

格尔德霉素基因工程高产菌株的构建和培养

赫卫清, 周红霞, 王红远, 高群杰, 王以光

中国医学科学院/中国协和医科大学医药生物技术研究所以, 卫生部抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050

摘要: 在格尔德霉素产生菌吸水链霉菌 17997(*Streptomyces hygroscopicus* 17997)中存在两种 3-氨基-5-羟基苯甲酸 (3-amino-5-hydroxybenzoic acid, AHBA)的生物合成基因簇, 根据同源性可分为苯醌类和萘醌类。已证明其中苯醌类的 AHBA 生物合成基因簇负责格尔德霉素(geldanamycin, Gdm)起始单位的合成, 而萘醌类的 AHBA 基因簇可能参与未知安莎化合物的生物合成。为提高吸水链霉菌 17997 菌种的 Gdm 发酵产量, 并研究高产菌种在固体培养基上孢子的生长周期。采用基因阻断技术, 将吸水链霉菌 17997 中的萘醌类 AHBA 生物合成基因簇(*shnSOP*)进行破坏, 以获得 Δ SOP 菌株, 从而减少对合成所需共同底物 AHBA 的争夺。HPLC 分析结果表明 Δ SOP 菌株 Gdm 的发酵产量比原株提高 185%。同时, 通过孢子计数发现该菌株在固体培养基上的孢子生长经历 2 个周期, 第 2 代孢子菌种的 Gdm 产量较高。

关键词: 吸水链霉菌 17997, 格尔德霉素, 基因阻断, 孢子形成周期

Construction and Cultivation of Genetically-engineered Strain to Improve Geldanamycin Production

Weiqing He, Hongxia Zhou, Hongyuan Wang, Qunjie Gao, and Yiguang Wang

Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS & PUMC, Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Ministry of Health, Beijing 100050, China

Abstract: To improve the production of geldanamycin in *Streptomyces hygroscopicus* 17997, gene disruption was done to delete the naphthalenic AHBA genes (*shnSOP*), encoding the products that share the common biosynthetic substrates with geldanamycin. The resulting mutant strain (Δ SOP) was cultivated on a solid medium and the amount of spores collected from the plates was calculated from 5 to 14 days and the yield of geldanamycin was measured by HPLC. The geldanamycin production of the Δ SOP strain increased by 185% comparing with that of the parent strain. On solid medium, the Δ SOP strain underwent 2 cycles of sporulation and the growth of the second sporulation had the highest geldanamycin production.

Keywords: *Streptomyces hygroscopicus*17997, geldanamycin, gene disruption, spore formation

吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)可以产生苯安莎类的 Gdm(图 1)。安莎类抗生素属于一种大环内酰胺, 它们的结构中都含有一个芳香环(苯醌或萘醌), 其脂肪链是连结在芳香环的两个不相邻原子

之间。芳香环的脂肪链通过酰胺键连接成大环结构。安莎类抗生素芳香环的生物合成均是以 AHBA 作为起始单元。

安莎类抗生素具有抗菌、抗结核、抗真菌、抗

Received: April 6, 2007; Accepted: June 4, 2007

Supported by: the National Department of Sciences and Technology under Preliminary Basic Research 973 project (No. 2001CCA00500).

Corresponding author: Yiguang Wang. Tel: +86-10-63038137; Fax: +86-10-63176489; E-mail: wangyh456@yahoo.com.cn

