

**Charakterisierung des Biosynthese-Operons
für das Peptidantibiotikum Tyrocidin
und
Konstruktion von Hybridpeptidsynthetasen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Henning Mootz

aus Braunschweig

Marburg/Lahn 1999

Vom Fachbereich Chemie der
Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 24.6.99 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel
Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Kindl

Tag der mündlichen Prüfung am 14.7.99.

Zusammenfassung

Das zyklische Dekapeptid Tyrocidin aus *Bacillus brevis* ATCC 8185 ist ein Produkt der nichtribosomalen Peptidbiosynthese, in der drei multifunktionelle Peptidsynthetasen gleichermaßen als Matrize und Synthesemaschinerie agieren. Die Tyrocidin Synthetasen TycA, TycB und TycC erkennen und aktivieren spezifische Substrataminosäuren und binden sie kovalent als Thioester am Kofaktor 4'-Phosphopantethein (Ppant). Eine gerichtete Verknüpfung führt zum linearen Dekapeptid (-DPhe-Pro-Phe-DPhe-Asn-Gln-Tyr-Val-Orn-Leu-), das im letzten Schritt zum fertigen Produkt zyklisiert wird.

In dieser Arbeit wurde, ausgehend von dem für TycA kodierenden Gen *tycA*, das gesamte Tyrocidin Biosynthese-Operon kloniert und sequenziert (*tycA-F*, 39 kb). Die Identifikation und Analyse der Gene *tycB* und *tycC* machte den multimodularen Aufbau ihrer Genprodukte TycB und TycC deutlich. TycA (123 kDa) besteht aus einem, TycB (405 kDa) aus drei und TycC (724 kDa) aus sechs Modulen, von denen jedes für den Einbau einer Aminosäure in das Produkt verantwortlich ist. Die Module können in verschiedene Domänen unterteilt werden, die die einzelnen Reaktionen katalysieren. Fünf Adenylierungs(A)-Domänen aus TycB und TycC, die ihre Substrate erkennen und als Aminoacyladenylat aktivieren, wurden als rekombinante, eigenständige Enzymfragmente hergestellt und biochemisch charakterisiert. Ihre Spezifitäten belegen die der Produktsequenz entsprechende lineare Anordnung der katalytischen Zentren der Tyrocidin Synthetasen.

Die Initiationsreaktion der Tyrocidinsynthese, die Bildung des enzymgebundenen Intermediates DPhe-Pro, wurde mit rekombinanten Proteinen *in vitro* rekonstituiert. Im Zusammenspiel von TycA und ProCAT, dem ersten Modul von TycB, konnte die essentielle Rolle der Kondensations(C)-Domäne bei der Bildung der Peptidbindung gezeigt werden.

Die katalytische Eigenständigkeit der Module und Domänen wurde für die Konstruktion von Hybridpeptidsynthetasen zur Synthese neuer Produkte ausgenutzt. Ausgehend von dem dimodularen System TycA/ProCAT wurden Proteinmatrizen für die Synthese von Tripeptiden aufgebaut. Dazu wurde das für ProCAT kodierende Genfragment mit den für die Module TycB2 (PheCAT), TycC5 (OrnCAT) und TycC6 (LeuCATTe) kodierenden Fragmenten fusioniert. Die Terminations(Te)-Domäne von LeuCATTe bewirkte in dem trimodularen System TycA/ProCAT-LeuCATTe eine hydrolytische Abspaltung des linearen Produktes DPhe-Pro-Leu. Die Tripeptide DPhe-Pro-Phe und DPhe-Pro-Orn wurden erst mit der Integration der Te-Domäne von den Systemen TycA/ProCATPheCAT-Te und TycA/ProCAT-OrnCAT-Te freigesetzt. Somit konnten sowohl durch Modul- als auch durch Domänenfusionen funktionelle Hybridenzyme erhalten werden. Spezifitätsstudien an der Te-Domäne deuteten auf ihre Funktion in der Ringschlußbildung im natürlichen System hin: Freies DPhe-Pro wurde als Mimikri des linearen Dekapeptides selektiv als Nukleophil für die Abspaltungsreaktion akzeptiert.

Ppant-Transferasen katalysieren die Modifikation ihrer Substrate mit dem Kofaktor Ppant. Eine Unterbrechung von *acps* aus *Escherichia coli*, dessen Genprodukt das Acyl-carrier Protein der Fettsäurebiosynthese modifiziert, konnte durch die Gene der mit Peptidsynthetasen assoziierten Ppant-Transferasen Sfp und Gsp *in trans* komplementiert werden.

1 Abkürzungen

aa	Aminosäure
ACP	Acyl-carrier Protein
ACV	δ -(α -Aminoadipyl)-cysteinyl-D-valin
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
C-Domäne	Kondensationsdomäne
Cm	Chloramphenicol
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
dpm	Zerfälle pro Minute (decays per minute)
DTE	1,4-Dithioerythrol
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
EEE	Essigsäureethylester
ESI	Electrospray-ionisation
FPLC	schnelle Flüssigchromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
M-Domäne	N-Methylierungsdomäne
MCS	Multipler Klonierungsbereich (multiple cloning site)
MS	Massenspektrometrie
OD	Optische Dichte
PCP	Peptidyl-carrier Protein oder T-Domäne
PCR	Polymerase chain reaction
Ppant	4'-Phosphopantethein
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
R-Domäne	Reduktasedomäne
RBS	ribosomale Bindungsstelle
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp	Spectinomycin
ssDNA	einzelsträngige (single-stranded) DNA
T-Domäne	Thiolierungsdomäne oder PCP

TCA	Trichloressigsäure
Te-Domäne	Terminationsdomäne
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
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 Aminosäuren: Abkürzungen und Molmassen

Aminosäure	3- Buchstabenkode	1-	M_r [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamin	Gln	Q	146
Gyclin	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	Y	181
Valin	Val	V	117

2 Einleitung

Mikroorganismen produzieren eine Vielzahl bioaktiver peptidischer Substanzen, die ihrem Synthesemechanismus zufolge in verschiedene Klassen eingeteilt werden können. Genkodierte Polypeptide wie die Lantibiotika [Jung, 1991] werden durch die von den Ribosomen vermittelte Translation einer mRNA-Matrize hergestellt und meist post-translational intensiv modifiziert. Eine sich durch enorme strukturelle Vielfalt auszeichnende Gruppe von niedermolekularen Peptiden wird dagegen durch multifunktionelle Enzyme synthetisiert, die gleichermaßen als Proteinmatrize dienen. Der Begriff der nichtribosomalen Peptidbiosynthese wurde geprägt, da die Unempfindlichkeit dieser Synthese gegenüber Inhibitoren der Translation wie Chloramphenicol und RNase gezeigt werden konnte [Mach *et al.*, 1963]. Heute ist allgemein akzeptiert, daß multimodulare Peptidsynthetasen ihre Substrate ähnlich den Fettsäuresynthetasen über 4'-Phosphopantethein-Kofaktoren kovalent binden, ggf. modifizieren und zum Polypeptidprodukt verknüpfen. Diese vielseitigen Katalysatoren bewerkstelligen so die komplexe Synthese von biotechnologisch und pharmakologisch wichtigen Produkten wie Vancomycin und den Penicillin-Vorstufen. Die Peptidsynthetasen für die Synthese des Peptidantibiotikums Tyrocidin, eines zyklischen Dekapeptides aus dem Bodenbakterium *Bacillus brevis*, sind das Thema der vorliegenden Arbeit.

2.1 Produkte der nichtribosomalen Peptidbiosynthese

2.1.1 Produzenten, Strukturen und Anwendungen

Die wichtigsten Produzenten nichtribosomal synthetisierter Peptide sind Gram-positive Bodenbakterien der Gattungen *Bacilli* und *Streptomyces*, einige Gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas* und Myxobakterien sowie filamentöse Pilze [Kleinkauf & von Döhren, 1990; Zuber *et al.*, 1993; Kleinkauf & von Döhren, 1996]. Die Produkte bestehen aus zwei bis 40 Aminosäuren [Marahiel, 1997], die in scheinbar unbegrenzten Variationsmöglichkeiten miteinander verbunden sein können. So entstehen lineare, zyklische und verzweigt zyklische Peptidketten. Auch deren Zusammensetzung ist vielseitiger als die der ribosomal produzierten Peptide. Als monomere Bausteine findet man nicht nur die proteinogenen (L)- α -Aminosäuren, sondern (L)- und (D)- α -Aminosäuren, α -Hydroxy- und Carbonsäuren aller Art. Seltener werden β -, γ - und δ -Aminosäuren angetroffen [Marahiel *et al.*, 1997]. Die Produkte können glykosyliert, hydroxyliert sowie an der Haupt- und an den Seitenketten

N-methyliert und *N*-formyliert sein. Weitere Strukturelemente sind Thiazolin- und Oxazolinringe in verschiedenen Oxidationsstufen. Abbildung 2.1-1 zeigt eine Auswahl einiger typischer Vertreter.

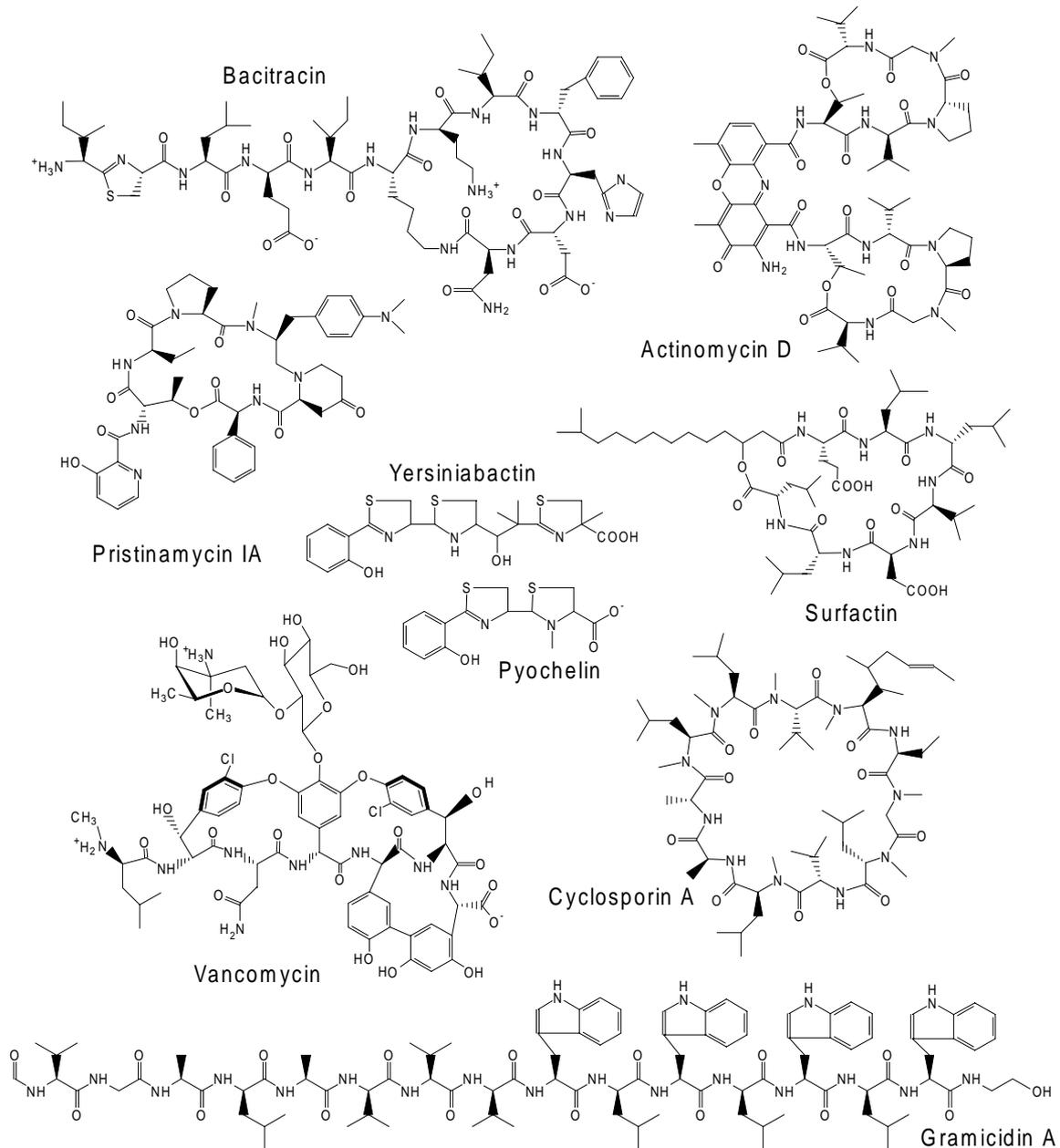


Abb. 2.1-1 Produkte der nichtribosomalen Peptidsynthese: Bacitracin, Actinomycin D, Pristinamycin IA, Vancomycin und Gramicidin A sind Peptidantibiotika [Konz *et al.*, 1997; Stindl & Keller, 1993; Thibaut *et al.*, 1997; van Wageningen *et al.*, 1998; Akashi & Kurahashi, 1978]. Cyclosporin hat immunosuppressive Eigenschaften und Surfactin wirkt als Biotensid [Lawen & Zocher, 1990; Ullrich *et al.*, 1991]. Yersiniabactin und Pyochelin, sogenannte Siderophore, dienen als Fe^{III}-Chelatoren [Gehring *et al.*, 1998a; Reimann *et al.*, 1998].

Die strukturelle Vielfalt nichtribosomal synthetisierter Produkte spiegelt das breite Spektrum ihrer biologischen Aktivitäten wider. Sie wirken antibiotisch, antifungal, antiherbizid, antiviral, antihelmentisch oder immunsuppressiv und finden daher verbreiteten Einsatz in der medizinischen, pharmakologischen und agrikulturellen Anwendung. Doch auch ihre physikalischen Eigenschaften stoßen auf Interesse. Gramacidin A bildet Ionenkanäle durch Membranen und Surfactin wird als Biotensid eingesetzt. Siderophore wie Enterobactin und Yersiniabactin dienen ihren Produzenten als Fe^{III} -Chelatbildner zur Aufnahme dieses essentiellen Ions unter Eisenmangelbedingungen (s. Kapitel 2.1.2).

Das Studium der nichtribosomalen Peptidbiosynthese führt zu einem zunehmenden Potential, die Produkte durch genetische Manipulationen in gesteigerten Mengen oder gezielten strukturellen Veränderungen zu erhalten [Stachelhaus *et al.*, 1996b; Marahiel *et al.*, 1997; Mootz & Marahiel, 1999a].

2.1.2 Physiologische Rolle

Das Anwendungspotential der Produkte der nichtribosomalen Peptidbiosynthese steht in krassem Gegensatz zu ihrer unverstandenen physiologischen Rolle [Katz & Demain, 1977]. Die Biosynthesewege zählen zum Sekundärmetabolismus ihrer Produzenten. Eine Unterbrechung der beteiligten Gene zeigt meist keinen unter Laborbedingungen erkennbaren Phänotyp. Spekulationen über mögliche regulatorische Funktionen der Produkte werden durch die Abhängigkeit ihrer Herstellung von bestimmten Wachstumphasen, etwa beim Übergang vom exponentiellen zur stationären Wachstum oder kurz vor Beginn des Sporulationsprozesses [Marahiel *et al.*, 1993], angeregt. Anderen Theorien zufolge dienen sie als exogene Signalstoffe oder Speichersubstanzen in der Spore. Nach der weithin akzeptierten, wengleich experimentell nicht belegten Hypothese fungieren die Verbindungen mit den vielfältigen Wirkungen als Kampfstoffe gegen konkurrierende Bewohner des gleichen Habitats. Dies könnte die biologischen Aktivitäten der Produkte begründen, gegen die sich die Produzenten mit speziellen Resistenzmechanismen auch selbst schützen müssen.

Für die Gruppe der Siderophore ist der Nutzen und der Gebrauch für die Produzenten allerdings ersichtlich [Crosa, 1989]. Diese Fe^{III} -Chelatbildner werden unter Eisenmangelbedingungen synthetisiert und gelangen durch spezielle Transportsysteme in den extrazellulären Raum und, komplexiert mit Fe^{III} , wieder in die Zelle zurück [Braun & Killmann, 1999]. Gerade für humanpathogene Bakterien wie *Yersinia pestis* (den Pesterreger) [Pelludat

et al., 1998] oder *Mycobacterium tuberculosis* (den Tuberkuloseerreger) [Quadri *et al.*, 1998a] sind diese Mechanismen wichtig, da sie in ihrem Wirt mit geringen Eisenkonzentrationen konfrontiert sind. Dementsprechend sind die nichtribosomalen Siderophor Synthetasen meist essentielle Faktoren für die Virulenz dieser Organismen [Carniel *et al.*, 1996] und könnten daher selbst ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe darstellen.

2.2 Multimodulare Peptidsynthetasen

2.2.1 Das multiple carrier Thiotemplat-Modell

Peptidsynthetasen sind modular aufgebaute Enzyme [Stachelhaus & Marahiel, 1995a; Marahiel *et al.*, 1997]. Ein Modul ist als eine Einheit definiert, die alle katalytischen Aktivitäten enthält, die für den spezifischen Einbau einer Aminosäure in das Produkt notwendig sind. Die Anzahl der Module und ihre Reihenfolge innerhalb des Peptidsynthetasensystems stimmt mit der Primärstruktur des Produktes überein. Jedes Modul erkennt, aktiviert und bindet sein spezifisches Substrat und verknüpft es mit dem Substrat des folgenden Moduls. Die kovalente Bindung der Substrate und Peptidintermediate erfolgt über den an jedem Modul gebundenen Kofaktor 4'-Phosphopantethein [Schlumbohm *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1996]. Die Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese beginnt am ersten Modul. Eine gerichtete Elongation bis zum letzten Modul des System führt zu einem schrittweisen Wachstum der Peptidkette vom N- zum C-Terminus. Durch Hydrolyse oder Zyklisierung des linearen enzymgebundenen Intermediates am letzten Modul wird die Termination bewirkt, die das Produkt freisetzt und der Proteinmatrize einen erneuten Synthesezyklus ermöglicht. Dieser Reaktionsablauf ist in Abbildung 2.2-1 dargestellt.

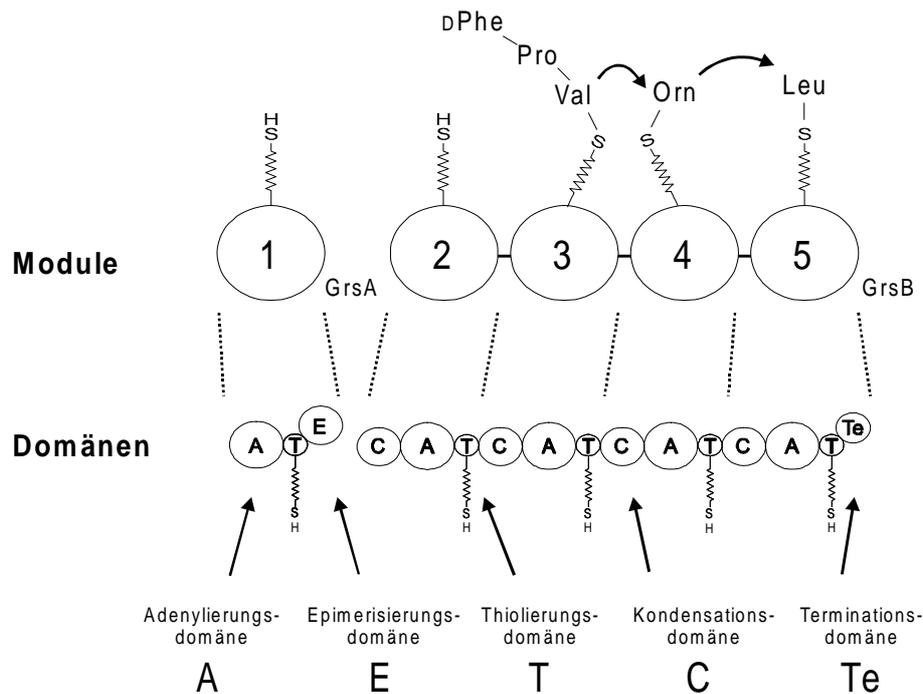


Abb. 2.2-1 Nichtribosomale Peptidbiosynthese nach dem multiple carrier Thiotemplat-Modell: Am Beispiel der Gramicidin S Synthetasen GrsA und GrsB ist der modulare Aufbau der Peptid-synthetasen illustriert. Jedes Modul katalysiert den Einbau und ggf. die Modifikation einer Aminosäure in die vom N- zum C-Terminus wachsende Peptidkette. Die Module können in katalytisch aktive Domänen unterteilt werden, die für die einzelnen Reaktionen verantwortlich sind. Zickzack-Linien repräsentieren den Kofaktor 4'-Phosphopantethein.

Die katalytischen Untereinheiten eines Moduls werden als Domänen bezeichnet. Je nach Position und Funktion kann ein Modul verschiedene Domänen enthalten [Mootz & Marahiel, 1997a]. Die Adenylierungs(A)- und Thiolierungs(T)-Domänen sind an der zweistufigen Reaktion der Aktivierung der Aminosäure beteiligt und gehören zur Minimalausstattung jedes Moduls. Die A-Domäne bildet unter ATP-Verbrauch das Aminoacyladenylat ihres kognaten Substrates. Dann wird die Aminoacylgruppe als Thioester auf die Sulfhydrylgruppe des an der T-Domäne gebundenen Kofaktors 4'-Phosphopantethein transferiert. Von dort aus findet die durch die Kondensations(C)-Domäne katalysierte Bildung der Peptidbindung mit dem aktivierten Aminosäurerest des darauffolgenden Moduls statt. Demzufolge sind C-Domänen notwendige Bestandteile von Elongationsmodulen. Das letzte Modul enthält schließlich eine den Acyl-Thioester spaltende Terminations(Te)-Domäne. Einige Module weisen zusätzlich Modifikationsdomänen auf. Bisher sind Epimerisierung(E)-, N-Methylierungs(M)-, Reduktions(R)- und Heterozyklisierung(Z)-Domänen identifiziert worden [Konz & Marahiel, 1999]. Die modifizierenden Domänen können die strukturelle Vielfalt der Produkte deutlich erhöhen. In manchen Fällen erfolgt noch eine anschließende

zusätzliche Modifikation durch externe Enzyme, wie z.B. die Glykosylierung des Vancomycin-Grundkörpers.

Die Integrierung der für die Synthese eines Produktes erforderlichen Aktivitäten in multifunktionellen Enzyme bietet einige Vorteile, zum Beispiel der besseren Kontrolle des Verbleibs der Intermediate am Enzymkomplex und der einfacheren Bereitstellung der katalytischen Untereinheiten in stöchiometrischen Verhältnissen [Hawkins & Lamb, 1995]. Vollständige Peptidsynthetasensysteme können auf einer einzigen Polypeptidkette liegen oder auf wenige interagierende Enzyme verteilt sein. Die erste Organisationsform war bisher in allen bekannten Systemen eukaryotischen Ursprungs anzutreffen, während die zweite die übliche bakterielle Strategie zu sein scheint. Trotz dieser Aufteilung können auch die bakteriellen Peptidsynthetasen aus über zwanzig Domänen bestehen und zählen damit zu den komplexesten und größten bekannten Enzymen (bis zu >1000 kDa Molekulargewicht). Die erste Ausnahme vom eukaryotischen Prinzip „ein Produkt - eine Peptidsynthetase“ scheint im Falle der Biosynthese eines Ergotamins aus *Claviceps purpurea* gefunden worden zu sein, das durch das Zusammenspiel zweier Peptidsynthetasen gebildet wird [Walzel *et al.*, 1997; Tudzynski *et al.*, 1999].

2.2.2 Organisation der für Peptidsynthetasen kodierenden Gene

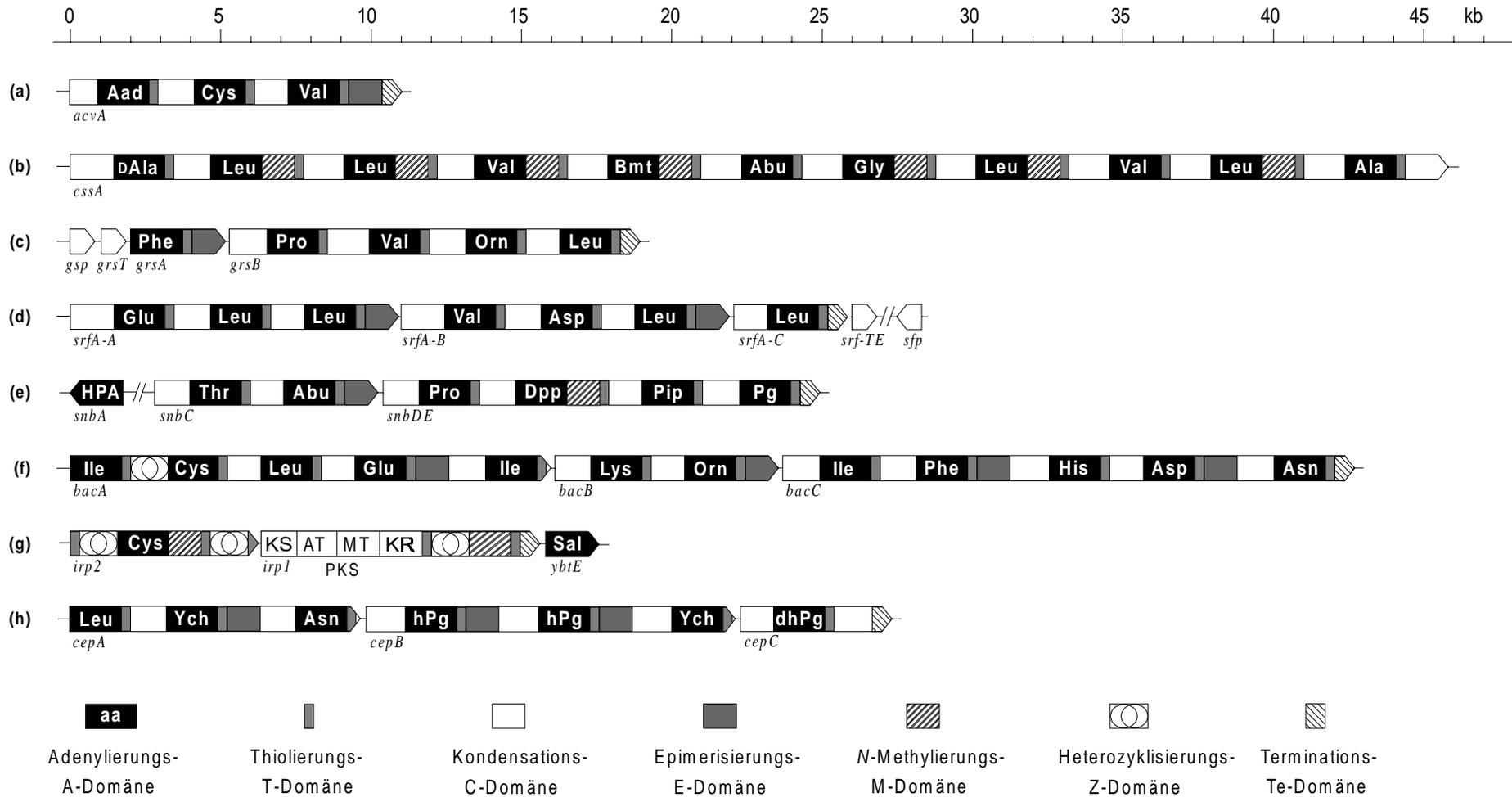
Den enormen Größen der Peptidsynthetasen entsprechend sind auch die sie kodierenden Gene von ungewöhnlichen Ausmaßen [Marahiel *et al.*, 1997], wodurch die Bestimmung ihrer Sequenz erschwert wird. Die in den letzten Jahren revolutionierten Techniken der DNA-Sequenzierung und die Bestimmung gesamter bakterieller Genome, die auch Peptidsynthetasengene enthielten, führte jedoch zu einer bemerkenswerten Akkumulation an genetischen Informationen. Diese trugen entscheidend zum Verständnis des modularen Aufbaus der multifunktionellen Enzyme bei.

