

Zusammenfassung

Die nichtribosomale Peptidsynthese wird an multifunktionellen Peptidsynthetasen ausgeführt. Peptidsynthetasen weisen eine modulare Struktur von repetitiven katalytischen Domänen auf, die als Enzym-Templat für die Synthese von Peptiden dienen. Die Anzahl und Abfolge dieser Module definiert die Sequenz und den Modifikationsgrad des Peptids. Der Aufbau von Peptidsynthetasen wird durch den *multiple-carrier-thiotemplate* Mechanismus beschrieben.

Im Vordergrund dieser Arbeit standen Untersuchungen zur Konstruktion von hybriden Peptidsynthetasen, die die *de novo*-Synthese definierter Dipeptide ermöglichen sollte. Das diesen Untersuchungen gemeinsame Prinzip ist das der Fusion von katalytischen Domänen. Es konnte gezeigt werden, daß die enzymatischen Einzelaktivitäten der Substrat-Adenylierung und -Thiolierung durch die Einführung von artifiziellen Fusionen nicht beeinträchtigt werden. Das Potential zur Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese scheint in der N-terminalen Domänenorganisation AT hinreichend determiniert zu sein. Um eine effiziente Termination zu gewährleisten, wurden Enzym-Templates C-terminal mit einer Thioesterasedomäne fusioniert.

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit Wegen, ein Enzym-Templat für das Dipeptid Aspartyl-Phenylalanin - dem industriell verwendeten Precursor des Zuckersubstituts Aspartam® - zu konstruieren. Enzym-Templates der Spezifität Asp-Phe konnten durch verschiedene Domänenfusionen dargestellt werden. Das Dipeptid Asp-Phe konnte als Produkt der nichtribosomalen Synthese an diesen hybriden Enzym-Templaten isoliert werden.

Detaillierte Sequenzanalysen von Peptidsynthetase-Domänen führten zur Identifikation von Linker-Regionen. Die konsequente Anwendung dieser Linker zur Definition von Domänengrenzen wurde ausgenutzt, um "Steck-Systeme" von Peptidsynthetase-Domänen zu etablieren. Durch die intramodulare Fusion von Adenylierungs- und Thiolierungsdomänen konnten dimodulare Hybrid-Peptidsynthetasen mit verbessertem Produkt-*turn over* konstruiert werden. Die Bildungsrate von an Enzym-Templaten prozessierten Dipeptiden wie beispielsweise Trp-Leu oder Ile-Phe erreichte so Größenordnungen, die auch für natürliche Systeme vorgeschlagen wurden. Desweiteren konnte die *in cis*-Fusion katalytischer Domänen gegenüber der Verwendung eines *in trans*-Systems als vorteilhaft angesehen werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit konnten so Regeln abgeleitet werden, nach denen eine Darstellung eines Enzym-Templates für das Dipeptid A-B durch rationale Kombination von Domänen entsprechender Spezifität A und B gelingen kann.

Begonnen wurde diese Arbeit mit der biochemischen Charakterisierung eines putativen Lichenysin Biosynthese-Operons aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716.

Synthese von Dipeptiden an hybriden Peptidsynthetasen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sascha Dökel

aus Bremerhaven

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 6. April 2000 angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Th. Carell

Tag der Disputation am 27. April 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	3
2.1	Die nichtribosomale Peptidsynthese	3
2.2	Einzelaktivitäten der Peptidsynthetasen	6
2.2.1	Die Adenylierungsdomäne	8
2.2.2	Die Thiolierungsdomäne und die posttranslationale Modifikation	9
2.2.3	Die Kondensationsdomäne	11
2.2.4	Die Heterozyklisierungsdomäne	12
2.2.5	Die Epimerisierungsdomäne	13
2.2.6	Die N-Methylierungsdomäne	14
2.2.7	Die Thioesterasedomäne und die Reduktasedomäne	14
2.3	Peptidsynthetasen in bakteriellen und pilzlichen Organismen	15
2.4	Die gezielte Veränderung nichtribosomaler Enzym-Templates	17
2.5	Aufgabenstellung	20
3	Material	21
3.1	Material	21
3.2	Enzyme und Chemikalien	22
3.3	Vektoren	23
3.3.1	pBluescript II SK ⁻	23
3.3.2	pQE60/70	23
3.3.3	pREP4	23
3.4	Mikroorganismen	24
3.5	Medien	24
4	Methoden	26
4.1	DNA-Techniken	26
4.1.1	DNA-Sequenzierung	26
4.1.2	Amplifizierung von DNA-Fragmenten (PCR)	27
4.2	Protein-Techniken	28
4.2.1	Genexpression	28
4.2.2	Präparation von <i>E. coli</i> Rohzellextrakten	28
4.2.3	Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	28

4.2.4	Biochemische Charakterisierung von Proteinen, enzymatische Reaktionen	30
4.2.4.1	ATP-PP _i -Austauschreaktion	30
4.2.4.2	Beladung mit radioaktiv markierten Aminosäuren	31
4.2.4.3	<i>In vitro</i> -Modifikation von Peptidsynthetase-Modulen mit 4'-PPAN	31
4.2.4.4	Spaltung Enzym-gebundener Intermediate - Thioesterspaltung	32
4.2.4.5	Produktabspaltungskinetik	32
4.2.4.6	Produktanalyse mit Hilfe radioaktiv markierter Aminosäuren: DC-Chromatographie	33
4.2.4.7	Produktanalyse über HPLC-Analytik	34
5	Ergebnisse	36
5.1	Biochemische Charakterisierung eines putativen Lichensyn Biosynthese-Operons aus <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 10716	36
5.1.1	Überproduktion rekombinanter Adenylierungsdomänen	37
5.1.2	Substratspezifität rekombinanter Adenylierungsdomänen	38
5.2	Konstruktion dimodularer Peptidsynthetasen als Enzym-Template für das Dipeptid Aspartyl-Phenylalanin	40
5.2.1	Strategie	41
5.2.2	Die Auswahl geeigneter Bausteine	42
5.2.3	Eine erste rekombinante dimodulare Peptidsynthetase	43
5.2.4	Substratspezifität der rekombinanten Peptidsynthetase [A _{Asp} TCA _{Leu} T] _(SrfB2-3)	44
5.2.5	Substratthiolierung des Proteins [A _{Asp} TCA _{Leu} T] _(SrfB2-3) aus BL21λDE3[pgsp]	46
5.2.6	Produktbildungsreaktionen	48
5.2.7	Konstruktion einer hybriden dimodularen Peptidsynthetase	49
5.2.8	Effekt der Domänenfusion: Einzelaktivitäten des hybriden Proteins [A _{Asp} TC] _(SrfB2) -[A _{Phe} T] _(TycA)	51
5.2.9	Fusion einer Thioesterasedomäne an die hybride Peptidsynthetase [A _{Asp} TC] _(SrfB2) -[A _{Phe} T] _(TycA)	52
5.2.10	Test der katalytischen Einzelaktivitäten in [A _{Asp} TC] _(SrfB2) -[A _{Phe}] _(TycA) -[TTe] _(SrfC)	53
5.2.11	Dipeptidbildung an den hybriden Enzym-Templaten [A _{Asp} TC] _(SrfB2) -[A _{Phe} T] _(TycA) und [A _{Asp} TC] _(SrfB2) -[A _{Phe}] _(TycA) -[TTe] _(SrfC)	54
5.2.12	Versuche zur Konstruktion eines effizienteren Asp-Phe-Templates	60
5.3	Systematische Konstruktion von Domänenfusionen - Identifizierung von Interdomänen-Linkern	62
5.4	Die Bildung von Dipeptiden durch ein <i>In trans</i>-System	63
5.4.1	Ein hybrides TycA	63

5.4.2	Ein Elongationsmodul als Initiator der nichtribosomalen Peptidsynthese	64
5.4.3	Andere TycA- und ProCAT-Hybride	67
5.5	Die Bildung von Dipeptiden durch ein <i>In cis</i>-System	69
5.5.1	Strategie	69
5.5.2	Fusion von Adenylierungs- und Thiolierungsdomänen: ein neues Stecksystem	71
5.5.3	Überproduktion und Reinigung der rekombinanten Proteine	71
5.5.4	Die Adenylierungsreaktion	72
5.5.5	Die Substratthiolierung	74
5.5.6	Produktbildung	75
5.5.6.1	Das Protein [A _{Ile}] _(BacA1) -[TCA _{Leu} TTe] _(TycC6)	76
5.5.6.2	Das Protein [A _{Phe}] _(TycB2) -[TCA _{Leu} TTe] _(TycC6)	77
5.5.6.3	Das Protein [A _{Ile}] _(BacA1) -[TCA _{Phe}] _(TycB2) -[TTe] _(TycC6)	79
5.6	Die Etablierung eines <i>Bacillus</i>-Expressionssystems für rekombinante Peptidsynthetasen - <i>Bacillus</i>-Integrationsvektoren	83
6	Diskussion	85
6.1	Ein putatives Lichenysin Biosynthese-Operon in <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 10716: Von der Sequenz dreier Gene zur Primärstruktur eines nichtribosomalen Peptids	85
6.2	Dipeptidsynthese an hybriden Peptidsynthetasen	89
6.2.1	Hybridenzyme - Ein Überblick	89
6.2.2	Anwendung von Domänenfusionen zur Darstellung eines Asp-Phe-spezifischen Enzym-Templates	91
6.2.2.1	Die Anforderungen an ein nichtribosomales Enzym-Templat für die Synthese eines Dipeptides	91
6.2.2.2	Die Definition von Domänengrenzen	91
6.2.2.3	Die enzymatische Aktivität von Domänen-fusionierten Peptidsynthetasen und die Bildung des Dipeptides Asp-Phe	93
6.2.2.4	Die Etablierung eines Ko-Expressionssystems mit dem 4'-PPAN-Gen <i>gsp</i>	95
6.2.2.5	β-Asp-Phe	96
6.2.3	Über die Steuerung der nichtribosomalen Peptidsynthese an modularen Multidomänen-Enzymen	98
6.2.3.1	Identifizierung von Interdomänen Linker-Regionen	98
6.2.3.2	Protein-Protein-Interaktionen, die sich in der Primärsequenz von Domänen wiederfinden	101
6.2.4	Die Etablierung eines dimodularen <i>In trans</i> -Systems von hybriden Enzymen	103
6.2.4.1	Der Einfluß einer Hybridfusion auf die Funktionalität einer Peptidsynthetase	103

6.2.4.2	Die Erweiterung des Systems zur Darstellung hybrider TycA- und ProCAT-Derivate	104
6.2.5	Die Etablierung eines dimodularen <i>In cis</i> -Systems von hybriden Enzymen	107
6.2.5.1	Die <i>de novo</i> -Synthese von Dipeptiden an spezifischen nichtribosomalen Enzym-Templaten	107
6.2.5.2	Eine Ausweitung des Systems von A-T-fusionierten <i>In cis</i> -Templaten	112
6.2.6	Manipulationen an Peptidsynthetasen: Eine zusammenfassende Betrachtung	114
6.3	Ein System zur Expression von Peptidsynthetase-Genen in einem homologen Wirt	115
7	Anhang	117
Anhang A	Terminologie für Hybridsynthetasen, Definition von Modulen und Domänen	117
Anhang B	Zusammenstellung der genetischen Konstrukte	118
Anhang C	Auflistung der identifizierten Linker-Regionen von Peptidsynthetase-Domänen des Genus <i>Bacillus</i>	122
Anhang D	Kondensationsdomänen, Epimerisierungsdomänen und Heterozyklisierungsdomänen	127
Anhang E	ESI-MS Referenz-Spektren α -Asp-Phe und β -AspPhe	131
8	Literaturverzeichnis	132

1 Abkürzungen

ACP	<i>acyl-carrier-protein</i>
ACV	δ -(α -Aminoadipyl)-cysteinyl-D-valin
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
ATCC	Stammsammlung (<i>American type culture collection</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C-Domäne	Kondensationsdomäne
CoA	Coenzym A
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEBS	6-Desoxy-Erythronolid B Synthase
dpm	Zerfälle pro Minute (<i>decays per minute</i>)
DTE	1,4-Dithioerythrol
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
EEE	Essigsäureethylester
ESI	Elektrospray-Ionisation
FPLC	schnelle Flüssigchromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
M-Domäne	N-Methylierungsdomäne
MCS	Multipler Klonierungsbereich (<i>multiple cloning site</i>)
MS	Massenspektrometrie
OD	Optische Dichte
PCP	<i>peptidyl-carrier-protein</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
4'-PPAN	4'-Phosphopantethein

PP _i	anorganisches Pyrophosphat
PPS	Peptidsynthetase
Red-Domäne	Reduktase-Domäne
RBS	ribosomale Bindungsstelle
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SNAC	N-Acetyl-Cysteamin-Thioester (<i>thioesterified N-acetyl cysteamin</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
T-Domäne	Thiolierungsdomäne (auch PCP-Domäne)
TCA	Trichloressigsäure
Te-Domäne	Thioesterasedomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammonium
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5'-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid
Z-Domäne	Heterozyklisierungsdomäne

Tab. 1.1 Aminosäure: Abkürzungen

Aminosäure	3-Buchstaben Code	1-Buchstaben Code	M [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	O	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	T	181
Valin	Val	V	117

2 Einleitung

2.1 Die nichtribosomale Peptidsynthese

Die nichtribosomale Peptidsynthese [1] stellt eine alternative Biosynthese-Route zur Darstellung kurzer (bis ca. 40 Aminosäuren enthaltenden) Peptide dar. Sie wird vollständig an enzymatischen Templaten geführt; diese Enzyme nennt man Peptidsynthetasen [2, 3].

Nichtribosomale Peptidsynthese scheint Mikroorganismen vorbehalten. Bedeutende Vertreter dieses Biosyntheseweges des Sekundärmetabolismus sind gram-positive Bakterien des Genus *Bacillus*, eine große Anzahl von Actinomyceten sowie einige gram-negative Proteobakterien [4-6]. Auch einzellige Pilze sind Produzenten nichtribosomaler Peptide [7]. Die physiologische Rolle der strukturell sehr divergenten Gruppe an nichtribosomalen Peptiden (siehe einige ausgewählte Beispiele in Abb. 2.1-1) in den Produzentenstämmen ist oftmals nicht geklärt [8]. Es wird spekuliert, daß nichtribosomalen Peptiden regulatorische Funktionen, insbesondere solche, die zu Zelldifferenzierungen führen, zukommen [9]. Anderen Hypothesen folgend könnten sie die Funktion von exogenen Signalstoffen übernehmen [10-12]. Einige nichtribosomal produzierte Peptide sind Fe^{III}-Chelatbildner, die unter Eisenmangelbedingungen produziert werden [13]. Diese sogenannten Siderophore werden in den extrazellulären Raum abgegeben, komplexieren dort Fe^{III}-Ionen und werden daraufhin über spezielle Transportsysteme in die Zelle zurückgeholt [14]. Dieser Mechanismus ist essentiell für die Pathogenität bestimmter Mikroorganismen, so die der humanpathogenen Bakterien des Pesterreger *Yersinia pestis* [15, 16], des Choleraerregers *Vibrio cholerae* [17, 18] oder des Tuberkuloseerregers *Mycobacterium tuberculosis* [19, 20]. Andere Hypothesen über die Funktionalität von nichtribosomal produzierten Peptiden stehen im Zusammenhang mit ihren bioaktiven Eigenschaften: viele dieser Peptide zeigen antibiotische Wirksamkeiten [21] und könnten den Produzentenstämmen als "Kampfstoffe" dienen, die einen gewissen Überlebensvorteil gegenüber anderen konkurrierenden Bewohnern des Lebensraums bringen.

Zwei Eigenschaften machen nichtribosomale Peptide zu einer interessanten Gruppe von Biomolekülen. Die erste ist struktureller Art [22]. Die Auswahl der benutzten Bausteine für die Synthese nichtribosomaler Peptide ist nicht beschränkt auf die 20 proteinogenen Aminosäuren des ribosomalen Systems. Einige hundert Aminosäuren und auch Hydroxysäuren dienen Peptidsynthetasen als Precursor. Zudem wird die Synthese nichtribosomaler Peptide begleitet durch umfangreiche Modifikationen wie α -C-Epimerisierung, N-Methylierung oder Heterozyklisierungen. β -, χ - und δ -verknüpfte Peptidbindungen sind zu finden [34]. Auch sind zyklische oder verzweigt-zyklische Produkte

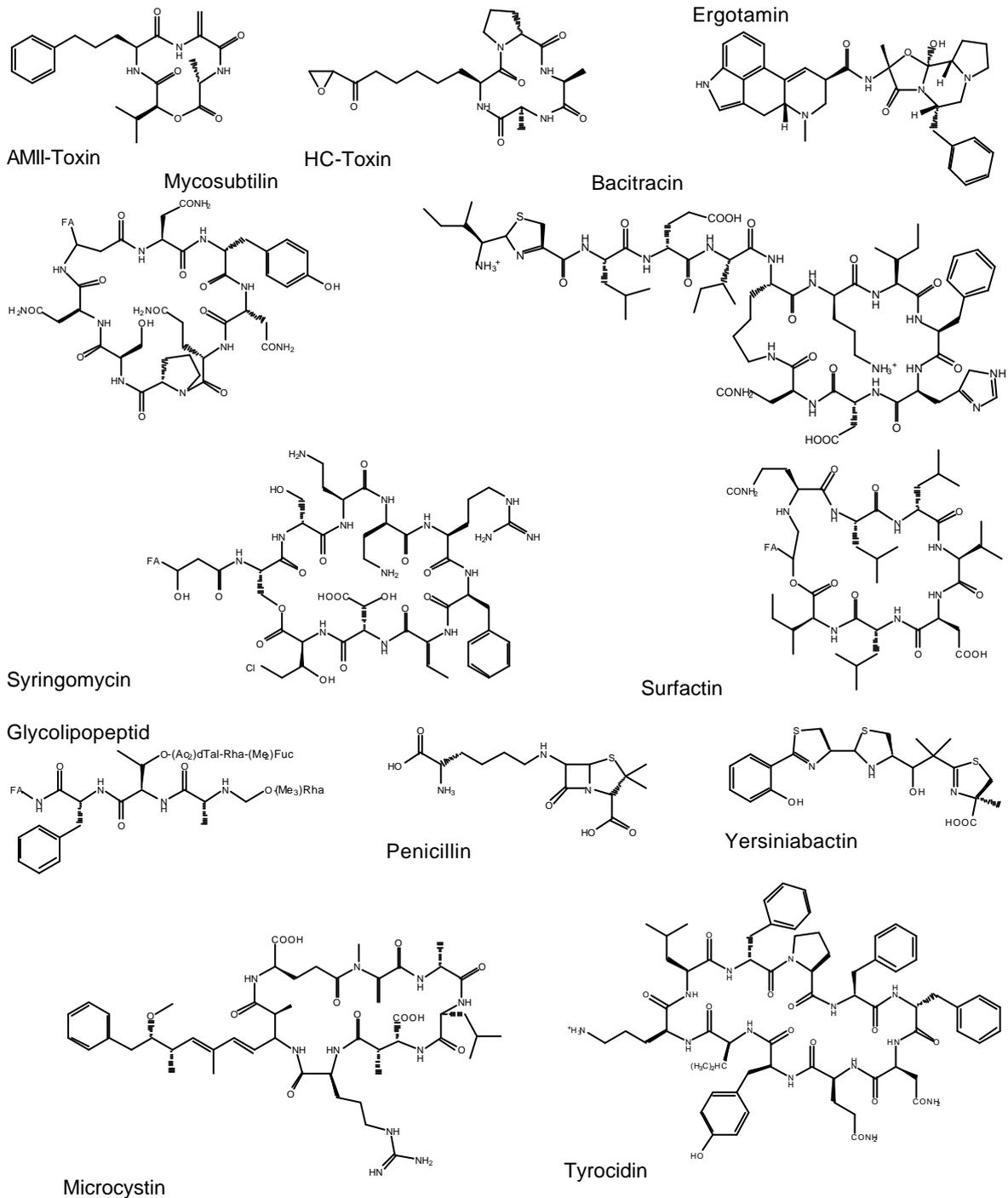


Abb. 2.1-1 Produkte der nichtribosomalen Peptidsynthese:

Mycosubtilin, Bacitracin, Penicillin, Chloroeromycin, Syringomycin und Tyrocidin sind Peptide mit antibiotischen Eigenschaften [23-28]. AMII-Toxin, HC-Toxin und Ergotamin sind Phytotoxine, die von Pilzen produziert werden [29-31]. Surfactin hat biotenside Eigenschaften [55]. Yersiniabactin ist ein Siderophor [16]. Das Glycolipopeptid [33] ist ein Bestandteil der Membran von *Mycobacterium smegmatis*, das eine bedeutende Rolle in der Pathogenität dieses Organismus spielt. Microcystin ist ein Hepatotoxin [38, 39].

häufig. Diese Modifikationen sind in der Regel auf enzymatische Eigenschaften der Peptidsynthetasen selbst zurückzuführen. Zudem können - "postsynthetisch" – Modifikationen wie zum Beispiel Glykosylierungen, Formylierungen oder Hydroxylierungen vorgenommen werden [26, 35].

Die Diversität ihrer Struktur wird komplementiert durch ihre Vielzahl an bioaktiven Eigenschaften. So haben einige nichtribosomale Peptide eine große pharmakologische Bedeutung erlangt: das Peptidrückgrat der Penicilline [25, 36] und Cephalosporine [37] sowie das der Vancomycin-Antibiotika [26] wird nichtribosomal produziert. Das Immunsuppressivum Cyclosporin ist ein zyklisches Undecapeptid, das von einer Peptidsynthetase prozessiert wird [32]. Andere nichtribosomale Peptide wie die Hepatotoxine des Cyanobakteriums *Microcystis aeruginosa* [38] können als toxische Produkte in eutrophierten Gewässern ausgemacht werden [39]. Viele nichtribosomale Peptide pilzlichen Ursprungs sind untersucht, weil ihre Toxizität für bestimmte Nutzpflanzen beträchtlichen ökonomischen Schaden verursacht [29-31].

Peptidsynthetasen sind Enzyme enormer Größe; so ist die Cyclosporin-Synthetase aus dem Pilz *Tolypocladium niveum* mit einem Molekulargewicht von mehr als 1600 kDa das größte bekannte Enzym überhaupt [32, 40]. Dieser Gigantismus rührt her von der modularen Struktur von repetitiven enzymatischen Einheiten. Ein Modul wird als eine Einheit von katalytischen Aktivitäten definiert, die für den Einbau *einer* Aminosäure in das produzierte Peptid verantwortlich ist [21, 41]. So stimmt die Anzahl an Modulen einer Peptidsynthetase mit der Anzahl der Aminosäuren des produzierten Peptides überein (siehe dazu auch 2.3). Die lineare Aneinanderreihung von Modulen spiegelt dabei die Primärstruktur des Peptides wider; man sagt, die Synthese ist kolinear zum Enzym-Templat. Ein Minimal-Modul, das die notwendige Anzahl an katalytischen Aktivitäten für die Knüpfung einer Peptidbindung besitzt, besteht aus drei enzymatischen Domänen: die Substrate werden erkannt und aktiviert über die Bildung eines Adenylates (Adenylierungsdomäne, [42, 43]). Nachfolgend wird das aktivierte Adenylat als Thioester an einem jedem Modul eigenen Co-Faktor gebunden [44]. Dieser Co-Faktor – ein 4'-Phosphopantethein-Rest – ist Bestandteil der Thiolierungsdomänen [45, 46]. Während der Synthese eines nichtribosomalen Peptides kommt es zur Thioesteraktivierung einer jeden Substrataminosäure A bis X, die in gleicher Reihenfolge an den Modulen A bis X gebunden sind. Die gerichtete Elongation zum Peptid erfolgt in einer schrittweisen N- nach C-terminalen Knüpfung von Peptidbindungen; daran ist die dritte enzymatische Domäne - die Kondensationsdomäne - beteiligt [47]. Die Abspaltung des enzymgebundenen Produktes von dem letzten Modul kann anschließend unter Hydrolyse oder Zyklisierung durch die Katalyse einer C-terminalen Domäne mit Thioesterase-Aktivität erfolgen [21]. Ein Minimalmodul kann durch optionale katalytische

Domänen erweitert werden, deren enzymatische Aktivitäten, die α -C-Epimerisierung [48] oder N-Methylierung [49, 50] von nichtribosomalen Peptiden bewirken.

Die Module von Peptidsynthetasen können auf nur einer, aber auch auf mehreren Polypeptidketten lokalisiert sein. So kann man Peptidsynthetasen als modulare Multidomänen- und Multienzym-Komplexe bezeichnen.

Die Identifizierung der modularen Struktur von Peptidsynthetasen und des daraus abgeleiteten Mechanismus der nichtribosomalen Peptidsynthese wurde in den letzten Jahren gefestigt durch die Analyse der zugehörigen Gene. So ermöglichen immer schnellere Techniken zur DNA-Sequenzierung die wachsende Verfügbarkeit von Peptidsynthetase-Genen. Die Zuordnung von Genen, die für Peptidsynthetasen kodieren, wird ermöglicht durch Identifizierung hochkonservierter Sequenzmotive [22]. Diese Zuordnung wurde umgekehrt ausgenutzt, um mit Hilfe degenerativer DNA-Oligonukleotide, bis dahin unbekannte Peptidsynthetase-Gene aus unterschiedlichen Organismen zu identifizieren [51]. Die Zuordnung von bestimmten Sequenzmotiven zu katalytischen Aktivitäten der nichtribosomalen Peptidsynthese ging teilweise tatsächlich der biochemischen Charakterisierung von enzymatischen Domänen voraus. In den letzten Jahren akkumulieren insbesondere durch die Entschlüsselung von bakteriellen Genomen [20, 52, 53], Gene von Peptidsynthetasen unbekannter Funktion [54], so daß eine Zuordnung von genetischen Daten zu einer Struktur von nichtribosomalen Peptiden eine immer drängendere Aufgabe darstellt.

Bakterielle Peptidsynthetase-Gene eines Biosynthese-Komplexes sind oft als Operons organisiert [24, 28, 56]. Die Größe dieser Operons reicht dabei bis zu 60 kb [26]. Eine schematische Darstellung der Organisation einiger Peptidsynthetase-Gene findet sich in Abb. 2.1-2. Erst in jüngster Zeit sind bakterielle Peptidsynthetase-Gene identifiziert worden, die, obwohl sie Bestandteil eines Biosynthese-Komplexes sind, keiner ko-transkriptionellen Regulation unterliegen [27, 57, 58]. Auch wurden Biosynthese-Operons identifiziert, die keine physikalische Gruppierung aufweisen [18, 38].

2.2 Einzelaktivitäten der Peptidsynthetasen

Sequenzvergleiche von Peptidsynthetasen [56] führten zur Identifizierung putativer katalytischer Einheiten, die man als Domänen bezeichnete [59]. Jeder dieser Domänen kommt ein Einzelschritt der nichtribosomalen Peptidsynthese zu. Es konnte gezeigt werden, daß diese Domänen als semi-autonom gelten können [28, 60]. Domänen, die als distinkte rekombinante Proteine dargestellt wurden, zeigten weiterhin die Fähigkeit, betreffende Teilschritte der nichtribosomalen Peptidsynthese zu katalysieren.

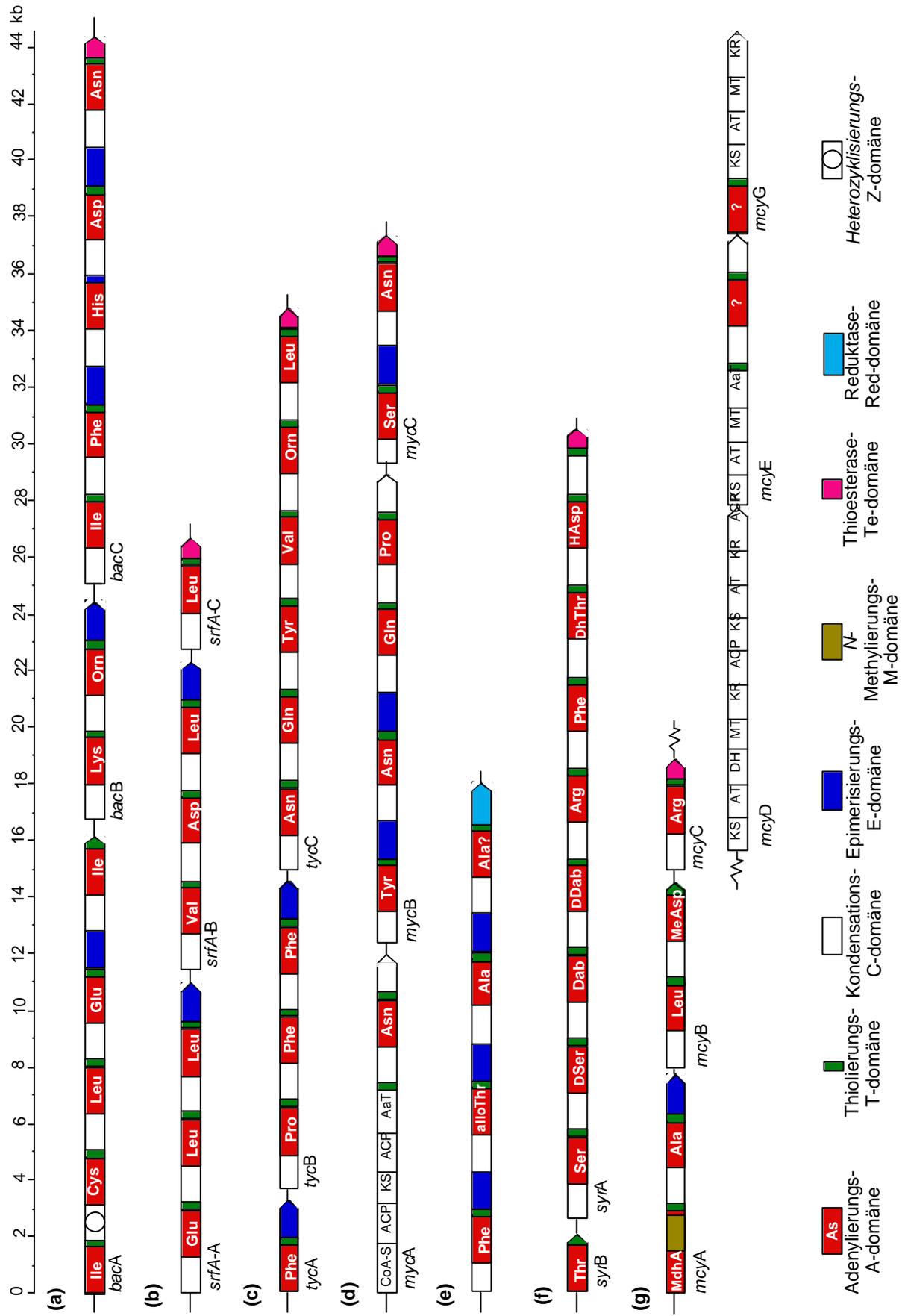


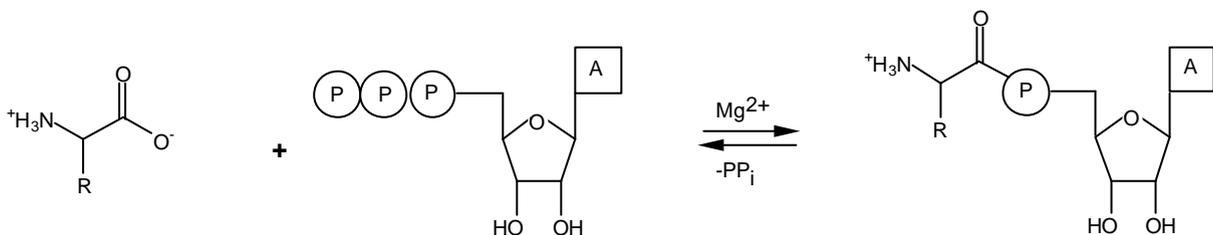
Abb. 2.1-2 (umseitig) Peptidsynthetasen kodierende Gene:

Schematische Darstellung von Genen, die für Peptidsynthetasen kodieren. (a) Gene der Bacitracin Synthetasen A-C aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 [24], (b) Gene der Surfactin A Synthetasen A-C aus *Bacillus subtilis* ATCC 21332 [55], (c) Gene der Tyrocidin Synthetasen A-C aus *Bacillus brevis* ATCC 8185 [28], (d) Gene der Mycosubtilin Synthetasen A-C aus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [23]. MycA ist ein funktionelles Hybrid, das Teile einer Fettsäuresynthase und eine Acyltransferase enthält. (e) Gen der Glycolipopeptid Synthetase aus *Mycobacterium smegmatis* MC2155 [33], (f) Gene der Syringomycin Synthetasen aus *Pseudomonas syringae* [27], (g) Gene der Microcystin Synthetase A-E und G aus *Microcystis aeruginosa* [38]. McyD ist eine Polyketidsynthase. McyE und G sind gemischte PPS-PKS Proteine. Die sechs Gene *mcyA-E* und G sind nicht Teil eines Operons.

*allo*Thr= *Allo*-Threonin, Dab= Diaminobuttersäure, DhThr= Dehydro-Threonin, HAsp= 3-Hydroxy-Aspartat, MdhA= *N*-Methyldehydro-Alanin, MeAsp= 3-Methyl-Aspartat. Abkürzungen für Polyketidsynthase-Domänen: KS= β -Ketoacylsynthase, AT= Acyltransferase, DH= β -Hydroxyacyl-Dehydrase, MT= Methyltransferase, KR= β -Ketoacylreduktase, ACP= *acyl-carrier-protein*, AaT= Aminotransferase. Die Strukturen der zugehörigen nichtribosomalen Peptide finden sich in Abb. 2.1-1.

2.2.1 Die Adenylierungsdomäne

Die Spezifität der nichtribosomalen Peptidynthese wird in erster Linie determiniert durch die A-Domäne [5]. Diese etwa 550 As große Domäne aktiviert selektiv Aminosäuren (und Hydroxy-Carboxysäuren) durch eine Adenylatbildung [61, 62]. Dabei wird ATP verbraucht und Pyrophosphat freigesetzt (siehe Abb. 2.2-1). A-Domänen von Peptidsynthetasen sind

**Abb. 2.2-1 Die A-Domäne:**

Die A-Domäne adenyliert spezifisch Substrataminosäuren. Sie ist damit die Domäne, die in erster Linie die Zusammensetzung von nichtribosomalen Peptiden determiniert.

deshalb in eine Gruppe von adenylatbildenden Enzymen [56] einzuordnen zu der auch Luciferasen [64, 65] und andere Acyl-CoA-Ligasen [215] gehören. Diese Klasse der adenylatbildenden Enzyme verbindet keine Konservierung der Primärstruktur. Erstaunlicherweise konnte aber gezeigt werden, daß die Tertiärstruktur der Luciferase aus *Photinus pyralis* und die der A-Domäne von GrsA (PheA) aus *Bacillus brevis* eine ausgeprägte Homologie aufweist [66]. Dieses Beispiel unterstreicht die Prinzipien einer konvergenten Evolution, nach der zwei unabhängig entstandene Systeme, die unter den gleichen äußeren Zwängen stehen, eine konvergente Entwicklung des Mechanismus

durchlaufen [67]. Aminoacyl-tRNA Synthetasen repräsentieren dagegen andere Klassen von adenylatbildenden Enzymen [63].

Da A-Domänen von Peptidsynthetasen eine Identität von 30-60 % untereinander aufweisen, kann angenommen werden, daß die Struktur von PheA als Prototyp für alle A-Domänen gilt [21].

Tab. 2.2-1 Konservierte Sequenzmotive der A-Domänen

A-Domäne	Motiv	Sequenz
	A1	L(TS)YxEL
	A2	LKAGxAYL(VL)P(LI)D
	A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG
	A4	FDxS
	A5	NxYGPTE
	A6	GELIxGxG(VL)ARGYL
	A7	Y(RK)TGDL
	A8	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE
	A9	LPLPxYM(IV)P
	A10	NGK(VL)DR

Mit Hilfe von detaillierten Sequenzanalysen gelang die Identifizierung von hochkonservierten Bereichen (siehe Tabelle 2.2-1) innerhalb von A-Domänen, und die Bedeutung einiger dieser invarianter Reste konnte durch gezielte Mutationen und Photoaffinitäts-*labeling* nachgewiesen werden [62, 68-70]. Einen tieferen Einblick in die Architektur von A-Domänen gab die Kristallstruktur von PheA [66], mit deren Hilfe es gelang, die Reste, die maßgeblich an der Koordination der Aminosäure-Substrate beteiligt sind, zu identifizieren. Dies führte zur Definition eines "nichtribosomalen Codes", dessen Anwendung es ermöglicht, die Substrataminosäuren von A-Domänen unbekannter Spezifität vorherzusagen [71]. Auch gelang es durch gezielte Veränderung weniger der neun diesen Code determinierenden Reste, die Spezifität von A-Domänen zu verändern.

In die Primärstruktur von A-Domänen können zusätzliche katalytische Domänen wie N-Methylierungs- [72] und Oxygenasedomänen [73, 74] inseriert sein. Dieser Einschub gelingt in einen variablen Bereich zwischen den beiden großen Untereinheiten von A-Domänen [66].

2.2.2 Die Thiolierungsdomäne und die posttranslationale Modifikation

Im C-Terminus von A-Domänen schließt sich eine kurze, etwa 80 Aminosäuren große Proteindomäne an. Dieser als T- oder PCP-Domäne bezeichneten Domäne kommt keine katalytische Funktion zu, vielmehr dient die Seitenkette eines invarianten Serin-Restes des Motivs LGG(HD)S(LI) als Anker für die Anheftung des Co-Faktors 4'-Phosphopantethein [46].

Das Cysteinamin-Ende dieses Co-Faktors dient der nichtribosomalen Peptidsynthese als *carrier* der vorher aktivierten Substrat-Aminosäuren (siehe Abb. 2.2-2). Aufgrund der mechanistischen Ähnlichkeiten zur Fettsäure- [75] und Polyketidbiosynthese [76] wird dieser Domärentyp in Analogie zum *Acyl-carrier-protein* (ACP) auch als *Peptidyl-carrier-protein* (PCP) bezeichnet [60]. Auch Biotinyl- und Lipoylabhängige Enzyme weisen (nicht homologe) kurze, etwa 80 Aminosäuren umfassende *carrier*-Domänen auf [77, 78].

PCP-Domänen kommt, übertragen auf die ribosomale Peptidsynthese, die Aufgabe der t-RNA zu. Seitdem bewiesen wurde, daß *jedes* Modul einer Peptidsynthetase eine PCP-Domäne trägt – und damit das heute akzeptierte *multiple-carrier-model* etabliert wurde [79] – kann behauptet werden, daß modulare Peptidsynthetase-Module im Gegensatz zu tRNA-Synthetasen ihren eigenen *carrier* bereitstellen.

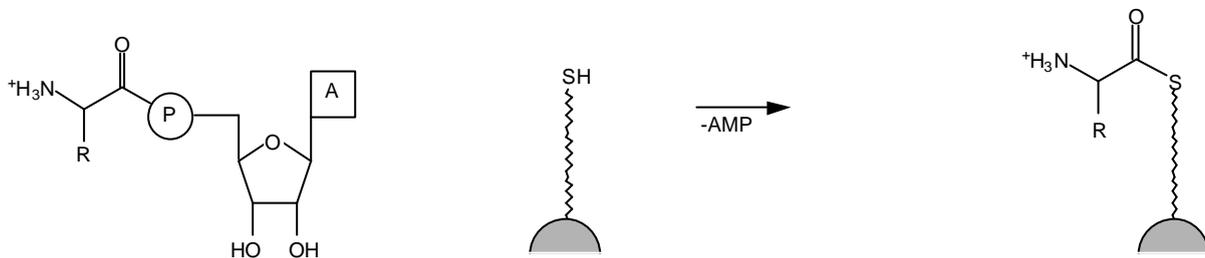


Abb.2.2-2 Die T-Domäne:

Die T-Domäne übernimmt die von der im N-Terminus liegenden A-Domäne aktivierten Adenylate und überträgt sie kovalent als Thioester auf den Kofaktor 4'-PPAN. Der flexible Arm des Kofaktors tritt auch mit C- und E-Domänen in Kontakt und erlaubt so das Prozessieren der enzymgebundenen Intermediate.

Funktionelle PCP-Domänen sind wie A-Domänen als distinkte rekombinante Proteine überproduziert worden [60]. Kürzlich wurde mit Hilfe der NMR-Technik, die Struktur der PCP-Domäne von TycC3 bestimmt [80]. Die funktionelle Verwandtschaft von ACP- und PCP-Domänen kann seitdem auf eine strukturelle Verwandtschaft ausgedehnt werden.

Die Modifikation des invarianten Serin-Restes von T-Domänen mit dem Co-Faktor 4'-PPAN ist ein für die Funktionalität von Peptidsynthetasen essentieller Schritt [81, 82]. Die Modifikation wird von CoA-bindenden 4'-PPAN-Transferasen übernommen [83] (siehe Abb. 2.2-3). Diese Proteine katalysieren den nukleophilen Angriff des Serin-Hydroxyl-O-Atoms auf die β -3'-Phosphatgruppe von CoA. Die Gene von 4'-PPAN-Transferasen sind oft mit Biosynthese-Operons nichtribosomaler Peptide assoziiert [55]. Die Substratspezifität von 4'-PPAN-Transferasen bezüglich von ACP- und PCP-Domänen ist mittlerweile eingehend untersucht worden [84, 85]. Systeme zur *in vitro* [83] und *in vivo*-Modifikation [86, 87] von T-Domänen mit 4'-PPAN-Transferasen sind etabliert. Die Kristallstruktur der mit der Biosynthese des Surfactins assoziierten 4'-PPAN-Transferase Sfp zeigte eine unerwartete

intramolekulare Pseudo-Symmetrie [88]. Dieser Befund spiegelt die Beobachtung wider, daß die mit 14 kDa nur halb so große 4'-PPAN-Transferase ACPS (die ACP-Synthase aus *E. coli*) ein funktionelles Homo-Dimer bildet.

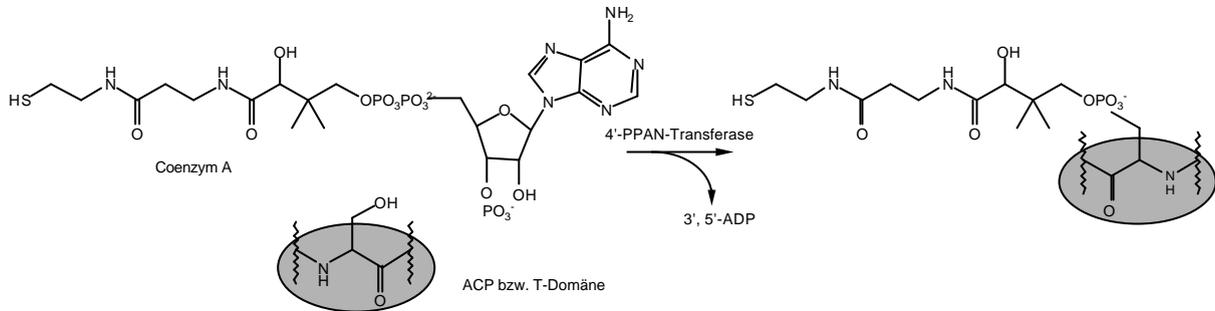


Abb. 2.2-3 Die enzymatische Funktion der 4'-PPAN-Transferasen:

Coenzym A-bindende 4'-PPAN-Transferasen modifizieren die Seitenkette eines invarianten Serinrestes von T-Domänen und ACPs mit dem Cofaktor 4'-PPAN.

2.2.3 Die Kondensationsdomäne

Die schrittweise N- nach C-terminale Kondensation von den als Thioester aktivierten Intermediaten wird bewerkstelligt durch die Kondensationsdomäne (C-Domäne, siehe Abb. 2.2-4) [47]. C-Domänen stellen den dritten essentiellen Domänentyp der nichtribosomalen Peptidsynthese dar. Per Definition wird ein Elongationsmodul deshalb als Abfolge der

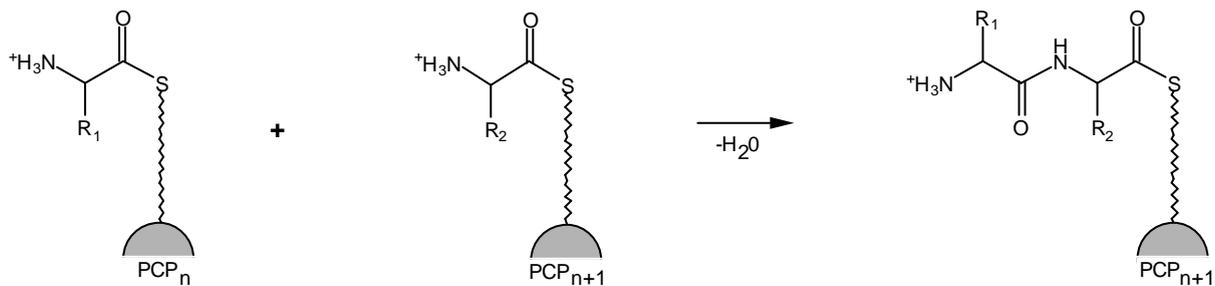


Abb. 2.2.-4 Die C-Domäne:

Der Elongationsschritt. Die C-Domäne katalysiert die Bildung einer Peptidbindung von zwei auf benachbarten T-Domänen aktivierten Intermediaten.

Domänen CAT bezeichnet [35]. Die Anzahl von C-Domänen einer Peptidsynthetase korreliert in bakteriellen Systemen mit der Anzahl der zu bildenden Peptidbindungen. C-Domänen haben eine Größe von etwa 450 Aminosäuren. Im Gegensatz zu A- und T-Domänen stellen C-Domänen eine Proteinklasse dar, die keine ausgedehnten Sequenzhomologien zu Proteinen mit aufgeklärten Mechanismen zeigen. Ein den C-Domänen eigenes Sequenzmotiv HHxxxDGxS [89, 90] findet sich auch in anderen

Enzymklassen, die den Transfer von Thioester-aktivierten Acylgruppen katalysieren, wie zum Beispiel den Chloramphenicol-Acetyltransferasen [91] und den Dihydrolipoyl-Transacetylasen [92]. Es wird angenommen, daß eines der Histidine des konservierten Motivs den nukleophilen Charakter der Aminogruppe der Akzeptoraminosäure erhöht, um so die Ausbildung einer Peptidbindung zu erleichtern. Die Identifizierung anderer hochkonservierter Reste innerhalb von G-Domänen lassen einen Mechanismus, der dem von Serin-Proteasen ähnelt, vermuten [93]. Zu anderen hochkonservierten Sequenzmotiven der C-Domänen, siehe Anhang D.

Die Rolle der C-Domäne [94] an der Ausbildung der Peptidbindung konnte *in vitro* bewiesen werden, indem sich ein Modellsystem der nichtribosomalen Peptidsynthese bedient wurde [47]. Durch Mutationsanalyse konnte bewiesen werden, daß das zweite Histidin des Motivs HHxxxDGxS eine für die Funktion der Domäne essentielle Bedeutung hat.

Untersuchungen von fehlbeladenen T-Domänen an einem *in vitro*-Modellsystem lassen vermuten, daß die C-Domäne eine beträchtliche Toleranz für die Art der zu verknüpfenden Donoraminosäure trägt, daß die Erkennung von Akzeptoraminosäuren aber restriktiv ist [95].

2.2.4 Die Heterozyklisierungsdomäne

Alternativ kann die Kondensation zweier als Thioester gebundener Adenylate zur Ausbildung von Heterozyklen des Thiazolin- und Oxazolintyps führen [24]. Dieser Reaktionstyp (siehe Abb. 2.2-5) involviert die Seitenketten der Akzeptoraminosäuren Cystein (Thiazolintyp) oder Serin beziehungsweise Threonin (Oxazolintyp). Die Katalyse der Heterozyklisierung ist dabei

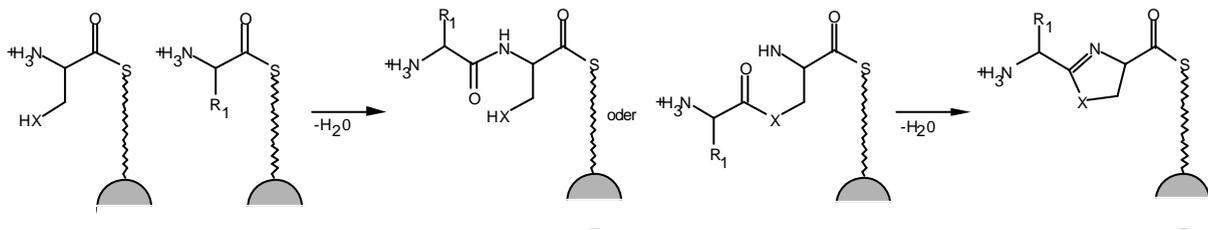


Abb. 2.2-5 Die Z-Domäne:

Eine Variante der Elongationsreaktion. Die Z-Domäne katalysiert die Bildung von Ringstrukturen des Oxazolin- oder Thiazolintyps. Dabei werden Seitenketten der Akzeptoraminosäuren Serin, Threonin oder Cystein verwendet. Der Mechanismus der Z-Domäne ist nicht geklärt. Es ist nicht bekannt, ob die Bildung eines (Thio)-Esters der Bildung der Peptidbindung vorausgeht oder ob die Peptidbindung zuerst geknüpft wird.

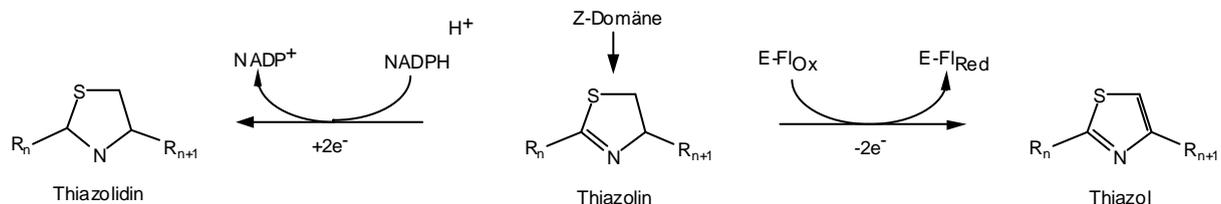
eine den Peptidsynthetasen inhärente Eigenschaft, wie durch Untersuchungen an den Yersiniabactin-Synthetase HMWPII gezeigt werden konnte [16]. Katalytische Domänen, die für eine Heterozyklisierung (Z-Domänen) verantwortlich sind, können sich in der selben Lokalisation wie die C-Domänen befinden; sie nehmen damit deren Position ein. Z-Domänen

zeichnen sich aber auch durch eine bemerkenswerte Varianz der Lokalisation aus [16, 18, 24, 74]. Z-Domänen können aufgrund von Unterschieden in der Primärstruktur klar von C-Domänen abgegrenzt werden. Es erscheint wahrscheinlich, daß beide Domärentypen einen gemeinsamen Vorläufer besitzen. Über den Mechanismus der Heterozyklisierung gibt es wenig Daten, insbesondere ist nicht bekannt, ob eine Peptidbindung oder eine (Thio)Esterbindung der Heterozyklisierung vorausgeht (vergleiche Abb. 2.2-5) [96]. Zu anderen hochkonservierten Sequenzmotiven der Z-Domänen, siehe Anhang D.

Die Bildung von Ringstrukturen des Thiazoltyps wie zum Beispiel die des ribosomal produzierten Microcin aus *E. coli* vollzieht sich über eine posttranslationale Modifikation mittels ATP-abhängiger Enzyme [97]. Der Vergleich der Primärstruktur dieser Proteine mit der von Z-Domänen ergibt keine Homologien, so daß sich beide Formen unabhängig voneinander entwickelt haben müssen.

Mit der Charakterisierung der Biosynthese-Operons des Epothilons und des Myxothiazols sind zwei Peptidsynthetase-Systeme beschrieben worden, die eine Insertion einer katalytischen Domäne innerhalb der A-Domäne, die einer Z-Domäne N-terminal vorausgeht, zeigen [73, 74]. Sequenzvergleiche lassen eine Funktion als Flavin-abhängige Oxygenase vermuten, so daß eine Beteiligung dieser Domäne an der Oxidation des Thiazolins zum Thiazol naheliegt.

Die Reduktion von Thiazolin-Strukturen zu Thiazolidinen erfolgt dagegen durch externe NADPH-abhängige Proteine [98].



2.2-6 Bildung von Thiazol- und Thiazolidin-Strukturen:

Die Heterozyklisierungsreaktion, die durch die Z-Domäne katalysiert wird, führt zur Bildung von Heterozyklen des Thiazolintyps. Die Oxidation scheint von einer Flavin-abhängigen Reduktase, die als optionale Domäne innerhalb von A-Domänen zu finden ist, vollzogen zu werden. Die Reduktion zum Thiazolidin dagegen ist Aufgabe einer externen NADPH-abhängigen Oxygenase.

2.2.5 Die Epimerisierungsdomäne

Eine optionale Insertion einer katalytischen Domäne findet sich in Modulen, die an der Prozession von D-konfigurierten Aminosäuren beteiligt sind [21]. Diese als Epimerisierungsdomäne (E-Domäne) bezeichnete Domäne ist als Insertion zwischen T- und C-Domäne zu verstehen. E-Domänen haben eine Länge von 450 Aminosäuren.

Sequenzvergleiche lassen eine Homologie von E-Domänen zu C-Domänen erkennen (siehe Anhang D). Alle identifizierten hochkonservierten Sequenzmotive von C-Domänen finden sich in abgeänderter Form auch in E-Domänen. Ein den C-Domänen ähnlicher Mechanismus ist daher zu erwarten [101]. E-Domänen stellen eine von PLP-abhängigen Epimerasen zu unterscheidende Gruppe von Enzymen dar [99, 100].

E-Domänen sind eher als Racemasen, denn als Epimerasen anzusehen. Punktmutationen innerhalb der E-Domäne von TycA belegen die Beteiligung einiger Reste an der Katalyse sowie der Geschwindigkeit und Art der D-/L-Äquibrierung [101].

Die Epimerisierung von Aminosäuren, die an internen Modulen aktiviert und thioliert werden, erfolgt auf Stufe der Peptidylbildung [25, 102]. Durch Untersuchungen an hybriden Enzymen konnte nachgewiesen werden, daß E-Domänen offensichtlich eine Toleranz bezüglich der Epimerisierung nicht-kognater Substrataminosäuren tragen [103].

2.2.6 Die N-Methylierungsdomäne

Module, die an der Prozessierung N-methylierter Aminosäuren beteiligt sind, beinhalten als Insertion innerhalb der A-Domäne eine etwa 420 Aminosäuren große katalytische Domäne. Sie wird als N-Methylierungsdomäne bezeichnet [50, 72]. M-Domänen besitzen ein Sequenzmotiv, das man auch in anderen S-Adenosinmethionin-abhängigen Enzymen findet. Studien an hybriden Peptidsynthetasen lassen vermuten, daß die N-Methylierung – wie die Epimerisierung – auf der Stufe der Peptidylbildung abläuft [49, 104].

2.2.7 Thioesterasedomäne und Reduktasedomäne

Die Abspaltung von Peptiden von der T-Domäne des letzten Moduls wird vollzogen durch die Thioesterasedomäne (Te-Domäne, siehe Abb. 2.2-7), die am C-terminalen Ende von Peptidsynthetasen zu finden ist [105]. Diese 250 Aminosäuren große Domäne weist Homologien zu den Te-Domänen der Fettsäure- [106] und Polyketidsynthetasen [107] auf; sie enthalten alle das Sequenzmotiv GxSxG, das vermutlich Bestandteil einer katalytischen Triade ist [108].

Indirekte Beweise für die Wichtigkeit der Te-Domäne an der Produktabspaltung wurden erhalten durch eine Deletion der C-terminalen Te-Domäne der SurfactinA-Synthetase C [105]. Ebenso führte die Repositionierung dieser Domäne hinter andere, im N-Terminus liegende Module *in vivo* zur Darstellung verkürzter Peptide [109].

Durch Konstruktion von hybriden Peptidsynthetasen *in vitro* konnte die Rolle der Te-Domäne an der Produktabspaltung von Peptiden eindeutig bewiesen werden [110]. Te-Domänen kommt auch eine Rolle an der Art der Abspaltung von nichtribosomalen Peptiden zu: so konnte anhand der Enterobactin-Synthetase EntF belegt werden, das die Trimerisierung zum

Enterobactin nach der kovalenten Übertragung der Monomere auf den Serinrest des GxSxG-Motivs vollzogen wird [111].

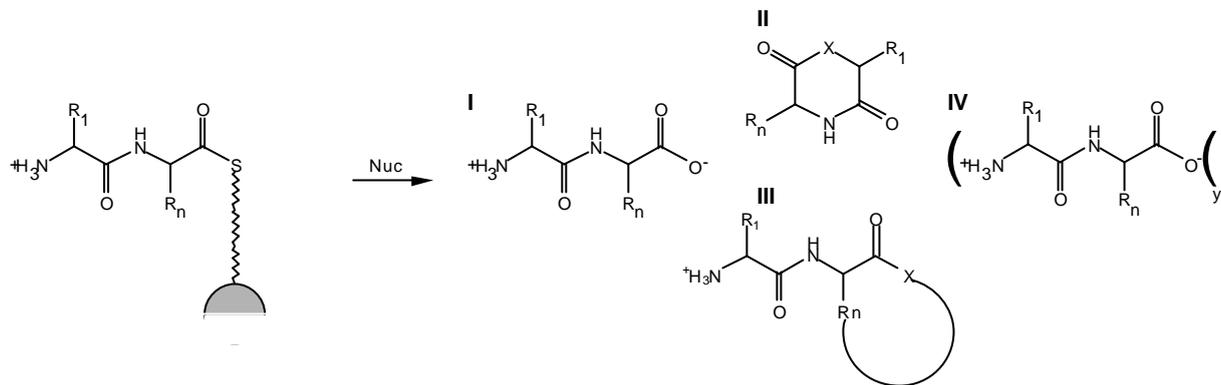


Abb. 2.2-7 Die Te-Domäne:

Die Te-Domäne katalysiert die Abspaltung der enzymgebundenen Peptide vom Enzym-Templat. Dabei können lineare (I), zyklische (II) oder verzweigt zyklische Produkte (III) entstehen. Auch eine Multimerisierung findet an der Te-Domäne statt (IV). X= N, O.

Eine alternative Abspaltung von Peptiden von nichtribosomalen Enzym-Templaten kann durch die Verwendung einer NADPH-abhängigen Reduktasedomäne (Red-Domäne) erfolgen [112, 113]. Dies führt in diesem Fall zur Freisetzung von Peptiden mit C-terminal reduzierten Aldehyd- oder Alkoholgruppen. So resultiert die reduktive Abspaltung eines Peptides mit Alanin am C-terminalen Ende in einem Peptid, dessen C-Terminus ein Ethanolamin bildet [33]. Red-Domänen finden sich auch in Enzymen der Lysin-Biosynthese in Hefen [114] sowie Polyketidsynthasen und Acyl-CoA-Ligasen.

2.3 Peptidsynthetasen in bakteriellen und pilzlichen Organismen

Die ersten identifizierten pilzlichen Gene, die für Peptidsynthetasen kodieren, waren die der ACV-Synthetase aus *Penicillium chrysogenum* [36] und die gigantische Cyclosporin-Synthetase aus *Tolypocladium inflatum* [32]. Aufgrund des Fehlens von Introns innerhalb dieser riesigen Gene wurde lange angenommen, Pilze hätten Peptidsynthetase-Gene über einen horizontalen Gentransfer von Bakterien erworben. Mit der jüngsten Identifizierung von pilzlichen Peptidsynthetase-Genen muß diese Hypothese revidiert werden: die Gene der Ergotamin Synthetase LPS1 aus *Claviceps purpurea* (dem Mutterkorn-Pilz) [31] und einer Peptidsynthetase unbekannter Funktion aus *Metarhizium anisopliae* [216] enthalten kurze Introns. Es muß deshalb angenommen werden, daß Gene von Peptidsynthetasen für eine evolutionär längere Periode in Pilzen vorhanden waren. In der Tat lassen sich einige

Charakteristika pilzlicher Peptidsynthetasen ausmachen, die sich von denen bakterieller Enzymen unterscheiden [115].

Da Eukaryonten die Kontrolle einer polycistronischen Transkriptionsregulierung fehlt, die Module von Peptidsynthetasen aber trotzdem in einem stöchiometrischen Verhältnis vorhanden sein müssen, findet man die Module von pilzlichen Peptidsynthetasen in der Regel auf einer Polypeptidkette lokalisiert. Die einzige Ausnahme stellt bis heute der Biosynthese-Komplex der Ergotamin-Synthetasen dar, der aus zwei Proteinen besteht [31, 116].

Das auffälligste Unterscheidungsmerkmal pilzlicher Peptidsynthetasen ist ein offenbar alternativer Mechanismus der Termination von enzymgebundenen Produkten (siehe 2.2.7). Während in bakteriellen Biosynthese-Komplexen die Anzahl der C-Domänen mit der zu bildenden Peptidbindungen korreliert, so findet man in pilzlichen Biosynthese-Komplexen eine zusätzliche C-terminale C-Domäne, die die Position der in bakteriellen Peptidsynthetasen zu findenden Te-Domäne einnimmt [29-32]. Diese C-Domäne scheint nicht wie normalerweise, die Aminogruppe der Akzeptoraminosäure als Nukleophil zu verwenden, sondern – je nachdem, ob lineare oder zyklische Produkte entstehen – Wasser, beziehungsweise die Aminogruppe der Starteraminosäure [117].

Nichtribosomale Peptide aus pilzlichen Organismen enthalten oft D-konfigurierte Aminosäuren, doch findet sich in zugehörigen Peptidsynthetasen keine E-Domäne in Modulen, die für die Inkorporation dieser Aminosäuren verantwortlich sind. Hier werden D-konfigurierte Aminosäuren als Substrate für die Adenylierung verwendet; externe Epimerasen scheinen für die Konfirugationsumkehr verantwortlich zu sein [32]. Auch die Peptidsynthetasen der bakteriellen Biosynthese-Komplexe des Chloroeromycin aus *Amycolatopsis orientalis* [26] sowie des Syringomycin aus *Pseudomonas syringae* [27] enthalten offenbar A-Domänen, die spezifisch D-Aminosäuren erkennen und adenylieren.

