCT	
		CCCGTCCGCC	CGGACGGGCG	GAGGCGGGCA	CATTGCGCAG	CGCGGCCACG	GTGGCCGCGT	CGTCCCCTC	CAGGACGTTT	TTCAGGATGA	AGACGTCCGC	36000
		GGGCAGGGCG	GCCTGCCCGC	CTCCGCCGCT	GTAACGCGTC	GCGCCGGTGC	CACCGGCGCA	GCAGGGTGAG	GTCCTGCAAG	AAGTCCACT	TCTGCAGGGC	
		CTCGACCTGC	ACCGACTCCC	GGCAGTCACC	GGCCACCAGA	CGGCAACGGC	CCTCCAGCGC	ACCGCCCTTG	CGCAGCCGCG	CGTCGACGTC	CTCCAGCACA	36100
		GAGCTGGACG	TGGCTGAGGG	CCGTCAGTGG	CCGGTGGTCT	GCCGTTGCCG	GGAGGTCGCG	TGGCGGGAAC	GCGTCGCGCG	GCAGTGCAG	GAGGTCGTGT	
		CCGGGCAGGT	CGAACAGGGC	ACCGCGCAGG	GACGGGTCGC	GCTCCAGGAC	GGTCGCGATG	AGGTCGCCGT	GGCCGCCGGC	TACATCCACC	ACGGTCAGGT	36200
		GGCCCGTCCA	GCTTGTCCC	TGGCGCGTCC	CTGCCACGCG	CGAGGTCCTG	CCAGCGTAC	TCCAGCGGCA	CCGGCGGCCG	ATGTAGGTGG	TGCCAGTCCA	

	CGCCGCGCAG	GTCGAGCGTC	TCGGCGATCG	CCCCGGACGA	GAGCCGGCTG	GCCTGCGTCA	TGGCGCGGTT	GAAGACCTCG	GCCGACTCCG	GCGCGTCCTC	36300
	GCGGCGCGTC	CAGCTCGCAG	AGCCGCTAGC	GGGGCCTGCT	CTCGGCCGAC	CGGACGCAGT	ACCGCGCCAA	CTTCTGGAGC	CGGCTGAGGC	GCGCGAGGAG	
	GTACAGATAG	GTGAAGAAGT	CCTTGCCGTG	CGTCTCGCCG	AAGCCGCCCT	TTCCTGTACG	GACGGCGTCG	GCGAGACGCG	GCCAGACCTC	CCAGTCCAC	36400
	CATGTCTATC	CACTTCTTCA	GGAACGGCAC	GCAGAGCGGC	TTCGGCGGGA	AAGGACATGC	CTGCCGACG	CGCTCTGCGC	CGGTCTGGAG	GGTCCAGGTG	
	GGTTCGGTGG	CCCACAGGAC	CATGTGCGCG	AGGCTGCGCG	GGGTGTCGCC	GCGCAGCAGT	CGGGAGACCG	GCGTGTGCGC	GTAGCGGTG	CCCTGGGCGA	36500
	CCAAGCCACC	GGGTGTCCTG	GTACAGCGCG	TCCGACGCGC	CCCACAGCGG	CGCGTCGTCA	GCCCTCTGGC	CGCACACGCG	CATCGCCAGC	GGGACCCGCT	
	GGAACACGCC	CTGCGAGCTG	AGCGCGCGCA	ACAGCCGGTC	GAGCGTGCCC	GGTTCGGCGT	TCACCAGGCG	CGCCAGCTCG	GCGGCGGTG	CGGGTCTCTC	36600
	CCTTGTGCGG	GACGCTCGAC	TCGCGCGCGT	TGTCGGCCAG	CTCGCACGGG	CCAAGCCGCA	AGTGGTCCGC	GCGGTGAGC	CGCCGCCAGC	GCCCCAGGAG	
	ACCGAGCGCG	TCGGCCACGC	CGAGCTGTAC	CGCGGCGCGG	AGCGCGGCCG	CGTGACCTGC	GGCCAGGCG	AGTCTGCGGA	GGTTCGTAC	GGCTTCGAGA	36700
	TGGCTCGCGC	AGCCGCTGCG	GCTCGACATG	GCGCCGCGCC	TCGCGCCGGC	GCACTGGACG	CCGGTCCCGC	TCAGACGCTT	CCAAGCAGTG	CCGAAGCTCT	
Start	GCGGGAGCTG	TCATGACACC	AGCGTCGTCA	ACTCCGCTAG	ACGGCAACTG	GACCCGTGGT	CGAAGCGGCG	AAGTCCCCTC	CGGGGCGTGG	ACGTCCCCTC	36800
<i>pokMT2</i>	CGCCCTCGAC	AGT ACTGTGG	TCGCAGCAGT	TGAGGCGATC	TGCCGTTGAC	CTGGCGACCA	GCTTCGCCGC	TTCAGGGCAG	GCCCCGCACC	TGCAGGGGAG	
	GGCGCGGGTA	TTGAGGGGGC	GCGACACTCG	CCCAGGGTGC	GGACATCTGC	GGGGCCCGGG	TACCCCGGAG	CGCGACTACC	CGACCCAGGG	GCGGCCCCG	36900
	CTCCGAGCGG	TGTGCACTCG	ACCGTGCGGC	GTACCCCGGC	CCGCGGCGTG	CCCCTGCCCG	TGCCGCGTGC	CCCGCCCGTG	CCACGTGCAC	CCCGTCGTG	37000
	GGAGGCGTGC	ACCCCGGTGT	TCGTGCTCCC	CGCGCGCTCC	GCTCCGGCTC	CAGCCACGAT	CGACCGTTCT	GGGACACGGT	GACAGCAACC	AACCCACCCA	37100
	CAGGGCCAGT	TCACCGATTG	CAGCCC CGCG	CGGCCCGGAC	AGCGAGAGGA	AGTGCACCGT	GT CGGAACCG	CACTCGCGCA	GCGAAGTAGC	GCCGCTGCCA	37200
Start	GGCCTGAAGG	GCAGGAGCGC	CCTCGTCATC	GGCGGGACGC	GCGGAGTGGG	CCGGGCCGTC	ACCGAGAAGC	TGGCCGTGTC	GGGATGCGAC	GTCGTGCGGA	37300
<i>pokT1</i>	CGTTCGCCCA	CTCCGCGGAG	GACGCCGGGA	CACTGCTCGC	GGATCTGAAG	GACACGCCCG	GCAGCCTGGA	GACGTGCGC	GGCGACGCGC	GCCGGGCCGA	37400
	GACGCTGCCC	GAGGCGATGC	GCCACGTGCG	TGAGCGGCAC	GGTCGGCTCG	ACATCCTGGT	CCACGCCGCC	GCCTCGGCGC	ACCCCATGCC	GGTCTCTGCG	37500
	ATGCGTCTGA	CGGAGGTGTA	CGCCGACACG	GCGACCGCGC	TGGTGCCGCT	CGCCGCCTCC	GCGGGGCCCG	CGGCGGACCT	GCTGTCCGAG	GGCGGCCGGA	37600
	TCATCGTCGT	CTCGGCGAGC	GTCGCCCGCG	GTGTGGCTCC	CCACATGGTC	AGCCTCGGCG	TCGCCAAGGC	CGCCCTGGAG	AGCCTGACAC	GCTTCGTGGC	37700
	CGTGGAAGT	GCCGACCGCG	GTGTGACCGT	CAACGCGGTC	TCCGCGTCCA	AGCTCGACAA	GGGCGCCGAC	ACCCCGCGCC	CCGAGGTCGC	CCGCGCGATC	37800
	GGTGCCCGCA	CCCCCGCGGG	ACGCCTCGCC	ACACCCCGGG	ACGTCGCCGA	CACCGTGCGG	CTGCTCTGCC	TGCCCGAGGC	CCAGTGATC	ACCGGCCACG	37900
	TGGTGTCCGC	CGACGGCGGC	CTGAGCCTGC	TGGC CTG ACG	GAGGACGACA	TG GAAGAACA	CACTCGCACG	GACGTCTGCG	TCGTGCGTGG	CGGCCCGCG	38000
Start	GGCATGACCC	TGGCACTCCT	GCTGCTGCGG	TCCGGCGCAC	GCGTCACCGT	CGTCGAGCGC	AGCTCCTCGC	TCAGCCCGCA	GTACCGCGGC	GAGATCCTCC	38100
<i>pokO1</i>	AGCCCGGCGG	CCTCGCCGTC	CTCGACGAGA	TCGGTGTCTT	CAAGGGCGCC	ACCGACCGCG	GCGCACACGT	CCTGGAGCGG	TTCCGGCTGG	TCGAGCACGG	38200
	TCGCGTGCTG	ATGTCCTTCG	ACTACCGCAG	GCTCCAGTCC	CCGTACAAC	ACCTGCTCAG	CCTGCCCCAG	GCGCATCTGC	TCGCCGAACT	CCTGGACCGT	38300
	TGCCAGGAGT	TCCCGGAGTT	CCGCTACGTG	GTGGCGCGGG	TCAACGGCCT	GATCCGGGAG	GGCGACGCGG	TACGCGGTGT	GTACGCCAAG	GCCCAGGACG	38400
	TCACGCACAC	CGTGCGCGCC	GCCTGTGTGG	TCGCGGCGGA	CGGGCGCCAC	TCACAGGTCC	GCCGGCTCGC	CGGCATCGAC	CACGTCCGCC	AGGACGTCTT	38500
	CGACCAGGAC	GTGGTCTGGT	TCCGGCTGCC	CGCGACGGAG	CGTCTCGGCG	AAGTCATGGT	GAACCGCGCC	GGAGGCAACC	CCGTGCTCGC	CTACGACTCC	38600
	CACCCGGGCG	CGGTGCAGAT	GGGCTGGACC	CTGCCAAGG	GGGAGTGGAA	GCGCCTGGCC	CCGCTCGGCA	TCGGCGAGGT	GCGCCGAGG	ATCACCGCGG	38700
	CGACCCCGCA	GTTGCGCGAC	CGGGTCGAGG	GGGCGTTGCG	CAGCTTCGCC	GACGTCTCGC	TCCTCGACGT	GTTGCGCGCC	GCCGCCGAGC	GGTGGACCGG	38800
	CGACGGCCTC	GTCCTCATCG	GCGACGCCGC	CCACACGCAC	GGCCCGCTCG	GCGCCAGGG	CATCAATCTC	GCCGTCCAGG	ACGCCGCGCT	GCTCCACCCG	38900
	ATCCTGCTCG	CCGCCGTCAC	GGACGGCGAT	GTGAGCGCGG	CGCGGCTCGG	AGAGTTCGAG	AGGATCCGCA	GGCCGCACAT	CAAGGCCGTC	ATGAAGTTCC	39000

	Stopp	AGGCCGTGCA	GAGCCGGATG	ATGCTCTCCG	CCGACAGCCT	GGCCACCTTC	CTGCGTCCCA	AGCTCGCCCG	AGTGGTGATG	CGCACCCCGA	TCGGCGCCAA	39100
	pokO1	GTTCACCCAG	CGGATCGCCT	TCGGAGCCCC	GGGCATCCGC	GTCGCCGACA	ACCTCTTAC	CGTCAACGAG	AAAGAGTGA	CGCGGATGAG	ACTGGTCGAC	39200
Start pokC2 ↓		CTGTCTCAC	CCGTCGACGC	CCGGGGCTGG	GAGCCCCGAGC	CGGTGACCCA	CGAGGTGATC	ACACCGGCCG	AGGGCGCCCG	GCACATGGCC	GACGAGATGC	39300
		GTGAGCACTT	CGGCATCGAC	TTCGACCCGA	GCGTGCTCGA	CGACGGCGAA	CTGCTGTGCA	TCGACACGCT	GCGGCTCACC	TCCCACACCG	GTACCCACAT	39400
		CGACGCGCCG	GCCCACTACG	GGACCCGCGC	CTCCTACCGC	GAGGGTCCGC	CCCGTACCGT	CGACGAGCTC	CCGCTCGACT	GGTTCACCCG	GCCCGCCGTC	39500
		GTCCTCGACC	TCACCGACGC	CGAGCCGGGC	GCCGTCGGGG	CCGACCGCAT	ACGAGCCGAA	CTGGACCGGA	CGGGTGTGCA	GCCGGCACCC	CTGGACATCG	39600
		TGCTCTGCA	CACCGGGGCC	GACCGGTGGG	CCGGCACGGA	GAAGTACTTC	ACCCACTTCA	CGGGACTCGA	CGGACCCGCC	GTGCACCTCC	TGCTCGACCT	39700
		GGGGGTGAAG	GTGATCGGCA	CGGACGCGTT	CAGCCTGGAC	GCGCCCTTCG	GCGACATCCT	GCGACGGTAC	CGGCAGACCG	GGGACCGCTC	GGTCTGTGG	39800
		CCCGCCACT	TCACGGGGCG	CGACCGCGAG	TTCTGCCAGA	TCGAGCGTCT	CGCCAACCTG	GACCGGCTGC	CTCCGCACGG	CTTACCCCTC	TCCTGCTTCC	39900
		CCGTGAAGAT	CGCTGGAGCC	GGAGCAGGCT	GGACCCGCGC	GGTCGCTTTC	ATCGACGACG	ACGAGGGCTG	ACGGACATGA	CCGACGACAT	CCAGGTGCAT	40000
		ACGCGCGGGG	CCCAGGCGGC	GCCGGGCGAG	AGCGACGCGG	GCGACACCGG	GCCGGTGGCG	GCGTACTCCT	TCGTGACCCG	GCCGGACGTC	CCGCCGCGCC	40100
		AGCGGCTCAT	GCTGCTCGCC	AACGGGCAGC	GCTTCTCCGC	CGTCGTGTAC	GCGCTCGCCG	AACTCAACGT	CGCCGACCAG	CTGGTCAAGG	GACCCCGCAC	40200
	GGTCTCCGAA	CTGGCCGACG	CGGTCGGCGC	CGACGAGGCG	GCGCTCTACC	GCATGCTGCG	CTGTGCCGCC	CTGCTCGGTG	TGTTCCAGGA	GCTCGACGGG	40300	
	CGGCAGTTCG	CCCTCACCCC	CCTCGCCGAG	GGGCTGCGCA	CCGACCTGCC	CGACGGGGTG	CGGGACCCG	TGCTGCTCGA	CGGATCCGGT	TTCTTCTGGG	40400	
	GCTCGTTCCG	CTCGATCCTG	CACTCCGCGC	GGACCGGCCG	GCCCGGCTTC	GACGCCGCGC	ACGGTATGTC	GTTCTGGGAG	TACCTCCAGG	GCAACCCGGA	40500	
	GGCGGGCGAG	GTCTTCGACG	ACGCCATGAC	CACCATCAGC	CGGCGGCTCG	GCGGGCTCTA	TCTGGACCGC	GTCGACTTCT	CCCGTTCCC	CGTCGTCGCC	40600	
	GACGTCGGCG	GAGGCCGGGG	CTACTTCTC	GCCGAGATCC	TGCGGGCGAA	CCCCGGCGTC	CGCGGTGTGC	TCTTCGACCG	TGCGCAAGTA	GCCGACACCG	40700	
	CAGGTGAGTT	GCTGAGCGAG	CGTGAGGTCG	CCCACCGCGT	GGAGGTGGTC	GGCGGCGACT	TCTTCACCGA	CCCGTCCC	GCCGGTCCG	ACGCGTACGT	40800	
	CCTGAAGACC	GTGCTGCACG	ACTGGCCGGA	CGAGAAGGCC	GTGGAGATCC	TGCGCGGCGT	ACGACGGGCC	ATCGGCGACT	CCGCGGCGCG	CCTGCTCGTC	40900	
	CTCGAACAGG	TCGTGGCACC	CGGCAACACC	TGGGACACCG	CCAAGTTCCT	GGACGTCGAC	ATGCTCGTGG	TGATGGGCGG	GCGCGAGCGC	AACCTCGACG	41000	
	pokMT3	AATGGCGCGC	GCTGCTCGCC	GCCGGCGGCT	TCGCCCTGGA	CTGCGAACC	GCCGTCGGCG	ACTGGGCGGT	ACTGGAATGC	AGGCCGTGCT	GAAGCGCTCC	41100
		CCGGCCTGTC	CGGCCGACCC	GACCTACTCC	GCCTTGGCCG	ACCGGCCCGG	CCAGGGCCCG	GGCGACCCGC	ACGACTCGGC	ACCCACCCCG	ATCACGGAGG	41200
	Start pokC1 ↓	ACAGGACCCT	ATGACCGACA	CCACCCTCGA	CGCGGCGCCC	GCTCAGGAGG	CGCTCTACAC	CGAGGTGCAG	CAGTTCTACG	CCCGCCACAT	GCAGCTCTTG	41300
		GACAGCGGCA	GGGCCGAGGA	GTGGGCGCAG	ACCTTACCG	AGGACGGGGA	GTTGCGGCCG	GAGCACCGGC	CCGAACCCGT	CGTCGGCAGG	ACCGCCTGG	41400
		CGCGCGCCGT	GCGTTCCGCC	CACGAGGCGC	TGGTGGCCGC	CGGCGAGGTG	CGACGCCACT	GGCACGGCAT	GGTCGCGGTG	GACTCCGCGG	CCGACGGTTC	41500
		GCTGCACGTT	CGGTGCTACG	CGCTCATCAT	CGGCACCGTG	CTGGGCGGCG	ATCCCCAGGT	CAGGATGAGC	TGTGTGTGCG	AGGACGTGCT	CGTCCGCGAG	41600
	Stopp pokC1 ↓	GACGGCGAGC	TGAAGGTCAG	CCGACGGCGC	GTGACCAAGG	ACGGTGTGGG	CGCGCCCGGC	TGAGCGGCGC	CGCACGGGAA	GGCCCCCGG	AATCTCTCCC	41700
		GGGGCCTTC	CCGTGTGGTC	GGCGCCGGAG	CGCGTCCGGC	GCGGCCTCAG	CGATCCTCGC	CGACCGGCGC	GTACAGGTCG	GCGTCGGGCG	TGGCGAGACC	41800
	pokO3	CCCCGGAAG	GGCACACCAG	CCGCGGCCCTC	GCGCAGGCCG	CGCCGGAGTC	GCTAGGAGCG	GCTGGCCGCG	CATGTCCAGC	CGCAGCCCGC	ACCGTCTTGG	41900
		GGCCAGGCCG	CGGACACGGT	TGCGGAACTC	CTCGCTCTGC	ACCGCCCTTT	TGTGCGAGTC	GGGGTCGTCC	CAGTGGGCGG	TCTCCACGAA	GATGTTCCGG	41900
		CCGGTCCGGC	GCCTGTGCCA	ACGCCTTGAG	GAGCGAGACG	TGGCGGGAAA	ACACGCTCAG	CCCCAGCAGG	GTCACCCGCC	AGAGGTGCTT	CTACAAGCCG	42000
		TTGCTGATCG	AGCGGTAGAC	CTCGTGGCTG	ATGAAGCCCG	GCTGCGCCTG	CATGTAGGCG	CTGACCTCGG	CGATGGCGCG	CCGGAACGCG	TCTACTTCGC	42000
		AACGACTAGC	TCGCCATCTG	GAGCACCGAC	TACTTCGGGC	CGACGCGGAC	GTACATCCGC	GACTGGAGCC	GCTACCGCGC	GGCCTTGCGC	AGATGAAGCG	42000