Die bakteriellen Peptidsynthetasengene eines Biosynthesekomplexes sind oft in Operons organisiert, die sich über einen Bereich von 18 bis 45 kb erstrecken können. Beispiele hierfür sind die *grs*-, *stfA*- und *bac*-Operons aus *Bacillus spp.*, die in der Biosynthese der Peptidantibiotika Gramicidin S, Surfactin und Bacitracin involviert sind (s. Abb. 2.2-2) [Krättschmar *et al.*, 1989; Turgay *et al.*, 1992; Cosmina *et al.*, 1993; Guenzi *et al.*, 1998b; Konz *et al.*, 1997]. In anderen Fällen findet man keine kotranskriptionelle Regulation der Peptidsynthetasengene, sondern nur eine enge physikalische Gruppierung, wie zum Beispiel in den Biosyntheseclustern für Pristinamycin IA aus *Streptomyces*

pristinaespiralis [de Crécy-Lagard *et al.*, 1997a] und Phosphinotricin aus *S. vidriochromogenes* [Schwartz *et al.*, 1996]. Pilzliche Peptidsynthetasegene können 10 bis 46 kb umfassen und sind meist frei von Introns, wie *esynI*, *cssA*, *htsI* und *acvA*, die für die Biosynthese von Enniatin, Cyclosporin, HC-Toxin und ACV, einem Zwischenprodukt der Penicillin- und Cephalosporinsynthese, erforderlich sind [Haese *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1994; Scott-Craig *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1990].

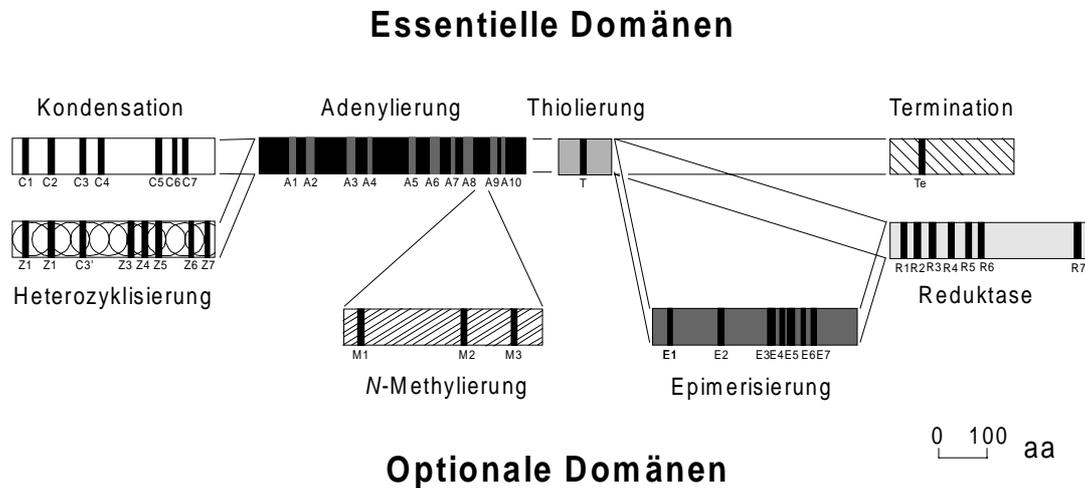
Die Analyse der aus den Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Peptidsynthetasen erlaubte die genaue Identifizierung und Definition der Organisation dieser multifunktionellen Enzyme in Module und Domänen. Neue Domärentypen wurden auf diese Weise erkannt, bevor ihre tatsächliche Funktion durch biochemische Experimente nachgewiesen werden konnte [Stachelhaus *et al.*, 1998; Konz *et al.*, 1997; Gehring *et al.*, 1998b; Ehmann *et al.*, 1999]. Die einzelnen Domänen lassen sich dabei durch Größe und charakteristische Sequenzmotive erkennen [Marahiel *et al.*, 1997]. Diese Analyse führte zu einer Einbeziehung der Domänenabfolge in die graphische Darstellung der Peptidsynthetasen kodierenden Gene (s. Abb. 2.2-2).

Abb. 2.2-2 (umseitig) Peptidsynthetasen kodierende Gene: Gezeigt sind Beispiele von pilzlichen (a-b) und bakteriellen für Peptidsynthetasen kodierenden Gene (c-h), die in der Synthese von (a) ACV aus *Penicillium chrysogenum* [Smith *et al.*, 1990], (b) Cyclosporin aus *Tolypocladium niveum* [Weber *et al.*, 1994], (c) Gramicidin S aus *Bacillus brevis* [Krätzschar *et al.*, 1989; Turgay *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 1994], (d) Surfactin aus *B. subtilis* [Cosmina *et al.*, 1993], (e) Pristinamycin I aus *Streptomyces pristinaespiralis* [de Crécy-Lagard *et al.*, 1997a; de Crécy-Lagard *et al.*, 1997b], (f) Bacitracin aus *B. licheniformis* [Konz *et al.*, 1997], (g) Yersiniabactin aus *Yersinia pestis* [Gehring *et al.*, 1998a] und (h) Chloroeremomycin aus *Amycolatopsis orientalis* [van Wageningen *et al.*, 1998] involviert sind. Die Gene *gsp* [Borchert *et al.*, 1994] und *sfp* [Nakano *et al.*, 1992] kodieren für Ppant-Transferasen. Die Genprodukte von *grsT* [Krätzschar *et al.*, 1989] und *srf-TE* [Schneider & Marahiel, 1998] haben Homologien zu Thioesterasen des Typs II. Aad = α -Aminoacidat, Bmt = (4R)-4[(E)-2-Butenyl-4-methyl-L-threonin], Abu = L- α -Aminobuttersäure, Orn = L-Ornithin, HPA = 3-Hydroxypicolinsäure; Dpp = Dimethyl-p-amino-phenylalanin; Pip = (S)-Piperidin-2-carbonsäure; Pg = L-Phenylglycin; Sal = Salicylat; Ych = m-Chloro- β -hydroxyl-L-tyrosin; hPg = 4-Hydroxy-L-phenylglycin; dhPg = 3,5-Dihydroxy-L-phenylglycin. PKS = Polyketidsynthaseanteil: KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, MT = Methyltransferase, KR = Ketoreduktase.



2.2.3 Funktionelle Domänen

Abbildung 2.2-3 und Tabelle 2.2-1 zeigen die Lokalisation und Sequenz der für die verschiedenen Domärentypen charakteristischen Motive. Die Domänen werden nachfolgend einzeln besprochen.



Optionale Domänen

Abb. 2.2-3 Domänenanordnung in einem Modul: Dargestellt sind die typischen Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen Domänen und die Lokalisationen der hochkonservierten Sequenzmotive.

Tab. 2.2-1: Konservierte Sequenzmotive der Domänen

Domäne	Motiv	Sequenz	Domäne	Motiv	Sequenz	
A-Domäne	A1	L(TS)YxEL	E-Domäne	E1	PIQxWF	
	A2	LKAGxAYL(VL)P(LI)D		E2	HHxISDG(WV)S	
	A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG		E3	DxLLxAxG	
	A4	FDxS		E4	EGHGRE	
	A5	NxYGPTE		E5	RTVGVWFTxxYP(YV)PF	
	A6	GELxIxGxG(VL)ARGYL		E6	PxxGxGYG	
	A7	Y(RK)TGDL		E7	FNYLG(QR)	
	A8	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE	Te-Domäne	Te	G(HY)SxG	
	A9	LPLPxYM(IV)P	Z-Domäne	Z1	FPL(TS)xxQxAYxxGR	
	A10	NGK(VL)DR		Z2	RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ	
T-Domäne	T	DxFFxxLGG(HD)S(LI)		C3'	(DNR)4xDxxS	
	C-Domäne	C1		SxAQxR(LM)(WY)xL	Z3	(LI)Pxx(PAL)x(LPF)P
		C2		RHExLRTxF	Z4	(TS)(PA)xxx(LAF)6x(IVT)LxxW
		C3		MHHxISDG(WV)S	Z5	(GA)(DQN)FT
		C4		YxD(FY)AVW	Z6	P(IV)VF(TA)SxL
		C5	(IV)GxFVNT(QL)xR	Z7	QVx(LI)Dx(QH)11xW(DYF)	
		C6	(HN)QD(YV)PFE	R-Domäne	R1	V(LF)(LV)TG(AV)(TN)G(YF)LG
C7	RDxSRNPL	R2	VxxxVRA			
M-Domäne	M1	VL(DE)GxGxG	R3		GDL	
	M2	NELxSxYRYxAV	R4		VYPYxxLRx(PL)NVxxT	
	M3	VExSxARQxGxLD	R5		GYxxSKWxxE	
			R6		RPG	
			R7		LExx(VI)GFLxxP	

2.2.3.1 Die Adenylierungs(A)-Domäne

Die A-Domäne kontrolliert den Eintritt der Substrate in die nichtribosomale Peptidsynthese und ist daher von besonderer Bedeutung für die Zusammensetzung der Produkte. Sie erkennt ihr spezifisches Substrat und aktiviert es unter ATP-Hydrolyse zum Aminoacyladenylat [Stachelhaus & Marahiel, 1995b; Dieckmann *et al.*, 1995]. Die ca. 550 aa große A-Domäne zählt zu einer Superfamilie adenylatbildender Enzyme [Turgay *et al.*, 1992], zu der auch die Luciferasen [Conti *et al.*, 1996], die 4-Coumarat-CoA Ligasen [Becker-André *et al.*, 1991] und weitere Acyl-CoA Ligasen [Connerton *et al.*, 1990] gehören. Dabei besteht keine Verwandtschaft auf Sequenz- oder struktureller Ebene mit den Aminoacyl-tRNA Synthetasen vom Typ I und II, die zwei weitere Klassen von adenylatbildenden Enzymen repräsentieren [Eriani *et al.*, 1990].

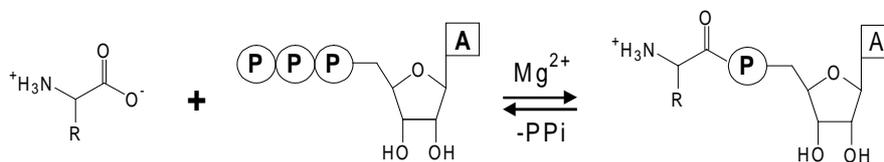


Abb. 2.2-4 Die A-Domäne: Die A-Domänen sind das Herzstück der Peptid synthetasen, da sie den Eintritt der Aminosäuren in die nichtribosomale Peptidbiosynthese kontrollieren. Sie erkennen ihr Substrat und aktivieren es unter ATP-Hydrolyse zum Aminoacyladenylat, das enzymassoziiert gebunden bleibt.

Zwischen der Luciferase aus *Photinus pyralis* [Conti *et al.*, 1996] und der A-Domäne PheA der Gramacidin S Synthetase GrsA besteht eine ausgesprochene Homologie der Tertiärstruktur, obwohl beide Enzyme nur 16 % Identität bezüglich ihrer Primärstruktur besitzen. Die 3D-Struktur von PheA wurde im ternären Komplex mit AMP und Phenylalanin bestimmt, wodurch Informationen über die Substrattaschen gewonnen werden konnten [Conti *et al.*, 1997]. So zeigte sich, daß die meisten hochkonservierten Sequenzmotive der A-Domänen (s. Tab. 2.2-1) an der Bindung des Nukleotids und der Carboxy- sowie Aminogruppe der Aminosäure beteiligt sind, was auch durch frühere Mutationsanalysen und chemische Markierungsstudien unterstützt wird [Tokita *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1995; Gocht & Marahiel, 1994; Hamoen *et al.*, 1995; Pavela-Vrancic *et al.*, 1994a; Pavela-Vrancic *et al.*, 1994b]. Die Bindung der Seitenkette des für PheA spezifischen Substrates Phenylalanin in einer hydrophoben Tasche wird jedoch durch acht nicht konservierte Aminosäurereste gewährleistet, die sich alle zwischen den Motiven A4 und A6 befinden. Aufgrund der hohen Homologie von 30-70 % zwischen A-Domänen verschiedener Herkunft wurde postuliert, daß die spezifitätsdeterminierenden Aminosäurereste auch in anderen A-Domänen an den

entsprechenden Positionen lokalisiert sind. Eine gesonderte Analyse dieser Reste durch Vergleich der gegenwärtig über 150 in den Datenbanken verfügbaren Primärstrukturen von A-Domänen zeigt deren charakteristische Abhängigkeit von der jeweiligen Substratspezifität [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Somit scheint der Spezifitätskode der A-Domänen gefunden zu sein [Stachelhaus *et al.*, 1999].

A-Domänen können aus internen Positionen des Multidomänenverbands der Peptidsynthetasen herausgelöst werden und als funktionell eigenständige Enzymfragmente in der Adenylierungsreaktion aktiv sein [Mootz & Marahiel, 1997b; Konz *et al.*, 1999]. Dieser Befund spricht für die Sichtweise, daß Peptidsynthetasen aus einer Aneinanderkettung semiautonomer Domänen bestehen, die ihrer Zusammenstellung entsprechend am Aufbau der wachsenden Peptidkette mitwirken.

2.2.3.2 Die Thiolierungs(T)-Domäne

Die T-Domäne stellt das gemeinsame Element in der Biosynthesestrategie der Peptidsynthetasen, Polyketidsynthetasen und Fettsäuresynthetasen dar [Stachelhaus *et al.*, 1996a]. Sie ist mit dem Kofaktor Ppant modifiziert (s. 2.2.4) und trägt an dessen Sulphydrylgruppe die Aminoacyl- und Peptidylintermediate als Thioester gebunden. Nach der aktuellen Modellvorstellung muß sie demnach in mindestens drei verschiedenen Arten mit ihren benachbarten Domänen funktionell interagieren [Schlumbohm *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1996]. Zunächst wird die als Adenylat aktivierte Aminoacylgruppe auf den Kofaktor übertragen. Im zweiten Schritt akzeptiert sie die Acylgruppe des vorhergehenden Moduls und reicht das um eine Aminosäure verlängerte Peptid im dritten Schritt weiter zum nachfolgenden Modul (s. Abb. 2.2-1 und 6.4-3). Die koordinierte Abfolge dieser Reaktionen resultiert in der Direktionalität der nichtribosomalen Peptidsynthese. Wahrscheinlich weisen die T-Domäne und ihr Kofaktor in Abhängigkeit des gebundenen Substrates unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Reaktionszentren an den A- und C-Domänen auf [Stein *et al.*, 1996; Mootz & Marahiel, 1997a; Belshaw *et al.*, 1999].

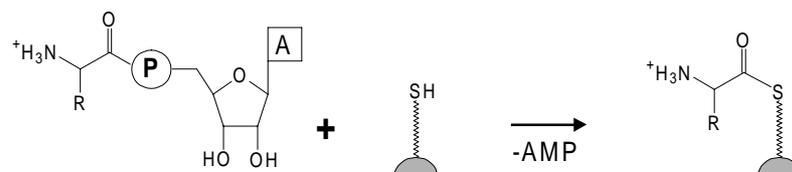


Abb 2.2-5 Die T-Domäne: Alle Substrate und Intermediate der wachsenden Peptidkette werden in der nichtribosomalen Peptidbiosynthese kovalent als Thioester an den Kofaktor Ppant der T-Domänen gebunden. Die Beladung der T-Domänen mit dem Substrat des jeweiligen Moduls erfolgt im Zusammenspiel mit der A-Domäne durch Transfer der als Aminoacyladenylat aktivierten Aminosäure.

Auch die ca. 80-100 aa großen T-Domänen können als eigenständige Enzymfragmente in funktioneller Form erhalten werden, so daß sie sowohl Substrat für die spezifische Ppant-Transferase sind als auch in manchen Fällen von einer A-Domäne aminoacyliert werden können [Stachelhaus *et al.*, 1996a; Lambalot *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1998b; Weinreb *et al.*, 1998]. Die Modifikation der T-Domänen von der apo- in die holo-Form wird in Kapitel 2.2.4 besprochen. Eine Mutation des konservierten Serinrestes, der als Bindungsstelle für den Kofaktor fungiert, führt zur Inaktivierung des Moduls und damit des gesamten Peptidsynthetasenkomplexes [Gocht & Marahiel, 1994; Souza *et al.*, 1993; Vollenbroich *et al.*, 1994].

2.2.3.3 Die Kondensations(C)-Domäne

Die C-Domäne ist an der Katalyse der Peptidbindungsbildung zwischen der Thioester-aktivierten Carboxyl- und der freien Aminogruppe zweier auf benachbarten Modulen gebundenen Acylgruppen beteiligt [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Sie ist der einzige der vier zur grundlegenden Domänenausstattung bakterieller Peptidsynthetasen zählender Domärentypen (A-, T-, C- und Te-Domänen, s. Abb. 2.2-3), der ein speziell für Peptidsynthetasen entwickeltes Enzym darzustellen scheint. Die einzigen signifikanten Sequenzhomologien zu anderen Enzymen beschränken sich auf das hochkonservierte C3-Motiv, das man auch in mehreren Familien von Acyl-ACP oder Acyl-CoA abhängigen Transferasen antrifft [de Crécy-Lagard *et al.*, 1995; de Crécy-Lagard *et al.*, 1997a]. Der zweite Histidinrest dieses Motivs wird etwa für die Chloramphenicol-Acetyl Transferasen [Leslie, 1990] oder den Glycerinlipid-Acyl Transferasen [Heath & Rock, 1998] als katalytische Base zur Deprotonierung des nukleophilen Acylgruppen-Akzeptors diskutiert. Durch Mutationsanalysen von C-Domänen konnte auch seine essentielle Rolle in der Katalyse der Peptidbindungsbildung gezeigt werden [Stachelhaus *et al.*, 1998; Vater *et al.*, 1997]. Zwei weitere Domärentypen der Peptidsynthetasen, die Z- und E-Domänen, lassen phylogenetische Verwandtschaften mit der etwa 450 aa großen C-Domäne erkennen.

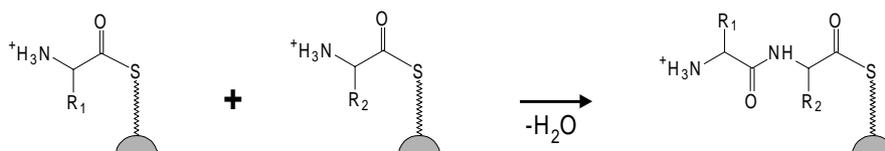


Abb. 2.2-6 Die C-Domäne: Die C-Domäne katalysiert die Kondensation der auf zwei benachbarten T-Domänen gebundenen Acylgruppen und vermittelt damit die Elongation der nichtribosomalen Peptidbiosynthese.

Dem Modell der nichtribosomalen Peptidsynthese zufolge besitzen C-Domänen eine Akzeptor- und eine Donor-Stelle [Stein *et al.*, 1996]. An der Akzeptor-Stelle bindet der in der Kondensationsreaktion als Nukleophil agierende aminoacylierte Kofaktor, während die Donor-Stelle den mit einer Aminoacyl- bzw. Peptidylgruppe beladenen Kofaktor des vorhergehenden Moduls aufnimmt. So positioniert kann die Bildung der Peptidbindung katalysiert werden (s. Abb. 6.4-3). Mit Hilfe von künstlich fehlbeladenen Modulen konnte kürzlich eine Selektivität der C-Domäne in der Akzeptorposition nachgewiesen werden. Aminosäuren mit kleinerem sterischen Volumen als das natürliche Substrat wurden toleriert, während größere Aminosäuren und Substrate mit entgegengesetzter Chiralität die Peptidsynthese blockierten [Belshaw *et al.*, 1999].

2.2.3.4 Die Terminations(Te)-Domäne und Thioesterasen vom Typ II (TE II)

Die Te-Domäne ist in allen bisher bekannten bakteriellen Peptidsynthetasensystem an dem Modul lokalisiert, das die letzte Aminosäure einbaut [Marahiel *et al.*, 1997]. Sie weist Sequenzhomologien zu Thioesterasen des Serinproteasen Typs auf und enthält die typischen Motive der katalytische Triade bzw. Diade [Schneider & Marahiel, 1998]. Aus diesen Gründen wurde bereits frühzeitig eine Rolle in der Abspaltung des fertigen Peptidproduktes vom Enzymkomplex diskutiert. Die mittlerweile vorliegenden experimentellen Daten unterstützen diese Hypothese. Die Deletion der Te-Domäne der Surfactin Synthetasen führte zu einem fast vollständigen Erliegen der Peptidsynthese [Cosmina *et al.*, 1993; Schneider & Marahiel, 1998]. Eine ebenfalls an den Surfactin Synthetasen vorgenommene Translokation der Te-Domäne mittels Fusion an interne Module resultierte in der Synthese der entsprechend verkürzten Lipopeptide [de Ferra *et al.*, 1997]. Dabei ist bei der nichtribosomalen Peptidbiosynthese auch die Art der Abspaltung zu berücksichtigen. Die Produkte scheinen durch Hydrolyse in linearer Form und durch intramolekulare Laktamisierung bzw. Laktonisierung freigesetzt werden zu können. Jüngste Untersuchungen des Enterobactin Biosynthesensystems sprechen dafür, daß die Te-Domäne auch die Art der Abspaltung kontrolliert [Gehring *et al.*, 1998c]. Mutationsanalyse und massenspektroskopische Untersuchungen belegen eine Trimerisierung des Intermediates Dihydroxybenzoyl-Serin durch die Te-Domäne der Enterobactin Synthetase EntF [Shaw-Reid *et al.*, 1999]. Die Monomere, Dimere und Trimere liegen dabei in Esterbindung am Serinrest der katalytischen Diade vor.

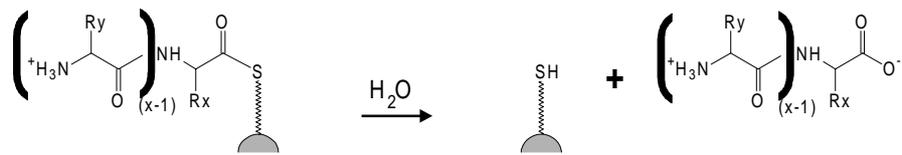


Abb. 2.2-7 Die Te-Domäne: Die Te-Domäne katalysiert in bakteriellen Peptidsynthetasen die Abspaltung der enzymgebundenen Peptidkette durch Hydrolyse (hier gezeigt) oder Zyklisierung.

Im Gegensatz zu den bakteriellen Peptidsynthetasen enthalten eukaryotische Systeme, die ein zyklisches Peptid synthetisieren, wie zum Beispiel die Enniatin, HC-Toxin und Cyclosporin Synthetasen, anstelle einer Te-Domäne eine weitere C-Domäne [Haese *et al.*, 1993; Scott-Craig *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994]. Es wird angenommen, daß in diesen Fällen die C-Domäne die Katalyse des Ringschlusses vermittelt.

Mit den bakteriellen Biosyntheseclustern sind häufig Gene assoziiert, deren Genprodukte ebenfalls Ähnlichkeiten zu Thioesterasen aufweisen, wie zum Beispiel zur Thioesterase Typ II der eukaryotischen Fettsäuresynthase [Randhawa & Smith, 1987]. Dieses Enzym katalysiert die vorzeitige Abspaltung kürzerer Fettsäuren. Entsprechende Gene findet man auch in Genclustern für die Biosynthese von Polyketiden, wie etwa Erythromycin und Pikromycin [Haydock *et al.*, 1991; Xue *et al.*, 1998]. Durch Genunterbrechungen konnte für das Peptidantibiotikum Surfactin und das Polyketid Pikromycin gezeigt werden, daß die Genprodukte nicht essentiell, aber wichtig für hohe Produktausbeuten sind [Schneider & Marahiel, 1998; Xue *et al.*, 1998]. Die genauen Funktionen der Thioesterasen-ähnlichen Protein (TE II) sind noch unklar. Es wird über eine unterstützende Beteiligung an der Termination der Peptidsynthese und über eine Rolle zur Deblockierung fehlerhaft acylierter Peptidsynthetasen spekuliert [Schneider & Marahiel, 1998; Marahiel *et al.*, 1997].

2.2.3.5 Die Heterozyklisierungs(Z)-Domäne

Die Z-Domäne findet man in Peptidsynthetasen, die die Bildung eines Thiazolin- oder Oxazolinringes in der Peptidkette katalysieren. Dabei wird die Sulfhydryl- bzw. Hydroxylgruppe der Seitenkette von Cystein bzw. Serin oder Threonin mit der Carbonylgruppe der vorhergehenden Aminosäure kondensiert. Als Beispiele für Produkte, die einen solchen Heterozyklus enthalten seien das Peptidantibiotikum Bacitracin und die Siderophore Yersiniabactin und Pyochelin genannt (s. Abb. 2.1-1) [Konz *et al.*, 1997; Gehring *et al.*, 1998b; Reimann *et al.*, 1998]. Die genaue Reaktionsabfolge der Heterozyklusbildung ist noch ungeklärt, insbesondere ob die Bildung einer Peptid- oder einer Thioesterbindung (s.