Es sind Gene für Peptidsynthetasen aus pro- und eukaryontischen Organismen charakterisiert worden, die eine Domänenorganisation aufweisen, denen offenbar A-Domänen fehlen. Module mit der Domänenorganisation CT anstelle CAT werden gefunden. Im Falle des Syringomycin Biosynthese-Komplexes [27] wurde postuliert, daß eine solche Domänenorganisation einer *in trans*-Acylierung dient, die hier durch das distinkte einmodulare Enzym SyrB bereitgestellt wird. *In trans*-Acylierungen - eine Art Nebeneingang in die nichtribosomale Peptidsynthese - weichen das bisher geltende Kolinearitätsprinzip von Peptidsynthetasen auf. *In trans*-Acylierungen sind nachgewiesen worden im Falle der Yersiniabactin-Synthetase HMWP II aus *Yersinia pestis* [118], die eine ungewöhnliche Domänenstruktur von drei T-Domänen, aber nur einer A-Domäne zeigt [16].

Module mit CT-Domänenorganisationen sind jüngst auch in dem Biosynthese-Komplex der Mycosubtilin-Peptidsynthetasen aus *Bacillus brevis* ATCC 6633 nachgewiesen worden [23].

Zudem stellt die Peptidsynthetase MycA das erste Beispiel eines funktionellen Hybrid-Proteins dar, das neben einer Peptidsynthetase Teile einer Fettsäure-Synthase sowie einer Acyltransferase in sich vereint. Es wird angenommen, daß MycA an der Synthese des Fettsäure-Anteils von Mycosubtilin beteiligt ist, die anschließend durch die System-eigene Acyltransferase auf die Aminogruppe der Starteraminosäure übertragen wird. Die Acylkette des Mycosubtilins weist *eine* definierte Struktur auf; das unterscheidet sie von denen anderer Lipopeptide wie die des Lichenysins aus *Bacillus licheniformis* JF-2 [119]. Eine Acyltransferase analog der von MycA ist in der Peptidsynthetase McyE aus dem Biosynthese-Komplex des Microcystins aus *Microcystis aeruginosa* identifiziert worden [38]. Die Mycosubtilin Synthetasen MycA und B weisen als weiteres Charakteristikum eine ungewöhnliche Domänenorganisation im Übergang zweier Polypeptidketten auf: die intermolekulare Domänenorganisation weist gemeinhin die C-Domäne dem Akzeptorprotein zu, woraus sich eine intermolekulare Organisation T→C ergibt. In MycA und B wird die C-Domäne als Teil des Donorproteins gefunden (C→A). Diese ungewöhnliche intermolekulare Domänenorganisation wurde bisher nur in dem Biosynthese-Komplex der Exochelin-Peptidsynthetasen FxB und C aus *Mycobacterium smegmatis* beschrieben [120]. Die Komplexität von Peptidsynthetasen kann noch ausgedehnt werden durch die Kombination mit enzymatischen Domänen von Polyketidsynthasen [19, 38, 121, 122]. Die auffällige Analogie der Architektur modularer Polyketidsynthasen der Typs I und Peptidsynthetasen ist beschrieben worden [123]. Die Natur bedient sich offenbar gemischten PPS-PKS-Systemen, um die strukturelle Diversität von Biomolekülen noch zu erhöhen.

2.4 Die gezielte Veränderung nichtribosomaler Enzym-Template

Nichtribosomale Peptidsynthetasen können verstanden werden als ein geordnetes Arrangement katalytischer Domänen, die – wie spezialisierte Arbeiter an einem Fließband – bestimmte enzymatische Reaktionen durchführen, an deren Ende die Bildung einer Peptidbindung steht. Mehrmaliges Durchlaufen dieser Reaktionen an repetitiven Modulen kann zum Aufbau einer wachsenden Peptidkette führen. Der Aufbau von Peptidsynthetasen aus enzymatisch aktiven Domänen sowie deren übergeordnete modulare Domänenstruktur wird durch den *multiple-carrier-thiotemplate* Mechanismus logisch erklärt [79].

Aus diesem Verständnis heraus sind Manipulationen der Domänen- und Modulstruktur von Peptidsynthetasen erdacht worden [35, 124], die darauf abzielten, die Spezifität von Modulen zu verändern, die enzymatische Ausstattung zu erweitern oder zu minimieren sowie nichtribosomale Enzym-Template durch Insertion oder Deletion von Modulen abzuändern. Auch die *de novo*-Synthese von an nichtribosomalen Templaten prozessierten kurzen

Peptiden wurde durch Anwendung von Domänen- und Modulfusionen ins Auge gefaßt. Die Darstellung von artifiziellen Enzym-Templaten der nichtribosomalen Peptidsynthese nimmt in dieser Arbeit einen bedeutenden Raum ein und so soll hier einführend auf die in der Literatur beschriebenen Versuche zur Manipulation von Peptidsynthetasen eingegangen werden (siehe Abb. 2.4-1).

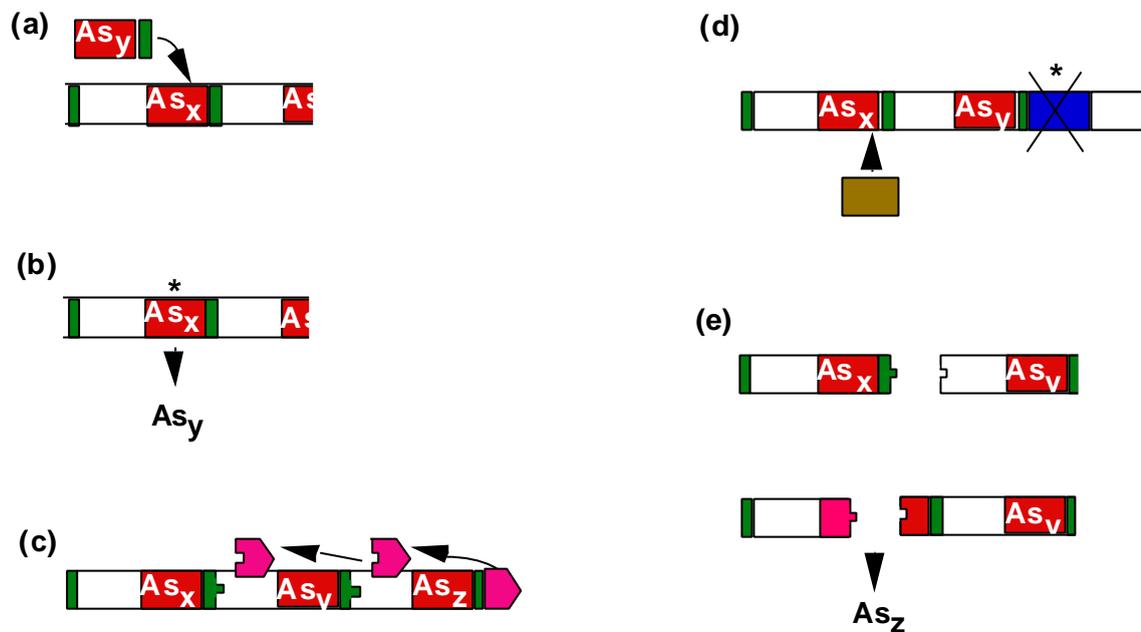


Abb. 2.4-1 Methoden der Manipulation von modularen Peptidsynthetasen:

(a) Der Austausch der Domänenstruktur AT im Enzym-Templat führt zum Austausch der dieser Position entsprechenden Aminosäure [59, 125], (b) das gleiche Resultat läßt sich auch durch Modulation der Substratspezifität einer A-Domäne erzielen, in diesem Fall durch die Einführung von Punktmutationen [71, 126], (c) Repositionierung der die nichtribosomale Peptidsynthese terminierenden Te-Domäne führt zur Darstellung verkürzter Peptide [87, 109, 110], (d) die Integration optionaler Domänen (links eine M-Domäne) führt zur induzierten Modifikation eines Peptids (*gain-of-function*) [127], die Unterbrechung einer optionalen Domäne (rechts eine E-Domäne) durch Mutation von für die Funktionalität wichtigen Resten induziert ebenfalls eine Modifikation des Peptides (*loss-of-function*) [128], (e) Domänenfusionen können benutzt werden, um neue Enzym-Templates gewünschter Spezifität zu konstruieren. Hier beispielhaft dargestellt, die Konstruktion von T-C-Domänenfusionen (oben) [110] und die Konstruktion einer chimären A-Domäne mit veränderter Spezifität (unten) [129, 130].

Das erste und bereits klassische Experiment zur Darstellung hybrider Peptidsynthetasen war der *in vivo*-Austausch der AT-Domänen im siebten Modul der Surfactin Synthetase C durch homologe AT-Domänen anderer Systeme [59]. Dabei konnte die Funktionalität dieses Austausches durch den Nachweis von an der siebten Position veränderten Surfactin-Analoga überprüft werden. Obwohl damit das Prinzip eines funktionellen

Domänen austausches bewiesen war, waren die Produktausbeuten dieser Surfactin-Analoga teilweise stark herabgesetzt. Der analog geführte Austausch von Modulen der dritten und fünften Position der Surfactin Synthetasen führte dagegen nicht zu den vorhergesagten Produkten [125].

Domänen austausche zwischen den eine Identität von mehr als 60 % aufweisenden Domänen der Surfactin- und Lichenysin Synthetasen belegten, daß ein Domänen austausch, der die Spezifität des Moduls nicht verändert, *nicht* zu einer verminderten Produktausbeute führen muß.

Eine andere *in vivo* Manipulation des Surfactin Biosynthese-Operons repositionierte den 3'-terminalen DNA-Bereich kodierend für die Thioesterase von SrfC hinter weiter im 5'-Bereich liegende Module [109]. Dies induzierte die Produktion artifiziell verkürzter Surfactinanaloga, wie sie anhand der neuen Modulstruktur vorhergesagt wurden. Auch konnte gezeigt werden, daß für die Interaktion der drei Surfactin A Synthetasen A-C keine transkriptionelle Ko-Regulation der natürlicherweise in einem Operon organisierten Gene *srfA-A-C* nötig ist [58].

Für die Funktionalität von artifiziellen Peptidsynthetasen ist die Wahl der Position der Hybridfusion entscheidend. So resultierte eine Darstellung von an verschiedenen Positionen innerhalb und außerhalb von enzymatischen Domänen fusionierten Hybriden der Surfactin Synthetase A in den meisten Fällen in einer Inaktivierung [129]. Die Möglichkeiten der Darstellung von hybriden Peptidsynthetase-Domänen über die Fusion an hochkonservierten Sequenzmotiven wurde untersucht [130]. Es gibt Untersuchungen, die eine limitierte Proteolyse verwendete, um die Grenzen von enzymatischen Domänen abzuschätzen [131].

Strategien, die versuchten, die Spezifität von Modulen zu verändern, beinhalten auch die Einführung von Punktmutationen in A-Domänen. Dieser Ansatz profitierte von der aufgeklärten Kristall-Struktur der A-Domäne der Peptidsynthetase GrsA (PheA), anhand derer die Identifikation von an der Substratbindung beteiligten Resten abzuleiten war [66]. So konnte gezeigt werden, daß wenige Punktmutationen, die Spezifität von A-Domänen bestimmen und die Substrataktivierung konnte somit vorhersagbar verändert werden [71]. Diese Untersuchungen wurden an distinkten rekombinanten A-Domänen *in vitro* durchgeführt.

In vitro-Untersuchungen an rekombinanten Peptidsynthetasen belegten jüngst die Praktikabilität der artifiziellen Fusion von Peptidsynthetase-Domänen [110]. Diese Untersuchungen benutzen die Definition von abgeschätzten Domänengrenzen, um dort die Hybridfusion einzuführen. So konnte die Funktion der Thioesterase-Domäne an der Spaltung des enzymgebundenen Intermediates vom Enzym-Templat nachgewiesen werden [132]. Auch gelang eine Repositionierung von Modulen der Tyrocidin-Synthetase, um so verkürzte Tyrocidin-Varianten darzustellen [110].

In vitro-Untersuchungen zur Toleranz der C-Domäne, nicht-kognate Substrate zu elongieren, waren wertvoll, um funktionelle Fusionen von Peptidsynthetase-Domänen zu etablieren [95].

2.5 Aufgabenstellung

Im Vordergrund der Aufgabenstellung dieser Arbeit stand die Etablierung von Methoden, *de novo* nichtribosomale Enzym-Template für die Darstellung von Dipeptiden zu erzeugen. Der Darstellung eines nichtribosomalen Enzym-Template für das Dipeptid Aspartyl-Phenylalanin (Asp-Phe) kam dabei besondere Wichtigkeit zu. Der Funktionalität artifizierender Hybrid-Peptidsynthetasen sollte durch Konstruktion verschiedener Domänenfusionen nachgegangen werden. Untersuchungen zur Fähigkeit der Hybrid-Peptidsynthetasen zur Produktion von Dipeptiden sollten angestellt werden, ebenso wie Untersuchungen, die den Einfluß der Hybridfusionen auf die einzelnen enzymatischen Reaktionen beleuchteten. Zur Untermauerung der im Zuge dieser Arbeit aufgestellten Regeln zur Konstruktion von Hybrid-Peptidsynthetasen sollten auch Enzym-Template anderer Spezifität als die von Asp-Phe dargestellt werden.

Begonnen werden sollte diese Arbeit mit der biochemischen Charakterisierung eines Peptid Biosynthese-Operons unbekannter Funktion aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716.

3 Material

3.1 Material

Tab. 3-1 Geräte, Hersteller und Typenbezeichnung

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Automatische Sequenzieranalyse	<i>PE Applied Biosystems</i> ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
Dokumentation von DNA-Agarosegelen	Videokamera <i>Cybertech</i> CS1
Elektrophoresesystem	<i>Biorad</i> Gene Pulser II
FPLC-System	<i>Pharmacia</i> FPLC-System bestehend aus: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpe P-500 (2x), Univord Opt. Einheit UV-1 (mit 280 nm Filter), Univord Kontrolleinheit UV-1, 2-Kanal-Flachbrettschreiber REC-102, Injektionsventil V-7, 3-Wege Magnetventil PSV-100, Fraktionssammler FRAC-100 und <i>chelating</i> -Superose-Säule HR 10/2
HPLC-MS-System	<i>Hewlett Packard</i> Series 1100 MSD HPLC-System mit DAD-Detektor, Vakuumentgaser, quatärner Pumpe, Autosampler und HP-Chemstation Säule: <i>Macherey & Nagel</i> Nucleosil C18 3/120 3-250
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series 25 Incubator Shaker
Mikrotiterplattenlesegerät	<i>Dynatech</i> MR7000
Photometer	<i>Pharmacia</i> Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrometer
Reinstwasseranlage	<i>Seral</i> Seralpur Pro90 CN
<i>Speed-Vac</i>	<i>Uniequip</i> Univapo 150 H
Szintillationszähler	<i>Packard</i> 1900CA TRI-CARB Liquid Szintillation Analyzer
Thermocycler	<i>Perkin Elmer</i> Thermal Cycler 480 <i>Perkin Elmer</i> GeneAmp PCR System2
UV-Inkubator	<i>Stratagene</i> Stratalinker UV Crosslinker Model 1800
Wasserbad	<i>Infors</i> Aquatron Rundschüttelmaschine
Zellaufschluß	SLM <i>Aminco</i> French Pressure Cell Press
Zentrifugen	<i>Beckman</i> Spinco L2 65B <i>Heraeus</i> Mikrofuge pico, Minifuge RF <i>Sorvall</i> RC 26 Plus

3.2 Enzyme und Chemikalien

Chemikalien, die in der nachfolgenden Tabelle nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Aldrich (Steinheim) in *p.a.* Qualität bezogen.

Tab. 3-2 Enzyme und Chemikalien

Amersham/Buchler (Braunschweig)	λ -DNA, Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme
Biomol (Ilvesheim)	DTT und DTE
Boehringer (Mannheim)	Mannheim Alkalische Phosphatase, Expand™ Long Template PCR System, <i>Blocking</i> -Reagenz, Lysozym
Difco (Detroit, USA)	Nutrient Broth, Casein-Hydrolysat
Du Pont/ Homburg)	NEN (Bad $[^{32}\text{P}]$ -Pyrophosphat (16 Ci mmol^{-1})
Eurogentec Belgien)	(Seraing, Agarose, Elektroporationsküvetten
Fluka (Neu-Ulm)	TEMED
Hartmann-Analytik (Braunschweig)	L-[U- ^{14}C]-Phenylalanin ($450 \text{ mCi mmol}^{-1}$), L-[U- ^{14}C]-Prolin ($246 \text{ mCi mmol}^{-1}$), L-[U- ^{14}C]-Aspartat ($200 \text{ mCi mmol}^{-1}$), L-[U- ^{14}C]-Tyrosin ($497 \text{ mCi mmol}^{-1}$), L-[U- ^{14}C]-Leucin ($292 \text{ mCi mmol}^{-1}$), L-[U- ^{14}C]-Valin ($200 \text{ mCi mmol}^{-1}$), L-[U- ^{14}C]-Isoleucin ($292 \text{ mCi mmol}^{-1}$), L-[5- ^3H]-Tryptophan ($22.1 \text{ Ci/ mmol}^{-1}$)
Gibco/BRL (Eggenstein)	Agarose, Acrylamid, Bisacrylamid
Kodak (Rochester, USA)	Röntgenfilme X-Omat AR und Biomaxx MR
MWG-Biotech (Ebersberg)	synthetische Oligonukleotide
Oxoid (Wesel)	Agar Nr.1
PE Applied (Weiterstadt)	Biosystems ABI Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit,
Qiagen (Hilden)	tip 20/100-Anionenaustauschersäulen, QIA-quick-spin, PCR Purification Kit, QIAexpress Vector Kit ATG, Ni-NTA-Agarose
Roth (Karlsruhe)	Ethidiumbromid, Trichloressigsäure, Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco Plus
Schleicher & Schüll (Dassel)	Sterilfilter ($0,45 \mu\text{m}$ Porengröße), Whatman-3MM-Papier
Serva (Heidelberg)	Bromphenolblau, Xylen-Cyanol, Triton X-100, Tween 20
Stratagene (Heidelberg)	pBluescript-Vektoren
United States (Bad Homburg)	Biochemicals Ampicillin, Kanamycin, Hefe-Extrakt, Agar Nr.1, APS, X-Gal, IPTG, Coomassie Brilliant Blue G

3.3 Vektoren

3.3.1 pBluescript II SK

Der Vektor pBluescript II ist ein 2961 bp großes Derivat von pUC19 [133]. Er enthält das für das α -Peptid der β -Galaktosidase kodierende *lacZ'*-Gen, das bei Insertion in die MCS unterbrochen wird und so eine Blau-Weiß-Selektion erlaubt. Der ColE1-Ursprung aus pBR322 [134, 135] ermöglicht die Replikation in *E. coli* und das Produkt des β -Laktamase-Gens *bla* vermittelt Resistenz gegen Ampicillin. Ferner ermöglicht der Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 (*f1 origin*) in Anwesenheit eines Helferphagen, die Extraktion von ssDNA. MCS in der Richtung des *lac*-Promotors: *Sac* I, *Sac* II, *Not* I, *Xba* I, *Spe* I, *Bam*H I, *Sma* I, *Pst* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Cla* I, *Hinc* II, *Sal* I, *Xho* I, *Dra* II, *Apa* I, *Kpn* I (in pBluescript KS in umgekehrter Reihenfolge).

3.3.2 pQE60/70

Die Vektoren pQE60 und pQE70 (jeweils 3431 bp) gehören zu der Familie der pDS-Plasmide [136] und basieren auf dem Plasmid pDS56/RBSII. Sie besitzen den T5-Promotor P_{N25} [137], zwei *lac*-Operationserkennungssequenzen und eine synthetische ribosomale Bindungsstelle, die auf hohe Expressionsraten in *E. coli* optimiert ist. Eine *in frame* Ligation in die MCS, bestehend aus *Nco* I, *Bam*H I und *Bgl* II, führt zu einer C-terminalen Fusion der rekombinanten Proteine mit sechs Histidinen (*His*₆-tag). Die Sequenz ATG der *Nco* I Restriktionssequenz dient für die Expression als Startkodon. Der analoge Vektor pQE70 besitzt die *multiple-cloning-site* *Sph* I, *Bam*H I und *Bgl* II. Das ATG der *Sph* I Restriktionssequenz dient hier als Startkodon. Das Plasmid verleiht Resistenz gegenüber Ampicillin durch die Expression des β -Laktamasegens *bla* und repliziert in *E. coli* mittels des ColE1 Replikationsursprunges aus pBR322 [134]. Die Genexpression in pQE-Vektoren ist durch den Lac-Repressor reprimierbar. Zu diesem Zwecke werden Expression unter Verwendung des Helferplasmids pREP4 durchgeführt.

3.3.3 pREP4

Das Plasmid pREP4 (3740 bp) ist mit seinem Replikationsursprung P15A [138] kompatibel zu ColE1-Plasmiden und kann so in Kombination mit pQE-Vektoren in *E. coli* repliziert werden. Es exprimiert den durch das *lacI*-Gen [139] kodierten Lac-Repressor. Durch das *neo*-Gen vermittelt es Resistenz gegen Kanamycin. Aufgrund einer Mutation in der RBS von *neo* sollten jedoch nur Konzentrationen von 25 μ g/mL zur Selektion eingesetzt werden. pREP4 wurde als Helferplasmid in Kombination mit pQE60 verwendet, um durch die Lac-Repressorproduktion, eine Regulation der Expression von in pQE-Vektoren enthaltenen Gene zu ermöglichen.

3.4 Mikroorganismen

Tab. 3-3 Vewendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	Wildtyp-Stamm, Surfactin-Produzent [140]
<i>B. licheniformis</i> ATCC 10716	Wildtyp-Stamm, Bacitracin-Produzent [141]
<i>B. licheniformis</i> ATCC 39307 JF-2	Wildtyp-Stamm, Lichensin-Produzent [142]
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>supE44</i> , <i>hscR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> ⁺ , <i>lac</i> ^q <i>lacZ</i> ΔM15, Tn10 (Tet ^r)] [143]
<i>E. coli</i> M15	<i>naI</i> ^β , <i>str</i> ^S , <i>rif</i> ^β , <i>lac</i> , <i>ara</i> , <i>gal</i> , <i>mtI</i> , F ⁻ [144]
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hscS</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i> -), <i>gal</i> [145, 146]

3.5 Medien

Für die Anzucht von *E. coli*, *B. licheniformis* und *B. subtilis* wurde 2x YT-Medium verwendet.

2x YT-Medium	Bactotrypton	16 g x L ⁻¹
	Hefeextrakt	10 g x L ⁻¹
	NaCl	5 g x L ⁻¹

M9-Medium diente als Minimalmedium zur Aufbewahrung der *E. coli*-Stämme. Zur Anfertigung des Mediums wurden Lösung I und II autoklaviert, im Verhältnis 89:10:1 (H₂O: Lsg. I : Lsg. II) gemischt und mit 1 mL sterilfiltriertem 1 M Thiaminiumchlorid versetzt.

M9-Medium Lösung I (pH 7.4)	Na ₂ HPO ₄	60 g x L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	30 g x L ⁻¹
	NaCl	5 g x L ⁻¹
	NH ₄ Cl	10 g x L ⁻¹
Lösung II	CaCl ₂	2.2 g x L ⁻¹
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	24.6 g x L ⁻¹
	Glukose	200 g x L ⁻¹

Als Sporulationsmedium für *B. subtilis* wurde Difco-Sporulationsmedium (DSM) eingesetzt:

DSM	Nutrient Broth	8 g x L ⁻¹
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,12 g x L ⁻¹
	KCl	1 g x L ⁻¹

autoklavieren NaOH 0,6 g x L⁻¹

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium mit je 1 mL der folgenden Lösungen versetzt:

Ca(NO ₃) ₂	1 M
MnCl ₂	0.1 M
FeSO ₄	1 mM

Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (w/V) Agar Nr.1 versetzt. Zur Sterilisation wurden alle Lösungen und Medien vor dem Gebrauch 20 min bei 121°C (Glukose-haltige Lösungen bei 110°C) und 1,5 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wie z.B. Antibiotika wurden den Medien als sterilfiltrierte Lösungen bei einer Temperatur von ca. 50°C in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: Amp 100 µg/ mL, Km 25 µg/ mL (*E. coli*) oder 10 µg/ mL (*B. subtilis*), Cm 5 µg/ mL (*B. subtilis*), Tet 20 µg/ mL (*B. subtilis*), X-Gal 40 µg/ mL und IPTG 50 µg/ mL.

4 Methoden

In dem Methoden-Teil sollen nur solche Praktiken beschrieben werden, die sich grundlegend von in Standardwerken [147] beschriebenen Techniken der molekularen Genetik und Biochemie unterscheiden. Diese Methoden wurden auch bereits eingehend [148] beschrieben. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach dem Verfahren der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly [149] durchgeführt. Die Reinigung von DNA mittels Anionenaustauscherchromatographie wurde nach dem von Vogelstein [150] entwickelten Prinzip vorgenommen.

Techniken der Protein-Biochemie wurden durchgeführt wie beschrieben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in [151, 152], für das *western-blotting* in [153], für die Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen in [154] und für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in [155].

4.1 DNA-Techniken

4.1.1 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger verfahren. ddNTPs, die zum Kettenabbruch der Polymerisation führten, enthielten für jede der vier Basen einen chemisch an die Moleküle gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, der bei einer energetischen Anregung, Licht einer definierten Wellenlänge emittiert. Die Sequenzierreaktion konnte so in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden. Dieser wurde anschließend einer Kapillar-elektrophoretischen Auftrennung unterworfen; die Sequenz konnte direkt aus der DNA-Matrize bestimmt werden.

Die Sequenzierung wurde mit dem ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden pro 1000 bp DNA-Templat 100 ng DNA sowie standardmäßig 5 pmol Primer und 2 μ L Terminations Mix, der eine Mischung von dNTPs, ddNTPs, Puffer sowie einer AmpliTaq DNA Polymerase FS enthielt, in einem PCR-Reaktionsgefäß vereint und mit H_2O auf ein Endvolumen von 10 μ L aufgefüllt. Anschließend wurde dieser Reaktionsansatz in einem PCR-Gerät unter folgenden Bedingungen inkubiert.

25 Zyklen	96°C	10 sec
	50-55°C	5 sec
	60°C	4 min

Der Reaktionsansatz wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 μ L 3 M NaOAc (pH 5,2) und 25 μ L 100 %igem EtOH gemischt und 30 min zentrifugiert (13000 U/min

bei 4°C). Das Pellet wurde vorsichtig mit 250 µL 75 %igem EtOH gewaschen, bei 37 °C für 15 min getrocknet und in 20 µL TSR (*template suppression reagent*) resuspendiert. Nach 2 min Denaturierung bei 95° wurde die Probe blasenfrei in ein Probengefäß überführt, welches zum Schutz vor Verdunstung mit einem Septum verschlossen wurde. Proben dieser Art wurden anschließend zur Sequenzanalyse mit dem ABI Prism 310 Gentic Analyzer entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

4.1.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten diente in erster Linie zwei Zwecken: Erstens wurden Gene oder Genfragmente, die in geeignete Vektoren kloniert werden sollten über PCR [156] amplifiziert. Zweitens wurden chromosomale Integrationen - bevor eine Überprüfung mittels *southern-blotting* erfolgte – durch die Amplifikation von DNA-Fragmenten überprüft. DNA-Oligonukleotide, die zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die nachfolgende Klonierung bestimmt waren, enthielten im 5'-Bereich eine Erkennungsschnittsequenz für eine Restriktionsendonuklease, die eine gerichtete Klonierung der Fragmente erlaubte. Zur Bestimmung der *annealing*-Temperatur der Oligonukleotide wurde wie folgt vorgegangen: Die Nukleotide, die eine zu dem DNA-Templat komplementäre Sequenz besaßen, wurden in einer Weise addiert, daß A- und T-Nukleotiden 2°C, C- und G-Nukleotiden 4°C entsprachen. Die Oligonukleotide wurden so konzipiert, daß sich *annealing*-Temperaturen von 50-55°C ergaben. Ein typischer PCR-Reaktionsansatz wurde durch Mischen der folgenden Komponenten erhalten:

PCR-Ansatz	DNA-Templat	0,05-0,5 ng
	Oligonukleotide jeweils	50 pmol
	dNTPs (Lösung je 2 mM)	2,5 µL
	10x Puffer III	2,5 µL
	Taq/Pwo-Polymerase	0,25 µL
	ddH ₂ O	add 25 µL

Anschließend wurde der Ansatz in einer PCR-Maschine nach folgendem allgemeinen Programm inkubiert [(a1= *annealing*-Temperatur -5°C*; (a2)= (a1) + 2°C* (max 68°C);(ez)= Elongationszeit etwa 40 sec pro zu amplifizierendes 1 kb DNA; * bezogen auf die vom Hersteller angegebene *annealing*-Temperatur)]:

94°C	5 Zyklen		10 Zyklen		15 Zyklen	
2 min	94°C	15 sec	94°C	15 sec	94°C	30 sec
	(a1)°C	30 sec	(a2)°C	30 sec	(a2)°C	30 sec
	68°C	(ez) sec	68°C	(ez) sec	68°C	(ez) sec + 5 sec pro Zyklen

4.2 Protein-Techniken

4.2.1 Genexpression

Die Expression der Gene oder Genfragmente in pQE60 bzw. pQE70-Vektoren erfolgte entweder in *E. coli* M15 mit dem Helferplasmid pREP4, oder in *E. coli* BL21λDE3 mit dem Helferplasmid pgsf. In beiden Fällen wurde analog verfahren: 400 mL 2xYT mit einem Zusatz an Amp¹⁰⁰ und Km²⁵ wurden auf 37°C vorgewärmt und mit einer Übernachtskultur des Expressionsstammes 1:100 angeimpft. Die Kultur wurde anfangs in einem Wasserschüttler bei 37°C und 250 Upm inkubiert. Die Inkubationstemperatur wurde in den darauffolgenden Stunden kontinuierlich auf 30°C abgesenkt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 wurde die Genexpression durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,2 mM) induziert und für weitere 1,5 bis 2 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in Zentrifugenbecher eingefüllt und bei 5000 Upm für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 25 mL/L Kultur Puffer HEPES A (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7.8-8.0) resuspendiert. Bis zur Verwendung wurden die Pellets bei -20°C gelagert, besser wurden sie aber sofort weiterverwendet.

4.2.2 Präparation von *E. coli* Rohzelleextrakten

E. coli Zellen wurden mit Hilfe einer *French Press*-Apparatur aufgeschlossen. Durch die plötzliche Expansion der unter einem Druck von 10000 PSI gegen Normaldruck stehenden Zellsuspension wird die Zellwand und die Zellmembran aufgerissen. Die Zellsuspension wurde 2 Kompressions-Dekompressionszyklen unterworfen. Dieser Arbeitsschritt erfolgte möglichst bei 4°C. Die unlöslichen und löslichen Bestandteile des Zellaufschlusses wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 10000 Upm separiert. Der klare Überstand wurde für die Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie verwendet.

4.2.3 Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

Die Expression von Genen, die in die Vektoren pQE60 und 70 kloniert wurden, resultiert in der 3'-terminalen Fusion mit sechs repetitiven His-Codons. Die Proteine stellen deshalb C-terminale (*His*₆)-Fusionsproteine dar. Die Aufreinigung erfolgte über

Affinitätschromatographie. Hierbei ist Nitrilotriacetat (NTA) kovalent an die Säulenmatrix gebunden. NTA kann vier der sechs Koordinationsstellen von Ni^{2+} -Ionen besetzen und diese dadurch an der Säulenmatrix immobilisieren. Proteine mit chelatbildenden Seitenketten wie die von Histidinen können die freien Koordinationsstellen besetzen und binden so an die Säule. Die Elution der Proteine erfolgt zur kompetitiven Verdrängung der (His_6)-Proteine durch Anlegen eines Imidazol-Gradienten von 0 bis 250 mM Imidazol.

Um unspezifische Bindungen anderer Proteine an die mit Ni^{2+} -Ionen beladene Chelatsäule zu unterdrücken, wurden Rohzellextrakte bereits mit imidazolhaltigem Puffer HEPES B (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7.8-8.0) versetzt. Rekombinante dimodulare Peptidsynthetasen wurden mit 1 % Puffer B (v/v) auf die Säule aufgetragen, andere Proteine von geringerer Größe auch mit bis zu 5 % Puffer B.

Schritte der Proteinaufreinigung an der FPLC wurden bei 4°C durchgeführt. Die Rohzellextrakte wurden mit einer Flußrate von 1 mL/min auf die Säule, die ein Bettvolumen von ca. 1 cm aufwies, aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde das Bettvolumen so lange mit dem Auftragspuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm sich einer Grundlinie näherte. Daraufhin erfolgte die Elution des rekombinanten (His_6)-Proteins mit Hilfe eines Gradienten bei einer Flußrate von 0.75 mL/min.

Standard-FPLC-Gradient:	0 min	1-5 % HEPES B
	5 min	1-5 % HEPES B
	30 min	30 % HEPES B
	45 min	100 % HEPES B
	50 min	100 % HEPES B
	55 min	0 % HEPES B

Die Fraktionen wurden in Volumina von 1,5 mL gesammelt. Die Elution einer rekombinanten dimodularen Peptidsynthetase begann ca. bei 10-15 % HEPES B und war bei ca. 30 % HEPES B bereits abgeschlossen. Der Proteingehalt der fraktionierten Proben wurde mittels Bradford-Tests bestimmt; bei Erstaufreinigungen wurde die Homogenisierung des Proteins mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft. Zur Verwendung in den Enzym-Reaktionen wurden die imidazolhaltigen Proteinlösungen gegen Assay-Puffer dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Konzentration des homogenisierten Proteins erneut über Bradford bestimmt. Die Proteinlösungen wurden direkt verwendet.

Assay-Puffer	HEPES	50 mM, pH 7.5-8.0	
	MgCl_2	20 mM	
	zur Dialyse wurden	EDTA	2 mM
	hinzugefügt:	DTE	2 mM

4.2.4 Biochemische Charakterisierung von Proteinen, enzymatische Reaktionen

4.2.4.1 ATP-PP_i-Austauschreaktion

Die Substratspezifität der nichtribosomalen Peptidsynthese wird determiniert durch die Adenylierungsreaktion, in der kognate Aminosäuren unter ATP-Verbrauch und Pyrophosphat-Abspaltung adenyliert werden [44, 157]. Diese Reaktion ist reversibel; sie wird ausgenutzt, um aminosäure-aktivierende Eigenschaften der A-Domäne zu verfolgen: wird die A-Domäne in Gegenwart ihrer Substrate Aminosäure und ATP (sowie dem Kofaktor Mg²⁺) inkubiert und dem Ansatz geringe Mengen an [³²P]-PP_i zugesetzt, so führt die Rückreaktion zur Bildung radioaktiv markierten ATPs. Die Reaktion wird durch einen Aktivkohle-haltigen Mix abgestoppt, der zur selektiven Absorption des ATPs führt. Die Inkorporation von [³²P]-markierten ATPs in den präzipitierten Aktivkohle-Niederschlag in Abhängigkeit der zugehörigen Substrataminosäure kann somit als Maß für die Aktivität der A-Domäne gelten. Da die ATP-PP_i-Austauschreaktion die Rückreaktion verfolgt (die Hydrolyse des Adenylats) kann diese Reaktion kein direktes Maß für die Verfügbarkeit des Adenylats darstellen. Allerdings ist die Menge der in ATP eingebauten Radioaktivität proportional zur ATP-PP_i-Austauschrate und somit zur spezifischen Aminosäure-aktivierenden Eigenschaft der Enzymprobe. Blindwerte können in Reaktionsansätzen ohne zugesetzte Aminosäure, beziehungsweise ohne ATP bestimmt werden.

In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde jeweils in parallelen Ansätzen die zu testenden Aminosäuren und Enzym vorgelegt, mit Assay-Puffer auf das halbe Reaktionsvolumen aufgefüllt und auf 37°C präinkubiert. In ein zweites Volumen Assay-Puffer wurden ATP, PP_i und radioaktiv-markiertes [³²P]-PP_i pipettiert. Nach Vermischen beider Volumina wurde für 10 min bei 37°C inkubiert, bevor durch die Zugabe von 0,5 mL eiskalter Terminationslösung die Reaktion abgestoppt wurde. Der Ansatz wurde vortexiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation (1 min bei 13000 Upm) pelletiert, zweimal durch Resuspension in 1 mL H₂O und erneuter Zentrifugation gewaschen und in 0.5 mL H₂O aufgenommen. Nach Überführung des Ansatzes in 20 mL Polypropylenmeßfläschen wurden 3 mL Szintillationsflüssigkeit *Rotiszint Eco Plus (Roth)* zugegeben und die Zählraten der Proben in einem Szintillationszähler gemessen.

ATP-PP_i-Austauschreaktion	Enzym	200 nM
	Aminosäure	0.4-1 mM
	ATP	1-2 mM
	PP _i	0.1-0.2 mM
	[³² P]-PP _i	0,15 µCi
	Assay-Puffer pH 7.5-8.0	add. 100 µL

Terminationslösung	Natriumpyrophosphat	100 mM
	Perchlorsäure	560 mM
	Aktivkohle (Norit A)	1.2 % (w/v)

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der ATP-PP_i-Austauschreaktion wurden die Meßwerte dreifach bestimmt. Die Reaktion wurde nach 15-30 sec durch Zugabe von Terminationslösung gestoppt. Die Konzentrationen der Substrate Aminosäure und ATP wurden zwischen 0.01 und 10 mM variiert.

4.2.4.2 Beladung mit radioaktiv markierten Aminosäuren

Die kovalente Beladung von PPS-Modulen mit ihren Substrataminosäuren kann durch die Inkubation der Enzyme mit radioaktiv markierten Aminosäuren und ATP stimuliert werden. Eine anschließende Präzipitation des Proteins mit TCA führt zur Ko-Präzipitation der gebundenen Aminosäure, während freie Aminosäuren durch einen sich anschließenden Waschschritt entfernt werden können. Der Blindwert wird aus einem entsprechenden Reaktionsansatz ohne ATP bestimmt. Anschließend kann die prozentuale Beladung des Proteins bezogen auf die Gesamtmenge an eingesetztem Protein bestimmt werden durch Umrechnung der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten Aminosäure in Substanzmengen.

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden Enzym und ATP vorgelegt und mit Assay-Puffer auf halbes Reaktionsvolumen aufgefüllt. Ein zweites Volumen an Assay-Puffer enthielt ATP und die radioaktiv markierte Substrataminosäure. Nach Präinkubation beider Lösungen bei 37°C wurden beide Lösungen vermengt und für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 mL eiskalter 10 %iger TCA-Lösung gestoppt. Nach Vortexieren wurde sofort auf Eis transferiert und für 30 Minuten dort inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden über eine Absaugapparatur abgenutscht, die Filterblättchen, die den Reaktionsrückstand enthielten, wurden zweimal mit 10 %-iger TCA-Lösung gewaschen bevor sie in Polypropylenmeßfläschen in einem Szintillationszähler vermessen wurden.

Beladungs-Assay	Enzym	500 nM
	[³ H]- oder [¹⁴ C]-Aminosäure	1500 nM
	ATP	2 mM
	Assay-Puffer	add 100 µL

4.2.4.3 *In vitro* Modifikation von PPS-Modulen mit 4'-PPAN

Die *holo* Enzym-Bildung wurde zum Teil durch *in vitro*-Modifikation [83] mit der 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase Bli [158] durchgeführt. In diesen Reaktionsansätzen wurden Enzym und Aminosäure vorgelegt, bevor mit Assay-Puffer auf ein Volumen aufgefüllt wurden. Ein zweites Volumen enthielt ATP, CoA und Bli (ca. 10 nM) in Assay-Puffer. Beide Volumina wurden vereint und die Beladungsreaktion wurde wie in 4.2.4.2 beschrieben verfolgt. Alternativ konnte die Substrataminosäure auch erst nach einer ca. 5 minütigen Präinkubation mit der 4'-PPAN-Transferase Bli zugegeben werden.

4.2.4.4 Spaltung Enzym-gebundener Intermediate – Thioesterspaltung

Peptidsynthetasen binden ihre Substrate und Intermediate als Thioester, die säurestabil, jedoch labil bei alkalischer Behandlung sind. Zur Untersuchung der auf den Enzymen gebundenen Zwischenprodukten wurde eine Thioesterspaltung mit KOH durchgeführt. Die ehemals enzymgebundenen Produkte wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Thioesterspaltungen wurden verglichen mit Beladungsreaktionen mit 10-fach erhöhter Proteinkonzentration durchgeführt; auch die Menge der radioaktiv markierten Aminosäure wurde entsprechend erhöht. Reaktionsansätze wurden, nachdem sie bei 37°C inkubiert wurden, mit 1 mL 10 %iger TCA-Lösung und 15 µL BSA-Lösung (25 mg/mL) versetzt und vortexiert. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde der Reaktionsansatz für weitere 30 min bei 13000 Upm zentrifugiert und anschließend das Pellet vorsichtig zweimal mit 10 %iger TCA-Lösung gewaschen. Das Pellet wurde erneut mit 1 mL Diethylether/Ethanol (3:1(v/v)) und zweimal mit 1 mL Diethylether gewaschen. Das Pellet wurde anschließend bei 37°C getrocknet. Nach Resuspendierung in 200 µL KOH (20 min im Schüttelinkubator) wurde für 20 min bei 75°C inkubiert, 2 min auf Eis abgekühlt und mit 1 mL Methanol (95 % (v/v)) versetzt. Nach Zentrifugation (30 min, 13000 Upm, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in der Speed-Vac bis zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand wurde in 20 µL Methanol/H₂O (9:1(v/v)) aufgenommen und für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

4.2.4.5 Produktabspaltungskinetik

Als Produktabspaltungskinetik wird in dieser Arbeit eine Beladungsreaktion eines dimodularen Systems bezeichnet, bei der – in Zeitabhängigkeit – die Inkorporation der radioaktiv markierten Substrataminosäure X in eine dimodulare Peptidsynthetase in Abhängigkeit der zugegebenen zweiten Substrataminosäure Y untersucht wird. Auf diese Weise kann der Fortgang einer enzymgebundenen Elongation zu Dipeptiden und die Abspaltung von Dipeptiden verfolgt werden. Auch über die Schnelligkeit einzelner Reaktion der Dipeptidbildung können so Aussagen gemacht werden. Ein Anstieg der Inkorporation der Aminosäure X auf den (optimal) doppelten Wert deutet so auf eine interne Dipeptidbildung

hin. Ist dieser Anstieg nur intermediär und wird danach ein Abfallen der Inkorporation beobachtet, so ist das ein Indiz für eine nachfolgende Abspaltung des Dipeptides von dem Enzym-Templat. Ist die interne Kondensation zum Dipeptid sehr viel langsamer als dessen Abspaltung von dem Enzym-Templat, so ist ein intermediärer Anstieg der Inkorporation an Aminosäure A überhaupt nicht zu beobachten. Die Übergänge zwischen den geschilderten Fällen sind fließend.

Die Methodik von Produktabspaltungskinetiken folgt der unter 4.2.4.2 gemachten Beschreibung. Reaktionsansätze wurden parallel durchgeführt: In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde Enzym, ATP und radioaktiv markierte Aminosäure X vereint und mit Assay-Puffer auf ein Volumen von 50 µL aufgefüllt. Nachdem das Maximal-Niveau der Beladung der Aminosäure X erreicht war, wurde ein zweites Volumen einer Lösung, die die zweite Aminosäure in Assay-Puffer enthielt, mit einer Pipette zugegeben. Für Dipeptid-Bildungen *in trans* enthielt das zweite Volumen eine Lösung von mit Aminosäure Y und ATP präinkubierten Akzeptor-Protein. Kontrollansätze wurden durchgeführt, indem keine Aminosäure Y zugefügt wurde oder eine Lösung, die eine Aminosäure enthielt, die kein Substrat des Enzyms darstellte. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Reaktionsansätze gemäß 4.2.4.2 durch die Zugabe von 10 %iger TCA-Lösung abgestoppt.

4.2.4.6 Produktanalyse mit Hilfe radioaktiv markierter Aminosäuren: DC-Chromatographie

Die Analyse der von rekombinanten Enzym-Templaten produzierten Produkte konnte mit Hilfe von Reaktionsansätzen, die radioaktiv markierte Aminosäuren als Substrate einsetzen, erfolgen. Dies führte zur Darstellung von Produkten, die radioaktiv markiert waren. Die Zuordnung dieser Produkte erfolgte nach einer dünnschichtchromatographischen Analyse durch Vergleich deren Laufverhaltens mit (nicht-markierten) Standardverbindungen. Eine weitere Verifizierung konnte unternommen werden, durch wechselseitige Verwendung der radioaktiven Aminosäuren X und Y, die zum Dipeptid XY oder YX verknüpft werden.

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden Enzym(e) (500 nM), Substrataminosäuren (1 mM) und ATP (2 mM) vermengt und mit Assay Puffer auf 100 µL aufgefüllt. Radioaktive Aminosäuren wurden – wenn nicht an Stelle anders beschrieben - in dreifachem Überschuß zum Enzym zugesetzt. Es wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0.5 Volumen n-Butanol und anschließendem Vortexieren abgestoppt. Reaktionsansätze, die DKP-Produkte enthielten sowie die zur Identifizierung der in Kapitel 5.4 behandelten Dipeptide, wurden vorher mit n-Butanol extrahiert, nachfolgend wurde nur die organische Phase weiterverwendet. Denaturierte Proteine wurden nach Möglichkeit mit einer Spitze entfernt, bevor der ganze Reaktionsansatz in der Speed-Vac zur Trockne eingengt wurde. Es wurde in 25 µL 10 %igem Methanol aufgenommen. Die Zählrate der Radioaktivität dieses Ansatzes wurde bestimmt durch Vermessen eines Teilvolumens in

einem Szintillationszähler. Bis zu 5 μL wurden auf eine Silicagel 60 F254 Platte (*Merck*) aufgetragen. Die Dünnschichtchromatographien wurden in einem Laufmittel Essigsäureethylester/n-Butanol/Essigsäure/ H_2O (1:1:1:1) entwickelt. Radioaktive Spots wurden durch Autoradiographie identifiziert.

4.2.4.7 Produktnachweis über HPLC-Analytik

Der Produktnachweis für die HPLC-Analytik wurde prinzipiell gleich dem mit radioaktiven Aminosäuren durchgeführten geführt. Reaktionsansätze unterschieden sich nicht, bis darauf daß beide Substrataminosäuren in Konzentrationen von 1 mM eingesetzt wurden. Für die Probenzubereitung wurde nach dem Einengen in 100 μL 10 %igem Methanol aufgenommen. Es wurde 15 min im Schüttelinkubator resuspendiert, bevor der Ansatz durch Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt wurde.

Die HPLC-Analytik erfolgte mittels eines 1100 HPLC-Systems (*Hewlett Packard*) und einer Nucleosil C18 3/120 3250 Säule (*Macherey & Nagel*, 3 x 250 mm, Porengröße 120 Å, Partikelgröße 3 μm). Standardmäßig wurden 10 μL der Reaktionsansätze injiziert. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 210 nm. Folgende Gradienten wurden verwendet:

HPLC-Gradient	0 min	10 %	HPLC-Puffer B
	1 min	30 %	HPLC-Puffer B
	20 min	100 %	HPLC-Puffer B
	30 min	100 %	HPLC-Puffer B
	35 min	10 %	HPLC-Puffer B
	50 min	10 %	HPLC-Puffer B

Die Flußrate betrug 0.35 mL/min, als HPLC-Puffer A wurde H_2O mit einem Zusatz von 0.05 % HCOOH , als HPLC-Puffer B wurde Methanol mit einem Zusatz von 0,45 % HCOOH verwendet.

Für den Nachweis des Dipeptides Asp-Phe wurde ein leicht verändertes HPLC-Programm verwendet:

HPLC-Gradient	0 min	10 %	HPLC-Puffer B
	15 min	40 %	HPLC-Puffer B
	25 min	50 %	HPLC-Puffer B
	30 min	100 %	HPLC-Puffer B
	34 min	100 %	HPLC-Puffer B
	36 min	10 %	HPLC-Puffer B
	45 min	10 %	HPLC-Puffer B

Das HPLC-MS-Programm der Abb. 5.2-21 wurde unter folgenden Bedingungen geführt:

HPLC-Gradient	0 min	10 %	HPLC-Puffer B
	25 min	60 %	HPLC-Puffer B
	30 min	100 %	HPLC-Puffer B
	34 min	100 %	HPLC-Puffer B
	36 min	10 %	HPLC-Puffer B

Eine Quantifizierung der gebildeten Produktmengen wurde vorgenommen, indem eine genau quantifizierte Verdünnungsreihe eines chemischen Standards hergestellt wurde. Die Integrale unter den Kurven dienten als Eichgrade zur Bestimmung von Produktmengen.

5 Ergebnisse

5.1 Biochemische Charakterisierung eines putativen Lichenysin-Biosynthese-Operons aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716

Die Klonierung und Sequenzierung des Bacitracin Biosynthese-Operons aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 durch Herrn Dirk Konz [24] führte zur gleichzeitigen Identifizierung eines zweiten Peptid Biosynthese-Operons unbekannter Funktion. Die Beschreibung der Klonierung und Sequenzierung sowie eine Sequenzanalyse dieses mit *lic* bezeichneten Operons waren bereits Bestandteil der Dissertation von Dirk Konz [159]. Die Organisation der abgeleiteten Domänenstruktur (eine schematische Darstellung der Domänenstruktur der drei Gene findet sich in Abb. 5.1-1) glich der des Surfactin Biosynthese-Operons. Die Identität der zugehörigen Genprodukte zu den Surfactin Synthetasen lag bei ca. 60% und damit weit höher als zu Synthetasen anderer nichtribosomaler Peptide [160].



Abb. 5.1-1 Schematische Darstellung der abgeleiteten Domänenstruktur des putativen Lichenysin Biosynthese-Operons aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716.

In der Literatur waren Stämme von *Bacillus licheniformis* aus vorwiegend tief-terristischen, erdöl-haltigen ökologischen Nischen beschrieben, die Lipopeptide – sogenannte Lichenysine - mit prominenten biosurfactanten Eigenschaften produzieren [161-163]. Die Bedingungen unter denen diese Lipopeptide produziert werden, waren eingehend untersucht [164], ebenso wie deren bioemulgatorische Eigenschaften [165, 166]. Der Peptidanteil dieser charakterisierten Lichenysine läßt sich durch die allgemeine Sequenz Glx-Leu-DLeu-Val-Asx-DLeu-Leu/Ile/Val wiedergeben [167]. Da Analysen zur Produktion eines Biosurfactanten der Lichenysin-Gruppe durch *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 nicht erfolgreich verliefen, konnte eine Spezifitätsaufklärung der sieben identifizierten Module nicht aufgrund einer Ableitung von der Primärsequenz des zugehörigen Lichenysins erfolgen. Auch mit Hilfe eingehender Sequenzanalysen des die Spezifität von A-Domänen definierenden Bereiches [71, 66] konnte keine eindeutige Vorhersage der Zusammensetzung des Peptids an den Positionen 1, 5 und 7 gegeben werden. Um eine Zuordnung des putativen Lichenysin Biosynthese-Operons zu einer definierten Peptidstruktur zu ermöglichen, wurden daraufhin in dieser Arbeit rekombinante A-Domänen der korrespondierenden *lic*-Module nicht vollständig determinierter Spezifität (Positionen 1, 5 und 7) heterolog in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und *in vitro* bezüglich ihrer Substratspezifität untersucht.

5.1.1 Überproduktion rekombinanter Adenylierungsdomänen

Mit Hilfe terminal modifizierter Oligonukleotide wurden DNA-Fragmente, die zu A-Domänen der Module 1, 5 und 7 korrespondieren, aus chromosomaler DNA von *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 durch PCR amplifiziert. Die DNA-Fragmente wurden in pQE60 bzw. 70-Vektoren kloniert. Nach Transformation des *E. coli* Expressionsstammes M15 [pREP4] mit den Plasmiden p[A]_{LicA-1} (pQE60-Derivat), p[A]_{LicB2} und p[A]_{LicC} (beide pQE70-Derivate) konnten aus den erhaltenen Stämmen die rekombinanten Proteine [A]_{LicA1}, [A]_{LicB2} und [A]_{LicC} gewonnen werden (4.2.1). Diese C-terminalen (*His*₆)-tag-Fusionsproteine erwiesen sich nach Zellaufschluß als in der löslichen Proteinfraction befindlich. Die Aufreinigung über Ni²⁺-IMAC erfolgte mit einer Anfangskonzentration von 5% Puffer B (4.2.3). Proteinfractionen mit homogenem Aufreinigungsgrad wurden dialysiert und der Proteingehalt der vereinigten Fractionen anschließend mittels Bradford-Test bestimmt.

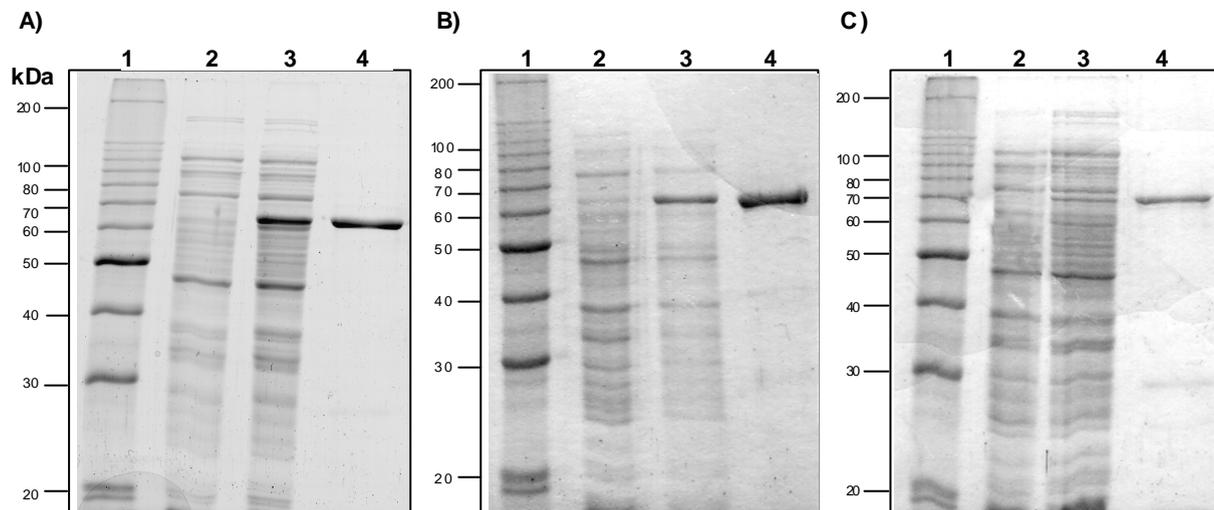


Abb. 5.1-2 Überproduktion und Reinigung rekombinanter Adenylierungsdomänen in *E. coli*:

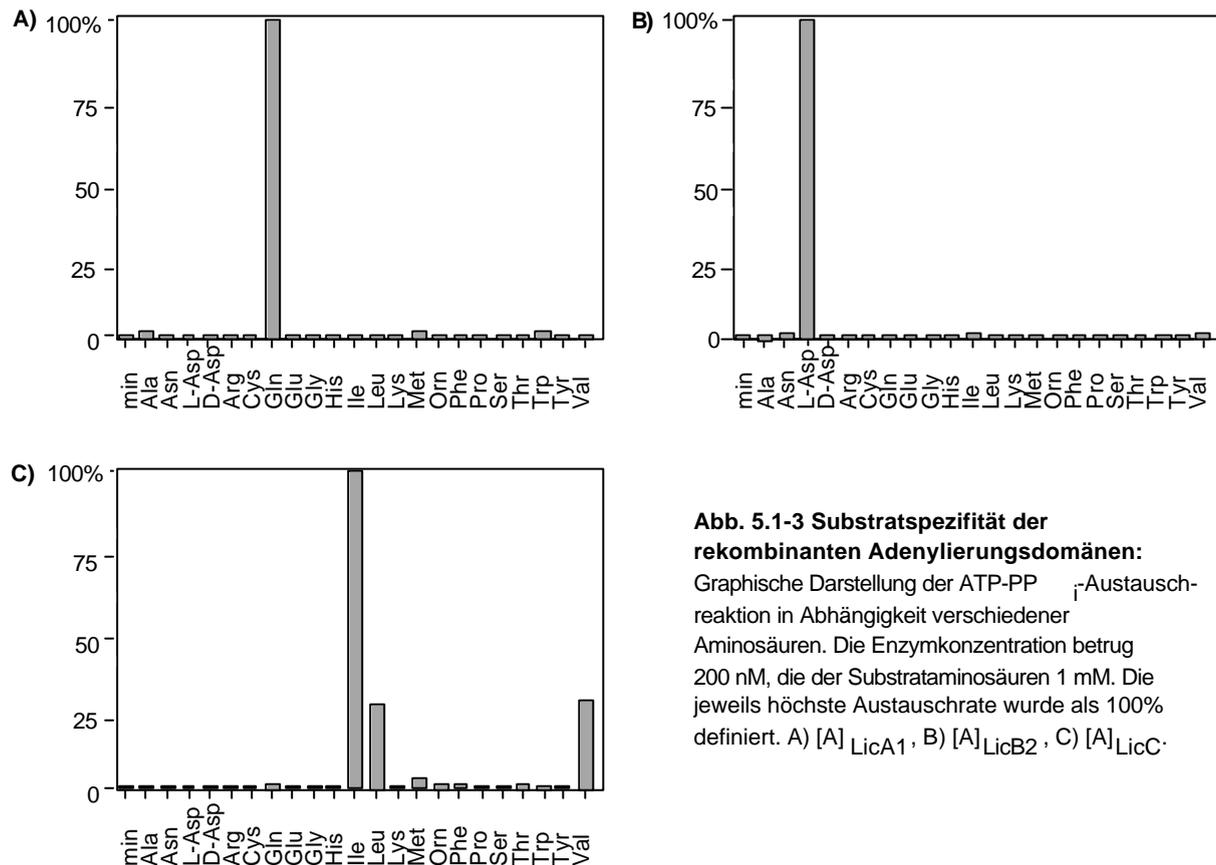
Coomassie Blau-gefärbte SDS-Polyacrylamidgele. Spuren 1 bis 4 jeweils: 10 kDa-Protein-Marker (1), Gesamtzell-extrakt vor (2) und 1,5 Stunden nach IPTG-Induktion (3), über Ni²⁺-IMAC-aufgereinigtes Protein (4). A) [A]_{LicA1}, B) [A]_{LicB2}, C) [A]_{LicC}.

Mit diesen Proteinlösungen wurden die unter 5.1.2 beschriebenen biochemischen Arbeiten durchgeführt. Abb. 5.1-2 zeigt die Coomassie-Blau gefärbten SDS-PAGE einer typischen Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine [A]_{LicA1} (60.9 kDa), [A]_{LicB2} (64.8 kDa) und [A]_{LicC} (62.6 kDa). Die elektrophoretische Beweglichkeit der rekombinanten Proteine stimmte gut mit den berechneten Molekulargewichten der Proteine überein.

5.1.2 Substratspezifität rekombinanter Adenylierungsdomänen

Die oben beschriebenen rekombinanten A-Domänen aus $[A]_{\text{LicA1}}$, $[A]_{\text{LicB2}}$ und $[A]_{\text{LicC}}$ wurden mit Hilfe des ATP-PP_i-Austausches (siehe 4.2.4.1) auf ihre katalytische Aktivität und ihre Substratspezifität untersucht.

In Abb. 5.1-3 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.



Anhand der ATP-PP_i-Austauschreaktion war es möglich, eindeutig die Spezifität der rekombinanten A-Domänen zu bestimmen: $[A]_{\text{LicA1}}$ aktivierte spezifisch Glutamin, $[A]_{\text{LicB2}}$ spezifisch Aspartat. Die höchste Austauschrate für $[A]_{\text{LicC}}$ konnte für Isoleucin bestimmt werden, aber auch die verwandten Aminosäuren Leucin und Valin wurden zu 30% der Austauschrate von Isoleucin aktiviert. Basierend auf dem Kolinearitätsprinzip zwischen Peptidsynthetasen-Templat und nichtribosomal produziertem Peptid ließ sich damit ableiten, daß die drei zugehörigen Peptidsynthetasen des putativen Lichenysin Biosynthese-Clusters ein Templat für ein acyliertes Heptapeptid mit der Sequenz **Gln-Leu-DLeu-Val-Asp-DLeu-Ile** darstellen. Die Nebenspezifitäten der rekombinanten A-Domäne LicC lassen Substitutionen an siebter Position durch Leucin und Valin erwarten. Dieses Lichenysin wurde als Lichenysin D bezeichnet [160].

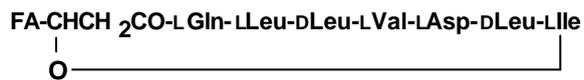


Abb. 5.1-4 Vorgeschlagene Struktur des Lichenysin aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716.