科技部基础研究重大项目 973 前期研究专项(No. 2001CCA00500)资助。

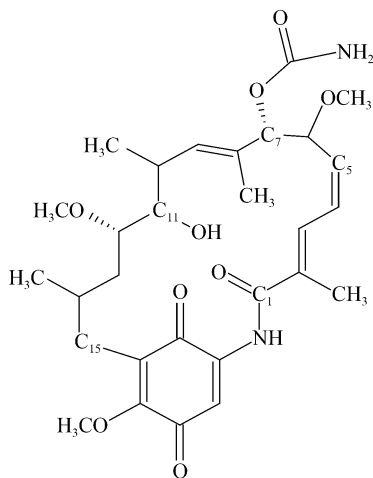


图1 格尔德霉素的化学结构

Fig.1 Chemical structure of geldanamycin

肿瘤和抗病毒等多种生物活性。Sasaki 等最先发现 Gdm 具有抗原虫和抗肿瘤作用^[1]，本所的研究发现 Gdm 还具有良好的抗病毒活性^[2]。近年的研究表明 Gdm 的这些生物学活性是因为它能特异性地抑制热休克蛋白 90 (Hsp90)的 ATP/ADP 结构域^[3,4]，下调多种 Hsp90 的靶蛋白功能所致。Gdm 新颖的作用机制决定了对其深入研究具有潜在的科学与经济价值。低毒、高效 Gdm 衍生物的获得成为当今新药研究的一个主要目标。目前对 Gdm 所进行的比较成功的化学改造，主要集中在苯核(17 位)上所连接甲氧基的变换。两个在 Gdm C17 位进行取代的衍生物 17-AAG 和 17-DMAG 已在美国进行 II 期和 I 期临床实验^[5,6]。

利用生物技术实现对 Gdm 产生菌染色体的改造，对提高 Gdm 发酵产量和研制化学方法难以获得的衍生物有重要意义。为此首先需要从产生菌中克隆 Gdm 生物合成的相关基因。本实验室^[7]曾根据参与 Gdm 生物合成的起始单位 AHBA^[8,9] 合酶基因的保守区域设计兼并引物，从 Gdm 产生菌基因文库中发现并获得了两组 AHBA 生物合成基因簇及与之连锁的部分 PKS 基因片段，通过基因阻断实验鉴定了参与 Gdm 生物合成的基因簇^[10]。基因同源性分析表明，另一组 AHBA 生物合成基因簇(AHBA-shn)与萘醌型的同源性高于苯醌型基因簇，提示该产生菌中含有编码萘醌型安莎类抗生素的生物合成基因簇。抗生素生物合成中前体的供应往往是发酵产量的限制因素^[11]。鉴于苯醌和萘醌型两种安莎类化合物共享 AHBA 为生物合成的起始单元，本研究拟采

用基因阻断技术破坏参与萘醌型安莎类化合物的 AHBA 基因，以便通过阻断或减少通往合成萘醌型安莎类化合物前体(N-AHBA)量，增强 Gdm 前体(B-AHBA)供应代谢流提高其发酵产量。此外，Gdm 产生菌属于吸水链霉菌，这种类型的菌种在固体培养基上经培养其孢子丝将自溶形成吸水褐黑色斑斑，本研究拟阐明所构建的基因阻断工程菌在固体培养基上的生长周期与发酵产量的关系。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

Gdm 产生菌——吸水链霉菌 17997 为本所从土壤中分离得到并保存。大肠杆菌/链霉菌接合转移质粒 pGH112 (tsr^R 硫链丝菌素抗性)^[12]。大肠杆菌/链霉菌接合转移供体菌^[13]，大肠杆菌 DH5 α ，本室保存。阿泊拉抗性基因(Apramycin, Am^R)构建在 pUC18 质粒上，本室构建。

1.2 培养基

吸水链霉菌 17997 固体培养基(MY)(Yeast extract 4 g, Malt extract 10 g, Glucose 4 g, 琼脂 15 g, 加水至 1000 mL)。Gdm 发酵培养基 (starch 2 g, cotton meal 0.5 g, glucose 0.5 g, corn starch liquor 0.5 g, yeast powder 0.5 g, CaCO₃ 0.2 g, 加水至 100 mL)。大肠杆菌/链霉菌接合转移培养基 (soybean powder 20 g, mannitol 20 g, agar 15 g, 加水至 1000 mL)。