Abb. 2.2-8) als Zwischenstufe zum Produkt führt [Gehring *et al.*, 1998b]. Da die Z-Domäne stets eine C-Domäne an ihrer Position ersetzt, scheint sie auch die erste Kondensationsreaktion zu katalysieren. Dadurch nimmt sie auch eine Sonderstellung unter den modifizierenden Domänen ein. In Anbetracht der phylogenetischen Verwandtschaft dieser beiden Domärentypen erscheint die Z-Domäne als eine spezialisierte Form der C-Domäne. Bemerkenswerterweise enthält sie aber nicht die beiden konservierten Histidinreste des C3-Motivs (vergl. Tab. 2.2-1 und Abb. 2.2-3).

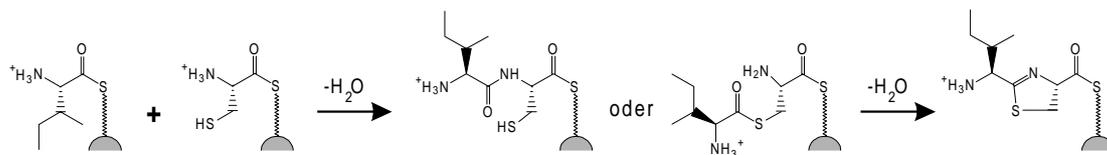


Abb. 2.2-8 Die Z-Domäne: Wie hier am Beispiel der Bacitracin Synthetase gezeigt (s. Abb. 2.1-1 und 2.2-2), katalysiert die Z-Domäne die Bildung eines Thiazolinringes durch Kondensation der Isoleucin- und Cysteinreste. Dabei ist der erste Schritt der Reaktion, Bildung einer Peptid- oder Thioesterbindung, noch nicht geklärt.

2.2.3.6 Modifizierende Domänen: Epimerisierung, N-Methylierung und Reduktase

Die E-, M- und R-Domänen, die durch ihren modifizierenden Charakter beachtlich zur Strukturvielfalt der Produkte der nichtribosomalen Peptidbiosynthese beitragen [Marahiel *et al.*, 1997], seien nur kurz besprochen. Sie agieren alle an den als Thioester gebundenen Substraten. Damit ergibt sich für die Module, die eine modifizierende Domäne enthalten, eine weitere Bindungsstelle des beladenen Kofaktors der T-Domäne [Mootz & Marahiel, 1997a].

Die E-Domäne invertiert das Stereozentrum am C- α Atom der gebundenen L-Aminosäure [Stein *et al.*, 1995; Stachelhaus & Marahiel, 1995b]. Bei internen Modulen erfolgt die Reaktion der E-Domäne offensichtlich auf Peptidylstufe, also nach der Peptidbindungsbildung mit der Acylgruppe des vorhergehenden Moduls [Stindl & Keller, 1994; Menkhaus *et al.*, 1993]. Es finden sich keine Homolgien zu bekannten Racemasen, vielmehr scheint die E-Domäne aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft zu den C- und Z-Domäne eine weitere Spezialisierungsform dieses Domärentyps darzustellen. Das Vorkommen von D-Aminosäuren ist eine der charakteristischen Eigenschaften der Produkte der nichtribosomalen Peptidbiosynthese und ist wahrscheinlich von konformationeller Bedeutung für die oftmals zyklischen Peptide.

Die ca. 420 aa große M-Domäne verwendet S-Adenosinmethionin (SAM) als Methylgruppendonor für die Methylierung der α -Aminogruppe der als Thioester aktivierten Aminosäure [Haese *et al.*, 1993; Haese *et al.*, 1994]. Die Reaktion findet wahrscheinlich auf Aminoacylstufe, also vor der Peptidbindungsbildung statt, vermutlich da sonst die Nukleophilie der Aminogruppe durch die Involvierung in der Peptidbindung zu stark herabgesetzt wäre.

Die R-Domäne ist bisher erst in zwei Systemen, den Saframycin Synthetasen und Lys2, einem Enzym der pilzlichen Lysinbiosynthese identifiziert worden [Pospiech *et al.*, 1996; Casqueiro *et al.*, 1998; Ehmann *et al.*, 1999]. Eine biochemische Charakterisierung des letzteren Systems zeigte, daß die ca. 350 aa umfassende Domäne die als Thioester aktivierten δ -Carboxylgruppe von α -Aminoacidat unter Verwendung des Kofaktors NADPH zu α -Aminoacidatsemialdehyd [Ehmann *et al.*, 1999] reduziert.

2.2.4 Posttranslationale Modifikation durch 4'-Phosphopantethein (Ppant)-Transferasen

4'-Phosphopantethein(Ppant)-Transferasen katalysieren die Übertragung der Phosphopantethonatgruppe von CoA auf die Hydroxylgruppe eines konservierten Serinrestes ihrer Enzymsubstrate (s. Abb. 2.2-8). Dadurch werden diese von ihrer katalytisch inaktiven apo-Form in die aktive holo-Form umgewandelt [Lambalot *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1997].

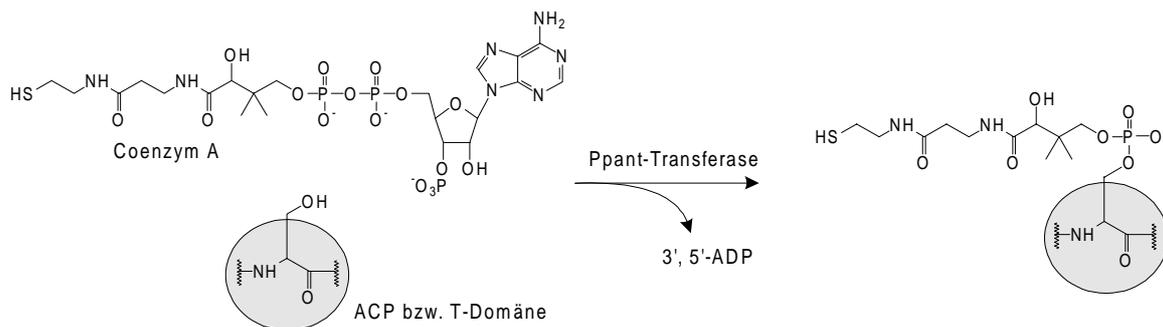


Abb. 2.2-8 Katalytische Funktion der Ppant-Transferasen: Ppant-Transferasen modifizieren ihre Substrate, ACPs oder T-Domänen, mit dem Kofaktor 4'-Phosphopantethein an einem invarianten Serinrest. Ko-Substrat der Reaktion ist Coenzym A.

Die bekanntesten Enzyme, die Ppant als Kofaktor verwenden, sind die ACPs (Acyl-carrier Protein) der Fettsäure- und Polyketidsynthetasen des Typs I und II, sowie die T-Domänen der Peptidsynthetasen (auch PCP, Peptidyl-carrier Protein, genannt). Weitere Beispiele der Ppant-abhängigen Enzyme erweisen sich als spezialisierte Varianten von ACPs

oder T-Domänen, die alle als katalytische Komponenten in ähnlichen Biosynthesekomplexen agieren. Beispiele sind das an der pilzlichen Lysinbiosynthese beteiligte Lys2 [Ehmann *et al.*, 1999], NodF aus *Rhizobium leguminosarum*, das in der Biosynthese spezieller Fettsäuren für die Initialisierung der Pflanzenzellinfektion involviert ist [Ritsema *et al.*, 1998], und DCP aus *Lactobacillus casei* und *Bacillus subtilis*, das D-Alanin für die Synthese von Lipoteichonsäure bindet [Heaton & Neuhaus, 1992; Debabov *et al.*, 1996; Perego *et al.*, 1995].

Für die meisten dieser Enzyme wurde eine spezifische Ppant-Transferase identifiziert. In Zellen, die mehr als einen Ppant-abhängigen Stoffwechselweg enthalten, findet man entsprechend mehr als eine Ppant-Transferase. So konnte durch *in vitro* Experimente gezeigt werden, daß die beiden Ppant-Transferasen ACPS und EntD aus *E. coli* selektiv ihre Substrate, ACP und die Enterobactin Synthetasen EntB bzw. EntF, erkennen, aber keine Kreuzaktivität aufweisen [Lambalot *et al.*, 1996]. Allerdings modifiziert ACPS auch ACP-Substrate aus anderen Organismen, ebenso wie EntD andere Peptidsynthetasen T-Domänen erkennt und auch eine *sfp*⁰ Mutation in *Bacillus subtilis* komplementieren kann [Grossman *et al.*, 1993]. Weitere mit Peptidsynthetasen assoziierten Ppant-Transferasen scheinen ebenfalls austauschbar. Gsp der Gramicidin S Biosynthese kann *in vivo* die Funktion von EntD übernehmen, und Gsp und Bli der Bacitracin Synthetasen können die *sfp*⁰ Mutation komplementieren [Borchert *et al.*, 1994; Konz, 1998]. Sfp aus *B. subtilis* ist die Ppant-Transferase mit der bisher größten gemessenen Substratbreite. Es konvertiert *in vitro* sowohl T-Domänen von Peptidsynthetasen als auch ACP aus *E. coli* in die holo-Form [Lambalot *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1998b].

ACPS und Sfp repräsentieren zwei verschiedene Gruppen innerhalb der Superfamilie der Ppant-Transferasen. Der ACPS-Typ ist ca. 120-130 aa groß und scheint auf als eigenständige Proteine vorliegende ACPs spezialisiert. Dagegen erkennt der ca. 240 aa große Sfp-Typ, den man mit den Peptidsynthetasen assoziiert findet, offensichtlich in Multidomänenenzyme eingebunde T-Domänen. Die C-terminale Hälfte der Enzyme des Sfp-Typs zeichnet sich dabei durch Sequenzhomolgien mit dem ACPS-Typ aus [Lambalot *et al.*, 1996]. Ein dritter Typ wurde durch die gleichen Sequenzhomologien identifiziert. Es handelt sich dabei um einen im C-Terminus integrierten Bestandteil pilzlicher multifunktionaler Fettsäuresynthetasen, der wahrscheinlich intramolekular die ACP-Domäne modifiziert [Lambalot *et al.*, 1996; Southard & Cihlar, 1995].

2.3 Das Peptidantibiotikum Tyrocidin

2.3.1 Struktur und Wirkungsmechanismus

Tyrocidin wurde 1941 von Hotchkiss und Dubos in Kulturüberständen von *Bacillus brevis* entdeckt [Hotchkiss & Dubos, 1941]. Das aus seinem natürlichen Produzenten isolierte Produkt ist stets ein Gemisch aus sehr ähnlichen zyklischen Dekapeptiden. Tyrocidin A hat die Aminosäureabfolge (-DPhe-Pro-Phe-DPhe-Asn-Gln-Tyr-Val-Orn-Leu-)zykl (s. Abb. 2.2-9). In den Tyrocidinen B, C und D sind die aromatischen Aminosäuren an den Positionen 3, 4 und 7 schrittweise gegen Tryptophan ausgetauscht (s. Tab. 6.2-1 und Abb. 6.2-1) [Ruttenberg & Mach, 1966]. Die relativen Mengenverhältnisse dieser Verbindungen lassen sich durch Zugabe von Phenylalanin bzw. Tryptophan in das Wachstumsmedium von *Bacillus brevis* verschieben [Ruttenberg & Mach, 1966]. Bereits frühe Untersuchungen demonstrierten, daß alle Tyrocidine auf die gleiche Art synthetisiert werden [Fujikawa *et al.*, 1968a]. Der Einfachheit halber, und da die verschiedenen Tyrocidine offensichtlich praktisch identische biologische Aktivitäten aufweisen, wird in dieser Arbeit nur von *dem* Tyrocidin die Rede sein, sofern nicht explizit eine spezielle Form diskutiert wird.

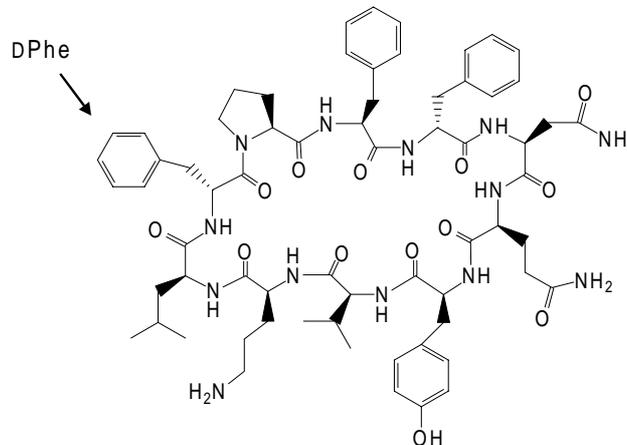


Abb. 2.2-9 Struktur von Tyrocidin A: Das zyklische Dekapeptid hat die Primärstruktur (-DPhe-Pro-Phe-DPhe-Asn-Gln-Tyr-Val-Orn-Leu-)zykl. Die Synthese beginnt mit dem markierten DPhe.

Das Peptidantibiotikum Tyrocidin hat eine bakterizide Wirkung insbesondere gegen viele Gram-positive, und deutlich schwächer gegen Gram-negative Bakterien [Hunter & Schwartz, 1967; Mootz & Marahiel, 1999b]. Dabei übt es offenbar eine pleiotrope Wirkung auf die Membranhülle der angegriffenden Zellen aus [Dax, 1997]. Dank seiner tensidischen Eigenschaften zerstört es die Integrität der Membran und führt damit zum Zelltod durch Verlust von intrazellulären kleinen Molekülen wie Aminosäuren, Pyrimidin- und Purinbasen.

Die oxidative Phosphorylierung wird unterbrochen. Tyrocidin wird aufgrund seiner unspezifischen Wirkung und seiner hämolytischen Aktivität (der Lyse von Erythrozyten) nur als oberflächliches Antibiotikum in Hautsalben und ähnlichem verwendet. Dort findet man es in Kombination mit linearem Gramacidin (Struktur s. Abb. 2.1-1). Beide Peptidantibiotika werden als Gemisch, das als Tyrothricin bezeichnet wird, von den *B. brevis* Stämmen ATCC 8185 und ATCC 10068 produziert.

Die Biosynthese von Tyrocidin und linearem Gramacidin beginnt am Übergang zur stationären Wachstumsphase, etwa drei Stunden vor Beginn des Sporulationsprozesses [Lee & Lipmann, 1975; Ristow *et al.*, 1979]. In vielen Studien wurde versucht, eine regulatorische Funktion von Tyrocidin, etwa in der Sporulation, nachzuweisen [Ristow *et al.*, 1979]. So wurde berichtet, daß Tyrocidin *in vitro* an DNA bindet [Schazschneider *et al.*, 1974], und daß es die aus exponentiell wachsenden *B. brevis* Zellen isolierte RNA Polymerase inhibiert [Ristow *et al.*, 1982]. Interessanterweise schien das lineare Gramacidin in diesen Reaktionen eine antagonistische Rolle zu spielen, da es die beobachteten Effekte wieder aufhob [Ristow *et al.*, 1975]. Andere Ergebnisse zeigten dagegen, daß Tyrocidin die RNA Synthese *in vivo* stimulieren konnte. Unter bestimmten Bedingungen konnte auch demonstriert werden, daß die Zugabe von Tyrocidin für eine effiziente Sporulation von *B. brevis* notwendig war [Ristow *et al.*, 1979]. Ob es tatsächlich eine biologische Funktion für Tyrocidin gibt, außer der als Verteidigungsmittel gegen Konkurrenten, bleibt Spekulation [Katz & Demain, 1977; Mootz & Marahiel, 1999b].

2.3.2 Biosynthese

Tyrocidin wird nichtribosomal durch die drei Peptidsynthetasen TycA, TycB und TycC synthetisiert [Fujikawa *et al.*, 1968b; Fujikawa *et al.*, 1971; Kambe *et al.*, 1971; Roskoski *et al.*, 1970a; Lee & Lipmann, 1975]. TycA aktiviert und epimerisiert LPhe und überträgt es auf das durch TycB aktivierte Pro. TycB verlängert die Peptidkette bis zum Tetrapeptid DPhe-Pro-Phe-DPhe und transferiert sie auf TycC, das die restlichen sechs Aminosäuren Asn, Gln, Tyr, Val, Orn und Leu einbaut und das zyklische Produkt abspaltet. Alle Intermediate bis zum linearen Dekapeptid wurden als enzymgebundene Thioester nachgewiesen [Roskoski *et al.*, 1970b].

Das Gen *tycA* der Tyrocidin Synthetase TycA war das erste Peptidsynthetasengen, das kloniert [Marahiel *et al.*, 1985] und sequenziert [Weckermann *et al.*, 1988] wurde. Die abgeleitete Primärstruktur von TycA zeigt hohe Homologien zu GrsA, dem ersten Enzym der

Gramicidin S Biosynthese [Hori *et al.*, 1989; Krätzschar *et al.*, 1989], im Einklang mit dem Befund, daß TycA durch GrsA in der *in vitro* Synthese von Tyrocidin ersetzt werden kann [Fujikawa *et al.*, 1971]. Weitere Sequenzanalysen und Promotorstudien zeigten, daß sich das TycB kodierende Gen *tycB* in einer kotranskriptionellen Organisation an *tycA* anschließt [Mittenhuber *et al.*, 1989]. Der Promotor des *tyc*-Operons wird im heterologen *B. subtilis* durch AbrB reprimiert [Robertson *et al.*, 1989; Fürbass & Marahiel, 1991].

2.4 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte der restliche Teil des Tyrocidin Biosynthese-Operons kloniert, sequenziert und analysiert werden, um die umfangreichen enzymologischen Studien an den Tyrocidin Synthetasen durch genetische Arbeiten zu ergänzen. Ausgehend von den Sequenzinformationen sollte durch die Herstellung rekombinanter Enzyme eine biochemische Charakterisierung der Peptidsynthetasen erfolgen.

Nach der *in vitro* Rekonstituierung der Katalyse einer Peptidbindung durch zwei funktionelle Modulfragmente in dieser Arbeit, sollte die Konstruktion von Hybridenzymen angegangen und eventuelle neue Produkte nachgewiesen werden. Von solchen Experimenten wurden neue Erkenntnisse über die Zugänglichkeit der modularen Peptidsynthetasen gegenüber künstlichen Umprogrammierungen erhofft.

Schließlich sollten die *in vitro* Untersuchungen zu den Spezifitäten der Ppant-Transferasen (s. 2.2.4) mit Studien unter stringenteren *in vivo* Bedingungen verglichen werden. Zu diesem Zwecke sollte die Unterbrechung und Komplementation des essentiellen *acps*-Gens aus *E. coli* unternommen werden.

3 Material

3.1 Geräte

Tab. 3-1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Autom. DNA-Sequenzanalyse	<i>PE Applied Biosystems</i> ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
Dokumentation von DNA-Agarosegelen	Videokamera <i>Cybertech</i> CS 1
Elektroporationssystem	<i>Biorad</i> Gene Pulser II
FPLC-System	<i>Pharmacia</i> FPLC-System bestehend aus: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpe P-500 (2x), Uvicord Opt. Einheit UV-1 (mit 280 nm Filter), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, 2-Kanal-Flachbettschreiber REC-102, Injektionsventil V-7, 3-Wege Magnetventil PSV-100, Fraktionssammler FRAC-100 und „chelating“-Superose- Säule HR 10/2
HPLC-System	<i>Hewlett Packard</i> Series 1100 HPLC-System mit DAD- Detektor, Vakuumentgaser, quaterner Pumpe, Autosampler und HP-Chemstation Säule: <i>Macherey & Nagel</i> Nucleosil C18 3/120 3-250
Hybridisierungsöfen	<i>Bachhofer</i> Hybridisierungsöfen Mini 38
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series 25 Incubator Shaker
Mikrotiterplattenlesegerät	<i>Dynatech</i> MR7000
Photometer	<i>Pharmacia</i> Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer
Reinstwasseranlage	<i>Seral</i> Seralpur Pro 90 CN
Speed-Vac	<i>Uniequip</i> Univapo 150 H
Szintillationszähler	<i>Packard</i> 1900CA TRI-CARB Liquid Scintillation 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	<i>SLM 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

Firma	Produkt(e)
<i>Amersham/Buchler</i> (Braunschweig)	Hybond N ⁺ -Nylonmembran, λ-DNA, Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme, L-[U- ¹⁴ C]-Phenylalanin (450 mCi/mmol), L-[³ H]-Pro (26 Ci/mmol)
<i>Biomol</i> (Ilvesheim)	DTT und DTE
<i>Boehringer Mannheim</i> (Mannheim)	Alkalische Phosphatase, Expand TM Long Template PCR System, <i>Blocking</i> -Reagenz, Lysozym
<i>Difco</i> (Detroit, USA)	Nutrient Broth, Casein-Hydrolysat
<i>Du Pont/NEN</i> (Bad Homburg)	[³² P]-Pyrophosphat (16 Ci mmol ⁻¹)
<i>Eurogentec</i> (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
<i>Fluka</i> (Neu-Ulm)	TEMED
<i>Hartmann Analytik</i> (Braunschweig)	L-Isoleucin [¹⁴ C(U)](240 mCi mmol ⁻¹)
<i>Gibco/BRL</i> (Eggenstein)	Agarose, Acrylamid, Bisacrylamid
<i>Kodak</i> (Rochester, USA)	Röntgenfilm X-Omat AR und Biomaxx MR
<i>MWG-Biotech</i> (Ebersberg)	synthetische Oligonukleotide
<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach)	Vent-Polymerase
<i>Oxoid</i> (Wesel)	Agar Nr. 1, Trypton
<i>PE Applied Biosystems</i> (Weiterstadt)	ABI Prism TM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Tripeptid Standards
<i>Qiagen</i> (Hilden)	tip 20/100-Anionenaustauschersäulen, QIA-quick-spin PCR Purification Kit, QIAexpress Vector Kit ATG, Ni-NTA Agarose
<i>Roth</i> (Karlsruhe)	Ethidiumbromid, Trichloressigsäure, Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco Plus

Tab 3-2 (Fortsetzung)

<i>Firma</i>	Produkt(e)
<i>Schleicher & Schüll</i> (Dassel)	Sterilfilter (0,45 µm Porengröße), Whatmann-3MM Papier
<i>Serva</i> (Heidelberg)	Bromphenolblau, Xylen-Cyanol, Triton X-100, Tween 20
<i>Stratagene</i> (Heidelberg)	pBluescript-Vektoren
<i>United States Biochemicals</i> (Bad Homburg)	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 [Vieira & Messing, 1982]. Er enthält das für das α -Peptid der β -Galactosidase kodierende *lacZ'*-Gen, das bei Insertion in die MCS unterbrochen wird und so eine Blau-Weiß-Selektion erlaubt. Der ColE1-Ursprung aus pBR322 [Scutcliffe, 1979; Bolivar *et al.*, 1977] 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 mittels 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*R I, *Eco*R V, *Hind* III, *Cla* I, *Hinc* II, *Sal* I, *Xho* I, *Dra* II, *Apa* I, *Kpn* I (in pBluescript II KS in umgekehrter Reihenfolge). GenBank-Accession: X52329 (KS-).

3.3.2 pQE60

Der pQE60-Vektor (3431 bp) gehört zu der Familie der pDS-Plasmide [Bujard *et al.*, 1987] und basiert auf dem Plasmid pDS56/RBSII [Stüber *et al.*, 1990]. Er besitzt den T5-Promotor, zwei *lac*-Operatorerkennungssequenzen 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 rekombinaten Proteine mit sechs Histidinen (His-tag). Die Sequenz ATG der *Nco* I Restriktionssequenz dient für die Expression als Startkodon. Ebenfalls durch die *Nco* I Restriktionssequenz wird das erste Nukleotid des nachfolgenden Kodons zu G umgewandelt.

Eine Klonierung in pQE60 mittels *Nco* I und *Bam*H I, wie in dieser Arbeit meist durchgeführt, resultiert zudem in einer Fusion der Aminosäurereste GSRS, kodiert durch die Erkennungssequenzen von *Bam*H I und *Bgl* II, an den C-Terminus des Proteins vor dem His-tag. Das Plasmid verleiht Resistenz gegen Ampicillin durch Expression des β -Laktamasegens *bla* und repliziert in *E. coli* mittels des ColE1 Replikationsursprunges aus pBR322 [Scutcliffe, 1979]. Die Genexpression im Plasmid pQE60 ist aufgrund der optimierten Promotorregion sehr effizient und kann nur in Gegenwart extrem hoher *lac*-Repressorkonzentrationen vollständig unterdrückt werden. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pREP4 verwendet.

3.3.3 pREP4 und pREP4-gsp

Das Plasmid pREP4 (3740 bp) ist mit seinem Replikationsursprung P15A [Miller, 1992] kompatibel zu ColE1-Plasmiden und kann so in Kombination mit pQE60 in *E. coli* repliziert werden. Es exprimiert den durch das *lacI*-Gen kodierten Lac-Repressor [Farabough, 1978]. 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 der in pQE60 enthaltenen Gene zu ermöglichen.

Das Gen *gsp* kodiert für die Ppant-Transferase des Gramicidin S Biosynthesystems. Es wurde im Plasmid pREP4-gsp unter Kontrolle des T7-Promotors [Studier & Moffatt, 1986] in den Vektor pREP4 integriert um eine Koexpression der Peptidsynthetasen(fragmente) mit einer Ppant-Transferase zu ermöglichen [Dökel & Marahiel, 1997].

3.3.4 pTZ18R und pTZ19R

Die Vektoren pTZ18R (2871 bp) und pTZ19R (2870 bp) stellen Derivate von pUC18 und pUC19 dar, die um einen f1-origin erweitert wurden, der die Präparation von ssDNA mittels Helferphagen ermöglicht. Diese Plasmide basieren auf einem ColE1 Replikationsursprung, vermitteln durch ihr *bla*-Gen Ampicillinresistenz und erlauben durch die in das *lacZ'*-Gen integrierte MCS ein Blau-Weiß-Screening auf rekombinante Plasmide. Zusätzlich zum *lac*-Promotor kann die Expression klonierter Gene dank eines T7-Promotors auch mittels der T7-Polymerase durchgeführt werden. MCS von pTZ18R in der Reihenfolge der Orientierung des *lac*-Promotors: *Eco*R I, *Sac* I, *Kpn* I, *Sma* I, *Ava* I, *Bam*H I, *Xba* I, *Sal* I, *Hinc* II, *Acc* I, *Bsp*M I, *Pst* I, *Sph* I, *Hind* III. pTZ19R enthält die MCS in umgekehrter Reihenfolge. GenBank-Accession: L08956 (pTZ18R), L08957 (pTZ19R).