Um eine quantitativere Aussage über die funktionelle Eigenständigkeit der überproduzierten A-Domänen zu erhalten, wurden daraufhin die kinetischen Konstanten (K_m) der rekombinanten Proteine $[A]_{\text{LicA1}}$, $[A]_{\text{LicB2}}$ und $[A]_{\text{LicC}}$ bezüglich ihrer Substrate ATP und Aminosäure untersucht. Kinetische Daten nichtrekombinanter Peptidsynthetasen lagen vor, insbesondere ein Vergleich mit den kinetischen Parametern der homologen Surfactin Synthetase C erschien nützlich [168]. Zur K_m -Wert-Bestimmung wurde jeweils in Abhängigkeit eines der beiden Substrate die Konzentration des anderen variiert und die Meßwerte dann nach einer Methode von Lineweaver-Burk doppelt reziprok aufgetragen [169]. Zur Bestimmung der K_m -Werte wurden in Meßreihen von ATP-PP_i-Austauschreaktionen, die Aminosäurekonzentrationen bei drei bis fünf konstanten ATP-Konzentrationen variiert. Zur Bestimmung der ATP-Dissoziationskonstanten wurde analog verfahren. Die Enzymassays wurden wie unter 4.2.4.1. beschriebenen durchgeführt. Die Ergebnisse der Bestimmung der Dissoziationskonstanten sind in Tab. 5.1-1 aufgelistet. Die ermittelten Werte lagen in dem gleichen Größenordnungsbereich wie für das Wildtypenzym SrfC [168]. Die im Vergleich zu Isoleucin geringere Affinität von $[A]_{\text{LicC}}$ zu Leucin und Valin spiegelt sich in den kinetischen Parametern dieser drei Aminosäuren wider.

Tabelle 5.1-1 Kinetische Konstanten der ATP-PP_i-Austauschreaktion

Enzym	Substrat	Aminosäure [mM]	K_m
			ATP [mM]
$[A]_{\text{LicA1}}$	L-Glutamin	1,4 ± 0,5	5 ± 3
$[A]_{\text{LicB2}}$	L-Aspartat	0,3 ± 0,15	1 ± 0,3
$[A]_{\text{LicC}}$	L-Isoleucin	0,4 ± 0,15	0,1 ± 0,02
$[A]_{\text{LicC}}$	L-Leucin	3 ± 1	5 ± 2
$[A]_{\text{LicC}}$	L-Valin	2,5 ± 1	0,6 ± 0,2

Durch die Bestimmung der Spezifität rekombinanter, funktionell eigenständiger A-Domänen war es hiermit zum ersten Mal gelungen, ein Biosynthese-Operon unbekannter Funktion, einem putativen nichtribosomalem Peptid zuzuordnen.

5.2 Konstruktion dimodularer Peptidsynthetasen als Enzym-Template für das Dipeptid Aspartyl-Phenylalanin

Aufgrund ihrer modularen Struktur und ihres Aufbaus aus katalytisch aktiven, repetitiven Domänen stellen Peptidsynthetasen verlockende Werkzeuge dar, deren rationale Verwendung den Weg zu neuen maßgeschneiderten Peptiden ebnen könnte [35]. Zwei grundsätzliche Zielrichtungen der Modifikation nichtribosomaler Enzym-Template lassen sich dabei entwerfen: die Veränderung eines bestehenden Systems durch Austausch bestimmter Module oder Domänen schafft Möglichkeiten, nach Maß die Struktur eines gegebenen Peptids abzuändern [59]. Zweitens bieten Peptidsynthetasen aber auch die Möglichkeit durch freie Kombination von katalytischen Domänen, Enzym-Template für die Darstellung von Peptiden gewünschter Struktur *de novo* zu konstruieren.

Obwohl die katalytischen Domänen von Peptidsynthetasen als funktionell autonom bezüglich der von ihnen übernommenen Reaktion erscheinen, so ist doch zu erwarten, daß intensive Wechselwirkungen innerhalb dieses Multidomänen-Arrangements bestehen müssen, die das geordnete Prozessieren von komplexen Biomolekülen erst ermöglichen. Welche Regeln eine geordnete Interaktion zwischen den Domänen eines Moduls (oder mehrerer Module) beherrschen, ist bislang wenig untersucht. An die *de novo* Darstellung eines synthetischen Templates der nichtribosomalen Peptidsynthese waren viele offene Fragen gestellt: Welche Mechanismen determinieren die Initiation von Peptidsynthetasen? Welche Spezifitätsvorgaben macht eine C-Domäne bezüglich der Art der zu verknüpfenden Aminosäuren? Wie läßt sich die Freisetzung eines prozessierten Peptids von einem hybriden Enzym-Template erreichen?

Das Dipeptid α -Aspartyl-Phenylalanin dient industriell als Precursor für die Darstellung des Zuckersubstituts α -Aspartyl-Phenylalaninmethylsäureester. Diese Substanz findet weite Verbreitung unter den Handelsnamen-Namen Aspartam[®] und Nutrasweet[®] und wird jährlich im 10000 Tonnen-Maßstab produziert. Die Synthese von α -Aspartyl-Phenylalaninmethylsäureester wird großindustriell in mehreren Schritten geführt, die zur Gewährleistung einer gerichteten Dipeptidverknüpfung die Blockierung der Aminofunktion der Donoraminosäure sowie der Carboxyfunktion der Akzeptoraminosäure beinhaltet. Die Verknüpfung der mit Schutzgruppen versehenen Aminosäuren verläuft enzymatisch unter ATP-Verbrauch, aber nicht fermentativ.

Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten Arbeit war die Konstruktion eines Proteintemplates der nichtribosomalen Peptidsynthese zur Darstellung des Dipeptids Aspartyl-Phenylalanin. Der potentielle Vorteil dieses zu entwickelnden Prozesses liegt auf der Hand: die Synthese an einer Peptidsynthetase wäre voll-enzymatisch und kommt mit den in lebenden

Organismen vorhandenen Substraten der beiden Aminosäuren und ATP aus, was die Möglichkeit eines fermentativen Prozesses offenläßt. Die Synthese an einer Peptidsynthetase verläuft gerichtet.

Die Vorgaben dieser Arbeit waren daher klar definiert und gingen über die Darstellung eines Modells für die *de novo* Synthese eines artifiziellen Templates hinaus.

5.2.1 Strategie

Die Identifizierung hochkonservierter *core*-Sequenzen innerhalb von A-Domänen und T-Domänen [56, 22] dokumentierte relativ früh deren funktionelle Bedeutung an der ATP-Bindung und -Hydrolyse, beziehungsweise an der Thiolierung von Substrataminosäuren. Die biochemische Charakterisierung dieser Domänen bestätigte dies [41]. Die Rolle der C-Domäne an der Ausbildung einer Peptidbindung konnte ebenfalls bewiesen werden [60]. Mechanismen der Initiation sowie der Termination der nichtribosomalen Peptidbiosynthese waren dagegen zu Beginn dieser Arbeit wenig untersucht. Die Bedeutung der C-terminalen Te-Domäne an der Produktabspaltung war belegt [105, 109]. Basierend auf diesem Wissen sollte eine Peptidsynthetase, die die Synthese eines Dipeptides dirigiert, aus zwei A- und T-Domänen bestehen, die über eine C-Domäne kontaktieren. Um eine katalysierte Produktabspaltung zu gewährleisten, wurde die Verwendung einer Te-Domäne ins Auge gefaßt. Die Domänenstruktur einer dimodularen Peptidsynthetase, die eine Peptidsynthese initiieren, zwei Aminosäuren definierter Struktur zu einem Dipeptid verknüpfen und dieses daraufhin abspalten soll, wurde daher als ATCATTe definiert (siehe Abb. 5.2-1).

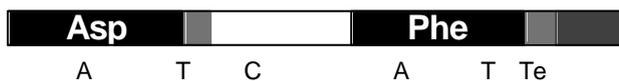


Abb. 5.2-1 Schematische Darstellung einer dimodularen Peptidsynthetase, an deren Templat das Dipeptid Asp-Phe prozessiert wird.

Zur Darstellung eines dimodularen Enzym-Templates für die Synthese des Dipeptides Asp-Phe sollte die Spezifität der ersten A-Domäne hoch für Aspartat, die der zweiten A-Domäne hoch für Phenylalanin sein.

Die Natur stellt ein solches Enzym-Templat, das alle beschriebenen Anforderungen einer nichtribosomalen Synthese von Asp-Phe erfüllt, nicht bereit. So wurde versucht, katalytische Einzelaktivitäten in rationaler Form zu kombinieren, was die Etablierung eines artifiziellen Systems, bestehend aus Modul- oder Domänenfusionen, voraussetzt. Um damit verbundenen Beeinträchtigungen der Funktionalität auszuschließen, wurde von Anfang an versucht, ein gegebenes System zu verwenden, das möglichst minimal modifiziert werden mußte. Zwei essentielle Domänenfusionen führten zur Darstellung eines artifiziellen Asp-Phe-Templates: (a) ein Phenylalanin-aktivierendes Akzeptormodul wurde an ein Aspartat-

aktivierendes Donormodul gekoppelt und (b) eine Te-Domäne wurde, um die Dipeptidabspaltung vom Enzym zu katalysieren, an das Phenylalanin-aktivierende Akzeptormodul gekoppelt. Die Kopplung dieser drei Sets katalytisch aktiver Enzym-Domänen erfolgte auf genetischer Ebene durch Fusion der entsprechenden Genfragmente.

5.2.2 Die Auswahl geeigneter Bausteine

Abgeleitet von der Primärsequenz des zugehörigen nichtribosomalen Peptids waren mehrere A-Domänen offensichtlicher Aspartat- und Phenylalanin-Spezifität bekannt (siehe Abb. 5.2-2) und genetisch charakterisiert [56, 28, 55]. Einige rekombinante A-Domänen, so die A-Domäne von SrfB2 und von TycA [148], TycB3 [28] und GrsA [41] wurden biochemisch charakterisiert und auf ihre Substratspezifität *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse des ATP-PP_i-Austausches zeigt Abb. 52-2. Die A-Domäne von SrfB2 wies eine hohe Selektivität bezüglich der Aminosäure Aspartat auf. Unterschiede in der Selektivität der Aktivierung von Phenylalanin zeigten sich aber für die A-Domänen von TycA, TycB3 und GrsA. TycA erwies sich hierbei als die selektivste Domäne, die im Vergleich zu GrsA geringere Nebenspezifitäten zeigte. TycB3 dagegen wies eine deutliche Präferenz für Tryptophan auf, so daß sie die Anforderungen für eine Phenylalanin-spezifische Domäne nicht erfüllte. Aufgrund der hohen Substrataminosäure-Spezifität wurde daraufhin für die Darstellung eines Asp-Phe-spezifischen Enzym-Templates mit der A-Domäne von SrfB2 – im Donormodul – und mit der A-Domäne von TycA – im Akzeptormodul – gearbeitet. Die Verwendung der A-Domänen von SrfB2 und TycA für die Darstellung eines dimodularen Asp-Phe-Templates wird (a) die A-Domäne eines Elongationsmoduls (SrfB2) in ein Initiationsmodul und (b) die A-Domäne eines Initiationsmoduls (TycA) in ein Elongationsmodul konvertieren.

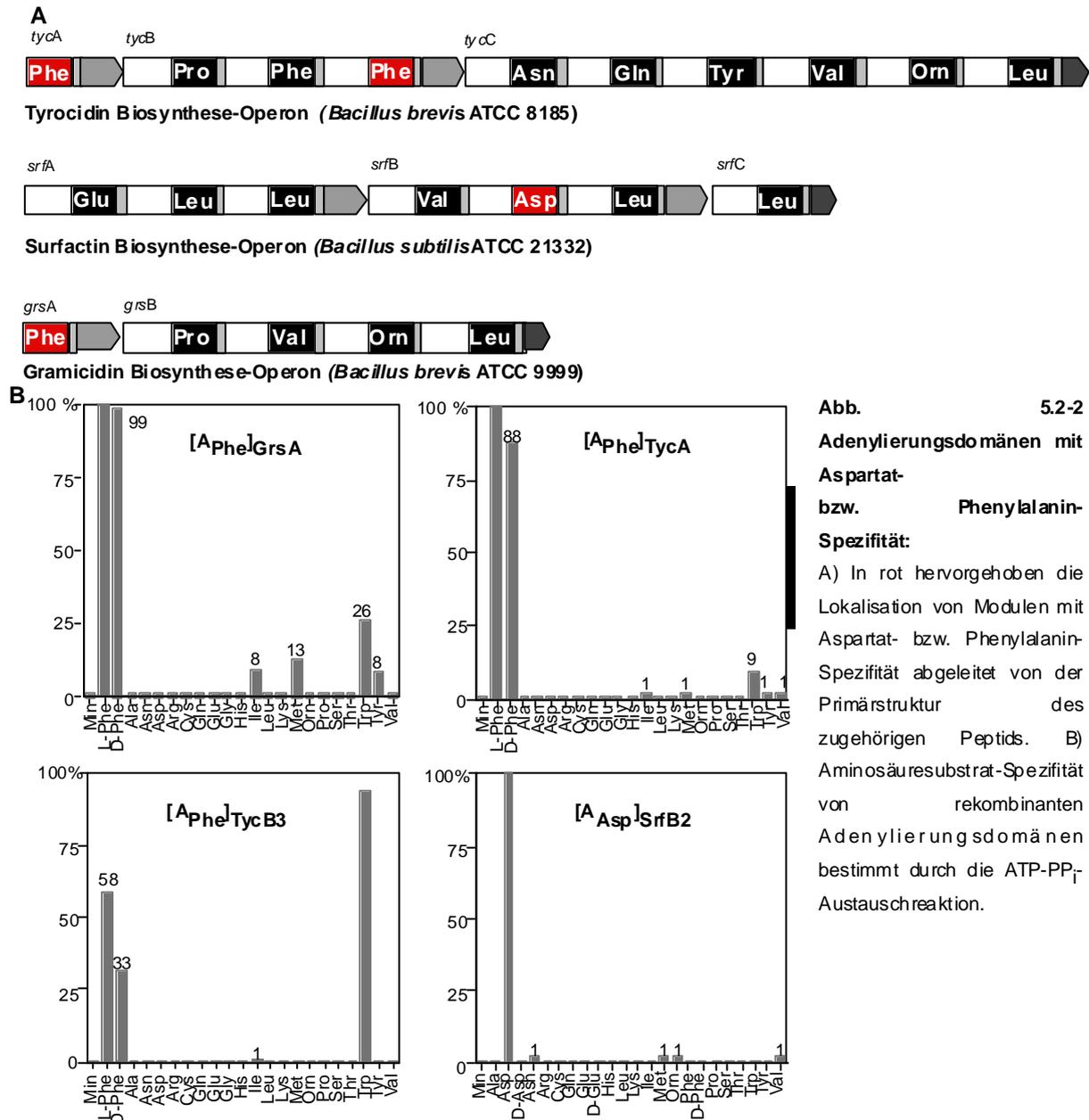


Abb. 5.2-2
Adenylierungsdomänen mit Aspartat- bzw. Phenylalanin-Spezifität:
 A) In rot hervorgehoben die Lokalisation von Modulen mit Aspartat- bzw. Phenylalanin-Spezifität abgeleitet von der Primärstruktur des zugehörigen Peptids. B) Aminosäuresubstrat-Spezifität von rekombinanten Adenylierungsdomänen bestimmt durch die ATP-PP_i-Austauschreaktion.

5.2.3 Eine erste rekombinante dimodulare Peptidsynthetase

Rekombinante interne A-Domänen sind bereits erfolgreich heterolog in *E. coli* überproduziert worden [28]. Zu Beginn dieser Arbeit war aber nicht bekannt, ob ein zweimodulares Peptidsynthetase-System der Domänenorganisation ATCAT mit einer Größe von ca. 180 kDa ebenso in löslicher und funktioneller Form überproduziert werden konnte. Um diese offene Frage im Vorfeld zu klären, bevor ein hybrides Enzym konstruiert wurde, wurde ein internes Fragment eines Peptidsynthetases kloniert, dessen zugehörige nichthybride dimodulare Peptidsynthetase die Spezifitätsvorgabe von Asp-Phe nur in einer - der ersten - Position erfüllte. Später könnte die Spezifität des zweiten Moduls dann durch einen Modulaustausch nach Phenylalanin geändert werden. Dieses interne Fragment wurde aus

chromosomaler DNA von *Bacillus subtilis* ATCC 21332 mittels PCR amplifiziert und beinhaltete Teile des Surfactin Synthetasegens *srfB* (siehe Abb. 5.2-3).

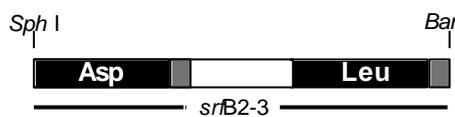


Abb. 5.2-3 Protein I:

Schematische Darstellung des rekombinanten Proteins I.

Grauschattierungen bezeichnen die katalytischen Domänen.

Das erste Modul SrfB2 determiniert wie unter 5.2.2 beschrieben für ein Aspartat-spezifisches Modul, während das zweite Modul SrfB3, abgeleitet von der Primärstruktur des Surfactins, Leucin-Spezifität aufweisen sollte. Die Klonierung erfolgte in pQE70. Nach Transformation des Expressionsstammes M15 [pREP4] mit dem rekombinanten Plasmid p[$A_{\text{Asp}}TCA_{\text{Leu}}T$]_(srfB2-3) erfolgte eine IPTG-induzierbare Überproduktion eines 180 kDa-Proteins. Nach dem Zellaufschluß konnte gezeigt werden, daß dieses Protein nahezu vollständig im löslichen Zellüberstand ist. Die Reinigung des Proteins mittels Ni²⁺-IMAC erfolgte nach dem unter 4.2.3 beschriebenen Standardverfahren. Die Anfangskonzentration an Puffer B betrug dabei nur 1 %. Nach der Dialyse gegen Assay-Puffer wurde die Proteinkonzentration bestimmt und das Protein bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Etwa 6 mg an homogenem, aufgereinigtem Protein konnten hierbei aus 1 L Zellkultur erhalten werden. Abb. 5.2-4 zeigt die Überproduktion und den Aufreinigungsgrad der rekombinanten Peptidsynthetase [$A_{\text{Asp}}TCA_{\text{Leu}}T$]_(SrfB2-3) (I).

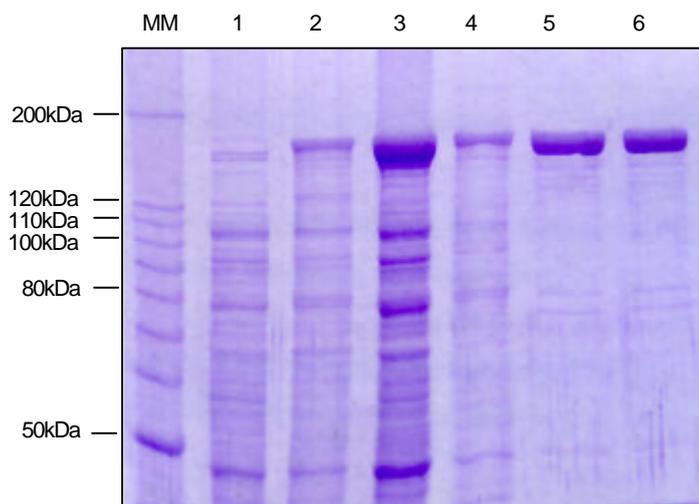


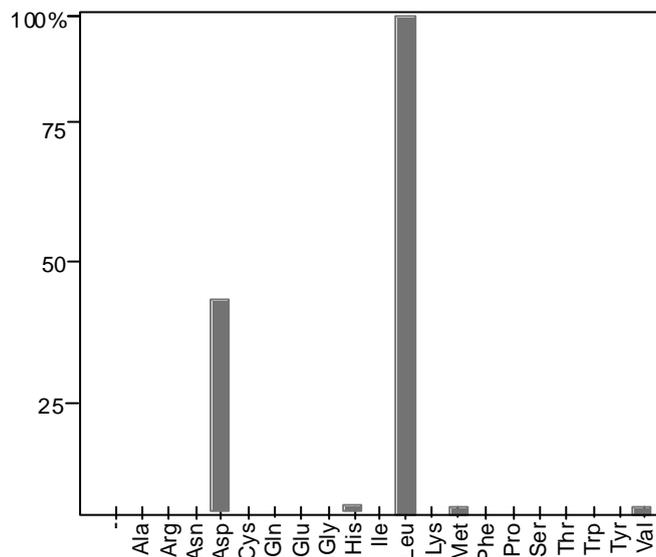
Abb. 5.2-4 SDS-Polyacrylamidgel der in *E. coli* überproduzierten dimodularen Peptidsynthetase I:

Spuren 1 und 2: Gesamtzellextrakt vor und 1,5 Stunden nach IPTG-Induktion. Spuren 3 und 4: Zellextrakt nach Zellaufschluß: Überstand (3) und Pellet (4). In Spuren 5 und 6 an Ni²⁺-IMAC aufgereinigtes Protein. MM: 10kDa-Protein-Leiter. Coomassie-Blue gefärbtes Gel.

5.2.4 Substratspezifität der rekombinanten Peptidsynthetase [$A_{\text{Asp}}TCA_{\text{Leu}}T$]_(SrfB2-3) (I).

Die Bestimmung der Aktivität und Spezifität der A-Domänen in dem rekombinanten Protein I erfolgte, wie unter 4.2.4.1 beschrieben, mit Hilfe der ATP-PP_i-Austauschreaktion. Die in Abb. 5.2-5 zusammengestellten Ergebnisse dieses Experiments zeigen, daß dieses Protein die

anhand der Primärsequenz von Surfactin postulierten Substratspezifitäten aufweist und eine Aspartat und Leucin-abhängige Aktivierung zeigte. Alle anderen proteinogenen Aminosäuren, auch D-Aspartat, werden mit Austauschraten unter 5 % aktiviert. Bei den angegebenen Konzentrationen der Substrate erwies sich der Umsatz an Leucin etwa 2,5 mal so hoch wie der von Aspartat.



5.2-5 Aminosäuresubstrat-Spezifität des Proteins I:

Graphische Auswertung der ATP-PP_i-Austauschreaktion. Die Enzymkonzentration betrug 200 nM, Substrataminosäuren wurden in Konzentrationen von 1 mM eingesetzt. Die höchste Austauschrate für Leucin wurde als 100% definiert.

Zur Quantifizierung der Substratspezifität wurden analog dem unter 5.1-2 beschriebenen Verfahren die kinetischen Konstanten (K_m) von ATP und den Substrataminosäuren Aspartat und Leucin bestimmt (Abb. 5.2-6). Der K_m -Wert für Aspartat wurde dabei mit 3,5 mM mehr als eine Zehnerpotenz höher als der von Leucin bestimmt, während der K_m -Wert für ATP sich unabhängig von der Art der verwendeten Substrataminosäure nicht wesentlich unterschied (siehe Tabelle 5.2.1). Für die A-Domäne von SrfB3 konnte für hohe Aminosäurekonzentrationen an Leucin (oberhalb 0.6 mM) eine Substratinhibition beobachtet werden.

Tab. 5.2-1 Kinetische Konstanten des rekombinanten Enzyms I

Enzym I	Substrat	K_m	
		Aminosäure [mM]	ATP [mM]
	Aspartat	3.5 ± 0.8	0.9 ± 0.3
	Leucin	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2

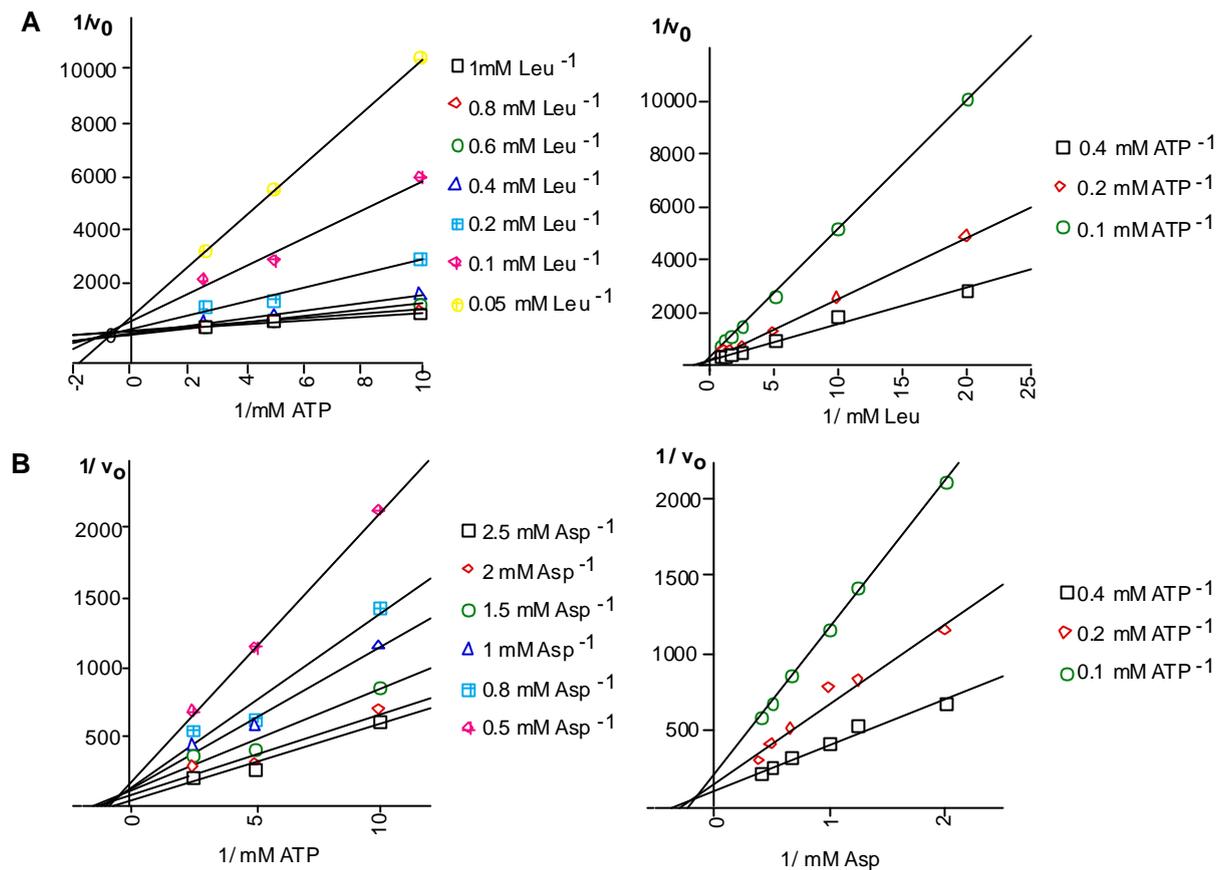


Abb. 5.2-6 Bestimmung der kinetischen Konstanten K_m für die rekombinante Peptidsynthetase I:

Doppelreziproke Auftragung der ATP-PP_i-Austauschaktivitäten für verschiedene ATP- (jeweils links) und Aminosäurekonzentrationen (jeweils rechts).

A) Substrataminosäure Leucin, B) Substrataminosäure Aspartat.

5.2.5 Substratthiolierung des Proteins $[A_{Asp}TCA_{Leu}T]_{(SrfB2-3)}$ (I) aus BL21[DE3][pgsp]

Die Thioesterbindung der Substrataminosäure an der T-Domäne von Peptidsynthetasen wird verfolgt über die TCA-Präzipitationsreaktion (siehe 4.2.4.2). Versuche zur Thiolierung des heterolog in *E. coli* überproduzierten Proteins I mit den Substrataminosäuren Aspartat und Leucin erwiesen sich als nicht erfolgreich: weniger als 1% des überproduzierten Proteins ließen sich radioaktiv mit den Substrataminosäuren Aspartat und Leucin beladen.

T-Domänen von Peptidsynthetasen unterliegen einer posttranslationalen Modifikation durch CoA-bindende Enzyme, die einen hochkonservierten Serinrest in dieser Domäne 4'-phosphopantetheinylieren und damit Peptidsynthetasen in die katalytisch aktive *holo*-Form umwandeln [83]. *E. coli* besitzt keine 4'-Phosphopantetheinyltransferase (4'-PPAN-Transferase), die in der Lage ist, T-Domänen von Peptidsynthetasen ausreichend zu modifizieren, so daß die heterologe Überproduktion von Peptidsynthetasemodulen nur zur katalytisch inaktiven apo-Form führen kann. Die geringen Anteile an *holo*-Enzym, die sich bildeten, sind auf eine Modifikation durch die mit der Fettsäurebiosynthese assoziierten 4'-PPAN-Transferase ACPS zurückzuführen. Studien zur Substratspezifität von 4'-PPAN-Transferasen belegen, das ACPS T-Domänen von Peptidsynthetasen nur unzureichend

modifiziert [83]. Es wurde daher versucht, durch Koexpression der im weiteren beschriebenen Peptidsynthetase-Gene mit einem PPS-assoziierten 4'-PPAN-Transferase-Gen, die Umwandlung in die *holo*-Form *in vivo* zu erreichen. Hierzu wurde das mit dem Gramacidin S-System assoziierte 4'-PPAN-Transferase-Gen *gsp* verwendet.

Die Klonierung von *gsp* erfolgte wie im Anhang B beschrieben in das Helferplasmid pREP4, der zur Gewährleistung der Überproduktion des LacI-Repressors verwendet wird. Um die Transkription des unter Kontrolle des T7-Promotor stehenden *gsp*-Gens [82] zu gewährleisten, wurde fortan der *E. coli* Stamm BL21 λ DE3 als Expressionsstamm verwendet, der das Phagen-kodierte Gen der T7-RNA-Polymerase trägt.

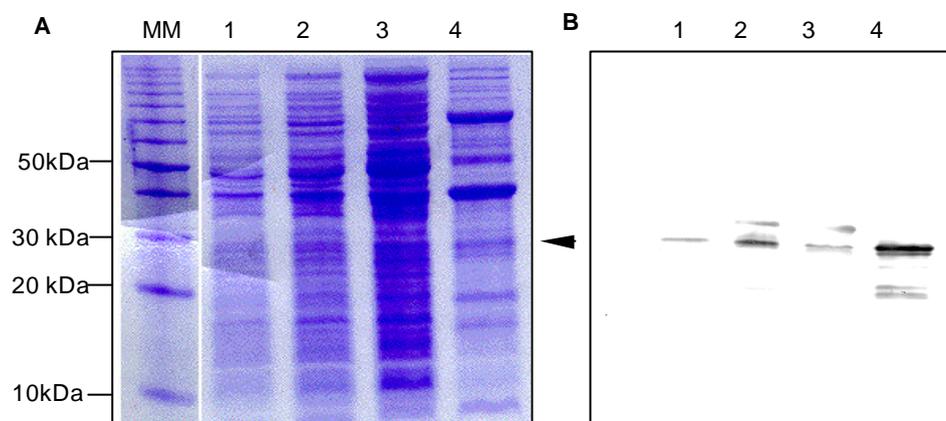
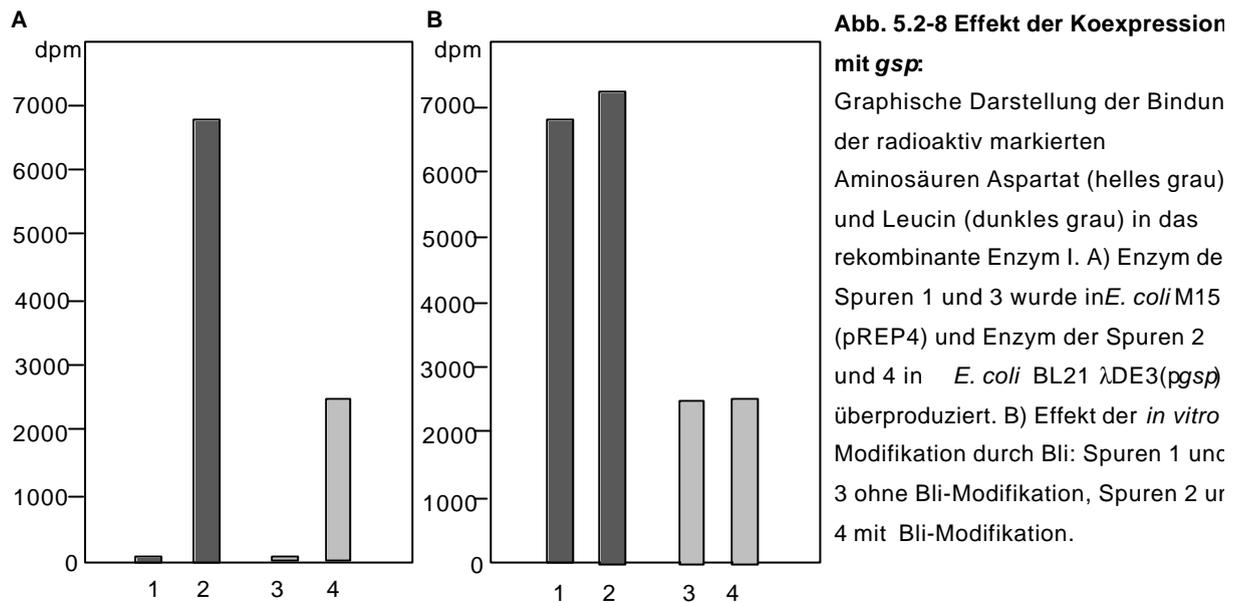


Abb. 5.2-7 Expression des 4'-Phosphopantetheinyltransferase-Gens *gsp* in *E. coli* BL21 λDE3:

A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Spuren 1 und 2 : Gesamtzellextrakte bei OD_{600} 0.7 (1) und 1.4 (2), Spuren 3 und 4: Zellextrakt nach Aufschluß, Überstand (3) und Zellpellet (4). Der Pfeil markiert die Größe des Gsp-Proteins. B) *western-blot* Analyse des Gels von A) mit *anti*-Gsp-Antikörpern.

Zur Ko-Expression wurde BL21 λ DE3[*pgsp*] mit dem Plasmid $p[A_{Asp}TCA_{Leu}T]_{(sr/B2-3)}$ transformiert und das rekombinante Protein I heterolog überproduziert, aufgereinigt und zur Fähigkeit auf Thioesterbildung der Substrataminosäuren eingesetzt.

Die spezifische Bindung der radioaktiv markierten Aminosäuren Aspartat und Phenylalanin war hiernach deutlich erhöht und erreichte prozentuale Beladungen von 20-30% für Leucin und 10% für Aspartat (siehe Abb. 5.2-7). Insbesondere die Thiolierungsrate für Aspartat hing deutlich von der jeweiligen Enzympräparation ab und war ein bedeutender Unsicherheitsfaktor. Das rekombinante Protein I wurde auch *in vitro* [83, 159] (4.2.4.3) mit der 4'-PPAN-Transferase Bli des Bacitracin-Systems modifiziert (Abb. 5.2-7 B). Da keine besseren Thiolierungsraten mit dieser Methode zu erzielen waren, wurde fortan nur die *in vivo* Ko-Expressionsmethode mit *gsp* verwendet, da sie direkt ohne eine Nachmodifikation der aufgereinigten Enzyme zu der *holo*-Form führte.



5.2.6 Produktbildungsreaktionen

Das rekombinante Protein I wurde nach dem Testen der Einzelaktivitäten der Adenylierungs- und Thiolierungsreaktion in Assays zur Produktbildung eines Dipeptids Asp-Leu - abgeleitet von der Spezifität der beiden Module - eingesetzt. Da das putative Dipeptid kein Chromophor besitzt, das eine Identifikation über Absorptionsmethoden deutlich vereinfachen würde, wurden dünnschichtchromatographische Methoden unter Verwendung von radioaktiv markierten Substrataminosäuren durchgeführt, die nach anschließender Autoradiographie und nach Vergleich mit chemischen Standards zu einer Zuordnung der Reaktionsprodukte benutzt wurden (siehe 4.2.4.6).

100 pmol des Proteins I wurden mit [^{14}C]-Asp (1 nmol), nicht-markiertem Leucin (100 nmol) und ATP in Assay-Puffer für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde durch die Zugabe von 100 μL Butanol gestoppt und in der Gesamtheit zur Trockne eingengt. Die Analyse des in 10% Methanol aufgenommenen Reaktionsansatzes ist in Abb. 5.2-9 dargestellt.

Nur in Ansätzen, in denen alle Substrate zur Dipeptidbildung vorhanden waren, konnte ein Reaktionsprodukt mit einem R_f -Wert von ungefähr 0,55 beobachtet werden. Fehlte eines dieser Substrate oder war kein Enzym im Reaktionsansatz, so wurde dieses Produkt nicht gefunden. Ein Vergleich des R_f -Wertes des Reaktionsproduktes mit einem chemischen Asp-Leu-Dipeptidstandard zeigte, daß das Laufverhalten beider Substanzen identisch war. Ein weiteres Indiz für die Involvierung von Leucin in diese Substanz war die Beobachtung, daß Reaktionsansätze in denen D-Leucin als Substrat verwendet wurde, zu einem Reaktionsprodukt mit verändertem Laufverhalten führte. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Bildung eines diastereomeren Dipeptids Asp-D-Leu.

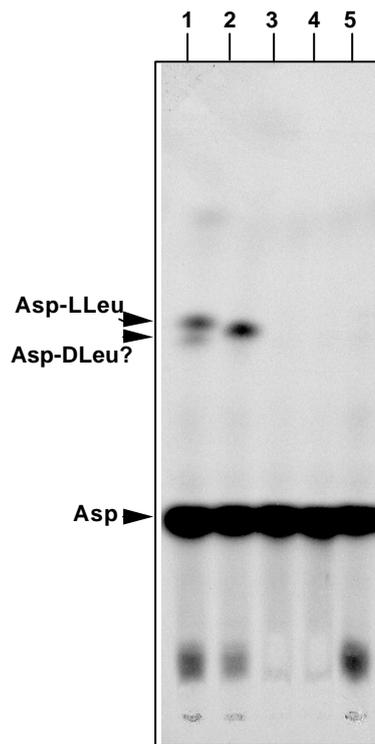


Abb. 5.2-9 Asp-Leu-Dipeptidbildung am Enzym I:

Autoradiographie einer DC-Analyse eines Reaktionsansatzes mit dem Enzym I. Laufmittel n-BuOH/H₂O/AcOH/EEE(1:1:1:1). Identifizierung von Produkten erfolgte durch einen Vergleich des Laufverhaltens mit chemischen Standards (siehe Pfeile). Pro Ansatz wurden 1 μ M Enzym und je 0.2 mM Leu und ATP eingesetzt. Asp* wurde in Konzentrationen von 2.5 mM, eingesetzt.

Spur 1: Asp*, L-Leu, ATP

Spur 2: Asp*, D-Leu, ATP

Spur 3: Asp*, L-Leu

Spur 4: Asp*, ATP

Spur 5: Asp*, L-Leu, ATP, kein Enzym

Die Bildung eines freien Dipeptidproduktes durch das Enzym I war gering und weit von einem quantitativen Umsatz entfernt. Die Abspaltung eines Dipeptidproduktes von dem Enzym I erfolgt offensichtlich nicht-katalysiert durch Hydrolyse.

Die Funktionalität eines heterolog in *E. coli* überproduzierten internen dimodularen Peptidsynthetasenfragmentes konnte bezüglich der Einzelreaktionen wie Adenylierung und Thiolierung von Substrataminosäuren bewiesen werden. Auch die Prozessierung eines Dipeptids, dessen Sequenz der Spezifität der Module entsprach, konnte nachgewiesen werden.

Da das Protein I nur der Vorläufer eines nachfolgend beschriebenen hybriden Enzym-Templates darstellte, um Fragen zur Löslichkeit und zur generellen Funktionalität von Einzelaktivitäten zu beantworten, wurde das Protein nicht weiter untersucht und mit der Konstruktion einer hybriden dimodularen Peptidsynthetase für die Darstellung des Dipeptids Asp-Phe fortgefahren.

5.2.7 Konstruktion einer hybriden dimodularen Peptidsynthetase

Die Vorgabe der Konstruktion eines Asp-Phe-spezifischen Enzym-Templates wurde im nächsten Schritt durch eine artifizielle Fusion, die ein Phenylalanin-aktivierendes Modul an Stelle des Leucin-aktivierenden positionierte, erzeugt. Hierbei wurde – ausgehend von der Annahme der Autonomität von Peptidsynthetase-Domänen – die Fusionsstelle zwischen zwei Domänen in einen wenig konservierten Bereich gelegt, da davon ausgegangen wurde, daß dies die Funktionalität der Einzeldomänen am minimalsten beeinflusst.

Wie durch Untersuchungen an rekombinanten A-Domänen gezeigt wurde (siehe 5.2.2), besitzt die Phenylalanin-aktivierende A-Domäne von TycA die höchste Selektivität bezüglich der Substrataminosäure Phenylalanin. TycA ist ein natürliches Startermodul, das keine C-Domäne besitzt. Zur Darstellung eines Domänen austausches in I wurden deshalb A- und T-Domäne des Leucin-spezifischen Moduls SrfB3 durch den analogen Bereich von TycA ersetzt. Die C-Domäne des entstehenden hybriden Proteins entstammt daher noch dem Vorläuferprotein I (siehe Abb. 5.2-10).

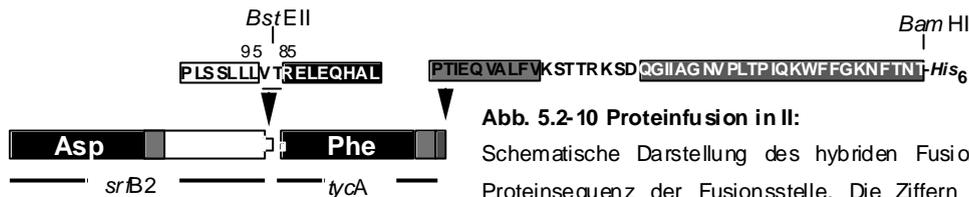


Abb. 5.2-10 Proteinfusion in II:

Schematische Darstellung des hybriden Fusionsproteins II. Oben die Proteinsequenz der Fusionsstelle. Die Ziffern geben die Position der Fusion relativ zum A-Domänenmotiv A2 (LQAGGA) von TycA an. Das A-Domänenmotiv A2 von (dem deletierten) SrfB3 lag 95 As im C-Terminus dieser Fusionsstelle. Grauschattierungen bezeichnen die katalytischen Domänen. *BstEII* stellt eine natürliche Schnittstelle der Sequenz von *srfB3* dar.

Der kodierende Bereich für die A- und T-Domäne des Leucin-aktivierenden Moduls in $p[A_{Asp}TCA_{Leu}T]_{(srfB2-3)}$ wurde durch Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *BamHI* (MCS des Vektors) und *BstEII* entfernt und ein mit kompatiblen Schnittstellen versehenes DNA-Fragment aus dem *tycA*-Gen aus *Bacillus brevis* ATCC8185 inseriert. Dabei wurde die natürliche Restriktionsschnittstelle *BstEII* für eine Fusion der beiden Genfragmente zwischen C- und A-Domäne verwendet. Der Bereich dieser Fusionsstelle wurde bisher benutzt, um den N-Terminus katalytisch aktiver interner A-Domänen zu definieren [28].

Der Expressionsstamm BL21 λ DE3[*pgsp*] wurde mit dem resultierenden Plasmid $p[A_{Asp}TC]_{(srfB2)}-[A_{Phe}T]_{(tycA)}$ transformiert. Nach Expression wurde das rekombinante Protein $[A_{Asp}TC]_{(srfB2)}-[A_{Phe}T]_{(tycA)}$ (II) über Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend auf die Aktivität der katalytischen Einzelaktivitäten wie Adenylierung und Thiolierung von Substrataminosäuren getestet. Das hybride Enzym II war ein vollständig lösliches Protein (siehe Abb. 5.2-11). Es konnten, verglichen mit dem nicht-hybriden Vorläufer I, vergleichbare Mengen an Protein pro Kulturansatz erhalten werden.

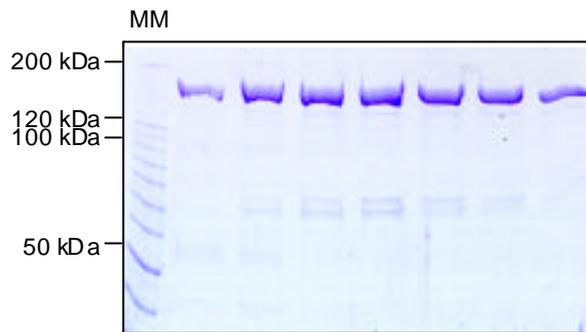


Abb 5.2-11 SDS-Polyacrylamidgel der aufgereinigten dimodularen Peptidsynthetase II: Eluierte Fraktionen der Aufreinigung an Ni^{2+} -Chelat. MM: 10 kDa Protein-Leiter. Coomassie-Blau gefärbtes Gel.

Diese dimodulare Peptidsynthetase **II** stellte die erste beschriebene, heterolog in *E. coli* überproduzierte und anschließend *in vitro* charakterisierte Hybrid-Synthetase dar, die durch einen Domänenfusion konstruiert wurde.

5.2.8 Effekt der Domänenfusion: Einzelaktivitäten des hybriden Proteins $[\text{A}_{\text{AspTC}}]_{(\text{SrfB2})}^-$ $[\text{A}_{\text{PheT}}]_{(\text{TycA})}$ (**II**)

Der Test der Aktivität und Spezifität des Proteins in der ATP- PP_i -Austauschreaktion (siehe 4.2.4.1) wurde bestimmt.

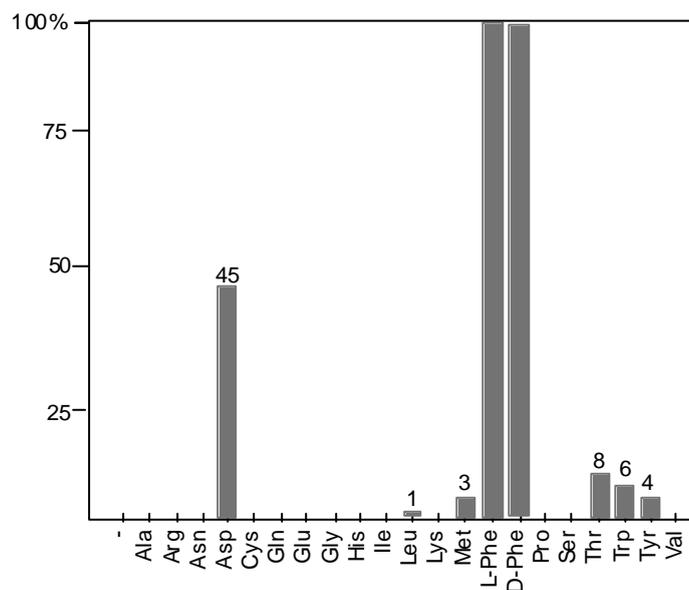


Abb. 5.2-12 Substratspezifität der hybriden Peptidsynthetase II: Graphische Darstellung der ATP- PP_i -Austauschreaktion. Die höchste Austauschrate für Phenylalanin wurde als 100 % definiert. Die Enzymkonzentration betrug 200 nM, ATP wurde in Konzentrationen von 2 mM, Aminosäuren in Konzentrationen von 1 mM verwendet.

Die Ergebnisse, die in Abb. 5.2-12 graphisch dargestellt sind, verdeutlichen den Effekt der Domänenfusion. **II** zeigte eine starke Phenylalanin-abhängige Substrataktivierung und nur geringe Nebenspezifitäten für Threonin, Tryptophan und Tyrosin. Auch D-Phenylalanin wurde ähnlich stark wie L-Phenylalanin aktiviert. Die Aktivierung der kognaten Aminosäure Aspartat durch das SrfB2-Modul war, verglichen mit der von Phenylalanin, nur etwa halb so stark. Das Aktivitätsmuster lässt sich als eine Addition der katalytischen Aktivitäten von SrfB2 und TycA ansehen (siehe Abb. 5.2-2).

Die beobachtete Substratspezifität des hybriden Proteins **II** bestätigte sich auch bei der Untersuchung des Proteins, Aminosäuren als Thioester zu binden.

Im Gegensatz zu dem Protein **I** konnte Phenylalanin bis zu einer Rate von 50 % bezogen auf die Gesamtmenge an Protein inkorporiert werden. Die Rate der Aspartat-Inkorporation war im Vergleich als unverändert zu bezeichnen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.2-12 dargestellt.

Sowohl die Fähigkeit der Substratadenylierung als auch Substratthiolierung schienen somit durch die Darstellung eines hybriden Enzyms nicht beeinträchtigt worden zu sein. Untersuchungen zur Fähigkeit der Synthese eines Dipeptids Asp-Phe wurden zurückgestellt, um zuerst das Protein **II** in einem weiteren Schritt mit einer Te-Domäne zu fusionieren. Auf diese Weise sollte ein katalysierter Produkt-*turn over* des Enzyms ermöglicht werden.

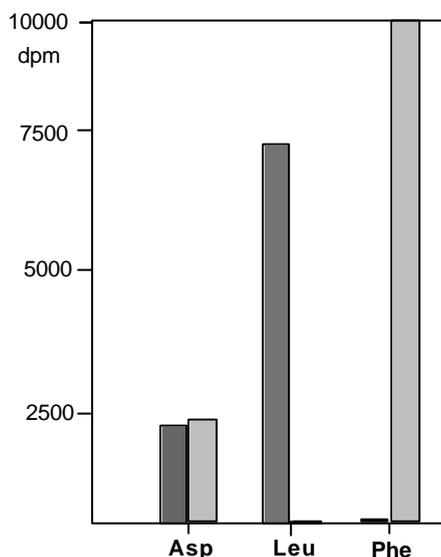


Abb. 5.2-13 Effekt des Modulaustausches in II auf die Substratthiolierung:

Graphische Darstellung der Bindung der radioaktiv markierten Aminosäuren Aspartat, Leucin und Phenylalanin. In dunklem Grau die Inkorporation in das Enzym I; in hellem Grau die Inkorporation in das hybride Enzym II. Für die Ansätze wurde 500 nM Enzym und 1500 nM Aminosäuren eingesetzt.

5.2.9 Fusion einer Thioesterasedomäne an die hybride Peptidsynthetase $[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}^-$ $[A_{Phe}T]_{(TycA)}$ (**II**)

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Beteiligung der Te-Domäne an der Art und Effizienz der Termination nichtribosomal produzierter Peptide wenig bekannt und auch über die Toleranz dieser Domäne bezüglich der Abspaltung nicht-kognater Peptide konnte nur spekuliert werden [109]. Durch eine C-terminale Fusion von **II** mit einer Te-Domäne sollte versucht werden, die Produktabspaltung eines putativ prozessierten Dipeptids Asp-Phe zu forcieren. Folgende Grundüberlegung leitete die Konzeption eines Thioesterase-fusionierten Asp-Phe-Templates. Neben einer potentiellen inhärenten Substratspezifität der Te-Domäne war auch die Funktionalität dieser Domäne nach einer künstlichen Domänenfusion eine offene Frage. Würde die Te-Domäne wechselwirkend mit einer nicht-kognaten T-Domäne in Kontakt treten? Um die Ungewissheit dieser Frage zu umgehen, wurde entschieden, die Thioesterase-Fusion zwischen A- und T-Domäne zu konstruieren (siehe dazu auch Abb. 5.2-

22), wodurch die Te-Domäne mit ihrer kognaten T-Domäne im Kontakt steht. So kann zudem nun eine hervorgerufene mögliche Beeinträchtigung des Enzym-Templates durch die zweite Domänenfusion zwischen A- und T-Domäne sehr einfach identifiziert werden, indem die Fähigkeit des Enzyms – über die Fusionsstelle hinweg – die Substrataminosäure Phenylalanin als Thioester zu binden, untersucht wurde. Durch Repositionierung der Te-Domäne der Surfactin Synthetase C wurde gezeigt, daß die Produktion verkürzter Surfactin-Analoga induziert werden kann [109]. Die Te-Domäne der Surfactin Synthetase C wurde im folgenden verwendet.

Wiederum diene eine native Restriktionsschnittstelle im 5'-Bereich des für die T-Domäne des zweiten Moduls kodierenden DNA-Abschnitts in dem Konstrukt $p[A_{Asp}TC]_{(srfB2)}-[A_{Phe}T]_{(tycA)}$ dazu, diesen DNA-Bereich mittels Restriktionsverdau zu deletieren. Hierzu wurden die Restriktionsendonukleasen *Cla* I und *Bam*H I verwendet. Ein DNA-Fragment mit kompatiblen Enden, das den für die T- und Te-Domäne kodierenden Abschnitt von *srfC* umfaßte, wurde mittels PCR amplifiziert und insertiert. Das resultierende rekombinante Plasmid wurde als $p[A_{Asp}TC]_{(srfB2)}-[A_{Phe}]_{(tycA)}-[TTe]_{(srfC)}$ bezeichnet (siehe Abb. 5.2-14).

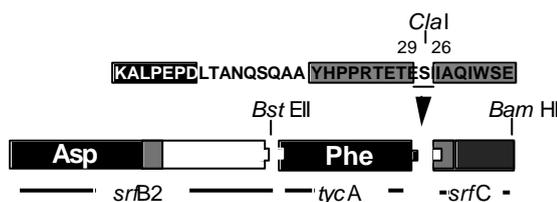


Abb. 5.2-14 Proteinfusion in III:

Schematische Darstellung des hybriden Fusionsproteins III. Oben die Proteinsequenz der Fusionsstelle und die Position der Fusion relativ zum Serin des core T der PCP-Domäne von SrfC. Das core T des deletierten TycA lag 29 As vor dieser Fusionsstelle. Grauschattierungen bezeichnen die katalytischen Domänen. *Cla* I stellt eine natürliche Schnittstelle der Sequenz von *tycA* dar.

5.2.10 Test der katalytischen Einzelaktivitäten in $[A_{Asp}TC]_{(srfB2)}-[A_{Phe}]_{(tycA)}-[TTe]_{(srfC)}$ (III)

Die Überproduktion und Aufreinigung des hybriden Proteins III erfolgte wie bereits beschrieben (5.2.8). Löslichkeit und Ausbeuten des rekombinanten Proteins waren auch durch die zweite artifizielle Fusionsstelle nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 5.2-15). Die Adenylierungsraten für die beiden Substrataminosäuren Aspartat und Phenylalanin unterschieden sich erwartungsgemäß nicht grundlegend von dem Vorläuferprotein II (siehe auch Abb. 5.2-11).

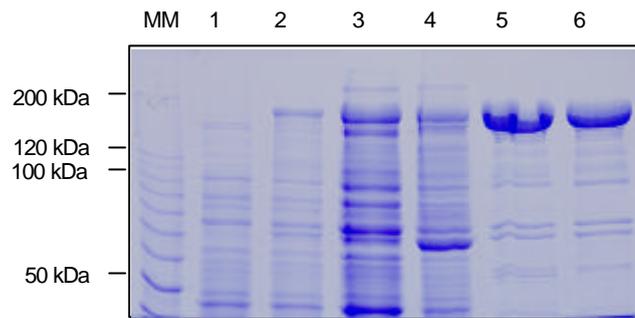


Abb. 5.2-15 SDS-Polyacrylamidgel der in *E. coli* überproduzierten dimodularen Peptidsynthetase:II
Spuren 1 und 2: Gesamtzellextrakt vor und 1,5 Stunden nach IPTG-Induktion. Spuren 3 und 4: Zellextrakt nach Zellaufschluss: Überstand (3) und Pellet (4). In Spuren 5 und 6 an Ni²⁺-IMAC aufgereinigtes Protein. MM: 10 kDa Protein-Leiter. Coomassie-Blau gefärbtes Gel.

Durch die Fusion zwischen A- und T-Domäne des zweiten Moduls wird die Substrataminosäure Phenylalanin auf eine nicht-kognate T-Domäne übertragen. Die Funktionalität dieser Fusion konnte leicht durch die Effizienz der heterologen Thiolierungsreaktion in dem Protein **III** untersucht werden. Die Ergebnisse der Thioesterbindung für die Substrataminosäuren Aspartat und Phenylalanin sind in Abb. 5.2-16 dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zu dem Vorläuferprotein **II** gefunden werden.

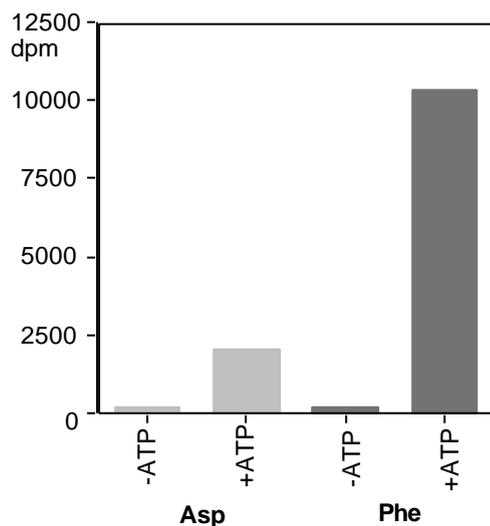


Abb. 5.2-16 Aminosäuresubstrat-Thiolierung des hybriden Enzyms III:

Graphische Darstellung der Bindung der radioaktiv markierten Aminosäuren Aspartat und Phenylalanin in Abhängigkeit von ATP. In hellem Grau, die Aspartat-Beladung, in dunklem Grau, die Phenylalanin-Beladung. In einem Reaktionsansatz wurden 500 nM Enzym und 1500 nM Aminosäure eingesetzt. Vergleiche auch mit Abb. 5.2-13

Die Anwendung einer intramodularen Domänenfusion zwischen einer A- und einer T-Domäne wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben.

5.2.11 Dipeptidbildung an den artifiziellen Enzym-Templaten $[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}-[A_{Phe}T]_{(TycA)}$ (II) und $[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}-[A_{Phe}]_{(TycA)}-[TTe]_{(SrfC)}$ (III)

Die Proteine **II** und **III** stellen artifizielle dimodulare Enzym-Templates dar, die, entsprechend der Spezifität der Module, für die Produktion des Dipeptides Asp-Phe geeignet sein sollten. Nach der Bestimmung der Einzelaktivitäten der Adenylierungs- und Thiolierungsreaktion wurden sie nun auf ihre Fähigkeit zur Bildung dieses Dipeptids hin untersucht. Der Nachweis erfolgte hierbei anfangs über dünnschichtchromatographische Methoden mit Hilfe radioaktiv

markierter Substrataminosäuren, später mit nicht-radioaktiven Aminosäuren mittels HPLC und gekoppelten HPLC-MS-Methoden.

Die Reaktionsbedingungen für die dünnschichtchromatographischen Analysen sind bereits unter 4.2.4.6 beschrieben und unterscheiden sich nicht gegenüber dem Nachweis des Dipeptids Asp-Leu.

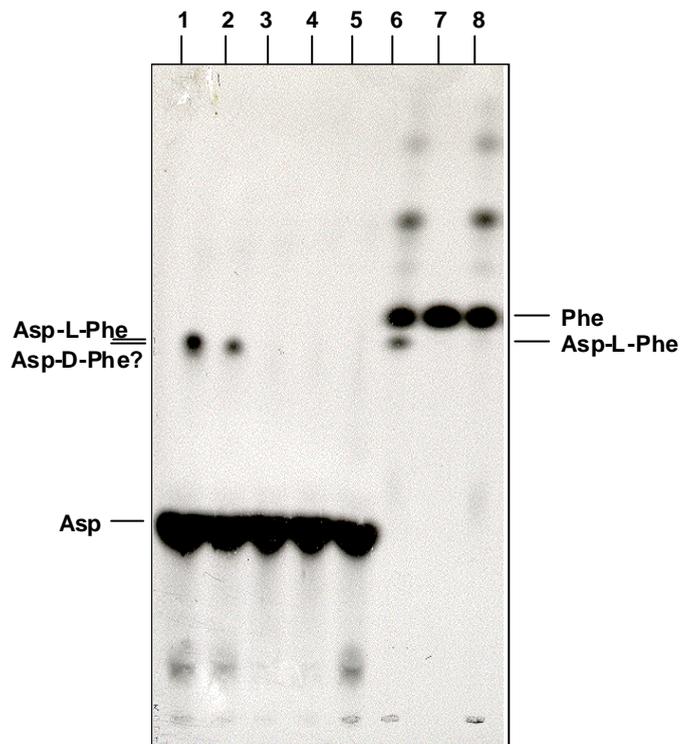


Abb. 5.2-17 Asp-Phe-Dipeptidbildung am Enzym III:

Autoradiographie einer DC-Analyse eines Reaktionsansatzes mit dem Enzym III (500 nM). Laufmittel n-BuOH/H₂O/AcOH/EEE (1:1:1:1). Identifizierung von Produkten erfolgte durch einen Vergleich des Laufverhaltens mit chemischen Standards. Asp* wurde in Konzentrationen von 10 µM, Phe* in Konzentrationen von 2,5 µM eingesetzt.

Spur 1: Asp*, L-Phe, ATP

Spur 2: Asp*, D-Phe, ATP

Spur 3: Asp*, L-Phe

Spur 4: Asp*, ATP

Spur 5: Asp*, L-Phe, ATP, kein Enzym

Spur 6: L-Asp, Phe*, ATP

Spur 7: L-Asp, Phe*

Spur 8: Phe*, ATP

Reaktionsansätze zur Dipeptidbildung des Enzyms III zeigten in Abhängigkeit der Substrate Aspartat, Phenylalanin und ATP eines zusätzlichen Produktpot mit einem R_f -Wert von ca. 0,5 (siehe Abb. 5.2-17). Fehlte eine der Substratkomponenten, so war dieser Produktpot nicht zu detektieren. In separaten Reaktionsansätzen konnte auch gezeigt werden, daß der Produktpot sowohl mit radioaktiv markiertem Aspartat als auch Phenylalanin zu identifizieren ist. Ein Vergleich des Laufverhaltens des Reaktionsproduktes mit einem chemischen Asp-Phe-Dipeptidstandard zeigte, daß die R_f -Werte identisch waren. In einem Kontrollansatz, der D-Phe als Substrataminosäure enthielt, konnte gezeigt werden, daß ein anderes Produkt gebildet wird. Diese Beobachtung wäre konsistent mit der Bildung eines diastereomeren Dipeptids Asp-D-Phe.