Stopp
pokPS



Start
pokPS

Start
pokO3

CCGTCACCGT	GAAC TTGTTG	ATCAGGGTCA	CCATGGTCGT	ACTCCTTGGT	CGGGGTCGGT	GGTGGTCCGG	TGTCATCCGC	GCGTGGCGAA	CAGTTCCGTG	42100
GGCAGTGGCA	CTTGAACAAC	TAGTCCCAGT	GGTACCAGCA	TGAGGAACCA	GCCCCAGCCA	CCACCAGGCC	ACAGTAGGGC	CGCACCGCTT	GTCAAGGCAC	
AAGAGCCGGC	GCAGGTCCTG	GCGGCGGACC	TTGCCGCCGC	CGGACCCGGC	GATGTCCGGG	ACCGCCCGGA	TGTGCCGGAT	GTGCTGGTAG	TACGGCAGGC	42200
TTCTCGGCCG	CGTCCAGGAC	CGCCGCCTGG	AACGGCGGCG	GCCTGGCCCC	CTACAGCCCC	TGGCGGGCCT	ACACGGCCTA	CACGACCATC	ATGCCGTCCG	
CGGAGTTGAC	GTCCGCGGCG	ATGCCGTCCA	GTGCTTCGGG	CTCCTCGGGA	CGACGGGTCA	CCACGAGGGC	GACCGCCACG	GCGCCGCTGA	ACTCGTCCGG	42300
GCCTCAACTG	CAGGCGCCGC	TACGGCAGGT	CACGAAGCCC	GAGGAGCCCT	GCTGCCAGT	GGTGCTCCCG	CTGGCGGTGC	CGCGCGACT	TGAGCAGGCC	
GTGGTGCAGC	ACCGCGCAGT	CCGCCACGGC	GGGGTGC GCG	AGCAGCACCT	GCTCGATCTC	CTGCGGGGAG	ACCAGCCAGT	TGTCGCACTT	GAAGACGTCC	42400
CACCAGCTGC	TGGCGCGTCA	GGCGGTGCCG	CCCCACGCGC	TCGTCTGTGA	CGAGCTAGAG	GACGCCCTC	TGGTCGGTCA	ACAGCGTGAA	CTTCTGCAGG	
TTGAGCCGGT	CGACGACGAA	GAGGCAGTCG	TCCTCGTCSA	CCTCGCCGAC	GTCCCCGGTG	GCGAACCAGC	CCTCGGCGTC	CAGGGCGCCG	CCGTCCGGCT	42500
AACTCGGCCA	GCTGCTGCTT	CTCCGTCAGC	AGGAGCAGCT	GGAGCGGCTG	CAGGGGCCAC	CGCTTGCTCG	GGAGCCGAG	GTCCCGCGGC	GGCAGCCCGA	
CGCCAGGTA	GCCCTTCATC	AACTGCGGGC	CGCGCACCTG	GATCTCGCCG	CGCTCACCGG	GGCCGAGTGC	CTTGCCGGTG	GCGAGGTCGA	CGATCCGGCA	42600
GCGGGTCCAT	CGGAAGTAG	TTGACGCCCG	GCGCGTGGAC	CTAGAGCGGC	GCGAGTGGCC	CCGGCTCACG	GAACGGCCAC	CGCTCCAGCT	GCTAGGCCGT	
CTCGGTGCGG	GGGACCGGGG	GTCCGCACGA	ACCCTCCTTG	GGCCGGGTGC	GGTCCGCCA	GTGGGTGATC	GGCGCCGTCT	CGGCGAGCCC	GTACCCTTGG	42700
GAGCCACGCC	CCCTGGCCCC	CAGGCGTGCT	TGGGAGGAAC	CCGGCCACG	CCGACGGCGT	CACCCAGTAG	CCGCGGCAGA	GCCGCTCGGG	CATGGGGACC	
AGGACCCGGA	TCCCGAAGTG	GTCGCCGAGC	CTGCGCGCCG	CCGGGACCCG	CAGTGC GGAG	CCGCCGGAGA	ACACGGCCTC	CACGGTGTCG	AGCCGCAGCT	42800
TCCTGGCCCT	AGGGCTTCAC	CAGCGGCTCG	GACGCGCGGC	GGCCCTGGCG	GTCACGCCTC	GGCGGCCTCT	TGTGCCGGAG	GTGCCACAGC	TCGGCGTCSA	
CCGACAGGTC	CGGTCGCGCC	GCGAGACGGC	TGAGCCGCAT	CGGCAGGCTG	TAGTACCGGG	TGGCCCGCGC	CTCGTTCGCC	GTCCGCAGCG	ACGCCGCCAG	42900
GGCTGTCCAG	GCCAGCGCGG	CGCTCTGCCG	ACTCGGCGTA	GCCGTCCGAC	ATCATGGCCC	ACCGGGCGCG	GAGCAAGCGG	CAGGCGTCSG	TGCGCGGGTC	
GTCCGGATCG	GTGGCCAGCA	CCTGCTCGGC	GGCCGCGAAC	AGCGCCGAGT	TCAGGTGCAT	CGGGTGGAAC	GTGGGCAGAT	GGTTGACGGT	CACCGAGCTG	43000
CAGGCCTAGC	CACCGGTCGT	GGACGAGCCG	CCGGCGCTTG	TCGCGGCTCA	AGTCCACGTA	GCCCACCTTG	CACCCGTCTA	CCAAGTCSA	GTGGCTCGAC	
TCGTCCAGAC	CGTGCGCGTG	CACGGTCTGC	GCCGCGTTGA	CCGCCAGGTT	GTGATGGGTC	TGCCGCACGC	CCTTCGGGGC	GCCGTCGTCG	CCGCTGGTGA	43100
AGCAGGTCTG	GCACGCGCAC	GTGCCAGACG	CGGCGCAACT	GGCGGTCCAA	CACTACCCAG	ACGGCGTGCG	GGAAGCCCCG	CGGCCAGCAC	GGCGACCACT	
AGTGGATGGA	CGCGACGTCG	TCGGGGCGCA	CGGCGGGCGC	CTCCCGCAGC	GGTCCGGTGT	CCCACAGCGT	CCGGTCGCCG	ATGTCCAGCG	ACGGCACCGT	43200
TCACCTACCT	GCGCTGCAGC	AGCCCCGCGT	GCCGCCCGCG	GAGGGCGTCG	CCAGGCCACA	GGGTGTCSA	GGCCAGCGGC	TACAGGTCGC	TGCCGTGGCA	
GTCGCCGAGC	TCGGCGGCGA	TCTCCTCCGT	CGTGAGCAC	AGCCGTGCGC	CGCTCGCGGC	GACGAGGGCC	TCCAGACCCT	TCGCCCGGAG	GAAGGGATTG	43300
CAGCGGCTCG	AGCCGCCGCT	AGAGGAGGCA	GCACTCGTGG	TCGGCACGCG	GCGAGCGCCG	CTGCTCCCGG	AGGTCTGGGA	AGCGGGCCTC	CTTCCCTAAC	
ACCGGCACGA	CGACATGGCC	CGCGCGCAGC	GTGCCGTAGT	ACGCCACGGC	GAAGTCCGGG	TGGAGGACCG	AGGTGATCSG	GACGGTCSGTG	CCGGGCCCGC	43400
TGGCCGTGCT	GCTGTACCGG	GCGCGCGTCG	CACGGCATCA	TGCGGTGCCG	CTTACGCCCT	ACCTCCTGGC	TCCACTAGCG	CTGCCAGCAC	GGCCCGGGCG	
CCACCAGAGC	GCGGATGCGT	GCCGCGCAGC	CGCTCACCCG	CTGCTCCAGC	TCCCCGAAGG	TCAGCGCGTC	GCTGCGGTCC	GTGCGCAGGG	CGACACGGTC	43500
GGTGGTCTCG	CGCTACGCA	CGGCGCGTCG	GCGAGTGGGC	GACGAGGTCG	AGGGGCTTCC	AGTCGCGCAG	CGACGCCAGG	CACGCGTCCC	GCTGTGCCAG	
GGGGTGGGCC	TCGGCGGCGA	GCCGCGGCAG	CTCGTCCAGG	CGCTCGACGG	GCTCACGCAC	GCGCCTGCTC	CTCCGCGAAC	TCCTTGACA	GCCGCAAGTT	43600
CCCCACCCGG	AGCCGCCGCT	CGGCGCCGTC	GAGCAGGTCC	GCGAGCTGCC	CGAGTCCGTC	CGGGACGAG	GAGGCGCTTG	AGGAACCTGT	CGGCTCCAA	
GGTCATGGAG	TTGGTGCTCA	GCACCCGGCG	CAGATAGCGG	CGTGCGTCTT	CGACCCGTGGT	GCCCTCGCCG	AGGATCGCSA	GCGCCACGG	CTTGTAGACG	43700
CCAGTACCTC	AACCACGAGT	CGTGGGCCCG	GTCTATCGCC	GCACGCAGGA	GCTGGCACCA	CGGGAGCGGC	TCCTAGCCGT	CGCGGCTGCC	GAAGTACTGC	