3.3.5 pSU18

Der Vektor pSU18 [Bartolomé *et al.*, 1991] ist ein Derivat von pACYC184 und ist sehr ähnlich zu pUC18, basiert jedoch auf dem Replikationsursprung P15A [Miller, 1992] und vermittelt durch das *cat*-Gen Resistenz gegen Chloramphenicol. Die in das *lacZ'*-Gen integrierte MCS erlaubt ein Blau-Weiß-Screening auf rekombinante Plasmide. MCS von pSU18 in der Reihenfolge der Orientierung des *lac*-Promotors: *EcoR* I, *Sac* I, *Kpn* I, *Sma* I, *Ava* I, *Bam*H I, *Xba* I, *Sal* I, *Hinc* II, *Acc* I, *Bsp*M I, *Pst* I, *Sph* I, *Hind* III.

3.4 Mikroorganismen

Tab. 3-3 Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp
<i>Bacillus brevis</i> ATCC 8185	Wildtyp-Stamm, Tyrocidin und Gramicidin Produzent
<i>B. subtilis</i> JH642	Surfactin-Nichtproduzent, <i>pheA1</i> , <i>trpC2</i> , <i>sfp</i> ⁰ [Hoch & Mathews, 1973]
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</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> ^{F1} <i>lacZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^r)] [Bullock <i>et al.</i> , 1987]
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRA (P2)	$\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> ^c (P2 lysogen) ^c [Jerpseth <i>et al.</i> , 1993]
<i>E. coli</i> M15	<i>nal</i> ^s , <i>str</i> ^s , <i>rif</i> ^s , <i>lac</i> , <i>ara</i> , <i>gal</i> , <i>mtl</i> , F ⁻ [Zamenhof & Villarejo, 1972]
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B - m _B .), <i>gal</i> [Studier & Moffatt, 1986; Grodberg & Dunn, 1988]
<i>E. coli</i> HSK42	MC4100 (F ⁻ <i>araD139</i> $\Delta(argF-lac)$ U169 <i>deoC1</i> <i>flbB5301</i> <i>ptsF25</i> <i>rpsL150</i> <i>relA1</i> [Casadaban & Cohen, 1979]) <i>polA</i>
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	Wildtyp-Stamm

3.5 Medien

Für die Anzucht von *E. coli*, *B. brevis* und *B. subtilis* wurde 2xYT-Medium verwendet.

2xYT Medium	Bactotrypton	16	g/L
	Hefeextrakt	10	g/L
	NaCl	5	g/L

Gegebenenfalls wurde *E. coli* auf M9-Medium angezogen. Zur Anfertigung des Mediums wurden Lösung I und II getrennt 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/L
	KH ₂ PO ₄	30	g/L
	NaCl	5	g/L
	NH ₄ Cl	10	g/L
Lösung II	CaCl ₂	2,2	g/L
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	24,6	g/L
	Glukose	200	g/L

Als Sporulationsmedium für *B. brevis* diente Difco-Sporulations-Medium (DSM).

DSM-Medium	Nutrient Broth	8	g/L
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,12	g/L
	KCl	1	g/L
	1 M NaOH	0,6	mL

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

Für die λ-Phageninfektion wurde NZY-Medium verwendet.

NZY-Medium	NaCl	5	g/L
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	2	g/L
	Hefeextrakt	5	g/L
	NZ Amin (Casein-Hydrolysat)	10	g/L
NZY-Agar	Agar	1,5	% (w/v)
NZY-Topagar	Agar	0,7	% (w/v)

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 bis 75 µg/mL, Cm 20 µg/mL, Tet 15 µg/mL, Sp 40 µg/mL, X-Gal 40 µg/mL und IPTG 50 µg/mL.

4 Methoden

4.1 DNA-Techniken

Folgende Standard-Techniken wurden nach Sambrook *et al.* [Sambrook *et al.*, 1989] bzw. wie zuvor beschrieben [Mootz, 1996] durchgeführt: Plasmidpräparation aus *E. coli* durch alkalische Lyse nach Birnboim *et al.* [Birnboim & Doly, 1979], Präparation von λ -Phagen-DNA, Präparation chromosomaler DNA aus *B. brevis* und *E. coli*, Reinigung von DNA mittels einer Anionentauschermatrix nach dem Prinzip von Vogelstein *et al.* [Vogelstein & Gillespie, 1979], Präparation und Verwendung CaCl₂- und elektrokompenter *E. coli* Zellen, Southern-Transfer nach dem Verfahren von Southern [Southern, 1975], λ -Phagen Methoden zum Screening einer EMBL3-Genbank.

4.1.1 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger verfahren [Sanger *et al.*, 1977]. Die ddNTPs enthielten für jede der vier Basen einen chemisch an das Molekül gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, der bei einer energetischen Anregung Licht einer spezifischen Wellenlänge emittiert. Somit war es möglich die Sequenzierungsreaktion für die vier Basen in einem Reaktionsansatz durchzuführen. Ein solcher Ansatz wurde einer elektrophoretischen Trennung unterworfen, so daß sich direkt die Sequenz der DNA-Matrize ermitteln ließ.

Die Sequenzierung wurde mit dem ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden 500 ng DNA, 5 pmol Primer und 2 μ L Terminations Mix (enthält dNTPs, markierte ddNTPs, Puffer und AmpliTaq DNA Polymerase FS) in einem 200 μ L PCR-Reaktionsgefäß gemischt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 10 μ L aufgefüllt. Anschließend wurde dieser Ansatz unter den folgenden Bedingungen in einem PCR-Gerät GeneAmp PCR System 2400 inkubiert.

25 Zyklen	96°C	10 s
	50°C	5 s
	60°C	4 min

Der Reaktionsansatz wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 μ L 3 M NaOAc (pH 5,2) und 25 μ L 95 %igem EtOH gemischt und 20 min zentrifugiert (13000 U/min bei 4°C). Das Pellet wurde vorsichtig mit 250 μ L 70 %igem EtOH gewaschen,

in einer Speedvac getrocknet und in 20 μL TSR (template suppression reagent) resuspendiert. Nach 2 min Denaturierung bei 95°C wurde die Probe blasenfrei in ein entsprechendes Probengefäß pipettiert, welches zum Schutz vor Verdunstung mit einem Septum verschlossen wurde. Diese Proben wurden nun zur Sequenzanalyse mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer gemäß der Herstellerangaben eingesetzt.

4.1.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde in erster Linie für zwei Anwendungen durchgeführt: Erstens für die Klonierung von Genen oder Genfragmenten in geeignete Vektoren zur Expression, zweitens zur Kontrolle chromosomaler Konstruktionen wie der Unterscheidung zwischen Einfach- und Doppel-crossover Integrationen. Im ersten Fall wurden durch die verwendeten Oligonukleotide die gewünschten Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen für die Ligation der Fragmente eingeführt. Die Annealing Temperatur der Oligonukleotide wurde wie folgt berechnet: Die mit dem DNA-Templat identischen Sequenz wurde in der Art addiert, daß A- und T-Nukleotide 2°C, C- und G-Nukleotide 4°C entsprachen. Die Oligonukleotide wurden so konzipiert, daß sich Annealing-Temperaturen von ca. 52-60°C ergaben. Ein typischer PCR-Reaktionsansatz wurde durch Mischen der folgenden Komponenten erhalten:

PCR-Ansatz	DNA-Templat	0,05-5	ng
	Oligonukleotide jeweils	50	pmol
	dNTPs (Lösung je 2 mM)	5	μL
	10x Puffer (Vent)	5	μL
	bzw. 10x Puffer 3 (Taq/Pwo)	5	μL
	Vent Polymerase (1U/ μL)	0,5	μL
	bzw. Taq/Pwo Polymerase	0,5	μL
	ddH ₂ O	add. 50	μL

Anschließend wurde der Ansatz in einer PCR-Maschine nach folgendem allgemeinen Programm inkubiert [(a1) = Annealing Temp. - 3°C; (a2) = (a1) + 5°C (max 62°C); (ez) = Elongationszeit, für Taq/Pwo 40 s pro 1 kb Amplifikat, für Vent 1 min pro 1 kb Amplifikat]:

Taq/Pwo-Polymerase:			
94°C	5 Zyklen	10 Zyklen	20 Zyklen
2 min	94°C 15 s	94°C 15 s	94°C 15 s
	(a1)°C 30 s	(a2)°C 30 s	(a2)°C 30 s
	68°C (ez) s	68°C (ez) s	68°C (ez) s + 5 s pro Zyklus

Vent-Polymerase:

94°C	5 Zyklen	21 Zyklen
2 min	94°C 15 s	94°C 15 s
	(a1)°C 30 s	(a2)°C 30 s
	72°C (ez) s	72°C (ez) s

Bei Verwendung der Vent-Polymerase wurde das Enzym erst während der 2 minütigen Denaturierung des DNA-Templats bei 94°C in den Ansatz pipettiert.

4.1.3 P1-Phagen Transduktion

Mit Hilfe der P1-Phagen Transduktion können chromosomale Abschnitte von ca. 100 kb Größe zwischen *E. coli* Zellen verschoben werden [Miller, 1992; Yarmolinsky & Sternberg, 1988]. Dazu werden virulente Derivate des Phagen eingesetzt (P1*vir*), die nicht zu einem lysogenen Zustand der Zelle führen können. Während des Vervielfältigungsprozesses des Phagen wird auch das Chromosom der Wirtszelle zerschnitten und bei ca. 1 % der Phagenpopulation kommt es zur fehlerhaften Integration chromosomaler DNA in die Phagenköpfe. Das so hergestellte Phagenlysats des Donorstammes wird zur Infektion des Rezipientenstammes verwendet. So kann beispielsweise durch Selektion auf einen geeigneten Marker die Transduktion des gewünschten chromosomalen Segments verfolgt werden.

Im ersten Schritt wurde das Phagenlysats des Donorstammes präpariert. In vier Ansätzen wurden je 4 mL 2xYT- oder LB-Medium 1:100-1:200 mit einer Übernachtskultur der *E. coli* Zellen inokuliert und 30 min bei 37°C im Luftschüttler inkubiert. Dann wurde CaCl₂ auf eine Endkonzentration von 2,5 mM zugegeben (1 M sterile Stock-Lösung). Nach weiteren 30 min wurden drei Ansätze mit verschiedenen Volumina (z.B. 2,5; 10 und 25 µL) eines P1-Phagen Lysats versetzt, das aus dem *E. coli* Wildtyp-Stamm K-12 MG1655 präpariert worden war, und weiter bei 37°C im Luftschüttler inkubiert. Der vierten Ansatz ohne P1-Phagen diente als Kontrolle. Die Zellen sollten nun in Abhängigkeit der Phagenkonzentration lysieren. Dabei ist der erhaltene Phagentiter umso besser, desto später die Lyse eingesetzt hat. Es wurden die Ansätze weiterverarbeitet, in denen die Lyse der Zellen nach 3 bis 4 h erfolgte. 2 mL eines solchen Ansatzes wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und mit 50 µL Chloroform versetzt. Anschließend wurde 1 min heftig vortexiert, um Phagen von Zellschrott und verbleibenden Zellen zu lösen, und 2 min bei 13,000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frische Reaktionsgefäß transferiert und zur Konservierung bei 4°C mit zwei Tropfen Chloroform versetzt.

Im zweiten Schritt wurde eine Infektion der Rezipientenzellen mit dem Phagenlysat des ersten Schrittes durchgeführt. Dazu wurden 5 mL 2xYT- oder LB-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur der Rezipientenzellen inokuliert und bei 37°C im Luftschüttler angezogen. Etwa 30 min bevor die Kultur eine OD(600 nm) von ca. 0,7-0,9 erreichte, wurde CaCl₂ auf eine Endkonzentration von 2,5 mM zugegeben (1 M sterile Stock-Lösung). Dann wurde je 1 mL der Kultur in vier Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert. Drei dieser Ansätze wurden mit verschiedenen Volumina des im ersten Schritt präparierten Phagen-Lysates versetzt (z.B. 2,5; 10 und 25 µL) und im Heizblock *ohne Agitation* für genau 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße 1 min heftig vortexiert und die Zellen durch Zentrifugation bei 13,000 Upm pelletiert. Nach Abnahme und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2xYT- oder LB-Medium mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Citrat (pH 6,5) resuspendiert und so *mit Agitation* (im Luftschüttler oder schüttelbaren Heizblock) zur Expression des Resistenzgens für 1 h bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf 2xYT-Platten, die das dem chromosomalen Marker entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und durch Inkubation über Nacht bei 37°C selektiert. Genauso wurde mit den Kontrollansätzen verfahren, die entweder keine Zellen oder keine Phagen enthielten. Die erhaltenen Transduktanten wurden mindestens einmal auf gleicher Selektion umgestrichen und anschließend auf die gewünschte Transduktion des chromosomalen Abschnitts untersucht. Es wurde stets mit solchen Transduktanten weitergearbeitet, die von der Platte stammten, die aus dem Reaktionsansatz mit der geringsten Phagenkonzentration hervorgingen.

4.2 Protein-Techniken

Folgende Standard-Techniken wurden nach Sambrook *et al.* [Sambrook *et al.*, 1989] durchgeführt: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli [Laemmli, 1970] oder Schägger und Jagow [Schägger & Jagow, 1987], Western-Blotting [Burnette, 1981], Coomassie-Blue Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen [Bennett & Scott, 1971] und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [Bradford, 1976].

4.2.1 Genexpression mit dem pQE-Vektorsystem

Die Expression der Gene oder Genfragmenten in pQE60-Vektoren erfolgte entweder in *E. coli* M15 mit dem Helferplasmid pREP4, oder in *E. coli* B121 mit dem Helferplasmid pREP4-gsp, das eine Koexpression der der Ppant-Transferase Gsp ermöglichte. Sie wurde in

beiden Fällen nach dem gleichen nachfolgend beschriebenen Verfahren durchgeführt: 400 mL 2xYT (Amp¹⁰⁰Km²⁵, 10 mM MgCl₂) wurden 1:100-1:200 mit einer Übernachtskultur des Expressionsstammes angeimpft und im Wasserbadschüttler bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Bei einer OD(600 nm) von 0,6 - 0,8 wurde die Genexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert und für weitere 2 bis 3 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen für 10 min auf Eis gestellt, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 5000 Upm, 4°C), nach Verwerfen des Überstandes in 15 mL Puffer HEPES A (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

4.2.2 Präparation von *E. coli* Rohzelleextrakten

E. coli Zellen wurden mit Hilfe einer French Press aufgeschlossen. Durch die Expansion von dem hohen Druck (20000 psi) gegen Normaldruck wird die Zellwand und Zellmembran aufgerissen. Die Zellsuspension in Puffer HEPES A wurde drei Kompressions-/Dekompressionszyklen unterzogen. Es wurde darauf geachtet, alle Materialien möglichst gekühlt zu halten. Nach Zellaufschluß wurden lösliche und unlösliche Bestandteile durch 15 min Zentrifugation getrennt (15,000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde für die Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie eingesetzt.

4.2.3 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

Die Reinigung der mit sechs Histidin-Resten fusionierten Proteine erfolgte durch Affinitätschromatographie. Hierbei ist Nitrilotriacetat (NTA) kovalent an die Säulenmatrix gebunden. NTA kann vier der sechs Koordinationsstellen von Ni²⁺-Ionen besetzen und diese dadurch an der Säulenmatrix immobilisieren [Porath *et al.*, 1975]. Proteine mit chelatbildenden Seitengruppen wie Histidin können die freien Koordinationsstellen besetzen und binden so an die Säule. Die Elution der Protein erfolgt durch das Anlegen eines Gradienten von 0 bis 250 mM Imidazol, das ebenfalls an die Nickelmatrix bindet und das Fusionsprotein verdrängt.

Um unspezifische Bindungen anderer Protein an die mit Ni²⁺-Ionen beladene Chelatsäule weiter zu unterdrücken, wurden die Rohzelleextrakte bereits mit mit imidazolhaltigem Puffer HEPES B versetzt (5 %(v/v) für die dimodularen Proteine ProCATPheCAT-(Te),

ProCAT-OrnCAT-(Te) und ProCAT-LeuCAT(Te); 10 % (v/v) für alle anderen Proteinpräparationen, soweit nicht anders angegeben).

FPLC-Puffer

HEPES A	HEPES 50 mM	HEPES B	HEPES 50 mM
	NaCl 100 mM		NaCl 100 mM
	pH 8,0		Imidazol 250 mM
			pH 8,0

Alle Schritte der Proteinreinigung an der FPLC wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Rohzelleextrakte wurden mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,75 mL/min auf die Säule (Bettvolumen ca. 1,5 mL) aufgetragen. Mit gleicher Ratio der Puffer A zu B wurde die Säule gewaschen, bis eine nahezu konstante Grundlinie (Detektion bei 280 nm) erreicht war. Dann wurde typischerweise folgender Gradient angelegt (Flußgeschwindigkeit 0,75 mL/min):

FPLC-Gradient	0 min	10 %	HEPES B
	5 min		10 % HEPES B
	15 min		15 % HEPES B
	45 min		70 % HEPES B
	50 min		100 % HEPES B
	55 min		100 % HEPES B
	60 min		0 % HEPES B
	65 min		0 % HEPES B

Die Fraktionen wurden in 1,5 mL Volumina gesammelt. SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese diente zur Beurteilung von Reinheit und Konzentration des Proteingehalts der einzelnen Fraktion, von denen geeignete vereint wurden. Zur Verwendung in den Enzymassays wurden die noch imidazolhaltigen Proteinlösungen gegen Assay Puffer dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt [Gill & von Hippel, 1989]. Die Proteine wurden entweder bis zur Verwendung auf Eis gehalten oder zur längeren Lagerung mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

Assay Puffer	HEPES	50	mM
	NaCl	100	mM
	EDTA	1	mM
	pH 8,0		

4.2.4 Untersuchung enzymkatalysierter Reaktionen

4.2.4.1 ATP-PP_i Austauschreaktion

Da es sich bei dem ersten Schritt der Aminosäureaktivierung durch Peptidsynthetasen, der Bildung eines enzymassoziierten Aminoacyladenylates unter ATP-Hydrolyse, um eine

reversible Reaktion handelt, kann die Rückreaktion verfolgt werden um die Enzymaktivität zu bestimmen [Lee & Lipmann, 1975]. Zu diesem Zweck wurde dem Reaktionsansatz radioaktiv markiertes [^{32}P]-Pyrophosphat zugesetzt, das in der Rückreaktion in ATP eingebaut werden kann. ATP absorbiert im Gegensatz zu PP_i an Aktivkohle, so daß die Effizienz der Rückreaktion auf diese Weise gemessen werden konnte. Dabei ist die Menge der in ATP eingebauten Radioaktivität proportional zur ATP- PP_i -Austauschrate und somit zur spezifischen Aminosäure-aktivierenden Eigenschaft der Enzymprobe.

In Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden jeweils die zu testenden Aminosäuren und ATP vorgelegt und auf 37°C präinkubiert. Dazu wurde ein ebenfalls auf 37°C präinkubiertes Gemisch aus Enzym, kaltem und radioaktiv markiertem PP_i und MgCl_2 (in assay Puffer) pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend auf Eis transferiert und mit 0,5 mL eiskalter Terminationslösung versetzt. Der Ansatz wurde vortexiert und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation (1 min; 13,000 Upm) pelletiert, zweimal durch Resuspension in 0,8 mL H_2O und erneuter Zentrifugation gewaschen, in 0,5 mL H_2O resuspendiert, in 20 mL Polypropylenmeßfläschchen überführt und mit 4 mL Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Eco Plus versetzt. So konnte die Zählrate der Probe in einem Szintillationszähler gemessen werden.

ATP-PP_i-Austauschreaktion	Aminosäure 10 mM	10	μL
	ATP 100 mM	5	μL
	Enzym	20-50	pmol
	MgCl_2 1M	1	μL
	Natriumpyrophosphat 50 mM	0,2	μL
	[^{32}P]-Pyrophosphat	0,15	μCi
	assay Puffer pH 8,0	add. 100	μL
Terminationslösung	Natriumpyrophosphat	100	mM
	Perchlorsäure	560	mM
	Aktivkohle (Norit A)	1,2	% (w/v)

4.2.4.2 Beladung mit radioaktiv markierten Aminosäuren

Die kovalente Bindung der Substrataminosäuren durch Peptidsynthetasen kann durch die Inkubation der Enzyme mit radioaktiv markierten Aminosäuren und ATP gemessen werden. Eine anschließende Präzipitation des Enzyms mit TCA führt zur Kopräzipitation der gebundenen Aminosäure, der Thioester ist unter sauren Bedingungen stabil, während die freie Aminosäure ausgewaschen werden kann. Der Blindwert wird aus einem entsprechenden Reaktionsansatz ohne ATP bestimmt.

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden Enzym, MgCl₂, DTE und die radioaktiv markierte Aminosäure in assay Puffer vorgelegt und auf 37°C präinkubiert. Durch Zugabe von ATP wurde die Reaktion gestartet und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Eis transferiert und durch Zugabe von 0,8 mL eiskalter 10 %iger TCA-Lösung und 15 µL BSA-Lösung (25 mg/mL) gestoppt. Nach Mischen durch Vortexieren wurde weitere 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von der Pelletierung des Präzipitats durch 30minütige Zentrifugation (13,000 Upm; 1°C). Das Pellet wurde einmal mit 0,8 mL eiskalter 10 %iger TCA-Lösung gewaschen, in 150 µL Ameisensäure aufgenommen und so zur Analyse mit einem Szintillationszähler eingesetzt.

Beladungs-Assay	Enzym	50	pmol
	[³ H]- oder [¹⁴ C] Aminosäure	100-300	pmol
	MgCl ₂ 1 M	1	µL
	DTE 250 mM	2	µL
	ATP 100 mM	5	µL
	Assay Puffer pH 8,0	add. 100	µL

4.2.4.3 Produktanalyse Di- und Tripeptid Assays radioaktiv

Für die Analyse der durch künstliche Enzymsysteme synthetisierten Peptide wurden jeweils eine eine der Substrataminosäuren radioaktiv markiert und die andere(n) in nicht radioaktiv markierter Form eingesetzt. So sollte das entstehende Produkt radioaktiv markiert werden. Ein Vergleich mit einem chemisch synthetisierten Standard mittels Dünnschichtchromatographie konnte dann Aufschluß über die Identität der Produkte geben. Für qualitative Versuche wurden dabei alle Edukte und Enzyme gemischt und für 2 h inkubiert. Für quantitative Versuche, mit denen Informationen über die Geschwindigkeit der Produktbildung gewonnen werden sollte, wurden aus einem angemessen vergrößerten Reaktionsansatz nach bestimmten Zeitintervallen Aliquots entnommen und unverzüglich in gleicher Weise wie die qualitativen Ansätze aufgearbeitet. Bis auf die Produkte DPhe-Pro-Orn, DPhe-Pro-Lys und cycOrn konnten alle Produkte, zumindest zu einem gewissen Anteil, durch organische Extraktion aus dem Reaktionsansatz getrennt werden.

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden Enzyme, Aminosäuren, MgCl₂ und DTE in Assay Puffer vorgelegt und auf 37°C präinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ATP gestartet und weiterhin bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 0,4 mL Butanol/Chloroform [4:1(v/v)] wurde die Reaktion gestoppt und die organische Extraktion eingeleitet. Nach Zugabe von 200 µL H₂O wurde das Gemisch 20 s vortexiert. Die Phasentrennung wurde durch 2minütige Zentrifugation (13,000 Upm; Raumtemperatur) herbei-

geführt. Die organische Phase wurde in eine frisches Reaktionsgefäß transferiert. Diese Extraktion wurde ein zweites Mal mit 0,4 mL Butanol/Chloroform [4:1(v/v)] durchgeführt und beide organischen Phasen vereinigt. Anschließend wurde die vereinte organische Phase in gleicher Weise zweimal mit je 0,3 mL H₂O gewaschen, wobei nach der Phasentrennung jeweils die organische Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Alle wässrigen Phasen wurden ebenfalls vereinigt. Von einem 50 µL Aliquot der organischen Phase wurde gegebenenfalls die Zählrate mit einem Szintillationszähler bestimmt. Für die dünnschichtchromatographische Analyse wurden organische und wässrige Phasen unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt.

Produktassay radioaktiv	TycA	50	pmol
	Enzym2	50	pmol
	Aminosäure1 [heiß]	100-340	pmol
	(ggf. 5 bis 100fache Verdünnung der heißen aa1 mit entsprechend kalter aa1)		
	Aminosäure2 100 mM	1	µL
	(ggf. Aminosäure3 100 mM	1	µL)
	MgCl ₂ 1 M	1	µL
	DTE 250 mM	2	µL
	ATP 100 mM	5	µL
	add. Assay Puffer pH 8,0	100	µL

Die Pellets der bis zur Trockne eingengten Phasen wurden in 20 µL Ethanol/H₂O [1:1 (v/v)] aufgenommen. Davon wurden 1 bis 8 µL auf Silicagel 60 F254 Platten (*Merck*) aufgetragen. Die Dünnschichtchromatographien wurden in Essigsäureethylester/Pyridin/Essigsäure/H₂O [90:30:9:16 (v/v)] (TycA/ProCAT-System) bzw. Butanol/Essigsäureethylester/Essigsäure/H₂O [1:1:1:1 (v/v)] (Trimodul-Systeme) entwickelt. Radioaktive Produkte wurden durch Autoradiographie, chemische Standards durch Besprühen der Platten mit Ninhydrin-Lösung (0,1 % in Ethanol) und Behandlung mit Heißluftfön sichtbar gemacht.

4.2.4.4 Produktanalyse Di- und Tripeptid Assays präparativ

Für eine Analyse der Produkte künstlicher Peptidsynthesensysteme mittels HPLC oder Massenspektroskopie wurden die Reaktionsansätze analog wie im vorherigen Abschnitt beschrieben durchgeführt, bis auf folgende Veränderungen: Alle Substrataminosäuren wurden in 1 mM Endkonzentration eingesetzt. Die Reaktion und die anschließende Aufarbeitung wurde im 10fachen Maßstab durchgeführt. Dem Ansatz wurde nach 2stündiger Inkubation bei 37°C nochmals die gleiche Menge ATP zugegeben und die Reaktion über Nacht bei 37°C fortgeführt.

4.2.4.5 Thioesterspaltung

Peptidsynthetasen binden ihre Substrate und Zwischenprodukte als Thioester, die säurestabil, jedoch labil bei alkalischer Behandlung sind. Zur Untersuchung der auf den Enzymen gebundenen Zwischenprodukte wurde eine Thioesterspaltung mit anschließender dünnschichtchromatographischer Analyse (wie im vorherigen Abschnitt beschrieben) durchgeführt.