Um sicherzustellen, daß die Produktbildung auf eine Prozessierung am Enzym-Templat entsprechend des vorgestellten Mechanismus der nichtribosomalen Peptidbiosynthese abläuft, wurde eine alkalische Thioesterspaltung durchgeführt (siehe 4.2.4.4). Mit dieser Methode können thioestergewundene Intermediate direkt vom Enzym abgespalten werden. Die Ergebnisse der alkalischen Thioesterspaltung zeigten neben den Spots der freien Aminosäuren, wiederum ein Reaktionsprodukt mit einem R_f -Wert von ca. 0,5. Dies stellt das

einziges zusätzliche Reaktionsprodukt dar (siehe Abb. 5.2-17). Die Ausbeuten dieses Reaktionsproduktes unterschieden sich stark, je nachdem, ob Aspartat oder Phenylalanin als radioaktiv markierte Aminosäure eingesetzt wurde. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die jeweils radioaktiv markierte Aminosäure stets in geringen Mengen, nicht-radioaktive Substrate aber in sättigenden Konzentrationen eingesetzt wurden. Ist keine Substratsättigung erreicht, so ist die Geschwindigkeit der Produktbildung in beiden Reihen nicht notwendigerweise identisch.

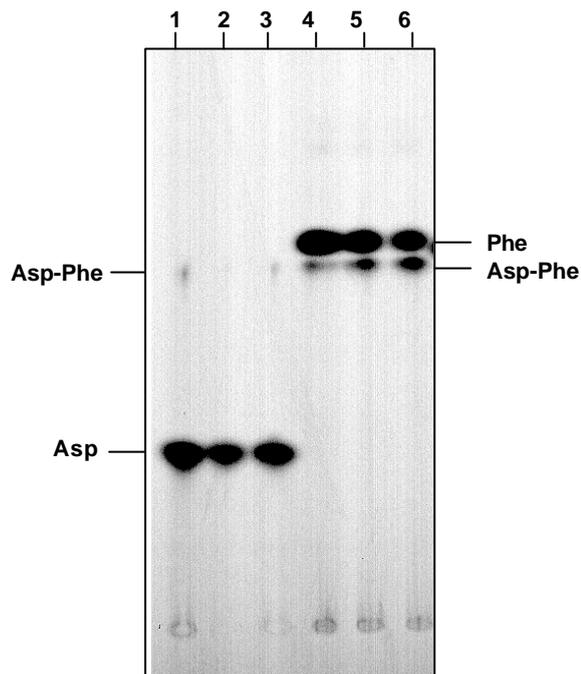


Abb. 5.2-18 Alkalische Thioesterspaltung von Reaktionsprodukten von dem Enzym III:

Autoradiographie einer DC-Analyse der Reaktionsansätze mit dem Enzym III. Laufmittel n-BuOH/H₂O/AcOH/EEE(1:1:1:1). Identifizierung von Produkten erfolgte durch einen Vergleich des Laufverhaltens mit chemischen Standards. Asp* wurde in Konzentrationen von 2 µM, Phe* in Konzentrationen von 6 µM eingesetzt.

Spuren 1- 3: Asp*, L-Phe, ATP

Spur 1: 10 min

Spur 2: 20 min

Spur 3: 30 min

Spuren 4- 6: L-Asp, Phe*, ATP

Spur 4: 10 min

Spur 5: 20 min

Spur 6: 30 min

Für das rekombinante Enzym **II** konnte gezeigt werden, daß sich die Reaktionsansätze nicht wesentlich von denen mit dem rekombinanten Protein **III** durchgeführten unterscheiden.

Asp-Phe-Produktabspaltungskinetiken (siehe 4.2.4.5) belegen, daß für beide thiolierten Substrataminosäuren, Aspartat und Phenylalanin, die Zugabe der jeweils anderen Aminosäure, eine leichte Abfall der Thiolierungsrate bewirkt. Dies kann auf die Bildung und nachfolgende Abspaltung eines Dipeptids zurückgeführt werden. Während sich die Kinetiken der Thiolierungsrate von Aspartat in einem Zeitfenster von 30 min für die Proteine **III** und **II** nicht unterscheiden, so sind analoge Kinetiken für die Thiolierungsrate von Phenylalanin unterschiedlich: erstens führt die Zugabe von Überschusmengen an Aspartat zu einem im Vergleich zum Protein **II** beschleunigten Abfall der Phenylalanin-Inkorporation im Protein **III**. Zweitens erreicht die Thiolierungsrate von Phenylalanin für das Protein **III** nicht den gleichen hohen Wert wie für das Protein **II**. Letztere Beobachtung spricht für die Vermutung, daß die Te-domäne bereits die freie Aminosäure Phenylalanin abspaltet, bevor es zu einer Dipeptidbildung gekommen ist. Wahrscheinlich kompetiert diese Abspaltung von Phenylalanin zeitlich mit der Kondensation der beiden Aminosäuren Aspartat und

Phenylalanin. Dieser Befund spricht auch für eine wahrscheinlich zeitlich verzögerte Kondensationsreaktion, so daß – in der Zwischenzeit – die Aminosäure Phenylalanin durch die Te-Domäne von dem Enzym abgespalten wird.

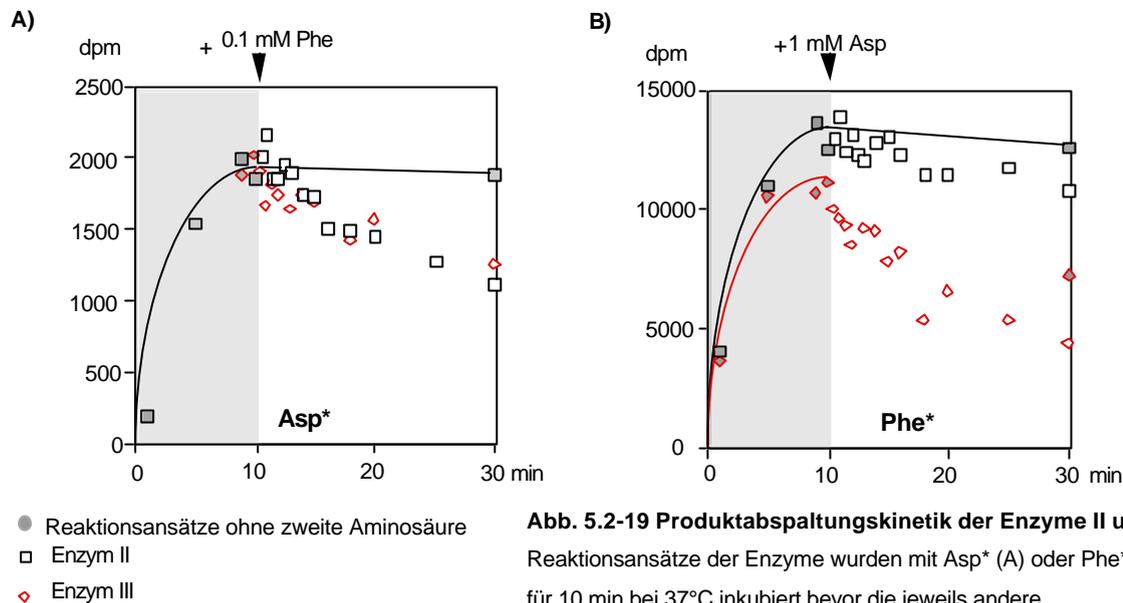


Abb. 5.2-19 Produktabspaltungskinetik der Enzyme II und III:

Reaktionsansätze der Enzyme wurden mit Asp* (A) oder Phe* (B) für 10 min bei 37°C inkubiert bevor die jeweils andere Substrataminosäure zugegeben wurde. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und nach TCA-Fällung die Menge an präzipitierter Radioaktivität bestimmt.

Eine HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte der Enzyme III und II wurde wie in 4.2.4.7 beschrieben durchgeführt. Beide Aminosäuren wurden hierbei nicht-radioaktiv in Konzentrationen von 1 mM eingesetzt. In Abhängigkeit aller drei Substrate Aspartat, Phenylalanin und ATP erfolgte die Bildung mindestens eines zusätzlichen Produktpeaks bei einer Retentionszeit von ca. 17 min, der mit einem chemischen Asp-Phe-Dipeptidstandard ko-eluierte (siehe Abb. 5.2-19). Massenspektrometrische Analysen ergaben, daß dieser Produktpeak eine Masse $m/z+1$ von 281,2 aufweist, was der Masse $m/z+1$ des Dipeptids Asp-Phe entspricht. Der Vergleich von Diagrammen einer Elektronenspray-Ionisationsmassenspektrometrie mit dem eines chemischen Standards zeigte, daß der Produktpeak bei 17 min nicht von Fremdstoffen unterlagert ist (siehe Abb. 5.2-20 und Anhang E).

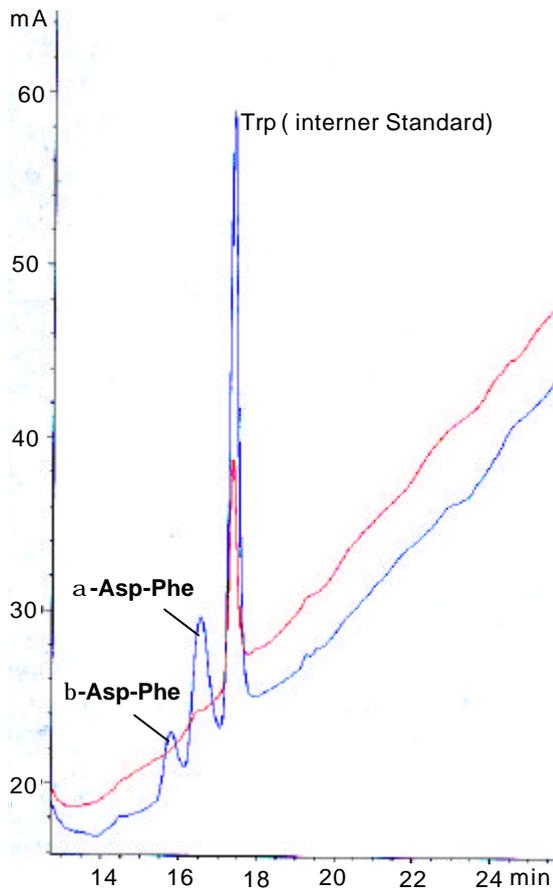


Abb. 5.2-20 Identifizierung von Asp-Phe:

HPLC-Analyse von Reaktionsansätzen des Enzyms III:

Blau: Reaktionsansatz unter Verwendung aller drei Substrate Asp, Phe und ATP.

Rot: Reaktionsansatz ohne ATP.

Tryptophan wurde als interner Standard verwendet.

Parallel konnte ein Peak geringerer Intensität bei ca. 16,5 min detektiert werden, der ebenfalls nur in Abhängigkeit aller drei Substrate zu beobachten war (siehe Abb. 5.2-20). Die Zuordnung dieses offenbar Aspartat und Phenylalanin enthaltenden Produktes gelang mittels Elektronenspray-Ionisationsmassenspektrometrie. Ein Vergleich mit MS-Diagrammen von chemischen Standards ergab, daß es sich bei dieser Substanz um β -Aspartylphenylalanin (siehe Abb. 5.2-20) handelte. β -Aspartylphenylalanin stellte in allen untersuchten Produktbildungsreaktionen der Proteine **II** und **III** ein Nebenprodukt dar, das, bezogen auf die gebildete α -Aspartylphenylalanin-Menge, zu etwa 25-30 % gebildet wurde.

Die Bildung von β -Aspartylphenylalanin durch eine unspezifische Enzymreaktion, die aufgrund der relativ langen Inkubationszeit zustande käme, konnte ausgeschlossen werden. Andere Produkte, die durch eine unspezifische enzymatische Reaktion zustande kämen, wie die Dipeptide PheAsp, PhePhe oder AspAsp konnten nur in marginalen Mengen nachgewiesen werden.

Wie bereits bei den dünnschichtchromatographischen Analysen der Produktbildungsreaktionen vermutet, war die Ausbeute an Asp-Phe-Dipeptidbildung für beide Proteine **II** und **III** nicht signifikant unterschiedlich. Wie durch eine Quantifizierung der gebildeten Produktmenge mittels Vergleich der Integrale der HPLC-Peaks mit einem quantifizierten

chemischen Asp-Phe-Standard abgeschätzt werden konnte, betrug die Geschwindigkeit der Asp-Phe-Bildung etwa $0,05\text{-}0,08\text{ min}^{-1}$.

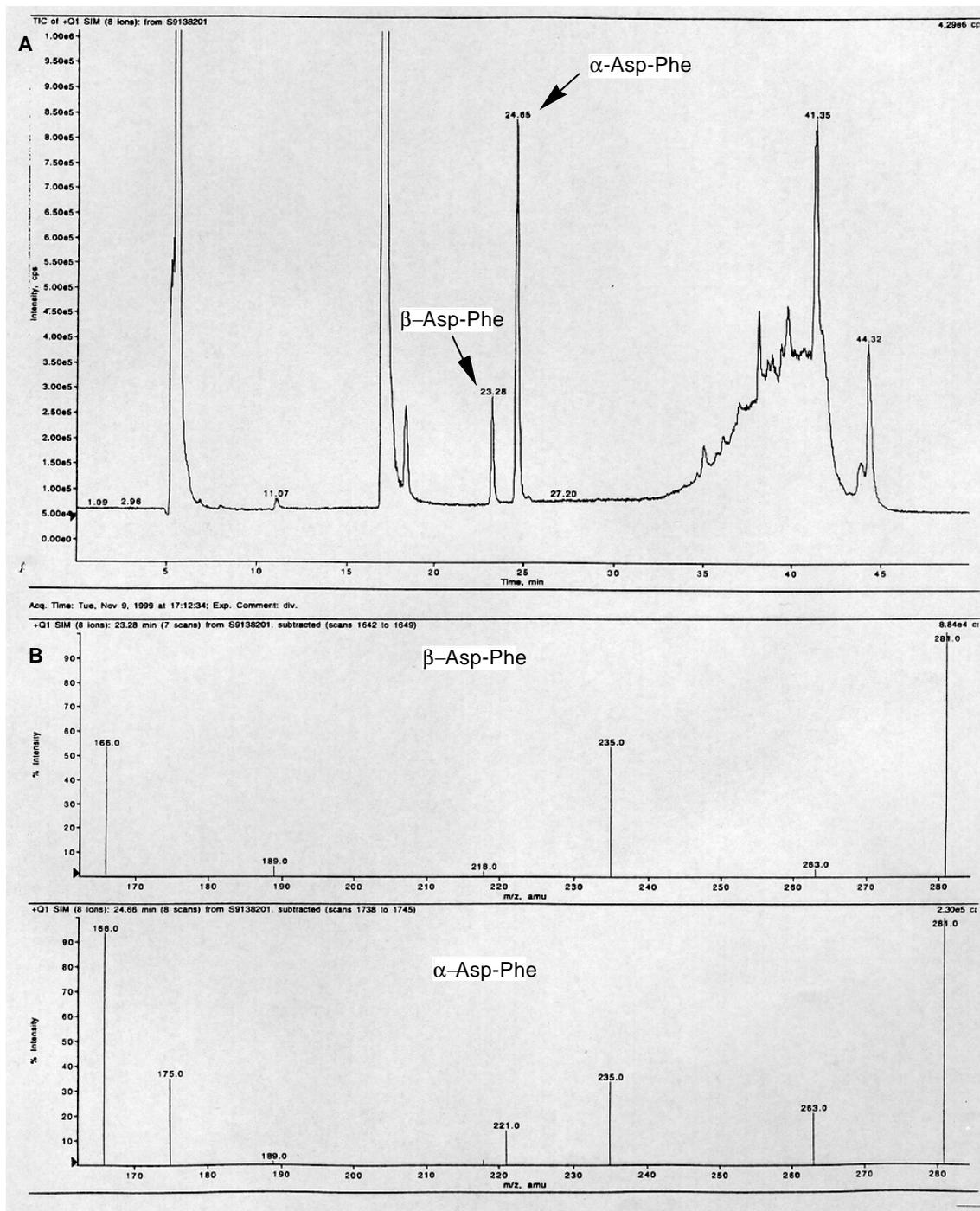


Abb. 5.2-21 HPLC-MS-Analytik eines Reaktionsansatzes des Enzyms III:

Positive Elektronenspray-Ionisation (ESI). Das Diagramm (B) weist die bei 23.28 bzw. 24.68 min detektierten Substanzen als β -Asp-Phe (oben) bzw. α -Asp-Phe (unten) aus. Diese Analytik wurde von Herrn Huub Hendrickx durchgeführt. Die Methodik findet sich in Kapitel 4.

5.2.12 Versuche zur Konstruktion eines effizienteren Asp-Phe-Enzym-Templates

Die Bildung eines Asp-Phe-Dipeptides an einem artifiziiellen, speziell für diese Zwecke konstruiertem Hybridenzym konnte wie in 5.2.12 beschrieben, nachgewiesen werden. Die Produktausbeuten dagegen waren gering. Die *turn over*-Rate der konstruierten Enzym-Templates lag wahrscheinlich um mehr als eine Größenordnung unter der von natürlichen Systemen [95, 170]. Für einen Hauptgrund der Ineffizienz kann – neben einer beeinträchtigten Kondensationsreaktion - die Te-Domäne verantwortlich gemacht werden, da Beladungskinetiken und Thioesterspaltungen vermuten lassen, daß die Te-Domäne nicht oder nur sehr unzureichend die Dipeptidabspaltung vom Enzym katalysierte. Dafür spricht auch, das die Thioesterase-Fusion in III offenbar nicht zu einer stark vermehrten Produktausbeute führte. Beladungskinetiken mit radioaktiv markiertem Phenylalanin belegten, daß offenbar bereits die freie Aminosäure vom Enzym abgespalten wurde.

Es wurden daraufhin neue dimodulare Hybrid-Peptidsynthetasen konstruiert, die auf den bereits bestehenden aufbauen, jedoch diese durch Austausch der Art der Te-Domäne modifizieren. Hierzu wurde die Te-Domäne der Synthetase SrfC durch die der Tyrocidin Synthetase TycC ausgetauscht. Zudem wurde auch eine neue Fusionsstrategie angewendet, die die Te-Domäne direkt an die T-Domäne des zweiten Moduls fusionierte; dies stellte somit eine T-Te-Fusion dar (vergleiche Abb. 5.2-22).

In einem ersten neuen Konstrukt wurde der für die T- und Te-Domäne von SrfC kodierende DNA-Abschnitt aus dem Plasmid $p[A_{Asp}TC]_{(srfB2)}-[A_{Phe}]_{(tycA)}-[TTe]_{(srfC)}$ mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen *Cla* I und *Bam*H I entfernt und durch einen analogen Bereich der Tyrocidin Synthetase TycC ersetzt. Das entstandene Plasmid wurde $p[A_{Asp}TC]_{(srfB2)}-[A_{Phe}]_{(tycA)}-[TTe]_{(tycC6)}$ genannt (siehe Abb. 5.2-22).

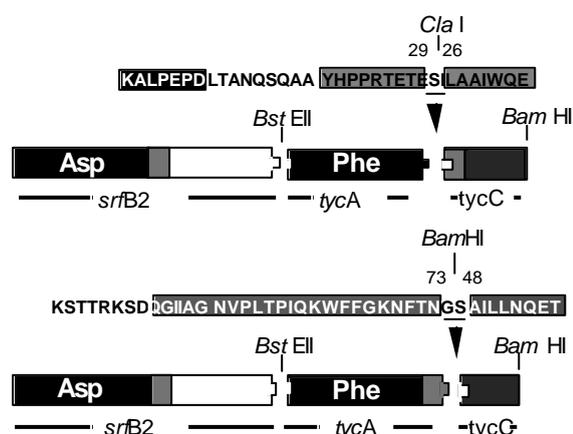
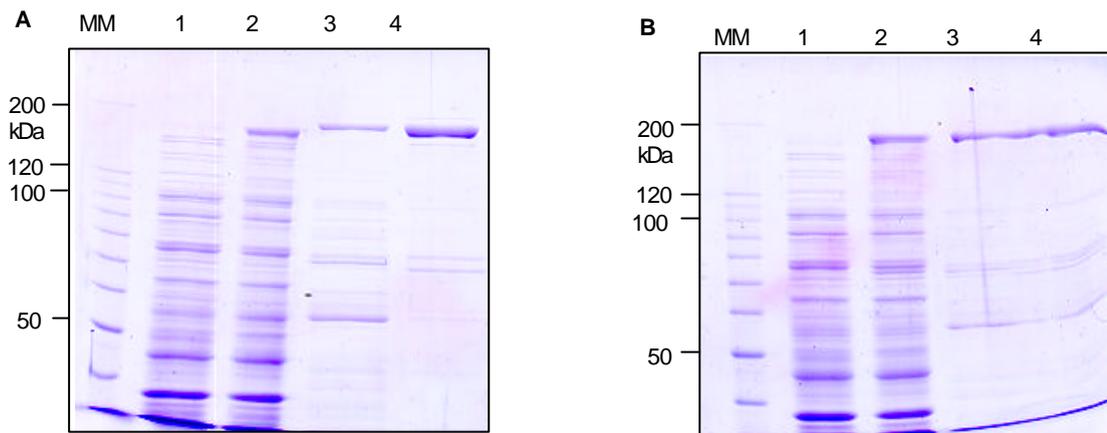


Abb. 5.2-22 Proteinfusionen in IV (oben) und V (unten): Schematische Darstellung der hybriden Fusionsproteine IV und V. Oben die Proteinsequenz der Fusionsstelle und die Position der Fusion relativ zum Serin des core T der PCP-Domäne von TycC6 bzw. TycA. Die Fusion der Te-Domäne in V beinhaltet noch 25 As der E-Domäne von TycA (vergl. Bezifferung der Fusionsstelle 73/48). Grauschattierungen bezeichnen die katalytischen Domänen. Die Verwendung der artifiziiellen Schnittstelle *Bam* HI verändert die Proteinsequenz zu GS.

Ein zweites neues Konstrukt, das die Te-Domäne von TycC verwendet, basiert auf dem Plasmid $p[A_{Asp}TC]_{(srfB2)}-[A_{Phe}T]_{(tycA)}$ (siehe Diskussion und Anhang B) Dieses wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuclease *Bam*H I linearisiert und ein PCR-amplifiziertes DNA-Fragment

korrespondierend zu der Te-Domäne der Tyrocidin Synthetase TycC wurde insertiert. Das entstandene Plasmid wurde $p[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}-[A_{Phe}T]_{(TycA)}-[Te]_{(TycC6)}$ genannt. Es unterscheidet sich von dem vorherigen durch die Wahl einer anderen Domänenfusion (siehe Abb. 5.2-21) und somit auch der Herkunft der zweiten T-Domäne.

Der Expressionsstamm BL21 λ DE3[pgsp] wurde jeweils mit beiden Plasmiden transformiert und die zugehörigen rekombinanten Proteine $[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}-[A_{Phe}T]_{(TycA)}-[Te]_{(TycC6)}$ (**V**) und $[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}-[A_{Phe}]_{(TycA)}-[TTe]_{(TycC6)}$ (**IV**) überproduziert und aufgereinigt. Die Löslichkeit der hybriden Proteine war nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 5.2-23).



5.2-23 SDS-Polyacrylamidgelle der in *E. coli* überproduzierten Proteine IV und V:

A) IV B) V. Spuren 1 bis 4 jeweils Gesamtzellextrakt vor Induktion (1) und 1,5 Stunden nach IPTG-Induktion (2), sowie über Ni^{2+} -IMAC aufgereinigtes Protein (3 und 4). MM: 10kDa-Proteinleiter. Coomassie-Blau gefärbtes Gel.

Die Bestimmung von Einzelaktivitäten wurde wie in 4.2.4.1 und 4.2.4.2 beschrieben durchgeführt und zeigte, daß die Adenylierungs- und Thiolierungsreaktion im Vergleich zu den unter 5.2.12 beschriebenen Proteinen nicht beeinträchtigt war.

Das Protein **IV** stellt das zweite Beispiel (siehe 5.2.11) für eine funktionelle heterologe Thiolierungsreaktion bereit.

In Produktbildungsreaktionen konnte mittels HPLC-Analyse gezeigt werden, daß weder die Modifikation der Te-Domäne noch die Art der Fusion dieser Domäne zu einer gesteigerten Produktbildung führte. Die Geschwindigkeit der Produktbildung war im Rahmen der Meßgenauigkeit gegenüber **III** als identisch zu bezeichnen.

5.3 Systematische Konstruktion von Domänenfusionen - Identifizierung von Interdomänen-Linkern

Einige Fragestellungen, die am Anfang dieser Arbeit bezüglich der Konstruktion einer hybriden dimodularen Peptidsynthetase gemacht wurden, konnten mit der Charakterisierung der in 5.2 beschriebenen Synthetasen beantwortet werden: so wurde gezeigt, daß die heterologe Expression dieser großen Enzyme in *E. coli* möglich ist. Auch konnten hybride Enzyme durch verschiedene Arten von Domänenfusionen erzeugt werden, ohne daß die Einzelaktivitäten der Adenylierungs- und Thiolierungsreaktion der nichtribosomalen Peptidsynthese beeinträchtigt schienen.

Bei der Konstruktion der unter 5.2 beschriebenen hybriden dimodularen Peptidsynthetase-Gene wurden natürliche Restriktionsschnittstellen verwendet. Diese Fusionsstellen wurden anhand der Definition von Domänengrenzen abgeschätzt. Die N- und C-terminalen Domänengrenzen von A und T-Domäne konnten beispielsweise nach der biochemischen Charakterisierung rekombinanter Domänen eingegrenzt werden [41, 60]. Für die Fusion zweier Gene wurden dabei die kodierenden Proteinabschnitte verglichen und die Gensequenz der zu fusionierenden Domäne durch Wahl geeigneter Oligonukleotide angepasst.

Über eine ausgedehnte Sequenzanalyse der putativen Domänengrenzen von Peptidsynthetasen konnte im Zuge dieser Arbeit die Definition der Domänengrenze präzisiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß im Grenzbereich zweier Domänen ein Abschnitt von 5 bis 9 Aminosäuren zu finden ist, der eine nur geringe Konservierung aufweist. Umliegende Abschnitte ließen dagegen noch den hohen Konservierungsgrad der Proteinsequenz von Domänen erkennen. Dieser Bereich geringer Konservierung wurde als Linker-Bereich bezeichnet, der – wie eine Art Scharnier – die semiautonomen katalytischen Domänen ausrichtend in eine definierte für die Funktionalität erforderliche Orientierung und räumliche Nähe bringt.

Die Primärsequenz der identifizierten Linkerregionen schien dabei keine Konservierung aufzuweisen.

Eine Zusammenstellung der putativen Linkerbereiche zwischen Peptidsynthetase-Domänen des Genus *Bacilli* findet sich in Anhang C.

In allen im folgenden beschriebenen Konstrukten wurden geeignete Restriktionsschnittstellen künstlich über PCR-Methoden in den für den Linker-Bereich kodierenden DNA-Abschnitt eingeführt. Die genaue Definition dieser Fusionsstellen in allen verwendeten Konstrukten erlaubte eine Kompatibilität untereinander auszutauschender Domänen nach Art eines Steck-Systems.

5.4 Die Bildung von Dipeptiden durch ein *In trans*-System

5.4.1 Ein hybrides TycA

Ein dimodulares System rekombinanter Peptidsynthetasen wurde mit der Charakterisierung von TycA (genauer GrsA) und dem ersten Modul von TycB1, genannt ProCAT, vorgestellt [47]. Dieses System bildete *in vitro* in Gegenwart seiner Substrate das zyklische Dipeptid D-Phe-Pro-Diketopiperazin (DKP) in signifikanten Mengen. TycA stellt ein natürliches Initiationsmodul dar, das *in vivo* die Synthese des Dekapeptids Tyrocidin startet. Durch die Konstruktion eines TycA-Hybrids ähnlicher Spezifität sollte die Fähigkeit von Elongationsmodulen zu einer Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese untersucht werden. Hierzu wurde der Genabschnitt der A-Domäne des internen Moduls *tycB2* repositionierend vor den für die T- und E-Domänen kodierenden Genabschnitt von *tycA* kloniert. Das entstandene ebenfalls Phenylalanin aktivierende TycA-Hybrid $[A_{\text{Phe}}]_{(\text{TycB2})}$ - $[\text{TE}]_{(\text{TycA})}$ (VI) sollte zusammen mit dem Protein ProCAT auf die Bildungsfähigkeit von D-Phe-Pro-DKP untersucht werden und quantitativ mit der von TycA und ProCAT verglichen werden (siehe Abb. 5.4-1).

In pTycA wurde mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide eine *Pst* I-Site in den für den Linker-Bereich von A- und T-Domäne kodierenden DNA-Abschnitt erzeugt (siehe 5.3 und Anhang C). Dies erlaubte durch Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Nco* I und *Pst* I den Austausch des für die A-Domäne kodierenden DNA-Abschnitts. Ein mit kompatiblen Schnittstellen versehenes PCR-Amplifikat der A-Domäne von *tycB2* wurde anstelle inseriert. Das entstandene Plasmid wurde als $p[A_{\text{Phe}}]_{(\text{tycB2})}$ - $[\text{TE}]_{(\text{tycA})}$ bezeichnet. Die Fusionsstelle des hybriden Proteins lag somit zwischen A- und T-Domäne.

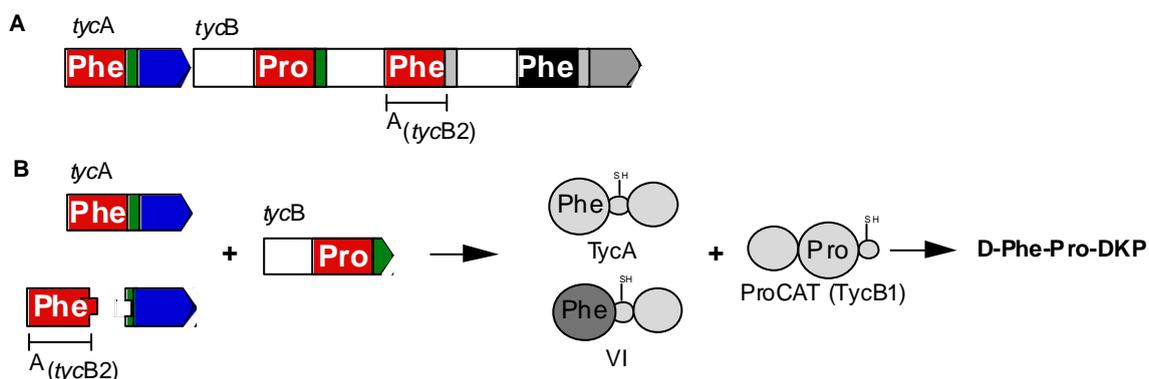


Abb. 5.4-1 Das Hybrid VI als Initiator der nichtribosomalen Peptidsynthese:

A) Schematische Darstellung der Gene *tycA* und B des Tyrocidin-Biosynthese-Operons aus *Bacillus brevis* ATCC8185. Farblich hervorgehoben *tycA* sowie die Genabschnitte CAT(*tycB1*) sowie A(*tycB2*).

B) Durch Konstruktion des Hybrids VI entsteht ein Fusionsprotein ähnlicher Spezifität wie TycA, das - zusammen mit ProCAT - auf das Bildungsvermögen des DKPs D-Phe-Pro untersucht werden kann.

5.4.2 Ein Elongationsmodul als Initiator der nichtribosomalen Peptidsynthese

Der Expressionsstamm BL21 λ (DE3)[p*gsp*] wurde mit dem rekombinanten Plasmid p[A_{Phe}]_(tycB2)-[TE]_(tycA) transformiert. Die Überproduktion und Aufreinigung des hybriden Proteins **VI** (siehe Abb. 5.4-2) erfolgte wie in 4.2.3.1-3 beschrieben.

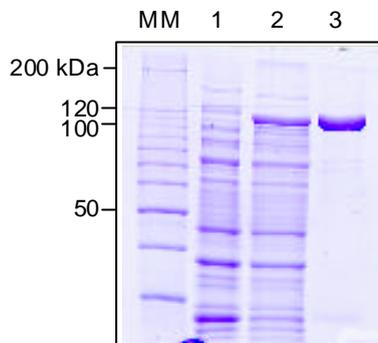


Abb. 5.4-2 Überproduktion und Reinigung des rekombinanten TycA-Hybrids VI:

Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Spuren 1 und 2, Gesamtzellextrakte vor (1) und 1,5 h nach IPTG-Induktion (2). Spur 3, über Ni²⁺-IMAC aufgereinigtes Protein.

Die Bestimmung der Aktivität der Adenylierungsreaktion mittels ATP-PP_i-Austauschreaktion (siehe 4.2.4.1) ergab eine erwartete, von der Primärstruktur des Tyrocidins abgeleitete Spezifität. So zeigte das hybride Protein **VI** höchste Austauschraten für die Aminosäure Tryptophan. Im Vergleich wurde Phenylalanin zu etwa 30% aktiviert. Eine Darstellung der relativen Austauschaktivitäten der Proteine TycA und **VI** für proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren findet sich in Abb. 5.4-3.

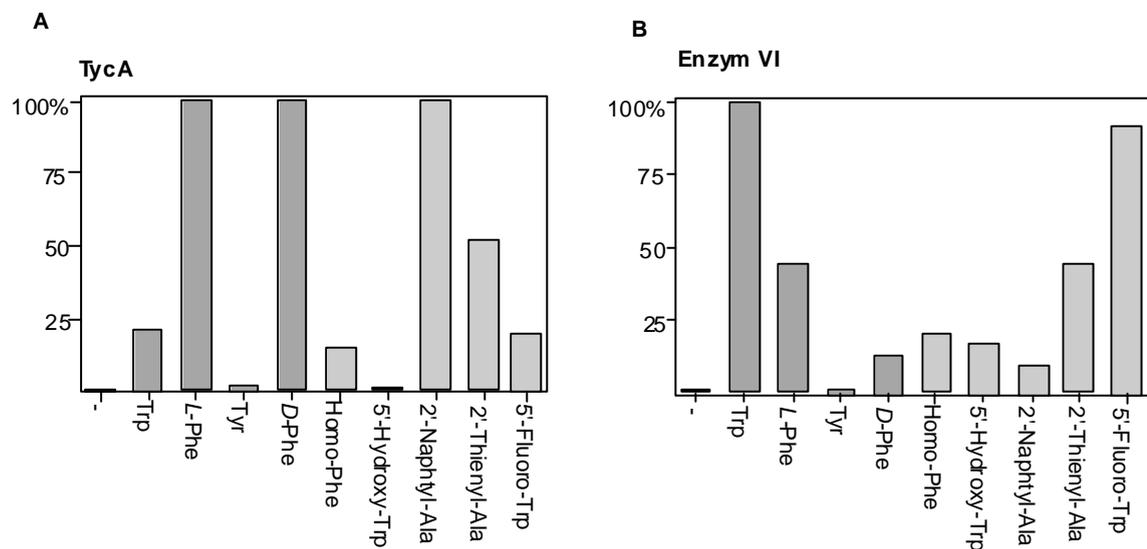
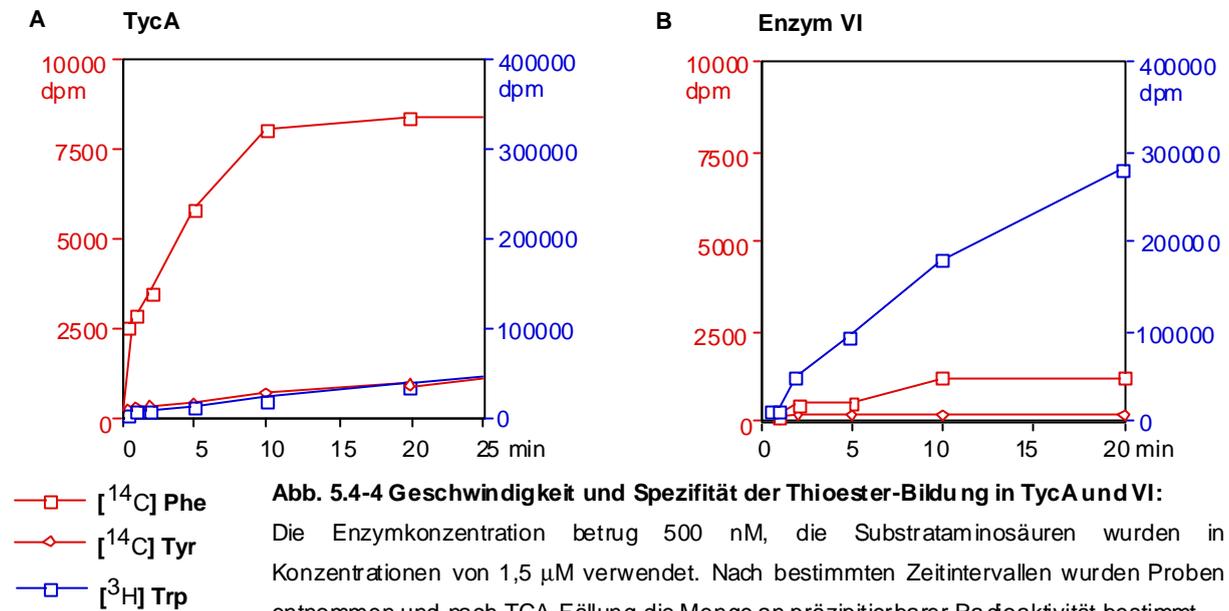


Abb. 5.4-3 Aminosäuresubstratspezifität der Proteine TycA (A) und VI (B):

Graphische Darstellung der ATP-PP_i-Austauschreaktion. Die Enzymkonzentration betrug 200 nM, Substrataminosäuren wurden in Konzentrationen von 1 mM eingesetzt. Höchste Austauschraten für Phenylalanin, beziehungsweise Tryptophan wurden als 100% definiert. 100% entsprachen in A) 170000 cpm und in B) 160000 cpm bei einer Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität von 360000 cpm.

Die Bestimmung der Fähigkeit des Enzyms, die aktivierte Substrataminosäure als Thioester zu binden, wurde wie in 4.2.4.2 beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 5.4-4 dargestellt.



Es zeigte sich, daß der Grad der Substratthiolierung in den Proteinen TycA und **VI**, das Verhältnis der Substratadenylierung widerspiegelt. So ist in TycA die Thioester-Bildung der Aminosäure Phenylalanin favorisiert, in **VI** dagegen ist Tryptophan das bevorzugte Substrat (vergleiche Abb. 5.4-4). Die Geschwindigkeit der Substratthiolierung in **VI** erfolgte allgemein langsamer als in TycA.

TycA und **VI** wurden zusammen mit ProCAT in Produktbildungsreaktionen (siehe 4.2.4.5) auf die Bildung von δ Phe-Pro-DKP und δ Trp-Pro-DKP untersucht. Zur Quantifizierung wurde die HPLC-MS-Analytik (siehe 4.2.4.7) eingesetzt. Für diese Produktbildungsreaktionen wurden je 50 pmol Enzyme mit 1 mM der Substrataminosäuren L-Phenylalanin und Prolin, beziehungsweise L-Tryptophan und Prolin sowie ATP inkubiert. Wie in Abb. 5.4-5 gezeigt, waren die Produktausbeuten mit dem hybriden Donorprotein **VI** herabgesetzt. Es wurde deutlich weniger δ Phe-Pro-DKP gebildet und auch die Ausbeute an δ Trp-Pro-DKP erreichte nicht das Niveau des Umsatzes des Systems TycA/ProCAT. Letztere Beobachtung steht konträr zu den Ergebnissen der Substratadenylierungsreaktion und der Substratthiolierung: obwohl Tryptophan für **VI** im Vergleich zu TycA ein schlechteres Substrat zu sein scheint, ist die Produktbildung δ Trp-Pro-DKP des nichthybriden Systems TycA/ProCAT noch immer schneller, als mit dem hybriden System **VI**/ProCAT.

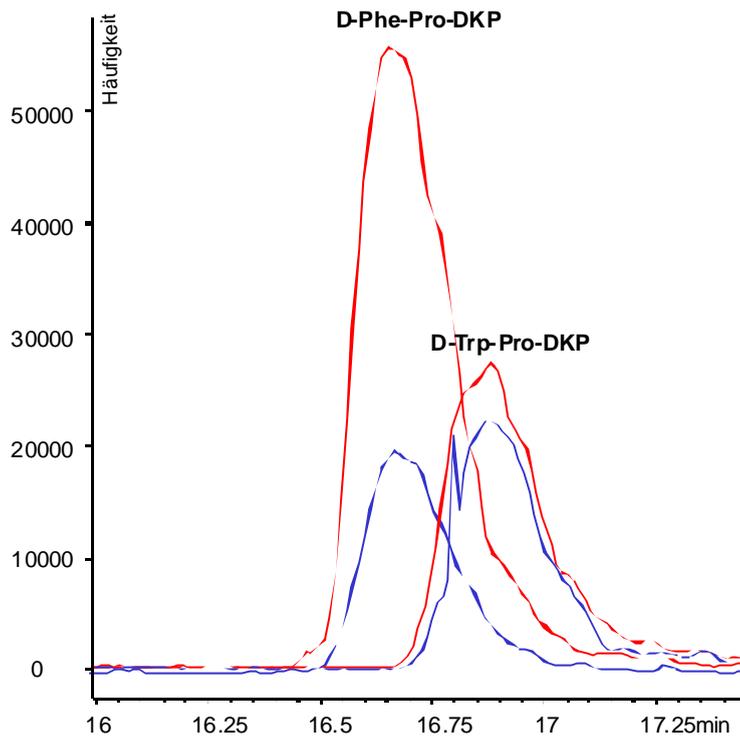


Abb. 5.4-5 Das hybride TycA-Derivat VI bildet geringere Mengen an Produkten:

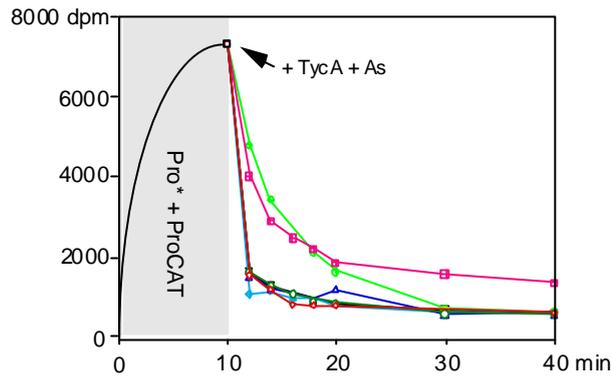
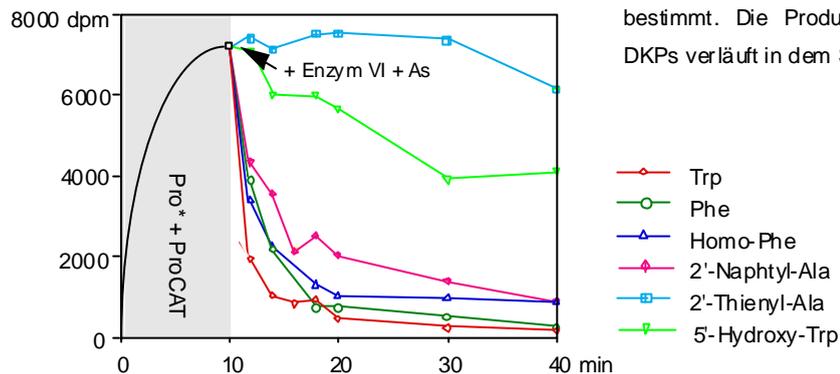
HPLC-MS Diagramme. Quantitativer Vergleich der D-Phe-Pro-DKP und D-Trp-Pro-DKP Bildung durch die Enzymsysteme TycA/ProCAT (rot) und VI/ProCAT (blau). Je 500 nM Enzyme wurden für eine Stunde bei 37°C mit ATP und Substrataminosäuren inkubiert.

Die Bestimmung der Geschwindigkeit der D-Phe-Pro-DKP-Bildung durch beide Enzymsysteme erfolgte durch eine kinetische Bestimmung der Produktmengen mittels HPLC-MS und eines quantifizierten chemischen Standards für D-Phe-Pro-DKP (siehe Tab. 5.4-1)

Tabelle 5.4-1 Kinetische Daten der D-Phe-Pro-DKP-Bildung

Enzymsystem	Substrate	Geschwindigkeit [mol x min ⁻¹]
TycA+ ProCAT	D-Phe, Pro, ATP	1 ±0,1
	L-Phe, Pro, ATP	1 ±0,1
VI+ ProCAT	D-Phe, Pro, ATP	0,2 ±0,05
	L-Phe, Pro, ATP	0,35 ±0,05

Kinetiken zur Untersuchung der Produktabspaltung (siehe 4.2.4.5) in Abhängigkeit der Art der Donoraminosäure ergaben, daß das hybride Protein VI mit ProCAT allgemein eine langsamere Produktbildungsreaktion eingeht als TycA (vergleiche Abb. 5.4.6). In den Kinetiken offenbarten sich zwischen den Proteinen VI und TycA für einige Substrataminosäuren signifikante Unterschiede.

A TycA**B Enzym VI****5.4-6 Vergleich der Geschwindigkeit einer Produktabspaltung der Systeme TycA/ProCAT (A) und VI/ProCAT (B):**

Inkorporation von radioaktiv markiertem Prolin in ProCAT in Abhängigkeit der Zugabe des mit unterschiedlichen Aminosäuren präinkubierten TycA beziehungsweise VI. Enzymkonzentrationen betragen jeweils 500 nM, nicht-markierte Aminosäuren wurden in Konzentrationen von 1 mM eingesetzt. In **A** wurden 3 μ M Pro*, in **B** nur 0,5 μ M Pro* eingesetzt. Nach 10 Minuten wurden beide Enzymlösungen vereint und die Inkorporation des markierten Prolins durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Die Produktabspaltung der relevanten Prolin-DKPs verläuft in dem System VI/ProCAT langsamer.

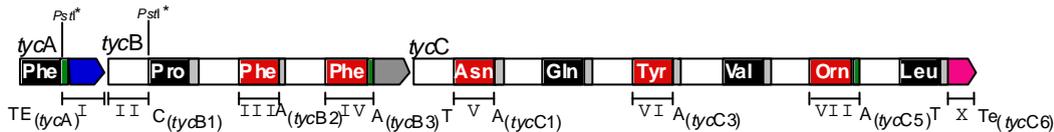
5.4.3 Andere TycA- und ProCAT-Hybride

Mit der Konstruktion des Proteins **VI** wurde ein TycA-Hybrid dargestellt, das eine ähnliche Spezifität wie das natürliche TycA besitzt. Mit ihm konnte die Funktionalität eines nativen Elongationsmoduls zur Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese unterstrichen werden. Zudem wurde der Einfluß der Einführung einer artifiziellen Hybridfusion auf Einzelschritte der nichtribosomalen Peptidsynthese sowie auf die Produktbildungsrate des Systems **VI/ProCAT** untersucht.

Die Proteine TycA und ProCAT wurden in dieser Arbeit noch weiteren Modifikationen unterzogen, die darauf abzielten, durch Domänen austausche die Spezifität sowohl des Donor- als auch des Akzeptorproteins zu verändern. Die Kombination dieser modifizierten TycA- und ProCAT-Derivate sollte *in trans* die Bildung von DKPs und Dipeptiden unterschiedlicher Zusammensetzung prozessieren. Dabei war insbesondere die Bildung eines Aspartat-aktivierenden TycA-Derivates und die eines Phenylalanin-aktivierenden ProCAT-Derivates von Interesse, da es – in Komplementation der in 5.2 beschriebenen Ergebnisse – ein potentielles nichtribosomales Enzym-Templat für das Dipeptid Δ Asp-Phe darstellen sollte.

Die Bildung von TycA-Derivaten wurde nach der gleichen Klonierungsstrategie wie die von **VI** durch Einfügung einer artifiziellen A-T-Fusion durchgeführt. ProCAT-Derivate wurden

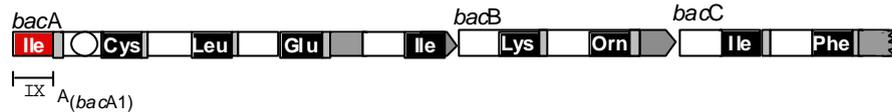
A Tyrocidin Biosyntheseoperon



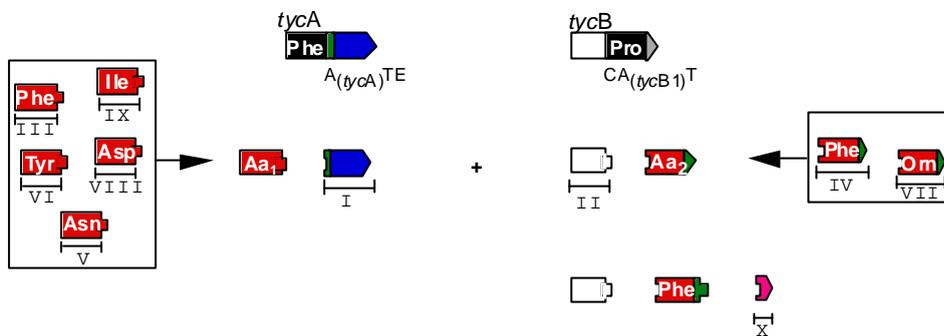
Surfactin Biosyntheseoperon



Bacitracin Biosyntheseoperon



B

Abb. 5.4-7 Ein dimodulares *in trans*-System basierend auf TycA und ProCAT:

A) Schematische Darstellung des Tyrocidin-, Surfactin- und Bacitracin Biosynthese-Operons. Mit römischen Ziffern bezeichnet und farbig hervorgehoben, die Genfragmente, die durch Fusion zur Darstellung der unter B) beschriebenen hybriden TycA und ProCAT-Gene benutzt wurden. B) Stecksystem auf der Basis von Domänenfusionen von Adenylierungs- und Thiolierungsdomänen (für TycA-Derivate: links) und auf der Basis von Domänenfusionen von Kondensations- und Adenylierungsdomänen (für ProCAT-Derivate: rechts). 5 TycA-Hybride und 2 ProCAT-Hybride unterschiedlicher Spezifität wurden dargestellt. Zudem wurde durch eine Domänenfusion zwischen Thiolierungs- und Thioesterase-Domäne ein ProCAT-Hybrid erzeugt, das die Termination eines prozessierten Dipeptides forcieren sollte. Die Kombinationen von 6 Donor- und 3 Akzeptorproteinen sollte 18 verschiedene Möglichkeiten zur Darstellung von DKPs und Dipeptiden unterschiedlicher Struktur ergeben.

durch artifizielle C-A-Fusionen erzeugt. Die genaue Beschreibung der Klonierung findet sich im Anhang B. Die funktionelle Interaktion von TycA- und ProCAT-Derivaten sollte durch den aufrechterhaltenen nativen Protein-Protein-Kontakt zwischen C-terminalen TycA-Domänen und N-terminaler ProCAT-Domäne gewährleistet werden. Eine schematische Darstellung der auf diese Weise konstruierten TycA- und ProCAT-Derivate findet sich in Abb. 5.4-7.

Produktbildungsreaktionen der Kombinationen von konstruierten TycA- und ProCAT-Hybriden ergab in keinem Fall eine signifikante Bildung von Produkten, die im Einklang mit der Domänenstruktur und Spezifität beider Proteine standen. Die Thioesterase-Fusion in dem ProCAT-Derivat $[A_{Asp}]_{(BacC3)}-[TCA_{Phe}]_{(TycB2)}-[TTe]_{(TycC6)}$ (XII) hatte keinen Effekt auf diese Beobachtung. Über Faktoren, die eine Bildung von Produkten durch ein dimodulares *in trans*-System bedingen, wird in Kapitel 6 diskutiert.

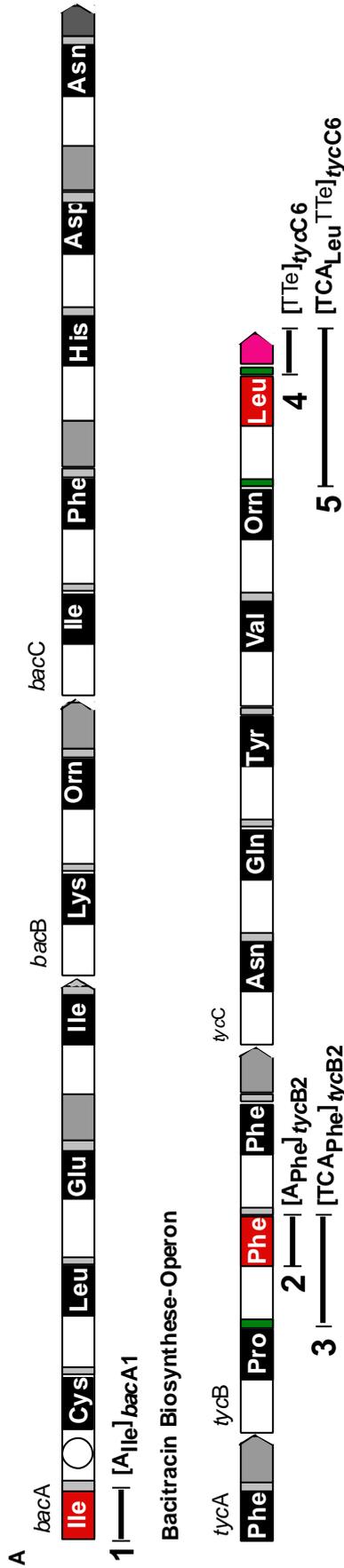
5.5 Die Bildung von Dipeptiden durch ein *In cis*-System

5.5.1 Strategie

Die in Kapitel 5.2 beschriebene Darstellung eines Asp-Phe-Dipeptids stellte das erste Beispiel einer gezielten *de novo*-Synthese eines Dipeptids definierter Struktur an einer für diesen Zweck konstruierten hybriden Peptidsynthetase dar. In Kapitel 5.4 konnte demonstriert werden, daß ein natürliches Elongationsmodul durch eine Repositionierung in ein Initiationsmodul konvertiert werden kann. Es wurden nun andere dimodulare Peptidsynthetasen konstruiert, die eine systematische Beantwortung folgender Fragen erbringen sollte: Welche Faktoren müssen an ein hybrides Enzym-Templat und an sein von ihm prozessiertes Dipeptid gestellt werden, damit eine Termination des Dipeptids katalysiert wird? Welche Faktoren beeinträchtigen die Elongationsreaktion, die von der C-Domäne katalysiert wird?

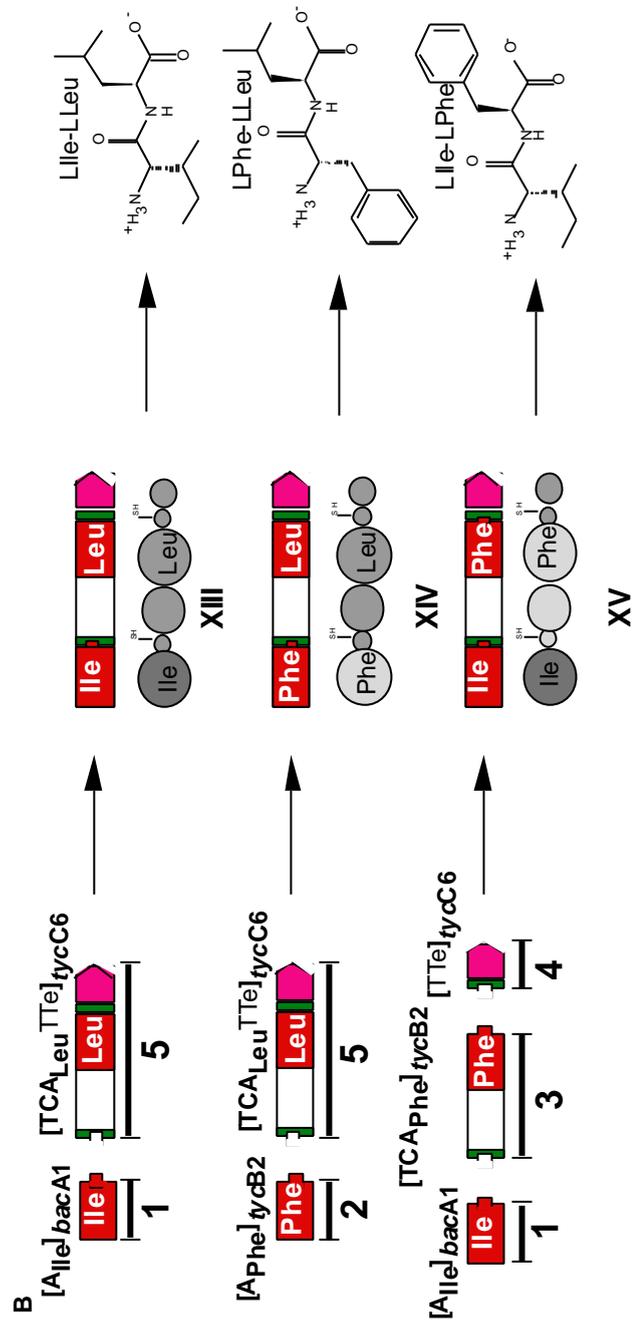
Inzwischen war durch induzierte Fehlbeladungen gezeigt worden, daß die C-Domäne von TycB1 eine größere Toleranz bezüglich nicht-kognater Donoraminosäuren als zu nicht-kognaten Akzeptoraminosäuren trägt [95]. Die in Kapitel 5.2 beschriebenen dimodularen Asp-Phe-Template verwendeten mit der C-Domäne von SrfB3 aber die natürliche C-Domäne des Donormoduls. Es wurde deshalb ein neues System von dimodularen Peptidsynthetasen konstruiert, das (a) C-Domänen der Akzeptormodule verwendete, (b) auf dem Stecksystem zur Herstellung von AT-Domänenfusionen wie bereits unter 5.4 beschrieben aufbaute und das (c) eine Beantwortung der Frage zur Funktionalität der Te-Domäne bezüglich der Abspaltung artifizierender Peptide erbringen sollte. Zu diesem Zweck wurden Enzym-Template mit anderer Spezifität als die von Asp-Phe konstruiert.

Die Funktionalität der Abspaltung artifizierender Peptide durch die Te-Domäne war mit den bisherigen Konstrukten nicht eindeutig belegt. Die Abspaltung eines artifizierenden Asp-Phe-Dipeptids von einem bietet einer Te-Domäne ein im ersten *und* zweiten Modul verändertes Substrat-Peptid an. Zudem spalten die bisher verwendeten Te-Domänen der Tyrocidin- und Surfactinsynthetasen im natürlichen Zusammenhang längere Peptide vom Enzym-Templat ab. Um die Akzeptanz der Thioesterase bezüglich des von ihr zu spaltenden Peptids zu untersuchen, wurde die Konstruktion von hybriden dimodularen Peptidsynthetasen in Angriff genommen, deren Spezifität anfangs nur in Donorposition verändert waren, die also das natürliche C-terminale, die Te-Domäne enthaltende Modul aufwiesen (siehe Abb. 5.5.1). In diesen dimodularen Konstrukten wurde zwischen A- und T-Domäne des ersten Moduls eine Domänenfusion in den Linker-Bereich eingeführt, die nach den gleichen Kriterien definiert wurde, wie unter 5.3 und 5.4 beschrieben (siehe dazu auch Anhang C).



5.5-1 Stecksystem zur Konstruktion dimodularer Peptidsynthetasen:

A) Schematische Darstellung der Bacitracin- und Tyrocidin Biosynthese-Operons. Mit Ziffern bezeichnet, die Genfragmente, die durch Fusion zur Konstruktion der unter B) beschriebenen hybriden Peptidsynthetase-Gene benutzt wurden. B) Stecksystem auf der Basis der Domänenfusion von Adenylierungs- und Thiolierungsdomänen. Links: Fusion der unter A) beschriebenen Genfragmente, Mitte: Fusionsgene und deren zugehörige hybriden dimodularen Peptidsynthetasen, Rechts: Dipeptide, die abgeleitet von der Spezifität der konstruierten Peptidsynthetasen, erwartet wurden.



5.5.2 Fusion von Adenylierungs- und Thiolierungsdomänen: ein neues Stecksystem

Das Plasmid $[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TE]_{(TycA)}$ (siehe Anhang B und Diskussion) wurde benutzt, um mittels den Restriktionsendonucleasen *Pst* I und *Bam*H I, den DNA-Abschnitt korrespondierend zu *tycA* zu entfernen und an dessen Stelle ein Fragment der Domänenorganisation TCATTe zu insertieren. Letzteres Fragment wurde aus dem 3'-Bereich von *tycC* amplifiziert. Das resultierende Plasmid wurde als $p[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TCA_{Leu}TTe]_{(TycC6)}$ bezeichnet. Abgeleitet von der Spezifität der beiden Module sollte die korrespondierende dimodulare Peptidsynthetase die Bildung eines Dipeptides Ile-Leu dirigieren (vergleiche Abb. 5.5.1).

In analoger Form wurde das Plasmid $p[A_{Phe}]_{(TycB2)}-[TE]_{(TycA)}$ verwendet, um das Plasmid $p[A_{Phe}]_{(TycB2)}-[TCA_{Leu}TTe]_{(TycC6)}$ zu erzeugen. Abgeleitet von der Spezifität der beiden Module sollte diese korrespondierende dimodulare Peptidsynthetase die Bildung eines Dipeptides Phe-Leu dirigieren (vergleiche Abb. 5.5.1).

Das Plasmid $p[A_{Phe}]_{(TycB2)}-[TCA_{Leu}TTe]_{(TycC6)}$ wurde anschließend weiter modifiziert, um die Spezifität des Akzeptor-Moduls zu verändern. Um einen AT-Domänenaustausch auch in diesem zweiten Modul zu erzielen, wurde mittels inverser PCR eine *Hpa* I-Restriktionsendonuklease-Schnittstelle in den Linker-Bereich der A- und T-Domäne kodierenden Abschnitt des zweiten Moduls eingeführt. Nach Religation erhielt man das Plasmid $p[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TTe]_{(TycC6)}$. Ein mit den terminalen Restriktionsschnittstellen *Pst* I und *Hpa* I versehenes PCR-Fragment aus *tycB2* mit der Domänenorganisation TCA wurde amplifiziert und in $p[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TTe]_{(TycC6)}$ insertiert. Das resultierende Plasmid wurde als $p[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TCA_{Phe}]_{(TycB2)}-[TTe]_{(TycC6)}$ bezeichnet. Das hybride Gen kodiert für eine dimodulare Peptidsynthetase der voraussichtlichen Spezifität Ile-Phe (vergleiche Abb. 5.5.1).

Eine genaue Beschreibung der Klonierungsstrategie findet sich im Anhang B.