Stopp
pokC3

		GCGACGTGCC	GCGACTCGAC	GACGATGCCC	TCCCGGGTCTG	GGGTGAACAG	CCAGTGCCCG	GTGTGCGCGT	CCAGCAGCGC	CGGCAGCCCG	ATCTGCTTGT	43800
		CGCTGCACGG	CGCTGAGCTG	CTGCTACGGG	AGGGCCACAG	CCCATTGTTC	GGTCACGGGC	CACACGCACA	GGTCGTCCGG	GCCGTCGGGC	TAGACGAACA	
		AGACGATCTT	GGAGTGCGGG	AAGCAGATCC	GCACCGAACG	GGTCGTGTGC	GGGGCGCCGT	CGGACGTCGT	GGTGTCCATG	TCAAGAAGCT	GGATGCCGGG	43900
		TCTGCTAGAA	CCTCACGCCC	TTCGTCTAGG	CGTGGCTTGC	CCAGCACACG	CCCCCGGGCA	GCCTGCAGCA	CCACAGGTAC	AGCTTCTTGA	CCTACGGCCC	
		CACGTCCTCG	GTCATGTCGA	TCCGGGAGAC	GTGGGCGAGC	CGCTCGGGCC	AGCGATCGGC	CTCGTACAGG	ATCCGGTACG	CGTCCTCGGC	GGACCCCGCG	44000
		GTGCAGGAGC	CAGTACAGCT	AGGCCCTCTG	CACCCGCTCG	GCGAGCCCGG	TCGCTAGCCG	GAGCATGTCC	TAGGCCATGC	GCAGGAGCCG	CCTGGGGCGC	
		GCGAACAGCG	GGTCCCGGAA	GTCGACGACC	AGGTCGGACA	GTTCTGCCCG	GTTCCGCGCG	GCGTACGCCA	CCGTCGACAG	CAGGTCGGAG	CGTGCCGACT	44100
		CGCTTGTGCG	CCAGGGCCTT	CAGCTGCTGG	TCCAGCCTGT	CAAGGACGGC	CAAGCGCCGC	CGCATGCGGT	GGCAGCTGTC	GTCCAGCCTC	GCACGGCTGA	
		CCGCACGAGC	GAGGTCCTCG	GGGGAGGTCA	GCGCGCTCGT	GTCCTGCCGC	AGCTCGATCT	CGGTCTTGTG	CTCCGAGACC	GCGCGCAGCA	CCCACGCGCC	44200
		GGCGTGCTCG	CTCCAGGAGC	CCCCTCCAGT	CGCGCGAGCA	CAGGACGGCG	TCGAGCTAGA	GCCAGAACAG	GAGGCTCTGG	CGCGCGTCTG	GGGTGCGCGG	
		GCGCACACCG	GCGAGCGAGG	ACTCGGGCGT	GTCCTCGAAC	GAGACCCGCA	GGCCGTCGCG	GTCCAGCGTG	CGGTCCTGGG	TGCGGGACCA	CACCCGCTCG	44300
		CGCGTGTTGC	CGCTCGCTCC	TGAGCCCGCA	CAGGAGCTTG	CTCTGGGCGT	CCGGCAGCCG	CAGGTCGCAC	GCCAGGACCC	ACGCCCTGGT	GTGGGCGAGC	
		TCGTGCGTGA	TGGTCCAGAT	CGTCACGGAG	TCCTGCGCCC	CGCCCCGGGC	GGTCCGGTCC	GCGTGGACGA	CGGAGGGGGA	GAGGTAGTGC	AGCGGATCGG	44400
		AGCAGCCACT	ACCAGGTCTA	GCAGTGCCTC	AGGACGCGGG	GCGGGGCCCG	CCAGGCCAGG	CGCACCTGCT	GCCTCCCCCT	CTCCATCACG	TCGCCTAGCC	
	Start	GATCGGTGAT	CAGGTTCGAGG	ACGACCTTCG	CCGGCGCGTC	GACGACGACC	GATTCGCCCA	CGGGGGCTTG	GGTGTGACC	ACTGGTGTTC	CTTCCACGAG	44500
	pokC3	CTAGCCACTA	GTCCAGCTCC	TGCTGGAAGC	GGCCGCGCAG	CTGCTGCTGG	CTAAGCGGGT	GCCCCGAAC	CCACAACCTG	TGACCACAAG	GAAG GTG CTC	
		GAGTGCGGGC	GGGCGGCCCG	CGGGCGAGGG	CCGGGCGCGG	GTGGCGTCA	CCGCGCCCGA	CCAGGGAGAC	CAGCTCGCCG	GTGATGTTCT	CGTTGGCCGC	44600
		CTCACGCCCG	CCCGCCGGGC	GCCCCCTCCC	GGCCGCGGCC	CACCGCAGTG	GGCGCGGGCT	GGTCCCTCTG	GTCGAGCGGC	CACTACAAGA	GCAACCGGCG	
		CGAGCAGTAG	AAGACGACGG	TCCTGGCGAC	CTCCTCCGGG	CTGCCGAGGC	GCCCCGTCCG	CAGTGCGGCC	GCGGCCTTCT	CCAGGACGGC	CGCGGGGAGG	44700
		GCTCGTCATC	TTCTGCTGCC	AGGACCGCTG	GAGGAGGCC	GACGGCTCCG	CGGGCCAGCC	GTACGCCGG	CGCCGAAGA	GGTCTGCCG	GCGCCCTCC	
		TGGCTCAAGG	CCCCCTCGGT	CGTGGTGAGC	CCGGGACTGA	TCACATTGAC	CAGGACCCCG	TCGGGGCCCG	CGTCGCGGGC	CAGACTGAGA	GCGAAGCCGT	44800
		ACCGAGTTCC	GGGGGAGCCA	GCACCACTCG	GGCCCTGACT	AGTGTAAGTG	GTCCTGGGGC	AGCCCCGGCC	GCAGCGCCCG	GTCTGACTCT	CGTTTCGGCA	
		GCAGCGCCGA	CTTCGCCGCC	GTGTAGACCT	CCTGGCCCGC	CTGGCCCTTG	GCGGCCAGGT	GGGAGGAGAT	CAGGGCGATG	CGGCCGCGGC	CCTGGGCACG	44900
		CGTCGCGGCT	GAAGCGGGCG	CACATCTGGA	GGACCGGGCG	GACCGGGAAC	CGCCGGTCCA	CCCTCCTCTA	GTCCCGCTAC	GCCGGCGCCG	GGACCCGTGC	
		CATGGCGCCG	AGCGCGGTCT	GCACCGTGCG	GATCGTCCCG	GTCAGGTTGT	CGTCCAGGAA	CGCGGCCAG	TCCGCCGGGT	CCAGGCGTTC	GAAGCCCGGC	45000
		GTACCGCGGC	TCGCGCCAGA	CGTGGCACGC	CTAGCAGGGC	CAGTCCAACA	GCAGGTCCTT	GCGCCGGGTC	AGGCGGCCCA	GGTCCGCAAG	CTTCGGGCCG	
		CGCGGGCGTC	CCGCGGGCCG	GCGCACGGCG	TTCGCGACGA	GGACGTCGAC	CGTGCCGAAG	TGCCGCTCGA	CCGTCGGTAC	GAGGTCTCTG	ACCGAGCCGG	45100
		GCGCCCGCAG	GGCGCCCGGC	CGCGTGCCGC	AAGCGCTGCT	CCTGCAGCTG	GCACGGCTTC	ACGGCGAGCT	GGCAGCCATG	CTCCAGGAGC	TGGCTCGGCC	
		GCCGGGCCAG	GTCGTAGTGG	ACCGCCAGAG	CCCTGTCCCG	TCCGCCAGAT	TCGCGCACCA	GGCGGTCCGC	TGTGTCTTTC	GCGCCGCGAT	AGGTCAGCGC	45200
		CGGCCCGGTC	CAGCATCACC	TGGCGGTCTC	GGGACAGGCC	AGGCGGCTCA	AGCGCGTGGT	CCGCCAGGCG	ACACAGGAAG	CGCGGCCGTA	TCCAGTCGCG	
		GACGCGGGCG	CCCTCGGGCG	CGAAGGCGCG	CACGGTCGCC	TCCCCGATGC	CCCCGGTGCC	GCCCCGTGACG	AGGACGACCC	GGTCGGTCAG	TCCGAGATCC	45300
		CTGCGCCCGC	GGGAGCCGCC	GCTTCCGCGC	GTGCCAGCGG	AGGGGCTACG	GGGCCACGGG	CGGGCACTGC	TCCTGCTGGG	CCAGCCAGTC	AGGCTCTAGG	
	Start	ATCGGGGCTC	CTCAGCGGGG	ACGGGCGAGC	GGCAGCCGCC	CGAGCGCGGT	GGACAGGGCC	GGCCAGGACA	GTGCGGGCCC	ACGGGCGAGC	AGATAGCCGT	45400
	pokO2	TAGCCCCGAG	GAGTCGCCCC	TGCCCGCTCG	CCGTGCGCGG	GCTCGCGCCA	CCTGTCCCGG	CCGGTCTCTG	CACGCCCGGG	TGCCCGCTCG	TCTATCGGCA	

Start
pokC3

Stopp
pokT2

Start
pokT2

Stopp
pokO2

 Start <i>pokO2</i>	CGGGGCGGAC CAGGAGCCAT CCGCCGGGGG ACAGGCCGAG CCGTTCCGAG ACCCGTCCGT CGCTGTCGGG GATCATCTCC GGGTCGGTGG CCGACTTCGC 45500
	GCCCCGCTG GTCCTCGGTA GCGCGCCCC TGTCCGGTCT GGCAAGGCTC TGGGCAGGCA GCGACAGCCC CTAGTAGAGG CCCAGCCACC GGCTGAAGCG
	CTCCGTGACG CTCAGCACCG ACAGCCAGCC GCCGTGCTCC TGCCGTGCC GGCCGACCGC GTCGGCGACG GCGGGCTCGT GCGGCGCCGG GGCGTCCAGC 45600
	GAGGCACTGC GAGTCGTGGC TGTCGGTCCG CCGCACGAGG ACGGCACGGG CCGGCTGGCG CAGCCGCTGC CGCCCCGAGCA CGCCGCGGCC CCGCCAGTCC
	AGCAGCCAGC CGGGCCGGCG CAGTGCCGTG AGCAGTGCCG GCCAGCCGGT GCCCGTGAGG TCCGAGTCGG TGACCTCGGT GAGCCGGGTC CCCGGGCGGG 45700
	TCGTCCGGTCG GCCCCGCCGC GTCACGGCAC TCGTCACGCC CGGTCGGCCA CCGGCACTCC AGGCTCAGCC ACTGGAGCCA CTCGGCCAG CCGGCCGCC
	GGCCGCTGCC GCCGCCGGTG TCCGCGACGG TCAGCGAACG GTCCGCGTAC GAGAGCAGCA GCCCCGACAT CCCGCCGAGC ATCTCCCGCT GCATCCGCCT 45800
	CCGGCGACGG CCGCGGCCAC AGGCGCTGCC AGTCGCTTGC CAGGCGCATG CTCTCGTCGT CGGGGCTGTA GGGCGGCTCG TAGAGGGCGA CGTAGGGCGA
	GCGGATGGGG GCGACCCGGC TCACCACCCC GAAGATCACG GGCAGCGCCA GGTCCGTGAA CCGGCTGCGC AGCTCGATCA TCTGCGTGGC CTTCTTGGTG 45900
	CGCTACCCC CGCTGGGCCG AGTGGTGGGG CTTCTAGTGC CCGTCGCGGT CCAGGCACTT GGCCGACGCG TCGAGCTAGT AGACGACCCG GAAGAACCAC
	GACTCCAGGA GGGCCTCGCC CACCGGCACG CGCTCGCTGG TGTAGCTGTC CAGCAGCTCC GCACGGGCAT GTCCGTCGAT GACCATCGCG AGCTTCCAGG 46000
	CTGAGGTCCT CCCGGAGCGG GTGGCCGTGC GCGAGCGACC ACATCGACAG GTCGTCGAGG CGTGCCCGTA CAGGCAGCTA CTGGTAGCGC TCGAAGGTCC
	CCAGATTGAC GGCCTCCTGG ATGCCGGTGT TCATGCCCTG CCCGGACGCC GGGGTGTGCA CATGGGCCGC GTCGCCCCG ACCAGGCAGC GGCCACGCG 46100
	GGTCTAACTG CCGGAGGACC TACGGCCACA AGTACGGGAC GGGCCTGCGG CCCGACACGT GTACCCGGCG CAGCGGGCGG TGGTCCGTCC CCGGGTGCGC
	CATGGCCGGG ACCATGCGCT GCTGCGCCGT GAAGACGGAC ACCCAGGTCG GGGTGCCGAT CCGTACCCGG TGGCCGATGC CCTGGCTGAG CTTGCGCTCG 46200
	GTACCCGGCC TGGTACGCGA CGACGCGGCA CTTCTGCCTG TGGGTCCAGC CCCACGGCTA GGCATGGGCC ACCGGCTACG GGACCGACTC GAACGCGAGC
	AAACGCGCCG CGAGACGGCC GGGGTGCGCG TCGTAGTCGG TCTCGGCGGT GTCCAGCAGC CGCCACCGGT CGTCGGCGAG GGGCACCGCC ATGAGGGTGC 46300
	TTTGCGCGGC GCTCTGCCGG CCCCAGCGGC AGCATCAGCC AGAGCCGCCA CAGGTCGTCG GCGGTGGCCA GCAGCCGCTC CCCGTGGCGG TACTCCCACG
	CGCCCTCGGC GCGCACCCAG TAGATGCTGT TGGGCGGCAG CTCGCTGGTC AGGGGTGCGT CCGCCAGCAG CCAGGTCTGG TTGGCCTCGC CGATCAGCGG 46400
	GCGGGAGCCG CGCGTGGGTC ATCTACGACA ACCCGCCGTC GAGCGACCAG TCCCCACGCA GCCGGTCGTC GGTCCAGACC AACCGGAGCG GCTAGTCGCC
GAGTTCCAGG GAACGGCGTA CGGTGCTGTG CCCGCCGTCG CAGCCGACCA GCCACGGGGT GCGCACGGTC TCCCGCCGGC CGTCGGCATG GGTACGCCCC 46500	
CTCAAGGTCC CTTGCCGCAT GCCACGACAC GGGCGGCAGC GTCGGCTGGT CCGGTGCCCA CGCGTGCCAG AGGGCGGCCG GCAGCCGTAC CCAGTCGGGG	
ACCGTCACGC CGTCGTCGTC GCGCGCGATC CGCTCCAGCT TCGTACCCCA TTCGGGGACC ACTCCGAGGT CCGCGAGCGC GTCGCGAAC ACCTCCTCGG 46600	
TGGCAGTGCG GCAGCAGCAG CGCGCGCTAG GCGAGGTCGA AGCATGGGGT AAGCCCCGGT TGAGGCTCCA GGCCTCGCG CAGCGCCTTG TGGAGGAGCC	
TCGCCGTCTG CTCGATGGCG AGCGTGAAGG GGAACCGGGT CCGCATCGTC GAGTAGTCCG CGTCSAGGCG GCGGAGCCGG CGACCGTCTT GGAAGAGGGT 46700	
AGCGGCAGAC GAGCTACCGC TCGCACTTCC CTTGGCCCA GCCGTAGCAG CTCATCAGGC GCAGSTCCGC CCGCTCGGCC GCTGGCAGGA CTTCTCCCA	
GAAGGCCCGG ATCTCCCGGC CCGCTTGAGC ATCTCYTCGA CCAGGCCAT TTGTTGTACG CCTCCAGGTG CGCGGATGCG TGGCGACGGC GCGGTGGTG 46800	
CTTCCGGGCC TAGAGGGCCG GGCGAACTCG TAGAGRAGCT GGTCCGGGTA AACAACATGC GGAGGTCCAC GCGCCTACGC ACCGTGCCC CGCCGACCAC	
TTCGCGGGCG CGTCCTTCGC GTCGAATGAG ACGCAACGGA TTCCGCGGCG GCGGAGTTCG AACGCCAGGG CGAGCCCCAC CGGGCCGGCC CCCGCCACGA 46900	
AAGCGCCCGC GCAGGAAGCG CAGCTTACTC TGCGTTGCCT AAGGCGCCGC CCGCTCAAGC TTGCGGTCCC GCTCGGGGTG GCCCGGCCGG GGGCGGTGCT	
GTACCTGGGG AGTGCGAGGT CCTTTCGTCA CTGCCATCCG ATCCTCTGCT GCCGAAGGTC ATCCGCTGCT GCCGAAGGTC ATCCGCGCCC CAGGCTCGGG 47000	
CATGGACCCC TCACGCTCCA GGAAAGCAGT GACGGTAAAGC TAGGAGACGA CCGCTTCCAG TAGGCGACGA CCGCTTCCAG TAGGCGCGGG GTCCGAGCCC	
CACCCTGCTG GAGCCCCCT CACTCGTGG TCGACGGGGC GCGGACCGG TCGACGGGTC CTCGACCCGG GCTCCAGAAG TCCCCGCAAG GGTGAGGGCA 47100	
TGCGCACTGC CTGGTACGAC CTCGACTTCG CCCGTGCGCT CCGGCGCCGC ATCGGACGGG GCCTGTGCAC GCGGCTGGCG GGGCTCGGCC TGGCCCGCG 47200	
CCGATGGCA CCGGACCCGG CGCTGCTGGA CGGGGATCCG CGCACGCCGC CGTACGGGGA CGACAGGGAC AACGGGGATA CGCCGCACAG GGACTGGAG 47300	