1.3 药品和试剂

限制性内切酶、LA-Taq 酶、连接酶、去磷酸化酶 (CIAP) 均购自 TaKaRa 公司。DNA 回收采用北京鼎国生物技术有限公司的 DNA 快速纯化/回收试剂盒。引物合成由赛百胜公司完成。硫链丝菌素为美国 Squibb & Sons, INC 产品，阿泊拉霉素(Am)为沈阳药科大学夏焕章教授惠赠。

1.4 仪器

Shimadzu LC-10Avp 高压液相色谱仪，SPD-M10AvP 二极管阵列检测器，CLASS-VP 工作站。PCR 仪 Techgene Thermal Cycler -PROGENE 型。

1.5 DNA 操作

大肠杆菌中质粒的提取和转化按文献^[14]进行，链霉菌 DNA 操作按文献^[15]进行。质粒的酶切、回收和连接按 TaKaRa 的说明书操作。PCR 反应: PCR 反应采用 TaKaRa LA-Taq 酶，GC-I 体系(20 μ L): (ddH₂O 4.6 μ L, GC-I buffer (2 \times) 10.0 μ L, Primer

(25 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , Template 1 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 3.2 μL , Taq 酶 0.2 μL 。反应条件: 仪器 40 预热 1 min, 96 预解链 2 min, 解链 96 \times 40 s, 退火 60 \times 40 s, 延伸 72 \times 1.5 min, 30 个循环, 72 延伸 5 min, 结束反应。

1.6 大肠杆菌 ET1567/pUZ8002 与链霉菌进行接合转移

按文献[15]操作。

1.7 Gdm 基因阻断工程菌发酵培养及产物 HPLC 分析

按文献[7]进行。

1.8 基因阻断载体的构建

根据 *shnSOP* 基因序列设计引物, 以吸水链霉菌 17997 基因组为模板进行 PCR。

上游引物: P1 5'-CCGGAATTCACACTCGCACGTCCAGCC-3' 带有 *EcoRI* 酶切位点

下游引物: P2 5'-GCGGGTACCGCAGCCAGATGCAGTCGG-3' 带有 *KpnI* 酶切位点

扩增 1257 bp 片段 1。

上游引物: P3 5'-AAAACACTGCAGCTGTGGCTCAGACTGCTGC-3' 带有 *PstI* 酶切位点

下游引物: P4 5'-CTAGTCTAGATGATGTCGGAAAGTAGCG-3' 带有 *XbaI* 酶切位点

扩增 1265 bp 片段 2。

回收 PCR 产物片段 1 和 2, 在中间以 *PstI*-*KpnI* 酶切位点插入 *Am* 抗性基因(1.5 kb), 并以 *EcoRI*-*XbaI* 酶切位点与载体 pGH112 相应酶切位点进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 获得基因阻断载体。

1.9 基因阻断株的获得及鉴定

基因阻断株的筛选按文献[16]进行。基因阻断株的 PCR 鉴定, 选取构建基因阻断载体的 1 和 2 两翼外测序列设计引物, 以原株和变株的基因组为模板进行 PCR。

P5 上游引物: 5' GGCCTCTAGAAGCGCATAGGTTACGA3' (*XbaI*)

P6 下游引物: 5' CTAGTCTAGATGATGTCGGAAAGTAGCG3' (*XbaI*)

1.10 孢子生长周期的观察和计数

将甘油保存菌种接种到平皿上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 用 3 mL 无菌水洗下, 取 0.1 mL 涂布含 20 mL 培养基的平皿, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 d, 观察孢子生长情况, 并分别以 5 mL 无菌水用玻璃珠滚下孢子、打碎、过滤, 孢子液经适当稀释后, 取 0.1 mL 加入平皿中涂布均匀, 置 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 根据单菌落计算其孢子数。