5.5.3 Überproduktion und Reinigung der rekombinanten Proteine

Der *E. coli* Stamm BL21 λ DE3[*pgsp*] wurde mit den rekombinanten Plasmiden $p[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TCA_{Leu}TTe]_{(TycC6)}$, $p[A_{Phe}]_{(TycB2)}-[TCA_{Leu}TTe]_{(TycC6)}$ und $p[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TCA_{Phe}]_{(TycB2)}-[TTe]_{(TycC6)}$ transformiert. Nach Expression wurden die rekombinanten Proteine wie bereits beschrieben überproduziert, aufgereinigt und auf die Aktivität von Einzelaktivitäten wie Adenylierungs- und Thiolierungsreaktion hin untersucht. In Abb. 5.5-2 sind die Expressionen der Konstrukte sowie die gereinigten Proteine $[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TCA_{Leu}TTe]_{(TycC6)}$ (**XIII**), $[A_{Phe}]_{(TycB2)}-[TCA_{Leu}TTe]_{(TycC6)}$ (**XIV**) und $[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TCA_{Phe}]_{(TycB2)}-[TTe]_{(TycC6)}$ (**XV**) dargestellt.

Die Konstruktion des hybriden Enzyms **XV** stellt eine allgemeine Möglichkeit zur Darstellung von Templaten für die Prozessierung von Dipeptiden A-B dar, die durch Kombination zweier Peptidsynthetase-Module der Spezifität A und B erzeugt wurden.

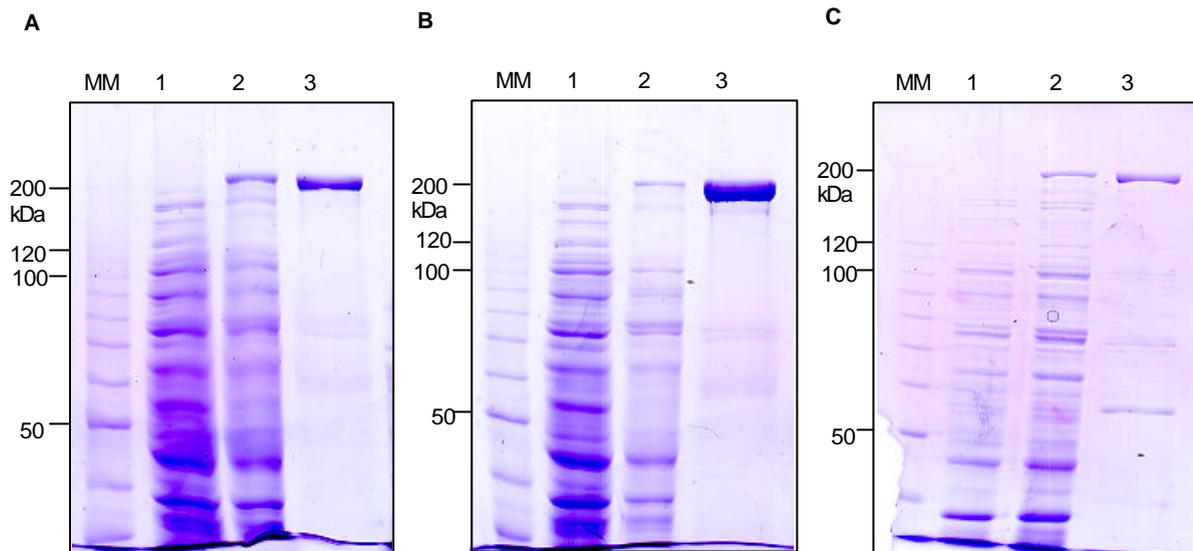


Abb. 5.5-2 SDS-Polyacrylamidgele der in *E. coli* überproduzierten dimodularen Hybridpeptidsynthetasen:

A) XIII, **B)** XIV, **C)** XV. Spuren 1 bis 3 jeweils Gesamtzellextrakt vor Induktion (1) und 1,5 h nach IPTG-Induktion (2), über Ni²⁺-IMAC aufgereinigtes Protein (3). MM: 10kDa-Proteinleiter. Coomassie-Blau gefärbte Gele.

5.5.4 Die Adenylierungsreaktion

In der ATP-PP_i-Austauschreaktion (siehe 4.2.4.1) wiesen alle rekombinanten Proteine eine spezifische Aktivierung der erwarteten Substrataminosäuren auf. Eine graphische Darstellung findet sich in Abb. 5.5-3.

Das Aktivitätsmuster der dimodularen Peptidsynthetasen spiegelte dabei die Summe der Aktivitäten der einzelnen Module wider. Für die Proteine **XIV** und **XV** konnte gezeigt werden, daß neben den Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan auch nicht-proteinogene Aminosäuren wie 2'-Thienyl-Alanin, 2'-Naphtyl-Alanin, Homo-Phenylalanin sowie 5'-substituierte Tryptophan-Analoga aktiviert werden. Auffällig war hierbei die Beobachtung, daß sich die beiden Proteine deutlich in der Aktivierung einiger nicht-proteinogener Aminosäuren unterschieden, obwohl diese Aktivierung sich in beiden Konstrukten auf die Verwendung desselben Moduls TycB2 zurückführen läßt. Für das Protein **XV** konnte gezeigt werden, daß für nicht-proteinogene Aminosäuren wie Homo-Phenylalanin, substituierte Tryptophan-Analoga, 2'-Naphtyl-Alanin und 2'-Thienyl-Alanin eine Aktivierung stattfand. Auch das Protein **XIV** zeigte eine Aktivierung von 2'-Thienyl-Alanin, die hier stärker als die für Tryptophan war. Andere nicht-proteinogene Aminosäuren wurden dagegen nur relativ schwach aktiviert. Die Absolutwerte der ATP-PP_i-Austauschreaktion ließen für das Protein

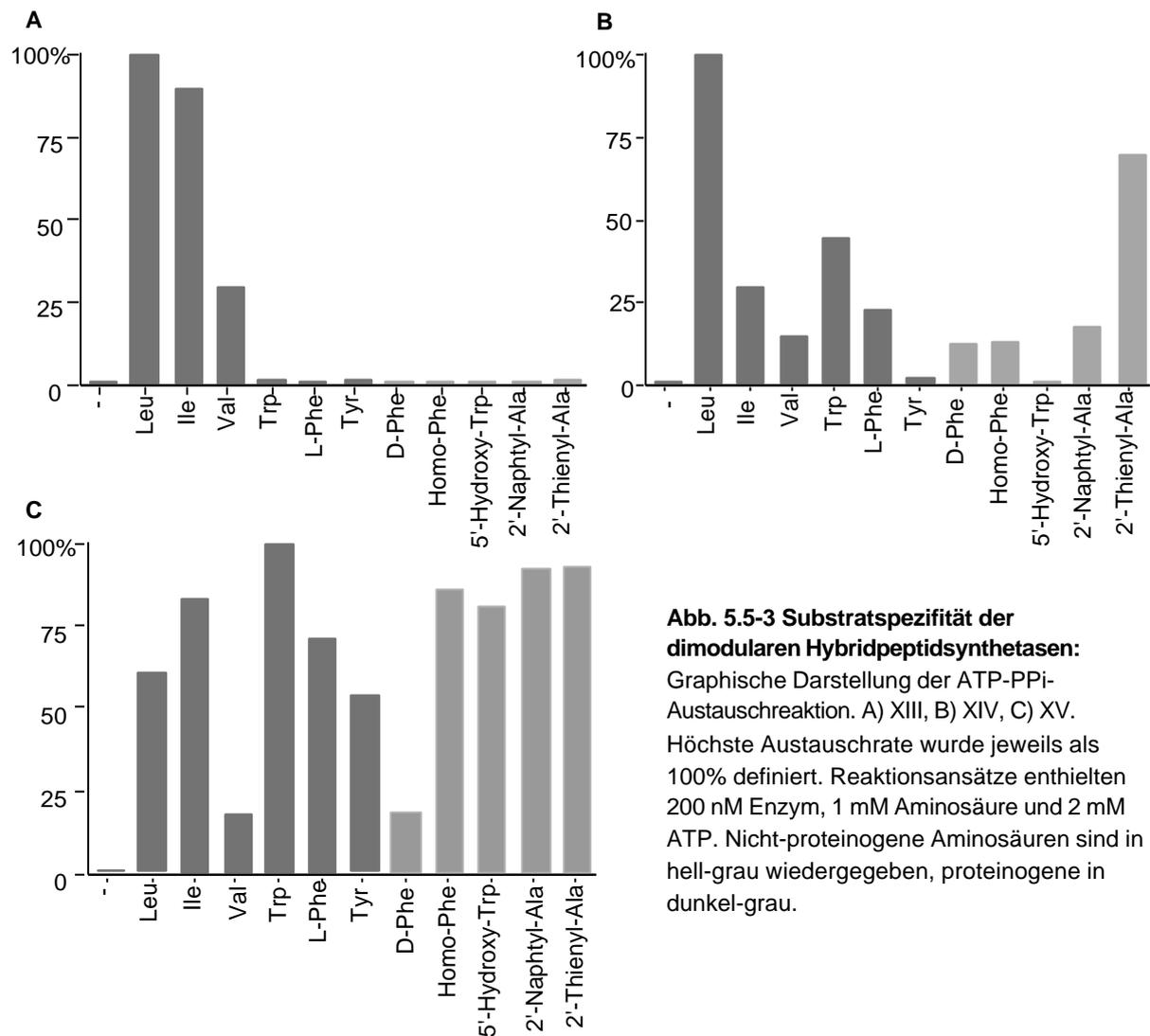


Abb. 5.5-3 Substratspezifität der dimodularen Hybridpeptidsynthetasen: Graphische Darstellung der ATP-PPi-Austauschreaktion. A) XIII, B) XIV, C) XV. Höchste Austauschrate wurde jeweils als 100% definiert. Reaktionsansätze enthielten 200 nM Enzym, 1 mM Aminosäure und 2 mM ATP. Nicht-proteinogene Aminosäuren sind in hell-grau wiedergegeben, proteinogene in dunkel-grau.

XIV zudem eine Beeinträchtigung der Umsatzgeschwindigkeit von Phenylalanin und Tryptophan vermuten. Um dieser Beobachtung näher auf den Grund zu gehen, wurden exemplarisch die kinetischen Konstanten der Proteine **XIV** und **XV** für die Substrataminosäuren Tryptophan, Homo-Phenylalanin und 2'-Thienyl-Alanin bestimmt (siehe Tab. 5.5-1).

Die K_m -Werte bestätigten, daß die Affinitäten des Proteins **XV** für die Aminosäuresubstrate Tryptophan und HomoPhenylalanin höher waren als diejenigen des Proteins **XIV**. Auch der k_{cat}/K_m -Wert der beiden Aminosäuren war größer. Dagegen waren die kinetischen Werte für die Substrataminosäure 2'-Thienylalanin für beide Proteine nahezu gleich. Sie belegen, daß die kinetischen Konstanten der A-Domäne von TycB2 offensichtlich durch die Art der Domänenorganisation, in der sie in den Proteinen **XIV** und **XV** vorliegt, beeinflusst wurden. Das widerspricht der Hypothese der vollständigen Autonomie von Peptidsynthetase-Domänen. Die genaue katalytische Aktivität scheint vielmehr auch eine Funktion der Konfiguration mit Nachbardomänen zu sein [131].

Tab. 5.5-1 Kinetische Konstanten der Substratadenylierung durch $A_{[TycB2]}$

Enzym				
XIV	Substrataminosäure	K_m [mM]	k_{cat}/K_m [mM ⁻¹ x sec ⁻¹]	
	Tryptophan	0,04	$7,2 \times 10^7$	
	 Homo-Phenylalanin	0,4	$3,9 \times 10^6$	
	2'-Thienyl-Alanin	0,8	$4,5 \times 10^7$	
Enzym				
XV	Substrataminosäure	K_m [mM]	k_{cat}/K_m [mM ⁻¹ x sec ⁻¹]	
	Tryptophan	<0,01	$>10^8$	
	 Homo-Phenylalanin	0,01	$6,9 \times 10^8$	
	2'-Thienyl-Alanin	1,2	$1,4 \times 10^7$	

5.5.5 Die Substratthiolierung

Die Fähigkeit der Hybridenzyme, die Substrataminosäuren als Thioester zu binden, wurde wie bereits in 4.2.4.2 beschrieben untersucht. Die Kinetik der Thioesterbildung der in diesem Kapitel behandelten Proteine ist in Abb. 5.5-4 dargestellt.

In dieser Darstellung wurde versucht, abgeleitet von der in der ATP-PP_i-Austauschreaktion bestimmten Substratspezifität der Module, die Beladung auf das erste *oder* das zweite Modul zurückzuführen. Für die Substratthiolierung der Aminosäuren Isoleucin und Leucin in das Protein **XIII** wurde, wegen des ähnlichen Aktivitätsmusters beider Module, diese Darstellung nicht verwendet. Prinzipiell konnte gezeigt werden, daß eine heterologe Substratbeladung (das heißt, die Übertragung einer aktivierten Aminosäure von einer A-Domäne auf die nachfolgende T-Domäne über die Fusionsstelle hinweg) möglich ist. So konnte mit den Proteinen **XIII** und **XIV** bewiesen werden, daß Substrataminosäuren des ersten Moduls (Isoleucin, beziehungsweise Tryptophan) auf die heterologe T-Domäne von TycC5 beladen werden können. Diese T-Domäne bindet im natürlichen Zusammenhang die Aminosäure Ornithin. Ebenso konnte für das Protein **XV** gezeigt werden, daß Donoraminosäuren wie Isoleucin und Akzeptoraminosäuren wie Phenylalanin auf heterologe T-Domänen übertragen werden können. Durch kinetische Messungen konnten Aussagen über die Geschwindigkeit der Substratthiolierung gemacht werden. Substratthiolierungen an T-Domänen der drei hier besprochenen Proteine spiegeln grundsätzlich das Verhältnis der Substratadenylierung wider: so werden Substrataminosäuren, die im ATP-PP_i-Austausch nur schwach aktiviert werden auch nur langsam und in niedrigem Maße thioliert. Eine Ausnahme stellt die im Vergleich zu Tryptophan langsamere Substratthiolierung von Phenylalanin in das Protein **XIV** dar. Eine detaillierte Betrachtung dieser Ergebnisse findet sich in der Diskussion.

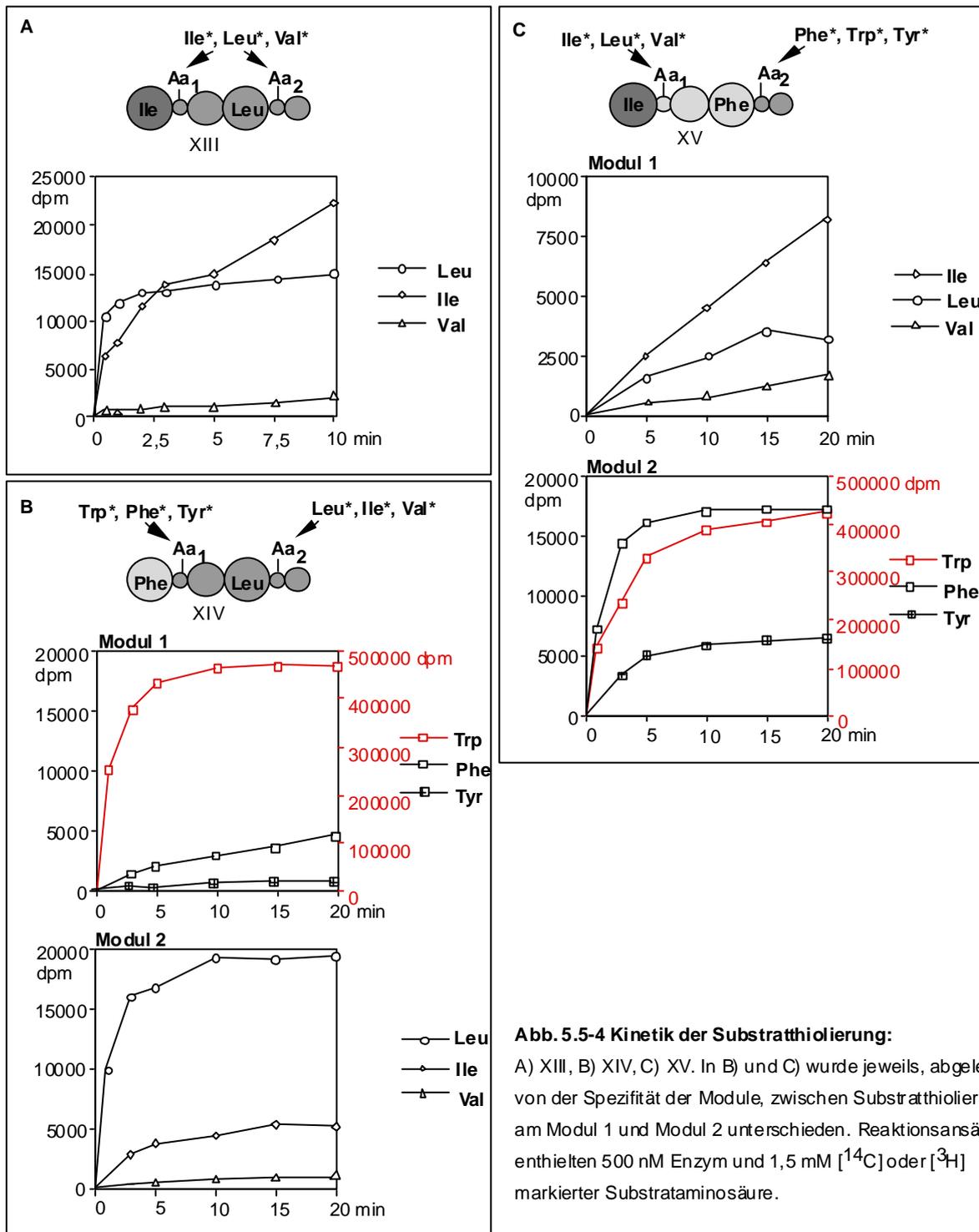


Abb. 5.5-4 Kinetik der Substratthiolierung:
 A) XIII, B) XIV, C) XV. In B) und C) wurde jeweils, abgeleitet von der Spezifität der Module, zwischen Substratthiolierung am Modul 1 und Modul 2 unterschieden. Reaktionsansätze enthielten 500 nM Enzym und 1,5 mM [¹⁴C] oder [³H] markierter Substrataminosäure.

5.5.6 Produktbildung

Schließlich wurden die Proteine bezüglich der Bildung einer Dipeptid, abgeleitet von der Anordnung und Spezifität ihrer Module, untersucht. Dazu wurden die Proteine mit ATP, einer Substrataminosäure des ersten Moduls sowie einer Substrataminosäure des zweiten Moduls, wie unter 4.2.4.7 beschrieben, inkubiert. Die Ergebnisse dieser Produktbildungsreaktionen werden nachfolgend für jedes der in diesem Kapitel behandelten Proteine einzeln beschrieben. Es wurde sich anfangs dünnschichtchromatographischer

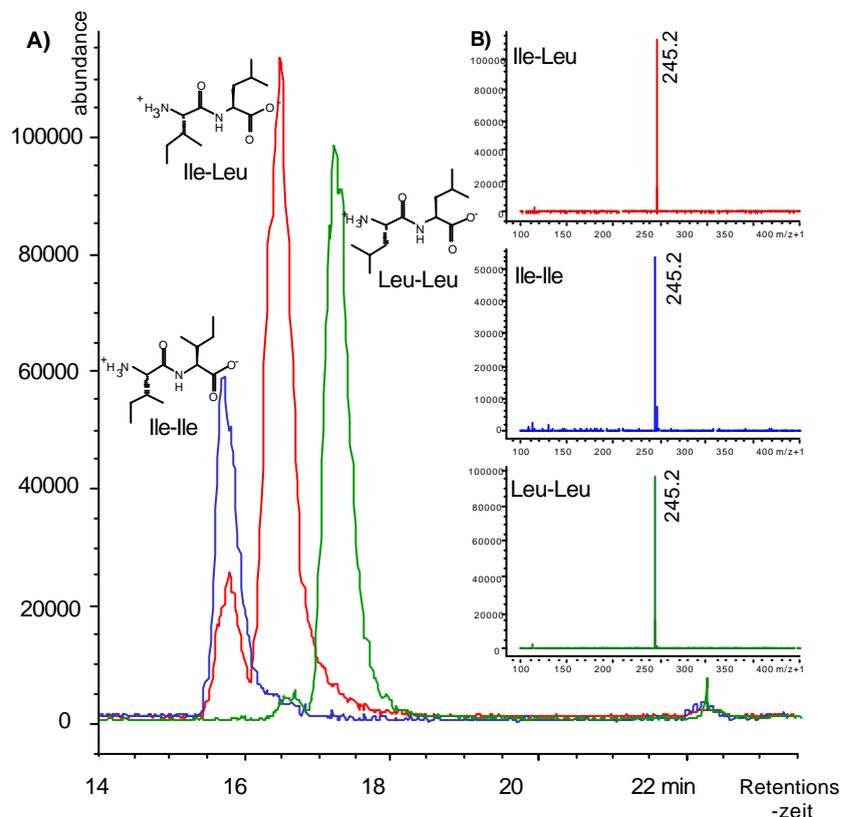
Methoden mit radioaktiv markierten Aminosäuren bedient (siehe 4.2.4.6), später wurden Reaktionsprodukte mit Hilfe der HPLC- und HPLC-MS-Analytik identifiziert. Dabei wurden relevante Produkte der Reaktionen mit chemischen Standards verglichen. Produktbildung setzte in allen beschriebenen Versuchen, die Anwesenheit von Enzym, ATP und den entsprechenden Substrataminosäuren voraus. Die Dipeptidbildungsrate zeigte ca. 2 h einen linearen Verlauf, bevor die Stabilität des Enzyms abnahm. Auch Kinetiken zur Produktabspaltung (siehe 4.2.4.5) gaben Aufschluß über die Geschwindigkeit und Spezifität der Produktbildung.

5.5.6.1 Das Protein [A_{Ile}]_(BacA1)-[TCA_{Leu} TTe]_(TycC6) (XIII)

In der Gegenwart der Substrataminosäuren Isoleucin und Leucin wurde die Bildung der Dipeptide Ile-Leu und Ile-Ile beobachtet (siehe Abb. 5.5-5). Mit Hilfe der HPLC-MS-Analyse konnte das Verhältnis dieser beiden Produkte auf etwa 5:1 bestimmt werden. Die Bildung der Dipeptide Leu-Leu oder Leu-Ile wurde nicht beobachtet. Wurde nur die Substrataminosäure Isoleucin verwendet, so führte das zu einer etwa dreifach verstärkten Produktion des Dipeptids Ile-Ile. Wurde nur die Substrataminosäure Leucin verwendet, so konnte auch das Produkt Leu-Leu nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise waren die Mengen an Leu-Leu,

Abb. 5.5-5 Dipeptidbildung durch die hybride Peptidsynthetase XIII:

Reversed-phase HPLC-MS-Analytik der Produkte. A) HPLC-MS-Diagramme. In Gegenwart beider Substrataminosäuren Isoleucin und Leucin werden die Dipeptide Ile-Leu und Ile-Ile gebildet (rot). Das Dipeptid Ile-Ile wird vermehrt gebildet, wenn kein Leucin in dem Reaktionsansatz zugegen war (blau). Fehlt Isoleucin, so wird auch das Dipeptid Leu-Leu gebildet (grün). B) Massenspektren der identifizierten Produkte Ile-Leu, Ile-Ile und Leu-Leu.



die gebildet wurden dabei mit der gebildeten Menge an Ile-Leu, in Ansätzen, die beide Substrataminosäuren enthielten, gleichzusetzen. Die Masse $m/z+1$ aller drei hier nachgewiesenen Produkte konnte mit 245.2 bestimmt werden, was der berechneten $m/z+1$ -Masse von Ile-Ile, Ile-Leu, beziehungsweise Leu-Leu entspricht. Ein Vergleich der gebildeten Dipeptidmengen mit quantifizierten chemischen Standards ergab Bildungsraten für Ile-Leu und Leu-Leu von ca. $0,3 \text{ min}^{-1}$ und für Ile-Ile von ca. $0,1 \text{ min}^{-1}$. Eine Zusammenfassung der gebildeten Dipeptide findet sich in Tabelle 5.5-2.

5.5.6.2 Das Protein [A_{Phe}]_(TycB2)-[TCA_{Leu} TTe]_(TycC6) (XIV)

Für das Enzym XIV konnte gezeigt werden, daß, wenn es mit relevanten Substrataminosäuren inkubiert wird, es die Dipeptide Trp-Leu, Phe-Leu und Trp-Ile produzierte (siehe Abb.5.5-6). Das Produkt Phe-Ile konnte nicht nachgewiesen werden. Trp-

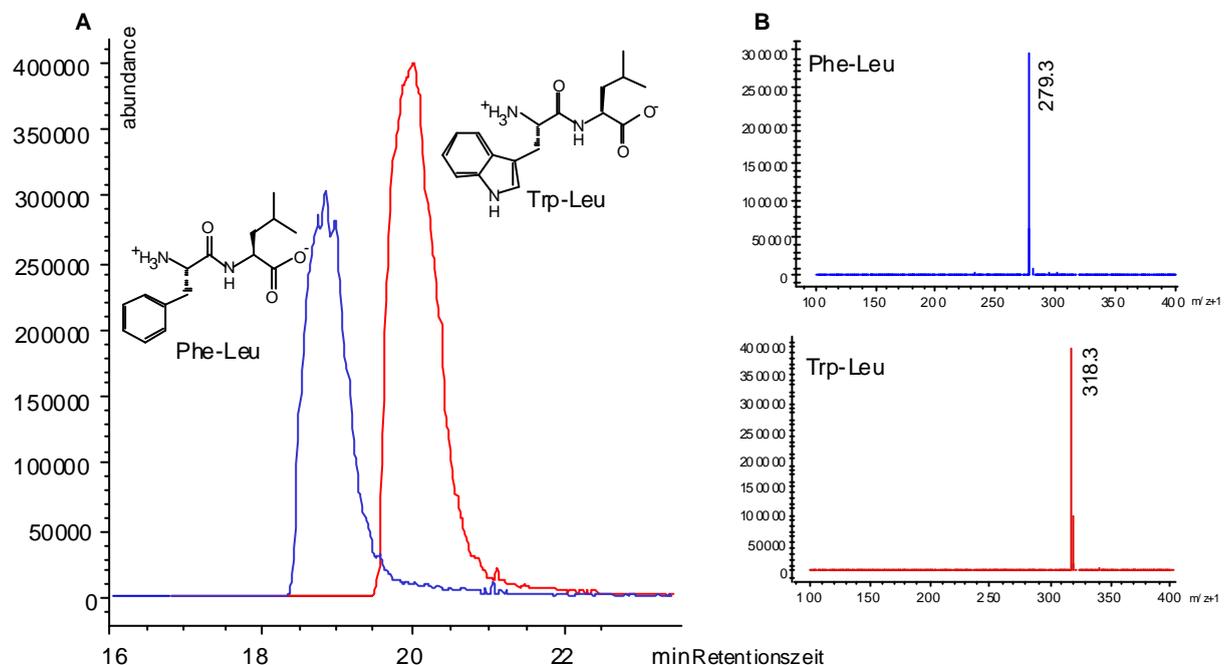


Abb. 5.5-6 Dipeptidbildung durch die hybride Peptidsynthetase XIV:

Reversed-phase HPLC-MS-Analyse der Produkte. A) HPLC-MS-Diagramme. Bildung der Dipeptide Trp-Leu (rot) und Phe-Leu (blau). B) Massenspektren der identifizierten Produkte Trp-Leu, Phe-Leu.

Leu stellte das aufgrund der Substratspezifität der Module erwartete Dipeptid dar und wurde

mit der höchsten Rate von $2,1 \text{ min}^{-1}$ produziert wurde. Austausch der Donoraminosäure von Tryptophan gegen Phenylalanin reduzierte die Bildungsgeschwindigkeit auf $0,9 \text{ min}^{-1}$ (für Phe-Leu, siehe Tabelle 5.5-2) während die Substitution der Akzeptoraminosäure Leucin nach Isoleucin die Bildungsgeschwindigkeit von Trp-Ile auf $0,1 \text{ min}^{-1}$ herabsetzte. Die Inkubation mit Tryptophan und Isoleucin führte zudem zur Bildung kleinerer Mengen der Dipeptide Trp-Trp, Ile-Trp und Ile-Ile. Diese Produkte waren wahrscheinlich das Ergebnis

einer nur semi-katalytischen Reaktion, bei der die Kondensation nicht-enzymatisch erfolgte (siehe Diskussion). Eine ebensolche Beobachtung ließ sich bei der Produktanalyse des mit Phenylalanin und Isoleucin inkubierten Enzyms machen: anstelle des am Protein-Templat prozessierten Dipeptids Phe-Ile war Ile-Ile das einzige Dipeptid, das nachgewiesen werden konnte.

Für die A-Domäne von TycB2 wurde schon in Kapitel 5.4 gezeigt, daß es einige nicht-proteinogene Substrat-Analoga aktivierte. Auch diese wurden in Produktbildungsreaktionen eingesetzt und nachfolgend auf entstandene Dipeptide analysiert. Die Dipeptide 2'-Naphtyl-Ala-Leu, 2'-Thienyl-Ala-Leu, Homo-Phe-Leu und 5'-Hydroxy-Trp-Leu konnten sowohl über radioaktive Dünnschichtchromatographie als auch über HPLC-MS-Analyse nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.5-7). Nähere Analysen zur Bildungsgeschwindigkeit dieser Dipeptide wurden aber nicht durchgeführt. Die Aminosäure Δ Phe ist kein Substrat für die Dipeptidbildung. Es konnte kein korrespondierendes Dipeptid Δ Phe-Leu nachgewiesen werden.

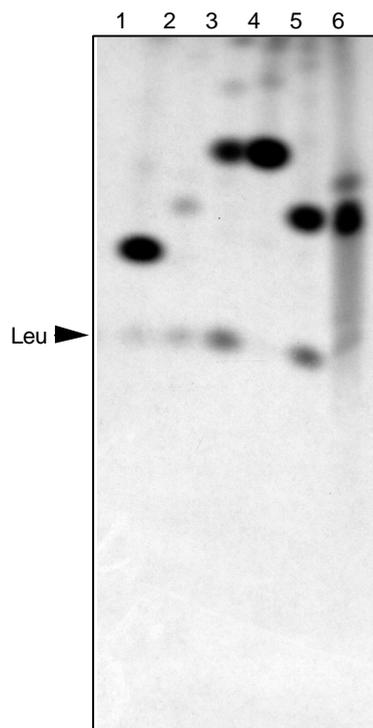


Abb. 5.5-7 Dipeptide nichtproteinogener Aminosäuren des Enzyms XIV:

Autoradiographie der DC-Analyse nach der Extraktion der Reaktionsansätze mit n-Butanol in der organischen Phase erhaltenen Produkte. Der Pfeil markiert das Laufverhalten der freien Aminosäure Leucin. Reaktionsansätze enthielten 500 nM Enzym, 2 mM ATP, 1 mM nichtproteinogene Aminosäure und 1500 nM ^{14}C -markiertes Leucin. Die Ansätze wurden für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Die DC zeigt die Bildung von Dipeptiden der Art X-Leu.

X=

Spur 1: 5'-Hydroxy-Tryptophan

Spur 2: Aspartat (Negativ-Kontrolle)

Spur 3: Homo-Phenylalanin

Spur 4: 2'-Naphtyl-Alanin

Spur 5: 2'-Thienyl-Alanin

Spur 6: 5'-Fluoro-Tryptophan

Der schwache Produktpot in Spur 2 korrespondiert wahrscheinlich zu Leu-Leu.

Anhaltspunkte über die Faktoren, die eine schnelle Dipeptidbildung an dem Enzym-Templat **XIV** ermöglichten, gab eine Produktabspaltungskinetik (siehe 4.2.4.5). Hierbei (siehe Abb. 5.5-8) induzierten Tryptophan und nicht-proteinogene Aminosäuren, die Tryptophan

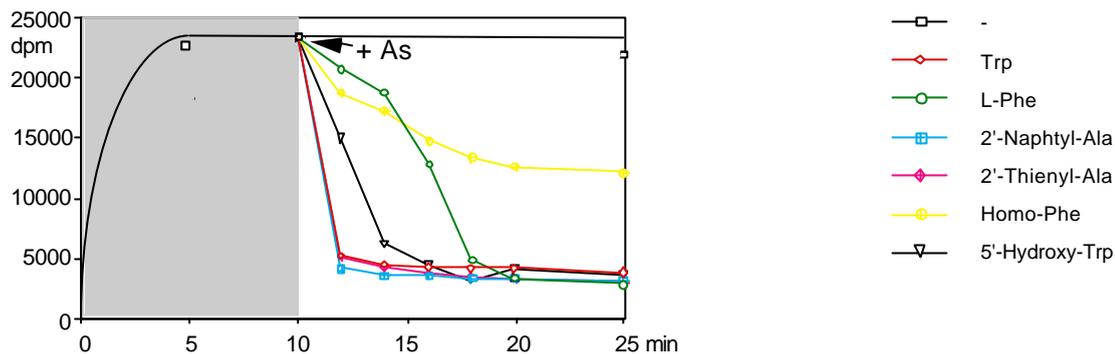


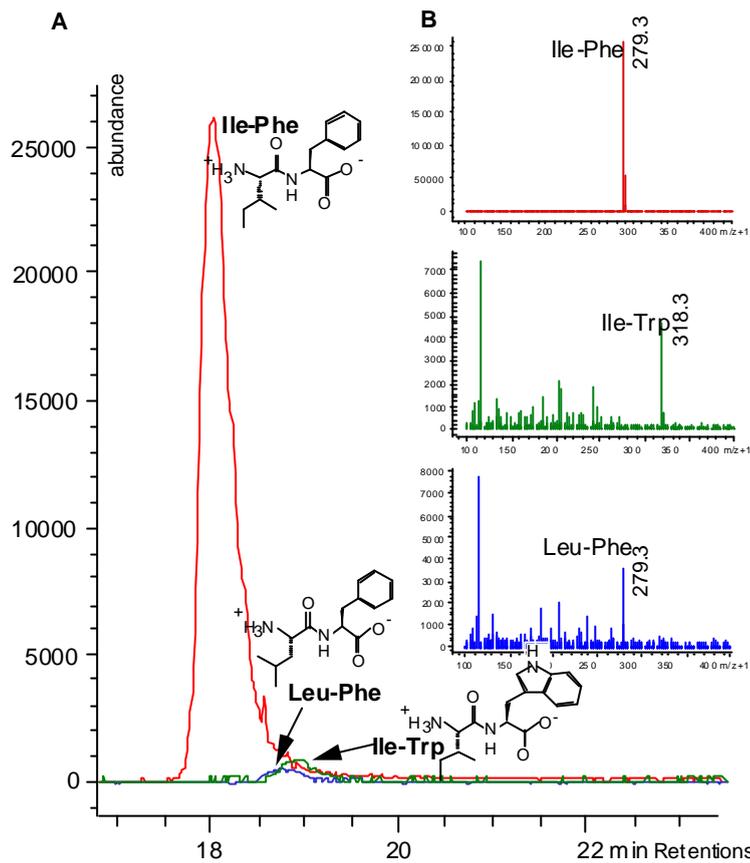
Abb. 5.5-8 Produktabspaltungskinetik des Enzyms XIV:

500 nM Enzym XIV wurden für 10 min mit 1,5 mM [^{14}C] markiertem Leucin als Akzeptoraminosäure präinkubiert. Die Zugabe von 0,5 mM verschiedener Donoraminosäuren induzierte eine Dipeptidbildung der Art X-Leu, die zum Sinken der Leucin-Inkorporation führt. Nach TCA-Fällung wurde die Menge an präzipitierbarer Radioaktivität vermessen. Bis zur Minute 10 wurde die Kurve in einer idealisierten Form wiedergegeben.

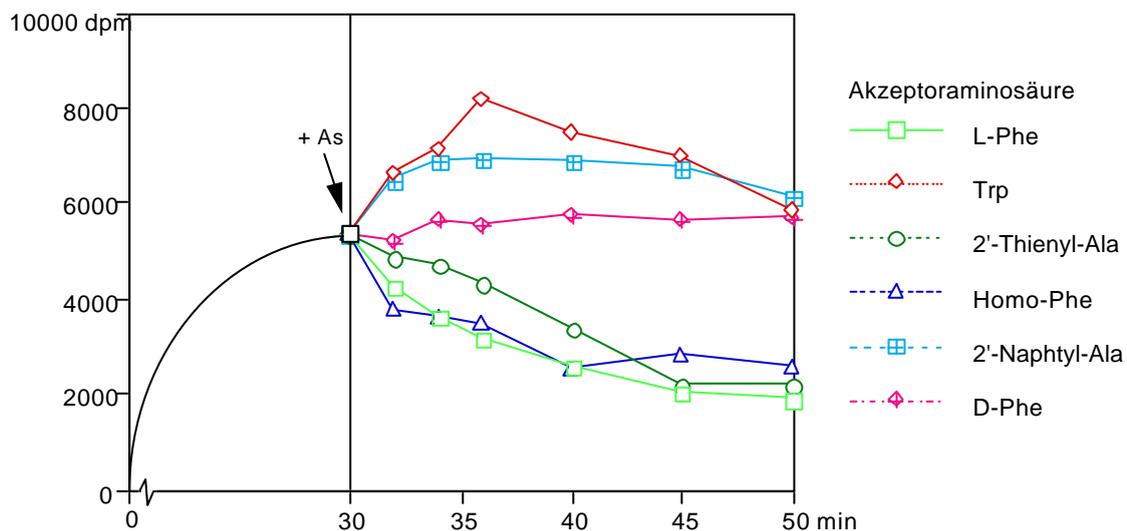
strukturell ähneln (2'-Thienyl-Ala, 5'-Hydroxy-Trp und 2'-Naphthyl-Ala) ein schnelles Absinken der Leucin-Inkorporation, was auf eine rasche Dipeptidbildung und Abspaltung mit vergleichbaren Raten wie für das Dipeptid Trp-Leu hindeutete. Phenylalanin und ihr Analoga Homo-Phenylalanin bewirkten dagegen ein verlangsamtes Absinken der Leucin-Inkorporation, entsprechend einer verminderten Produktbildungsrate. Die genaue Analyse der Dipeptidbildung an den in diesem Kapitel beschriebenen Enzym-Templaten ist Bestandteil der Diskussion.

5.5.6.3 Das Protein [A_{Ile}]_(BacA1)-[TCA_{Phe}]_(TycB2)-[TTe]_(TycC6) (XV)

Das einzige Dipeptid, das mit signifikanter Geschwindigkeit von dem Enzym **XV** produziert wurde (siehe Abb. 5.5-9), war das Dipeptid Ile-Phe mit einer Rate von $0,5 \text{ min}^{-1}$. Damit stellte das Enzym-Templat eine hohe Selektivität bezüglich der Bildung von Dipeptiden dar. Substitution der Donoraminosäure von Isoleucin zu Leucin sowie der Akzeptoraminosäure von Phenylalanin zu Tryptophan reduzierte die Produktbildungsrate beträchtlich auf ca. $0,02 \text{ min}^{-1}$. Das Dipeptid Leu-Trp konnte mit diesem Enzym-Templat überhaupt nicht produziert werden. Wurden nicht-proteinogene Aminosäuren, die Phenylalanin und Tryptophan strukturell ähneln, als Substrate verwandt, so zeigte sich, daß die höchste Dipeptidbildungsrate Ile-X mit der Aminosäure Homo-Phenylalanin gebildet werden konnte. Mit den Aminosäuren 2'-Thienyl-Alanin, 2'-Naphthyl-Alanin und 5'-Hydroxy-Tryptophan konnten nur geringe Mengen an korrespondierenden Dipeptiden erhalten werden (siehe Tab. 5.5-2). Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung, daß auch Tryptophan ein schlechtes Substrat für eine Dipeptidbildung war. Die Aminosäure D^{Phe} stellte überhaupt kein Substrat für die Dipeptidbildung Ile- D^{Phe} dar (vergleiche auch Abb. 5.5-3).



Mit Hilfe von Produktabspaltungskinetiken (siehe 4.2.4.5) konnte gezeigt werden, daß man die verwendeten Akzeptoraminosäuren in drei Gruppen einteilen kann (siehe Abb. 5.5-10):



L-Phe, Homo-Phe, und 2'-Thienyl-Alanin induzieren ein rasches Absinken Inkorporation von Isoleucin. Die Aminosäuren Tryptophan und 2'-Naphtyl-Alanin bewirken anfangs ein leichtes Ansteigen, bevor die Isoleucin-Inkorporation wieder leicht sinkt. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß sowohl Elongations- als auch Terminationsreaktion verlangsamt sind. Einen ähnlichen Hinweis gibt eine Untersuchung mittels Thioesterspaltung des Enzym **XV**: während bereits nach 5 min die Bildung eines internen Dipeptids Ile-Phe nachzuweisen ist, so ist der analoge Nachweis eines Dipeptids Ile-Trp auch nach 15 min noch nicht möglich (vergleiche Abb. 5.5-11). Eine Aminosäure der dritten Gruppe repräsentiert D-Phe, die nach Zugabe, eine konstante Isoleucin-Inkorporation bewirkt. Hier scheint bereits die Kondensationsreaktion blockiert zu sein.

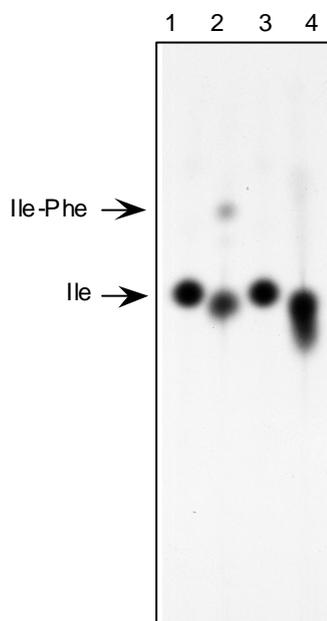


Abb. 5.5-11 Die Elongation eines Trp-substituierten Dipeptides am Enzymtemplat XV ist gehemmt:

Autoradiographie der DC-Analyse einer alkalischen Thioesterspaltung des Enzyms XV. Pfeile am linken Rand markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen.

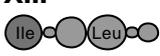
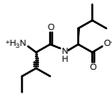
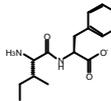
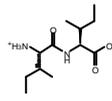
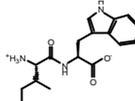
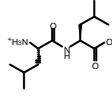
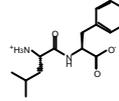
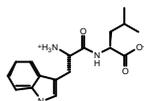
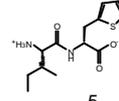
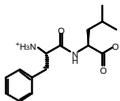
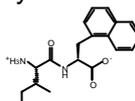
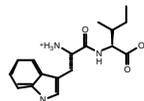
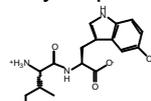
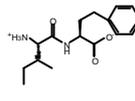
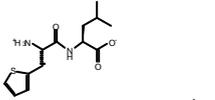
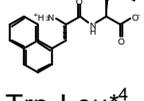
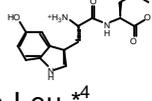
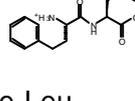
Spur 1: Kontrolle. Ile*, -

Spur 2: Ile*, Phe. 5 Minuten Reaktionszeit

Spur 3: Kontrolle. Ile*, -

Spur 4: Ile*, Trp. 15 Minuten Reaktionszeit

Tab. 5.5-2: Zusammenstellung der Dipeptide, die durch die in Kapitel 5.5 behandelten hybriden Enzyme gebildet wurden

Enzym	Produkt Ω	Nachweis	Geschwindigkeit#	Enzym	Produkt Ω	Nachweis	Geschwindigkeit#
XIII 	Ile-Leu	 v	0.3 *1	XV 	Ile-Phe	 v	0.5
	Ile-Ile	 v	0.1		Ile-Trp	 v	<0.02
	Leu-Leu	 v	0.3		Leu-Phe	 v	<0.02
	Leu-Ile	—	—		Leu-Trp	—	—
XIV 	Trp-Leu	 v	2.1		Ile-2'-Thienyl-Ala *5	 v	n. b.
	Phe-Leu	 v	0.9		Ile-2'-Naphthyl-Ala *5	 v	n. b.
	Trp-Ile	 v	0.1 *2		Ile-5'-Hydroxy-Trp *5	 v	n. b.
	Phe-Ile	— *3	—		Ile-Homo-Phe *	 v	n. b.
	2'-Thienyl-Ala-Leu *4	 v	n. b.		Ile-DPhe	—	—
	2'-Naphthyl-Ala-Leu *4	 v	n. b.				
	5'-Hydroxy-Trp-Leu *4	 v	n. b.				
	Homo-Phe-Leu *4	 v	n. b.				
	DPhe-Leu	—	—				

Ein Haken (v) indiziert, daß das jeweilige Dipeptid über HPLC-MS Analytik und radioaktive Dünnschichtchromatographie nachgewiesen wurde. Ω wenn nicht anders bezeichnet, befinden sich beide Aminosäuren in der L-Konfiguration.

in $[\text{min}^{-1}]$. n.b.: nicht bestimmt.

1 parallel wird Ile-Ile, aber kein Leu-Leu gebildet.

2 auch Dipeptide, die aus einer semi-katalytischen Reaktion hervorgegangen sind, werden beobachtet : Ile-Ile, Ile-Trp and Trp-Trp.

3 Ile-Ile wird in geringem Maße gebildet.

4 analoge Dipeptide mit Isoleucin in der Akzeptorposition werden in geringerem Ausmaß gebildet.

5 analoge Dipeptide mit Leucin in der Donorposition können nicht gebildet werden.

5.6 Die Etablierung eines *Bacillus*-Expressionssystems für rekombinante Peptidsynthetasen- *Bacillus*-Integrationsvektoren

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht vorherzusehen, welche Schwierigkeiten der heterologen Überproduktion von hybriden Peptidsynthetasen mit einer Größe von ca. 200 kDa in *E. coli* im Weg stehen würden. So erlaubte nur die exakte Definition von Domänengrenzen die Überproduktion von A-Domänen in löslicher und aktiver Form [28]. Auch die posttranslationale Modifikation der T-Domäne von Peptidsynthetasen war ein nicht ausgeräumtes Hindernis zur Darstellung heterolog überproduzierter Peptidsynthetasen in ihrer *holo*-Form. Es wurde deshalb parallel zu den Ergebnissen einer *E. coli*-Expression versucht, ein System zu entwickeln, das eine homologe Expression von rekombinanten Peptidsynthetase-Genen in einem natürlichen Produzent nichtribosomal produzierter Peptide, wie *Bacillus*, ermöglicht. Dabei wurde teilweise auf den Ergebnissen der Diplomarbeit von Katrin Eppelmann aufgebaut. In ihrer Diplomarbeit gelang die Konstruktion einer *Bacillus subtilis* *srfA*⁻ Mutante, die durch homologe Rekombination hergestellt wurde [171]. Diese Mutante KE30 war kein Produzent eines nichtribosomal produzierten Peptides und konnte deshalb diesbezüglich als *clean-strain* bezeichnet werden.

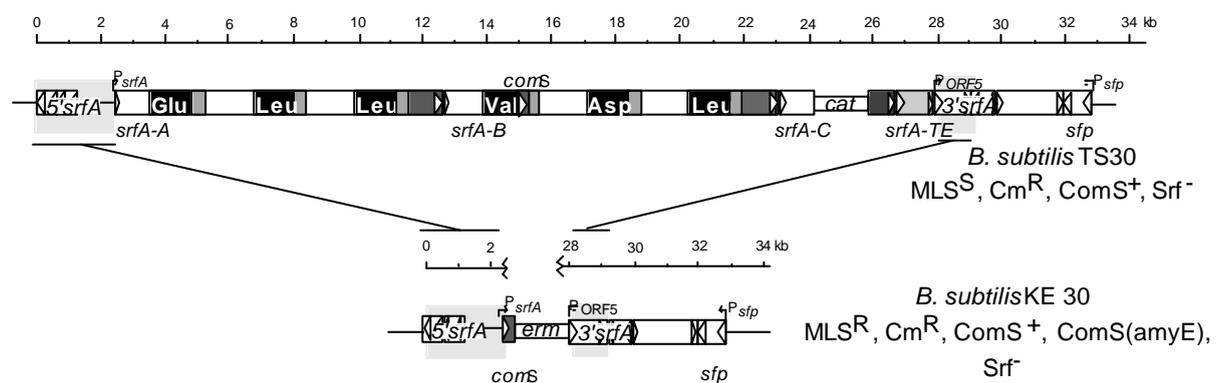
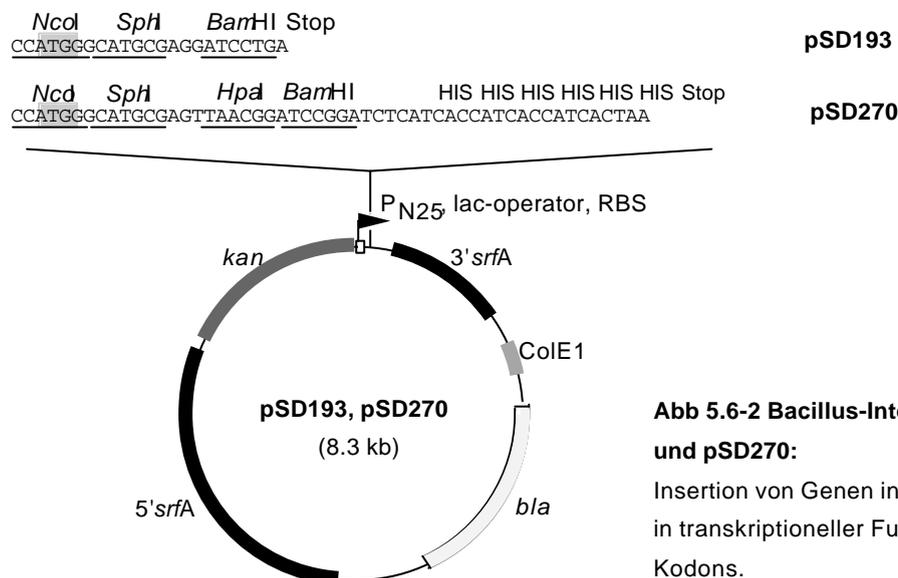


Abb. 5.6-1 Schematische Wiedergabe des von Katrin Eppelmann konstruierten *srfA*⁻ *Bacillus subtilis* Stammes KE30:

Durch homologe Rekombination wurde das 27 kbp umfassende *srfA*-Operon deletiert. Ausgangsstamm war die *B. subtilis* Mutante TS30, die eine Unterbrechung des Gens *srfA*-A-C durch eine *cat*-Kassette trägt. *B. subtilis* KE30 trägt zudem eine Insertion einer zweiten Kopie des Kompetenzregulator-Gens *comS* in der *amyE*-site, so daß KE30 dem Genotyp MLS^R , cat^R , $comS^+$, $comS(amyE)^+$ und $srfA-A-D^-$ besitzt.

Der ehemalige chromosomale Locus des Surfactin-Operons wurde nun in dieser Arbeit benutzt, um an dessen Stelle das Gen einer rekombinanten Peptidsynthetase zu integrieren. Hierzu wurde ein Vektorsystem entwickelt, an das folgende Anforderungen gestellt waren: (a) der Vektor sollte einen Replikationsursprung für *E. coli* besitzen, der es ermöglicht, rekombinante Peptidsynthetase-Gene in *E. coli* zu klonieren. (b) Gene, die in diesen Vektor kloniert werden, sollten der Kontrolle eines Promotors unterliegen, der sowohl in *Bacillus*, als auch in *E. coli* funktionell ist. (c) die Expression dieser Gene sollte induzierbar sein. (d) die

multiple-cloning-site des Vektors sollte kompatibel mit der von pQE-Vektoren sein, um ein einfaches Umklonieren von bereits in *E. coli*-pQE-Vektoren klonierten Genen zu ermöglichen. Dieser Vektor, wurde auf der Basis des von Katrin Eppelmann klonierten *srfA*-Deletionsplasmids pKE19 [171] konstruiert. pKE19 wurde nun in mehreren Schritten modifiziert (siehe Anhang B): (a) die Region des T5-Promotors, des *lac* I-Operators, sowie die der *multiple-cloning-site* des pQE60-Vektors wurden integriert, (b) unter Bildung einer erweiterten *multiple-cloning-site* wurde die für den (*His*₆)-tag kodierende Region des pQE70-Vektors integriert, (c) eine Kanamycin-Resistenz-Kassette wurde zwischen den zum 5'- und 3'-Bereich des *srfA*-Locus kompatiblen DNA-Bereich des Vektors kloniert, so daß für nachfolgende Integrationen durch positive beziehungsweise negative Antibiotika-Selektion zwischen *single*- und *double-cross over* unterschieden werden konnte.



Zwei Typen von Integrationsvektoren wurden konstruiert: pSD270 stellte ein Vektor zur Expression von Fusionsgenen dar, die 3'-terminal mit einem (*His*₆)-tag-kodierenden DNA-Abschnitt gekoppelt wurden, während der Vektor pSD193 zur Expression nicht-fusionierter Gene führte. Diese Vektoren sind *Bacillus*-Integrationsvektoren, da sie keinen Replikationsursprung für *Bacillus* besitzen. Unter Antibiotikaselektionsdruck kann über die homologen Bereiche 5'-*srfA* und 3'-*srfA* eine Integration in den früheren *srfA*-DNA Locus induziert werden, der zu einer stabilen Aufrechterhaltung der rekombinanten Gene führt. Die Funktionalität dieses Systems konnte durch die Integration eines rekombinanten Peptidsynthetase-Gens untermauert werden.

6 Diskussion

Der Ergebnisteils befaßte sich mit Mitteln, die modulare Struktur von Peptidsynthetasen auszunutzen, um *de novo*-Enzym-Template für die nichtribosomale Synthese von Dipeptiden definierter Sequenz darzustellen. Dabei wurden verschiedene Strategien zur Fusion katalytisch aktiver Domänen angewendet. Die funktionelle Interaktion dieser artifiziellen Domänenarrangements konnte durch den Nachweis der am Enzym-Template prozessierten Dipeptide nachgewiesen werden. Durch die *in vitro*-Charakterisierung der hybriden dimodularen Enzyme konnte so ein tieferes Verständnis über die Faktoren, die eine effiziente Peptidsynthese an hybriden Peptidsynthetasen bestimmen, erhalten werden.

Die Diskussion soll auch dazu dienen, bis hierher nicht vorgestellte Untersuchungen dieser Arbeit vorzustellen.

6.1 Ein putatives Lichenysin Biosynthese-Operon in *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: Von der Sequenz dreier Gene zur Primärstruktur eines nichtribosomalen Peptids

Die Historie der nichtribosomalen Peptidsynthese beginnt mit der Entdeckung von nichtribosomalen Peptiden wie Gramicidin S und Tyrocidin in den vierziger Jahren. Die zugehörigen Biosyntheseenzyme wurden in den sechziger Jahren entdeckt [157, 172], biochemisch charakterisiert und schließlich zur Definition der nichtribosomalen Peptidsynthese eingesetzt [61]. Erst die moderne Genetik der neunziger Jahre erlaubte jedoch, den Mechanismus der nichtribosomalen Peptidsynthese anhand von strukturellen Daten zu festigen [173]. So konnte mit der Sequenzierung von Peptid Biosynthese-Operons der modulare Charakter der zugehörigen Enzyme belegt werden [55, 56]. Nachfolgende Untersuchungen an rekombinanten Enzym-Domänen von Peptidsynthetasen führten zur biochemischen Charakterisierung von Einzelschritten dieses Biosynthese-Systems [41, 47, 60]. Schließlich konnte mit Hilfe von Strukturaufklärungen ein tieferer Einblick in die Architektur von Peptidsynthetase-Domänen gegeben werden [66]. Ein "nichtribosomaler Code" wurde postuliert, der es erlaubte, anhand weniger ausgewählter Aminosäurereste von A-Domänen auf das Substrat der A-Domäne zu schließen [71].

In dieser Arbeit konnte, in teilweiser Umkehr der historischen Route, ein Peptid Biosynthese-Operon bis dato unbekannter Funktion durch molekulare und biochemische Charakterisierung der Biosynthese eines nichtribosomalen Peptids - eines Lichenysins - zugeordnet werden. Eine Identifizierung des Peptids konnte nicht erfolgen, deshalb bleibt die

vorgeschlagene Struktur putativ. Folgende Mittel wurden angewendet, um diese Zuordnung zu ermöglichen:

- (1) Die Analyse der Modul- und Domänenstruktur gab Aufschluß über die Anzahl und den Modifizierungsgrad des von dem System produzierten Peptides. Dabei wurde von dem Kolinearitätsprinzip zwischen nichtribosomalem Enzym-Templat und dem von ihm produzierten Peptid ausgegangen [174]. Die Art der katalytischen Domänen wurde anhand von identifizierten hochkonservierten *core*-Motiven definiert [22]. Die Modul- und Domänenstruktur glich dem Surfactin Biosynthese-Operon aus *Bacillus subtilis* ATCC 21332, so daß das Enzym-Templat in der Biosynthese eines acylierten Heptapeptids involviert zu sein schien [55].
- (2) Detaillierte Sequenzanalysen des die Spezifität von A-Domänen definierenden Bereiches zwischen den *core*-Motiven A2 und A4 erlaubte eine Vorhersage der Aminosäuresubstrat-Spezifität [66]. Auch der jüngst vorgeschlagene "nichtribosomale Code" konnte die wahrscheinlich determinierten Aminosäuresubstrat-Spezifitäten eingrenzen [71]. Beide Analysen legten eine enge Verwandtschaft der Primärstruktur zu der des Surfactins nahe. Ein Beispiel, das die Eleganz der Definition eines "nichtribosomalen Codes" unterstreicht, ist das Unterscheidungsmerkmal von Asparagin- und Aspartat-aktivierenden A-Domänen (siehe Tabelle 6.1-1): Aspartat-aktivierende Domänen weisen an Position 322 einen Histidin-Rest auf (dessen Aminprotonen offensichtlich die β -Carboxygruppe des Aspartats koordinieren), Asparagin-aktivierende Domänen einen Glutamat-Rest (dessen χ -Carboxygruppe offensichtlich die β -Aminofunktion koordiniert).

Tab. 6.1-1 Der "nichtribosomale Code" und Asparagin- und Aspartat-aktivierende Domänen

Reste abgeleitet von der Primärsequenz von GrsA

A-Domäne		236	239	278	299	301	322	330
Asp	LicB2	L	T	K	V	G	H	I
	SrfB2	L	T	K	V	G	H	I
	BacC4	L	T	K	V	G	H	V
Asn	TycC1	L	T	K	I	G	E	V
	BacC5	L	T	K	I	G	E	I

Eine ähnlich elegante Vorhersage der Spezifität der A-Domäne des Moduls 1, das putativ Glutamat *oder* Glutamin aktivierte, konnte dagegen nicht erfolgen (siehe Tabelle 6.1-2).

Tab. 6.1-2 Der "nichtribosomale Code" und Glutamin- und Glutamat-aktivierende Domänen

Reste abgeleitet von der Primärsequenz von GrsA

	A-Domäne	236	239	278	299	301	322	330
Gln	LicA1	A	Q	D	L	G	V	V
	TycC2	A	W	Q	F	G	L	I
Glu	SrfA1	A	K	D	L	G	V	V
	FenE1	A	W	H	F	G	G	V

Auch konnte die Spezifität der A-Domäne von Modul 7 auf diese Art nicht eindeutig zu Gunsten von Leucin, Isoleucin oder Valin vorhergesagt werden.

- (3) Neben dem Dodecapeptid Bacitracin [24] sind noch mindestens zwei weitere Klassen bioaktiver Peptide, die von *Bacillus licheniformis*-Stämmen produziert werden, beschrieben. So ist die Isolierung von sogenannten Amoebicinen, kleinen hydrophilen Peptiden mit einer Masse um 3000 Da, berichtet worden [175, 176].

Der Nachweis einer als Lichensine bezeichneten Lipopeptid-Klasse konnte aus mindestens drei Isolaten von *Bacillus licheniformis* erfolgen [161, 164]. Für diese Isolate wurde eine Oberflächen-aktive Wirkung nachgewiesen, zudem wurden Lichensine als die stoffliche Komponente, die für diese Eigenschaft verantwortlich ist, isoliert und strukturell aufgeklärt. *Bacillus licheniformis* BAS50 konnte aus einem Ölfeld in 1500 Metern Tiefe isoliert werden [177]. Ein halophiler Stamm von *Bacillus licheniformis* JF-2 [178, 142] wurde aus einem Wassereinschluß eines Ölfeldes in Oklahoma isoliert. Lichensine sind Lipopeptide der allgemeinen Peptidstruktur Glx-Leu-DLeu-Val-Asx-DLeu-X, wobei an der letzten Position die Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin identifiziert wurden. Die Carboxygruppe des C-Terminus bildet einen Lacton-Ring mit der β -Hydroxygruppe einer in ihrer Länge variablen N-terminalen Fettsäure [119]. Diese Struktur der Lichensine schließt somit die des Surfactins aus *Bacillus subtilis* ein.