Ein üblicher radioaktiver Reaktionsansatz im zweifachen Maßstab wurde nach Inkubation bei 37°C auf Eis transferiert und mit 0,8 mL eiskalter 10 %iger TCA-Lösung und 15 µL BSA-Lösung (25 mg/mL) versetzt. Die Probe wurde vortexiert und weiter 30 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 30minütige Zentrifugation (13,000 Upm; 1°C) pelletiert und zweimal mit je 0,8 mL eiskalter 10 %iger TCA-Lösung gewaschen. Anschließend wurde mit einmal mit 1 mL Diethylether/Ethanol (3:1 (v/v)) und zweimal mit 1 mL Diethylether gewaschen. Das Pellet wurde dann bei 37°C getrocknet. Nach Resuspension in 200 µL Assay Puffer (pH 11,0) wurde für 20 min bei 70°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 transferiert und unter vermindertem Druck in der Speedvac bis zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Rückstand wurde in 20 µL Ethanol/H₂O (1:1 (v/v)) aufgenommen und für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

4.2.4.6 HPLC-Produktanalyse

Die Analyse der Produkte mittels HPLC wurde mit dem 1100 HPLC-System (*Hewlett Packard*) und einer Nucleosil C18 3/120 3-250 Säule (Macherey & Nagel, 3 x 250 mm, Porengröße 120 Å, Partikelgröße 3 µm) durchgeführt. Die Proben wurden in 100 bis 200 µL HPLC-Puffer A/HPLC-Puffer B (90:10) aufgenommen. Davon wurden 20 µL auf die Säule appliziert. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 214 und 254 nm. Folgender Gradient wurde angelegt (Flußrate 0,35 mL/min):

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

HPLC-Puffer A	0,05 % (v/v) HCOOH in H ₂ O
HPLC-Puffer B	0,04 % (v/v) HCOOH in Methanol

5 Ergebnisse

5.1 Genetische Charakterisierung des *tyc*-Operons

5.1.1 Strategie

Der Grundstein zur Klonierung und Sequenzierung des Tyrocidin Biosynthese-Operons (*tyc*-Operon) wurde bereits in der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit gelegt, deren Ergebnisse hier kurz aufgeführt werden sollen [Mootz, 1996]. Aus chromosomaler DNA des Tyrocidin Produzenten *Bacillus brevis* ATCC 8185 wurde eine λ -EMBL3 Genbank konstruiert. Aus dieser Genbank wurden λ -Phagen isoliert, die den 5'-Bereich des *tyc*-Operons enthielten. Dazu wurden die Sonden I und II aus dem damals kloniert vorliegenden *tycA* [Marahiel *et al.*, 1985; Weckermann *et al.*, 1988; Gocht & Marahiel, 1994] und dem 5'-Bereich von *tycB* [Mittenhuber *et al.*, 1989] angefertigt (s. Abb. 5.1-1). In der Absicht, den klonierten Bereich des *tyc*-Operons in 3'-Richtung zu verlängern, wurden rekombinante λ -Phagen, deren DNA mit Sonde I, nicht jedoch mit Sonde II, hybridisierte, isoliert. Das Insert des λ -Phagen I.4 wurde vollständig kartiert und in pBluescript-Vektoren mittels *SalI*-Verdau subkloniert. Die Inserts dieser Plasmide wurden mit Standardprimern von beiden Seiten ansequenziert. Die daraus abgeleiteten bruchstückhaften Aminosäuresequenzen bestätigten bereits die erwartete Organisation des *tycB*- und des sich anschließenden *tycC*-Gens [Mootz, 1996].

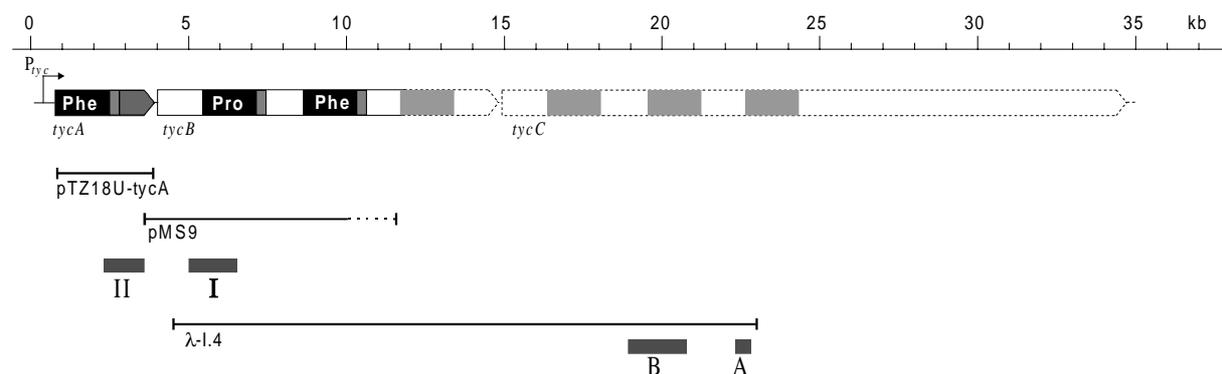


Abb. 5.1-1: Stand der Klonierung des *tyc*-Operons vor dieser Arbeit. Mit Einsatz der Sonden I und II war aus einer λ -EMBL3-Genbank von *B. brevis* ATCC 8185 der λ -Phage I.4 isoliert worden. Diese Strategie wurde mit den Sonden A und B zur weiteren Klonierung erneut angewendet.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die DNA-Sequenz des Inserts des λ -Phagen I.4 vervollständigt werden sowie weitere Phagen aus der Genbank isoliert werden, die den Rest des *tyc*-Operons umfaßten. Dabei wurde mit dem Einsatz der beiden Sonden A und B wieder nach gleicher Strategie verfahren: λ -Phagen, deren DNA mit Sonde A, aber nicht mit Sonde B reagiert, wurden isoliert (s. Abb. 5.1-1).

5.1.2 Klonierung des *tyc*-Operons durch Isolierung von rekombinanten λ -Phagen und deren Subklonierung

5.1.2.1 Screening der Genbank

Die Sonden A und B wurden aus Fragmenten am 3'-Ende des Inserts des λ -Phagen I.4 gewonnen. Sonde A stellte ein 345 bp *Sal* I-Fragment aus dem λ -I.4 Subklon pHM8 dar, Sonde B ein 1810 bp *Hind* III-*Sal* I-Fragment aus pHM3 (s. Tab. 5.1-1). Nach Infektion von *E. coli* XL1Blue P2 Zellen mit λ -Phagen der λ -EMBL3 Genbank wurden auf 10 „Overlay“-Kulturplatten ca. 5000 Plaques erhalten und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden mit Sonde A hybridisiert und positiv reagierende Bereiche den Plaques auf den Kulturplatten zugeordnet. Anschließend wurden die Membranen von Sonde A befreit und mit Sonde B hybridisiert. Plaques, die mit Sonde A reagiert hatten, mit Sonde B jedoch keine Reaktion zeigten, wurden ausgestochen und in Lösung aufgenommen. Die so isolierten λ -Phagen wurden für eine erneute Infektion von *E. coli* XL1Blue P2 Zellen eingesetzt und die entstandenen Plaques nach Transfer auf Nitrozellulosemembran wieder mit Sonde A hybridisiert. Zur Vereinzelung der λ -Phagen wurde diese Prozedur wiederholt bis sämtliche nach Infektion erzeugten Plaques mit der Sonde A reagierten. Die homogenen λ -Phagen A.1 bis A.34 wurden schließlich zur Kontrolle nochmals mit Sonde B hybridisiert. Zwei dieser Phagen, λ -A.7 und λ -A.13 (s. Abb. 5.1-1), wurden für die weiteren Arbeiten eingesetzt.

5.1.2.2 Subklonierung der λ -Phagen A.7 und A.13 in pBluescript SK (-)

Zur Subklonierung der rekombinanten DNA-Fragmente, die die λ -Phagen A.7 und A.13 trugen, wurde von diesen im Flüssigkulturverfahren λ -DNA präpariert [Mootz, 1996]. Die DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III geschnitten, die resultierenden Fragmente über ein Agarosegel getrennt, aufgereinigt und in *Hind* III-linearisierten pBluescript SK(-)-Vektor ligiert. Dabei war bereits zu erkennen, daß einige Fragmente von nur 100-300 bp Größe entstanden, die nur noch unzuverlässig identifiziert und isoliert werden

konnten. Ebenso zeigte sich im Laufe der Klonierungsexperimente, daß λ -Phage A.7 weniger rekombinante DNA enthielt als λ -Phage A.13. Aus den Fragmenten aus λ -A.7 ließ sich rechnerisch nicht der restliche 3'-Bereich des *tyc*-Operons isolieren. Daher wurden auch noch die im Restriktionsverdau mit *Hind* III von λ -A.13-DNA gegenüber λ -A.7-DNA zusätzlich auftretenden DNA-Fragmente in pBluescript SK (-) kloniert. Ihre physikalische Kartierung wurde zum Teil durch Restriktionsverdau der λ -DNA und der pBluescript-Derivate erschlossen, zum Teil erst durch die mittels DNA-Sequenzierung erhaltene Information aufgeklärt. In Tabelle 5.1-1 sind alle Plasmide aufgeführt.

5.1.2.3 Sequenzierung aller Subklone und Zusammenfügen der Sequenzen

Mit den Subklonen der λ -Phagen A.7 und A.13 sowie den in der Diplomarbeit konstruierten Subklonen des λ -Phagen I.4 [Mootz, 1996] lagen die gesamten Gene *tycB* und *tycC* in leicht zu vervielfältigenden pBluescript-Derivaten kloniert vor. Im ersten Schritt konnten nun alle rekombinanten DNA-Fragmente mit Hilfe der Standardoligonukleotide „Universal“ und „Reverse“ (s. Anhang: Tab. 7.1) von beiden Seiten ansequenziert werden. Nach der Methode des „Primer walking“ wurden dann aus den bekannten Sequenzdaten geeignete Oligonukleotide abgeleitet, die die Bestimmung des jeweils nächsten Abschnitts der DNA-Sequenz erlaubten, bis die DNA-Sequenz aller Subklone mindestens einmal auf dem kodierenden oder dem Gegenstrang gelesen war. Durch Analyse der entsprechenden Aminosäuresequenz war nun auch das im vorherigen Abschnitt erwähnte Fehlen einiger kurzer Fragmente ersichtlich. Um diese Lücken zu schließen, wurden von den jeweils benachbarten, klonierten DNA-Fragmenten geeignete Oligonukleotide abgeleitet und für eine PCR-Amplifikation aus chromosomaler DNA verwendet. Die DNA-Sequenzierung dieser Amplifikate (in Tabelle 5.1-1 aufgeführt) beseitigte die letzten Lücken sicherte die physikalische Kartierung des *tyc*-Operons. Abschließend wurde mit Hilfe weiterer Oligonukleotide der jeweils noch nicht sequenzierte DNA-Strang innerhalb des gesamten bearbeiteten Bereiches sequenziert, so daß alle verbliebenden Sequenzunsicherheiten eliminiert werden konnten. Ebenso wurden die gesamten schon vor dieser Arbeit veröffentlichten Sequenzen des *tycA*- und 5'-Endes des *tycB*-Gens sequenziert und an mehreren Stellen korrigiert. Die korrigierten und erstmals bestimmten Sequenzen (40897 bp) wurden in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>) unter der Accession Number AF004835 hinterlegt [Mootz & Marahiel, 1997b]. Weitere 3169 bp wurden in der 3'-benachbarten Region sequenziert. Für diesen Bereich wurde jedoch auf eine

Gegenstrangsequenzierung verzichtet, so daß diese Daten nicht fehlerfrei sein könnten. Alle für diese Arbeit relevanten DNA-Sequenzen sind in den zweifelsfrei bestimmten 40897 bp enthalten. Positionsangaben in Tabellen beziehen sich auf sie.

Tab. 5.1-1: Subklone des *tyc*-Operons

Plasmid, λ -Phage bzw. PCR-Produkt	von* (bp)	bis* (bp)	Größe (bp)	ligiert über	aus Templat DNA
λ -I.4	4612	23163	18551	<i>Sau</i> 3A- <i>Sau</i> 3A	<i>Bb</i> 8185
pHM4	4612	10231	5619	<i>Sau</i> 3A- <i>Sal</i> I	λ -I.4
pHM5	10231	12970	2739	<i>Sal</i> I- <i>Sal</i> I	λ -I.4
pHd1	12970	13184	214	<i>Sal</i> I- <i>Hind</i> III	pHM3
pHc4	12970	14313	1343	<i>Hinc</i> II- <i>Hinc</i> II	pHM3
pHM3	12970	20725	7755	<i>Sal</i> I- <i>Sal</i> I	λ -I.4
pHd2.17	13184	15784	2600	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	pHM3
pHc3	14313	16836	2523	<i>Hinc</i> II- <i>Hinc</i> II	pHM3
pHd2.12	15784	18461	2677	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	pHM3
pHc1	16836	20725	3889	<i>Hinc</i> II- <i>Hinc</i> II	pHM3
pHd4	18461	18915	454	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	pHM3
pHd3	18915	20725	1810	<i>Hind</i> III- <i>Sal</i> I	pHM3
pHM6	20725	22366	1641	<i>Sal</i> I- <i>Sal</i> I	λ -I.4
pHM8	22366	22711	345	<i>Sal</i> I- <i>Sal</i> I	λ -I.4
pHM7	22711	23163	452	<i>Sal</i> I- <i>Sau</i> 3A	λ -I.4
pH5	22026	23080	1054	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.7
pH8	23080	23307	227	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.7
pH3a2	23307	25562	2255	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.7
pH3b1	25562	27970	2408	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.7
pH1.3	27970	30325	2355	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.7
pH4.3	30325	31377	1052	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.7
pH6	31377	31932	555	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.7
pH4	31932	33575	1643	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.7
PCR21	33575	33952	377		<i>Bb</i> 8185
pH11	33952	34320	368	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.13
pH9	34320	35101	781	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.13
PCR39	35101	35776	675		<i>Bb</i> 8185
pH3	35776	39134	3358	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.13
pH8	39134	39909	775	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.13
PCR	39909	40043	134		<i>Bb</i> 8185
pH5	40043	(42552)	(2509)	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.13
pH3b	(42552)	(44060)	(1508)	<i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III	λ -A.13

* Numerierung gemäß Sequenzdaten accession number AF004835

5.1.3 Organisation des *tyc*-Operons

Die Analyse der erhaltenen DNA-Sequenzdaten von 40897 bp führte zur Identifizierung von lediglich sechs definierbaren offenen Leserahmen. Dem Gen *tycA* (3021 bp) folgen *tycB* (10764 bp) und *tycC* (19461 bp), die für die Tyrocidin Synthetasen TycB und TycC kodieren und in 5.1.4 detailliert beschrieben werden. In gleicher Leserichtung folgen unmittelbar die Gene *tycD* (1788 bp), *tycE* (1752 bp) und *tycF* (735 bp). Daran schließt sich ein Bereich an, der sich durch sehr geringe Homologien zu bekannten Sequenzen in den Datenbanken auszeichnet, so daß offene Leseraster auf dieser Basis nicht mehr eindeutig identifiziert werden konnten (siehe Abb. 5.1-2).

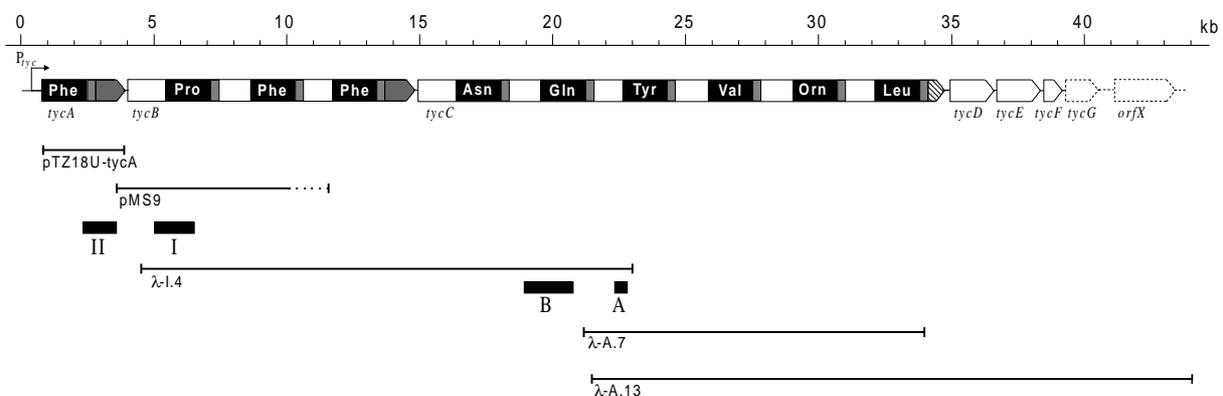


Abb 5.1-2: Klonierung und Sequenzierung des gesamten *tyc*-Operons. Gezeigt sind die Lage der isolierten λ -Phagen A.7 und A.13, die das 3'-Ende des *tyc*-Operons umfaßten. Die Analyse der durch Sequenzierung der gesamten klonierten DNA-Information ergab die Identifikation der Gene *tycA-G* und *orfX*, der vermutlich für eine ABC Exinuclease kodiert. Durch gestrichelte Linien soll die Unsicherheit der Definition der offenen Leseraster ausgedrückt werden.

Im Anschluß an *tycF* könnte ein etwa 1200 bp großer offener Leserahmen (*tycG*) lokalisiert sein, dessen putatives Genprodukt TycG, die einzigen signifikanten Homologien zu Lipasen verschiedener Herkunft zeigt. Die letzten 500 bp des hinterlegten 40897 bp-Abschnittes sind durch Sequenzvergleiche nicht funktionell zu interpretieren. Dagegen sind in den folgenden 3169 bp trotz fehlender Gegenstrangsequenzierung eindeutige Homologien des/der abgeleiteten Genprodukt(e) zu ABC Exinucleasen zu finden. Durch diese Zuordnung konnte auch davon ausgegangen werden, daß dieser Bereich funktionell nicht mehr der Tyrocidin Biosynthese zuzuordnen ist, und eine nähere Analyse unterbleiben. Tabelle 5.1-2 faßt die Sequenzanalysen zusammen.

Tab. 5.1-2: Genanalyse der Sequenzdaten

Gen bzw. DNA-Abschnitt	von* (bp)	bis* (bp)	Länge (bp)	% (GC)	Funktion
5'- <i>tyc</i>	0	911	911	41.0	Promotorbereich <i>tyc</i>
<i>tycA</i>	912	4178	3021	50.2	Strukturgen Peptidsynthetase TycA
<i>tycA-tycB</i>	4179	4272	94	39.4	-
<i>tycB</i>	4273	15036	10764	54.0	Strukturgen Peptidsynthetase TycB
<i>tycB-tycC</i>	15037	15141	105	47.6	-
<i>tycC</i>	15142	34602	19461	54.8	Strukturgen Peptidsynthetase TycC
<i>tycC-tycD</i>	34603	34687	85	56.5	Terminationsschleife?
<i>tycD</i>	34688	36475	1788	52.5	Strukturgen ABC-Transporter TycD
<i>tycD-tycE</i>	36476	36527	53	50.9	-
<i>tycE</i>	36528	38279	1752	54.7	Strukturgen ABC-Transporter TycE
<i>tycE-tycF</i>	38280	38338	59	42.3	-
<i>tycF</i>	38339	39073	735	54.4	Strukturgen Thioesterase TycF
<i>tycF-tycG ?</i>	39074	39117	59	40.7	-
<i>tycG ?</i>	39118	40368	1251	54.1	Strukturgen putative Lipase TycG
?	40369	40911	542	50.9	Terminationsschleife?
?	40911	44065	3154	54.2	Strukturgen(e) ABC Exinuclease

* Numerierung gemäß Sequenzdaten accession number AF004835

5.1.3.1 Transkriptionelle Einheiten

Der vor *tycA* befindliche *tyc*-Promotor wurde bereits eingehend untersucht [Robertson *et al.*, 1989; Fürbass *et al.*, 1991]. Ferner wurden Hinweise dafür gesammelt, daß sich *tycB* mit *tycA* in einer transkriptionellen Einheit befindet [Mittenhuber *et al.*, 1989]. Dies wird auch durch den Abstand von nur 94 bp zwischen *tycA* und *tycB* unterstrichen. In ähnlich geringem Abstand (105 bp) und gleicher Leserichtung schließt sich *tycC* an *tycB* an. In dem Bereich zwischen den beiden Genen befinden sich auch keine augenfälligen Hinweise für einen Promotor, so daß davon ausgegangen werden kann, daß sich *tycC* ebenfalls Teil des *tyc*-Operons ist. Der Bereich zwischen *tycC* und *tycD* ist schwieriger zu interpretieren. Wenngleich er auch nur 85 bp ausmacht und keine typischen Promotorsequenzen identifiziert werden konnten, so befindet sich hier eine komplementäre Sequenz, die auf mRNA-Ebene

eine thermodynamisch mäßig stabile Terminationsschleife ausbilden könnte (GGAxUCCCCUxGGxAxAxxxxUxUxCCxAGGGGAxUCC). Dies wird auch durch den überproportional hohen GC-Gehalt in diesem Bereich deutlich (s. Tab 5.1-2). Die Gene *tycD*, *tycE* und *tycF* liegen offensichtlich in einer transkriptionellen Einheit, da sie nur um 53 bzw. 59 bp voneinander getrennt sind. Diese Bereiche weisen zudem einen gegenüber den Strukturgenen charakteristisch niedrigeren GC-Gehalt auf (s. Tab 5.1-2). Die gleichen Kriterien gelten auch für das putative *tycG*, welches demnach in derselben Einheit liegen könnte. Lediglich im schlecht zu interpretierenden Bereich nach *tycG*, nicht jedoch nach *tycF*, läßt sich eine mäßig stabile Terminationsschleife identifizieren (ACGACCCUxxxxxxAGGGUCGU).

Die Gene *tycA-G* könnten also alle in einem Operon liegen, oder aber in zwei Einheiten, *tycA-C* und *tycD-G*, reguliert sein. Ebenso wäre eine nur partielle Termination nach *tycC* und/oder eine alternative Initiation der Transkription vor *tycD* denkbar. Für die Erhärtung solcher Spekulationen wurden jedoch keine experimentellen Daten gesammelt. Wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt, sei nachfolgend unter der Beschreibung „*tyc*-Operon“ eine Transkriptionseinheit der sechs definierten Gene *tycA-F* verstanden. In den nächsten beiden Abschnitten werden Indizien für die funktionelle Zweckmäßigkeit der Koregulation in dieser Form angebracht.

5.1.3.2 *tycD* und *tycE* kodieren für membranlokalisierte ABC-Transporter

In direkter Nachbarschaft zu den Peptidsynthetasegenen folgen die Gene *tycD* und *tycE*. 9 bp vor dem postulierten ATG-Startkodon von *tycD* (1788 bp) befindet sich eine typische ribosomale Bindungsstelle (GGAGAG). Diese ist bei *tycE* (1752 bp) schlechter auszumachen. Dem postulierten ATG geht in 9 bp Abstand die Sequenz AACTG und in 21 bp Abstand die Sequenz AGGAG voraus. Die abgeleiteten Genprodukte TycD (595 aa; 66,176 kDa) und TycE (583 aa; 64,022 kDa) sind zu 36 % identisch. Der Vergleich mit Sequenzen in den Datenbanken zeigt, daß es sich bei beiden um Proteine aus der großen Superfamilie der ABC-Transporter handeln muß. Dabei ist die Sequenzverwandtschaft zu den sogenannten MDR-Proteinen (multiple-drug-resistance), die eine Subfamilie der ABC-Transporter darstellen, besonders stark ausgeprägt. Als Beispiele mit höchster Homologie seien MsbA aus *E. coli* [Karow & Georgopoulos, 1993], YgaB, ein nicht näher charakterisierter Transporter aus *B. subtilis* [Cummings & Connerton, 1997] und das humane MDR-1 P-Glykoprotein Dvhu1 [Chen *et al.*, 1986] genannt. Alle diese Proteine sind membranständig und transportieren ihre Substrate unter ATP-Hydrolyse über die

Membranbarriere. ATP wird von der ABC-Domäne (ATP-binding cassette), die der Proteinfamilie den Namen gegeben hat, gebunden und hydrolysiert. Diese Domäne befindet sich in der Regel in der C-terminalen Hälfte der Proteine, während die N-terminale Hälfte die transmembranale Komponente ist. Die in Abb. 5.1-3 gezeigten Hydrophobizitäts-Plots der Primärstrukturen von TycD und TycE verdeutlichen diese Zuordnung. Für beide Proteine konnten jeweils sechs Transmembranbereiche identifiziert werden.

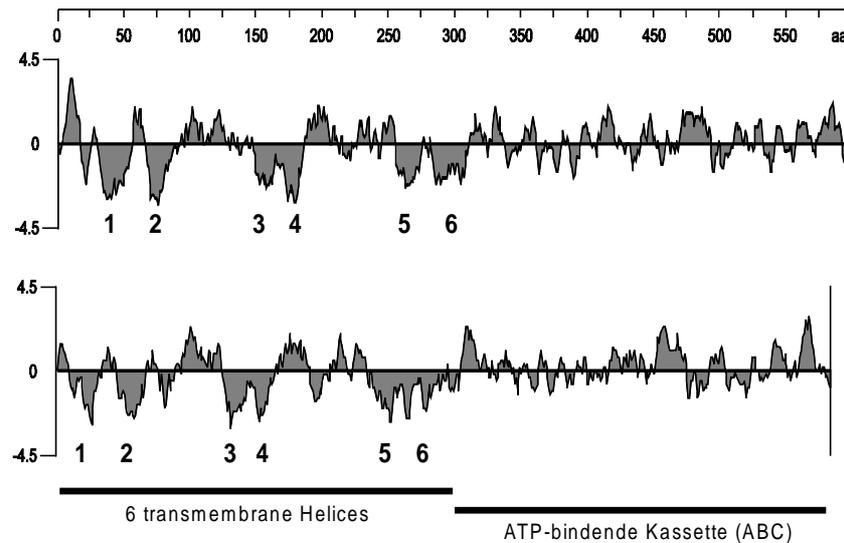


Abb. 5-3: Hydrophobizitäts-Plot von TycD und TycE: Hydrophobizitäts-Plot nach Kyte und Doolittle. In beiden Proteinen lassen sich in der N-terminalen Hälfte sechs stark hydrophobe Regionen identifizieren.

Aufgrund der Lokalisation von *tycD* und *tycE*, zwischen den Tyrocidin Biosynthesegenen und *tycF* (s. nächsten Abschnitt), liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei TycD und TycE um die gegen Tyrocidin resistenzvermittelnden Proteine handelt, mit der sich der Produzent gegen die Toxizität seiner eigenen Produkte durch Export schützt. Zu diesem Zweck wäre auch eine Koregulation in einem gemeinsamen Operon einleuchtend.