2 结果

2.1 萘醌型 AHBA 基因阻断重组质粒的构建

AHBA 是安莎类抗生素生物合成的起始单位, 在吸水链霉菌 17997 中曾发现了两种 AHBA 生物合成基因簇[AHBA-*gdn*和 AHBA-*shn*], AHBA-*shn* 基因簇结构见(图 2), 前者参与 Gdm 的生物合成, 后者与吸水链霉菌 17997 可能产生的萘醌类抗生素有关。为了阻断 AHBA-*shn* 的合成, 采用 pGH112 载体构建了 AHBA-*shn* 基因簇中部分基因敲除的重组质粒。应用同源基因重组原理根据 *ShnS* 的 N 端(引物 P1)和 *ShnO* 的 C 端(引物 P2), 以及 *ShnO* 的 C 端(引物 P3)和 *ShnP* 的 N 端(引物 P4), 以吸水链霉菌 17997 总 DNA 为模板进行 PCR, 分别获得了同源片段 S1 和 S2。在片段 S1 和 S2 中间加入选择性标记 *Am* 抗性基因, 并与载体 pGH112 相连。基因阻断重组载体 pGEX-*shn* 构建流程如图 3 所示。

2.2 基因阻断株的获得和鉴定

将构建的基因阻断重组质粒 pGEX-*shn* 通过大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 接合转移导入到吸水链霉菌 17997 中, 并在 MY 培养基中传 3~4 代后, 再进行