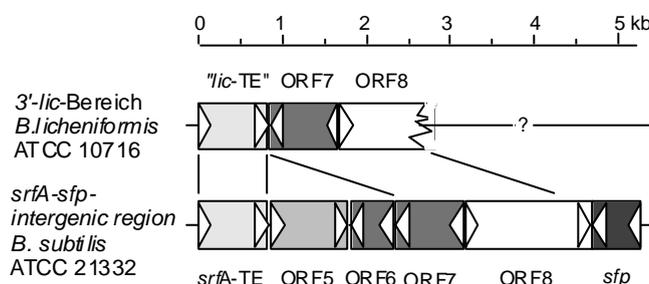
- (4) Durch heterologe Überproduktion rekombinanter A-Domänen korrespondierend zu den Modulen 1, 5 und 7 konnte die genaue Substratspezifität dieser Enzyme *in vitro* festgestellt werden. Konsistent mit den drei obigen Punkten wurde gezeigt, daß die A-Domänen von Modul 1 (LicA1-A) spezifisch Glutamin und die des Moduls 5 (LicB2-A) spezifisch Aspartat aktiviert. Modul 7 (LicC1-A) zeigte höchste Aktivierungsraten für Isoleucin, aber auch die verwandten Aminosäuren Leucin und Valin wurden aktiviert. Nebenspezifitäten der A-Domäne von Modul 7 bezüglich strukturell ähnlicher Substrataminosäuren können somit die strukturelle Varianz der in der Literatur beschriebenen Lichensine erklären [160]. Die Struktur der Lichensine ist damit auch

eine Funktion der Verfügbarkeit von Substrataminosäuren [28]. Dagegen scheint die strukturelle Varianz der Lichenysine an Position 5 (und wahrscheinlich auch Position 1) durch die Möglichkeit gegeben, durch wenige Punktmutationen, die Substratspezifität zu verändern. An der rekombinanten A-Domäne von SrfB2 konnte gezeigt werden, daß eine einzige Mutation, H322E, die Substratspezifität von Asp zu Asn konvertiert [71].

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit stellte die vorgeschlagene Primärstruktur des Lichenysins aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 einen neuen Strukturtyp dar. Inzwischen wurde die Struktur eines isolierten Lichenysins aus *Bacillus licheniformis* BNP29, dessen zugehöriges Biosynthese-Operon eine 95%-ige Identität zu dem aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 aufweist, zu Gunsten der hier vorgeschlagenen Primärstruktur revidiert [179]. Umfangreiche Strukturaufklärungen an anderen Lichenysinen bestimmten die Zusammensetzung der Acylkette [119], sowie die Art des Lacton-Ringschlusses über das carboxyterminale Ende und die β -Hydroxygruppe der Fettsäure [180].

Zusammenfassend erscheint es einleuchtend, daß Lichenysin-Isoformen einen gemeinsamen evolutionären Vorläufer haben. In diese Gruppe ist auch das Surfactin aus *Bacillus subtilis* einzuordnen.

Überraschend ist die Beobachtung, daß die genetische Organisation im 3'-Bereich des *lic*-Operons, sich von dem des homologen *srfA*-Operons in *Bacillus subtilis* unterscheidet [55] (siehe Abb. 6.1-1).



6.1-1 Vergleich der Genorganisation des 3'-Bereiches des *lic*-Operons in *B. licheniformis* ATCC 10716 und des *srfA*-Operons in *B. subtilis* ATCC 21332 :

Durch Sequenzierung konnte gezeigt werden, daß homologe Gene zu ORF7 und ORF8 auch in *B. licheniformis* zu finden sind. Homologe Gene zu ORF5 und ORF6 konnten hier aber nicht identifiziert werden.

So konnten im 3'-Bereich homologe Gene zu den ORFs 5 und 6 nicht identifiziert werden. Die Funktion der Genprodukte der ORFs 6 und 7 in *Bacillus subtilis* wird als "unkonventionelles" Zwei-Komponenten-System in der transkriptionellen Kontrolle des *srfA*-Operons vermutet [181]. Inzwischen konnte durch Frau Andrea Klens gezeigt werden, daß das 4'-PPAN-Gen *bli* [158] im 3'-Bereich des hier identifizierten ORFs 8 lokalisiert ist. Bli stellt also offenbar eine dem Lichenysin Biosynthese-System inhärente 4'-PPAN-Transferase dar. Die Komplementation von *sfp* in *Bacillus subtilis* durch *bli* konnte gezeigt werden [159]. Biosurfactant-produzierende Microorganismen [163] sind von beträchtlichem industriellen Interesse und werden vor allem für Erdöl-gewinnende Prozesse verwendet [166]. Mikrobielle Biosurfactanten, von denen die Lipopeptide nur eine Gruppe repräsentieren, werden als Emulsiva, Schäumer oder Korrosions-Inhibitoren benutzt [167]. Die generelle Funktion der

mikrobiellen Produktion von Lipopeptiden scheint dagegen vielschichtig zu sein; so ist für Lichenysine auch eine antibiotische Wirkung beschrieben, Lipopeptide des Genus *Serratia* werden für die Mobilität dieser Bakterien mitverantwortlich gemacht [182, 183].

Ein Lichenysin aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 konnte nicht isoliert werden, so daß über die Funktionalität des charakterisierten Biosynthese-Operons nachgedacht werden muß. Auch andere "stille" Peptidsynthetase-Gene sind in Stämmen des Genus *Bacillus* bekannt [184, 185]. Untersuchungen zur Regulation der Lichenysin-Produktion in anderen *Bacillus licheniformis* Stämmen belegen eine starke Abhängigkeit von den Kulturbedingungen [186]. Ebenso ist ein Verlust der Surfactant-Produktion während wiederholter Rekultivierungen beobachtet worden [142]. Die transkriptionelle Kontrolle des Lichenysin Biosynthese-Operons aus *Bacillus licheniformis* BNP29 scheint einer der *Bacillus subtilis* verwandten ComA-Regulierung zu unterliegen [187].

6.2 Dipeptidsynthese an hybriden Peptidsynthetasen

Nichtribosomal produzierte Peptide haben wegen ihrer bioaktiven Fähigkeiten Interesse erweckt, so daß eine gezielte Veränderung der modularen Struktur eines nichtribosomalen Enzym-Templates, das Potential zur Darstellung modifizierter bioaktiver Peptide mit veränderten Fähigkeiten trägt [59]. Zudem stellen Peptidsynthetasen verlockende Instrumente zur Katalyse der Bildung von Peptidbindungen bereit [35]. Die Synthese von Peptiden verläuft dabei gerichtet, sie kommt mit in der Natur verfügbaren Substraten wie Aminosäuren und ATP aus. In dieser Arbeit wurde versucht, die Darstellung von Dipeptiden definierter Primärsequenz an nichtribosomalen Peptidsynthetasen-Templaten zu führen.

6.2.1 Hybridenzyme - Ein Überblick

Hybride Enzyme – also solche, die aus Elementen mehrerer Enzyme bestehen - können auf verschiedene Weise dargestellt werden [188]: (a) Sind die strukturellen Determinanten einer enzymatischen Eigenschaft bekannt, so kann die Übertragung dieser Determinanten auf ein zweites strukturell homologes Enzym zur Angleichung der enzymatischen Eigenschaften führen. Oft sind wenige Punktmutationen genügend, um beispielsweise die Substratspezifität eines Enzyms zu konvertieren. Die rationale Übertragung von an der Substratbindung involvierter Reste in der A-Domäne von GrsA auf A-Domänen anderer Spezifität konnte beispielsweise die Substratspezifität in vorhersagbarer Weise verändern [71, 126]. (b) Weitergehende Veränderungen eines Enzyms schließen den Austausch ganzer Sekundär- und Tertiärstruktur-Motive ein. So konnte beispielsweise die Spezifität des Trypsins durch

den Austausch einer an der Substraterkennung beteiligten Peptidschleife geändert werden, so daß das hybride Enzym eine Spezifität auswies, die dem Chymotrypsin ähnlich war [189, 190]. Die Darstellung chimärer Domänen durch Fusion von homologen Proteinen im Bereich hochkonservierter Sequenzmotive, ist auch in dieser Gruppe zu nennen [191]. (c) Handelt es sich um Multidomänen-Enzyme, so kann der Austausch einer dieser Domänen zur Konvertierung einzelner katalytischer Fähigkeiten und damit des Gesamtprozesses des Multidomänen-Enzyms führen. Der Austausch funktioneller Domänen in an der Signaltransduktion beteiligten Kinasen führte beispielsweise zur Reprogrammierung von Signalkaskaden [192]. Auch die durch einen Modulaustausch in modularen Peptidsynthetasen induzierte Produktion von Peptiden abgeänderter Primärsequenz fällt in diese Gruppe der Darstellung von Hybridenzymen [59].

Die Ergebnisse der Kapitel 5.2, 5.4 und 5.5 beschäftigen sich mit der Darstellung von hybriden dimodularen Peptidsynthetasen, die über Domänenfusionen konstruiert wurden (wie unter (c) beschrieben). Die Gliederung des Ergebnis-Teils in diese drei Unterkapitel erfolgte, aufgrund unterschiedlicher Vorgaben an die Teilgebiete dieser Arbeit sowie aufgrund methodischer Unterschiede zur Darstellung von Domänenfusionen: Das Kapitel 5.2 steht ganz im Zeichen der Konstruktion eines Asp-Phe-spezifischen Enzym-Templates. Die Kapitel 5.4 und 5.5 befassen sich mit der Etablierung eines Steck-Systems von Peptidsynthetase-Domänen, wobei die Ergebnisse in Kapitel 5.4 die Etablierung eines *in trans*-Systems, die in Kapitel 5.5 die eines *in cis*-Systems beschreiben. Der Diskussionsteil soll dazu verwendet werden, die Ergebnisse der Kapitel 5.2 bis 5.5 zusammengestellt zu bewerten, da sie das Prinzip der Domänenfusion zur Darstellung hybrider Peptidsynthetasen verbindet.

Ein Ansatz, die Spezifität einer A-Domäne durch den Austausch eines Tertiärstrukturbereiches zu verändern (die Möglichkeit B zur Darstellung hybrider Enzyme) führte dagegen nicht zu den erwarteten Ergebnissen (sie sind nicht Bestandteil dieser Arbeit).

Der Versuch, die Aminosäuresubstrat-Spezifität eines Moduls allein durch Punktmutationen zu verändern (die Möglichkeit (a) zur Darstellung hybrider Enzyme), wurde nicht unternommen, da zu erwarten war, daß die hohen Spezifitätskriterien für die Darstellung eines Asp-Phe-Templates dadurch nicht erreicht werden würden.

6.2.2 Anwendung von Domänenfusionen zur Darstellung eines Asp-Phe-spezifischen Enzym-Templates

Das Dipeptid α -Aspartyl-Phenylalanin, dient der Synthese des Zuckersubstituts α -Aspartyl-Phenylalaninmethylsäureester (Aspartam[®]) als Precursor und ist daher von großem industriellen Interesse.

Da die Natur ein nichtribosomales Enzym-Templat für die Darstellung des Dipeptides Asp-Phe nicht bereitstellt (oder dieses zumindest noch nicht identifiziert wurde), wurden hybride Enzym-Templates gewünschter Funktionalität erzeugt. Dabei wurden mit dieser Arbeit zum ersten Mal nichtribosomale Templates determinierender Spezifität durch genetische Manipulationen *de novo* erzeugt. Die biochemische Charakterisierung dieser artifiziellen Enzym-Templates wurde *in vitro* durch Untersuchung der katalytischen Einzelaktivitäten sowie des Potentials zur Bildung von definierten Dipeptiden geführt.

6.2.2.1 Die Anforderungen an ein nichtribosomales Enzym-Templat für die Synthese eines Dipeptides

Zur Darstellung dieses Dipeptides an einem nichtribosomalen Enzym-Templat wurde die Domänenorganisation ATCATTe als ausreichend angesehen: so wird beispielsweise die Synthese des Tripeptides δ -Aminoacyl-Cysteiny-D-Valin (ACV) an einer Peptidsynthetase der Domänenorganisation ATCATCATETe geführt [25, 193]. Die Verwendung einer zusätzlichen N-terminalen C-Domäne, wie sie zum Beispiel im Surfactin-Biosynthesesystem vorkommt [194], wurde nicht ins Auge gefaßt. Es wird vermutet, daß der Start der Biosynthese des Surfactins über einen anfänglichen Acylierungsschritt, der die Nterminale C-Domäne involviert, geführt wird. Mit den Untersuchungen an dem verkürzten nichtribosomalen Modellsystem GrsA/ProCAT konnte belegt werden, daß eine Nterminale AT-Domänenorganisation ausreichend zur Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese ist [47]. Die Verwendung einer C-terminalen Te-Domäne schien geeignet für eine enzymatisch katalysierte Produktabspaltung [109, 105]. Mit der Definition der Primärsequenz des zu prozessierenden Dipeptides Asp-Phe war die Spezifität der beiden zu verwendenden Module klar vorgegeben.

6.2.2.2 Die Definition von Domänengrenzen

Zur Darstellung von Asp-Phe-spezifischen Templaten wurden 3 Typen von Domänenfusionen angewandt, die in Tabelle 6.2-1 zusammengestellt sind:

Tab. 6.2-1: Zusammenstellung der verwendeten Domänenfusionen

Domänenfusion	Anwendung
C-A	zur Fusion der A-Domäne von TycA an die C-Domäne von SrfB3 in I.
A-T	zur Fusion der T-Domäne von SrfC beziehungsweise TycC6 an die A-Domäne von TycA in III beziehungsweise in IV.
T-Te	zur Fusion der Te-Domäne von TycC6 an die T-Domäne von TycA in V.

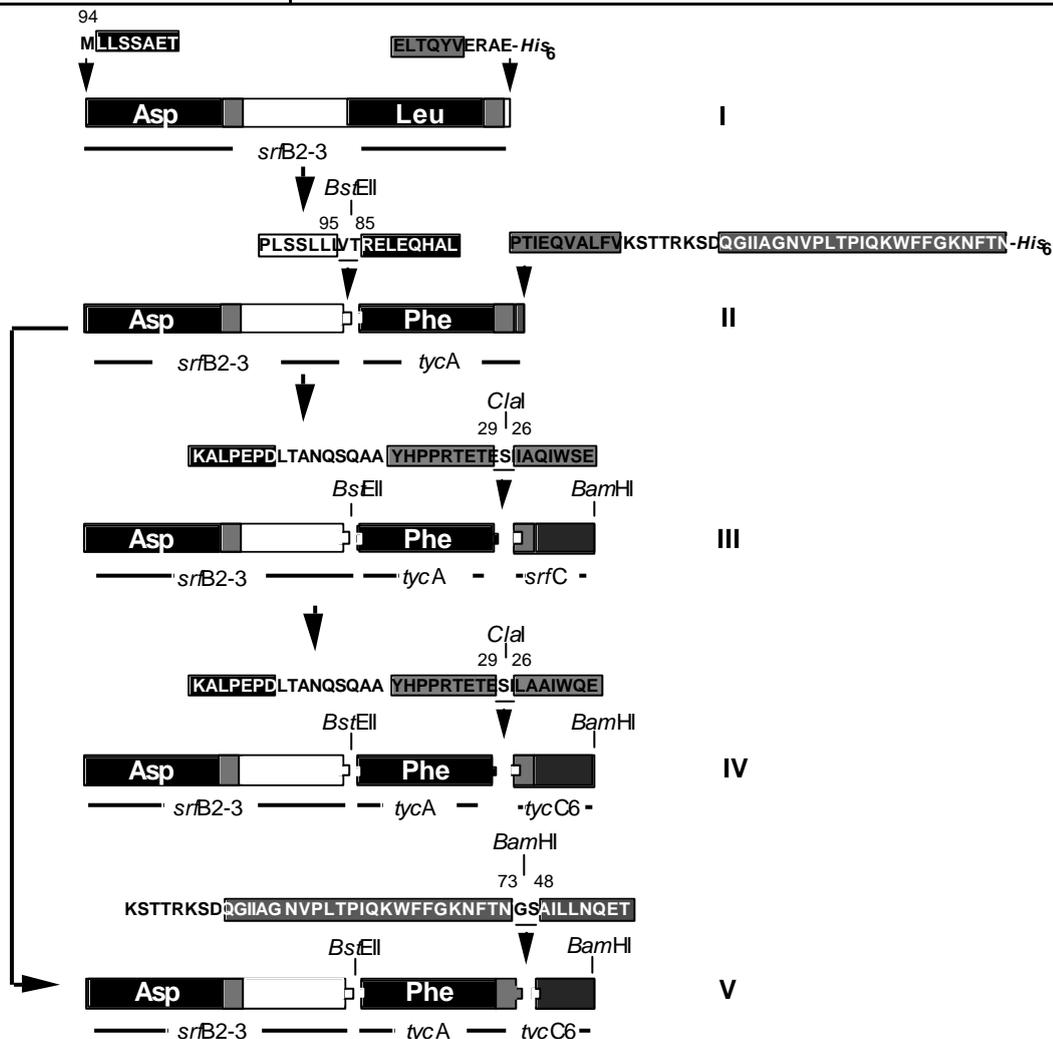


Abb. 6.2-1 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der in Kapitel 5.2 beschriebenen dimodularen Peptidsynthetasen:

Fusionsstellen sind jeweils durch ein Steck-Symbol bezeichnet. Oberhalb der Darstellungen jeweils die Proteinsequenz im Bereich der Fusionsstelle. Verschiedene Graustufen stellen die Domänen dar. Die Nummerierung bezieht sich auf benachbarte hochkonservierte *core*-Motive, so für das Protein II auf *core*-Motiv A2 von TycA (L KAGGA), für die Proteine III, IV und V auf *core* T von SrfC bzw. TycC6 (LGGD S). Eine Fusion an den Positionen n/ n-2 kann als optimal gelten. Die Proteine II und V enthalten die 25 N-terminalen Aminosäuren der E-Domäne von TycA.

Zur Definition von Domänengrenzen wurde zum einen auf strukturelle Daten zurückgegriffen: so erlaubte ein Vergleich der Primärsequenzen von A-Domänen mit der der strukturell aufgeklärten A-Domäne von GrsA [66], die Abschätzung des N und C-terminalen Endes dieses Domärentypes. Zum anderen erlaubte die Lokalisation von identifizierten

hochkonservierten *core*-Motiven innerhalb von Domänen, eine ungefähre Abschätzung ihrer Grenzen [22]. Fusionsstellen wurden durch Verwendung natürlicher Restriktionsschnittstellen, die im Grenzbereich von Domänen lokalisiert waren, eingefügt. Die systematische Definition von hybriden Peptidsynthetasen über Domänenfusionen kann als vorteilhaft angesehen werden. Die Darstellung von hybriden Enzymen über willkürlich ausgewählte Fusionsstellen innerhalb von Domänen (insbesondere solcher, die auf hochkonservierten *core*-Sequenzen liegen), führte zu unbefriedigenden Ergebnissen [129, 130]. Eine schematische Darstellung der konstruierten dimodularen Peptidsynthetasen findet sich in Abb. 6.2-1.

6.2.2.3 Die enzymatische Aktivität von Domänen-fusionierten Peptidsynthetasen und die Bildung des Dipeptides Asp-Phe

Als Grundvoraussetzung für die selektive Darstellung eines Dipeptides Asp-Phe an einem nichtribosomalen Enzym-Templat wurde die Spezifität des Templates angesehen. Daher wurden anfangs die A-Domänen höchster Spezifität für Aspartat beziehungsweise Phenylalanin durch Testen der katalytischen Fähigkeit der Adenylatbildung bestimmt. Die A-Domäne von SrfB2 wies eine spezifische Aktivierung von Aspartat, die von TycA [62, 195] die höchste Spezifität bezüglich Phenylalanin auf. Es konnte belegt werden, daß die Substrataktivierung der konstruierten dimodularen Asp-Phe-Template als eine Summe der Substrataktivierungen an beiden Modulen verstanden werden kann. Für das rekombinante Protein I konnte durch Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Adenylierungsreaktion gezeigt werden, daß die Substrataffinitäten im Bereich der für natürliche Systeme bestimmten Parameter liegen [168].

Generell beeinträchtigte die Einführung von artifiziellen Domänenfusionen die Löslichkeit der heterolog in *E. coli* überproduzierten Proteine nicht. Verglichen mit dem nicht-hybriden rekombinanten Protein I konnten alle darauf aufbauenden hybriden Proteine in vergleichbaren Mengen pro Kulturansatz isoliert werden. Dies spricht zum einen für eine günstige Wahl der Fusionsstellen. Dies unterstützt zudem die Hypothese der vermuteten strukturellen und katalytischen Unabhängigkeit von Peptidsynthetase-Domänen.

In den hybriden Asp-Phe-Templaten III und IV konnte durch Verwendung einer A-T-Domänenfusion gezeigt werden, daß eine heterologe Substratthiolierung, über die artifizielle Domänenfusion hinweg, möglich ist. In beide Proteine konnte auf die T-Domäne von SrfC beziehungsweise TycC6, die im natürlichen Zusammenhang in der Thiolierung der Substrataminosäure Leucin involviert sind, in gleichem Maße Phenylalanin geladen werden, wie in das Vorläuferprotein I. Eine ausführlichere Diskussion des Potentials von A-T-Domänenfusionen findet sich in den Kapiteln 6.4 und 6.5.

Die Fähigkeit zur Produktbildung und -abspaltung der rekombinanten Enzymen I bis III konnte Aufschluß über die Funktionalität der G-, beziehungsweise der Te-Domäne geben:

Dipeptide abgeleitet von der Spezifität der Module konnten sowohl für das nicht-hybride Enzym-Templat I (Dipeptid Asp-Leu) als auch für alle in dem Kapitel 5.2 beschriebenen Template mit Asp-Phe-Spezifität isoliert werden. Der Produktumsatz war allerdings gering und konnte für Asp-Phe mit nur $0.05-0.08 \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden. Für diese langsame Produktbildung lassen sich Erklärungen finden. Zum einen wurde die G-Domäne, die die Elongation der beiden Aminosäuren katalysiert, in den hybriden Asp-Phe-Templaten vor ein Phenylalanin-aktivierendes Modul repositioniert. Ihr wird damit in Akzeptorposition eine unnatürliche Substrataminosäure angeboten (siehe Abb. 6.2-2). Auch die Konvertierung des nativen Elongationsmoduls SrfB2 in ein Initiationsmodul könnte die C-Domäne beeinflussen, da damit auch das natürliche Substrat der Donorposition (ein acyliertes Heptapeptid mit Aspartat am carboxy-terminalen Ende) abgeändert wird.

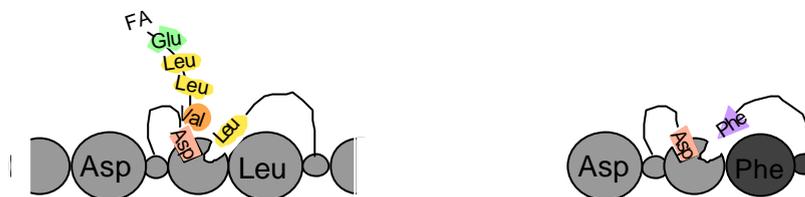


Abb. 6.2-2 Kondensation nicht-kognater Substrataminosäuren:

Die Konstruktion von hybriden Peptidsynthetasen setzt die Kondensationsdomäne in ein nicht natürliches Umfeld, so daß artfremde Aminosäuren kondensiert werden müssen. Links die Kondensationsreaktion von SrfB3 mit den natürlichen Substraten, rechts die gleiche Kondensationsreaktion mit nichtkognaten Substrataminosäuren in dem Hybrid I. FA= Fettsäure

Inzwischen war durch eine induzierte Fehlbeladung an der T-Domäne von TycB1 beschrieben worden, daß C-Domänen eine relative Unspezifität bezüglich der Donoraminosäure aufweisen, während auf der anderen Seite eine Abänderung der Akzeptoraminosäure aber weniger toleriert wird [95]. In diesem Zusammenhang kann die Fusion des Phenylalanin-aktivierenden Moduls von TycA an die C-Domäne von SrfB3 (eine Fusion, die die Substrataminosäure in Akzeptorposition verändert) als unvorteilhaft gelten. Einen Hinweis über die Elongationsfähigkeit von verkürzten Donorsubstraten können die in 6.5 diskutierten Ergebnisse erbringen. Zwei Ergebnisse sprechen für eine Beeinträchtigung der Elongation des Dipeptides Asp-Phe an den hybriden Enzym-Templaten: (a) eine Produktabspaltungskinetik von den Enzymen II und III (vergleiche 5.2-19) führt nicht zu einem Ansteigen der Aspartat-Inkorporation, was auf eine intermediäre Neu-Beladung des Donormoduls hätte zugeführt werden können. Die Elongationsreaktion zum Dipeptid Asp-Phe scheint somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein. (b) die Produktmenge an Asp-Phe, die gebildet wird, ist für die Proteine II und III im Rahmen der Meßungenauigkeit als gleich zu bezeichnen. Das kann zum einen für eine funktionelle Beeinträchtigung der Te-Domäne sprechen. Wahrscheinlicher ist, daß die Te-Domäne schon die freie Aminosäure Phenylalanin abspaltet (siehe 5.2-19B), bevor eine Elongation zum Dipeptid Asp-Phe

stattgefunden hat. Auf diese Art wird dem Enzymkomplex ein Teil der bereits aktivierten Akzeptoraminosäure entzogen, so daß effektiv die Fusion der Te-Domäne nicht zu einem beschleunigtem *turn over* führt. Auch der Austausch (Te-Domäne von TycC6 beziehungsweise SrfC) oder die Art der Fusion der Te-Domäne (A-T versus T-Te-Fusion, siehe Abb. 6.2.1) hatte keinen Effekt auf die Geschwindigkeit der Produktbildung. Eine putative Substratspezifität der Te-Domäne wird in Kapitel 6.5 diskutiert. Dieses Kapitel gibt ebenfalls Aufschluß über die Möglichkeit Asp-Phe-spezifische Template unter Verwendung anderer Domänenfusionen – insbesondere solcher, die die beschriebene Spezifität der C-Domäne beachten – darzustellen.

Obwohl die Einzelreaktionen wie die Adenylierung und die Thiolierung einer hybriden dimodularen Peptidsynthetase durch die Einführung von artifiziellen Fusionen nicht beeinträchtigt schienen, so ist doch an den Gesamtprozeß einer nichtribosomalen Synthese das Zusammenspiel mehrerer an dem Vorgang beteiligter Domänen als Bedingung gestellt. Dieses Zusammenspiel bedarf wahrscheinlich intensiver, den Prozeß beeinflussender Domänen-Interaktionen, die unter 6.3 näher diskutiert werden .

6.2.2.4 Die Etablierung eines Ko-Expressionssystems mit dem 4'-PPAN-Gen *gsp*

Die heterologe Überproduktion von Peptidsynthetase-Modulen in ihrer *holo*-Form in *E. coli* konnte überhaupt erst durch die Etablierung eines Ko-Expressionssystem mit einem 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase-Gen möglich gemacht werden [83]. 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen sind CoA-abhängige Enzyme, die einen invarianten Serinrest, der Bestandteil von T-Domänen von Peptidsynthetasen ist, mit dem Ko-Faktor 4'-Phosphopantethein modifizieren. Durch diese posttranslationale Modifikation werden Peptidsynthetasen erst in ihre katalytisch aktive *holo*-Form überführt. Durch Klonierung des 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase-Gens *gsp* des Gramicidin S Biosynthese-Systems in das Expressionshelferplasmid pREP4 konnte eine Überproduktion von Gsp erreicht werden. Der Pool an Gsp führt dann *in vivo* zu einer posttranslationalen Modifikation von Peptidsynthetasen; die Aufreinigung der rekombinanten Enzyme führt direkt zur Isolierung der aktiven *holo*-Form. Die Funktionalität dieses Ko-Expressionssystems konnte durch einen Vergleich des Substratthiolierungsvermögens von rekombinanten Peptidsynthetasen, die in M15 [pREP4] beziehungsweise in dem Ko-Expressionstamm BL21λDE3[p*gsp*] überproduziert wurden, bewiesen werden.

6.2.2.5 β -Asp-Phe

Die Prozessierung des Dipeptids Asp-Phe an den unter Kapitel 5.2 beschriebenen dimodularen Peptidsynthetasen verläuft gerichtet. Nebenprodukte wie Asp-Asp, Phe-Phe oder Phe-Asp konnten nicht in signifikanten Mengen nachgewiesen werden. Trotzdem zeigte die massenspektrometrische Analyse von Reaktionsansätzen, daß noch ein zweites Produkt mit der Masse $m/z+1$ von 281,2 in einem konstanten Verhältnis von etwa 20% bezogen auf die Menge von Asp-Phe gebildet wurde. Ein Vergleich der massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster mit chemischen Standards zeigte, daß es sich bei diesem Produkt um β -Asp-Phe handelte (vergleiche Abb. 5.2-21 und Anhang E). Die Strukturen von α - und



β -Asp-Phe sind in Abb. 6.2-3 dargestellt.

Abb.6.2-3 Strukturen von α -Asp-Phe (links) und β -Asp-Phe (rechts)

Die Bildung von β -Asp-Phe durch die hybriden Peptidsynthetasen war unerwartet und für die Etablierung eines biotechnologischen Prozesses zur Darstellung von Asp-Phe nachteilig. So kann β -Asp-Phe nicht als Vorstufe für die Synthese von Aspartam dienen und müßte deshalb abgetrennt werden. Zudem wird die Ausbeute an α -Asp-Phe um den Anteil des β -verknüpften Produktes reduziert.

Die nichtribosomale Peptidsynthese setzt die Aktivierung der Substrataminosäuren als Adenylate voraus. Folgende zwei Szenarien wurden entworfen, nach deren Mechanismen die Synthese von β -Asp-Phe ablaufen könnte:

- die A-Domäne von SrfB2 diskriminiert nicht vollständig die β -ständige Carboxygruppe, sondern aktiviert auch diese zu einer Rate von etwa 20 %¹ bezogen auf die Rate der α -Carboxy-Aktivierung (vergleiche Abb. 6.2.4). Dies wäre eine der A-Domäne inhärente Eigenschaft, die in einer gewissen Unspezifität begründet wäre. Zu diesem Punkt kann man einwenden, daß die A-Domäne von SrfB2 eine der selektivsten Substrataktivierungen überhaupt aufweist und weder eine längere Seitenkette (dies entspricht der Aminosäure Glutamat), eine umgepolte Ladung der Seitenkette (entsprechend der Aminosäure Asparagin) noch eine D-konfigurierte Substrataminosäure Aspartat aktiviert. Insbesondere die Tatsache, daß eine D-konfigurierte Aminosäure Aspartat kein Substrat darstellt,

widerspricht der Vermutung, daß die β -ständige Carboxygruppe eine Substratgruppe sein könnte: Aspartat müßte "Kopf-über" in der Bindungstasche stecken, was zu einer Konfigurationsumkehr am α -C-Atom führt. Ebenso sollte man - wäre die Aktivierung der β -Carboxygruppe eine dem System eigene Eigenschaft – ein Surfactin-Analoga erwarten, das eine β -Peptidbindung enthält.

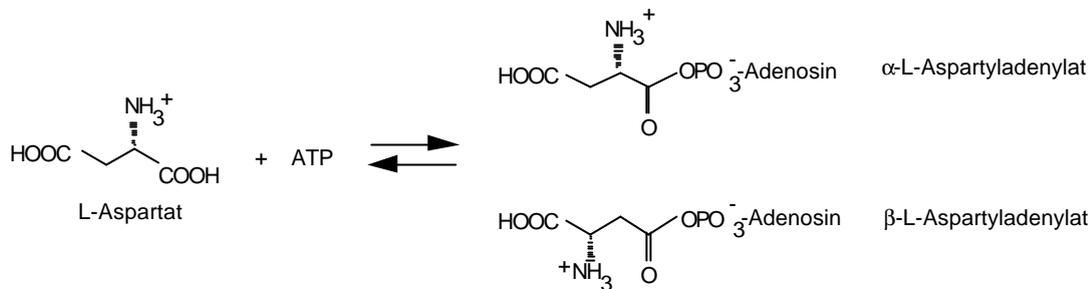


Abb. 6.2-4 Die Bildung von β -Asp-Phe ist Folge einer β -Carboxy-Adenylierung:

Um das α - zu β -Produktverhältnis von Asp-Phe zu erklären, beträgt das Aktivierungsverhältnis der α - und β -Carboxy-Gruppe etwa 80 : 20¹.

- die Bildung eines β -Asp-Phe ist Folge eines Umlagerungsprozesses. In 6.2.2.3 wurde argumentiert, daß die Elongationsreaktion wahrscheinlich der langsamste Schritt der Prozessierung eines Dipeptids Asp-Phe ist. Was passiert in der Zwischenzeit mit den als Phosphatanhydrid (Stufe der Adenylierung) beziehungsweise als Thioester (Stufe der Thiolierung) aktivierten Aminosäuren? Phosphatester sowie Thiole stellen gute organische Abgangsgruppen dar und so könnte der intramolekulare Angriff der β -Carboxylgruppe des Aspartats zur Bildung eines intermediären, fünfgliedrigen Anhydrids (2-Amino-Succinanhydrid) führen (vergleiche Abb 6.2-5). Dieses Anhydrid stellt selber eine reaktive Verbindung dar, die – in Umkehrung der Hinreaktion – wiederum geöffnet werden kann. Der induktive Effekt der Aminogruppe erhöht in diesem Fall den elektrophilen Charakter der β -ständigen Carboxygruppe, so daß sich eine Produktverteilung α - zu β -substituiertem Aspartat von ca. 70 : 30 ergibt. Tritt die intermediäre Zwischenstufe des 2-Amino-Succinanhydrids nicht mit Wasser in Kontakt, so daß keine Hydrolyse – und damit keine Unterbrechung der Katalyse – erfolgt, so führt ein verlangsamter Produktdurchsatz des Enzyms zu einem vorgeschalteten Gleichgewicht, in dem sich α - zu β -substituierte Aspartate ständig umlagern. Schließlich bestimmt die Lage dieses Gleichgewichts das Verhältnis der α - zu β -Asp-Phe-Bildung mit. Greift diese Hypothese, so ist die β -Asp-Phe-Bildung keine inhärente Eigenschaft des enzymatischen Systems, sondern eine Folge der langsamen Produktbildung. Zwei Gründe favorisieren diese Hypothese vor der in (1) genannten: das Produktverhältnis von 80 : 20 entspricht in etwa dem Verhältnis einer nichtenzymatischen

¹ Hier wird die Vereinfachung gemacht, daß α - und β -aktivierte Aspartate in gleichem Maße für *downstream*-Prozesse weiterverwendet werden.

Öffnung eines intermediären 2-Amino-Succinanhydrids. Desweiteren ließe sich auf diese Weise auch die im Vergleich zu anderen Aminosäuren schlechten Thiolierungswerte von Aspartat erklären: eine teilweise Hydrolyse des intermediären 2-Amino-Succinanhydrids entzieht dem System ständig einen Teil des aktivierten Precursors, die Thiolierungsrate erscheint niedriger als sie wahrscheinlich in Wahrheit ist. Letzterer Punkt spricht zudem für eine 2-Amino-Succinanhydridbildung von der Stufe des Thioesters aus.

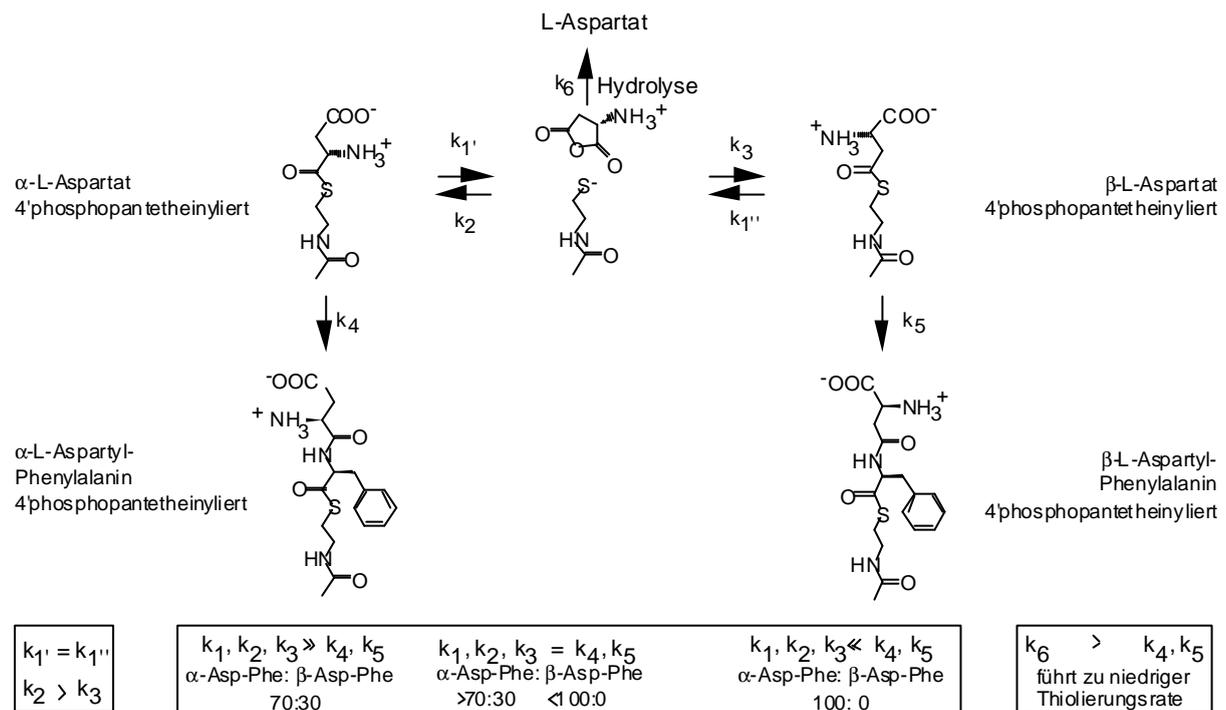


Abb. 6.2-5 Die Entstehung von β -Asp-Phe ist Folge eines Umlagerungsprozesses:

Eine verlangsamte Elongationsreaktion (k_4) läßt einen kompetitiven Umlagerungsprozess (k_1 - k_3) zu, in dem sich das als Thioester gebundene Aspartat über ein cyclisches Anhydrid umlagert. Das beobachtete α - zu β -Produktverhältnis von Asp-Phe wäre dann eine Folge des unterschiedlich nukleophilen Charakters der beiden Carboxy-Gruppen im Anhydrid (k_3 : k_2 = 30: 70).

Die mechanistische Klärung des Phänomens der β -Asp-Phe-Bildung ist eine wichtige offene Frage. Studien zum Abfangen eines putativen intermediären 2-Amino-Succinanhydrids mit einem starken Nukleophil (Hypothese 2) beziehungsweise Studien zum Nachweis der β -Carboxy-Aktivierung durch spezifisches O-labeling (Hypothese 1) sind in Vorbereitung.

6.2.3 Über die Steuerung der nichtribosomalen Peptidsynthese an modularen Multidomänen-Enzymen

6.2.3.1 Identifizierung von Interdomänen Linker-Regionen

Modulare Strukturen von Proteinklassen sind in der Natur weitverbreitet: neben den metabolischen Prozessen der Synthese von Macrolid-Polyketiden [196] werden auch

physiologische Prozesse wie Signaltransduktion und Transkriptionskontrolle durch Proteine modularer Domänenstruktur bewerkstelligt. Auch Peptidsynthetasen weisen eine modulare Struktur repetitiver Domänenarrangements auf. Das Verständnis der Funktion der einzelnen Domärentypen wurde in den letzten Jahren beträchtlich erweitert durch die individuelle biochemische Charakterisierung rekombinanter Proteinen-Domänen [41, 47, 60, 111, 197]. Jedoch kann die Charakterisierung von Einzelreaktionen der nichtribosomalen Peptidsynthese nicht zum vollen Verständnis des Mechanismus des "*intermediate channeling*" von einer katalytischen Domäne zur nächsten und von einem Modul zum nächsten beitragen. Spiegelt die Summe der individuellen Reaktionen wirklich die enzymatische Komplexität von modularen Multidomänen-Enzymen wie Peptidsynthetasen wider? Was sind die Koordinatoren des Informationsflusses zwischen benachbarten Modulen? Einzelne Domänen sind laut vorgeschlagenem Mechanismus an mehreren Einzelreaktionen beteiligt: so hat jede T-Domäne ein Aminosäuresubstrat von der im N-Terminus liegenden A-Domäne zu übernehmen und sie im folgenden unter Wechselwirkung mit der im C-Terminus lokalisierten C-Domäne weiterzureichen. Sind optionale Domänen wie die E-Domäne Bestandteil eines Moduls, so hat auch ein Kontakt mit dieser Domäne zu erfolgen. Was programmiert die T-Domäne zur Ausführung dieser verschiedenen Prozesse? Im einzelnen wird sogenannten Linker-Regionen, die modulare Strukturen verbinden, eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von funktionellen Protein-Protein-Interaktionen zugeschrieben [198, 199]. Linker-Regionen werden per Definition als kurze (etwa 5-15 Aminosäurereste lange) Abschnitte gemeinhin geringer Primärsequenz-Konservierung aber wahrscheinlich ausgeprägter Sekundärstruktur beschrieben. Ihnen kommt zwar keine katalytische Funktion zu, doch wirken sie als Adaptoren, die die Ausrichtung von benachbarten katalytischen Domänen definieren. Ein prominentes Sekundärstrukturmotiv von Linkern der Src-Kinase Familie ist die Polyprolin-Helix, die als eine Art Scharnier, Schalter-Bewegungen von Domänen forciert [200]. Inter-Peptid Linker-Regionen von Polyketidsynthetasen sollen sogenannte α -"*coiled-coils*"-Struktur motive bilden [201]. Diese werden als Mittel zur Induktion einer Hetero-Dimerbildung angesehen und sind – wie Studien beweisen - deshalb essentielle Faktoren für die Funktionalität von Polyketidsynthetasen [202]. Linkern wird auch eine Rolle als Kommunikator zugesprochen, die die Interaktion von Domänen erst ermöglicht. So ist die *in trans* Wechselwirkung von der Te-Domäne des DEBS-Systems offenbar nur schwach [203]. Eine analoge Vermutung lässt sich aus den Ergebnissen der Sektion des Peptidsynthetase-Moduls EntF schließen: hier waren die *in trans*-Wechselwirkungen zwischen A- und T-Domäne auch nur schwach und führten zu einem Versagen der Thiolierungsreaktion [204]. Konsistent hiermit lassen sich Systemfremde Domänen durch die Fusion über Linker-Regionen in ein – dann artifizielles – System einbinden [191, 202].

Wie identifiziert man Linker-Regionen? Vergleichende Sequenzanalysen können herangezogen werden, um die ungefähre Position von Domänengrenzen zu definieren. Sequenzmotive, die zwar nicht wichtig für die katalytische Funktion, aber dennoch essentiell für die korrekte Faltung von Domänen sind, liessen sich durch die Überproduktion rekombinanter, distinkter Protein-Domänen identifizieren [28, 148]. So ist die Essentialität des N-terminalen Proteinabschnitts von A-Domänen für die Ausbildung der globulären Struktur belegt [66]. Proteolytische Verdauung von Peptidsynthetasen helfen zusätzlich die Domänengrenzen abzuschätzen [131]. Auf diese Weise konnte in dieser Arbeit die Identifizierung von Linker-Regionen, die Peptidsynthetasen-Domänen verbrücken, vorgenommen werden (siehe Anhang C). Die identifizierten Linker-Regionen weisen – wie erwartet - keine Primärstruktur-Konservierung auf und ihre Länge schwankt zwischen 6 und 13 Aminosäuren. Die Linker-Region zwischen A- und T-Domänen wurde benutzt, um artifizielle Fusionen zur Darstellung von Hybrid-Peptidsynthetasen herbeizuführen. Die Fusionsstelle wurde dabei jeweils in den 3'-Bereich des für die Linker-Region kodierenden DNA-Abschnitt gelegt, das heißt, Fusionen von Domänen enthalten die Linker-Region der N-terminalen Domäne [202]. Durch Einführung einer artifiziellen Restriktionsschnittstelle wurde die zugehörige Proteinsequenz der Linker-Region an zwei Positionen verändert. Die generelle Funktionalität der hybriden Fusionsproteine schien, wie durch die Möglichkeit einer heterologen Substratthiolierung bewiesen werden konnte, nicht beeinträchtigt zu sein. Ebenso schien die Darstellung von Proteinen, die über Linker-Regionen fusioniert wurden, die Effizienz der katalytischen Einzelaktivitäten der nichtribosomalen Peptidsynthese nicht zu beeinflussen. Dies spricht ebenfalls für die rein strukturelle Bedeutung von Linker-Regionen. Für Polyketidsynthetasen konnte gezeigt werden, daß Intra- und Interdomänen-Linker zwischen ACP- und Ketosynthase-Domänen funktionsbedingte Unterschiede auch auf der Basis der Primärsequenz aufweisen und daß für die funktionelle Darstellung von Interdomänen-Fusionen, die Verwendung von Interdomänen-Linkern erforderlich ist [191, 202]. Die Untersuchung einer analogen Divergenz von Linker-Regionen zwischen T- und C-Domänen von Peptidsynthetasen wird durch die Tatsache erschwert, daß die meisten N-terminalen C-Domänen auf eine E-Domäne folgen und - *vice versa* - die meisten internen C-Domänen auf eine T-Domäne. Eine etwaig beobachtete Divergenz von Inter- und Intradomänen Linker-Regionen in Peptidsynthetasen könnte also noch andere Gründe haben.

Die Identifizierung von Linker-Regionen erlaubte eine genauere Definition von Domänengrenzen, die im folgenden benutzt wurde, um ein neues Stecksystem zur Rekombination von Peptidsynthetase-Domänen zu etablieren.

6.2.3.2 Protein-Protein-Interaktionen, die sich in der Primärsequenz von Domänen wiederfinden

Wie gelingt nun die funktionelle Koordination einer Domäne mit ihren Nachbardomänen? Die Rolle von Linker-Regionen an der Ausrichtung von katalytischen Domänen zur Gewährleistung mechanistischer Prozesse wurde beschrieben. Dennoch benutzen Peptidsynthetasen variable Domänenorganisationen: so scheint die Verteilung verschiedener Module auf eine oder mehrere Peptidketten eher willkürlichen Prinzipien zu gehorchen. Ebenso kann der symmetrische repetitive Aufbau von Modulen durch den Einschub von optionalen Domänen wie E-Domänen unterbrochen werden. Wie adaptiert sich beispielsweise ein Domärentyp wie die C-Domäne an eine N-terminale-, beziehungsweise intermolekulare Domänenorganisation oder an den Einschub einer optionalen Domäne?

Im Zuge der Sequenzanalyse von ca. 50 C-Domänen aus verschiedenen Peptidsynthetasen des Genus *Bacillus* konnte gezeigt werden, daß die beschriebene relative Heterogenität dieses Domärentypes (sie variiert zwischen 25 und 60%), in erster Linie die Folge einer strukturellen Anpassung an unterschiedliche benachbarte Domärentypen ist (siehe dazu Abb.6.2-6).



6.2-6 Typische Formen der Lokalisation von Kondensationsdomänen in Peptidsynthetasen des Genus

Bacillus: a) intramolekulare Lokalisation zwischen PCP- und Adenylierungsdomäne, b) intramolekulare Lokalisation zwischen Epimerisierungs- und Adenylierungsdomäne, c) intermolekulare Organisation zwischen PCP- und Adenylierungsdomäne, d) intermolekulare Organisation zwischen Epimerisierungs- und Adenylierungsdomäne.

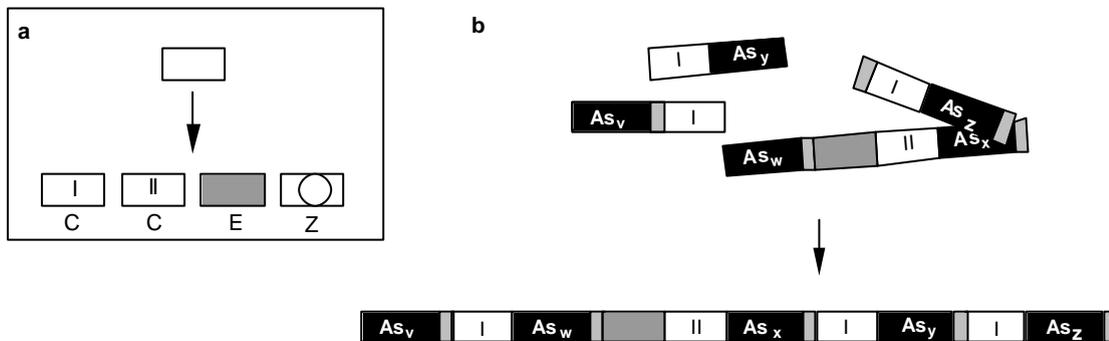
So konnte gezeigt werden, daß C-Domänen, die im C-terminalen Bereich von Elongationsdomänen zu finden sind, klar von denjenigen, die im C-terminalen Bereich von T-Domänen liegen, zu unterscheiden sind und daher zwei Untergruppen von C-Domänen darstellen. Auf der anderen Seite spiegelt sich die Unterscheidung zwischen internen und N-terminalen C-Domänen *nicht* in ausgedehnten Primärsequenzunterschieden wieder, so daß diese Unterschiede eher marginaler Art sind (vergleiche Anhang D).

Wie läßt sich dieser Befund erklären? Zum einen kann offenbar der "Aktionsradius" von katalytischen Domänen durch die Verknüpfung über scharnier-artige Linker-Regionen definiert erweitert werden. Zum anderen scheint ein Anteil der Information, der die Interaktion verschiedener Domänen steuert, ein inhärenter Faktor der Domänen selbst zu sein. Dieser determiniert sich über die Primärsequenz und - daraus abgeleitet – vermutlich auch über eine veränderte Sekundär- und Tertiärstruktur der Domäne.

Eine analoge Divergenz in der Primärstruktur der C-terminalen Hälfte von T-Domänen in Abhängigkeit der folgenden Domäne (C- oder E-Domäne) wurde identifiziert [80].

Auf eine vermutete funktionelle Homologie von G- und E-Domänen ist bereits kurz in der Einleitung eingegangen worden (siehe 2.2). Es konnte nun gezeigt werden, daß die phylogenetische Distanz der zwei identifizierten Typen von Kondensationsdomänen (siehe Anhang D) untereinander kaum größer ist als die zu den E-Domänen. Es ist anzunehmen, daß C- und E-Domänen einen gemeinsamen evolutionären Vorläufer besitzen [21], und daß manche mechanistischen Prinzipien von C- und Epimerisierungsreaktion gleich sind. Die divergente Entwicklung von C- und E-Domänen ging wahrscheinlich mit der Duplikation der zugehörigen genetischen Kopien einher.

Die Unterscheidbarkeit von Subformen an C-Domänen in Abhängigkeit der Lokalisation läßt vermuten, daß multimodulare Peptidsynthetasen einst durch Rekombination und Duplikation nicht einzelner Domänen, sondern ein- oder mehrmodularer Domänenarrangements entstanden sind (siehe Abb.6.2.7).



6.2-7 Kondensationsdomänen, Epimerisierungsdomänen und Zyklisierungsdomänen haben einen gemeinsamen Vorläufer (a) : Vorschlag für die Entstehung multimodularer Peptidsynthetasen aus etablierten Multidomänen-Organisationen (b).

Die identifizierte Divergenz von C-Domänen hat weitreichende Folgen für kombinatorische Ansätze zur Erzeugung artifizierlicher Peptidsynthetase-Template: so ist zu erwarten, daß die artifizielle Fusion einer C-Domäne an eine T-Domänen nur dann funktionell ist, wenn die C-Domäne auch im nativen Zusammenhang im C-Terminus einer T-Domäne lag. Analoges gilt für die Fusionsstrategie einer C-Domäne an eine E-Domäne. C-Domänen scheinen spezifisch die Konfiguration ihrer Substrate zu erkennen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Hybridpeptidsynthetasen folgen diesen aufgestellten Regeln.

6.2.4 Die Etablierung eines dimodularen *in trans*-Systems von hybriden Enzymen

6.2.4.1 Der Einfluß einer Hybridfusion auf die Funktionalität einer Peptidsynthetase

In Abschnitt 5.4 wurde die Etablierung eines dimodularen *in trans*-Systems beschrieben, das auf dem Modellsystem TycA/ProCAT aufbaut. Durch Austausch der nativen Initiations-A-Domäne von TycA durch ein natives Elongationsmodul ähnlicher Spezifität konnten zwei Effekte untersucht werden: (a) wie die Repositionierung eines nativen Elongationsmodul in die Initiationsposition die Fähigkeit des Systems, das Produkt DPhePro-DKP zu bilden beeinflusst und (b) welchen Einfluß die Einfügung einer artifiziellen A-T-Fusion auf die Substratthiolierung hat. Da auch das konstruierte hybride TycA-Derivat, **VI**, eine Phenylalanin-abhängige Aktivierung zeigte, konnte die Thiolierungsreaktion vom Standpunkt der Substrataminosäure als homolog bezeichnet werden.

Mit Hilfe der Konstruktion des hybriden TycA-Derivates **VI** konnte belegt werden, daß (a) die Geschwindigkeit der Substratthiolierung durch Einfügung der A-T-Fusion in diesem Fall beeinträchtigt wird, und daß (b) wahrscheinlich als Folge dieser verlangsamten Substratthiolierung auch die Geschwindigkeit der Produktbildung von 1 min^{-1} auf 0.3 min^{-1} abnimmt. Es gibt keinen Hinweis, daß die Substratthiolierung aufgrund der Repositionierung des TycB2-Moduls verlangsamt wird (siehe dazu auch den Abschnitt 6.2.5). Es konnte angenommen werden, daß die Spezifität der Substratthiolierung im Falle von TycA und seinem Hybrid **VI** durch die Stärke der vorgeschalteten Adenylierungsreaktion diktiert wird. So findet sich die Phenylalanin-abhängige Adenylierungsreaktion von TycA in der Phenylalanin-Thiolierung wieder, ebenso wie im Falle des hybriden Proteins **VI**, sich die Tryptophan-Adenylierungsreaktion in der Tryptophan-Thiolierung ausdrückt. Daraus kann gefolgert werden, daß die T-Domäne offensichtlich nicht zwischen diesen Aminosäuresubstraten selektiert (siehe auch Abschnitt 6.5).

Für die Bildungsgeschwindigkeiten der Produkte D-Phe-Pro-DKP und D-Trp-Pro-DKP sind wahrscheinlich noch andere Faktoren als die Effizienz der Adenylierung oder der Thiolierung verantwortlich. So kann vermutet werden, daß auch die Geschwindigkeit der Elongation und der Produktabspaltung einen Einfluß auf die Produktbildungsrate hat.

Neben der Fähigkeit zur Bildung von D-konfigurierten DKPs wurde auch untersucht, ob Nebenreaktionen, die zu anderen Produkten führen, stattfanden. Interessanterweise konnte unter Verwendung der Substrataminosäure Homo-Phenylalanin auch ein L-konfiguriertes Homo-Phe-Pro-DKP nachgewiesen werden. Das HPLC-MS-Diagramm, das den Produktnachweis zeigt, ist in Abb. 6.2-8 dargestellt.

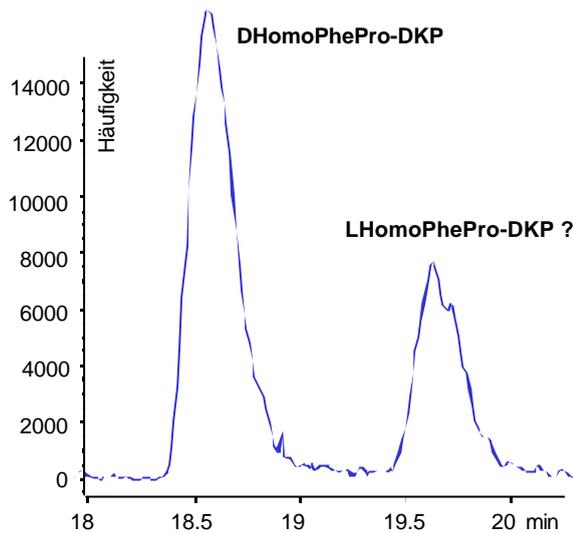


Abb. 6.2-8 Identifizierung eines LHomo-Phe-Pro-DKP?

HPLC-MS-Diagramm der Produktanalyse des Systems TycA/ProCAT inkubiert mit den Substrataminosäuren LHomo-Phenylalanin und Prolin. Während mit allen anderen getesteten Substrataminosäuren nur ein Produktpeak korrespondierend zu dem D-konfigurierten DKP identifiziert werden konnte, tritt mit Homo-Phenylalanin noch ein zweiter Produktpeak gleicher Masse auf, der wahrscheinlich einem L-konfiguriertem Homo-Phe-Pro-DKP entspricht.

Neben den beschriebenen DKPs bildeten die Systeme TycA/ProCAT und **VI**/ProCAT auch lineare Produkte wie L-konfiguriertes PhePhe und TrpTrp. Diese Dipeptide werden nicht an dem dimodularen Enzym-Templat gebildet, da für ihre Bildung nur die Anwesenheit von TycA beziehungsweise **VI** notwendig ist. Vermutlich reichte die Adenylierung der Substrataminosäure für diesen Prozeß aus: die aktivierte Carboxygruppe wurde daraufhin von einer freien Aminosäure aus der Lösung unter Bildung eines Dipeptides abgefangen.

6.2.4-2 Die Erweiterung des Systems zur Darstellung hybrider TycA- und ProCAT-Derivate

Unter 5.4.3 wurde die Darstellung weitere hybrider TycA- (analog zu **VI**) und ProCAT-Derivate beschrieben, die durch A-T beziehungsweise C-A-Fusionen konstruiert wurden. Diese hybriden Proteine wurden in Kombinationen von jeweils einem TycA- und einem

Tab. 6.2-3: Biochemische Charakterisierung von TycA und ProCAT-Hybriden
Reaktion

	ATP-PP _i	Substrat- thiolierung	Epimeri- sierung	Produktbildung (in Assays, die TycA- und ProCAT- Hybrid enthalten)
Protein_(TycA-Hybrid)				
A _(BacA1) -TE _(TycA) (X)	√	√	√	- (lineare L-konfigurierte Dipeptide)
A _(TycC1) -TE _(TycA) (VII)	-	-	-	-
A _(SrfB2) -TE _(TycA) (VIII)	(√)	-	-	-
A _(TycB2) -TE _(TycA) (VI)	√	√	√	√ (DKP-Bildung DPhePro, DTrpPro, auch lineare L-konfigurierte Dipeptide)
A _(TycC3) -TE _(TycA) (IX)	√	-	-	- (lineare L-konfigurierte Dipeptide)
Protein_(ProCAT-Hybrid)				
C _(TycB1) -A _(TycC5) T (XI)	√	√		- (lineare L-konfigurierte Dipeptide)
C _(TycB1) -A _(TycB3) T (XII)	√	√		- (lineare L-konfigurierte Dipeptide)

ProCAT-Hybrid in Produktbildungsreaktionen eingesetzt. Eine Bildung von Produkten, die vollständig an dem dimodularen Enzym-Templat geführt worden wäre, konnte in keinem der untersuchten Fälle nachgewiesen werden. Trotzdem bilden diese Ergebnisse einen interessanten Einblick über die Faktoren, die eine Bildung von Produkten durch ein dimodulares *in trans*-System bedingen. Diese Faktoren können als vielschichtig identifiziert werden. In tabellarischer Form sind für die nachfolgende Diskussion relevante Punkte aufgeführt (Tab. 6.2-3).

(1) Die Adenylierungsreaktion schien nicht völlig unbeeinflusst von der Art der verwendeten A-T-Domänenfusion zu sein. Die A-Domänen von TycC1 und SrfB2 sind bereits in aktiver Form als distinkte rekombinante Proteine heterolog überproduziert worden [28]. In den hybriden TycA-Derivaten **VII** und **VIII** war eine Aminosäure-abhängige ATP-PP_i-Austauschreaktion dagegen nicht, beziehungsweise nur sehr schwach zu beobachten. Eine Beeinträchtigung der Adenylatbildung durch eine Manipulation variabler konformativer Zustände ist beschrieben worden [131, 205] (siehe hierzu auch Kapitel 6.5). Sektion der A-Domäne von EntF von der T-Domäne ging ebenfalls einher mit einer Reduktion der Substrataffinitäten und katalytischen Adenylierungsaktivität [204].

(2) Die Funktionalität der A-T-Domänenfusion ist nicht in allen untersuchten Fällen gegeben. So konnte die Substrataminosäure Aspartat nicht als Thioester in das Protein **VIII** gebunden werden. Auch der Transfer von Tyrosin auf die T-Domäne des Proteins **IX** erfolgte nicht. Ob eine funktionelle A-T-Domänenfusion alleine durch die Verwendung einer Linker-Region aufrechterhalten wird oder ob Faktoren, wie Protein-Protein-Wechselwirkungen eine weitere Determinante für die Funktionalität darstellen, ist nicht bekannt. Ist letztere Überlegung richtig, so würde sicherlich die Identität der fusionierten A-Domäne zu TycA (der nativen A-Domäne) eine wesentliche Rolle für die Funktionalität von artifiziellen A-T-Fusionen spielen. Es gibt mehrere Beispiele in der Literatur, die eine Unfähigkeit einer *in trans*²-Beladung von getrennten A- und T-Domänen zeigen [84, 85]. Interessanterweise ist eine solche Inkompatibilität einer *in trans*-Beladung auch zwischen künstlich getrennten homologen Domänen von EntF beobachtet worden [204]. Welche Faktoren die physiologische Funktion und Spezifität von natürlichen *in trans*-Systemen wie die der A-Domänen von YbtE (siehe Abb. 6.2-9) [16], MbtE [19] oder PchD [98] determiniert, ist nicht bekannt. Offenbar scheinen bei natürlichen *in trans*-Systemen die funktionelle Interaktionen aber nach anderen Regeln gewährleistet zu sein als bei natürlichen *in cis*-Systemen: so könnte der evolutionäre Druck einer notwendigen spezifischen Interaktion von A- und T-Domänen *in cis* nicht aufrecht erhalten sein, da die kovalente Verbindung beider Domänen eine Verfügbarkeit der

² Der Begriff "*in trans*-Beladung" bezieht sich hier auf die Thiolierungsreaktion. Er ist somit nicht zu verwechseln mit einer Dipeptidbildung *in trans*!

Domänenpartner garantiert [204]. Hier ist wiederum auf die Rolle von Interdomänen-Linkern zu verweisen (siehe hierzu Kapitel 6.3.1) [206].