Start <i>pokO4</i> ↓ Stopp <i>pokO4</i>		GTTCG ATG AA	CACCGACGTC	GTCGTGGTCTG	GAGGGGGCCC	GGTCGGTCTG	CTGCTCGCCG	CCGAACTGCG	GCTCGGGGGC	GCCCCGTGG	TCCTCCTGGA	47400
		GCGGCTGACG	GAGCCGAGCG	GGCACTCCCG	GGCCTTCCGC	ATGCAGGCGA	GGATGCTGGA	CGTCCTGGAC	CAGCGAGGCC	TGCTCGACCG	GTTCAAGGAG	47500
		GGCAACCGGA	CCTGGCCGAA	AGCCCATTTT	GCGGGCCTGG	AACCGTTGCT	CGACTTCGGG	CACCTGCGCA	ACGAGCACCC	CTACGCCCTG	CTCATCCCCG	47600
		AGGCGCGCAC	CGAGGAGCTC	CTGGAGGAGC	ACGCCCTGGC	GTGCGGAGTC	GAGATCCGCC	GCGGGCACAC	GCTCCGGGGG	CTCGACGCCA	CGCCCTCCGA	47700
		CGTCGTGGCC	GAGGTCGAGT	CGCCCGAGGG	CACCTACCGG	TTGCGTCCC	ACTACCTGGT	CGGCTGCGAC	GGCGGTGCA	GCACCGTCCG	CAAGCTCGCG	47800
		GGCATCGGTT	TCGGCGGCTC	GCCGCCACG	GTCCGGGCGC	TCCTCGCCGA	CGTGGAAGT	GCCGACCCG	GACAGTGCC	CAACGGAGTG	CCGGGCACCA	47900
		TGCGCACCCC	CCGGGGTCTG	CTGATGGCGA	TCTCCCTGCA	ACCCGGCGTG	ACCCGGGTGC	TCACCACCGA	GTTACCCCG	CCGGAGCCG	GCTCCGAGCA	48000
		CGCGCCGGTG	ACCCTGGACG	AACTGCGCGA	GACGGTGC	AGGATCACCG	GCATCGACGT	CGCGATGGAC	CGGCCGCGCT	GGGTGTCCC	GTTGCGCGAC	48100
		ACGACCCGGC	TGGCGGACAC	CTACCGGCAG	GGCCGCGTGC	TGCTCGCCGG	CGACGCGGCC	CACGTGCACT	TCCCCATAGG	AGCGCAGGGC	CTCAACCTCG	48200
		GCCTCCAGGA	CGCCGTGAAC	CTCGGTGGA	AGCTGGCCGG	GACCATCGTC	GGATGGGCGC	CGCCCGACT	GCTCGACAGC	TACGGCTCCG	AGCGCCGCC	48300
		GGTCGCCGGG	CGCGTGCTGC	GCGAGACCCG	GGTGCAGCTC	CTGCTCATGG	CCCCGACCC	CAAGTTCGAC	CCGCTCCGCG	AGATGTTTCG	GGAGCTTCTC	48400
		GCGCTCCCCG	AGGTCAACAG	CCGTCTCGCG	CACGAGATGA	CAGGCCTGGA	CGTCCACTAC	GCCGCGGCCG	CGGGCCGCTA	CGAGCACGGC	CTGCTCGGCC	48500
		GCCCCTGCCC	TCCGCTGCCG	GCCTCGGTCTG	GTGACGAGGT	CCGCACGGTC	CTGCGCACGG	GCCGCGGGGC	ACTGCTCCTG	CCGGAGGGCC	CGGCCGAGGA	48600
		GGCCGCGCGG	CTCGCCACCG	AGTGGTCGCA	CCGCGTCGGC	CGGGTCGCGA	CCGAGGACGG	ACAGGGCCTG	CTGCTCCGAC	CCGACGGCCA	TGTCGCTGG	48700
		GTGGACCCCG	GCGACGGGGT	GCCCCGCAAG	GACGTGCTGC	TGGAGCTGGA	GGACGCCCTG	CGGCGTGGT	TCGGCGCTCC	CGGCTGCACG	GTCCTGTCCC	48800
		GCAACGACGA	CACGCGCCGGC	AG GTGA CCGG	GATGCGTACG	CGCAGGCTCG	CGGTGGCAGG	CAGCTTCGAG	TTCACCCCG	AGATCCACAC	GGACGCGCGG	48900
Start <i>pokS7</i> ↓ Stopp <i>pokS7</i>		GGGCTGTTTCG	TGTCGCCCT	TCAGGAGGAG	GCGTTCTGTCG	CGGCGTCCG	CGAGCCGTTT	GTGACCGCGC	AGACGAACCA	CAGCCGCTCC	GCCCCGGGCG	49000
		TGCTGCGCGG	GCTGCACTT	ACGACCACAC	CTCCCGCCA	GGCCAAGTAC	GTGACTGCG	CGCAGGGCCG	GGCCCTCGAC	GCGGTCGTCG	ACATCCGGCT	49100
		CGGCTCACCG	ACCTTCGGCA	AGTGGGACAT	CGTGGAGATG	GACGCCGTCT	CCTACCGTGC	CGTGTACATC	CCCGACGGCG	CCGGGCACGC	CTTCTCGCG	49200
		CTCGACGACG	ACACCGTGAT	GTCGTACCTC	GTCTCCAGCG	CCTACCGGAC	CGAACTGGAG	CAGGCCGTCG	ACCCGCTGGA	CCCGGCCCTC	GGCCTGCCGT	49300
		GGCCGTACGA	CATGGAGTTC	GTCATGTCGG	AGCGCGACAC	GACCGCCGTC	TCGCTCGCCG	AGGCGGAGGC	GCGGGGGATG	CTGCCCGCT	ACGAGGACTG	49400
		CCGGCAGTGG	CCCGCGGAAG	CGGAACCCGG	CCG GTGA GCG	AGGCGCCCGC	GAGAGGGCCG	GCGGCATCCG	GCGCGAACGG	ACGGGTCGCG	GTCATCGGCG	49500
		CGACCGGGTG	CGTCGGCAGG	CAGATCGCCG	AGGCCTTCGC	CGCCCGCGGC	ACCGAAGTGG	TCGCCGTCGC	CCGCCGGCCC	GCACCGCACG	TGGCCGCCCA	49600
		TCGGTTCGTC	GCGCTGGACG	TCGCCGCCGC	ACCCGCCGAA	CGGCTCGCCG	AGTCTCTGGC	CGCGCAGCGG	GTGGACGCGG	TGGTGAACGC	GACGCTCGGC	49700
		TGGGGCGAGG	AACTGCACGC	CATCAACGTC	CACTTGGTGG	AGCGACTGGT	GGACGCACTG	AAGAAGACGC	CCGAGCCACC	GCGCCTGGTG	CAGCTCGGCA	49800
		CCATCCACGA	GTACGGGGCC	GTCCCCGGG	GCACCTCCAT	CGACGAGCGG	GTCCGGCCGG	ACCCGAGACA	GCCCTATCCC	CGGTCCAAGT	TGGTGGCGGC	49900
Start <i>pokS9</i> ↓ Stopp <i>pokS9</i>		CCGCCTGGTG	CTCGACGCCG	CGCGCGCCGG	GGAACCTGAC	GGTGTGGTGC	TGCGCCTCAC	CAACACCATC	GGGCCGCATC	CCGCCGCCGA	GAGCTTCTTC	50000
		GGCTCCCTGG	CCGCGCGGCT	GCGCGACGAG	CCGGGGACGG	TCGACCTGAC	GCTGGCCGAG	GCGCACCGCG	ACTACGTCGA	CTCGCGCGAC	GCGGCGGACG	50100
		CGGTGGTGCT	GGCCGCCGAA	AGTCCCAGCG	CCCACGGGGT	GTTCAACATC	GGTACCGGCC	GCGCTCGCGA	CATCCGACC	CTGGTCGCCG	CGCTGGTCCG	50200
		CGCTCGGGG	CGCCCGCCGG	ACTCGGTGCG	CGGGCACCCG	GGAGCCGTGC	ACAGCCGTGG	CGCGGACTGG	ATCCAGGTCG	ACAGCACACG	GGCACGGCGG	50300
		CTGCTCGGCT	GGAGCCCGCG	CCACGACCTG	GACGCGTCGA	TGCGGGCGAT	GTGGGAGACG	GTGCGCGCCG	AACGGGTCCC	AGGGGCCCGG	TGA TCGGGCA	50400
		GGGGCCCCCG	ACGCACGGTG	ACCGGGCAAG	AGGCTCCAGG	TGCACGGTGA	CTGGACAAGA	GGCCCCGGGT	GCACGGTGAT	CGAGGCCCGG	CGGAGGAGTG	50500
		GCGGTGGGCG	TCGGAGGGGG	CTCGGAAAT	CCCTCTGCCG	CGTCATCGGC	ATTCCCAAGT	TCTGCAACAC	GTTTACTCT	GTGCGCCGAC	CAGCCGGGAG	50600

Start	AACCAGCTCG	GGCACCGGGC	AACAGGAGGC	GCC GTG CATC	TCGAATACAC	GCCGGATCAG	CAGCGTCTGC	GCACCGAACT	GCGCGACTAC	TTCGCCCAGT	50700
<i>pokU3</i>	TGGTACCCGA	CAACGCCTAC	GCCCGGTACG	CCGACCCCGC	CTCGCAGAAG	CGGTTCTACC	GCGAGACCGT	CCGGCGCCTG	GGCGCGGACG	GCTGGCTCGG	50800
	GGTCGGATGG	CCGAAGGAGT	ACGGCGGGCG	CGGGCTGACC	CCCATGGAAC	AGTTCATCTT	CTTCGACGAG	GCGGCCCAGG	CGGGCGTGCC	CCTGCCCCTG	50900
	ATGGCCCTGA	ACACCGTCGG	CCCGACGATC	ATGCAGTTCG	GGACGGAGGA	ACAGAAGTCC	CACTTCCTGC	CCAGGATCCT	CTCCGGCGAG	ATCGACTTCG	51000
	CGATCGGCTA	CAGCGAGCCC	GACGCGGGCA	CCGACCTCGC	CGCGCTGAAG	ACCAAGGCGG	TCCGCGACGG	CGACGGCGAC	TACGTCGTGA	ACGGGCAGAA	51100
	GATCTGGACG	ACGAACGGCG	ACACCGCCGA	CTGGGTCTGG	CTCGCCGTCC	GCACCGACCC	CGACGCCCCG	CCGCACAAGG	GCATCACCAT	GCTCCTGGTG	51200
	CCGACCTCCG	ACCCCGGCTA	CTCGTGACG	CTGATCAACA	CACTCGCCTC	GCACGACACC	ACCGCCAGCT	ACTACGAGAA	CATCCGGGTC	CCCGTCACCC	51300
	GCCGGGTCCG	CGAGGAGAAC	AAGGGATGGC	GGCTGATCAC	CAACCAGCTC	AACCACGAAC	GCGTGACGCT	CGCCGCGCAC	GGCACCATGG	CGATCCGGGC	51400
	CCTGCACGAC	GTGCAGCGCT	GGGCCATGGA	GACCAAGCTC	ACCGACGGCC	GCCGCGTGGC	CGACCTCCCG	TGGGTGCGCC	GCCGGCTCGC	GCAGACGCAC	51500
	ACCCGGCTCG	ACGCCATGAA	GCTGCTCAAC	TGGAAGATGG	TGAACGCCGT	CCAGGAGGGC	ACCCTCACCC	CGCAGGACGC	CTCCGCGGTC	AAGGTGTACG	51600
	GCTCCGAGGC	GCGCCGCGAC	GCGTACGCCT	GGCTGATGGA	GATCGTCGCC	GCGCCCGGGG	TGCTCAAGGA	GGGCTCCGCG	GGAGCCGTTT	TGCACGGCGA	51700
Stopp	GCTCGAACGT	GGTTACCGCT	CCGCGGTGAT	CTTCACCTTC	GGCGGCGGCA	ACAACGAGAT	CCAGCGCGAG	ATCATCTCGT	GGATCGGACT	GGGGATGCCC	51800
<i>pokU3</i>	CGGGTCCGGC	GT TAG CCTGA	CACG GTG GAG	AGCACGTTCC	CGGGCGACCC	GGGACTCTTC	GGCCCCGGCT	CCGTGACCTG	GCAGATGCAC	GGCGACCCGA	51900
	TGATGTGGGT	CGCCGGCATC	CGCGCGCTGT	ACCTCCAGGC	CCTGCACCCA	CGCGTCGTGC	GCGGGGTGAC	GCAGAACTCC	GACTTCCGGC	GCGACGCCTG	52000
	GGGCCGGCTG	ATGCGCACCG	CGAACTTCGT	CGGCACGACG	ACGTACGGCA	CCGGTGAGGC	CGCCGAGAAG	GCAGGGGCGA	GGGTACGAAA	GATTCACAGC	52100
	ATGCTCACGA	CCA									52113

Start
pokX



6.4.2 myo-Inositol-Metabolismus-Gensequenz

Sequenzabschnitt (6,9 kb) auf dem Cosmid CB30-4E08 aus *S. diastatochromogenes* Tü6028 mit *myo*-Inositol-Metabolismus-Genen