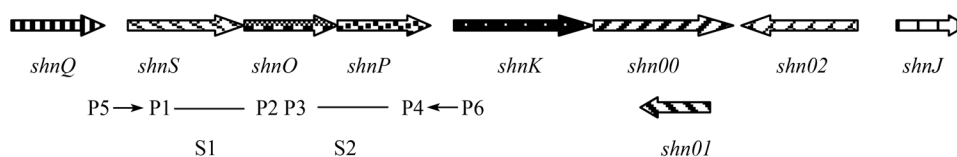


图 2 AHBA-*shn* 基因簇的组成

Fig. 2 The organization of AHBA-*shn* gene cluster

shnQ: aminohydroquininate synthase gene, *shnS*: AHBA synthase gene

shnO: oxidoreductase gene, *shnP*: phosphatase

shnK: kinase gene, *shnJ*: aminohydroquininate dehydratase gene

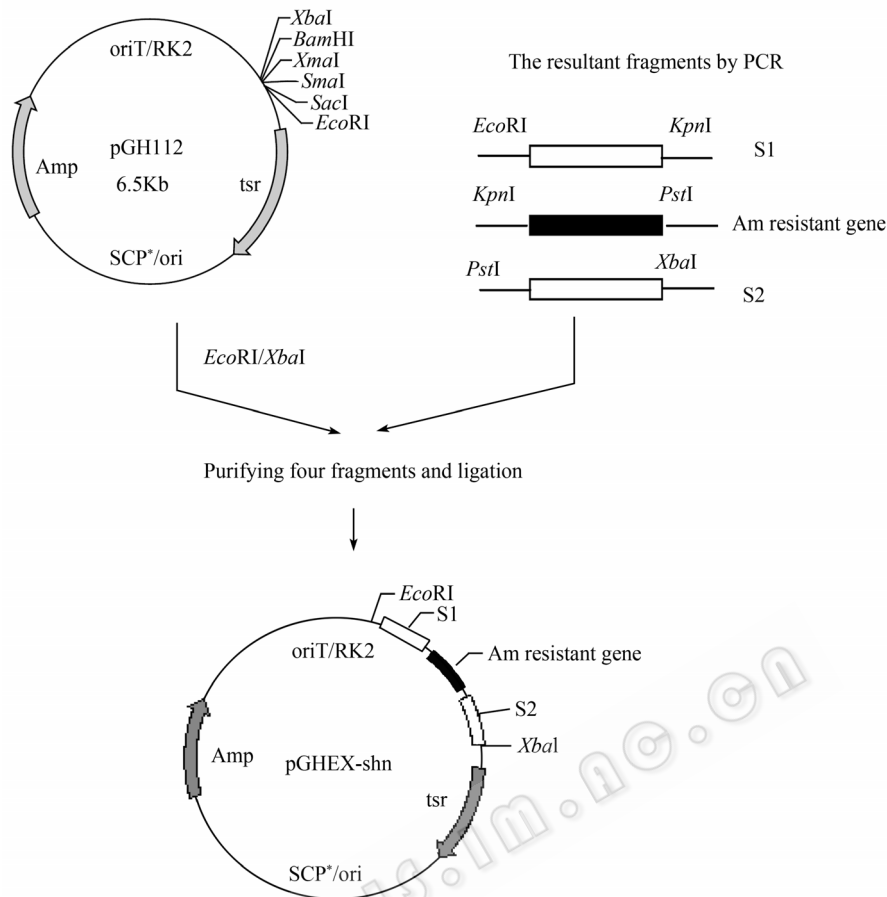


图 3 pGEX-shn 基因阻断载体的构建

Fig. 3 Construction of the gene disruption vector pGEX-shn

单克隆分离, 根据对 Tsr 和 Am 抗性表型, 筛选获得 Am^RTsr^S 同源基因双交换阻断突变株 ΔSOP。对 ΔSOP 阻断变株在基因整合水平进行了 PCR 验证。以原株和 ΔSOP 变株的基因组为模板, 选取构建基因阻断载体的 1 和 2 片段两翼外测序列所设计引物(P5 和

P6) 进行 PCR, 结果见图 4。

由图 4 可见原株基因组 PCR 产物大小约 4 kb 左右, 而在 ΔSOP 变株中扩增出将近 6 kb 的特异性条带, 揭示在靶基因之间插入了 1.5 kb 左右的 Am 抗性基因, 符合预期结果。ΔSOP 变株在不加药传代中 Am^R 表型很稳定, 说明该变株中确实发生了 DNA 同源重组双交换所造成的 Am^R 基因插入, 并使 shn SOP 基因受到破坏。

2.3 ΔSOP 变株发酵产量的 HPLC 检测

吸水链霉菌 17997 及 ΔSOP 变株在固体培养基上培养 7d, 将孢子收集后经发酵培养, 发酵液离心, 取 5 μL 发酵液直接进样, 采用甲醇: 水=40%~100% 梯度洗脱 30 min, 选择波长 304 nm 进行 HPLC 检测, 结果见图 5。