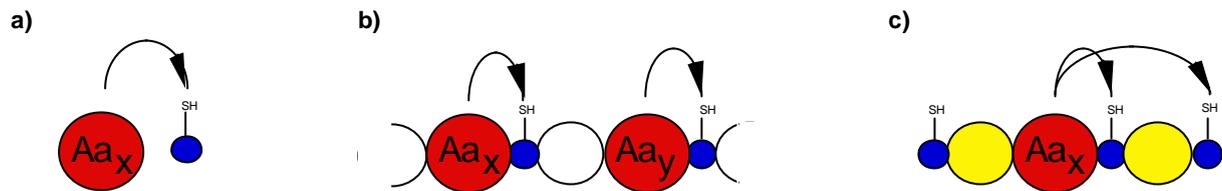
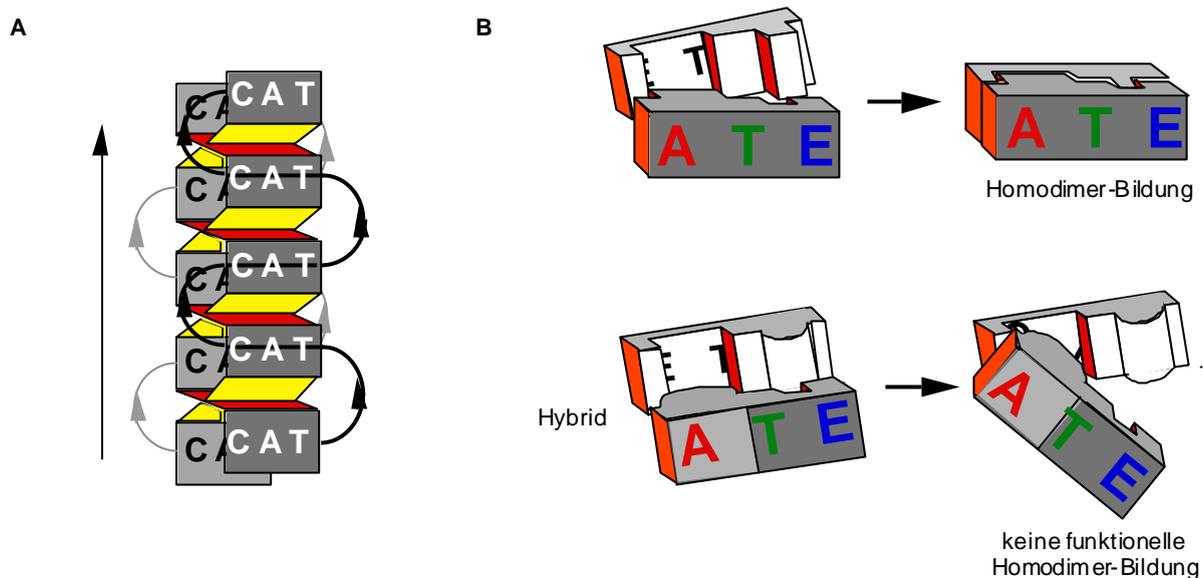


Abb. 6.2-9 Formen unterschiedlicher Thiolierungsreaktionen:

a) *in trans*-Thiolierung wie beispielsweise beobachtet zwischen den Proteinen MbtA/MbtB (Mycobactin-Biosynthese, [19]), PchA/PchB (Pyochelin-Biosynthese, [98]) oder AcmA/AcmB (Actinomycin-Biosynthese, [207]); b) *in cis*-Thiolierung wie gemein beobachtet in multimodularen Systemen; c) eine ungewöhnliche Form der *in cis*-Thiolierung wie beobachtet in der Biosynthese von Yersiniabactin (HMWP11, [118]).

(3) Weder unter Verwendung des nichthybriden Akzeptorproteins ProCAT noch der hybriden ProCAT-Derivate **XI** und **XII** konnte eine Bildung von Dipeptiden oder DKPs beobachtet werden. Für die hybriden Proteine **XI** und **XII** unterstreicht dies die inzwischen beschriebene Intoleranz von C-Domänen, nicht-natürliche Akzeptoraminosäuren zu verknüpfen [95]. Erstaunlicherweise war aber auch in einer Produktbildungsreaktion mit dem TycA-Derivat **X** und ProCAT kein erwartetes DKP Dlle-Pro zu detektieren. Elongationskinetiken dieses Systems deuteten auf die Inkompatibilität dieser beiden Proteine hin. Dieser Befund ist um so erstaunlicher, da Herr Uwe Linne zeigen konnte, daß die Aminosäure Isoleucin an dem hybriden Protein **X** nicht nur thioliert, sondern auch epimerisiert wird [103].

Über die Gründe hierfür kann nur spekuliert werden. Durch die Bildung eines hybriden Enzym-Templates kommt es aber womöglich zu einer gestörten Quartärstruktur mit dem Akzeptorprotein ProCAT, die eine funktionelle Kommunikation beider Proteine somit unterbindet. Ginge man von der Überlegung aus, daß Peptidsynthetasen als Homodimere arbeiten [208], so könnte alternativ die Erklärung des Misslingens einer Dlle-Pro-DKP Bildung auch in einer unterbrochenen Dimerbildung des hybriden Proteins **X** gesucht werden. Diese Möglichkeit, für die es noch keine experimentellen Beweise gibt, ist graphisch in Abb. 6.4-5 illustriert.



6.2-10 Arbeiten Peptidsynthetasen als Homodimere?

(A) Abgeleitet von der Erkenntnis, daß modulare Polyketidsynthetasen des Typs I funktionelle Homodimere bilden, kann die Hypothese aufgestellt werden, daß Peptidsynthetasen ebenfalls eine solche funktionelle Quartärstruktur bilden. In dieser orientieren sich die Domänen eines Moduls in einer Kopf-Schwanz-Anordnung, während die Module selber eine Kopf/Kopf-Schwanz/Schwanz-Anordnung annehmen. Intermediate werden danach wechselweise an beiden Proteinsträngen synthetisiert. (B) Die Darstellung von hybriden Modulen kann die Homodimer-Bildung eines Moduls durch Störung von Domänen-Domänen-Kontakten beeinflussen, so daß kein funktioneller Synthese-Komplex formiert wird. Dargestellt als Puzzle-artige Box ist das Protein TycA (oben) und ein TycA-Hybrid (unten).

Zusammenfassend kann behauptet werden, daß die Etablierung eines *in trans*-Systems von hybriden Peptidsynthetasen das zusätzliche Risiko der Störung einer Hetero-Quartärstruktur in sich bergen könnte. Ermutigende Ergebnisse zur Darstellung von hybriden *in cis*-Systemen (siehe Kapitel 5.2 und 5.5) zeigen, daß die Ausbildung einer funktionellen Domäneninteraktion, die die Prozessierung von kurzen Peptiden dirigiert, durch eine kovalente Fusion von Domänen besser gewährleistet ist.

6.2.5 Die Etablierung eines dimodularen *in cis*-Systems von hybriden Enzymen

6.5.1 Die *de novo*-Synthese von Dipeptiden an spezifischen nichtribosomalen Enzym-Templaten

In Kapitel 5.5 wurde die Etablierung eines Stecksystems von Peptidsynthetase-Domänen vorgestellt, das es erlaubte, durch *in cis*-Fusion dimodulare Enzym-Template definierter Spezifität *de novo* darzustellen. Hierzu wurde von der Identifizierung von Linker-Regionen profitiert, durch die eine systematische Austauschbarkeit von homologen Domänenorganisationen möglich war. Die Domänenfragmente, die zur Darstellung der in Kapitel 5.4. und 5.5 beschriebenen Konstrukte benutzt wurden, sind durch die Verwendung

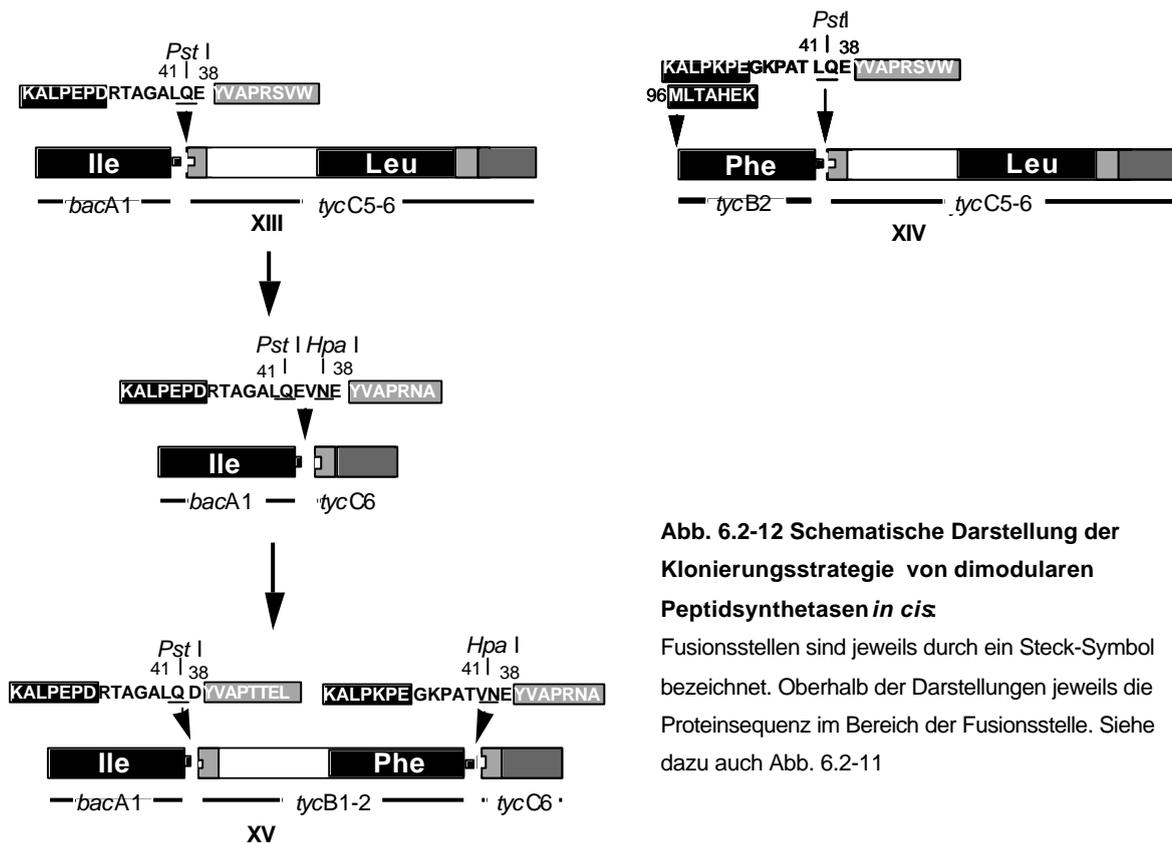


Abb. 6.2-12 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von dimodularen Peptidsynthetasen *in cis*

Fusionsstellen sind jeweils durch ein Steck-Symbol bezeichnet. Oberhalb der Darstellungen jeweils die Proteinsequenz im Bereich der Fusionsstelle. Siehe dazu auch Abb. 6.2-11

Die biochemische Charakterisierung dieser hybriden dimodularen Enzym-Template konnte einen Einblick geben, welche Faktoren die Produktbildung an artifiziellen Peptidsynthetasen beeinflussen.

Aufgrund der gemachten Beobachtung, daß C-Domänen eine deutliche Toleranz für nicht-kognate Aminosäuren der Donorposition besitzen [95], wurde in dem in Kapitel 5.5 beschriebenen System die C-Domäne des Akzeptormoduls verwendet. Diese Maßnahme ist vermutlich als der Hauptgrund für den besseren *turn-over* der hier beschriebenen Enzym-Template im Vergleich zu den Asp-Phe-Template des Kapitels 5.2 anzusehen. Die Vorgabe der Verwendung von C-Domänen der Akzeptormodule in hybriden Template läßt zwei Arten von Domänenfusionen zu (siehe Abb. 6.5-2): die eine verwendet T-C Fusionen und ist somit – definiert man ein Modul als eine Domänenanordnung von CAT – als intermodulare Fusion zu bezeichnen. Die andere – intramodulare – Fusion fügt die hybride Stelle zwischen A- und T-Domäne ein. A-T Fusionen wurden in dieser Arbeit als vorteilhaft gegenüber von T-C Fusionen angesehen, da die Funktionalität dieser Hybridstelle durch die Fähigkeit die Substrataminosäure als Thioester zu binden, einfach experimentell überprüft werden kann. Die Funktionalität von artifiziellen T-C Fusionen kann dagegen nicht unmittelbar untersucht werden, da kein direkter Assay zur Beobachtung der Kondensationsreaktion zur Verfügung steht.



6.2-13 Schematische Darstellung von Domänenfusionen, bei denen die Kondensationsdomäne des Akzeptormoduls verwendet wird links, eine intramodulare A-T-Fusion; rechts, eine intermodulare T-C-Fusion.

Mit der Darstellung von funktionellen TycA-Hybriden und der Asp-Phe-Template **III** und **IV**, die A-T Fusionen verwendeten, konnte vermutet werden, daß die heterologe Substratthiolierung offenbar maßgeblich eine Funktion der Spezifität der vorgeschalteten A-Domäne ist (siehe dazu Abb. 6.5-3). Diese Hypothese konnte nun mit der Charakterisierung der in Kapitel 5.5 beschriebenen dimodularen Hybriden weiter unterstützt werden. So ist insbesondere ein Vergleich der Thiolierung aromatischer Aminosäuren in den Proteine **XIV** und **XV** interessant. Die Adenylierung von aromatischen Aminosäuren erfolgt in beiden Proteinen durch das selbe Modul (TycB2), die Substratthiolierung involviert aber die Domänenfusion und somit unterschiedliche T-Domänen (TycC5 beziehungsweise TycC6). So offenbaren sich Unterschiede in der Spezifität der Substratthiolierung: in **XIV** ist die Tryptophan-Thiolierung auf die T-Domäne von TycC5 sehr effizient, während die Thiolierung von Phenylalanin langsam verläuft und auf einem niedrigem Niveau verbleibt. Die Substratthiolierung auf die T-Domäne von TycC6 in **XV** scheint weniger restriktiv: Tryptophan und Phenylalanin, aber auch Tyrosin zeigen eine signifikante Thiolierungsreaktion. Ob man aus diesen Daten auf eine Selektivität von T-Domänen schließen kann, ist fragwürdig. Offenbar gibt es aber noch andere Faktoren als die Effizienz der Adenylierung, die die Substratthiolierung beeinflussen: so zeigen einige AT Fusionen von TycA-Hybriden (siehe 5.4.3), daß eine artifizielle Fusion eine heterologe Substratthiolierung ganz unterbinden kann. Auch die Thiolierungskinetiken der Aminosäuren Leucin und Isoleucin in dem hybriden Enzym **XV** lassen eine Beeinträchtigung der Substratthiolierung erkennen. Es ist aber festzustellen, daß die ATP-PP_i-Austauschreaktion kein direktes Maß für die Adenylatbildung ist; sie beobachtet die Rückreaktion, in der Aminosäure und ATP rückgebildet werden [205, 118]. Auch die unterschiedliche Stabilität von Adenylaten als Funktion einer Hydrolyse-Zugänglichkeit ist beschrieben worden [131]. Eine direkte Reflexion des Aktivitätsmusters der ATP-PP_i-Austauschreaktion auf die Spezifität der Thiolierungsreaktion kann somit trügerisch sein.

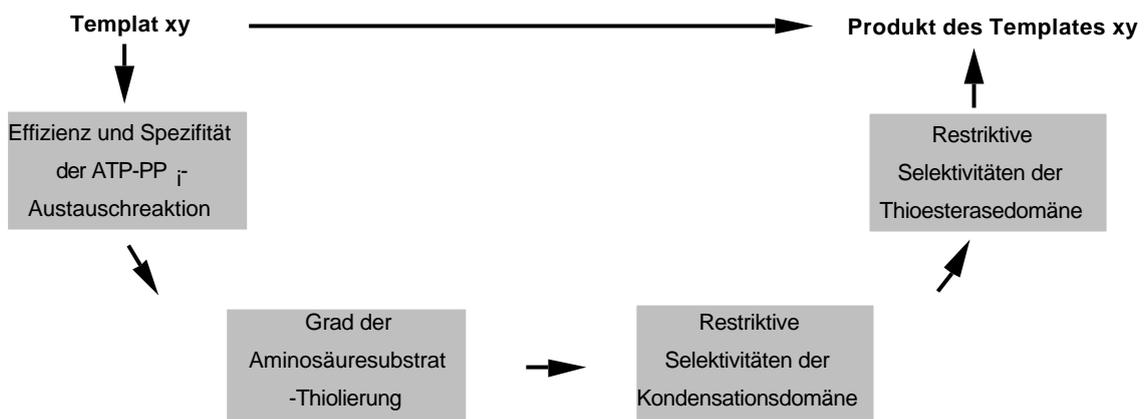
In diesem Zusammenhang war es erstaunlich festzustellen, daß auch die kinetischen Konstanten einer Adenylierungsreaktion einem Einfluß der benachbarten Domänen unterliegen. Durch die Bestimmung von Konstanten für die Aminosäuresubstrataffinitäten konnte die Beobachtung untermauert werden, daß die Proteine **XIV** und **XV** ein unterschiedliches Aktivitätsmuster von aromatischen Aminosäuren aufwiesen, obwohl in beiden Fällen diese Aktivierung auf das selbe Modul (TycB2) zurückzuführen war. Offenbar wird die definierte katalytische Aktivität einer A-Domäne durch Nachbardomänen moduliert [131]. Es gibt Daten, die belegen, daß die Thiolierungsreaktion einen Einfluß auf die

kinetischen Parameter der ihr vorgeschalteten Adenylierung hat. So induziert eine Thiolierungsreaktion die Hydrolyse von Adenylaten [118]. Auch der Einfluß des "Herauslösens" einer katalytischen Domäne aus einem umfassenderen Multidomänen-Komplex sollte beachtet werden. Die Reduktion der katalytischen Fähigkeiten der A-Domäne von EntF nach der Sektion von der nativen Tholierungsdomäne ist beschrieben worden [204]. Durch die Konstruktion der Enzym-Templates **XIII**, **XIV** und **XV** konnte die jüngst gemachte Aussage untermauert werden, daß die verwendete Te-Domäne von TycC6 künstlich verkürzte Dipeptide von den Enzym-Templaten abspaltet. Untersuchungen an artifiziellen Templaten, die eine Repositionierung des terminierenden Moduls der Tyrocidin Synthetase C beinhalteten, belegen mittlerweile eindeutig die Rolle der Te-Domäne an der Termination von Peptiden [110]. Diese Ergebnisse komplementierten die *in vivo*-Untersuchungen zur Darstellung verkürzter Surfactin-Analoga durch die Repositionierung der Te-Domäne von SrfC [109]. Mit der Darstellung des Dipeptides Ile-Phe durch das Enzym-Templat **XV** erfolgte die Termination eines in Donor- und Akzeptorposition veränderten Dipeptides.

Nach einem vorgeschlagenen Mechanismus vollzieht sich die Termination der nichtribosomalen Peptidsynthese nach der Übertragung der naszierenden Peptidkette von der T-Domäne des letzten Moduls auf einen hochkonserviertes Serinrest der Thioesterase-Domäne [111]. Dieser Rest wird als Teil einer katalytischen Triade angesehen [108]. Te-Domänen von Peptidsynthetasen katalysieren Produktabspaltungen, die zu linearen oder zyklischen Produkten führen [22]. Die Te-Domäne des Tyrocidinsystems führt beispielsweise eine Zyklisierung unter Involvierung des N-Terminus des Dekapeptids Tyrocidin durch, ist diesbezüglich also als Zyklase zu bezeichnen. Die Abspaltung linearer Dipeptide von den hier beschriebenen hybriden Enzym-Templaten vollzieht sich nach einem nukleophilen Angriff eines H₂O-Moleküls. Offenbar besitzt die benutzte Te-Domäne von TycC6 sowohl eine beträchtliche Toleranz bezüglich der Art und Länge des zu spaltenden Peptides als auch für die Art des die Termination verursachenden Nucleophils [117]. Studien zur Spezifität der homologen Te-Domäne aus der Polyketidsynthese DEBS III bezüglich artifizierender Polyketid-SNACs belegten, daß in diesem Fall eine deutliche Diskriminierung von Substraten nach der Länge und nach der Konfiguration der letzten Extender-Einheit besteht [203, 210]. Diese Te-Domäne besaß in diesen Assays keine Zyklase-Aktivität.

Die Selektivität der Thiolierungsreaktionen bezüglich einiger Aminosäuren spiegelt sich in der Produktbildung wider. So ist das Dipeptid, das mit der höchsten Rate von dem Protein **XIV** gebildet wird (Trp-Leu) dasjenige, dessen Substrataminosäuren am schnellsten thioliert werden. Analoges kann für das Protein **XIII**, das das Dipeptid Ile-Leu mit der höchsten Rate produziert, gefolgert werden. Eine Ausnahme stellt das bezüglich der Dipeptidbildung sehr selektive Enzym-Templat **XV** dar. Hier wird das Dipeptid Ile-Trp nur mit marginaler Geschwindigkeit gebildet, obwohl die Thiolierung der Substrataminosäure Tryptophan

schnell verläuft. Durch Produktabspaltungskinetiken und einer Thioesterspaltung von enzymgebundenen Intermediaten konnte belegt werden, daß die Kondensationsreaktion der Akzeptoraminosäure Tryptophan vergleichsweise langsam verläuft. In diesem Falle könnte die Selektivität der Kondensationsdomäne von TycB2 eine Beteiligung an der Produktverteilung nichtribosomaler Peptide zukommen.



6.2-14 Zusammenstellung möglicher Faktoren, die die Spezifität und Effizienz einer Produktbildung eines nichtribosomalen Templates bedingen können:

Durch die Darstellung hybrider Templates unterliegen die Faktoren wahrscheinlich einer weiteren Beeinflussung.

Es konnten keine Dipeptide mit D-konfigurierten Aminosäuren an den hybriden Enzym-Templaten prozessiert werden. Produktabspaltungskinetiken des Proteins **XIV** belegen eindeutig, daß keine Kondensationsreaktion mit der Akzeptoraminosäure D-Phe stattfindet. Die Selektivität von C-Domänen bezüglich der Konfiguration von Substrataminosäuren findet sich auch in den Ergebnissen der DKP-Bildung durch das System TycA/ProCAT [47, 95, 211].

Das hybride Protein **XIV** verwendet mit der A-Domäne von TycB2 ein natives Elongationsmodul zur Initiation. Das Initiationsvermögen schien dadurch nicht beeinträchtigt: das von diesem Protein prozessierte Dipeptid Trp-Leu ist mit einer Geschwindigkeit von 2.1 min⁻¹ dasjenige, das mit der höchsten *turn over*-Rate von allen in dieser Arbeit untersuchten Systemen gebildet wird.

6.2.5.2 Eine Ausweitung des Systems von A-T-fusionierten *in cis*-Enzym-Templaten

Die Identifizierung von Linker-Regionen erlaubte die Etablierung eines Stecksystems zur Konstruktion von Domänen-fusionierten nichtribosomalen Enzym-Templaten. Das Stecksystem basiert auf genetischer Ebene auf der Verwendung von künstlich erzeugten Restriktionsschnittstellen. Das Konstrukt pA_(bacA1)-TCA_(tycB2)-TTe_(tycC6) ist dabei als Prototyp anzusehen, da es durch jeweils einen Klonierungsschritt gelingt, die für die Spezifität der

Module kodierenden Bereiche zu entfernen und durch solche anderer Spezifität zu ersetzen. Auf diese Weise lassen sich potentiell also beliebige Enzym-Template durch Fusion zweier Module mit der Spezifität A und B konstruieren (siehe Abb. 6.2-15). Durch Insertion einer dimodularen Domänenorganisation TCA_T kann theoretisch das System auf die Darstellung trimodularer Template ausgeweitet werden, obwohl sicherlich der *in vitro* Charakterisierung solch riesiger rekombinanter Enzyme Grenzen gesetzt sind.

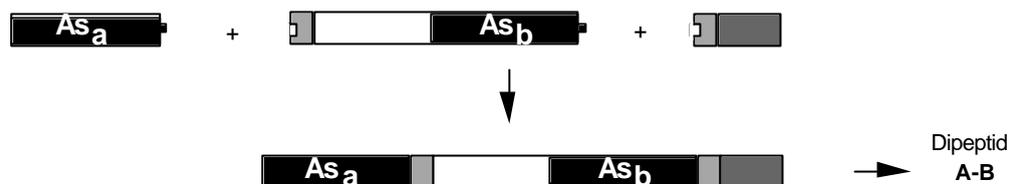
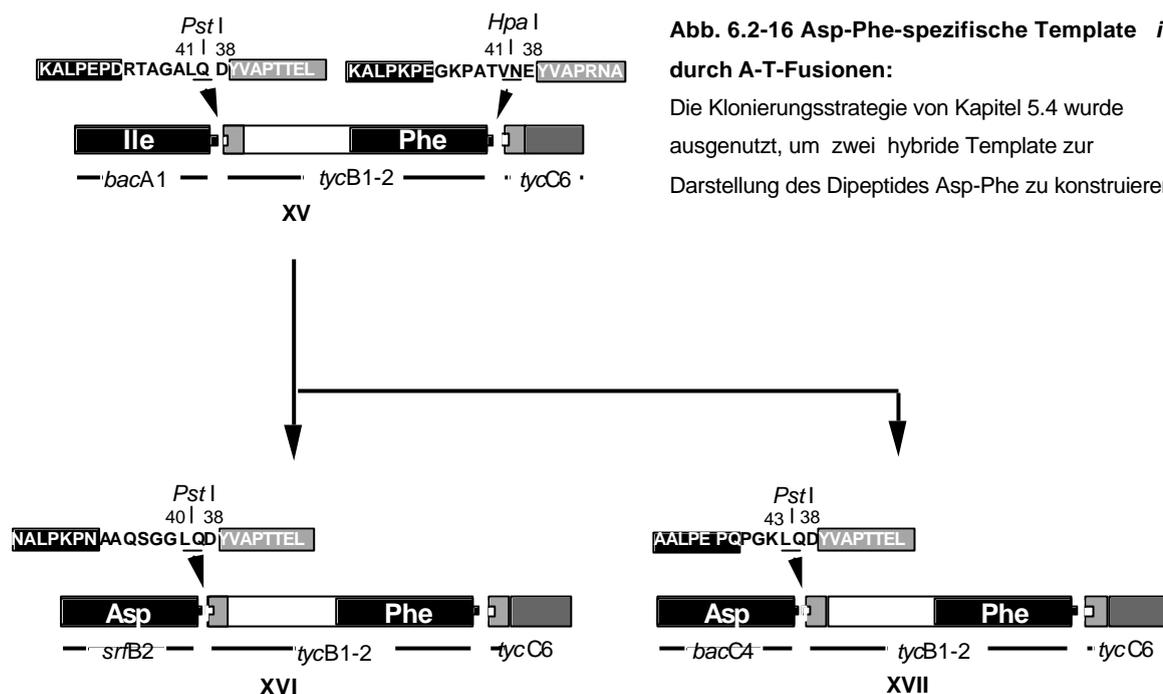


Abb. 6.2-15 Darstellung von Enzymtemplaten beliebiger Spezifität A-B durch ein Steck-System

Inhalt des Kapitels 5.2 war die Konstruktion eines spezifischen dimodularen Enzym-Template zur Darstellung des Dipeptides Asp-Phe. In diesem Zusammenhang wurde zum ersten Mal, die Konstruktion einer nichtribosomalen Peptidsynthetase aus der Auswahl als geeignet angesehener Bausteine beschrieben, die die *de novo* Synthese eines Peptides definierter Sequenz dirigierte. Verglichen mit der Produktbildungsrate der in Kapitel 5.5 beschriebenen dimodularen Hybrid-Peptidsynthetasen war die der in 5.2 dargestellten Systeme um mehr als eine Größenordnung erniedrigt (zu möglichen Erklärungen, siehe 6.2.5.1). Es wurden nun nach Art des Stecksystems von Kapitel 5.5 zwei Enzym-Template der Spezifität Asp-Phe konstruiert. Eine schematische Darstellung der Klonierungsstrategie findet sich in Abb. 6.2-16 (siehe Anhang B). Die Expression der beiden Enzym-Template $pA_{(srfB2)}-TCA_{(tycB2)}-TTe_{(tycC6)}$ und $pA_{(bacC4)}-TCA_{(tycB2)}-TTe_{(tycC6)}$ sowie die Überproduktion und Reinigung der zugehörigen rekombinanten dimodularen Peptidsynthetasen $A_{(SrfB2)}-TCA_{(TycB2)}-TTe_{(TycC6)}$ (**XVI**) und $A_{(BacC4)}-TCA_{(TycB2)}-TTe_{(TycC6)}$ (**XVII**) erfolgte wie bereits beschrieben.

Die biochemische Charakterisierung der Proteine ergab, daß keine signifikante Thiolierungsreaktion der Substrataminosäure Aspartat zu erreichen war. Dies komplementiert in gewissem Sinne die in 5.4.3 beschriebene Beobachtung, daß auch die Thiolierung von Aspartat in einem hybriden TycA-Derivat nicht erreicht werden konnte. Die Produktbildung eines Asp-Phe-Dipeptides war daher mit den Konstrukten **XVI** und **XVII** nicht zu beobachten. Ob die Gründe für die offenbare Inkompatibilität der Fusion von Aspartat-aktivierenden A-Domänen an heterologe T-Domänen wirklich in einer gestörten Domänen-Domäneninteraktion liegen, ist fraglich. Der Befund könnte auch in Zusammenhang mit der in 6.2.2.5 gemachten Hypothese eines Umlagerungsprozesses von als Thioester-gebundenen Aspartaten stehen: eine gestörte Domänen-Domäneninteraktion von A- und T-Domäne, die durch eine artifizielle Domänenfusion hervorgerufen wird, könnte



zu einer gesteigerten Hydrolyseempfindlichkeit des Thioesters führen. Diese kompetiert mit einer nachfolgenden Kondensationsreaktion und führt zu einem Versagen einer Produktbildung. Dem System würde so fortlaufend der Precursor entzogen und es wäre keine effektive Thiolierung zu beobachten.

6.2.6 Manipulationen an Peptidsynthetasen: Eine zusammenfassende Betrachtung

Aus den dargestellten Ergebnissen lassen sich zusammenfassend folgende Regeln ableiten, nach denen Manipulationen an Peptidsynthetasen durchzuführen sind:

- (1) Domänenfusionen stellen ein geeignetes Mittel zur Rekombination der katalytischen Aktivitäten von Peptidsynthetasen dar. Domänenfusionen beeinträchtigen – wird die Fusion innerhalb der Domänengrenzen eingefügt – nicht die katalytische Aktivität von Einzeldomänen wie die der A- oder T-Domäne.
- (2) Die Identifizierung von Linker-Regionen erlaubte die exakte Definition von Domänengrenzen und damit eine Möglichkeit, Peptidsynthetase-Domänen in einem Steck-System in exakter Größe austauschbar zu rekombinieren.
- (3) Die *in cis*-Domänenfusion zu einem artifiziiellen, dimodularen Enzym-Templat erlaubt das Prozessieren von Dipeptiden entsprechend der Spezifität der Module. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Verwendung eines *in cis*-Systems als vorteilhaft gegenüber der eines *in trans*-Systems erkennen.
- (4) Zusätzliche restriktive Spezifitäten von Peptidsynthetase-Domänen können das Prozessieren von Produkten an einem hybriden Enzym-Templat erschweren: so konnte die Beobachtung untermauert werden, daß die Erkennung der Akzeptoraminosäure

durch eine C-Domäne restriktiv ist. In hybriden Peptidsynthetasen sollte daher die G-Domäne des Akzeptormoduls verwendet werden.

- (5) Der Mechanismus der Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese wird durch die Domänenorganisation allein determiniert: die N-terminale Domänenorganisation AT hat generell das Potential, die Peptidsynthese zu initiieren.
- (6) Die Termination der nichtribosomalen Peptidsynthese wird durch die Verwendung einer Te-Domäne gewährleistet. Diese Domäne besitzt eine breite Toleranz gegenüber nicht-kognaten Peptid-Substraten und kann somit durch Repositionierung funktionell verwendet werden.
- (7) Die Anwendung der hier zusammengestellten Regeln erlaubt das *de novo*-Design von Enzym-Templaten der nichtribosomalen Peptidsynthese an denen kurze Peptide definierter Primärsequenz produziert werden können.

6.3 Ein System zur Expression von Peptidsynthetase-Genen in einem homologen Wirt

In Kapitel 5.5 wurde die Etablierung eines Vektor-Systems beschrieben, das es erlaubte rekombinante Peptidsynthetasen in einem *Bacillus*-Wirt überzuproduzieren. Dieses System macht Gebrauch von dem von Frau Katrin Eppelmann konstruierten *Bacillus subtilis* Stamm KE30 [171], der eine Deletion des Surfactin-Biosynthese-Operons [55] trägt. Da dieser Stamm damit kein Produzent eines nichtribosomalen Peptids mehr ist, ist er diesbezüglich als *clean-strain* zu bezeichnen [184, 212, 213]. Er erlaubt insbesondere die Re-Integration neuer rekombinanter Gene, die für Peptidsynthetasen kodieren, ohne eine ungewünschte Rekombination mit dem System-inhärenten *srfA*-Operon zu befürchten. Die Expression von Peptidsynthetase-Genen in einem ehemals natürlichen Produzent nichtribosomaler Peptide kann vorteilhaft sein: so ist die Überproduktion von multimodularen rekombinanten Peptidsynthetasen in *E. coli* als problematisch bezüglich einer unkorrekten Faltung beschrieben worden, die die Ko-Expression mit einem Chaperon bedingte [129]. *Bacillus subtilis* besitzt mindestens eine Peptidsynthetasen-spezifische 4'-PPAN-Transferase [81, 83] und es konnte belegt werden, daß die Überproduktion einer rekombinanten Peptidsynthetase zur Darstellung der *holo*-Form führt. Zudem ist die Expression von *Bacillus*-Genen in einem homologen Wirt aufgrund eines verwandten Codon-Gebrauchs als vorteilhaft zu bezeichnen. Das in dieser Arbeit vorgestellte *Bacillus*-Expressionssystem der Vektoren pSD193 und pSD270 stellt eine Komplementation des in der Arbeitsgruppe vielfach genutzten *E. coli* pQE-Systems dar, da es durch die Verwendung eines in *Bacillus* und *E. coli* gleichermaßen funktionellen Operator-Promotor-Systems, die Verwendbarkeit des Expressionssystems

erweitert. Auch die Verwendung einer zu den *E. coli* pQE-Vektoren kompatiblen MCS erlaubt die Austauschbarkeit bereits in pQE-Vektoren klonierter rekombinanter Gene.

Die Etablierung eines homologen Expressionsstammes für Peptidsynthetase-Gene kann schließlich – stehen entsprechende Extraktions- und Nachweismethoden zur Verfügung – zur Produktion von nichtribosomalen Peptiden *in vivo* führen [86]. Dieser methodische Ansatz ist bereits erfolgreich benutzt worden, um rational veränderte Polyketide zu produzieren [214].

Anhang

Anhang A: Terminologie für Hybridsynthetasen, Definition von Modulen und Domänen

Peptidsynthetase-**Domänen** werden in dieser Arbeit bezeichnet mit Ein-Buchstaben-Abkürzungen: Adenylierungsdomäne = A-Domäne, Kondensationsdomäne = C-Domäne etc. Thiolierungsdomänen werden auch als PCP-Domänen bezeichnet.

Als ein **Modul** wird die Domänenabfolge CAT bezeichnet. Ein **Initiationsmodul** wird als AT, ein Terminationsmodul wird als CATTe definiert.

Für die Bezeichnung von **hybriden Peptidsynthetasen**, die durch Fusion von Domänen hervorgegangen sind, wurde folgende Nomenklatur verwendet:

- Domänen oder Domänenabfolgen aus einem natürlichen Arrangement werden in eckige Klammern [] gesetzt.
- Die Herkunft dieser Domäne oder Domänenabfolge ist als Prefix in eckigen Klammern beigefügt, z.B. ${}_{TycA}$
- Fusionsstellen werden durch Striche – bezeichnet.
- Es wird die Ein-Buchstaben-Abkürzung für Domänen verwendet.
- Die Aminosäuresubstratspezifität wird, abgeleitet von der Primärstruktur eines nichtribosomalen Peptids, als Prefix der A-Domäne angehängt, z.B. A_{Phe} .

Die hybride Peptidsynthetase $[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TCA_{Phe}]_{(TycB2)}-[TTe]_{(TycC6)}$ besteht somit aus drei Teilen (BacA1, TycB2 und TycC6), die über zwei Fusionsstellen – jeweils zwischen A- und T-Domäne - zusammengefügt sind. Die wahrscheinliche Spezifität dieser dimodularen Peptidsynthetase ist Ile-Phe.

Aufgrund der Definition eines Moduls als CAT gelten AT und C-A-Domänenfusionen als **intramodulare** Fusionen, T-C-Fusionen stellen hiernach **intermodulare** Domänenfusionen dar.

Um den Textfluß nicht zu sehr zu stören, werden rekombinante Peptidsynthetasen nach ihrer ersten Erwähnung im Text mit einer römischen Ziffer bezeichnet. Zugehörige genetische Konstrukte sollen weiter durch die oben beschriebene Nomenklatur wiedergegeben werden. Ebenso wird diese Nomenklatur in Überschriften weiterverwendet. Eine Auflistung, die eine Zuordnung der römischen Ziffern erlaubt, soll hier gegeben werden:

Tab. 7.1 Abkürzungen für die rekombinanten, in dieser Arbeit dargestellten Peptidsynthetasen

I	$[A_{Asp}TCA_{Leu}T]_{(SrfB2-3)}$
II	$[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}-[A_{Phe}T]_{(TycA)}$
III	$[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}-[A_{Phe}]_{(TycA)}-[TTe]_{(SrfC)}$
IV	$[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}-[A_{Phe}]_{(TycA)}-[TTe]_{(TycC6)}$
V	$[A_{Asp}TC]_{(SrfB2)}-[A_{Phe}T]_{(TycA)}-[Te]_{(TycC6)}$
VI	$[A_{Phe}]_{(TycB2)}-[TE]_{(Ty cA)}$
VII	$[A_{Asn}]_{(TycC1)}-[TE]_{(Ty cA)}$
VIII	$[A_{Asp}]_{(SrfB2)}-[TE]_{(Ty cA)}$
IX	$[A_{Tyr}]_{(TycC3)}-[TE]_{(Ty cA)}$
X	$[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TE]_{(Ty cA)}$
XI	$[C]_{(TycB1)}-[AT]_{(Ty cC5)}$
XII	$[C]_{(TycB1)}-[AT]_{(Ty cB3)}$
XIII	$[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TCA_{Leu}TTe]_{(TycC6)}$
XIV	$[A_{Phe}]_{(TycB2)}-[TCA_{Leu}TTe]_{(TycC6)}$
XV	$[A_{Ile}]_{(BacA1)}-[TCA_{Phe}]_{(TycB2)}-[TTe]_{(TycC6)}$
XVI	$[A_{Asp}]_{(SrfB2)}-[TCA_{Phe}]_{(TycB2)}-[TTe]_{(TycC6)}$
XVII	$[A_{Asp}]_{(BacC4)}-[TCA_{Phe}]_{(TycB2)}-[TTe]_{(TycC6)}$

Anhang B: Zusammenstellung der genetischen Konstrukte

Im folgenden wird die Klonierungsweise der in den Kapiteln 5 und 6 beschriebenen genetischen Konstrukte in tabellarischer Form dargelegt.

Tab. 7.1 Klonierungen

Genetisches Konstrukt	Klonierungsweise
1) $p[A_{Asp}TCA_{Leu}T]_{srfB2-3}$	Ein 4931 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 DNA amplifiziert: 5'AspLeu(<i>Sph</i> I) <i>srfB2</i> TAA GCA TGC TGC TTT CAT CTG CAG AAA C und 3'AspLeu(<i>Bam</i> H I) <i>srfB</i> AAT GGA TCC TTC GGC ACG CTC TAC. Mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen <i>Sph</i> I und <i>Bam</i> H I wurde das Amplifikat terminal modifiziert und anschließend in einen analog modifizierten pQE70-Vektor

kloniert.

- 2)
p[A_{Asp}TC]_{srfB2}⁻
[A_{Phe}T]_{tycA}
- Ein Derivat von 1). Ein 3144 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. brevis* ATCC 8185 DNA amplifiziert: 5'(BstE II)TycA RELE TAT GGT CAC CCG GGA ACT GGA GCA und 3'TycA(BamH I) ATA GGA TCC TGT ATT CGT AAA GTT TTT C. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen BstE II und BamH I wurde das Amplifikat terminal modifiziert und anschließend in den analog modifizierten Vektor 1) kloniert.
- 3)
p[A_{Asp}TC]_{srfB2}⁻
[A_{Phe}]_{tycA}-[TTe]_{srfC}
- Ein Derivat von 2). Ein 910 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. subtilis* ATCC 21332 DNA amplifiziert: 5'Te_{srfC1}(Cla I) ATA ATC GAT AAT CGC ACA AAT ATG GTC und 3'int.srf-Te(Bgl II) ATA AGA TCT AAC CGT TAC GGT TTG TGT. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Cla I und Bgl II wurde das Amplifikat terminal modifiziert und anschließend in den mit Cla I und BamH I modifizierten Vektor 2) kloniert.
- 4)
p[A_{Asp}TC]_{srfB2}⁻
[A_{Phe}]_{tycA}-[TTe]_{tycC6}
- Ein Derivat von 2). Ein 967 pb DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. brevis* ATCC 8185 DNA amplifiziert: 5'TE_{tycC6}(Cla I) CTA ATC GAT ACT GGC AGC CAT CTG G und HM98-8 TAT GGA TCC TTT CAG GAT GAA CAG TTC TTG. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Cla I und BamH I wurde das Amplifikat terminal modifiziert und anschließend in den mit Cla I und BamH I modifizierten Vektor 2) kloniert.
- 5)
p[A_{Asp}TC]_{srfB2}⁻
[A_{Phe}T]_{tycA}-[Te]_{tycC6}
- Ein Derivat von 2). Ein 744 pb DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. brevis* ATCC 8185 DNA amplifiziert: 5'tycTe(BamH I) TAA GGA TCC GCC ATT TTG TTA AAT CAG und HM98-8 (siehe oben). Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease BamH I wurde das Amplifikat terminal modifiziert und anschließend in den analog modifizierten Vektor 2) kloniert.
- 6)
pREP4[gsp]
- Ein Derivat des Plasmids pGSP+ [82]. pGSP+ wurde mit Pvu II modifiziert, um ein 1,5 kb Genfragment zu isolieren. Dieses wurde ungerichtet in den mit Sma I linearisierten Vektor pREP4 kloniert.
- 7)
p[A_{Gln}]_{licA1}
- Ein 1646 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. licheniformis* ATCC 10716 DNA amplifiziert: licA1-5'Nco I ATT CCA TGG AGA TTG TTC CCG CTT TT und licA1-3'BamH I TAT GGA TCC ATA TTC ATT TCT CGG TGC. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Nco I und BamH I wurde das Amplifikat terminal modifiziert und anschließend in den analog modifizierten pQE60 kloniert.
- 8)
p[A_{Asp}]_{licb2}
- Ein 1649 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. licheniformis* ATCC 10716 DNA amplifiziert: licB2-5'Sph I ATT GCA TGC TTT CAG TCA AAG AGC G und licB2-3'BamH I ATT GGA TCC GCA GAG GGC TTT TTC. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Sph I und BamH I wurde das Amplifikat terminal modifiziert und anschließend in den analog modifizierten pQE70 kloniert.
- 9)
p[A_{Ile}]_{licC}
- Ein 1682 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. licheniformis* ATCC 10716 DNA amplifiziert: licC-5'Sph I TAA GCA TGC AGC CGC TTG ACG ACA T und licC-3'BamH I TAA GGA TCC GAG AAC CTC AGA CCA A. Anschließend wurde wie bei 8) verfahren.
- 10)
p[A_{Phe}]_{tycB2}-[TE]_{tycA}
- Ein 4686 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus dem Plasmid pTycA re-amplifiziert: 5'tycA-Pst I2478+ AGC CTG CAG GCC TAC CAT CCT CCG AG und 3'T5(Nco I) TGG ACC CAT GGT AAT TTC TCC TCT. Das Fragment wurde terminal mit den Restriktionsendonukleasen Pst I und Nco I modifiziert. Ein 1577 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. brevis* ATCC 8185 DNA amplifiziert :5'tycB2-Nco I8712+ CAA CCA TGG AGA TGC TGA CTG CGC ATG und 3'tycB2-Pst I10276- AGC CTG CAG TGT TGC AGG CTT TCC TTC C. Nach terminaler Modifikation mit den Restriktionsendonukleasen Pst I und Nco I wurde das Fragment in das re-amplifizierte TycA-Plasmid kloniert.

- 11) Ein Derivat von 10). Ein 1613 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. licheniformis* ATCC 10716 DNA amplifiziert: 5'*bacA1-Nco* I: TTT CCA TGG CTA AAC ATT CAT TAG A und 3'*bacA1-Pst* I1916- TTC CTG CAG CGC CCC CGC CGT TCT G. Das Fragment wurde terminal mit den Restriktionsendonukleasen *Pst* I und *Nco* I modifiziert und in das re-amplifizierte *tycA*-Plasmid kloniert.
- 12) Ein Derivat von 10). Folgende Primer wurden zur Amplifikation der A-Domäne verwendet: 5'*Asp(srfB2)-Nco* I TAA CCA TGG TGC TTT CAT CAG CAG AA C und 3' *AspA(srfB2)-Pst* I CAA CTG CAG GCC TCC GGA TTG TG. Es wurde wie bei der Konstruktion von 11) verfahren.
- 13) Ein Derivat von 10). Folgende Primer wurden zur Amplifikation der A-Domäne verwendet: 5'-*AsnA-Nco* I ATA CCA TGG AGA TCG GCA TCA TCA CC und 3'*AsnA(Pst* I) CGC CTG CAG TGT AAC GAC TGC GCC. Es wurde wie bei der Konstruktion von 11) verfahren.
- 14) Ein Derivat von 10). Folgende Primer wurden zur Amplifikation der A-Domäne verwendet: 5'-*TyrA-Nco* I ATA CCA TGG CGT TGTCCG AGA TCA CCA TG und 3'*TyrA(tycC3)-Pst* I ATA CTG CAG TTC GGT TAC GGG CTT GC. Es wurde wie bei der Konstruktion von 11) verfahren.
- 15) Ein 4777 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus dem Plasmid pProCAT re-amplifiziert: pQE3'iPCR CTA TGG ATC CAG ATC TCA TCA C und *tycB1-3'C(Pst* I) ATA CTG CAG CTG TCA GCA ACG GAA TCT G. Das Fragment wurde terminal mit den Restriktionsendonukleasen *Pst* I und *BamH* I modifiziert. Ein 1812 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. brevis* ATCC 8185 DNA amplifiziert: *tycC5-5'(Pst* I) AAT CTG CAG AGA CGG AGC ACA TGC und HM98-6 ATA GGA TCC TTC GAT GAA CGC CGC CAG. Dieses Fragment wurde terminal modifiziert mit den Restriktionsendonukleasen *Pst* I und *BamH* I und in den re-amplifizierten Vektor pProCAT kloniert.
- 16) Ein Derivat von 15). Folgende Primer wurden zur Amplifikation der AT-Domänen (1812 bp) verwendet: *tycC3-5'(Pst* I) ATA CTG CAG AAA AGC AGC GCT TGC TG und *tycC3-3'(BamH* I) TAT GGA TCC TTC CGC TCG TGG CGA CAT. Es wurde wie bei der Konstruktion von 15) verfahren.
- 17) Es wurde das gleiche 744 bp DNA-Fragment wie unter 5) verwendet. Nach terminaler Modifikation des Fragmentes mit der Restriktionsendonuklease *BamH* I wurde es in den analog modifizierten Vektor 16) kloniert.
- 18) Ein Derivat von 11). Ein 4131 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. brevis* ATCC 8185 DNA amplifiziert: 5'*TycC5-T-Pst* I ATA CTG CAG GAG TAT GTA GCG CCG C und HM98-8 (siehe oben). Nach terminaler Modifikation des Fragmentes mit der Restriktionsendonuklease *Pst* I und *BamH* I wurde es in den analog modifizierten Vektor 11) kloniert.

- 19)
p[A_{Phe}]_{tycB2}⁻
[TCA_{Leu}TTe]_{tycC6}
- Ein Derivat von 10). Das 4131 bp DNA-Fragment von 18) wurde verwendet und in den mit den Restriktionsendonukleasen *Pst* I und *Bam*H I modifizierten Vektor 10) kloniert.
- 20)
p[A_{Ile}]_{bacA1}⁻
[TCA_{Phe}]_{tycB2}⁻
[TTe]_{tycC6}
- Ein Derivat von 18). Ein 6035 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus dem Plasmid 18) re-amplifiziert :i5'*tycC6*-T-*Hpa* I ACC GTT AAC GAA TAC GTG GCC CCG AG und i3'*bacA1*-T-*Pst* I/*Hpa* I AAT GTT AAC CTC CTG CAG CGC CCC. Das Fragment wurde terminal mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Hpa* I modifiziert und anschließend religiert, um das Plasmid p[A_{Ile}]_{bacA1}-[TTe]_{tycC6} zu erzeugen. Ein 3117 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. brevis* ATCC 8185 DNA amplifiziert : *tycB1A*-T(*Pst* I) ACG CTG CAG GAT TAC GTC GCC CCG A und 3'*tycB2*-*Hpa* I-10276- AGC GTT AAC TGT TGC AGG CTT TCC TTC. Das Fragment wurde terminal mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Pst* I und *Hpa* I modifiziert und in den analog modifizierten Vektor p[A_{Ile}]_{bacA1}-[TTe]_{tycC6} kloniert.
- 21)
p[A_{Asp}]_{srfB2}⁻
[TCA_{Phe}]_{tycB2}⁻
[TTe]_{tycC6}
- Ein Derivat von 20). Ein 1610 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. brevis* ATCC 8185 DNA amplifiziert : 5'*AspA*(*srfB2*)-*Nco* I TAA CCA TGG TGC TTT CAT CAG CAG AAA C und 3'*AspA*(*srfB2*)-*Pst* I CAA CTG CAG GCC TCC GGA TTG TG. Das Fragment wurde terminal mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Nco* I und *Pst* I modifiziert und in den analog modifizierten Vektor 20) inseriert.
- 22)
p[A_{Asp}]_{bacC4}⁻
[TCA_{Phe}]_{tycB2}⁻
[TTe]_{tycC6}
- Ein Derivat von 20). Ein 1613 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus chromosomaler *B. licheniformis* ATCC 10716 DNA amplifiziert: BacC4 5'(*Nco* I) OGC CCA TGG CGT TGA GCG ACG TCA A und BacC4 3'(*Pst* I) TTC CTG CAG CAG TTT TCC CGG CTG CGG T. Es wurde anschließend wie bei 21) verfahren.
- 23)
pSD193
- Ein Derivat des Plasmids pKE18 [171]. Ein 146 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus pQE60 Plasmid-DNA amplifiziert: 5'T5(*Nsp* I) AAT ACA TGT CCT TTC GTC TTC ACC TC und 3'T5(*Nco* I) TGG ACC CAT GGT AAT TTC TCC TCT. Das Fragment wurde terminal mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Nsp* I und *Nco* I modifiziert und anschließend in den mit *Sph* I und *Nco* I linearisierten Vektor pKE18 kloniert (resultierend in pSD181). Ein 110 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus pQE70 Plasmid-DNA amplifiziert: 5'pQE70-MCS(*Nco* I) AAA CCA TGG GCA TCC GAG GAT CCT G und 3'pQE70-downHis₆(*Bgl* II) TAT AGA TCT CTG AGG TCA TTA CTG G. Das Fragment wurde terminal mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Nco* I und *Bgl* II modifiziert und in den mit *Nco* I und *Bam*H I linearisierten Vektor pSD181 kloniert (resultierend in pSD185). Ein 1494 bp DNA-Fragment wurde mit Hilfe folgender Primer aus pDG783 Plasmid-DNA amplifiziert: 5'*kan*(*Pst* I) AAT CTG CAG AGC GAA CCA TTT GAG GTG A und 3'*kan*(*Pst* I) ATA CTG CAG ATA CAA ATT CCT CGT AGG C. Das Fragment wurde terminal mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Pst* I modifiziert und anschließend in analog modifizierten Vektor pSD185 kloniert.
- 24)
pSD270
- Ein Derivat von 23). pSD193 wurde mit Hilfe folgender Primer re-amplifiziert: 5'psrT5/*His*₆(*Hpa* I) GGC GGT AAC GGA TCC GGA TCT CA und 3'psrT5/*His*₆(*Hpa* I) AAG GTT AAC TCG CAT GCC CAT G. Das Amplifikat wurde terminal mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Hpa* I modifiziert und ligiert (resultierend in pSD270).

Anhang C: Auflistung der identifizierten Linker-Regionen von Peptidsynthetase-Domänen des Genus *Bacillus*

Die Auflistung der Linker-Regionen von A- und T-Domänen ist unterteilt in drei Gruppen je nachdem, welcher Domärentyp sich C-terminal anschließt.