	GATCGCCACC	GCGTCCGCG	AACCGCACGC	CTGCGCCCAG	GCGTTGCTCG	ACGCGGGCGT	CGAACTCGCC	GTCGTCAAAA	AGGGCCCGGA	CGGAGTCCTC	100	
	GCCGTCCACC	GCGACGGCAC	CGTAGCCGAG	GTCCCGCCCG	TCCCGTTCGA	GGTCGTCAAC	GGCCTCGGCG	CGGGAGACGC	GTTCCGGCGC	TCGCTCTGCC	200	
	ACGGTCTGCT	GGCCGGCCTG	CCGTTGGAGA	AGACCATCCG	GTACGCCAAC	GCGGCCGGGG	CGATCGTCGC	GTCCCGGCTC	GCCTGCTCCT	CCGCCATGCC	300	
↓ Stopp orf2-A	CACCGAGTCC	GAGGTTCGAGG	ACCTTCTCGC	GCGCGGCTGA	CCGAGGCCAC	CCCCGAACGG	AGCCCGACTT	GAGTATCAGC	ATCCCGGACC	TCGTACCGGT	400	
	Start orf2-B	GCGTGCCCGG	CACCCGGAGG	CCATCGCAGA	GGCGGCCGCG	CGCCGTGTCC	GCCGCCCGTT	CGTCGGCGAC	AGCGGCCGGC	TGATGATCGT	CGCCGCCGAC	500
		CACCCCGCCC	GCGGCGCGCT	CGGCGTCGGC	GGTCACCGGC	TCGCCATGGC	GAACCGCGCG	GATCTCCTCG	AACGTCTCTG	CGTCGCGCTG	TCACGGCCCCG	600
		GCGTGGACGG	GGTGCTCGGC	ACCGCCGACA	TCCTCGAGGA	CCTGCTGTCT	CTGGGCGTCC	TGGAGGGAAA	GGTCGTGATG	GGCTCCATGA	ACCGTGGCGG	700
		GCTCGCCGGG	TCGTCAATCG	AGATGGACGA	CCGCTTCACC	GGCCACCGCG	CCGAGGACAT	CGAACGGCTC	CGCTTCGACG	CCGGCAAAGT	CCTGCTGCGC	800
		ATCGACCACG	ACGACCCCGG	ATCACTGGAG	ACCCTGGAGA	GCGCCGCCCG	TGCCGTGAC	GACATGGCGG	CCCGGCGACT	CCCGTGTTT	GTCGAGCCGT	900
		TCGTCTCGCG	CCGGGTGGAC	GGCACGGTCC	GCAACGACCT	CGGCGCCGAG	GCCGTACCC	GTTCCATCGC	CATCGCCTCT	GGGCTCGGCG	GCACCTCCGC	1000
		CTACACCTGG	CTCAAACCTC	CCGTCAACCAC	CGACCCCGAC	GACATGGCCC	AGGTGCTGGA	GACCTCCACC	CTGCCCGCGG	TGCTGCTCGG	GGGCGATGTG	1100
	Stopp orf2-B	GCCGGGGACC	AGGAGGGCGC	CTACGAGAGA	TGGCGCAAGG	CCCTGCGGCT	GCCGACCGTC	CAGGGCATGG	TCGTGCGCCG	GTCGCTGCTG	TATCCCGCCG	1200
		AAGGCAGCGT	GGAGACCGCG	GTGGACACCG	CGGTGCGGCT	GCTCTGAACC	ACCGTGCGGG	AGCCTCCCGC	CGGCCCTGCG	CGGCAGCCGC	TTGCCGAAC	1300
		TCCGGGCAGG	AGCAACCCGA	TTGACGCCCT	GCGCACGGCC	TCCCGCCCGG	TCCGGTGGGC	GAGCCTCCCG	CCCGGTCCGT	GGACGAAGCC	ACTCGCCCGA	1400
		TCTTGTGGAC	GAGCTTCCCG	CTCGGTCCTG	TGGACGAGGC	ACCAGCCCAG	TCCCGAGGAC	TAGGCACCAG	CCCGATCCGG	GCACGAGCCA	CCCGTCCGAA	1500
Start orf2-C		CCCCCTTGCC	CGAGCCACCG	CCCGAACCC	ATGCACGAAT	CACCGTCCCA	ACCCCTTGC	AGGAGCCGCC	CGATGACCAC	CGCGCACCAT	CTCCCGCGG	1600
		GCAAGGCCCG	GACCGGCGCC	TACGCCGTGG	ACGTGAACCC	CGGGTCCGCG	GGCTGGGGCC	ACTCCAGCCT	GCGCGTGCTG	GAAGTGCCGC	CCGGCGGCAC	1700
		GCACGGCCTC	GACACGGCG	ACAGCGAATG	GATCGTGCTT	CCGCTGTCCG	GCGGATGCGC	CGTCTCCGTC	GACGGCGAAT	CGTTCCCTT	GACCGGCCGG	1800
		GCCGATGTCT	TCAGCGGCGT	CACCGACTTC	GCGTACCTGC	CTCGCGACGC	CCACGTCTCG	ATCGTCTCCG	AGGGCGGCGG	ACGGTTCGCG	CTCACCGGAG	1900
		CCCGCTGCAC	CCGCCGGCTG	CCCGCACGCT	ACGGCCCCGC	CTCGAACGTG	CCGGTCCGAA	TGCGCGGACG	CGGCACCTGC	TCCCGGCAGG	TCAACAACCTT	2000
		CGCCGCCGCG	GCCCCGCGG	GAGCCGGCCC	GGAGTACGGG	TTCGAGTGCG	ACAGCCTCAT	CGCCGTCGAG	GTGATCACCC	CCGGCGGCAA	CTGGTCTCTC	2100
		TTCCCTCCGC	ACAAGCACGA	CGAGCACCGG	CCGGGCACCG	AGTCCGAACT	GGAGGAGATC	TACTACTTCG	AGTTCGCGG	CCACCGGGGC	ACGCCGGGCC	2200
		TCGGCTACCA	CCCGTCTCG	CCCTGGGGAG	ACGGACGCGG	CACGGACGTG	CTCGCCGAGG	TCCGCGACGG	GGACGTGCTC	CTCGTCCCCG	ACGGTGGCA	2300
Stopp orf2-C		CGGACCGTCC	ATGGCCGTGC	CGGGCCACCA	CATGTAATAC	CTGAACGTCA	TGGCGGGACC	CGGCACCGAG	CGCGCCTGGC	TGATCTGCGA	CCACCCCGAC	2400
	Start orf2-D	CACGCTGGA	TCCGCGACAC	CTGGGCCGAG	CAGCCCCTAG	ACCCCGACT	GCCCCTTAC	ACCGCCCCCG	AGAGTCCCG	ATGAGCCCCA	CCACGCGCCG	2500
		CCTGACGACC	GCTCAGGCC	TGGTGCCTT	CCTGTCCGTC	CAGTACAGCG	AGCGCGACGG	CGTACGCCAC	CGGCTGATCG	CCGGCACCTG	GGGCATCTTC	2600
		GGACACGGCA	ACGTGGCCGG	CATCGGACAG	GCGCTGCTGG	AGGCCGGCGA	GGACGCCATG	CCCTTCCACC	AGGGGCGCAA	CGAACAGGCC	ATGGTGCACG	2700
		CGGCCGTGCG	CCACGCCCGC	CAGCTCGACC	GCCTCTCCGC	GCAGGCCGTC	ACCACCTCGA	TCGGCCCCCG	CGCCACCAAC	CTCGTACCG	GCGCGCCCT	2800
		CGCGACGATC	AACCGGCTGC	CCGTAATGCT	CCTGCCGGGC	GACTACTTCG	CCGCCCGCTC	CGCCGATCCA	CTGCTGCAGC	AGCTGGAGCA	CCCCGTCGAG	2900

	GCCGACGTCT	CCGTCAACGA	CGCACTGCGC	CCGGTCTCCC	GCTACTTCGA	CCGGATCACG	CGCCCGGAGG	CACTGATCCC	GTCCGCGCTG	AGCGCCATGC	3000
	GCGTCTGAC	CGACCCTGCC	GAGACCGGCG	CCGTACGCT	CGCGCTGCC	CAGGACGTAC	AAGCGGAGGC	GTACGACTGG	CCCGAGGCGT	TCTTCGCGGA	3100
	ACGCGTGTGG	CCGGTACGCC	GTCCCGCGCC	CGACCCGGTC	GAACTCGCCG	AGGCCGTACG	GGCGATCCGC	GCCGCCCGGC	GCCCTCTCCT	CGTCGCGGGC	3200
	GGGGGAGTGC	ACCACAGCGA	GGCCGAGGAC	GCCCTCCTGG	CGTTCGCCGA	CGCCACCGGA	GTCCCGGTCTG	CCTCCACCCA	GGCCGGCAAG	GGATCGCTGC	3300
	GCCACGACCA	CCCCGCCGAC	CTCGGCGGCA	TCGGCCACAC	CGGCACCGCC	GTCTGCGACG	CCGTGCGCG	CACCGCGGAC	CTGGTCATCG	GCGTCGGCAC	3400
	CCGCTACAGC	GACTTCACCA	CCGCGTCCCG	GACTGTTC	CAGAATCCCG	CCGTCCGCTT	CGTCAACCTC	AACATCACCG	GCCTCGACGC	CCACAAGCTC	3500
	GCCGCCCGGC	CCCTGGTGGC	GGACGCGCGC	ACCGGCCTGG	AGGCGCTGAC	CGCGGCCCTC	ACCGGGCACC	GCGTCGACCC	CGCGTACGAG	GCCGAGTACC	3600
	GCGAGGGCAA	ACGCCGTTGG	GAGGGGATCG	TCGGGGCGGC	CTTCCGCGCA	CCGGACGAGC	ACGCGGTCCC	GACCCAGACG	CAGTCTCTCG	GCGTCTTGGA	3700
	CTCCGTCGTC	GGCGACGACG	ACGTGATCGT	CAACGCGGCC	GGATCGCTGC	CCGGCGACCT	GCACAACTG	TGGCGGGCCC	GCGGCCCGCG	CCAGTACCAC	3800
	CTGGAGTACG	GCTACTCCTG	CATGGGCTAC	GAGATCCCGG	CCGCCGTCCG	AGTCCAGCAG	GCCGCGCCGG	ACACCCCGGT	CTGGGCACTG	GTCGCGGACG	3900
	GTACGTACCT	GATGATGCC	ACCGAGATCG	TCACCGCCGT	CCAGGAGCAC	CTGCCGTCA	ACCTGGTGCT	GATCCAGAAC	CACGGTTACG	CCTCCATCGG	4000
	AGCCTGTCC	GAGGAGACCG	GCGGCGAACG	CTTCGGAACC	GCCTACCGCT	ACCGCGCCCC	CGACGGCACC	TTCTCCGCG	ACCCGCTCCC	GGTGACCTC	4100
	GCCGCCAACG	CCGCCAGCCT	CGGCATGGAC	GTCTCCGCG	CCAAGACCGT	GGGCGAACTC	CGCCACGCC	TCGCCGAAGC	GCGCGGCTCG	CAGCGCCGA	4200
Stopp	CCTGCGTGTA	CGTCGAGACC	GACCCGGCGC	CCACCGCCCC	GGCGGCCGAG	GCCTGGTGGG	ACGTGCCCGT	CGCGGAGGTC	GCCTCCCGCG	AACCCGCCGT	4300
orf2-D	ACGTGCCCGT	GAACGGTACG	ACCGTCGGGC	CGCCGACCGC	CGGCACCACC	<u>TCTGA</u> ACTCC	CCGCCGCCCG	AGGACCCCCG	CACCGGGGGC	CCGGTGGACC	4400
	GACCGTCAGG	AGGACACGAT	GCCAAGGGGG	CGAACCCGGC	AGGCCGCCCG	ATCCCCGCGG	GCGACGACCG	CAGTCCC GCC	CGCGGACCTC	GACTTACGCG	4500
Start	TCGACCGGAA	CAGTCCCGTG	CCGCTCTACT	ACCAGCTCGC	ACGGCAGTTG	GAGGCAGCGA	TCCAGCGGGG	CACACCCGCC	GCCGGAAGCC	TGCTCGGGAA	4600
orf2-E	CGAGGTCGAA	CTCGCGGGAC	GCCTCGGCCT	GTCCCGCCCC	ACCGTCCGCC	AGGCCATCCA	GACCCTGGTC	GACAAGGGAC	TCCTGGTCCG	TCGGCGCGGC	4700
	GTGGGTACGC	AGGTCGTGCA	CAGCCAGGTG	AAGCGCCCGC	TGGAACTCAC	CAGCCTCTAC	GACGACTTGG	AGAGCGCGGG	CCAGTCCCC	ACGACTCTCG	4800
	TCCTGCACAA	CGCGGTCGAG	CCGGCGGACG	CCGAGGTCGC	CGCCGCGCTG	GGCATCGCGG	AGGGCGGCGG	AGTCCACCGT	CTGGAACGAC	TGCGCCTCAC	4900
	CCACGGCCCG	CCCGTGGCCG	TCCTGTGCAA	TCACATCCC	GAGGGACTCC	TGGACCTCGA	CACCGCCCGG	CTGGAGTCGA	CCGGGCTGTA	CCGCATGATG	5000
	CGTGCGGCCG	GCATCACCT	GCACAGCGCC	CGCCAGTCGG	TCGGCGCCCG	CTCGGCCGGC	GCCGGCGAAG	CGGAACGCC	GGACGAACCG	GCGGGCGCGG	5100
Stopp	CCCTGCTCAC	CATGCGACGC	ACCGCGTACG	ACGACACCGG	CCGCGCGGTC	GAGTACGGCA	CCCACATCTA	CCGCGCCTCG	GGGTACGCC	TCGAGTTCCA	5200
orf2-E	ACTGCTCGTC	CGGCCCTGAG	CGCGGAACGC	GGGGCCGACC	GGACGCGGAG	GCGGGTGCCA	GGCGGCCGGA	CCGCCGCGC	GCACGCGCG	CGCCGGCGGT	5300
	CCGGCGCCCG	ACGCGGGGGA	GTGGGCGGGG	CGGTGCGACG	CCGTACTCCC	GGGGGCCGCG	GAGCCGGGCT	CAGACGCCCT	TGCGGGCGGC	CTCGCGGCGC	5400
Stopp	GGCCGCGGCC	TGCGCCCCCT	CACCCGCCCC	GCCACGCTGC	GGCATGAGGG	CCCCCGGCGC	CTCGGCCCGA	<u>GT</u> CTGCGGGA	ACGCCGCGG	GAGCGCCCGG	5400
orf2-F	TGCCGCTTGC	CCAGCGGCGC	CTGGGACAGG	TCCTCGGCCT	GCGACCTGAG	GTTCTTGTAC	CCGTATCCGC	GTGCGCCGAG	CCAGGCCTC	GCGGTTCTCT	5500
	ACGGCGAACG	GGTCGCCGCG	GACCCTGTCC	AGGAGCCGGA	CGCTGGACTC	CAAGAACATG	GGCATAGGCG	CACGCGGCTC	GGTCCGGGAG	CGCCGAAGGA	5500
	CGGCGCGTTC	GGTCGCCTCC	AGGATGTCGT	CCTCGGCCTC	CCCCGAGTCG	AGGAAGCGGA	AGGTGAAGGC	GGGGCGTGCG	GCGATGTCGT	AGCTGAGGTG	5600
	GCCGCGCAAG	CCAGCGGAGG	TCCTACAGCA	GGAGCCGGAG	GGGGCTCAGC	TCCTTCGCTT	TCCACTTCCG	CCCCGCACGC	CGCTACAGCA	TCGACTCCAC	5600
	ACCCTCGGGG	GTGAACGCCG	CGCGCAGGAC	GTCGTGCTCG	GCGGCCCGTG	CCAGGAGTTC	GGCCCGCTGG	TCGGTGCCGA	GCCCGTCGAA	GACACCGCGA	5700
	TGGGAGCCCC	CACTTGCGGC	GCGCGTCTTG	CAGCACGAGC	CGCCGGGCAC	GGTCTCTAAG	CCGGGCGACC	AGCCACGGCT	CGGGCAGCTT	CTGTGGCGCT	5700
Start	ACGGTGATGC	GGAAGGTGCG	CGTACTCATG	ACGCGAGCCT	AAGCACCGCC	GGGGTCTGTCG	CTCCAACGGG	TTTTTCGCGGA	CGCGAGGTAC	CCGCACCTCT	5800
orf2-F	TGCCACTACG	CCTTCCACGC	GCATGAGTAC	TGCGCTCGGA	TTCGTGGCGG	CCCCAGCAGC	GAGGTTGCC	AAAAGCGCT	GCGCTCCATG	GGCGTGGAGA	5800