从峰面积来看, ΔSOP 变株发酵液中 Gdm 的含量要比 17997 原株的高 185%。说明阻断 shn SOP 基因可以提高菌株的 Gdm 产量。

2.4 ΔSOP 变株在固体培养基上的生长周期与发酵产量的关系

根据孢子形成过程考察了吸水链霉菌 17997 和

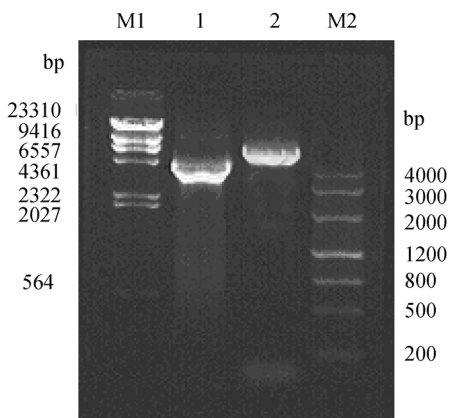
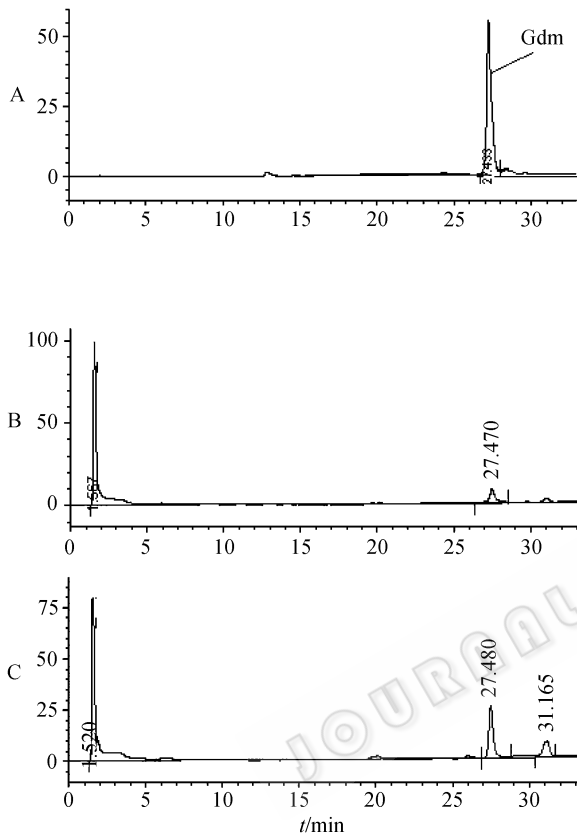


图 4 基因阻断变株 PCR 产物电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of PCR products of gene disruption mutant genome

1: *S. hygroscopicus* 17997; 2: ΔSOP mutant; M1: λDNA/Hind III marker; M2: DNA marker III

Δ SOP 变株在固体培养基的生长周期及孢子形成过程, Δ SOP 变株在 MY 固体培养基上的生长有二个完整的周期, 第一代从营养菌丝到形成气生菌丝再形成第一代孢子的时间为 7 d 左右, 以后孢子数明显减少, 第二代孢子形成高峰在 10 d 左右。而吸水链霉菌 17997 原株在固体培养基上的生长只呈现一个



	RT	Peak area
A: Gdm	27.433	1076622
B: 17997	24.470	285489
C: Δ SOP	24.480	529614

图 5 HPLC 检测 Δ SOP 变株发酵液中 Gdm 的含量

Fig. 5 HPLC analysis of Gdm content in Δ SOP mutant broth

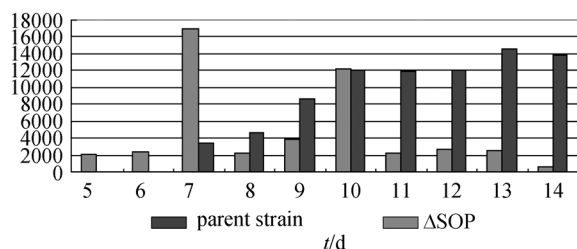
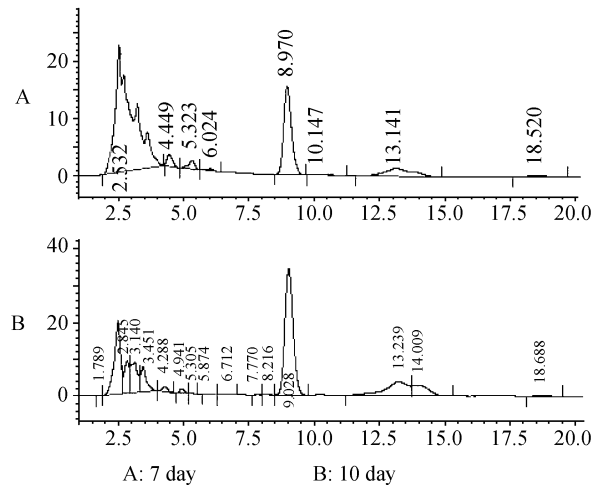


图 6 Δ SOP 变株在 MY 固体培养基上不同培养天数形成孢子数的变化

Fig. 6 Spore amount of Δ SOP mutant culturing on the MY medium at different days

Y axis indicating the spore amount per Petri dish (unit: ten thousands)