Domänengrenzen Adenylierung- Thiolierung(A-T-C)

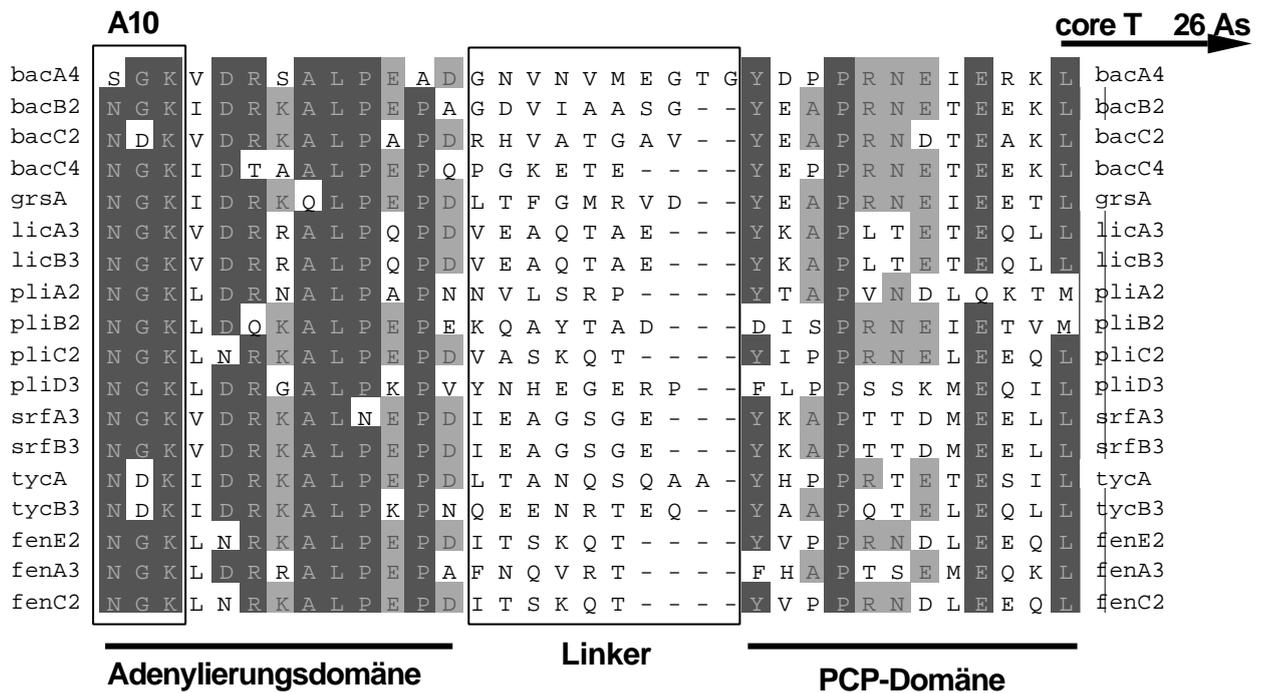
	A10										core T 26As																							
bacA1	N	G	K	V	D	R	K	A	L	P	E	P	D	R	T	A	G	A	E	N	E	Y	E	A	P	R	N	E	T	E	E	K	L	bacA1
bacA3	N	G	K	V	D	K	K	S	L	P	V	P	E	R	S	V	T	M	D	R	R	Y	E	A	P	R	D	Q	M	E	E	K	L	bacA3
bacA5	N	G	K	V	D	R	K	A	L	P	E	P	D	R	S	A	G	T	E	A	E	Y	E	A	P	R	N	Y	V	E	Q	R	I	bacA5
bacB1	N	G	K	A	D	L	K	A	L	P	E	P	D	R	R	A	F	A	Q	A	R	Y	E	A	P	R	N	Q	T	E	A	L	L	bacB1
bacC1	N	G	K	V	D	R	K	A	L	P	E	P	D	R	T	A	G	A	E	N	E	Y	E	A	P	R	N	E	T	E	E	K	L	bacC1
bacC3	N	G	K	I	D	R	K	A	L	P	E	P	S	S	T	I	S	E	A	T	-	Y	E	A	P	R	N	R	T	E	E	K	L	bacC3
grsB1	N	G	K	I	D	R	K	S	L	P	N	L	E	G	I	V	N	T	N	A	K	Y	V	V	P	T	N	E	L	E	E	K	L	grsB1
grsB2	N	G	K	V	N	R	S	A	L	P	K	P	D	G	E	F	G	T	A	T	E	Y	V	A	P	S	S	D	I	E	M	K	L	grsB2
grsB3	N	G	K	I	D	K	R	S	L	P	E	P	D	G	S	I	S	I	G	T	E	Y	D	R	P	R	T	M	L	E	G	K	L	grsB3
licA1	S	G	K	V	D	R	K	A	L	L	R	H	E	V	S	V	S	G	T	A	E	Y	A	A	P	R	N	E	Y	E	E	K	M	licA1
licA2	N	G	K	V	D	R	R	A	L	P	E	P	D	V	T	Q	A	A	Q	K	E	Y	T	A	P	R	S	R	T	G	A	Q	L	licA2
licB1	N	G	K	V	D	K	R	Q	L	P	A	P	I	A	E	E	T	A	R	-	-	F	E	A	P	K	N	E	T	E	E	I	L	licB1
licB2	N	G	K	V	D	R	R	A	L	P	E	P	Q	G	L	N	G	R	S	D	S	Y	R	A	P	S	T	E	I	E	K	A	L	licB2
pliA1	S	G	K	L	D	R	N	A	L	P	A	P	G	G	A	A	D	A	E	T	-	Y	T	A	P	R	N	V	T	E	M	K	L	pliA1
pliB1	S	G	K	L	D	R	F	A	L	P	E	P	E	N	N	T	S	V	T	-	-	Y	M	A	P	R	T	L	I	E	A	D	L	pliB1
pliC1	S	G	K	L	D	R	N	A	L	P	A	P	G	G	A	A	D	A	E	T	-	Y	T	A	P	R	N	V	T	E	M	K	L	pliC1
pliD1	N	G	K	V	D	R	A	A	L	P	E	P	D	A	S	I	S	G	N	P	-	Y	T	A	P	R	N	L	L	E	A	K	L	pliD1
pliD2	S	G	K	L	D	R	N	A	L	P	A	P	G	G	A	A	D	A	E	T	-	Y	T	A	P	R	N	V	T	E	M	K	L	pliD2
srfA1	S	G	K	V	D	R	R	K	L	F	A	L	E	V	K	A	V	S	G	T	A	Y	T	A	P	R	N	E	T	E	K	A	I	srfA1
srfA2	N	G	K	I	D	R	R	A	L	P	I	P	D	A	N	V	S	R	G	V	S	Y	V	A	P	R	N	G	T	E	Q	K	V	srfA2
srfB1	N	G	K	I	N	K	K	E	L	P	A	P	Q	S	E	A	V	Q	-	P	E	Y	A	A	P	K	T	E	S	E	K	K	L	srfB1
srfB2	N	G	K	T	D	R	N	A	L	P	K	P	N	A	A	Q	S	G	G	K	A	L	A	A	P	E	T	A	L	E	E	S	L	srfB2
tycB1	N	G	K	T	D	R	R	A	L	P	K	P	E	G	S	A	K	T	K	A	D	Y	V	A	P	T	T	E	L	E	Q	K	L	tycB1
tycB2	N	G	K	V	D	R	K	A	L	P	K	P	E	G	K	P	A	T	G	A	A	Y	V	A	P	A	T	E	V	E	A	K	L	tycB2
tycC1	N	G	K	V	E	R	K	K	L	P	K	P	A	G	A	V	V	T	G	T	A	Y	A	A	P	Q	N	E	I	E	A	K	L	tycC1
tycC2	N	G	K	V	D	R	K	A	L	P	Q	P	E	D	A	A	A	S	A	A	V	Y	V	A	P	R	N	E	W	E	A	K	L	tycC2
tycC3	N	G	K	V	D	K	K	A	L	P	K	P	E	G	K	P	V	T	E	A	Q	Y	V	A	P	T	N	A	V	E	S	K	L	tycC3
tycC4	N	G	K	V	D	R	R	A	L	P	Q	P	S	G	E	R	T	T	G	S	A	F	V	A	A	Q	N	D	T	E	A	K	L	tycC4
tycC5	N	G	K	V	D	R	R	S	L	P	A	P	D	V	T	M	L	R	T	T	E	Y	V	A	P	R	S	V	W	E	A	R	L	tycC5
fenE1	S	G	K	L	D	R	K	A	L	P	A	P	D	G	A	A	D	R	E	T	-	Y	T	A	P	R	N	L	T	E	M	K	L	fenE1
fenA1	N	G	K	V	D	Q	S	A	L	P	K	P	E	A	S	I	S	S	N	T	-	Y	A	A	P	R	N	L	L	E	V	K	L	fenA1
fenA2	S	G	K	L	D	R	K	A	L	P	A	P	D	G	A	A	D	R	E	T	-	Y	T	A	P	R	N	L	T	E	M	K	L	fenA2
fenC1	S	G	K	L	D	R	K	A	L	P	A	P	D	G	A	A	D	R	E	T	-	Y	T	A	P	R	N	L	T	E	M	K	L	fenC1
dhbF1	N	G	K	L	D	R	K	A	L	P	A	P	D	F	S	T	S	V	S	-	-	D	R	A	P	R	T	P	Q	E	E	I	L	dhbF1

Adenylierungsdomäne

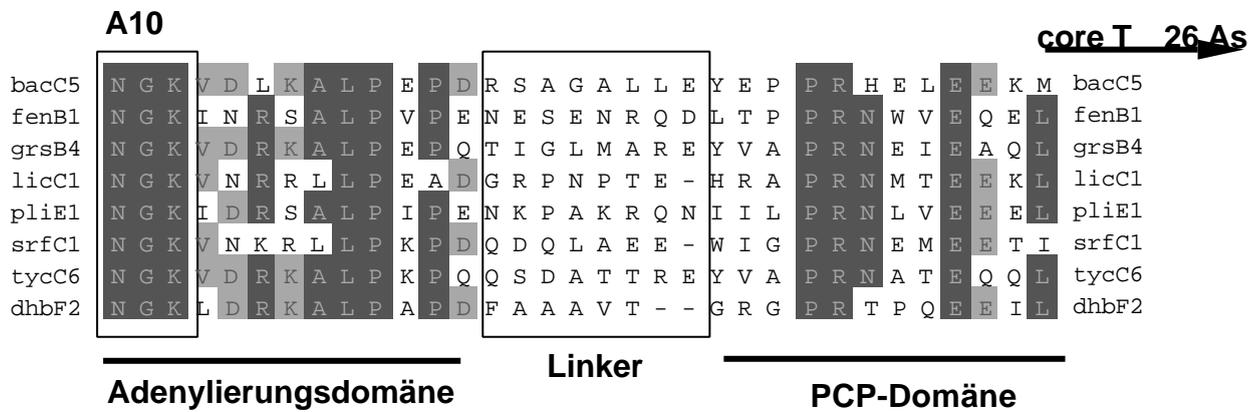
Linker

PCP-Domäne

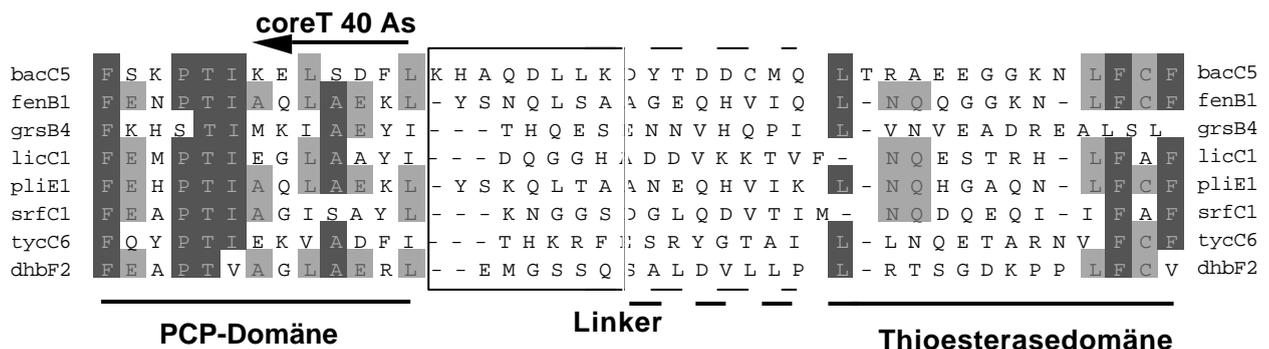
Domänengrenzen Adenylierung- Thiolierung (A-T-E)



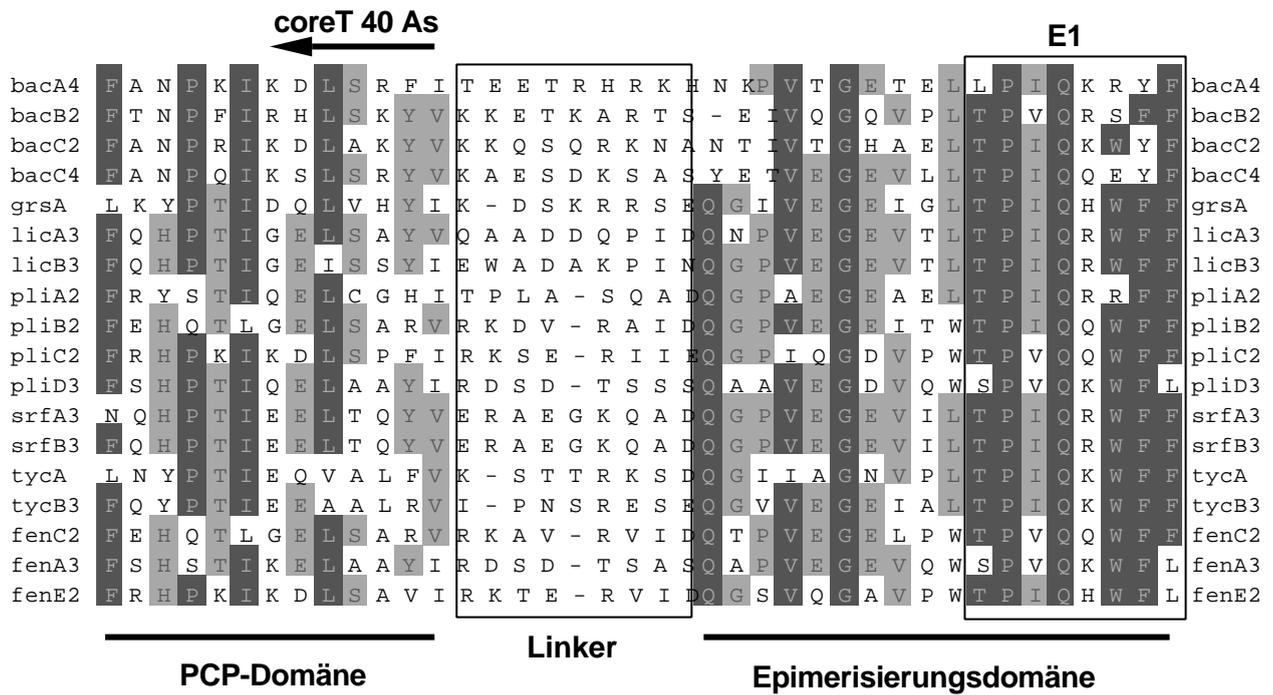
Domänengrenzen Adenylierung- Thiolierung (A-T-Te)



Domänengrenzen Thiolierung- Thioesterase



Domänengrenzen Thiolierung- Epimerisierung



Domänengrenzen Kondensation-Adenylierung

core A2 103 As

bacA3	I	Q	K	I	A	E	D	Y	F	R	I	L	E	E	V	S	E	N	L	D	V	A	L	H	Q	I	D	M	I	S	R	Q	E	K	R	T	L	L	E	S	bacA3
bacA4	M	E	R	L	S	E	H	L	I	S	L	L	E	Q	A	A	D	H	P	D	I	A	I	N	Q	I	D	V	L	T	K	G	E	R	H	R	V	L	Y	D	bacA4
bacA5	I	E	T	L	E	K	H	I	T	T	V	A	E	Q	V	A	E	D	E	T	Q	T	L	R	D	I	N	L	V	S	K	E	E	Q	H	R	I	L	H	T	bacA5
bacB1	V	E	R	M	A	G	H	F	L	N	V	L	K	D	A	A	H	H	P	E	L	A	L	S	E	I	R	M	M	S	E	E	E	K	D	I	I	L	H	T	bacB1
bacB2	A	E	T	L	A	Q	H	F	V	N	I	L	R	D	I	S	D	H	P	Q	K	T	L	R	D	I	N	L	V	S	K	E	E	R	H	T	V	L	Y	Q	bacB2
bacC1	I	E	T	L	E	K	H	I	I	T	V	A	E	Q	V	A	E	D	E	T	Q	T	L	R	D	I	N	L	V	S	K	E	E	Q	H	R	I	L	D	T	bacC1
bacC2	V	E	R	M	A	A	H	F	V	R	V	L	E	D	I	S	K	R	T	D	K	R	L	D	Q	I	E	A	M	S	E	D	E	K	N	T	L	L	Y	R	bacC2
bacC3	I	N	N	I	E	G	H	I	K	R	V	A	E	Q	V	T	A	N	E	N	R	K	I	A	E	I	D	M	L	A	E	E	E	R	K	T	L	L	Y	E	bacC3
bacC4	I	E	R	M	A	G	H	L	I	N	I	L	K	E	A	A	N	D	P	H	M	P	L	S	D	V	N	M	L	S	D	E	E	M	N	A	L	L	D	Q	bacC4
bacC5	I	A	G	I	K	G	H	L	Q	Q	V	M	E	Q	V	V	Q	H	E	D	Q	S	L	N	D	I	T	V	L	S	E	A	E	R	N	R	L	L	Y	E	bacC5
grsB1	I	K	K	I	E	G	H	M	K	E	V	A	L	C	V	A	N	N	P	H	V	L	V	Q	D	V	P	L	L	T	K	Q	E	K	Q	H	L	L	V	E	grsB1
grsB2	V	E	R	M	A	G	H	F	L	Q	I	L	H	A	I	V	G	N	P	T	I	I	I	S	E	I	E	I	L	S	E	E	E	K	Q	H	I	L	F	E	grsB2
grsB3	I	E	R	L	A	T	H	F	M	H	I	L	Q	E	I	V	I	N	P	E	I	K	L	C	E	I	N	M	L	S	E	E	E	Q	Q	R	I	L	Y	D	grsB3
grsB4	V	E	Q	L	A	Q	H	F	I	Q	I	V	K	A	I	V	E	N	P	D	V	K	L	S	D	I	D	M	L	S	E	E	E	K	K	Q	I	M	L	E	grsB4
licA1	L	A	V	L	Y	E	R	L	M	T	L	L	E	D	A	L	L	F	P	Q	K	T	I	A	E	L	E	I	V	P	A	F	E	K	E	R	L	L	K	R	licA1
licA2	A	E	R	M	L	K	A	Y	L	H	L	L	E	G	M	T	A	D	P	L	R	R	I	G	E	Y	S	L	L	T	E	E	E	T	N	R	Q	L	V	A	licA2
licA3	I	E	R	W	R	G	Y	W	V	N	L	L	E	A	V	A	E	N	P	D	A	R	L	S	E	L	S	L	L	D	E	A	E	K	R	R	I	V	Q	N	licA3
licB1	I	E	Q	A	A	G	H	L	T	R	L	A	E	E	A	I	A	N	P	E	S	K	A	A	S	A	A	M	L	S	K	Q	E	Q	Q	T	L	L	A	-	licB1
licB2	I	R	R	W	S	G	H	F	L	N	V	I	K	K	I	C	E	N	P	G	I	K	L	R	D	I	E	L	L	S	V	K	E	R	A	R	L	L	E	E	licB2
licB3	I	E	R	W	S	G	Y	L	N	N	L	L	E	A	V	A	E	N	P	D	A	R	L	S	E	L	S	L	L	D	E	A	E	K	R	R	I	V	Q	N	licB3
licC1	I	L	Q	L	K	E	Q	L	L	T	A	I	R	E	I	I	T	N	P	E	Q	P	L	D	D	I	C	V	S	K	K	E	K	E	R	L	L	H	E	licC1	
pliA1	I	K	R	I	Q	S	H	L	L	T	I	L	E	N	A	L	K	H	P	H	S	F	I	R	E	L	D	M	T	N	T	R	E	K	Q	K	L	L	Y	E	pliA1
pliA2	I	E	R	W	A	D	H	F	I	E	F	L	H	E	A	L	S	T	P	E	T	S	L	A	Q	I	N	I	L	S	D	K	E	K	Q	K	I	V	F	E	pliA2
pliB1	M	L	R	I	Q	G	H	L	K	Q	A	L	D	C	I	L	T	N	P	D	V	A	V	S	D	I	N	I	V	-	P	P	E	E	Q	Q	V	I	Q	L	pliB1
pliB2	I	T	Q	W	A	S	Y	F	I	E	L	V	K	G	V	T	A	D	T	F	M	R	I	S	N	M	Q	L	L	P	A	A	E	R	R	L	L	L	E	K	pliB2
pliC1	M	S	E	I	K	D	Y	L	H	M	V	S	D	V	I	S	D	P	S	L	P	V	S	K	M	T	L	L	D	E	D	E	K	T	R	K	I	V	S	Q	pliC1
pliC2	I	E	K	W	L	Q	Y	F	N	N	M	L	S	I	I	K	D	N	K	A	A	L	G	T	I	N	I	L	N	E	D	E	A	H	Y	L	I	H	E	pliC2	
pliD1	V	L	S	V	K	E	H	L	L	N	A	V	S	Q	I	L	N	N	P	N	L	P	P	E	E	I	D	I	T	D	T	E	K	R	Q	L	I	G	E	pliD1	
pliD2	I	Q	R	W	A	S	L	F	T	T	L	V	E	H	T	A	A	S	P	E	T	E	L	D	N	I	P	I	L	T	K	E	E	R	D	F	I	E	S	pliD2	
pliD3	I	E	R	W	A	S	H	L	T	N	V	L	S	I	I	G	K	N	P	K	V	T	L	N	H	I	D	I	L	T	Q	E	E	R	H	Q	L	L	N	E	pliD3
pliE1	I	S	C	I	K	R	Q	F	T	Q	A	L	S	T	A	A	Q	H	P	H	M	P	I	A	D	F	S	F	L	D	A	T	E	K	E	Q	I	V	T	Q	pliE1
srfA1	I	N	M	I	C	E	R	M	I	T	M	L	E	N	A	L	T	H	P	E	H	T	I	D	E	L	T	L	I	S	D	A	E	K	E	K	L	L	A	R	srfA1
srfA2	A	D	R	L	L	T	H	F	A	R	L	L	E	D	A	A	A	D	P	E	K	P	I	S	E	Y	K	L	L	S	E	E	E	A	A	S	Q	I	Q	Q	srfA2
srfA3	I	E	R	W	K	Q	Y	W	M	E	L	L	D	A	V	T	G	N	P	N	Q	P	L	S	S	L	S	L	V	T	E	T	E	K	Q	A	L	L	E	A	srfA3
srfB1	I	E	R	T	A	E	H	L	T	R	M	E	A	A	V	D	Q	N	P	A	A	F	V	R	E	Y	G	L	V	G	D	E	E	Q	R	Q	I	V	E	V	srfB1
srfB2	I	R	R	W	S	R	H	F	V	N	I	I	K	A	A	A	A	N	P	N	V	R	L	S	D	V	D	L	L	S	S	A	E	T	A	A	L	L	E	E	srfB2
srfB3	A	E	K	W	S	E	Y	V	L	R	L	L	K	A	V	A	D	N	P	N	Q	P	L	S	S	L	L	L	V	T	E	T	E	K	Q	A	L	L	E	A	srfB3
srfC1	I	L	R	L	K	S	Q	L	L	T	A	I	Q	Q	L	I	Q	N	P	D	Q	P	V	S	T	I	N	L	V	D	D	R	E	R	E	F	L	L	T	G	srfC1
tycB1	V	Q	K	L	A	G	H	L	Q	Q	I	A	D	C	V	A	N	N	S	G	V	E	L	C	Q	I	P	L	L	T	E	A	E	T	S	Q	L	L	A	K	tycB1
tycB2	I	E	R	M	S	L	H	Y	L	Q	I	L	Q	A	V	S	A	N	T	E	Q	E	L	A	Q	I	E	M	L	T	A	H	E	K	Q	E	L	L	V	H	tycB2
tycB3	V	E	R	M	A	H	H	F	L	Q	I	L	R	A	V	T	A	N	P	E	N	E	L	Q	E	I	E	M	L	T	A	E	E	K	Q	Q	L	L	V	A	tycB3
tycC1	V	N	R	I	E	G	H	L	R	T	V	I	D	Q	V	I	G	N	P	H	V	H	L	H	E	I	G	I	I	T	E	E	E	K	Q	Q	L	L	V	A	tycC1
tycC2	V	E	R	M	A	R	H	Y	L	E	I	L	R	W	I	S	E	Q	P	T	A	S	L	A	D	I	D	M	M	T	E	A	E	K	R	T	L	L	N	tycC2	
tycC3	I	E	K	I	A	T	H	F	I	Q	I	L	R	A	V	I	A	E	P	E	M	P	L	S	E	I	T	M	L	T	E	A	E	K	Q	R	L	L	V	D	tycC3
tycC4	I	E	R	M	A	G	H	F	L	Q	V	L	R	Q	V	A	D	Q	A	T	A	L	R	E	I	S	L	L	S	E	E	E	E	R	R	I	V	T	V	D	tycC4
tycC5	V	D	R	L	A	A	H	Y	V	Q	L	L	Q	T	I	T	A	D	P	D	I	E	L	A	R	I	S	V	L	S	K	A	E	T	E	H	M	L	H	S	tycC5
tycC6	M	E	R	F	S	R	H	F	L	T	I	A	A	S	I	V	Q	N	P	H	I	R	L	G	E	I	D	M	L	P	E	E	E	K	Q	Q	I	L	A	G	tycC6
dhbF1	I	K	L	H	Q	Q	R	I	L	Q	L	L	Q	T	A	S	A	G	E	D	M	L	I	G	Q	M	E	L	L	P	E	E	E	K	E	K	V	I	S	K	dhbF1
dhbF2	A	Q	A	L	A	D	R	L	M	R	L	L	E	A	A	E	S	D	P	D	E	Q	I	G	N	L	D	I	L	A	P	E	E	H	S	S	M	V	T	D	dhbF2
fenC1	V	L	R	I	Q	G	H	L	M	E	A	M	D	C	I	L	S	N	P	D	I	A	V	D	S	I	N	I	V	-	P	T	E	E	R	K	L	I	Q	S	fenC1
fenC2	I	A	R	W	A	S	H	F	I	E	L	V	K	G	I	T	S	D	I	H	M	K	L	S	E	M	Q	L	L	S	A	P	A	R	E	L	L	L	E	T	fenC2
fenA2	V	Q	R	W	A	G	L	F	T	T	L	V	E	N	T	V	S	S	P	D	M	E	L	D	D	I	P	I	L	T	L	E	E	E	R	S	F	I	D	S	fenA2
fenA3	I	K	Q	W	T	Y	H	L	T	K	L	L	S	H	I	V	K	N	P	N	T	R	L	N	N	I	D	I	L	T	H	E	E	R	N	K	L	L	N	E	fenA3
fenB1	M	T	C	I	Q	R	Q	L	T	Q	A	L	Q	A	A	A	D	H	P	D	I	P	V	A	D	F	S	F	L	D	P	K	E	K	E	Q	I	L	T	Q	fenB1
fenE1	I																																								

Anhang D: Kondensationsdomänen, Epimerisierungsdomänen und Heterozyklisierungsdomänen

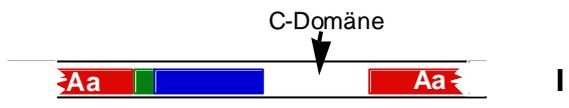
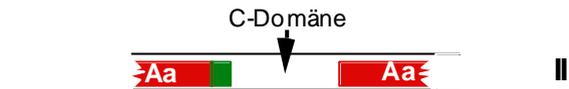
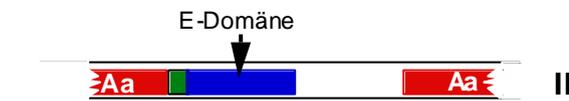
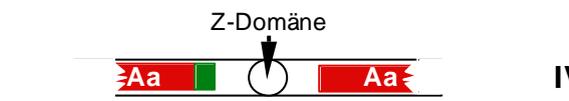
	<p>I</p> <p>C1 (IM)YPL(ST)xMQ(EK)GML(FY)H C2 (YH)(DE)I(FL)R(TA)xF C3 W(ST)xHHI(LM)(LM)DGW(CS)x(GS)(IV) C4 PYxxYI(KN)WLxxQ(DN) C5 MVGLFINT(IV)PxR C6 (PN)L(YF)(ED)(IV)Q C7 L(IL)DH(IL)x(VA)F(EN)Y(PA)</p>
	<p>II</p> <p>C1 YP(VL)SSAQR(MI)(YF)(IV)L C2 RHE(SA)LRT(SA)F C3 DMHHII(ST)DG(VA)S C4 (IL)(QH)YKD(FY)(AS)(VE)W C5 GMFV(NG)TLA(LM)(RK) C6 A(YF)(ED)(HN)Q(DE)YPF(DE)EL C7 LV(ED)(KN)LxxQR(DE)(ML)SRNPLF(DN)</p>
	<p>III</p> <p>E1 Gx(VI)x(LW)(TS)PIQ(KR)W(FY)F E2 (HQ)HALRM(VI)(YF) E3 GD(HF)L(LF)I(AV)IHHLVVDGVSWR(IV) E4 KTDS(FY) E5 RT(VF)GWFTSxYP(VL) E6 Kx(VT)K(ED)xLR(RK)(IV)PNKGxGYG E7 P(ED)(IV)SFNYLG(QE)(FI)</p>
	<p>IV</p> <p>Z1 PLTxxQxAY(WL)xGR Z2 (RH)H(PE)(MI)LR Z3 RLHxxDx(LV)xxDxxS Z4 (FY)R(DE)Y Z5 G(DN)F(TS)(ST)xLLL Z6 G(VL)x(VL)xRxxR Z7 P(VI)VFTSxL(GS)</p>

Abb. 7.1 Vergleich von hochkonservierten *core*-Motiven von C-, Z- und E-Domänen:

Die untereinander analogen *core*-Motive wurden abgeleitet aus einem Alignment von Aminosäuresequenzen (ClustalW) von Peptidsynthetase-Domänen des Genus *Bacillus* (siehe auch Abb. 7.3).

Abb. 7.2 (umseitig) Phylogenetischer Baum erhalten durch ein Aminosäuresequenz-Alignment von C-, Z- und E-Domänen des Genus *Bacillus*:

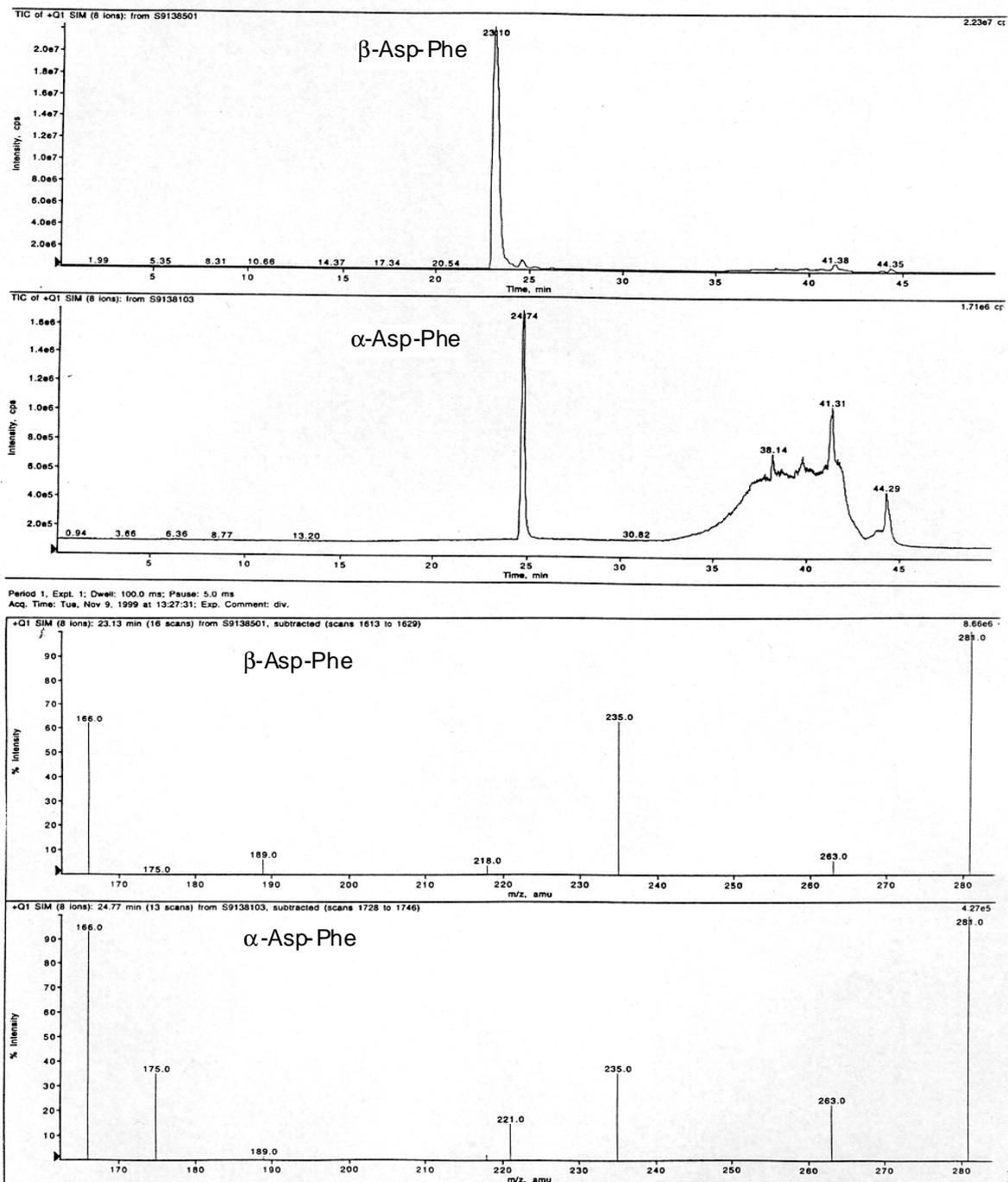
Der phylogenetische Baum zeigt das *clustern* von C-Domänen in Untergruppen abhängig von der Lokalisation. Zwei Untergruppen von C-Domänen repräsentieren solche, die in einer Domänenorganisation T→C←A beziehungsweise E→C←A zu finden sind. C-Domänen, die wahrscheinlich in einen Transfer einer Acyl-Kette involviert sind (N-terminale C-Domänen der Peptidsynthetasen SrfA1, LicA1 und PliA1) repräsentieren eine dritte Untergruppe. Die C-Domäne von MycA1 entstammt der ungewöhnlichen Domänenorganisation T→C←T. Es ist kein *clustern* von Domänen zu beobachten in Abhängigkeit einer internen oder N-terminalen Lokalisation der Domänen. Der phylogenetische Baum unterstreicht zudem die Verwandtschaft von C- und E-Domänen.



Abb. 7.3 (umseitig) Aminosäuresequenz-Alignment von jeweils 6 C-Domänen aus einer Lokalisation T® C←A (I), 6 C-Domänen aus einer Lokalisation E® C←A (II), 6 E-Domänen sowie 6 Z-Domänen (vergleiche Abb. 7.1):

Die Alignments sind jeweils separat geführt worden; sie wurden vergleichend untereinander dargestellt. Die hochkonservierten *core*-Motive sind hervorgehoben durch Kästchen. Die Z-Domänen schließen auch Domänen aus Bakterien anderer Geni als *Bacillus* ein, diese Sequenzen sind deshalb untereinander verhältnismäßig heterolog.

Anhang E: ESI-MS Referenz-Spektren a-Asp-Phe und b-AspPhe



8 Literaturverzeichnis

1. Kurahashi, K. (1974). Biosynthesis of small peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 445-459.
2. Marahiel, M.A. (1997). Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem. Biol.* **4**, 561-567.
3. von Döhren, H., Keller, U., Vater, J. & Zocher, R. (1997). Multifunctional peptide synthetases. *Chem. Rev.* **97**, 2675-2705.
4. Kleinkauf, H. & von Döhren, H. (1990). Antibiotics-cloning of biosynthetic pathways. *FEBS Lett.* **268**, 405-407.
5. Kleinkauf, H. & von Döhren, H. (1996). A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **236**, 335-351.
6. Zuber, P., Nakano, M. & Marahiel, M.A. (1993). Peptide antibiotics. In *In Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*, Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., Eds., pp. 897-916, Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.
7. Zocher, R. & Keller, U. (1997). Thiol template peptide synthesis systems in bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **38**, 85-131.
8. Davies, J. (1990). What are antibiotics? Archaic functions of modern activities. *Mol. Microbiol.* **4**, 1227-1232.
9. Marahiel, M.A., Nakano, M.M. & Zuber, P. (1993). Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* **7**, 631-636.
10. Rice, S.A., Givskov, M., Steinberg, P. & Kjelleberg, S. (1999). Bacterial signals and antagonists: The interaction between bacteria and higher organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 23-31.
11. Dunlap, P.V. (1999). Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 5-12.
12. Solomon, J.M., Magnuson, R., Srivastava, A. & Grossman, A.D. (1995). Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **9**, 547-558.
13. Crosa, J.H. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 517-530.
14. Braun, V. & Killmann, H. (1999). Bacterial solution to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 104-109.
15. Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C.A., Schubert, S. & Heesemann, J. (1998). The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J. Bacteriol.* **180**, 538-546.
16. Gehring, A.M., DeMoll, E., Fetherston, J.D., Mori, I., Mayhew, G.F., Blattner, F.R., Walsh, C.T., Perry, R.D. (1998). Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.* **5**, 573-586.
17. Wyckoff, E.E., Stoebner, J.A., Reed, K.E. & Payne, S.M. (1997). Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: identification of genes required for early steps in siderophore biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**, 7055-7062.
18. Butterson, J.R., Choi, M.H., Watnick, P.I., Carroll, P.A. & Calderwood, S.B. (2000). *Vibrio cholerae* ViF is required for vibriobactin synthesis and is a member of the family of nonribosomal peptide synthetases. *J. Bac.* **182**, 1731-1738.
19. Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H. & Walsh, C.T. (1998). Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem. Biol.* **5**, 631-645.
20. Cole, S.T. & Barrell, B.G. (1998). Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found. Symp.* **217**, 160-172.
21. Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. & Mootz, H.D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2651-2673.
22. Konz, D. & Marahiel, M.A. (1999). How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem. Biol.* **6**, R39-48.
23. Duitman, E.H.H., Hamoen, L.W., et al. (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 13294-13299.
24. Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K. & Marahiel, M.A. (1997). The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem. Biol.* **4**, 927-937.

25. **Schwecke, T., Aharonowitz, Y., Palissa, H., von Döhren, H., Kleinkauf, H. & van Liempt, H.** (1992). Enzymatic characterisation of the multifunctional enzyme delta-(L-alpha- amino adipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Streptomyces clavuligerus*. *Eur. J. Biochem.* **205**, 687-694.
26. **van Wageningen, A.M., Kirkpatrick, P.N., et al.** (1998). Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* **5**, 155-162.
27. **Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D.C. & Grandi, G.** (1998). Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* **273**, 32857-32863.
28. **Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1997). The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J. Bacteriol.* **179**, 6843-6850.
29. **Johnson, R.D., Johnson, L.J., Itch, Y., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto, K.** (unveröffentlicht). Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity.
30. **Scott-Craig, J.S., Panaccione, D.G., Pocard, J.A. & Walton, J.D.** (1992). The cyclic peptide synthetase catalyzing HC-toxin production in the filamentous fungus *Cochliobolus carbonum* is encoded by a 15.7-kilobase open reading frame. *J. Biol. Chem.* **267**, 26044-26049.
31. **Tudzynski, P., Holter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N. & Keller, U.** (1999). Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 133-141.
32. **Weber, G., Schörgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. & Leitner, E.** (1994). The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr. Genet.* **26**, 120-125.
33. **Billman-Jacobe, H., McConville, M.J., Haites, R.E., Kovacevic, S. & Coppel, R.L.** (1999). Identification of a peptide synthetase involved in the biosynthesis of glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **33**, 1244-1253.
34. **Byford, M.F., Baldwin, J.E., Shiao, C.-Y. & Schofield, C.J.** (1997). The mechanism of the ACV synthetase. *Chem. Rev.* **97**, 2631-2649.
35. **Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1999). Design and application of multimodular peptide synthetases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 341-348.
36. **Smith, D.J., Earl, A.J. & Turner, G.** (1990). The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *Embo J.* **9**, 2743-2750.
37. **Gutierrez, S., Diez, B., Montenegro, E. & Martin, J.F.** (1991). Characterization of the *Cephalosporium acremonium* pcbAB gene encoding alpha-amino adipyl-cysteinyl-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the pcbC gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J. Bacteriol.* **173**, 2354-2365.
38. **Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Harada, K. & Shirai, M.** (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**, 520-529.
39. **Carmichael, W.W.** (1994). The toxins of the cyanobacteria. *Sci. Am.* , 64-72.
40. **Dittmann, J., Wenger, R.M., Kleinkauf, H. & Lawen, A.** (1994). Mechanism of cyclosporin A biosynthesis. Evidence for synthesis via a single linear undecapeptide precursor. *J. Biol. Chem.* **269**, 2841-2846.
41. **Stachelhaus, T. & Marahiel, M.A.** (1995). Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J. Biol. Chem.* **270**, 6163-6169.
42. **Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Döhren, H. & Kleinkauf, H.** (1995). Expression of an active adenylation domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett.* **357**, 212-216.
43. **Stachelhaus, T. & Marahiel, M.A.** (1995). Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 3-14.
44. **Gevers, W., Kleinkauf, H. & Lipmann, F.** (1968). The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **60**, 269-276.
45. **Schlumbohm, W., Stein, T., Ullrich, C., Vater, J., Krause, M., Marahiel, M.A., Kruft, V. & Wittmann-Liebold, B.** (1991). An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase. *J. Biol. Chem.* **266**, 23135-23141.
46. **Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. & Morris, H.R.** (1994). Detection of 4'-phosphopantetheine at the thioester binding site for L-valine of Gramicidin S synthetase 2. *FEBS Lett.* **340**, 39-44.
47. **Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. & Marahiel, M.A.** (1998). Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 22773-22781.

48. Vater, J. & Kleinkauf, H. (1976). Gramicidin S-synthetase. A further characterization of phenylalanine racemase, the light enzyme of Gramicidin S-synthetase. *Biochim. Biophys. Acta* **429**, 1062-1072.
49. Haese, A., Pieper, R., von Ostrowski, T. & Zocher, R. (1994). Bacterial expression of catalytically active fragments of the multifunctional enzyme enniatin synthetase. *J. Mol. Biol.* **243**, 116-122.
50. Billich, A., Zocher, R., Kleinkauf, H., Braun, D.G., Lavanchy, D. & Hochkeppel, H.K. (1987). Monoclonal antibodies to the multienzyme enniatin synthetase. Production and use in structural studies. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **368**, 521-529.
51. Turgay, K. & Marahiel, M.A. (1994). A general approach for identifying and cloning peptide synthetase genes. *Pept. Res.* **7**, 238-241.
52. Kunst, F., et al. Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.
53. Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Hopwood, D.A. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**, 77-96.
54. Oudega, B., Vandenbol, M. & Konigstein, G. (1997). A 12 kb nucleotide sequence containing the alanine dehydrogenase gene *az 279* degrees on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Microbiology* **143**, 1489-1491.
55. Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G. & van Sinderen, D. (1993). Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **8**, 821-831.
56. Turgay, K., Krause, M. & Marahiel, M.A. (1992). Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.* **6**, 2743-2744.
57. Zhang, J.H., Quigley, N.B. & Gross, D.C. (1995). Analysis of the *syxB* and *syxC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. *J. Bacteriol.* **177**, 4009-4020.
58. Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Pace, E., Ferranti, P. & Grandi, G. (1998). Coordinate transcription and physical linkage of domains in surfactin synthetase are not essential for proper assembly and activity of the multienzyme complex. *J. Biol. Chem.* **273**, 14403-14410.
59. Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M.A. (1995). Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* **269**, 69-72.
60. Stachelhaus, T., Hüser, A. & Marahiel, M.A. (1996). Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.* **3**, 913-921.
61. Lipmann, F., Grevers, W., Kleinkauf, H. & Roskoski, R.J. (1971). Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Advan. Enzymol.* **35**, 1-34.
62. Gocht, M. & Marahiel, M.A. (1994). Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* **176**, 2654-2662.
63. Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **274**, 765-769.
64. Baldwin, T.O. (1996). Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure* **265**, 561-567.
65. Conti, E., Franks, N.P. & Brick, P. (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**, 287-298.
66. Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. & Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the nonribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J.* **16**, 4174-4183.
67. Hawkins, A.R. & Lamb, H.K. (1995). The molecular biology of multidomain proteins. Selected examples. *Eur. J. Biochem.* **232**, 7-18.
68. Tokita, K., Hori, K., Kurotsu, T., Kanda, M. & Saito, Y. (1993). Effect of single base substitutions at glycine-870 codon of gramicidin S synthetase 2 gene on proline activation. *J. Biochem. (Tokyo)* **114**, 522-527.
69. Pavela-Vrancic, M., Pfeifer, E., van Liempt, H., Schäfer, H.J., von Döhren, H. & Kleinkauf, H. (1994). ATP binding in peptide synthetases: determination of contact sites of the adenine moiety by photoaffinity labeling of tyrocidine synthetase 1 with 2azidoadenosine triphosphate. *Biochemistry* **33**, 6276-6283.
70. Saito, M., Hori, K., Kurotsu, T., Kanda, M. & Saito, Y. (1995). Three conserved glycine residues in valine activation of gramicidin S synthetase 2 from *Bacillus brevis*. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**, 276-282.

71. **Stachelhaus, T., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493-505.
72. **Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M. & Zocher, R.** (1993). Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Mol. Microbiol.* **7**, 905-914.
73. **Silakowski, B., Schairer, H.U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blocker, H., Hofle, G., Beyer, S. & Müller, R.** (1999). New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* dw4/3-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 37391-37399.
74. **Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R.E., Milnamov, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D.D., Grolach, J., Mayo, J.M., Hu, A., Goff, S., Schmid, J. & Ligon, J.M.** (2000). The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So CE90. *Chem. Biol.* **7**, 97-109.
75. **Rawlings, M. & Cronan Jr., J.E.** (1992). The gene encoding *Escherichia coli* acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes. *J. Biol. Chem.* **267**, 5751-5754.
76. **Sherman, D.H., Malpartida, F., Bibb, M.J., Kieser, H.M. & Hopwood, D.A.** (1989). Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22. *Embo J.* **8**, 2717-2125.
77. **Perham, R.N.** (1991). Domains, motifs and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry* **30**, 8509-8512.
78. **Kim, J.-J.P., Wang, M. & Pashke, R.** (1993). Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from the pig liver mitochondria with and without substrate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 7523-7527.
79. **Stein, T., Vater, J., Kruff, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. & Morris, H.R.** (1996). The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J. Biol. Chem.* **271**, 15428-15435.
80. **Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M.A. & Holak, T.A.** (2000). Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure*, **8**, in press
81. **Nakano, M.M., Corbell, N., Besson, J. & Zuber, P.** (1992). Isolation and characterization of sfp: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **232**, 313-321.
82. **Borchert, S., Stachelhaus, T. & Marahiel, M.A.** (1994). Induction of surfactin production in *Bacillus subtilis* by *gsp*, a gene located upstream of the Gramicidin S operon in *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **176**, 2458-2462.
83. **Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C.T.** (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3**, 923-936.
84. **Weinreb, P.H., Quadri, L.E., Walsh, C.T. & Zuber, P.** (1998). Stoichiometry and specificity of in vitro phosphopantetheinylation and aminoacylation of the valine-activating module of surfactin synthetase. *Biochemistry* **37**, 1575-1584.
85. **Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. & Walsh, C.T.** (1998). Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **37**, 1585-1595.
86. **Kealey, J.T., Liu, L., Santi, D.V., Betlach, M.C. & Barr, P.J.** (1998). Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 505-509.
87. **Dökel, S.**, diese Arbeit.
88. **Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A. & Ficner, R.** (1999). Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *Embo J.* **18**, 6823-6831.
89. **De Crecy-Lagard, V., Marliere, P. & Saurin, W.** (1995). Multienzymatic nonribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation. *C. R. Acad. Sci. III* **318**, 927-936.
90. **de Crecy-Lagard, V., Blanc, V., Gil, P., Naudin, L., Lorenzon, S., Famechon, A., Bamas-Jacques, N., Crouzet, J. & Thibaut, D.** (1997). Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes. *J. Bacteriol.* **179**, 705-713.
91. **Leslie, A.G.W.** (1990). Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at a 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **213**, 167-186.
92. **Heath, R.J. & Rock, C.O.** (1998). A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J. Bacteriol.* **180**, 1425-1430.

93. Bergendahl, V., persönliche Mitteilung.
94. Vater, J., Stein, T., Vollenbroich, D., Kruft, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Liu, L & Zuber, P. (1997). The modular organization of multifunctional peptide synthetases. *J. Protein Chem.* **16**, 557-564.
95. Belshaw, P.J., Walsh, C.T. & Stachelhaus, T. (1999). Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* **284**, 486-489.
96. Keating, T.A. & Walsh, C.T. (1999). Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 598-606.
97. Li, Y.M., Milne, J.C., Madison, L.L., Kolter, R. & Walsh, C.T. (1996). From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: Microcin B17 synthase. *Science* **274**, 1188-1193.
98. Quadri, L.E., Keating, T.A., Patel, H.M. & Walsh, C.T. (1999). Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* Nonribosomal Peptide Siderophore Pyochelin: *In Vitro* Reconstitution of Aryl-4,2-bisthiazoline Synthetase Activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry* **38**, 14941-14954.
99. Gallo, K.A., Tanner, M.E. & Knowles, J.R. (1993). Mechanism of the reaction catalyzed by glutamate racemase. *Biochemistry* **32**, 3991-3997.
100. Galakatos, N.G. & Walsh, C.T. (1987). Specific proteolysis of native alanine racemases from *Salmonella typhimurium*: identification of the cleavage site and characterization of the clipped two-domain proteins. *Biochemistry* **26**, 8475-8480.
101. Stachelhaus, T. & Walsh, C.T. (2000). Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of the Gramicidin S synthetase. *Biochemistry*, in press.
102. Stindl, A. & Keller, U. (1994). Epimerization of the Dvaline portion in the biosynthesis of actinomycin D. *Biochemistry* **33**, 9358-9364.
103. Linne, U. (1999), unveröffentlicht
104. Pieper, R., Kleinkauf, H. & Zocher, R. (1992). Enniatin synthetases from different fusaria exhibiting distinct amino acid specificities. *J. Antibiot. (Tokyo)* **45**, 1273-1277.
105. Schneider, A. & Marahiel, M.A. (1998). Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in nonribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol.* **169**, 404-410.
106. Pazirandeh, M., Chirala, S.S., Huang, W.Y. & Wakil, S.J. (1991). Site-directed mutagenesis studies on the recombinant thioesterase domain of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 20946-20952.
107. Cortes, J., Wiesmann, K.E., Roberts, G.A., Brown, M.J., Staunton, J. & Leadlay, P.F. (1995). Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* **268**, 1487-1489.
108. Witkowski, A., Naggert, J., Witkowska, H.E., Randhawa, Z.I. & Smith, S. (1992). Utilization of an active serine 101 to cysteine mutant to demonstrate the proximity of the catalytic serine 101 and histidine 237 residues in thioesterase II. *J. Biol. Chem.* **267**, 18488-18492.
109. de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C. & Grandi, G. (1997). Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 25304-25309.
110. Mootz, H.D., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A. (2000). Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc Nat Acad Sci USA*, submitted.
111. Shaw-Reid, C.A., Kelleher, N.L., Losey, H.C., Gehring, A.M., Berg, C. & Walsh, C.T. (1999). Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem. Biol.* **6**, 385-400.
112. Pospiech, A., Bietenhader, J. & Schupp, T. (1996). Two multifunctional peptide synthetases and an O-methyltransferase are involved in the biosynthesis of the DNA-binding antibiotic and antitumor agent saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus*. *Microbiol.* **142**, 741-746.
113. Casqueiro, J., Gutierrez, S., Banuelos, O., Fierro, F., Velasco, J. & Martin, J.F. (1998). Characterization of the *lys2* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding alpha-amino adipic acid reductase. *Mol. Gen. Genet.* **259**, 549-556.
114. Ehmman, D.E., Gehring, A.M. & Walsh, C.T. (1999). Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha- amino adipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry* **38**, 6171-6177.
115. Doekel, S. & Marahiel, M.A. (2000). Biosynthesis of natural products on modular peptide synthetases. *Met. Engineer.*, in press.
116. Riederer, B., Han, M. & Keller, U. (1996). D-Lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *J. Biol. Chem.* **271**, 27524-27530.

117. Witkowski, A., Witkowska, H.E. & Smith, S. (1994). Reengineering the specificity of a serine active-site enzyme: two active-site mutations convert a hydrolase to a transferase. *J. Biol. Chem.* **269**, 379-383.
118. Keating, T.A., Suo, Z., Ehmann, D.E. & Walsh, C.T. (2000). Selectivity of the yersiniabactin synthetase adenylation domain in the two step process of amino acid activation and transfer to a holo-carrier protein domain. *in press*.
119. Yakimov, M.M., Fredrickson, H.L. & Timmis, K.N. (1996). Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50. *Biotechnol Appl Biochem* **23**, 13-18.
120. Fsihi, H. & Cole, S.T., unveröffentlicht.
121. Paitan, Y., Alon, G., Orr, E., Ron, E.Z. & Rosenberg, E. (1999). The first gene in the biosynthesis of the polyketide antibiotic TA of *Myxococcus xanthus* codes for a unique PKS module coupled to a peptide synthetase. *J. Mol. Biol.* **286**, 465-474.
122. Motamedi, H. & Shafiee, A. (1998). The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *Eur. J. Biochem.* **256**, 528-534.
123. Cane, D.E. & Walsh, C.T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, R319-325.
124. Cane, D.E., Walsh, C.T. & Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63-68.
125. Schneider, A., Stachelhaus, T. & Marahiel, M.A. (1998). Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 308-318.
126. Eppelmann, K., (unveröffentlicht).
127. Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N. & Keller, U. (2000). Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for the synthesis of N-methylated acyl-peptides. *Chem. Biol.*, in press.
128. Bedford, D., Jacobsen, J.R., Luo, G., Cane, D.E. & Khosla, C. (1996). A functional chimeric modular polyketide synthase generated via domain replacement. *Chem. Biol.* **3**, 827-831.
129. Symmank, H., Saenger, W. & Bernhard, F. (1999). Analysis of engineered multifunctional peptide synthetases. Enzymatic characterization of surfactin synthetase domains in hybrid bimodular systems. *J. Biol. Chem.* **274**, 21581-21588.
130. Elsner, A., Engert, H., Saenger, W., Hamoen, L., Venema, G. & Bernhard, F. (1997). Substrate specificity of hybrid modules from peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* **272**, 4814-4819.
131. Dieckmann, R., Pavela-Vrancic, M., von Döhren, H. & Kleinkauf, H. (1999). Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase 1. *J. Mol. Biol.* **288**, 129-140.
132. Schwarzer, D. (1999). Die Thioesterasedomäne der Tyrocidin-Synthetasen: Charakterisierung durch Konstruktion eines Hybridenzym der nichtribosomalen Peptidsynthese. *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg.
133. Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268.
134. Scutcliffe, J.G. (1979). Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Methods Enzymol.* **43**, 77-90.
135. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. & Falkow, S. (1992). Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Biotechnology* **24**, 153-171.
136. Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahim, I., Haeuptle, M.T., Dobberstein, B. (1987). A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol.* **155**, 416-433.
137. Gentz, R. & Bujard, H. (1985). Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5. *J. Bacteriol.* **164**, 70-77.
138. Miller, J.H. (1992). A short course of bacterial genetics: *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
139. Farabough, P.J. (1978). Sequence of the *lacI* gene. *Nature* **274**, 765-769.
140. Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B. & Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 408-412.
141. Johnson, B.A., Anker, H. & Meleney, F.L. (1945). *Bacitracin A*: A new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science* **102**, 376-377.
142. Javaheri, M., Jenneman, G.E., McInerney, M.J. & Knapp, R.M. (1985). Anaerobic production of a Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Env. Microb.* **50**, 698-700.
143. Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987). XL1Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-379.

144. **Zamenhof, P.J. & Villarejo, M.** (1972). Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting γ -complementation of β -galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.* **110**, 171-178.
145. **Studier, F.W. & Moffatt, B.A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
146. **Grodberg, J. & Dunn, J.J.** (1988). *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**, 11245-11253.
147. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
148. **Dökel, S.** (1996). Untersuchungen zur Domänenstruktur von modularen Peptidsynthetasen und zur *in vivo*-Aktivität der 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase Gsp. *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg.
149. **Birnboim, H.C. & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
150. **Vogelstein, B. & Gillespie, D.** (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 615-619.
151. **Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
152. **Schägger, H. & Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gele electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
153. **Burnette, N.** (1981). *Western blotting*: electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
154. **Bennett, J. & Scott, K.J.** (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal. Biochem.* **43**, 173-182.
155. **Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
156. **Mullis, K.B. & Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335.
157. **Lee, S.G. & Lipmann, F.** (1975). Tyrocidine synthetase system. *Methods Enzymol.* **43**, 585-602.
158. **Gaidenko, T.A. & Khaikinson, M.** (1988). Cloning of the genes controlling the biosynthesis of bacitracin in *Bacillus licheniformis*. *Mol. Gen. Microbiol. Virusol.* **2**, 24-28.
159. **Konz, D.** (1998). Identifizierung und Charakterisierung des Bacitracin Biosynthese-Operons aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716, Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
160. **Konz, D., Doekel, S. & Marahiel, M.A.** (1999). Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J. Bacteriol.* **181**, 133-140.
161. **Jenny, K., Kappeli, O. & Fiechter, A.** (1991). Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. *Appl. Microbiol, Biotechnol.* **36**, 5-13.
162. **Horowitz, S. & Griffin, W.M.** (1991). Structural analysis of *Bacillus licheniformis* 86 surfactant. *J. Ind. Microbiol.* **7**, 45-52.
163. **Georgiou, G., Lin, S.C. & Sharma, M.M.** (1992). Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology (N Y)* **10**, 60-65.
164. **Horowitz, S., Gilbert, J.N. & Griffin, W.M.** (1990). Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *J. Ind. Microbiol.* **6**, 243-248.
165. **McInerney, M.J., Javaheri, M. & Nagle, D.P. Jr.** (1990). Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. *J. Ind. Microbiol.* **5**, 95-101.
166. **Harvey, S., Elashvili, I., Valdes, J.J., Kamely, D. & Chakrabarty, A.M.** (1990). Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Biotechnology (N Y)* **8**, 228-230.
167. **Fiechter, A.** (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* **10**, 208-217.
168. **Galli, G., Rodriguez, F., Cosmina, P., Pratesi, C., Nogarotto, R., de Ferra, F. & Grandi, G.** (1994). Characterization of the surfactin synthetase multi-enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1205**, 19-28.
169. **Kittelberger, R., Altmann, M. & von Döhren, H.** (1982). Kinetics of amino acid activation in gramicidin S synthesis. In *Peptide antibiotics, biosynthesis and functions*, Kleinkauf, H., and von Döhren, H., Eds., pp. 209-218, W. de Gruyter, Berlin.
170. **Fujikawa, K., Suzuki, T. & Kurahashi, K.** (1968). Biosynthesis of tyrocidine by a cell-free enzyme system of *Bacillus brevis* ATCC 8185. I. Preparation of partially purified enzyme system and its properties. *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 232-246.

171. **Eppelmann, K.** (1999). Konstruktion eines *srfA*-Deletionsstammes für die Überproduktion von Peptidsynthetasen in *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Diplomarbeit*, Philipps-Universität-Marburg.
172. **Ohno, M., Kato, T., Makisumi, S. & Izumiya, N.** (1966). Studies of peptide antibiotics. IV. The synthesis of tyrocidine A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **39**, 1738-1747.
173. **Mittenhuber, G., Weckermann, R. & Marahiel, M.A.** (1989). Gene cluster containing the genes for tyrocidine synthetases 1 and 2 from *Bacillus brevis*: evidence for an operon. *J. Bacteriol.* **171**, 4881-4887.
174. **Marahiel, M.A.** (1992). Multidomain enzymes involved in peptide synthesis. *FEBS Lett.* **307**, 40-43.
175. **Galvez, A., Valdivia, E., Gonzalez-Segura, A., Lebbadi, M., Martinez-Bueno, M. & Maqueda, M.** (1993). Purification, characterization and lytic activity against *Naegleria fowleri* of two amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* A12. *Appl. Environ. Microb.* **59**, 1480-1486.
176. **Lebbadi, M., Galvez, A., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M. & Maqueda, M.** (1994). Purification of amoebolytic substances from *Bacillus licheniformis* M-4. *Arch. Microbiol.* **162**, 98-102.
177. **Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. & Fredrickson, H.L.** (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1706-1713.
178. **Jenneman, G.E., McInerney, M.J., Knapp, R.M., Clark, J.B., Feero, J.M., Revus, D.E., & Menzie, D.E.** (1983). A halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery. In *Developments in industrial microbiology*. (Vol. 24), pp. 485-492, , Washington, D. C.
179. **Yakimov, M.M., Abraham, W.R., Meyer, H., Laura, G. & Golyshin, P.N.** (1999). Structural characterization of lichenysin A components by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1438**, 273-280.
180. **Thomas, D.W. & Ito, T.** (1969). The revised structure of the peptide antibiotic esperin, established by mass spectroscopy. *Tetrahedron* **25**, 1985-1990.
181. **Reverchon, S., Nasser, W. & Robert-Baudony, R.** (1994). *pecS*: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **11**, 1127-1139.
182. **Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. & Imanaka, T.** (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bac.* **175**, 6459-6466.
183. **Lindum, P.W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M.** (1998). N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **180**, 6384-6388.
184. **Tsuge, K., Ano, T. & Shoda, M.** (1996). Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. *Arch. Microbiol.* **165**, 243-251.
185. **Tognoni, A., Franchi, E., Magistrelli, C., Colombo, E., Cosmina, P. & Grandi, G.** (1995). A putative new peptide synthase operon in *Bacillus subtilis*: partial characterization. *Microbiology* **141**, 645-648.
186. **Mulligan, C. & Gibbs, B.** (1989). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microb.* **55**, 3016-3019.
187. **Yakimov, M.M. & Golyshin, P.N.** (1997). ComA-dependent transcriptional activation of lichenysin A synthetase promoter in *Bacillus subtilis* cells. *Biotechnol. Prog.* **13**, 757-761.
188. **Nixon, A.E., Ostermeier, M. & Benkovic, S.J.** (1998). Hybrid enzymes: manipulating enzyme design. *Trends Biotechnol.* **16**, 258-264.
189. **Hedstrom, L., Szilagyi, L. & Rutter, W.J.** (1992). Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science* **255**, 1249-1253.
190. **Hedstrom, L., Perona, J.J. & Rutter, W.J.** (1994). Converting trypsin to chymotrypsin: residue 172 is a substrate specificity determinant. *Biochemistry* **33**, 8757-8763.
191. **Ranganathan, A., Timoney, M., Bycroft, M., Cortes, J., Thomas, I.P., Wilkinson, B., Kellenberger, L., Hanefeld, U., Galloway, I.S., Staunton, J. & Leadlay, P.F.** (1999). Knowledge-based design of bimodular and trimodular polyketide synthases based on domain and module swaps: a route to simple statin analogues. *Chem. Biol.* **6**, 731-741.
192. **Perraud, A.-L., Kimmel, B., Weiss, V. & Gross, R.** (1998). Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPt domains of the sensor proteins. *Mol. Microbiol.* **27**, 875-887.
193. **Aharonowitz, Y., Bergmeyer, J., Cantoral, J.M., Cohen, G., Demain, A.L., Fink, U., Kinghorn, J., Kleinkauf, H., MacCabe, A. Palissa, H. et al.** (1993). Delta-(L-alpha-aminoadipyl)-

- L-cysteinyl-D-valine synthetase, the multienzyme integrating the four primary reactions in beta-lactam biosynthesis, as a model peptide synthetase. *Biotechnology (NY)* **11**, 807-810.
194. **Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D. & Kamp, R.M.** (1993). Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *J. Biol. Chem.* **268**, 7678-7684.
195. **Weckermann, R., Furbass, R. & Marahiel, M.A.** (1988). Complete nucleotide sequence of the *tycA* gene coding the tyrocidine synthetase 1 from *Bacillus brevis*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 11841.
196. **Hopwood, D.A. & Khosla, C.** (1992). Genes for polyketide secondary metabolic pathways in microorganisms and plants. *Ciba Found. Symp.* **171**, 88-106.
197. **Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D. & Walsh, C.T.** (1998). The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry* **37**, 11637-11650.
198. **Xu, Q., Zheng, J., Xu, R., Barany, G. & Cowburn, D.** (1999). Flexibility of interdomain contacts revealed by topological isomers of bivalent consolidated ligands to the dual Src homology domain SH(32) of abelson. *Biochemistry* **38**, 3491-3497.
199. **Riggs, S.D. & Smithgall, T.E.** (1999). SH2-kinase linker mutations release Hck tyrosine kinase and transforming activities in rat-2 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **274**, 26579-26583.
200. **Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J. & Harrison, S.C.** (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell* **3**, 629-638.
201. **Lupas, A.** (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**, 375-382.
202. **Gokhale, R.S., Tsuji, S.Y., Cane, D.E. & Khosla, C.** (1999). Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science* **284**, 482-485.
203. **Gokhale, R.S., Hunziker, D., Cane, D.E. & Khosla, C.** (1999). Mechanism and specificity of the terminal thioesterase domain from the erythromycin polyketide synthase. *Chem. Biol.* **6**, 117-125.
204. **Ehmann, D.E., Shaw-Reid, C.A., Losey, H.C. & Walsh, C.T.** (2000). The EntF and EntE adenylation domains of the *E. coli* Enterobactin synthetase: Sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates. *in press*.
205. **Pavela-Vrancic, M., Dieckmann, R., von Döhren, H. & Kleinkauf, H.** (1999). Editing of non-cognate aminoacyl adenylates by peptide synthetases. *Biochem. J.* **342 Pt 3**, 715-719.
206. **Gokhale, R.S. & Khosla, C.** (2000). Role of linkers in communication between protein modules. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 22-27.
207. **Schauwecker, F., Pfennig, F., Schröder, W. & Keller, U.** (1998). Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from *Streptomyces chrysomallus* and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II. *J. Bacteriol.* **180**, 2468-2474.
208. **Kao, C.M., Pieper, R., Cane, D.E. & Khosla, C.** (1996). Evidence for two catalytically independent clusters of active sites in a functional modular polyketide synthase. *Biochemistry* **35**, 12363-12368.
209. **Fujikawa, K., Sakamoto, Y., Suzuki, T. & Kurahashi, K.** (1968). Biosynthesis of tyrocidine by a cell-free enzyme system of *Bacillus brevis* ATCC 8185. II. Amino acid substitution in tyrocidine. *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 520-533.
210. **Weissman, K.J., et al. & Leadlay, P.F.** (1998). The thioesterase of the erythromycin-producing polyketide synthase: Influence of acyl chain structure on the mode of release of substrate analogous from the acyl enzyme intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1437-1440.
211. **Ullrich, C., Kluge, B., Palacz, Z. & Vater, J.** (1991). Cell-free biosynthesis of surfactin, a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **30**, 6503-6508.
212. **Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y. & Shoda, M.** (1999). The Genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8 (sfp)* Are Responsible for Conversion of *Bacillus subtilis* 168 to Plipastatin Production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2183-2192.
213. **May, J. & Marahiel, M.A.** (unveröffentlicht). DhbF: a complete dimodule essential for the synthesis of a siderophore in *Bacillus subtilis*.
214. **McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D.A. & Khosla, C.** (1993). Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science* **262**, 1546-1550.
215. **Connerton, I.F., Fincham, J.R.S., Sandeman, R.A. & Hynes, M.J.** (1990). Comparison and cross-species expression of the acetyl-CoA synthetase genes of the ascomycete fungi, *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* **4**, 451-460.
216. **Bailey, A.M., Kerchow, M.J., Hunt, B.A., Perterson, I.C., Chamley, A.K., Reynolds, S.E., Clarkson, J.M.** (1996). Cloning and sequence analysis of an intron-containing domain from a peptide synthetase-encoding gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **173**, 195-197.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. A. Marahiel danke ich für die Bereitstellung des Themengebietes und für das dauernde Engagement an dieser Arbeit. Der eigentliche Wissensgewinn während dieser Zeit ist in schriftlicher Form gar nicht ausgedrückt.

Herrn Prof. Dr. Th. Carell danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die Erzeugung des (Arbeits)-Klimas, für die Betreuung eines zeitweise *technical-disabled* Kollegen und das sehr gute Teamwork. Mein besonderer Dank gilt den PPS-Kollegen Henning Mootz, Dirk Konz, Katrin Eppelmann und Veit Bergendahl. Ich danke auch Torsten Stachelhaus dafür, daß er den Entschluß gefaßt hat, an die Stätte seines ehemaligen Lieblings-Diplomanden zurückzukehren.

Den Kollegen Jürgen May, Thomas Wendrich und Henning Mootz aus Labor 4707 gilt mein Dank auch dafür, daß sie wußten, was es heißt, wenn die Tür geschlossen war. In diesem Zusammenhang muß auch Petra Köhler erwähnt werden.

Meinen Vertiefungsstudenten Hong-Ying Gan-Schreier, Katrin Eppelmann und Alexandra Mees danke ich für deren aufopfernde Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung der durchgeführten Untersuchungen danke ich der Firma DSM, Geleen, Holland. Insbesondere die Herren Peter Quaedflieg und Theo Sonke gaben mir durch ihr Interesse immer einen beträchtlichen Motivationsschub. Ihre Diskussionsbereitschaft bereicherte diese Arbeit.

Für die kritische und schnelle Durchsicht des Manuskriptes danke ich Henning Mootz, Torsten Stachelhaus und auch Katrin Eppelmann (obwohl ich ihren Kommateregeln teilweise vehement entgegengetreten muß!).

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei meinen Freunden Tatjana Achenbach, mit der ich die gesamte Studienzeit verbrachte und Harm Brummerhop bedanken. Auch Claudi Mundt möchte ich hier erwähnen.

Meinen Eltern gilt in erster Linie mein Dank, Ihnen widme ich diese Arbeit.