Stopp
orf2-G



CCGGGCGGCA	CAGCCACCCC	CGCGCCTCT	CCCCACTCGT	CCTCTGTCCC	TGCCGTCCCC	CGGCGAAGCC	TCGCCCTGCC	CCGCACCCCG	CAGGGCTCCG	5900
GGCCCGCCGT	GTCGGTGGGG	GCGCGGGAGA	GGGGTGAGCA	GGAGACAGGG	ACGGCAGGGG	GCCGCTTCGG	AGCGGGACGG	GGCGTGGGGC	GTCCCGAGGC	
GTCATGCCAG	GCTCACCCAG	GAACCCCGCT	CGGCGGAGCG	TGCCATCGCG	TCGAGCGTCT	CCGCGCTGTG	CACCGCGTCG	TCGAGCGTCG	CCCCGTACGG	6000
CAGT ACGGTC	CGAGTGGGTC	CTTGGGGCGA	GCCGCCTCGC	ACGGTAGCGC	AGCTCGCAGA	GGCGCGACAC	GTGGCGCAGC	AGCTCGCAGC	GGGGCATGCC	
AGTGCCGTCC	TCGATGGACC	GCAGGAAGTG	GTGCGCCTCG	ATGACCTTGA	GGTCGTCGTA	GCCCATGCTG	TTGGCCGCGC	CCGGCTGGAA	GGCGGCGTAC	6100
TCACGGCAGG	AGCTACCTGG	CGTCCTTAC	CACGCGGAGC	TACTGGAAct	CCAGCAGCAT	CGGGTACGAC	AACCGGCGCG	GGCCGACCTT	CCGCCGCATG	
TCGCCGTGTC	CGGGGCCAC	GTACACCGTG	CTGACCGGCT	GGTCCTGGTA	GGCCGTGCC	CGGCTGACCG	CGAGCTCGCC	CATGCGGCGG	AAGTCCCAGA	6200
AGCGGCACAG	GCCCCGGTG	CATGTGGCAC	GACTGGCCGA	CCAGGACCAT	CCGGCACGGG	GCCGACTGGC	GCTCGAGCGG	GTACGCCGCC	TTCAGGGTCT	
ACACCGCGCC	CCGGGTGCCG	TGCACCTCGA	AGCCGTAGTT	GTTCTGCTCG	CCCACCGAGA	CCCGGCACGC	CTCCAGCACG	CCCCGGGCGC	CGGAGACGAA	6300
TGTGGCGCGG	GGCCACGGC	ACGTGGAGCT	TCGGCATCAA	CAAGACGAGC	GGGTGGCTCT	GGGCCGTGCG	GAGGTCGTGC	GGGGCCCGCG	GCCTCTGCTT	
GCGCAGCAGA	CAGCCGACGT	AGTCCTCGTT	CTCCACGGTG	CCGAGCTCAC	CGCCCGTGC	GCGTGCCTGG	CCGGCCGTCG	CACCCGCCGG	ACGTGCCCGC	6400
CGCGTCGTCT	GTCGGCTGCA	TCAGGAGCAA	GAGGTGCCAC	GGCTCGAGTG	GCGGGCAGCG	CGCACGCACC	GGCCGGCAGC	GTGGGCGGCC	TGCACGGGGC	
CGTGGCAGGA	AGACCGCGGT	GTCCGCGGTG	AGCGCCTCGA	TCTCGCCGAG	CAGGTGCCGG	GCCAGGTCCA	CGCCGTGCGA	GGCCAGGTG	CCCAGGACGC	6500
GCACCGTCCT	TCTGGCGCCA	CAGGCGCCAC	TCGCGGAGCT	AGAGCGGCTC	GTCCACGGCC	CGGTCCAGGT	GCGGCACGCT	CCGGTCCAGC	GGGTCTGCG	
CGCTGCCGCC	GCGCTCCCTC	TCGTAGCGCC	AGGTCAAGTC	CCCCTCAGGG	TGTGCGGCGT	AGTCGCTGAG	GAGCCGGATG	CGGACATGGG	TGACGGTACC	6600
GCGACGGCGG	CGCGAGGGAG	AGCATCGCGG	TCCAGTCACG	GGGGAGTCCC	ACACGCCGCA	TCAGCGACTC	CTCGGCTTAC	GCCTGTACCC	ACTGCCATGG	
GATCTGCCG	GAGGAGATCA	GTTGCGGGC	GGCGGCGACG	GCCGGCGCGT	TGCGGTAGTT	GAAGCCGACG	GTGCCCTGCA	CCCCGGCCTT	GGCCGCGGCC	6700
CTAGAGCGGC	CTCCTCTAGT	CAAGCGCCCG	CCGCCGCTGC	CGGCCGCGCA	ACGCCATCAA	CTTCGGCTGC	CACGGGACGT	GGGGCCGGAA	CCGGCCTGG	
CGCGACACCG	CGCGGGCGTC	CGCTGCGGTG	AGCCCCACCG	GCTTCTCGAT	CCAGATGTGC	TTGCCGGCCC	CGGACATGGC	CACGCCGATC	TCGCGGTGCA	6800
GCGCTGTGGC	GCGCCCGCAG	GCGACGCCAC	TCGGGGTGGC	CGAAGAGCTA	GGTCTACACG	AACGGCCGGG	GCCTGTACCG	GTGCGGCTAG	AGCGCCACGT	
GGAAGTTCCG	AGCGGCGATG	CTCACCGCCT	CGACGCGCGG	GTCGGCGGGC	ACCGTACGCC	AGTCGCGGGT	GCCCGTGGCG	AAGCCGTACC	GCGCGGCCCG	6900
CCTTCAAGCC	TCGCCGCTAC	GAGTGGCGGA	GCTGCGCGCC	CAGCCCGCCG	TGGCATGCGG	TCAGCGCCCA	CGGGCACCGC	TTCGGCATGG	GCGCGCGGGC	

6.5 Informationen zur Synthese von *susy_GC*

6.5.1 Aminosäure- und DNA-Sequenzen von *Sus1_Soltu* bzw. *Susy_GC1*

Aminosäuresequenz von *Sus1_Soltu*

MAERVLTRVH	SLRERVDATL	AAHRNEILLF	LSRIESHGKG	ILKPHELLAE	FDAIRQDDKN	KLNEHAFFEL	LKSTQEAIVL	PPWVALAIRL	RPGVWEYIRV	100
NVNALVVEEL	SVPEYLQFKE	ELVDGASNGN	FVLELDFEFP	TASFPKPTLT	KSIGNGVEFL	NRHLSAKMFH	DKESMTPLE	FLRAHMYKKG	TMMLNDRIQN	200
SNTLQNVLRK	AEEYLIMLPP	DTPYFEFEHK	FQEIGLEKGW	GDTAERVLEM	VCMLLDLLEA	PDSCTLEKFL	GRIPMVFNVV	ILSPHGYFAQ	ENVLGYPDTG	300
GQVVYILDQV	PALEREMLRK	IKEQGLDIIP	RILIVTRLLP	DAVGTTGQQR	IEKVYGAEHS	HILRVPFRT	KGIVRKWISR	FEVWPYMETF	IEDVAKEISA	400
ELQAKPDLII	GNYSEGNLAA	SLLAHKLGVT	QCTIAHALEK	TKYPDSDIYW	KKFDEKYHFS	SQFTADLIAM	NHTDFIITST	FQEIAGSKDT	VGQYESHMAF	500
TMPGLYRVVH	GINVFDPKFN	IVSPGADINL	YFSYSETEKR	LTAHFPEIDE	LLYSDEVENDE	HLCVLKDRTK	PILFTMARLD	RVKNLTGLVE	WYAKNPRLRG	600
LVNLVVVGGD	RRKESKDLLE	QAEMKKMYEL	IETHNLNGQF	RWISSQMNRV	RNGELYRYIA	DTKGAFVQPA	FYEAFLTVV	EAMTCGLPTF	ATNHGGPAEI	700
IVHGKSGFHI	DPYHGEQAAD	LLADFFEKCK	REPSHWETIS	TGGLKRIQEK	YTWQIYSERL	LTLAAVYGFW	KHVSCLDRLE	IRRYLEMFYA	LKYRKMAEAV	800
PLAAE										805

DNA-Sequenz des klonierten *aviD*-Promotor-Bereiches

Per PCR wurden ein 300 bp-Abschnitt amplifiziert, der sich vor dem Start-Codon des Gens *aviD* befindet. Dieser Abschnitt umfaßt wahrscheinlich den *aviD*-Promotor sowie die Ribosomenbindestelle. Am 5'-Ende ermöglichte eine *HindIII*-Schnittstelle die Verknüpfung mit dem Vektor und am 3'-Ende eine *NdeI*-Schnittstelle die Verknüpfung mit dem synthetischen Gen *susy_GC1*.

AAGCTT CTGG	AAGCTGCCCA	CCATCAGCGA	CATCGTCGAT	CACCTGACCG	AACGCCTCAC	GGAACACCCG	ACGGCGGACG	GCCATGCGTC	CTGAACGCAC	100
TGACTCCGTA	ACTCATGTCA	GCAGGGGACG	GCGGGGTGAA	AGGGCCGCGC	CAGCCGGCCC	GGAAACCTAG	GGAAAACCTG	AAAAACACGC	CAGTACGATC	200
GTTGTTGGGC	GGAGACATTC	GATGCCATCT	GGAGTCCCT	TGAAACGACC	TGATCTGACG	GCGCTGACCG	CAAGGTGTGG	GATATG		286

DNA-Sequenzen von *sus1_Soltu* und *susy_GC1*

Im folgenden sind die Sequenzen der Gene *sus1_Soltu* und *susy_GC1*, die beide für dieselbe Aminosäuresequenz codieren, dargestellt. Die Sequenz *susy_GC1* entstand durch Anpassung der verwendeten Codone an den Avilamycin-Produzenten *S. viridochromogenes* Tü57. Alle Veränderungen in der Sequenz sind durch Unterlegung der jeweiligen Nukleotide hervorgehoben. Bei der Wahl der Codone wurde außerdem berücksichtigt, daß die zur Synthese nötigen Primer möglichst optimal miteinander hybridisieren können. Weiterhin mußte die Sequenz verändert werden, um bestimmte Restriktionsschnittstellen auszuschließen oder in die Sequenz einzufügen.

<i>sus1</i>	ATGGCTGAAC	GTGTTCTGAC	TCGTGTTTAT	AGCCTTCGTG	AACGTGTTGA	TGCAACTTTA	GCTGCTCACC	GCAATGAGAT	ACTGCTGTTT	CTTTCAAGGA	100
<i>susy_GC1</i>	ATGGC CGAGC	G CGT GCTGAC	CCGCGTCCAC	TCCCTGCGCG	AGCGGTGCGA	CGCCACCCTG	GCCGCCACC	GCAAC GAGAT	CCTGCTGTTT	CTGTC CCCGCA	100
<i>sus1</i>	TCGAAAGCCA	CGGAAAAGGG	ATATTGAAAC	CTCACGAGCT	TTTGCTGAG	TTCGATGCAA	TTCGCCAAGA	TGACAAAAAC	AAACTGAACG	AACATGCATT	200
<i>susy_GC1</i>	TCGAG TCCCA	CGG CAAGGGC	AT CCTGAAGC	CCCACGAGCT	GCTGGCCGAG	TTCGACGCCA	TCCGCCAGGA	CGACAA GAAC	AAG CTGAACG	AGCACGCC TTT	200
<i>sus1</i>	CGAAGAATC	CTGAAATCCA	CTCAGGAAGC	GATTGTTCTG	CCCCCTTGGG	TTGCACTTGC	TATTCGTTTG	AGGCCTGGTG	TCTGGGAATA	CATCCGTGTG	300
<i>susy_GC1</i>	CGA GGAGCTG	CTGA AGTCCA	CC CAGGAGGC	CATCGT CCTG	CCGCCGTGGG	TCGCCCTGGC	CATCCGCCTG	CGGCCGGGCG	TCTGGG AGTA	CATCCGGT C	300
<i>sus1</i>	AACGTCAATG	CACTAGTTGT	CGAGGAGCTG	TCCGTCCCTG	AGTATTTGCA	ATTCAAGGAA	GAACTTGTG	ACGGAGCCTC	GAATGGAAAT	TTCGTTCTCG	400
<i>susy_GC1</i>	AACGTCA ACG	CCCTGGT CGT	CGAGGAGCTG	TCCGT CCC GG	AGT ACCT CCA	GTTCAAGGAA	GAGCTGGT CG	ACGG CGCCTC	CAACGGGAAC	TTCGT CCTGG	400
<i>sus1</i>	AGTTGGATTT	CGAGCCTTTC	ACTGCATCCT	TTCCTAAACC	AACCCTCACC	AAATCTATTG	GAAATGGAGT	TGAATTCCTC	AATAGGCACC	TCTCTGCCAA	500
<i>susy_GC1</i>	AG CTGGAC TTT	CGA ACCG TTC	ACC GCCTCCT	TCCCCAAGCC	GACCCTGACC	AAGTCCATCG	GCAA CGGCGT	CGAGTTCCTG	AA CCGCACC	TGTC CCGCGAA	500
<i>sus1</i>	AATGTTCCAT	GACAAGGAAA	GCATGACCCC	GCTTCTCGAA	TTTCTTCGCG	CTCACCATTA	TAAGGGCAAG	ACAATGATGC	TGAATGATAG	GATACAGAAT	600
<i>susy_GC1</i>	GATGTTCCAC	GACA AGGAGT	CCATGACCCC	GCT GTG GAG	TTCTGCGCG	CCCACCACTA	CAAGGGCAAG	ACCATGATGC	TGA ACGACCG	CAT CCAGAAC	600
<i>sus1</i>	TCGAATACTC	TTCAAAATGT	CCTAAGGAAG	GCAGAGGAAT	ACCTCATTAT	GCTTCCCCCA	GATACTCCAT	ATTTGCAATT	CGAGCACAAG	TTCCAAGAAA	700
<i>susy_GC1</i>	TCCAA CACCC	TGCAGA ACGT	CCT GG GGAAG	G CCG AGGAGT	ACCT GAT CAT	GCT GCCG CCG	GACAC CCCGT	ACTTCGAG T	CGAGCACAAG	TTCCA GGAGA	700
<i>sus1</i>	TCGGATTGGA	GAAGGGATGG	GGGGACACGG	CGGAGCGTGT	GCTAGAGATG	GTATGCATGC	TTCTTGATCT	CCTTGAGGCT	CCTGACTCAT	GTACTCTTGA	800
<i>susy_GC1</i>	TCGG CC TGGA	GAAGGG CT GG	GG CG ACACCG	CCG AGCGCGT	CCTCG AAATG	GT CT GCATGC	TGCTGG ACCT	GCTGG AGGCG	CCGGACTCGT	GCACG CTGGA	800
<i>sus1</i>	GAAGTTCTTG	GGGAGAATTC	CTATGGTTTT	CAATGTGGTT	ATCCTTTCCC	CTCATGGATA	TTTTGCCCAA	GAAAATGTCT	TGGGTTATCC	CGACACCGGT	900
<i>susy_GC1</i>	GAAGTT CCTG	GG CCG CATCC	CGATGGT CTT	CAACGT CGTC	ATCCT GT CCC	CGCAC GGCTA	CTT CGCGCAG	GAGAA CTCC	TGGG CTA CCC	GGACAC CGGC	900
<i>sus1</i>	GGCCAGGTTG	TCTACATTTT	AGATCAAGTT	CCCGCCTTGG	AGCGTGAAAT	GCTTAAGCGC	ATAAAGGAGC	AAGGACTTGA	TATCATCCCC	CGTATTCTTA	1000
<i>susy_GC1</i>	GGCCAGG TCG	TCTACAT CCT	GGAC CAGG TG	CCGGCC CTGG	AGCG CG AGAT	GCT G AAAGCGC	AT CA AGGAGC	AGGGC CTGGA	CATCAT CCCC	CGGAT CCTGA	1000
<i>sus1</i>	TTGTTACTCG	TCTGCTGCC	GATGCAGTTG	GAACCACTTG	TGGTCAGAGG	ATTGAGAAGG	TGTATGGAGC	AGAACACTCA	CATATTCTTA	GGGTCCCTTT	1100
<i>susy_GC1</i>	TCGT CACCCG	CCTGCTGCCG	GAC GC GGT GG	GC ACCACCTG	CGGC CAGCGG	AT CG GAGAAGG	TGT A CGGCGC	CGAG CACTCC	CACAT CCTGC	GCGT CCCGTT	1100
<i>sus1</i>	TAGGACTGAG	AAGGGCATTG	TTCGCAAATG	GATCTCTCGC	TTTGAAGTGT	GGCCATACAT	GGAGACATTC	ATTGAGGATG	TTGCAAAAGA	AATTTCTGCA	1200
<i>susy_GC1</i>	CCG GAC CG GAG	AAGGGC ATCG	TCCG CAAGTG	GATCT CGCG	TT CG AGG TC T	GGCC G TACAT	GGAGAC CTTC	AT CG AGG ACG	TCGC CAAGGA	AAT CT CCGC	1200