5.1.3.3 Das Genprodukt von *tycF* hat Homologien zu Thioesterasen des Typs II

Für *tycF* (735 bp) findet sich 7 bp vor dem ATG-Startkodon eine mögliche ribosomale Bindungsstelle (GGGAG). Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz errechnet sich das Genprodukt TycF mit einer Länge von 244 aa und einem Molekulargewicht von 27.790 kDa. Datenbankvergleiche zeigen eindeutige Homologien von TycF mit Thioesterasen verschiedener Herkunft, insbesondere der Typ II-Thioesterasen der Fettsäurebiosynthese, die in zahlreichen Säugetierzellen gefunden werden [Safford *et al.*, 1987]. Letztere katalysieren die vorzeitige Abspaltung kürzerer Fettsäuren vom Synthasekomplex. Solche Thioesterasen

vom Typ II sind auf der Basis von Sequenzhomologien in nahezu jedem bisher sequenzierten Peptidantibiotika-Gencluster gefunden worden. Ihre Rolle in diesen Systemen ist jedoch noch unklar. Spekuliert wird über eine Beteiligung an der Termination oder ein Recycling blockierter Peptidsynthetasen. Allerdings konnte ihre Wichtigkeit für eine effiziente Peptidproduktion in zwei Systemen gezeigt werden [Schneider & Marahiel, 1998; Rangaswamy *et al.*, 1998]. Oft befindet sich das entsprechende Gen in einer transkriptionellen Einheit mit den Peptidsynthetasegenen, wie beispielsweise in den Gramicidin S [Krätzschmar *et al.*, 1989] und Surfactin Systemen [Cosmina *et al.*, 1993]. Diese Ergebnisse und die oben diskutierte Organisation des *tyc*-Operons legen nahe, daß *tycF* in demselben Operon wie *tycA-C* reguliert ist, welches dann auch die Gene *tycDE* beinhalten müßte.

Ein Sequenzvergleich von TycF mit Thioesterasen des Typs II macht die Präsenz der unter Serin-Thioesterasen konservierten katalytischen Triade Asp-His-Ser deutlich. *tycF* wurde zur Herstellung des rekombinanten Proteins in den Expressionsvektor pQE60 kloniert. Eine Expression in *E. coli* M15/pREP4 resultierte in der Überproduktion eines Proteins der entsprechenden Größe, welches jedoch vollständig unlöslich war (s. Abb. 5.1-4).

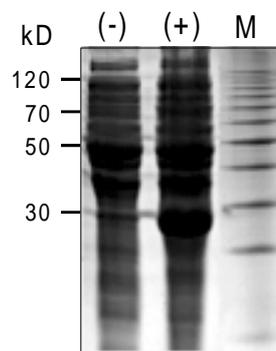


Abb. 5.1-4: Expression von *tycF*: Gezeigt ist ein Coomassie Blue gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Die Expression von *tycF* mittels des Plasmides pQE60-*tycF* in *E. coli* M15/pREP4 resultierte in einem unlöslichen Protein der berechneten Größe (ca. 28 kDa). (-) vor Induktion; (+) nach Induktion; M = Proteinmarker.

5.1.4 Modularer Aufbau der Tyrocidin Synthetasen

Das Hauptaugenmerk bei der Analyse der erhaltenen Sequenzen lag auf den für die Tyrocidin Synthetasen kodierenden Gene. Im Anschluß an *tycA* wurden die Gene *tycB* und *tycC* gefunden, die für die Tyrocidinsynthetasen B und C kodieren. Für *tycB* (10764 bp) ließ sich 7 bp vor dem ATG-Startkodon eine ribosomale Bindungsstelle identifizieren (GAGG), bei *tycC* kommt dafür die 6 bp vor dem ATG-Startkodon gelegene Sequenz GAGG in Frage. Mit 19461 bp Länge ist *tycC* eines der größten zur Zeit bekannten Gene.

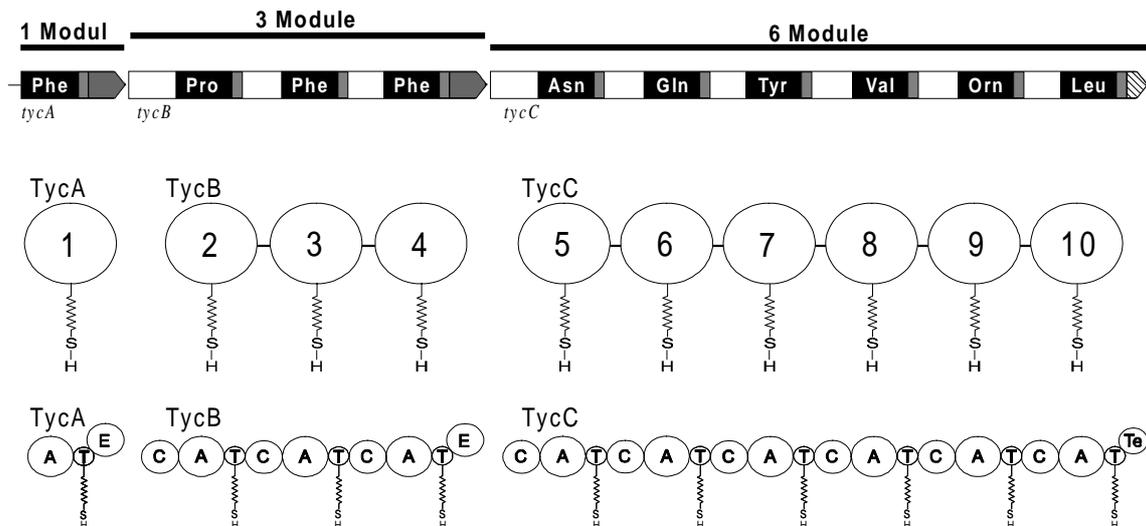


Abb. 5.1-5: Modularer Aufbau der Tyrocidin Synthetasen: Die Tyrocidin Synthetasen bestehen aus zehn Modulen. TycA enthält ein Modul, TycB drei und TycC sechs. Die Module lassen sich in die essentiellen A-, T-, C- und Te-Domänen unterteilen. Die Module der Positionen 1 und 4 enthalten zudem eine E-Domäne.

Die aus den Gensequenzen abgeleiteten Primärstrukturen für TycA (1088 aa, 122,671 kDa), TycB (3587 aa, 404,817 kDa) und TycC (6486 aa, 724,033 kDa) bestätigten viele Ergebnisse der früheren umfangreichen biochemischen Arbeiten an den aus *B. brevis* gereinigten Tyrocidin Synthetasen: Wie bereits in den Abbildungen 5.1-1 und 5.1-2 angedeutet, lassen sich zehn repetitive Blöcke, die sogenannten Module, ausmachen. Module sind nach den Synthetasen die nächstkleineren Organisationseinheiten, die die katalytischen Fähigkeiten haben, eine Substrataminosäure zu erkennen, zu aktivieren, gegebenenfalls zu modifizieren und mit den Substraten der benachbarten Module zu verknüpfen. TycA enthält ein Modul, TycB drei und TycC sechs. Die Module lassen sich anhand charakteristischer Sequenzmotive (s. Tab. 2.2-1) wiederum in Domänen unterteilen, die die verschiedenen erforderlichen Einzelreaktionen katalysieren. So findet man in allen zehn Modulen der Tyrocidin Synthetasen eine Adenylierungs(A)-, eine Thiolierungs(T)- und eine Kondensations(C)-Domäne. Lediglich das erste Modul in der Reihe, das Initiationsmodul TycA, enthält keine C-Domäne, was dadurch erklärt werden kann, daß die Substrataminosäure von TycA zunächst nur am Carboxylterminus mit der darauffolgenden Aminosäure verknüpft wird. Zum Aufbau des linearen Intermediates des Dekapeptides Tyrocidin ist lediglich die Bildung von neun Peptidbindungen erforderlich. Die Module an den Positionen eins (TycA), vier (TycB3) und zehn (TycC6) enthalten zusätzliche Domänen. TycA und TycB3 weisen eine Epimerisierungsdomäne (E-Domäne) auf, in Übereinstimmung mit den Aminosäuren DPhe und DPhe/DTrp des Produktes.

TycC6 trägt eine Terminations- oder Thioesterasedomäne (Te-Domäne), wie sie in allen bisher sequenzierten bakteriellen Peptidsynthetasekomplexen am C-terminalen Ende des letzten Moduls gefunden wurde. Von dieser Domäne wird angenommen, daß sie das lineare als Thioester gebundene Intermediat vom letzten Modul abspaltet, und dabei eventuell auch den Ringschluß aktiv katalysiert (siehe dazu 5.4-6 und 6.4-3).

Nach der Analyse der Sequenzdaten entspricht der modulare Aufbau der Tyrocidin Synthetasen also genau den Erwartungen, die an eine das Dekapeptid synthetisierende Peptidsynthetase matrixe gestellt wurden [Mootz & Marahiel, 1997b]. Diese Erkenntnis sollte im folgenden durch biochemische Daten belegt werden.

5.2 Biochemische Charakterisierung eigenständiger Adenylierungsdomänen der Tyrocidin Synthetasen

5.2.1 Strategie

Die von den DNA-Sequenzen der Gene abgeleiteten Primärstrukturen der Proteine TycA, TycB und TycC entsprachen der modularen Organisation der Tyrocidinsynthetasen, wie sie nach früheren biochemischen Arbeiten zu erwarten war. Für eine biochemische Charakterisierung kam besonderes Interesse den Adenylierungs(A)-Domänen zu, die die einzubauenden Aminosäuren erkennen und zum Aminoacyladenylat aktivieren. Sie bestimmen somit entscheidend die Struktur des Produktes. Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits Untersuchungen an den zwei sehr ähnlichen A-Domänen der Peptidsynthetasen GrsA [Stachelhaus & Marahiel, 1995b] und TycA [Dieckmann *et al.*, 1995] veröffentlicht. Diese Studien zeigten, daß die A-Domänen als eigenständige rekombinante Proteine eine Aktivität in der Adenylierungsreaktion aufwiesen, die von der Aktivität der Wildtyp-Enzyme praktisch nicht unterscheidbar war. Beide Domänen entsprachen jedoch der N-terminalen Hälfte lediglich einmodularer Enzyme, d.h. sie enthielten ihren nativen N-Terminus. Es waren bereits mehrere Versuche gescheitert, in ähnlicher Art interne A-Domänen aus komplexeren Peptidsynthetasen zu untersuchen [Dökel, 1996; Schneider, 1993]. So blieb die für das Verständnis der funktionellen Organisation von Peptidsynthetasedomänen wichtige Frage offen, ob auch interne A-Domänen aus multimodularen Enzymen als diskrete Proteine aktiv sein würden.

Als entscheidendes Kriterium für die Expression löslicher und aktiver interner A-Domänen stellte sich dabei die Wahl des künstlichen und willkürlichen N-Terminus heraus [Mootz & Marahiel, 1997b]. Dieser wurde, in Anlehnung an die Primärstruktur der adenylyt-bildenden Luciferase aus *Photinus pyralis*, dessen 3-D Struktur gerade veröffentlicht worden war [Conti *et al.*, 1996], ca. 95-100 aa vor dem Sequenzmotif LKAGGA (s. Tab. 2.2-1) definiert. Gegenüber vorherigen Versuchen [Dökel, 1996] entsprach dies einer Verlängerung um ca. 15 aa am N-Terminus. Nach der Aufklärung der Kristallstruktur der A-Domäne von GrsA wurde klar, daß dieser Bereiches eine maßgeblich strukturbildende α -Helix enthielt [Conti *et al.*, 1997].

5.2.2 Überproduktion rekombinanter interner Adenylierungsdomänen

Insgesamt wurden fünf A-Domänen der Tyrocidin Synthetasen als rekombinante Proteine biochemisch charakterisiert. Davon stammten zwei aus TycB, genauer aus den Modulen TycB1 und TycB3, und drei aus TycC, den Modulen TycC1, TycC2 und TycC3. Zur Namensgebung der A-Domänen wurde der dem Kolinearitätsprinzip entsprechenden vermuteten Reihenfolge der zehn Module Rechnung getragen: ProA2 und PheA4 (aus TycB), sowie AsnA5, GlnA6 und TyrA7 (aus TycC). Die wichtigsten Daten zu diesen Proteinen sind der Tabelle 5.2-1 zu entnehmen.

Tabelle 5.2-1 Daten zu den rekombinanten A-Domänen

A-Domäne	Positionsangaben*			Länge (aa)	Molekular- gewicht (kDa)	Extinktions- koeffizient bei 280 nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Konzentrations- umrechnung: 1 A(280 nm) entspricht mg/ml
	aus	N-Terminus	C-Terminus				
ProA2	TycB	442 + M	989 + H ₆	559	62,951	37580	1,68
PheA4	TycB	2522 + M	3047 + H ₆	536	59,966	58370	1,03
AsnA5	TycC	437 + M	972 + H ₆	546	60,751	53150	1,14
GlnA6	TycC	1477 + M	2011 + H ₆	546	60,431	68020	0,89
TyrA7	TycC	2507 + M	3047 + H ₆	551	60,268	54770	1,10

* M = plus Startmethionin; H₆ = plus Hexahistidin-Appendix

Mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide (s. Anhang Tab. 7.1) wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus chromosomaler DNA von *B. brevis* durch PCR amplifiziert, mit den

Restriktionsendonukleasen *Nco* I und *Bam*HI, deren Erkennungssequenzen mit den Oligonukleotiden eingeführt wurden, geschnitten und in gleichermaßen behandelten pQE60-Vektor ligiert. Nach Transformation von *E. coli* XL1Blue konnten die Expressionsplasmide pQE60-proA2, pQE60-pheA4, pQE60-asnA5, pQE60-glnA6 und pQE60-tyrA7 präpariert werden. Anschließend wurde der Expressionsstamm *E. coli* M15/pREP4 mit den Plasmiden transformiert und aus den so erhaltenen Stämmen die rekombinanten Proteine gewonnen (s. Methode 4.2.1 bis 4.2.3). Die C-terminal mit einem Appendix von sechs Histidinresten versehenen Proteine ProA2, PheA4, AsnA5, GlnA6 und TyrA7 befanden sich nach Zellaufschluß praktisch vollständig in der löslichen Proteinfraction. Ihre Bindungseigenschaften an die Ni²⁺-IMAC-Säule (Elution bei ca. 20-75 % Puffer B, s. 4.2-3) ermöglichte das Auftragen der Proteine auf die Säule bei einer Startkonzentration von 12 % Puffer B, wodurch eine stringente Aufreinigung erzielt werden konnte. In Abbildung 5.2-1 sind das typische Expressionsmuster am Beispiel von AsnA5 und die gereinigten fünf A-Domänen zu sehen. Das Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE stimmte dabei gut mit ihren berechneten Molekulargewichten überein.

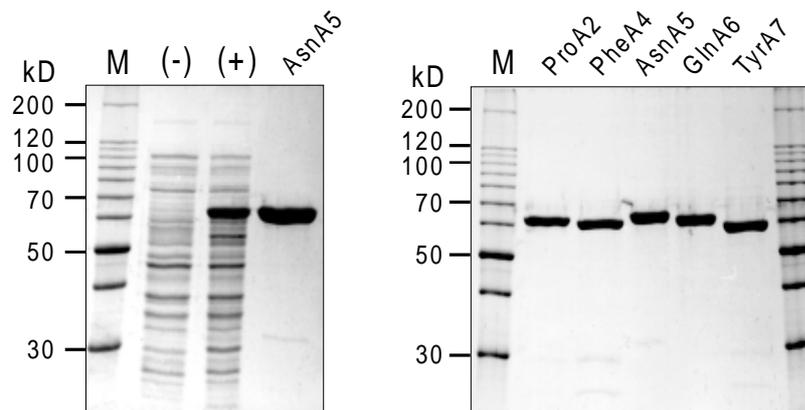


Abb. 5.2-1 Produktion rekombinanter A-Domänen in *E. coli*: Gezeigt sind Coomassie Blue-gefärbte SDS-Polyacrylamidgele: Links: Spur (-) und (+) *E. coli* Gesamtzellextrakt vor und nach Induktion der Überproduktion von AsnA5. Rechts: Gereinigte A-Domänen. M = Proteinmarker.

5.2.3 Biochemische Charakterisierung interner A-Domänen

5.2.3.1 Substratspezifität

Nach Aufreinigung, Dialyse gegen Assay Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTE, pH 8.0, s. 4.2.3) und Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die fünf A-Domänen ProA2, PheA4, AsnA5, GlnA6 und TyrA7 für biochemische Untersuchungen eingesetzt. Das angewendete Enzymassay „ATP/PP_i-Austausch“ (s. 4.2.4.1)

basiert auf der Reversibilität der von A-Domänen katalysierten Adenylierungsreaktion. So wird das Enzym mit den Substraten Aminosäure und ATP, dem Kofaktor Mg^{2+} und geringen Mengen an anorganischem Pyrophosphat $[^{32}P]-PP_i$ inkubiert. In der Rückreaktion kann $[^{32}P]-PP_i$ in ATP eingebaut werden, welches im Gegensatz zu PP_i an Aktivkohle absorbiert und so abgetrennt werden kann. Die Aktivität der A-Domänen kann also in Abhängigkeit der zugegebenen Aminosäure durch die Inkorporation von ^{32}P in mit Aktivkohle extrahierbares Material gemessen werden.

Alle fünf A-Domänen zeigten in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Substrataminosäuren katalytische Aktivität im „ATP/ PP_i -Austausch“. Um ihre Substratspezifitäten aufzuklären, wurde alle in den Tyrocidinen A-D vorkommenden Aminosäuren als Substrate getestet (in den Tyrocidinen B-D wird Tryptophan an den Positionen 3, 4 und 7 eingebaut, s. 2.3.1). Dabei wurden die Substrate, ATP und Aminosäure, in gesättigten Konzentrationen eingesetzt (5 mM ATP, 2 mM aa), und in einem 100 μ L Ansatz mit 30 pmol (PheA4, TyrA7), 60 pmol (ProA2) bzw. 300 pmol (AsnA5, GlnA6) der A-Domänen 15 min bei 37°C in Assay-Puffer mit 2 mM $MgCl_2$ inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Transfer auf Eis und Zugabe von 0,5 ml kaltem Terminationsmix gestoppt. Die Aktivkohle wurde durch Filtration vom Reaktionsansatz getrennt, zweimal mit dH_2O gewaschen, und ihr Gehalt an ^{32}P gemessen. In Abbildung 5.2-2 sind die so erhaltenen Werte zur Substratspezifität der A-Domänen graphisch dargestellt.

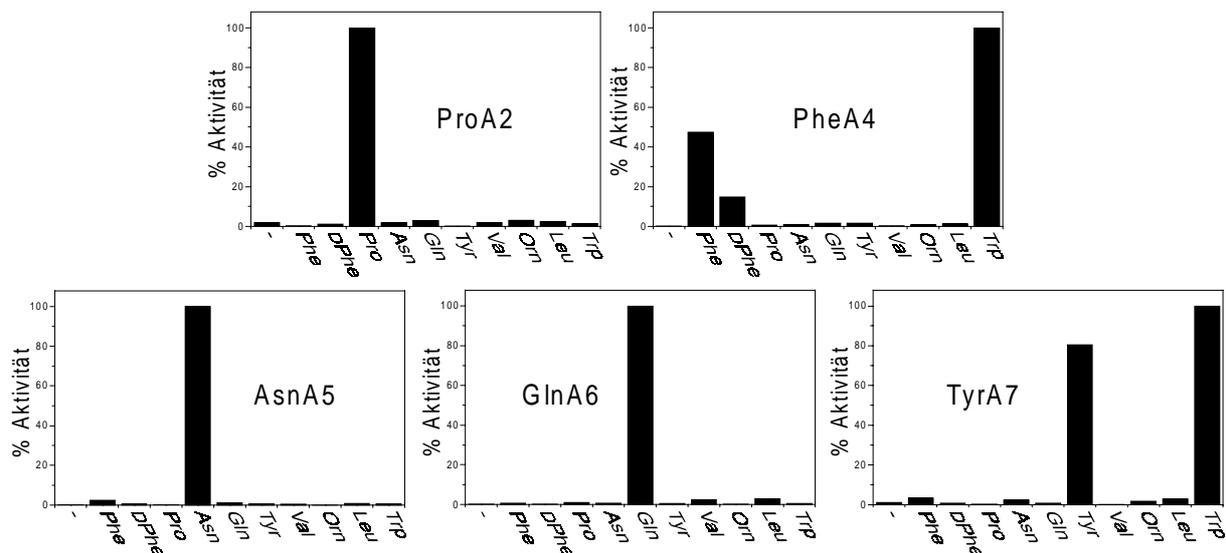


Abb. 5.2-2 Substratspezifität der rekombinanten A-Domänen: Für die fünf A-Domänen wurde der Umsatz in der ATP/ PP_i -Austauschreaktion in Abhängigkeit verschiedener Aminosäuren gemessen. Der jeweils höchste Wert wurde als 100 % gesetzt. Unspezifische Werte lagen unter 0,1-1 %.

Jede der fünf untersuchten A-Domänen zeigte eine ihrer Position innerhalb der Tyrocidin Synthetasen entsprechende Aminosäurespezifität. Dies bestätigte das Kolinearitätsprinzip mit einem neuen experimentellen Ansatz. Bemerkenswert ist, daß Tryptophan das bevorzugte Substrat von PheA4 und TyrA7 war, und nicht, wie die Primärstruktur von Tyrocidin A vermuten ließ, Phenylalanin bzw. Tyrosin. Mit dieser relativen Unspezifität mancher A-Domänen schien die Erklärung für die verschiedenen natürlich vorkommenden Tyrocidine A-D gefunden worden zu sein.

Vor allem aber war es gelungen, interne Fragmente der Tyrocidin Synthetasen TycB und TycC als lösliche und funktionell eigenständige Proteine zu isolieren. Um den Vergleich mit den intakten Wildtyp-Enzymen noch weiterzuführen, wurden für die fünf A-Domänen auch die K_m -Werte für ihre Substrate, Aminosäure und ATP, bestimmt.

5.2.3.2 K_m -Wert-Bestimmung

Zur K_m -Wert-Bestimmung wurde nach der von Kittelberger *et al.* beschriebenen Methode verfahren [Kittelberger *et al.*, 1982]. Dabei werden die Konzentrationen beider Substrate, Aminosäure und ATP, unabhängig voneinander unterhalb der Sättigungsgrenze variiert und durch eine doppelt reziproke Auftragung für beide die K_m -Werte erhalten. Die Enzymassays wurden in 100 μ L Ansätzen mit 30 pmol (PheA4 und TyrA7), 60 pmol (ProA2) bzw. 300 pmol (AsnA5 und GlnA6) Enzym in Assay Puffer mit 2 mM $MgCl_2$ für 15 min bei 37°C inkubiert und wie oben beschrieben aufgearbeitet (s. Methode 4.2.4.1). In Abbildung 5.2-3 sind Ergebnisse am Beispiel von TyrA7 mit den Substraten L-Tyr und ATP graphisch dargestellt. Tabelle 5.2-2 führt die Werte für alle fünf A-Domänen auf.

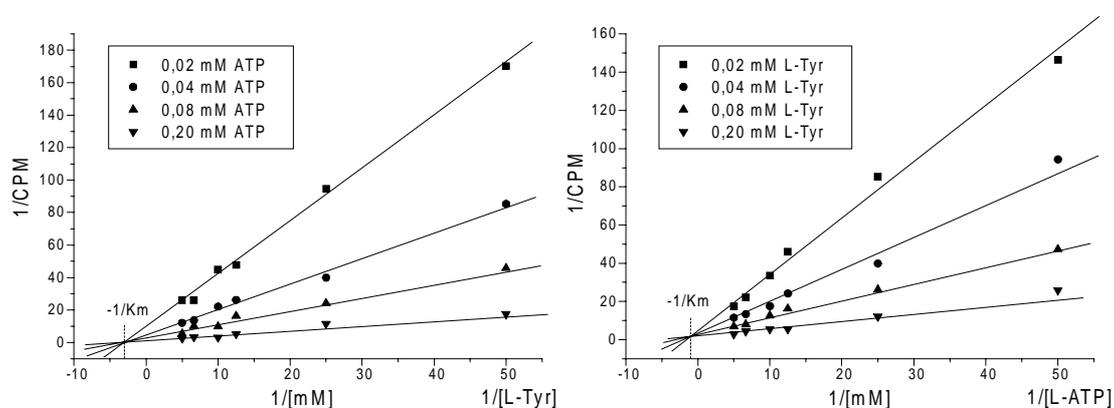


Abb. 5.2-3 Bestimmung der K_m -Werte am Beispiel von TyrA7: Doppelt reziproke Auftragung der ATP/PP_i-Austauschaktivität gegen Substratkonzentration. In der linken Darstellung ist die Bestimmung des K_m (L-Tyr) abgebildet, rechts die Bestimmung von K_m (ATP).

Tabelle 5.2-2 K_m-Werte der A-Domänen

A-Domäne	Substrate (Aminosäure)	K _m (mM)	
		Aminosäure	ATP
ProA2	LPro	0,35 ± 0,10	0,9 ± 0,3
PheA4	LPhе	0,45 ± 0,10	1,2 ± 0,3
	LTrp	0,08 ± 0,05	1,0 ± 0,3
AsnA5	LAsn	0,85 ± 0,20	1,7 ± 0,3
GlnA6	LGln	0,70 ± 0,20	1,9 ± 0,3
TyrA7	LTyr	0,30 ± 0,10	1,0 ± 0,3
	LTrp	0,10 ± 0,05	0,6 ± 0,2

Mit den K_m-Werten bestätigte sich der Befund, daß L-Tryptophan das bevorzugte Substrat für PheA4 und TyrA7 war. Außerdem zeigte sich, daß die K_m-Werte der internen isolierten A-Domänen in der gleichen Größenordnung lagen wie es für die Wildtyp-Enzyme TycA [Pfeifer *et al.*, 1995], GrsA [Stachelhaus & Marahiel, 1995b] und GrsB [Kittelberger *et al.*, 1982] berichtet wurde. Dies unterstützte die Interpretation, daß interne A-Domänen multimodularer Peptidsynthetasen als eigenständig katalytische Einheiten aktiv sein können [Mootz & Marahiel, 1997b].