Incubation days	RT	Δ SOP mutant Peak area	parent strain Peak area
A: 7 day	27.433	529614	76616
B: 10 day	24.470	747856	139125

图 7 HPLC 检测 Δ SOP 变株固体培养基上不同培养时间发酵液效价

Fig. 7 HPLC analysis of Gdm fermentation title of Δ SOP mutant culturing on solid medium at different days

周期, Δ SOP 菌株和原株在固体培养基上孢子形成情况见图 6。将第一代生长周期(培养 7 d)的菌种与第二代生长周期(培养 10 d)的 Δ SOP 菌种进行发酵, 以 17997 原株同样时间培养物作为对照, 并用 HPLC 检测其发酵产量, 结果见图 7。结果表明, 原株培养 7 d, 而 Δ SOP 变株培养 10d GDM 发酵产量最高。

3 讨论

用于抗生素生物合成的微生物初级代谢小分子产物, 称为抗生素生物合成的前体。当前体供应有可能成为抗生素生物合成限制性因素时, 通过有目的地提高产生菌前体供应可促进抗生素的生物合成。

AHBA 是安莎类抗生素生物合成的前体。AHBA 的合成途径与初级代谢产物莽草酸的合成相类似, 但有所不同。参与其合成的过程有激酶、氨基脱氢奎尼酸酶、氧化还原酶、磷酸化酶和氨基脱氢奎尼酸脱水酶等, 而且, 参与苯醌型和萘醌型安莎类抗生素 AHBA 生物合成基因的同源性有一定差异^[17]。在吸水链霉菌 17997 中本实验室发现了两套 AHBA 基因簇, 分别负责苯醌型 Gdm 合成的 AHBA-B 和与萘醌型安莎类抗生素合成相关的 AHBA-N 基因簇。这两种类型 AHBA 的合成均与初级代谢的磷酸烯醇式丙酮酸和赤藓糖 4-磷酸的代谢

流相关。本研究采用基因重组技术, 通过破坏 AHBA-N 基因, 获得的基因阻断变株 Δ SOP, 其苯醌型安莎类抗生素 Gdm 的发酵产量提高了 185%, 表明 AHBA 的合成可能在吸水链霉菌中是限制因素, 抑制该菌中 AHBA-N 的供应, 可以促进 AHBA-B 的合成和供应, 有利于 Gdm 的合成。