<i>sus1</i>	GAACTGCAGG	CCAAGCCAGA	TTTGATAATT	GGAAACTACA	GTGAGGGCAA	TCTTGCTGCT	TCTTTGCTAG	CTCACAAGTT	AGGCGTAACT	CAGTGCACCA	1300
<i>susy_GC1</i>	GAGCTGCAGG	CCAAGCCGGA	CCTGATCATC	GGCAACTACT	CCGAGGGCAA	CCTGGCCGCC	TCCCTGCTGG	CCCACAAGCT	GGGCGTCACC	CAGTGCACCA	1300
<i>sus1</i>	TTGCCACGC	GTTGGAGAAA	ACGAAGTATC	CTGATTCCGA	CATTTACTGG	AAAAAGTTTG	ATGAAAAATA	CCATTTCTCG	TCCCAGTTTA	CCGCTGATCT	1400
<i>susy_GC1</i>	TCGCCACGC	CCTGGAGAA	ACCAAGTACC	CGGACTCCGA	CATCTACTGG	AAGAAGTTCG	ACGAGAAGTA	CCACTTCTCC	TCCCAGTTCA	CCGCCGACCT	1400
<i>sus1</i>	CATTGCAATG	AATCACACTG	ATTTTCATCAT	CACCAGCACC	TTCCAGGAGA	TAGCAGGAAG	CAAGGACACT	GTGGGACAAT	ATGAGAGCCA	TATGGCATTTC	1500
<i>susy_GC1</i>	GATCGCCATG	AACCACACCG	ACTTCATCAT	CACCTCCACC	TTCCAGGAGA	TCGCCGGCTC	CAAGGACACC	GTCCGGCCAGT	ACGAGTCCCA	CATGGCCTTC	1500
<i>sus1</i>	ACAATGCCTG	GATTGTACAG	AGTTGTTTAT	GGCATTAAATG	TGTTTCGACCC	CAAATTCAAC	ATTGTCTCAC	CTGGAGCTGA	TATTAACCTC	TACTTCTCGT	1600
<i>susy_GC1</i>	ACCATGCCGG	GCCGTGTACCG	CGTCGTCCAC	GGCATCAACG	TCTTCGACCC	GAAGTTCAAC	ATCGTCTCC	CGGGCGCCGA	CATCAACCTG	TACTTCTCCT	1600
<i>sus1</i>	ACTCCGAAAC	GGAAAAGAGA	CTTACAGCAT	TTCACCCTGA	AATTGATGAG	CTGCTGTATA	GTGACGTTGA	GAATGACGAA	CATCTGTGTG	TGCTCAAGGA	1700
<i>susy_GC1</i>	ACTCCGAGAC	CGAGAAGCGC	CTGACCGCCT	TCCACCCGGA	GATCGACGAG	CTGCTGTACT	CCGACGTGGA	GAACGACGAG	CACCTGTGCG	TCCTGAAGGA	1700
<i>sus1</i>	TAGGACTAAA	CCAATTTTAT	TCACAATGGC	AAGGTTGGAT	CGTGTGAAGA	ATTTAACTGG	ACTTGTGAG	TGGTACGCCA	AGAATCCACG	ACTAAGGGGA	1800
<i>susy_GC1</i>	CCGCACCAAG	CCGATCCTGT	TCACCATGGC	CCGCCTGGAC	CGCGTCAAGA	ACCTGACC GG	CCTGGTCGAG	TGGTACGCCA	AGAACC CGC	CCTGCCCGGC	1800
<i>sus1</i>	TTGGTTAACC	TGGTTGTAGT	TGGCGGAGAT	CGAAGGAAGG	AATCCAAAGA	TTTGGAAGAG	CAGGCAGAGA	TGAAGAAGAT	GTATGAGCTA	ATAGAGACTC	1900
<i>susy_GC1</i>	CTGGTCAACC	TGGTCTGCTG	CGGCGGCGAC	CGCCGCAAGG	AGTCCAAGGA	CCTGGAGGAG	CAGGCAGAGA	TGAAGAAGAT	GTACGAGCTG	ATCGAGACCC	1900
<i>sus1</i>	ATAATTTGAA	TGGCCAATTC	AGATGGATTT	CTTCCCAGAT	GAACCGAGTG	AGGAATGGTG	AGCTCTACCG	ATACATTGCT	GACACTAAGG	GAGCTTTCGT	2000
<i>susy_GC1</i>	ACAACCTGAA	CGGCCAGTTC	CGCTGGATCT	CCTCCCAGAT	GAACCGCGTC	CGCAACGGCG	AGCTGTACCG	CTACATCGCC	GACACCAAGG	GCCTTTCGT	2000
<i>sus1</i>	TCAGCCTGCA	TTCTACGAGG	CTTTTGGTCT	GACTGTTGTC	GAAGCAATGA	CTTGTGGTTT	GCCTACATTT	GCAACTAATC	ACGGTGGTCC	AGCTGAGATC	2100
<i>susy_GC1</i>	CCAGCCGGCC	TTCTACGAGG	CCTTCGGCCT	GACCCTGCTC	GAGGCCATGA	CCTGCGGCCT	GCCGACCTTC	GCCACCAACC	ACGGCGGCC	GGCCGAGATC	2100
<i>sus1</i>	ATCGTTCATG	GAAAGTCCGG	CTTCCACATT	GATCCATATC	ACGGTGAGCA	AGCTGCTGAT	CTGCTAGCTG	ATTTCTTTGA	GAAATGCAAG	AGAGAGCCTT	2200
<i>susy_GC1</i>	ATCGTCCACG	GCAAGTCCGG	CTTCCACATC	GACCCGTACC	ACGGCGAGCA	GGCCGCCGAC	CTGCTGGCCG	ACTTCTTCGA	GAAGTGCAAG	CGCGAGCCGT	2200
<i>sus1</i>	CACATTGGGA	AACCATTTTCG	ACGGGTGGCC	TGAAGCGCAT	CCAAGAGAAG	TACACTTGGC	AAATCTACTC	CGAAAGGCTA	TTGACACTGG	CTGCTGTTTA	2300
<i>susy_GC1</i>	CCCACTGGGA	GACCATCTCC	ACCGGCGGCC	TGAAGCGCAT	CCAGGAGAAG	TACACTGGC	AGATCTACTC	CGAGCGCCTG	CTGACCCTGG	CCGCCGCTTA	2300
<i>sus1</i>	TGGGTTCTGG	AAACATGTTT	CTAAGCTTGA	TCGTCTAGAA	ATCCGTCGCT	ATCTTGAAAT	GTTTTATGCT	CTCAAGTACC	GTAAGATGGC	TGAAGCTGTT	2400
<i>susy_GC1</i>	CGGCTTCTGG	AAGCACGTC	CCAAGCTGGA	CCGCCTGGAG	ATCCGCGCT	ACCTGGAGAT	GTTCTACGCC	CTGAAGTACC	GCAAGATGGC	CGAGGCCGTC	2400
<i>sus1</i>	CCATTGGCTG	CTGAGTGA									2418
<i>susy_GC1</i>	CCGCTGGCCG	CCGAGTGA									2418

6.5.2 Codon-Präferenz-Tabelle für *S. viridochromogenes* Tü57

Die in Tab. 6.1 aufgeführten Daten zur Codon-Präferenz von *S. viridochromogenes* Tü57 stammen aus einer Datenbank des Kazusa DNA Research Instituts (Nakamura *et al.*, 2000).

Tab. 6.1: Codon-Präferenz-Tabelle für *S. viridochromogenes* Tü57. Für jedes Codon ist angegeben mit welcher Häufigkeit es in Gensequenzen je 1000 Codone vorkommt. Außerdem ist angegeben, mit welcher prozentualen Wahrscheinlichkeit ein bestimmtes Codon/Aminosäure vorkommt. Der Datensatz ist unter [http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species= Streptomyces+viridochromogenes+\[gbbct\]](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Streptomyces+viridochromogenes+[gbbct]) abrufbar und beruht auf der Auswertung von 59 Genen mit 20347 Codonen. Die Stopp-Signale sind in der Tabelle als „Stopp“ bezeichnet.

AS	Codon	Häufigkeit in ‰	Nutzung in %
Phe	TTT	0,5	2
Phe	TTC	28,9	98
Leu	TTA	0,3	0
Leu	TTG	2,5	2
Leu	CTT	1,6	2
Leu	CTC	32,2	31
Leu	CTA	0,3	0
Leu	CTG	66,3	64
Ile	ATT	0,8	3
Ile	ATC	30,8	95
Ile	ATA	0,9	3
Met	ATG	16,4	100
Val	GTT	1,7	2
Val	GTC	47,2	55
Val	GTA	2,4	3
Val	GTG	35,3	41
Ser	TCT	0,5	1
Ser	TCC	20,0	38
Ser	TCA	1,2	2
Ser	TCG	16,1	30
Pro	CCT	1,5	2
Pro	CCC	27,4	41
Pro	CCA	1,5	2
Pro	CCG	36,8	55
Thr	ACT	1,1	2
Thr	ACC	36,9	64
Thr	ACA	2,2	4
Thr	ACG	17,1	30
Ala	GCT	2,8	2
Ala	GCC	70,4	58
Ala	GCA	5,0	4
Ala	GCG	43,8	36
Tyr	TAT	1,6	7
Tyr	TAC	21,4	93
Stopp	TAA	0,0	2
Stopp	TAG	0,3	12
His	CAT	2,5	10
His	CAC	22,0	90
Gln	CAA	0,9	4
Gln	CAG	22,7	96
Asn	AAT	1,7	8
Asn	AAC	19,2	92
Lys	AAA	1,1	7
Lys	AAG	16,0	93
Asp	GAT	4,1	7
Asp	GAC	56,9	93
Glu	GAA	11,1	18
Glu	GAG	50,0	82
Cys	TGT	1,3	12
Cys	TGC	9,3	88
Stopp	TGA	2,5	86
Trp	TGG	15,5	100
Arg	CGT	7,7	9
Arg	CGC	35,0	43
Arg	CGA	2,9	3
Arg	CGG	31,5	39
Ser	AGT	1,8	3
Ser	AGC	13,4	25
Arg	AGA	1,0	1
Arg	AGG	3,6	4
Gly	GGT	9,2	10
Gly	GGC	56,3	62
Gly	GGA	8,1	9
Gly	GGG	17,0	19

6.5.3 Primerkombinationen für die PCR-basierte Gensynthese

Tab. 6.2: Übersicht über die Zusammensetzung der Primer-Mixe, die jeweils in einer PCR zur Synthese eines ca. 120 bp-Fragments eingesetzt wurden.

Primer-Mix	Primerkombination	Primeranzahl
1	A1, A2, AB3, AB4, BC5, BC6, CD7, CD8	8
2	CD7, CD8, DE9, DE10, EF11, EF12, FG13, FG14	8
3	FG13, FG14, GH15, GH16, HI17, HI18, IJ19, IJ20	8
4	IJ19, IJ20, JK21, JK22, KL23, KL24, LM25, LM26	8
5	LM25, LM26, MN27, MN28, NO29, NO30, OP31, OP32	8
6	OP31, OP32, PQ33, PQ34, QR35, QR36, RS37, RS38	8
7	RS37, RS38, ST39, ST40, TU41, TU42, U43, U44	8
8	A45-2, A46-2, AB47, AB48, BC49, BC50, CD51, CD52	8
9	CD51, CD52, DE53, DE54, EF55, EF56, FG57, FG58	8
10	FG57, FG58, GH59, GH60, HI61, HI62, IJ63, IJ64	8
11	IJ63, IJ64, JK65, JK66, KL67, KL68, LM69, LM70	8
12	LM69, LM70, MN71, MN72, NO73, NO74, OP75, OP76	8
13	OP75, OP76, PQ77, PQ78, QR79, QR80, RS81, RS82	8
14	RS81, RS82, ST83, ST84, TU85, TU86, UV87, UV88, V89, V90	10
3A	PCR-Produkte aus Ansatz 8-14	
3B	PCR-Produkte aus Ansatz 1-7	

6.6 Plasmidkarten

6.6.1 Inaktivierungsplasmid pSP1/aviD-S

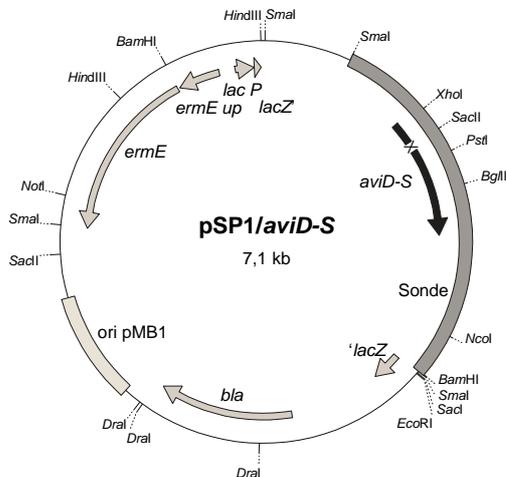


Abb. 6.2: Darstellung des Inaktivierungsplasmids pSP1/aviD-S mit mutiertem *aviD*-Gen. Innerhalb der *aviD*-Sequenz wurde per Restriktion mit SacI und Religation des Plasmids ein 291 bp-Fragment deletiert. Dadurch kommt es zu einer *in-frame*-Deletion, die auf Proteinebene rund 100 Aminosäuren umfaßt.

Zur Überprüfung der Mutante wurde die genomische DNA mit *SmaI* geschnitten, die DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und ein „Southern Blot“ wurde durchgeführt. Ein 2 kb-*SmaI*-Fragment (siehe Abb.) diente als Sonde. Im Wildtyp gibt es eine zusätzliche *SmaI*-Schnittstelle, die eine Unterscheidung zwischen Wildtyp und *aviD*-Mutante möglich macht.