5.2.4 Zusammenfassung der Charakterisierung des *tyc*-Operons

Ausgehend vom bereits klonierten *tycA* und 5'-Ende von *tycB* wurde das gesamte Tyrocidin Biosyntheseoperon kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse von zwei Genen, *tycB* und *tycC*, spricht dafür, daß die Gene für die multimodularen Tyrocidin Synthetasen TycB und TycC identifiziert wurden. *tycB* kodiert für drei Peptidsynthetase-Module mit einer Epimerase-Domäne am dritten Modul. Das riesige Genprodukt von *tycC* besteht aus sechs Modulen, von denen das letzte eine Terminations-Domäne enthält. Daß es sich bei *tycB* und *tycC* um die Tyrocidin Biosynthesegene handelt wird weiter durch die biochemische Charakterisierung untermauert. Fünf interne Fragmente, die Adenylierungsdomänen der Positionen 2, 4, 5, 6 und 7 kodierend, konnten rekombinant in *E. coli* exprimiert werden und lieferten lösliche und katalytisch aktive Proteine. Durch die Bestimmung ihrer Aminosäurespezifitäten konnte gezeigt werden, daß die Reihenfolge der A-Domänen der Tyrocidin Synthetasen mit der Primärstruktur des Produktes Tyrocidin übereinstimmt. Das Auftreten der Tyrocidine B-D, in denen Phenylalanin und Tyrosin durch Tryptophanreste substituiert sind,

konnte durch die Substratvariabilität der entsprechenden A-Domänen erklärt werden. Schließlich lieferte die katalytische Eigenständigkeit der isolierten A-Domänen einen interessanten Beitrag zum Verständnis des Organisationsprinzips multifunktionaler Peptidsynthetasen. Eine wichtige Erkenntnis für die weiteren Arbeiten war auch die erfolgreiche Überproduktion rekombinanter Fragmente der Tyrocidin Synthetasen in *E. coli*.

5.3 Die Initiation der Tyrocidinbiosynthese - Entwicklung eines Systems zur Untersuchung der Elongationsreaktion *in vitro*

5.3.1 Strategie

Die biochemische Charakterisierung einzelner Adenylierungsdomänen zeigte die katalytische Eigenständigkeit von Domänen auf, die aus dem multifunktionalen Enzymverband isoliert wurden. Diese Ergebnisse untermauern die Modellvorstellung, daß Peptidsynthetasen als eine Aneinanderkettung von semiautonomen katalytischen Einheiten, den Modulen und Domänen, betrachtet werden können. Das Zusammenspiel der Domänen ergibt sich aus den Komponenten eines Moduls, und das Zusammenspiel der Module aus ihrer Reihenfolge innerhalb der multimodularen Peptidsynthetase. Die höchste Organisationsebene, in Multienzymsystemen wie den Tyrocidinsynthetasen, wird schließlich durch die Erkennung der Peptidsynthetasen untereinander bestimmt.

Die Domäne, die für die Bildung einer Peptidbindung zwischen den als Thioester aktivierten Acylresten zweier aufeinanderfolgender Module verantwortlich ist, war zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht experimentell definiert. Durch Sequenzanalysen konnte jedoch ein ca. 450 aa großer Bereich, der neben den A- und T-Domänen [Stachelhaus *et al.*, 1996a] integraler Bestandteil der repetitiven Elongationsmodule ist, für diese Funktion postuliert werden. Diese putative Kondensations(C)-Domäne enthält zudem ein hochkonserviertes Sequenzmotiv (HHxxxDG), das man auch in Enzymen findet, die verschiedene Reste von oder auf CoA oder holo-ACP transferieren (s. 2.2.4).

Die Schwierigkeit der Untersuchung des Elongationsprozesses der nichtribosomalen Peptidbiosynthese liegt maßgeblich in der Komplexität der Systeme begründet. Die Tyrocidin

Synthetasen müssen zehn Peptidbindungen knüpfen. Zudem sind die Enzyme sehr empfindlich und von enormer Größe und daher technisch nur sehr schwer zu handhaben. Das Ziel mußte daher die Entwicklung eines möglichst einfachen Systems aus rekombinanten und verkürzten Peptidsynthetasen sein, das idealerweise nur eine einzige Peptidbindung knüpft. Mit der damaligen Entdeckung der 4'-Phosphopantethein Transferasen, die die posttranslationelle Modifikation von Peptidsynthetasen durchführen, war die Möglichkeit gegeben, in *E. coli* produzierte rekombinante Enzyme in der aktiven holo-Form zu erhalten [Lambalot *et al.*, 1996; Ku *et al.*, 1997].

5.3.2 Das Minimalsystem TycA/ProCAT bzw. GrsA/ProCAT[‡]

Das in den Kapiteln 5.3.2 bis 5.3.5 beschriebene Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Torsten Stachelhaus und Herrn Veit Bergendahl durchgeführt [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Der Anteil dieser Arbeit besteht hauptsächlich in der Konzipierung des Enzymsystems, der Konstruktion der Expressionsvektoren und den biochemischen Untersuchungen der verschiedenen Modulfragmente von ProCAT[‡], sowie der Beteiligung an der prinzipiellen funktionellen Etablierung des Systems GrsA/ProCAT[‡] (die Bezeichnung „[‡]“ dient zur Unterscheidung mit dem in Abschnitt 5.4 beschriebenen Protein ProCAT, das gegenüber ProCAT[‡] einen verkürzten C-Terminus aufweist). Im Rahmen des im nächsten Kapitel 5.4 beschriebenen Projektes wurde das System TycA/ProCAT etabliert und einige Untersuchungen zur Substratspezifität durchgeführt (s. 5.3.6).

An das ideale Minimalsystem zur Untersuchung der Elongationsreaktion von Peptidsynthetasen wurden zwei Forderungen gestellt: (1) Es sollte nur eine C-Domäne enthalten, bzw. die Bildung nur einer Peptidbindung katalysieren. (2) Das entstandene Dipeptid sollte vom Enzymkomplex abgespalten werden, so daß das System wieder frei für einen neuen Katalysezyklus ist. Dadurch würde die Produktanalytik erheblich vereinfacht werden. Mit der Wahl eines aus den Tyrocidin- bzw. Gramacidin S Synthetasen bestehenden Systems wurde sich zudem eine auch im natürlichen System bestehende Initiationsreaktion zunutze gemacht: DPhe wird von TycA bzw. GrsA auf LPro übertragen, welches auf dem ersten Modul von TycB bzw. GrsB gebunden ist. Das entstandene Dipeptid DPhe-Pro wird dann üblicherweise zum darauffolgenden Modul weitergereicht, infolge dessen die enzymgebundenen Tripeptide DPhe-Pro-Phe (Tyrocidin) bzw. DPhe-Pro-Val (Gramacidin S) gebildet werden. Steht aber die Substrataminosäure für das dritte Modul nicht zur Verfügung,

bzw. ist das dritte Module gar nicht vorhanden, weil mit proteolytischen Fragmenten von TycB [Lee *et al.*, 1973] bzw. GrsB [Kurotsu *et al.*, 1991] gearbeitet wurde, so spaltet sich das Dipeptid als zyklisches DPhe-Pro-Diketopiperazin vom Enzym ab. Diese spontane Reaktion, die durch den nukleophilen Angriff der Aminogruppe des Phenylalanylrestes auf die als Thioester aktivierte Carbonylfunktion des Prolylrestes zustande kommt (s. auch Abb. 5.3-4), ist nicht enzymkatalysiert. Sie wird durch den hohen Anteil an in cis-Konformation vorliegender Peptidbindungen in prolinhaltigen Peptiden begünstigt [Weiss *et al.*, 1998].

Somit sollten die Module TycA und TycB1, nachfolgend ProCAT[‡] genannt, als rekombinante Enzyme in *E. coli* produziert und für die Etablierung eines Assays der Initiationsreaktion eingesetzt werden. Schwierigkeiten in der Konstruktion des TycA-Vektors führten dazu, daß GrsA herangezogen wurde. Für GrsA wurde berichtet, daß es TycA in der Tyrocidinbiosynthese *in vitro* ersetzen kann [Fujikawa *et al.*, 1971]. Schließlich wurden einige Domänendeletionsfragmente von GrsA (nachfolgend PheATE genannt) und ProCAT[‡] verwendet (s. Abb. 5.3-1).

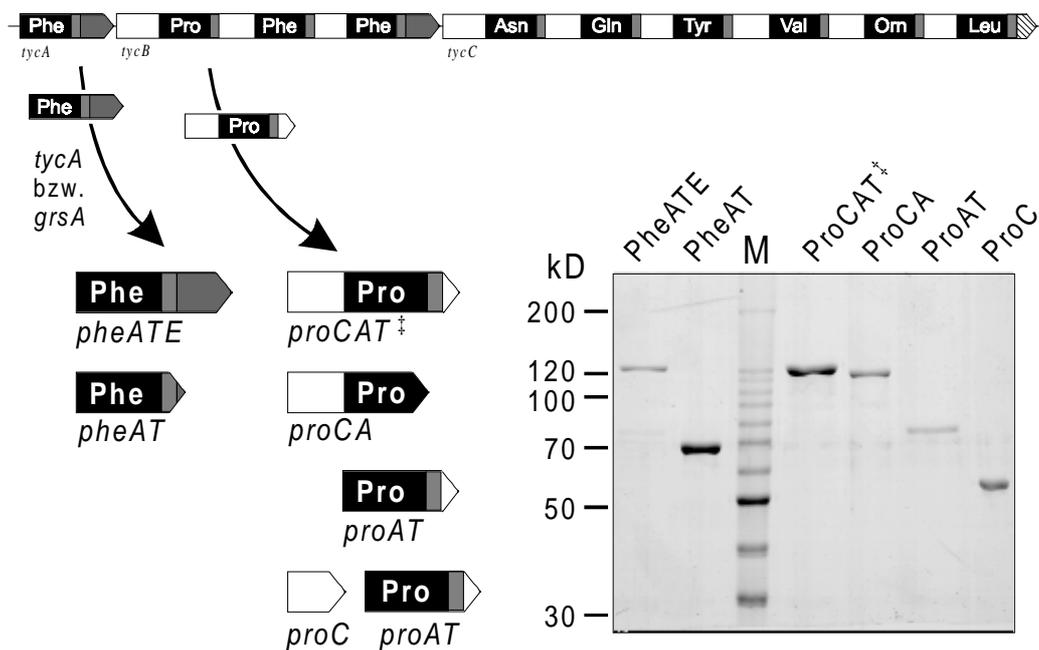


Abb. 5.3-1 Das TycA bzw. GrsA/ProCAT[‡] Minimalssystem: Die Genfragmente, die den ersten beiden Modulen der Tyrocidinsynthetasen bzw. GrsA entsprechen, wurden als rekombinante Proteine exprimiert. Gezeigt sind weiterhin, in der Skizze und in einem Coomassie-Blue gefärbten SDS-Polyacrylamidgel als aufgereinigte Proteine, die Domänendeletionsmutanten von GrsA(PheATE) und ProCAT[‡].

5.3.3 Konstruktion der Expressionsvektoren und Reinigung der rekombinanten Proteine

Das dem ersten Modul von TycB entsprechende DNA-Fragment *proCAT*[‡] sowie die einer Verkürzung um die für die T-, C- bzw. AT-Domäne entsprechenden Bereiche wurden mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide (s. Anhang Tab 7.1) durch PCR amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Nco* I und *Bam* HI geschnitten und in ebenso präparierte pQE60-Vektoren ligiert. Nach Transformation von *E. coli* XL1-Blue und Plasmidpräparation wurden die Expressionsvektoren pQE60-*proCAT*[‡], pQE60-*proCA*, pQE60-*proAT* und pQE60-*proC* erhalten. Die Vektoren pQE60-*proCAT*[‡] und pQE60-*proAT* wurden zur Expression in *E. coli* BL21/pREP4-*gsp* transformiert. Das Plasmid pREP4-*gsp* wurde von Herrn Sascha Dökel konstruiert [Dökel & Marahiel, 1997]. Es ermöglicht die Koexpression des Gens *gsp*, das für die P_{ant}-Transferase des Gramicidin S Biosynthesesystems kodiert, unter Kontrolle des T7-Promotors [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Somit können Peptidsynthetasefragmente direkt während der Produktion in *E. coli* in die aktive holo-Form überführt werden. pQE60-*proCA* und pQE60-*proC* wurden zur Expression in *E. coli* M15/pREP4 transformiert.

Die Aufreinigung der mit einem C-terminalen His₆-tag versehenen Proteine ProCAT[‡], ProCA, ProAT und ProC wurde nach dem Standardverfahren (s. 4.2.3) durchgeführt (s. Tab. 5.3-1 für relevante Daten zu den rekombinanten Proteinen). Alle rekombinanten Proteine waren nach Expression in *E. coli* nahezu vollständig löslich, lediglich im Falle von ProCAT[‡] verblieben ca. 50 % des rekombinanten Proteins in der unlöslichen Fraktion.

Tabelle 5.3-1 Daten zu den rekombinanten Proteinen des Dipeptidsystems

A-Domäne	aus	Positionsangaben*		Länge (aa)	Molekular- gewicht (kDa)	Extinktions- koeffizient bei 280 nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Konzentrations- umrechnung: 1 A(280 nm) entspricht mg/ml
		N-Terminus	C-Terminus				
PheATE	GrsA	1	1099 + H ₆	1108	127,828	138690	0,92
PheAT	GrsA	1	654 + H ₆	664	75,930	83120	0,91
ProCAT [‡]	TycB	1	1095 + H ₆	1104	125,241	97350	1,29
ProCA	TycB	1	990 + H ₆	999	113,711	90830	1,25
ProAT	TycB	442 + M	1095 + H ₆	664	74,482	44100	1,69
ProC	TycB	1	466 + H ₆	475	54,718	54530	1,00

* M = plus Startmethionin; H₆ = plus Hexahistidin-Appendix

5.3.4 Test der enzymatischen Einzelaktivitäten

Vor dem Einsatz der Enzymfragmente für Versuche zur Bildung der Peptidbindung wurden die enzymatischen Einzelaktivitäten der Domänen getestet. Dabei zeigte sich, daß in allen Fällen die A-Domäne in ATP/PP_i-Austauschreaktion aktiv war (s. 4.3.4.1), bei PheATE und PheAT in Abhängigkeit von LPhe und DPhe, bei ProCAT[‡], ProCA und ProAT in Abhängigkeit von LPro. Die gefundenen Aktivitäten waren für PheATE und PheAT bzw. ProCAT[‡], ProCA und ProAT praktisch identisch (siehe Kapitel 5.4.4.1 für eine ausführlichere Beschreibung der Aktivitäten von TycA und ProCAT). Die Modifikation der rekombinanten Peptidsynthetasefragmente mit dem Kofaktor Ppant und die Bildung des Thioesters mit der kognaten Aminosäure wurde mit dem sogenannten Beladungsassays gemessen (s. 4.2.4.2). Hier konnte der Effekt der Koexpression der Peptidsynthetasefragmente mit der Ppant-Transferase Gsp beobachtet werden: Ohne Gsp wurde etwa 1-5 % Thioesterbildung, mit Gsp wurden bei allen hier untersuchten Proteinen, die eine T-Domäne enthielten, ca. 60-100 % Thioesterbildung festgestellt. Dabei trat eine Varianz von ca. ± 20 % in Abhängigkeit der Enzympräparation auf. Abbildung 5.3-2 zeigt die Zeitabhängigkeit der Bildung des Thioesters der rekombinanten Proteine holo-PheATE und holo-ProCAT[‡]. Mit diesen Ergebnissen war die Aktivität der A- und T-Domänen gesichert. Auf eine gesonderte Aktivitätsbestimmung der E-Domäne von PheATE wurde verzichtet.

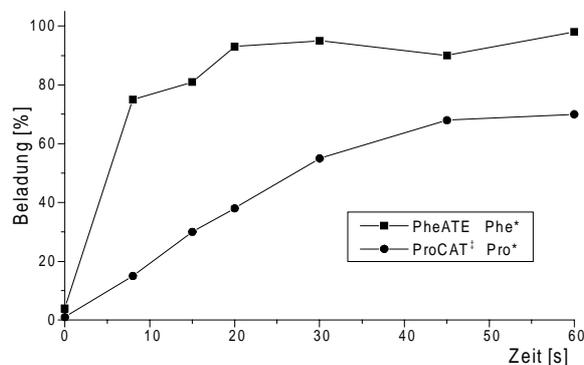


Abb. 5.3-2 Bindung der Substrataminosäure durch PheATE und ProCAT[‡]: Zeitabhängigkeit der Thioesterbildung von PheATE(GrsA) mit [¹⁴C]-Phe und ProCAT[‡] mit [³H]-Pro.

5.3.5 Charakterisierung der Elongationsreaktion und Produktnachweis

Um zu verfolgen, ob das von PheATE aktivierte und epimerisierte LPhe auf das von ProCAT[‡] als Thioester gebundene LPro übertragen werden konnte, und ob das so gebildete Dipeptid sich unter intramolekularer Zyklisierung abspaltete, wurde zunächst mit radioaktiv markierten Aminosäuren gearbeitet (vergl. 4.2.4.3). Je 50 pmol PheATE und ProCAT[‡]

wurden in einem 100 μL Ansatz in Assay Puffer mit 2 mM ATP, 10 mM MgCl_2 und 2 mM DTE bei 37°C inkubiert. Dabei wurden entweder L-[^3H]-Phe und 0,5 mM unmarkiertes LPro (Ansatz 1), oder L-[^3H]-Pro und 0,5 mM unmarkiertes LPhe (Ansatz 2) zugesetzt. Zur Aufarbeitung wurden 400 μL dH_2O zugegeben und das Reaktionsgemisch mit zweifachem Volumen n-Butanol/Chloroform (4:1 (v/v)) extrahiert [Lee & Lipmann, 1977]. Die organische Phase wurde einmal mit 0,5 mL 0,1 M NaCl-Lösung gewaschen und entweder zum Messen der Radioaktivität oder nach Einengen bis zur Trockne und Wiederaufnahme in 20 μL dH_2O /Ethanol (1:1 (v/v)) zur Dünnschichtchromatographie verwendet. Es konnte unter diesen Bedingungen in beiden Ansätzen (radiomarkiertes LPhe oder LPro) eine etwa lineare Zunahme der Radioaktivität in der organischen Phase innerhalb einer Zeitspanne von 30 min beobachtet werden. Dagegen fand keine nennenswerte Zunahme der Radioaktivität in der organischen Phase in den Kontrollansätzen statt, in denen die zweite Aminosäure, ATP oder das zweite Enzym fehlten. Die Autoradiographie der mit Laufmittel I (Essigsäureethylester/Pyridin/Essigsäure/ dH_2O ; 90:30:9:16 (v/v)) entwickelten Dünnschichtchromatographie zeigte, daß mehr als 90 % der Radioaktivität in einer Bande mit dem R_f -Wert von ca. 0,80-0,85 vereinigt waren. Diese Bande wies zudem in der mit markiertem LPhe bzw. markiertem LPro durchgeführten Ansätzen das gleiche Laufverhalten auf. Die sehr gute Übereinstimmung mit dem von Lee und Lipmann beschriebenen R_f -Wert von 0,85-0,90 schien zu belegen [Lee & Lipmann, 1977], daß das vorhergesagte DPhe-Pro-Diketopiperazine gebildet worden war und somit das System bimodulare System PheATE/ProCAT ‡ für die Untersuchung der Peptidbindungsbildung geeignet war. Das Produkt konnte nach Durchführung eines präparativen Ansatzes durch Vergleich mit einem chemisch synthetisierten Standard mittels HPLC-Analyse (siehe auch Abb. 5.3-5) und Massenspektroskopie ($M^+ = 245$) eindeutig als DPhe-Pro-DKP identifiziert werden.

Weitere Unterstützung für den postulierten Reaktionsablauf konnte durch die Zeitabhängigkeit der TCA-präzipitierbaren L-[^3H]-Phe Radioaktivität gesammelt werden. Dazu wurde PheATE 3 Minuten mit L-[^3H]-Phe präinkubiert und mit ProCAT ‡ versetzt, welches seinerseits mit unmarkiertem LPro präinkubiert worden war. Anschließend wurden dem Reaktionsgemisch zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots entnommen, die dem Beladungsassay entsprechend aufgearbeitet wurden (s. 4.2.4.2). In Abbildung 5.3-3 ist der nach Zugabe von ProCAT ‡ zu beobachtende Anstieg des radioaktiv markierten TCA-präzipitierbaren Materials, und der darauf folgende Abfall zu sehen. Im Vergleich dazu blieb ohne ProCAT-Zugabe die TCA-präzipitierbare Radioaktivität konstant. Der Anstieg läßt sich mit dem

Transfer von radioaktiv markiertem Phe auf ProCAT[‡] und der gleichzeitig in schneller Reaktion erfolgenden Neubeladung von PheATE mit radioaktiv markiertem Phe erklären. Schließlich kommt es zu einem Abfall, da sich das gebildete Dipeptid unter Zyklisierung von ProCAT[‡] abspaltet und das in nur dreifachem Überschuß vorliegende markierte Phe in der Reaktion verbraucht wurde.

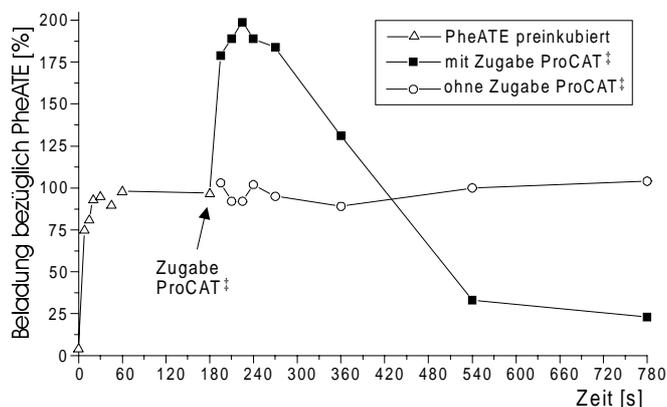


Abb. 5.3-3 Zeitabhängigkeit der Produktbildung durch PheATE/ProCAT[‡]: Das Minimalsystem PheATE/ProCAT[‡] wurde mit L-[¹⁴C]-Phe (3facher molarer Überschuß gegenüber den Enzymen), LPro und ATP inkubiert. Es ist die TCA-präzipitierbare Zählrate in Zeitabhängigkeit dargestellt.

Die Durchführung der Messungen mit allen Kombinationen der um einzelne Domänen verkürzten Fragmente von PheATE und ProCAT[‡] erbrachte die Erkenntnis, daß das System in dieser Weise nicht weiter zu minimieren war. Den eindeutigsten Beweis für die katalytische Rolle der C-Domäne von ProCAT lieferte schließlich das von Herrn Dr. Torsten Stachelhaus konstruierte Enzym ProCAT[‡](H147V), welches eine Aminosäuresubstitution des zweiten His nach Val im hochkonservierten HHxxxDG Motiv der C-Domäne enthielt. Auch dieses Enzym war nicht in der Lage die Bildung des Dipeptides zu katalysieren [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Abbildung 5.3-4 stellt die zum Dipeptid führende Reaktion schematisch dar.

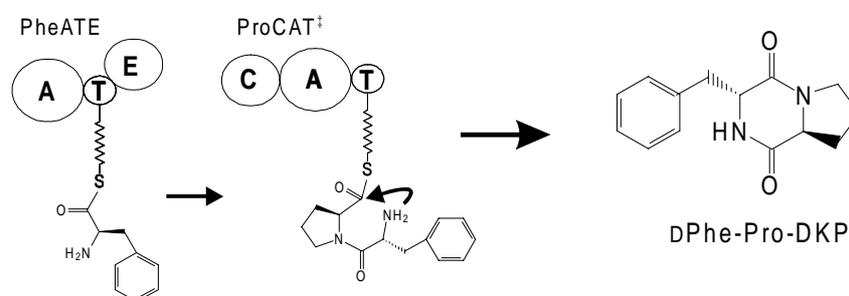


Abb. 5.3-4 Produktbildung des Minimalsystems PheATE/ProCAT[‡]: Schematische Darstellung der Übertragung von durch PheATE gebundenen und epimerisierten Phe auf an ProCAT[‡] gebundenes Pro. Eine intramolekulare Zyklisierung führt zur Abspaltung des Produktes DPhe-Pro-DKP.

5.3.6 Substratvariabilität des Minimalsystems TycA/ProCAT

Im Rahmen der Arbeiten des im Abschnitt 5.4 beschriebenen Projekts wurden ein Expressionsvektor für TycA (pQE60-tycA) sowie ein neuer Expressionsvektor für ProCAT konstruiert (pQE60-proCAT, siehe 5.4.2 und 5.4.3). Die präparierten Enzyme TycA und ProCAT (eingehendere enzymatische Charakterisierung siehe 5.4.4.1 und 5.4.4.3) waren analog zu den oben beschriebenen PheATE/ProCAT[‡] in der Lage, DPhe-Pro-DKP zu synthetisieren. Das Produkt wurde nach organischer Extraktion des Reaktionsansatzes mittels HPLC und Vergleich mit einem chemisch synthetisierten Standard identifiziert (Versuchsdurchführung s. 4.2.4.3). Von dem so etablierten System TycA/ProCAT wurde die Substratvariabilität mit einigen anderen Aminosäuren gemessen. Die Produktanalytik blieb dabei auf HPLC-Analyse beschränkt (s. Abb. 5.3-5).

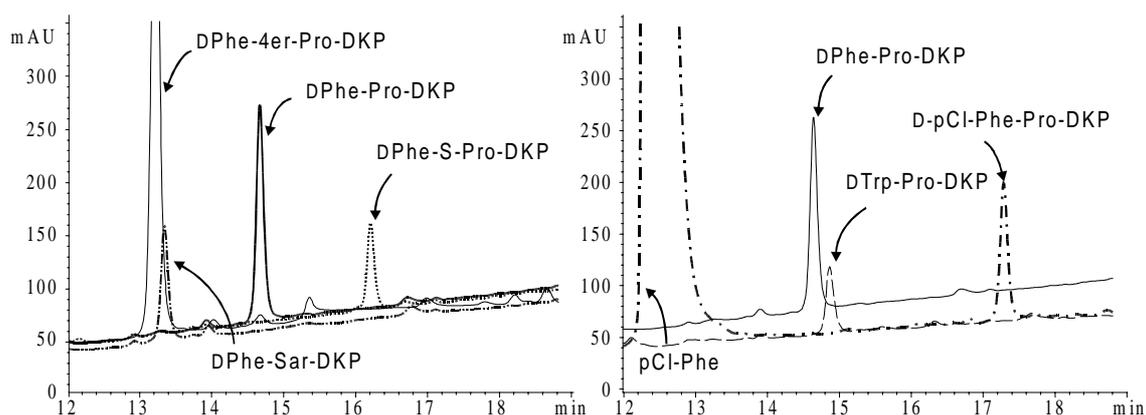


Abb. 5.3-5 Substrattoleranz des TycA/ProCAT Systems: HPLC-Analyse der durch organische Extraktion gewonnenen Produkte. Detektion der Verbindungen bei 214 nm. Das Enzymsystem TycA/ProCAT wurde mit verschiedenen Aminosäuresubstraten inkubiert. Eine Substitution von LPhe durch LTyr oder LLeu führte unter diesen Bedingungen nicht zu nachweisbaren Produkten. 4er-Pro = (S)-Azetidin-2-carbonsäure; S-Pro oder Thio-Pro = (R)-1,3-Thiazolidin-4-carbonsäure; Sar = Sarkosin.