一般链霉菌的生活周期多以孢子起始和告终。孢子萌发后形成菌丝, 在固体培养基上开始长为基内菌丝, 菌丝体发育至一定阶段形成气生菌丝, 部分气生菌丝发展为孢子丝和孢子。链霉菌固体培养物的生长周期对菌种的发酵潜能影响很大。使用以孢子量多和成熟的菌种为佳, 过于年轻的孢子产生抗生素的能力容易波动, 过于成熟的孢子已接近衰老会导致生产能力的降低, 但不同菌种随着培养基的不同其生长规律有变化。尤其是吸水链霉菌在固体培养基上的孢子易自溶而形成湿斑。研究表明吸水链霉菌 17997 原株孢子形成较缓慢, 至 10 d 孢子数达到高峰, 而 Δ SOP 变株在固体培养基上孢子形成可分为两个周期, 第一代孢子形成期为 7 d, 但这时孢子表面颜色较浅, 显示培养物处于比较年轻的状态, 第 7 天以后孢子数明显减少, 表明第一代孢子又形成气生菌丝, 以后又长成孢子, 至第 10 天孢子表面颜色变深, 显示第二代孢子比较成熟, 以孢子计数为指标的菌种生长周期与发酵潜力的研究表明, 在本实验条件下 17997 原株在孢子形成高峰期发酵效价较高(HPLC 图谱从略)。 Δ SOP 在第二代孢子成熟期的发酵能力比第一代孢子高 140%。其确切机制尚需进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Sasaki K, Yasuda H, Onodera K. Growth inhibition of virus transformed cells *in vitro* and antitumor activity *in vivo* of geldanamycin and its derivatives. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1979, **32**(8): 849–951.
- [2] Tao PZ, Lou ZX, Yao TJ, *et al.* Antiviral study on the broad spectrum antiviral antibiotic 17997 *in vitro* and *in vivo*. *Chinese Journal of Antibiotics*, 1997, **22**: 368–372. 陶佩珍, 娄志贤, 姚天爵, 等. 广谱抗病毒抗生素 17997 体内外抗病毒活性研究. *中国抗生素杂志*, 1997, **22**: 368–372.
- [3] Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, *et al.* Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 1997, **90**(1): 65–75.
- [4] Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, *et al.* Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, 1997, **89** (2): 239–250.
- [5] Goetz MP, Toft D, Reid J, *et al.* Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005, **23**(6): 1078–1087.
- [6] Glaze ER, Lambert AL, Smith AC, *et al.* Preclinical toxicity of a geldanamycin analog, 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), in rats and dogs: potential clinical relevance. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 2005, **56** (6): 637–647.
- [7] Gao QJ, Shang GD, Wang YG, *et al.* Cloning and analysis of geldanamycin biosynthetic genes from *S. hygroscopicus* 17997. *Chinese Journal Antibiotics*, 2002, **27**: 13–17. 高群杰, 尚广东, 王以光, 等. Geldanamycin 产生菌生物合成相关基因的克隆与分析. *中国抗生素杂志*, 2002, **27**: 13–17.
- [8] Ghisalpa O, Nüesch J. Genetic approach to the biosynthesis of the rifamycin-chromophore in *Nocardia mediterranei*. IV, identification of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid as a direct precursor of the seven-carbon amino starter-unit. *Journal of Antibiotics*, (Tokyo), 1981, **34**: 64–71.
- [9] Becker AM, Herlt AJ, Hilton GL, *et al.* 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid in antibiotic biosynthesis. VI. Directed biosynthesis studies with ansamycin antibiotics. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1983, **36**: 1323–1328.
- [10] He WQ, Wu LZ, Wang YG, *et al.* Identification of AHBA biosynthetic genes related to geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Current Microbiology*, 2006, **52** (3): 197–203.
- [11] Li-Hong Malmberg, Hu WS, David H Sherman. Precursor flux control through targeted chromosomal insertion of the lysine- ϵ -aminotransferase (Lat) gene in cephamycin C biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 19993, **175** (21): 6916–6924.
- [12] Mo HB, Bai LQ, Yang KQ, *et al.* Construction of efficient conjugal plasmids between *Escherichia coli* and streptomycetes. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, **20**: 662–666. 莫宏波, 白林泉, 杨克迁, 等. 大肠杆菌-链霉菌高效接合载体的构建及其应用. *生物工程学报*, 2004, **20**: 662–666.
- [13] Bierman M, Logan R, O'Brien K, *et al.* Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp.* *Gene*, 1992, **116**: 43–49.
- [14] Sambrook J, Russell DW, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [15] Tobias Kieser, Mervyn J Bibb, Mark J Buttner, Keith F Chater, David A Hopwood. *Practical Streptomyces Genetics*. the John Innes Foundation Norwich, 2000.
- [16] He WQ, Li JY, Sun GZ, *et al.* Detection of fermentation products from *Streptomyces hygroscopicus* 17997 by HPLC analysis. *Chinese Journal of Antibiotic*, 2006, **31**(3): 168–171. 赫卫清, 李京艳, 孙桂芝, 等. 反相高效液相色谱型分析检测吸水链霉菌 17997 变株发酵新产物. *中国抗生素杂志*, 2006, **31**(3): 168–171.
- [17] Shuo Chen, Daniel von Bamberg, Valeric Hale, *et al.* Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphthomycin Identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* Tu 1892. *European Journal of Biochemistry*, 1999, **261**: 98–107.