6.6.2 Expressionsplasmid pSET152/aviD

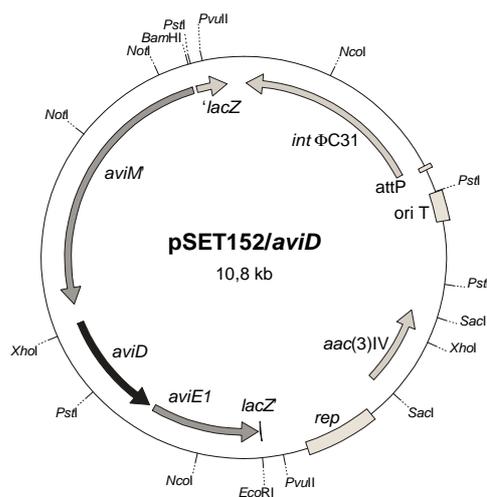


Abb. 6.3: Darstellung des Expressionsplasmids pSET152/aviD. Der Vektor pSET152 wurde mit einem *BamHI*/*EcoRI*-Fragment aus dem Avilamycin-Cluster ligiert. Dieser DNA Abschnitt enthält *aviD* zusammen mit dem nativen *aviD*-Promotor. Dieses Plasmid wurde zur Komplementation der *aviD*-Mutante verwendet.

6.6.3 Inaktivierungsplasmid pKC1132/Δ*pokGT1*

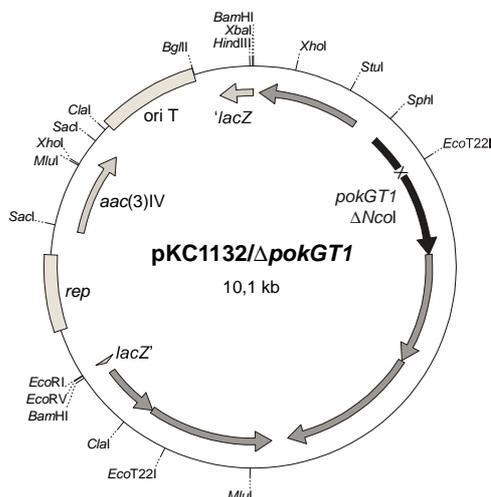


Abb. 6.4: Darstellung des Inaktivierungsplasmids pKC1132/Δ*pokGT1*. Ausgehend von einem 6,5 kb großen *BamHI*-Fragment in pSK (pSK/213) wurde eine *NcoI*-Schnittstelle durch Restriktion, Auffüllen der entstandenen Überhänge und Religation in eine *EcoT22I*-Schnittstelle umgewandelt. Die 4 zusätzlichen Basenpaare führen zu einer Leserasterverschiebung innerhalb des Gens *pokGT1*. Das *BamHI*-Fragment ist möglicherweise in anderer Orientierung in den Vektor pKC1132 integriert worden. Dieses Plasmid wurde zur Konjugation von *S. diastatochromogenes* eingesetzt.

6.6.4 Expressionsplasmid pAF1/urdR

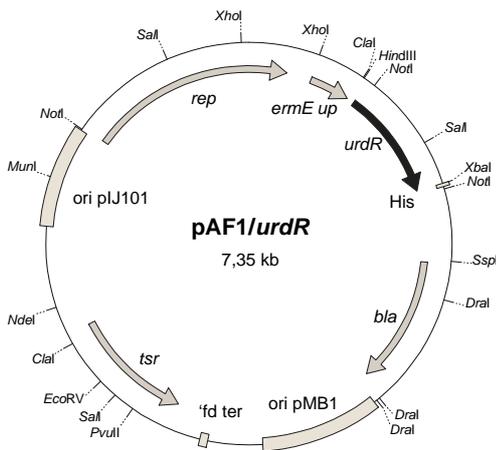


Abb. 6.5: Darstellung des Expressionsplasmids pAF1/urdr. Hinter dem *ermE* up-Promotor wurden folgende Elemente eingefügt: Der codierende Bereich von *urdr* (ohne Stopp-Codon), 6 Histidin-Codone, eine *XbaI*-Schnittstelle und ein Stopp-Codon. Das Plasmid eignet sich zur Expression anderer Gene, um das entsprechende Protein um einen C-terminalen Histidin-Tag zu erweitern. Für die Klonierung sind die Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* vorgesehen.

6.6.5 Expressionsplasmid pAF2/urds

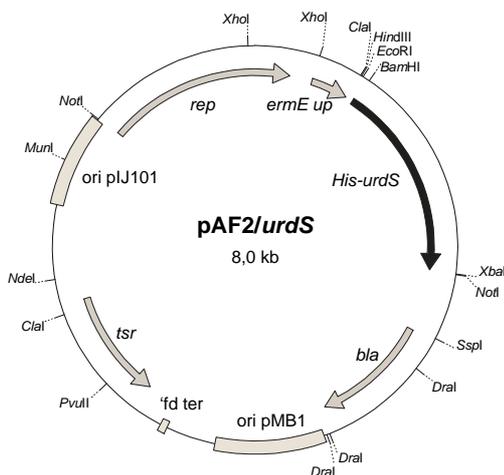


Abb. 6.6: Darstellung des Expressionsplasmids pAF2/urds. Hinter dem *ermE* up-Promotor wurden nach der *EcoRI*-Schnittstelle folgende Elemente eingefügt: Die ribosomale Bindestelle von *urds*, das Start-Codon ATG gefolgt von 6 Histidin-Codonen und daran anschließend eine *BamHI*-Schnittstelle. Es folgt der codierende Bereich von *urds* mit einer *XbaI*-Schnittstelle im Bereich des Stopp-Codons. Das Plasmid eignet sich zur Expression anderer Gene, um das entsprechende Protein um einen N-terminalen Histidin-Tag zu erweitern. Für die Klonierung sind die Schnittstellen *BamHI* und *XbaI* vorgesehen.

6.6.6 Expressionsplasmid pAF3/urds

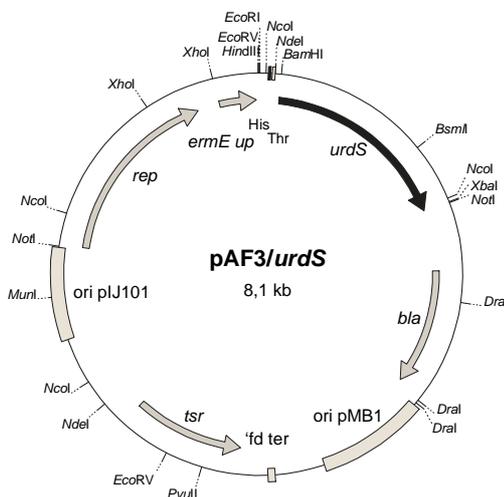


Abb. 6.7: Darstellung des Expressionsplasmids pAF3/urds. Hinter dem *ermE* up-Promotor wurden nach der *EcoRI*-Schnittstelle folgende Elemente (aus pET-28a(+)) eingefügt: Ribosomenbindestelle, das Start-Codon ATG, 6 Histidin-Codone, Codone für die Thrombin-Erkennung und außerdem T7-Tag-Codone, woran sich nach wenigen Nucleotiden eine *BamHI*-Schnittstelle anschließt. Es folgt der codierende Bereich von *urds* mit einer *XbaI*-Schnittstelle im Bereich des Stopp-Codons. Das Plasmid eignet sich zur Expression anderer Gene, um das entsprechende Protein um einen N-terminalen Histidin-Tag mit Thrombin-Schnittstelle zu erweitern. Für die Klonierung sind die Schnittstellen *BamHI* und *XbaI* vorgesehen.

6.6.7 Expressionsplasmid pAF1/aviS

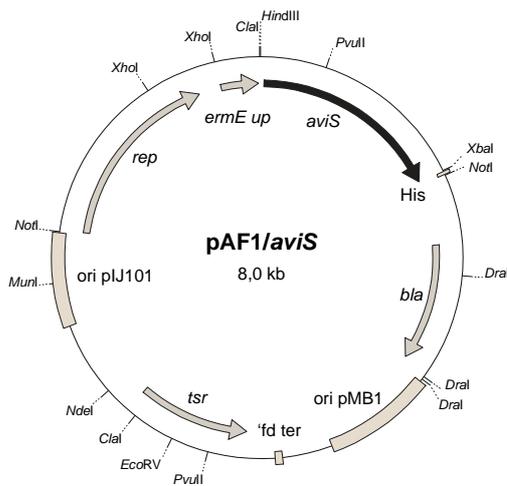


Abb. 6.8: Darstellung des Expressionsplasmids pAF1/aviS. Das Plasmid wurde ausgehend von pAF1/urdR. erstellt. Dazu wurde *aviS* (ohne Stopp-Codon) per PCR amplifiziert. Das Einbringen in das Plasmid erfolgte über die *HindIII*- und *XbaI*-Schnittstellen.

6.6.8 Expressionsplasmid pAF1/aviT

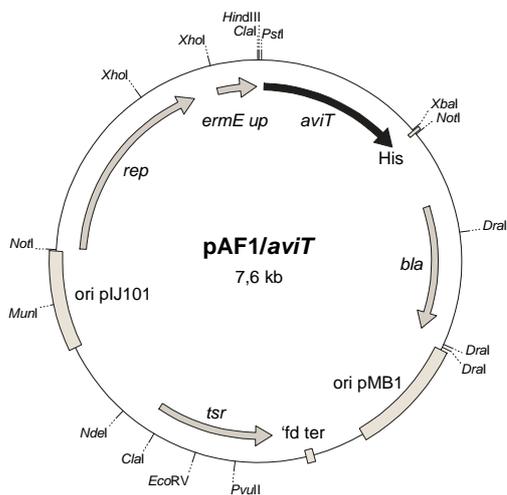


Abb. 6.9: Darstellung des Expressionsplasmids pAF1/aviT. Das Plasmid wurde ausgehend von pAF1/urdR. erstellt. Dazu wurde *aviT* (ohne Stopp-Codon) per PCR amplifiziert. Das Einbringen in das Plasmid erfolgte über die *HindIII*- und *XbaI*-Schnittstellen.

6.6.9 Expressionsplasmid pAF1/simB7

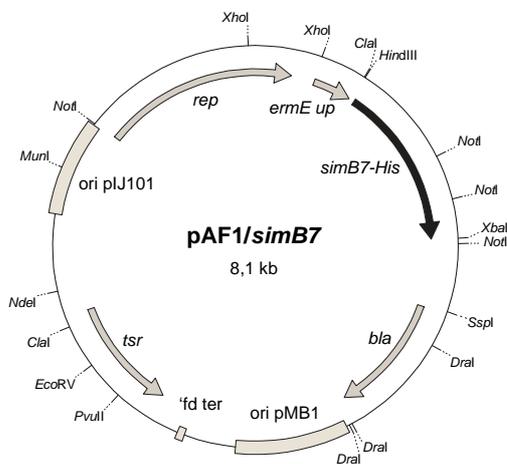


Abb. 6.10: Darstellung des Expressionsplasmids pAF1/simB7. Das Plasmid wurde ausgehend von pAF1/urdR. erstellt. Dazu wurde *simB7* (ohne Stopp-Codon) per PCR amplifiziert. Das Einbringen in das Plasmid erfolgte über die *HindIII*- und *XbaI*-Schnittstellen.

6.6.10 Expressionsplasmid pSETerm/susy

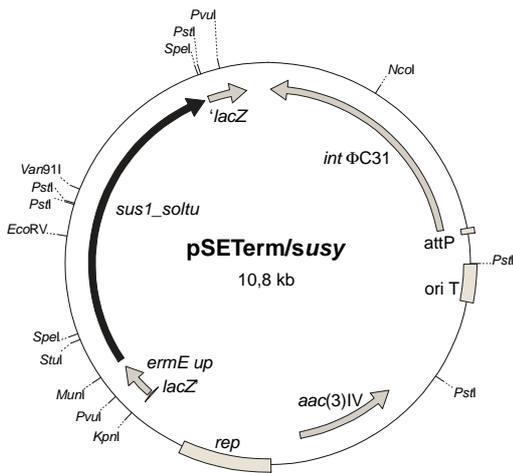


Abb. 6.11: Darstellung des Expressionsplasmids pSETerm/susy. Das Intron-freie Saccharosesynthasegen *sus1_Soltu* wurde mit *NcoI* und *BamHI* aus dem Plasmid pTSSuc ausgeschnitten. Aus dem Vektor pSET-1cerm wurde das *urdGT1c*-Insert durch Restriktion mit *BglII* und *NdeI* entfernt. Nach Auffüllen der 5'-Überhänge wurde das Insert in den Vektor ligiert und die Orientierung überprüft.

6.6.11 Expressionsplasmid pKC1218/susy_GC

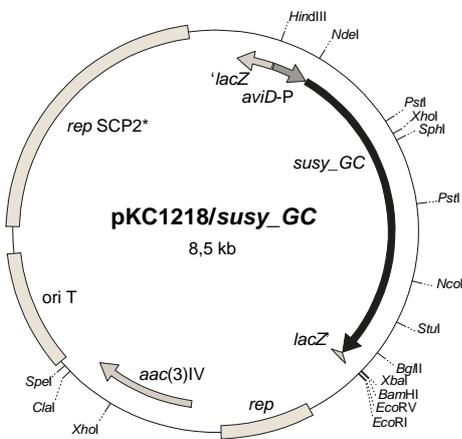


Abb. 6.12: Darstellung des Expressionsplasmids pKC1218/susy_GC. In den replikativen Vektor pKC1218 wurde über die *HindIII*- und *XbaI*-Schnittstelle das synthetische Gen *susy_GC* mit vorgeschaltetem *aviD*-Promotor-Bereich eingebracht.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Bechthold für die Bereitstellung des interessanten Themas und die stete Ansprechbarkeit bei allen Fragen und Problemen.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Irmgard Merfort für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferates bedanken.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Peter Graumann für das entgegengebrachte Interesse und die Bereitschaft, dem Rigorosum als Prüfer beizuwohnen.

Zudem möchte ich Herrn Dr. Dirk Hoffmeister, Frau Dr. Ursula von Mulert und Frau Dr. Gabriele Weitnauer für die wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotion sowie die Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung meines Projekts danken.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Laborkollegen bedanke ich mich für für die jederzeit erwiesene Hilfsbereitschaft und das gute Miteinander. Insbesondere Dr. Carsten Hofmann und Andreas Günther gilt mein Dank für den Beistand bei den analytischen Untersuchungen. Ein besonderes Dankeschön gilt meinen „Weggefährten“ Corina Bihlmaier und Raija Boll für ihre Unterstützung, ihr Engagement beim Korrekturlesen und vor allem für die schöne gemeinsame Zeit.

Ich möchte den am Polyketomycin-Projekt beteiligten Mitarbeitern der Combinature Biopharm AG (Berlin) und Herrn Dr. Tilmann Weber (Uni Tübingen) für die zur Verfügung gestellten Cosmide und Daten danken.

Herrn Prof. Dr. Lothar Elling (RWTH Aachen) und seinen Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung des „Susy“-Gens und die Kooperation zwecks Expression von Desoxyzuckerbiosyntheseenen.

Für die Möglichkeit, am Graduiertenkolleg „Biochemie der Enzyme“ teilzunehmen, und für das damit verbundene Stipendium bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Bildungsgang

- 1986-1995 Marienschule Lippstadt
- 1995-1998 Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Biologiestudium (Vordiplom im Oktober 1997)
- 1998-2001 Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Biologiestudium (Diplomabschluß im Mai 2001)
Thema der Diplomarbeit: Molekularbiologische Untersuchungen
zum Ureidtransport in Leguminosen
- 2002-2006 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
Jan. '02-Sept. '04 Stipendiatin im Graduiertenkolleg
„Biochemie der Enzyme“ der DFG