TycA zeigte in der Adenylierungsreaktion geringe Nebenspezifitäten für die Aminosäuren p-Cl-LPhe, LTrp, LLeu und LTyr (s. 5.4.4.1). Die in Abbildung 5.3-6 dargestellten Iminosäuren Sar, 4er-Pro, Thio-Pro wurden von ProCAT als Substrat akzeptiert (s. 5.4.4.1). In Abbildung 5.3-5 sind die HPLC-Analysen der Dipeptid Assays dargestellt. Neue Produkte wurden in den Ansätzen mit den Substraten p-Cl-LPhe/Pro, LTrp/Pro sowie Phe/Sar, Phe/4er-Pro und Phe/Thio-Pro erhalten. Ihrer Hydrophobizität entsprechenden gegenüber DPhe-Pro-DKP veränderten Retentionszeiten, sowie ihre Präsenz in der organischen Phase (die linearen Dipeptide hätten unter den verwendeten Bedingungen in der

wässrigen Phase zu finden sein müssen) ließen gesichert erscheinen, daß es sich um die Diketopiperazine handelte. Lediglich in den Ansätzen, in denen LPhe durch LLeu bzw. LTyr substituiert wurde, konnten mit dieser Methode keine neuen Produkte nachgewiesen werden. Daraus ließ sich zumindest schließen, daß LLeu bzw. LTyr bestenfalls deutlich schlechter von dem System TycA/ProCAT zur DKP-Synthese verwendet werden konnten.

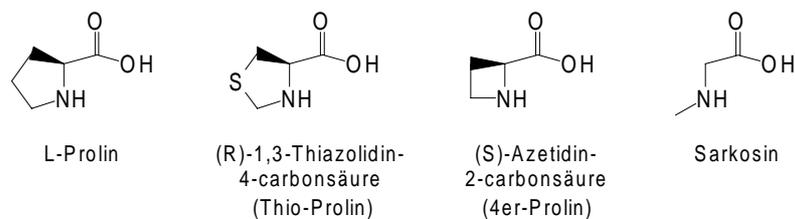


Abb. 5.3-6 Von ProCAT akzeptierte Substratanaloga: Die Iminosäuren (R)-1,3-Thiazolidin-4-carbonsäure (Thio-Pro oder S-Pro), (S)-Azetidin-2-carbonsäure (4er-Pro) und Sarkosin wurden von ProCAT als Substrat erkannt.

5.3.7 Einfluß von DPhe-Pro-DKP auf *E. coli* Zellen

In Vorbereitung einer Integration des TycA/ProCAT Systems in einen geeigneten *E. coli* Stamm zur *in vivo* Produktion von DPhe-Pro-DKP sollte getestet werden, ob *E. coli* dieses Produkt metabolisieren kann, bzw. ob es einen toxischen Effekt auf *E. coli* hat. Zu diesem Zweck wurde der *E. coli* K-Stamm NK5525 (vom *E. coli* Genetic Stock Center; <http://cgsc.biology.yale.edu>; CGSC# 6169) verwendet, der eine Transposoninsertion in den Prolinbiosynthesegenen *proA* oder *proB* trägt und somit Prolin-auxotroph ist (relevanter Genotyp: *pro-81::Tn10*). Um in einem definierten genetischen Hintergrund zu arbeiten, wurde der *Pro*⁻-Genotyp mittels P1-Phagen in den *E. coli* Referenzstamm K-12 MG1655 [Blattner *et al.*, 1997] transduziert. Dazu wurde ein P1-Phagenlysat von NK5525 hergestellt, welches zur Infektion von MG1655 verwendet wurde. Tetracyclin resistente Kolonien wurden vereinzelt und auf festem Minimalmedium M9 mit den Zusätzen LPro und LArg (je 1 mM) an das Minimalmedium adaptiert. Dann erfolgte das Umstreichen der Zellen auf die Testplatten mit LPro, LPro plus LArg, DPhe-Pro-DKP, LPhe-Pro-DKP, DPhe-Pro und LPhe-Pro (jeweils 1 mM). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Wachstum der Zellen festgestellt, wie in Tabelle 5.3-2 gezeigt.

Tabelle 5.3-2 Wachstum von *E. coli* Stämmen auf Minimalmedium M9 mit verschiedenen Zusätzen

Zusatz in M9- Minimalmedium (1 mM)	<i>E. coli</i> MG1655	<i>E. coli</i> NK5525 (<i>pro-81::Tn10</i>)	<i>E. coli</i> MG1655 (<i>pro-81::Tn10</i>)
-	+	-	-
LPro	+	+	+
LPro, LArg	+	+	+
DPhe-Pro	+	-	-
LPhe-Pro	+	+	+
DPhe-Pro-DKP	+	-	-
LPhe-Pro-DKP	+	-	-

Aus diesen Untersuchungen ließ sich schließen, daß *E. coli* nicht in der Lage war, exogenes DPhe-Pro-DKP, LPhe-Pro-DKP und DPhe-Pro als Prolin-Quelle zu verwenden. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob dies auf fehlenden Transport- und/oder Metabolismusfunktionen beruhte. LPhe-Pro konnte dagegen sowohl aufgenommen, als auch metabolisiert werden. Der *E. coli* Wildtypstamm MG1655 war unter diesen Bedingungen nicht sensitiv gegenüber den getesteten Verbindungen.

5.4 Konstruktion von Hybridpeptidsynthetasen durch Modulfusionen

5.4.1 Strategie

Wie in den Kapiteln 5.2 und 5.3 beschrieben, konnten in dieser Arbeit enzymatische Einzelaktivitäten von multifunktionellen Peptidsynthetasen auf zwei verschiedenen logistischen Ebenen aus dem Megaenzymverband isoliert werden, ohne dabei ihre katalytischen Aktivitäten einzubüßen. So sind erstens isolierte A-Domänen in der Adenylierungsreaktion funktionell eigenständig. Zweitens konnte gezeigt werden, daß ein isoliertes Modul aus TycB, ProCAT, offensichtlich alle Aktivitäten enthält, um ein funktionelles Zusammenspiel mit einem benachbarten Modul, TycA, zu bewerkstelligen, d.h. von diesem das dort bereitgestellte Intermediat zu übernehmen und durch Kondensation mit dem eigenen aktivierten Substrat um eine Aminosäure zu verlängern. Beide Beobachtungen

unterstützten die durch Primärstrukturanalysen naheliegende Modellvorstellung, daß die katalytischen Zentren der multifunktionellen Peptidsynthetasen nach einer Regel zum Einsatz an der wachsenden Peptidkette kommen, die schlicht ihrer Anordnung vom N- zum C-Terminus innerhalb dieser Megaenzyme entspricht. Man könnte somit auch das Bild der Perlen auf der Kette benutzen. Die Peptidsynthese beginnt bei der ersten Perle, die die N-terminale Aminosäure einbaut, und endet bei der letzten, die das fertige Produkt abspaltet. Entwickelt man diesen Gedanken noch einen Schritt weiter, so könnte man auch postulieren, daß die Perlen in ihrer Reihenfolge beliebig austauschbar sein müßten. Wäre also auch der Umkehrschluß richtig, daß nicht nur die Reihenfolge der Module die Primärstruktur des Produktes determiniert, sondern auch die Synthese eines anderen Produktes durch Umstellung derselben Module erreicht werden könnte? Würde ein durch Fusion künstlich umpositioniertes Modul das Peptidintermediat des vorherigen Moduls übernehmen und weiter prozessieren? Ließe sich so eine Proteinmatrize für die Synthese eines beliebigen Peptides konstruieren? Diese Fragestellung sollte mit dem in diesem Kapitel beschriebenen Projekt untersucht werden. Ausgangspunkt für die folgenden Konstruktionen war dabei das etablierte System TycA/ProCAT, das durch Fusion um ein drittes Modul erweitert wurde.

5.4.2 Ein Stecksystem für Hybridenzyme - Konstruktion der Expressionsvektoren

Die Konstruktion der Expressionsvektoren sollte möglichst flexibel sein, um von denselben Basiskonstrukten ausgehend durch beliebige Kombinationen verschiedene rekombinante Hybridenzyme erhalten zu können. Für die Fusion gesamter Module hinter TycB1 (ProCAT) mußte zunächst willkürlich eine Fusionsstelle zwischen der T-Domäne des einen und der C-Domäne des darauffolgenden Moduls gewählt werden (die Module wurden in Anlehnung an ProCAT als Verbund der Domänen C, A und T in der Reihenfolge CAT definiert). Dieser Wahl lag die Modellvorstellung zugrunde, daß es zwischen den als Funktions- und Faltungseinheit aufzufassenden Domänen einige Aminosäuren geben müßte, die quasi als Verbindungsschlaufe fungieren. Diese Schlaufe sollte sich durch vergleichsweise geringe Sequenzkonservierung auszeichnen und als Schnittstelle für die künstliche Fusion benutzt werden. Ein Sequenzvergleich aller von der T- zur C-Domäne entsprechenden Übergänge innerhalb der Tyrocidin Synthetasen sowie die Berücksichtigung der gut abschätzbaren Größe der T-Domäne ermöglichte die Identifizierung eines diesen Kriterien entsprechenden Bereiches (siehe Abb. 5.4-1).

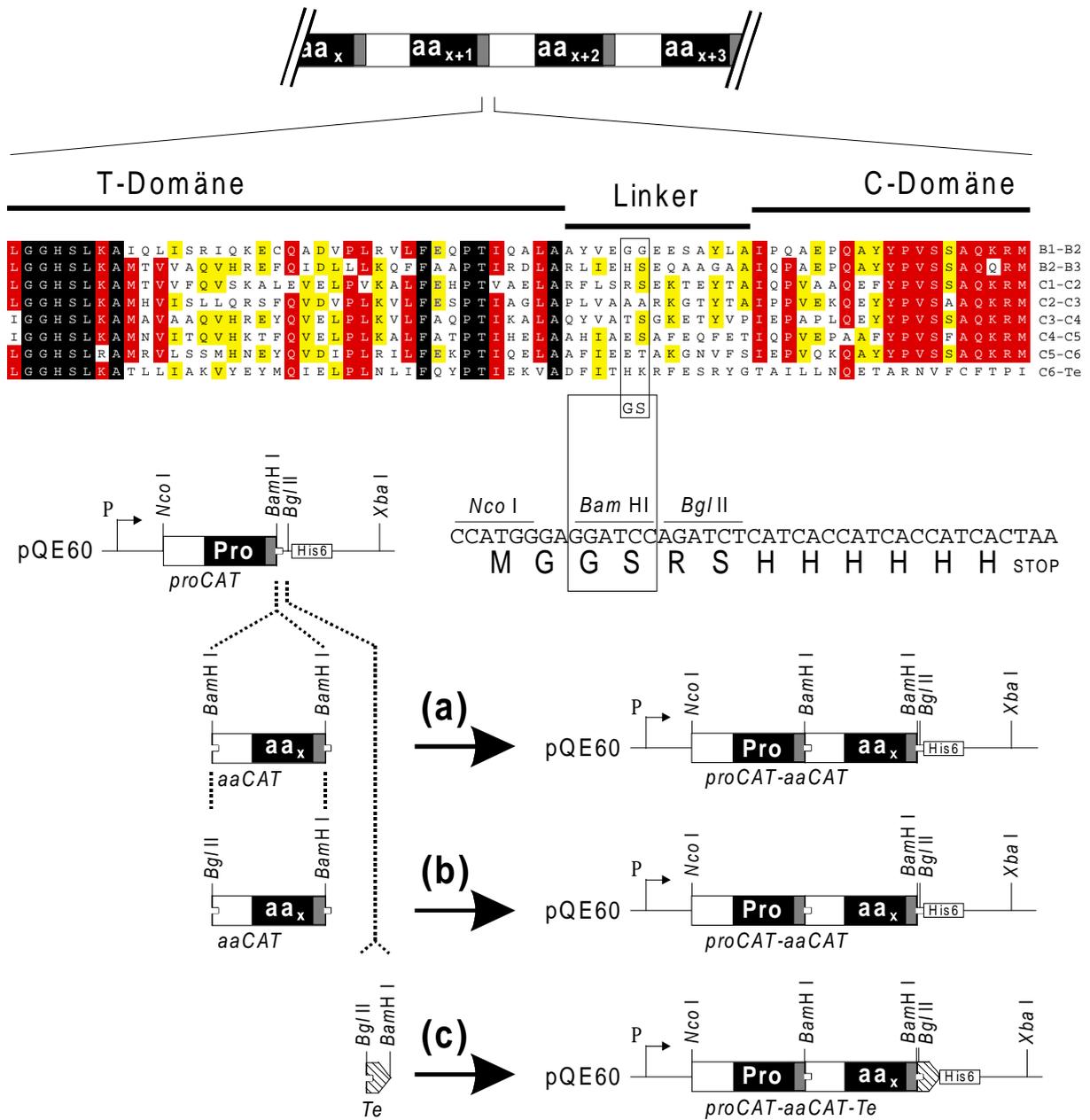


Abb. 5.4-1 Modul- und Domänenstecksystem für Hybridpeptidsynthetasen: (a): Auf der Basis der Sequenzhomologien der Module der Tyrocidin Synthetasen wurde ein gering konservierter Linkerbereich zwischen den T- und C-Domänen aufeinander folgender Module identifiziert. In diesem Bereich wurden Endpunkt des ProCAT-Moduls bzw. Anfangs- und Endpunkte interner aaCAT-Module definiert. Für aaCAT-Module kodierende Genfragmente (*BamH I-BamH I*) wurden „in frame“ an das für ProCAT kodierende Fragment fusioniert. (c): Das die Te-Domäne kodierende Genfragment wurde zunächst in die *Bgl II*-Schnittstelle des Vektors pQE60 ligiert (*BamH I* und *Bgl II* erzeugen kompatible DNA-Enden). Aus dem Vektor pQE60-Te konnte dann das *Bgl II-Xba I* Fragment ausgeschnitten und in gleichermaßen präparierte Vektoren pQE60-proCAT-aaCAT ligiert werden, um die Te-Domäne an die dimodularen Konstrukte zu fusionieren. (b): Eine Ligation der aaCAT-Module mittels *Bgl II-BamH I* würde eine Konstruktion erlauben, die weitere Modul-Insertionen aufnehmen könnte, da so die 5'-terminale *BamH I*-Erkennungssequenz zerstört wäre.

Aus dieser Definition ergab sich auch die Notwendigkeit für die Herstellung eines neuen pQE60-proCAT Konstruktes, da das oben beschriebene ProCAT[‡] am C-Terminus des entsprechenden Enzyms noch 50 Aminosäuren der sich anschließenden C-Domäne des nächsten Moduls enthielt. Ebenso wurde nun der TycA Expressionsvektor pQE60-tycA konstruiert. Die Module TycB2 (PheCAT), TycC5 (OrnCAT) und TycC6 (LeuCATTe) wurden nach PCR aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 über *Bam* HI-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende zunächst in mittels *Bam* HI linearisierten pTZ18 kloniert (verwendete Oligonukleotide s. Anhang Tab 7.1). Aus den so erhaltenen Vektoren pTZ18-pheCAT, pTZ18-ornCAT und pTZ18-leuCATTe wurden dann die Fragmente für die Ligation in pQE60-proCAT gewonnen. Dabei mußten aufgrund der ungerichteten Klonierung Restriktionsanalysen mit den Enzymen *Hind* III bzw. *Ava* I durchgeführt werden, um die Konstrukte pQE60-proCAT-pheCAT, pQE60-proCAT-ornCAT und pQE60-proCAT-leuCATTe zu identifizieren, die das für das zweite Modul kodierende Fragment in der richtigen Orientierung enthielten.

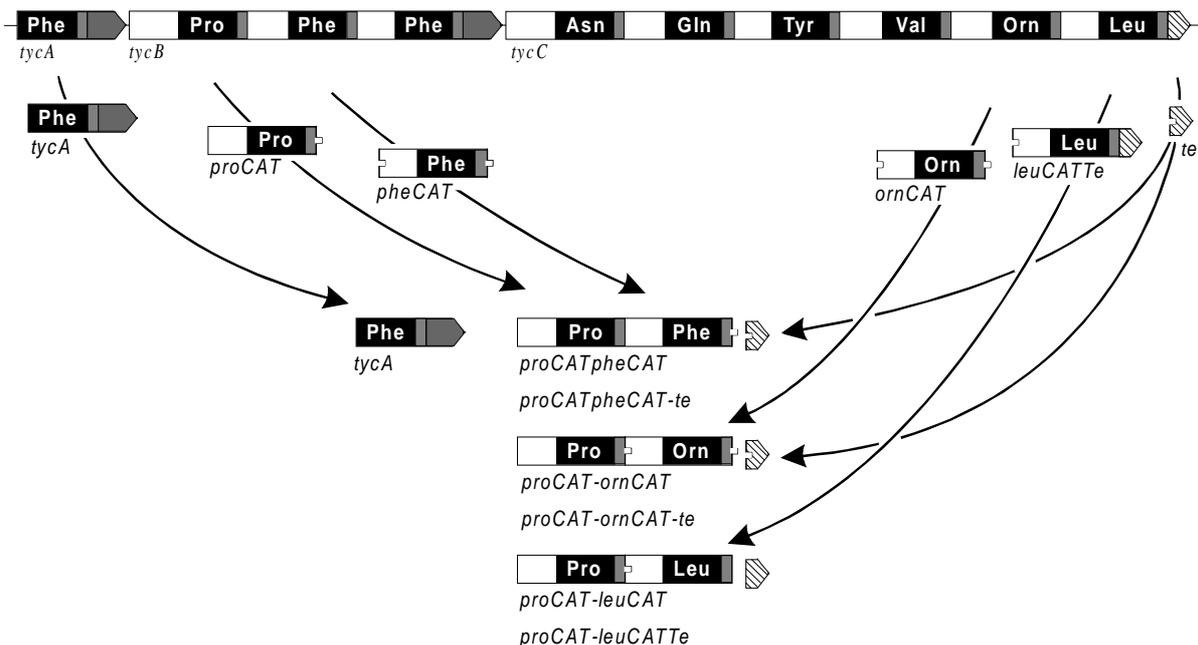


Abb. 5.4-2 Fusion der Genfragmente für rekombinante Hybridenzymssysteme: Schematische Darstellung der Konstruktion der trimodularen Proteinmatrizen aus den Modulen und Domänen der Tyrocidinsynthetasen auf DNA-Ebene. Siehe Abbildung 5.4-1 für die genaue Klonierungsstrategie.

Das für die Te-Domäne kodierende Fragment wurde ebenfalls mittels PCR aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl* II (5'-Ende) und *Bam* HI (3'-Ende) geschnitten und in mit *Bgl* II linearisierten pQE60 ligiert. Auf diese Weise wurde im erhaltenen Konstrukt pQE60-Te die

Schnittstelle am 3'-Ende des Fragmentes verloren. Damit konnte das Fragment mitsamt einem Vektoranteil mit den Enzymen *Bgl* II und *Xba* I ausgeschnitten werden. Nach Ligation mit den gleichermaßen geschnittenen Vektoren pQE60-proCATpheCAT und pQE60-proCAT-ornCAT wurden so die Konstrukte pQE60-proCATpheCAT-Te und pQE60-proCAT-ornCAT-Te erhalten. pQE60-proCAT-leuCAT wurde durch inverse PCR, *Bgl* II Verdau und Religation aus pQE60-proCAT-leuCATTe konstruiert (s. Anhang Tab. 7.1).

5.4.3 Reinigung der rekombinanten Enzyme

Zur Expression wurden die Plasmide pQE60-tycA, pQE60-proCATpheCAT, pQE60-proCATpheCAT-Te, pQE60-proCAT-ornCAT, pQE60-proCAT-ornCAT-Te, pQE60-proCAT-leuCAT und pQE60-proCAT-leuCATTe in den *E. coli* Stamm BL21/pREP4-gsp transformiert, der die Koexpression der Ppant-Transferase Gsp ermöglicht. Das Plasmid pQE60-Te wurde in *E. coli* M15/pREP4 transformiert. Mit den so erhaltenen Stämmen erfolgten Expression, Zellaufschluß und Reinigung der Proteine mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie nach dem Standardverfahren (s. 4.2.1 bis 4.2.3). Dabei wurden TycA und die Te-Domäne mit einer Anfangskonzentration von 10 % Puffer B, alle anderen Proteine mit 5 % Puffer B auf die Ni²⁺-Säule aufgetragen. Nach Dialyse gegen Assay Puffer mit 2 mM DTE wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt und die Proteine (s. Abb. 5.4-3) bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Tabelle 5.4-1 führt alle wesentlichen Daten zu den beschriebenen Proteinen auf.

Tabelle 5.4-1 Daten zu den Proteinen

Protein (-His ₆)	Länge (aa)	Molekulargewicht (kDa)	Extinktions- koeffizient bei 280 nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Konzentrations- umrechnung: 1 A(280 nm) entspricht mg/ml
TycA	1098	123,968	136580	0,91
ProCAT	1054	119,741	92230	1,30
Te	266	29,985	33830	0,89
ProCATPheCAT	2089	235,502	190030	1,24
ProCATPheCAT-Te	2343	264,072	223860	1,18
ProCAT-OrnCAT	2098	236,862	173170	1,37
ProCAT-OrnCAT-Te	2352	265,431	207000	1,28
ProCAT-LeuCAT	2095	234,972	178650	1,32
ProCAT-LeuCATTe	2349	263,541	212480	1,24

In Abbildung 5.4-3 sind exemplarisch die Expressionen der Konstrukte pQE60-tycA, pQE60-proCAT-leuCAT, pQE60-proCAT-leuCATTe und pQE60-Te sowie alle gereinigten Proteine dokumentiert.

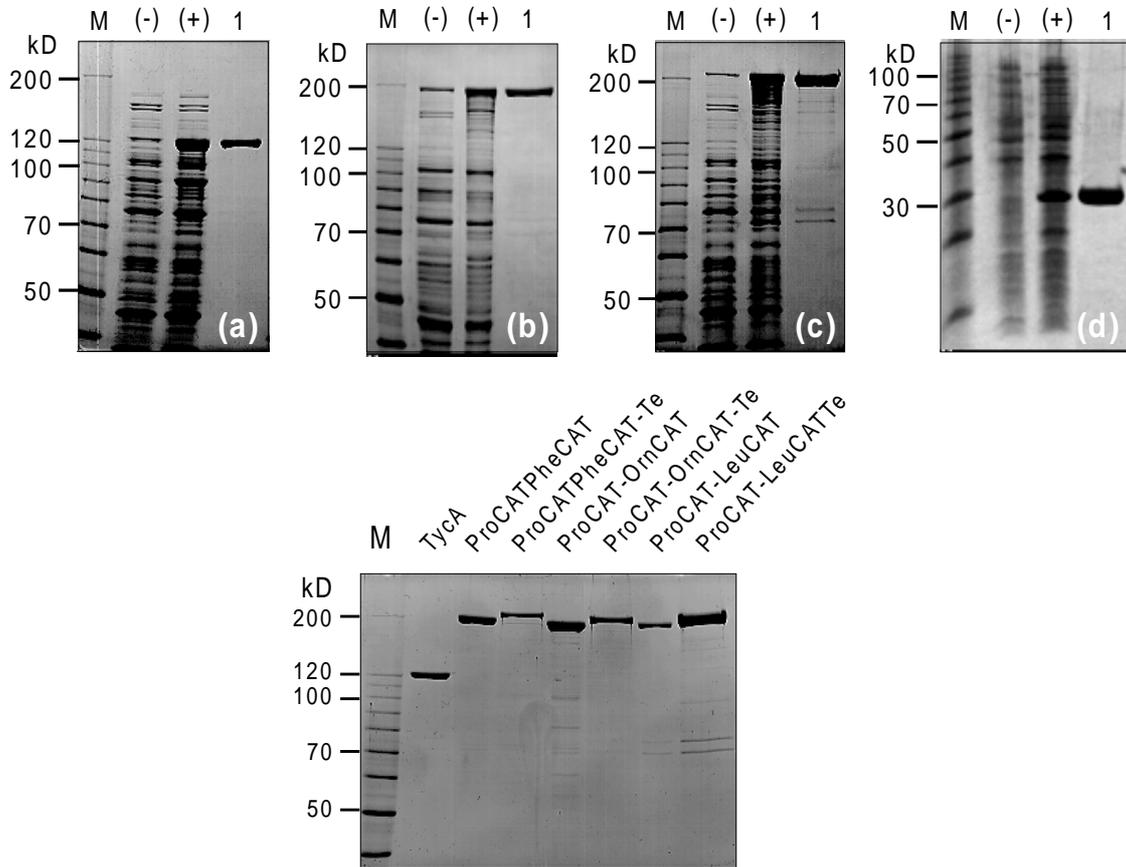


Abb. 5.4-3 Überproduktion und Reinigung der rekombinanten Proteine für die Hybridenzym-systeme: Coomassie-Blue gefärbte SDS-Polyacrylamidgels zeigen: oben, *E. coli* Gesamtzell-extrakte vor (-) und nach (+) Induktion, sowie gereinigtes Protein (1) beispielhaft für TycA (a), ProCAT-LeuCAT (b), ProCAT-LeuCATTe (c) und Te (d); unten, gereinigte Proteine. M = Größenmarker.

5.4.4 Test der enzymatischen Einzelaktivitäten

5.4.4.1 Substratspezifität der Adenylierungsreaktion

Zunächst sollte die Aktivität und Spezifität der Proteine in der ATP/PP_i-Austausch-reaktion (s. 4.2.4.1) bestimmt werden. Dazu wurde sich bei ProCAT-OrnCAT-Te und ProCAT-LeuCAT auf einen qualitativen Test mit wenigen verschiedenen Substraten beschränkt. TycA, ProCAT, ProCAT-OrnCAT und ProCAT-LeuCATTe wurden dagegen detailliert untersucht. Abbildung 5.4-4 zeigt eine graphische Darstellung der gemessenen Substratspezifitäten.

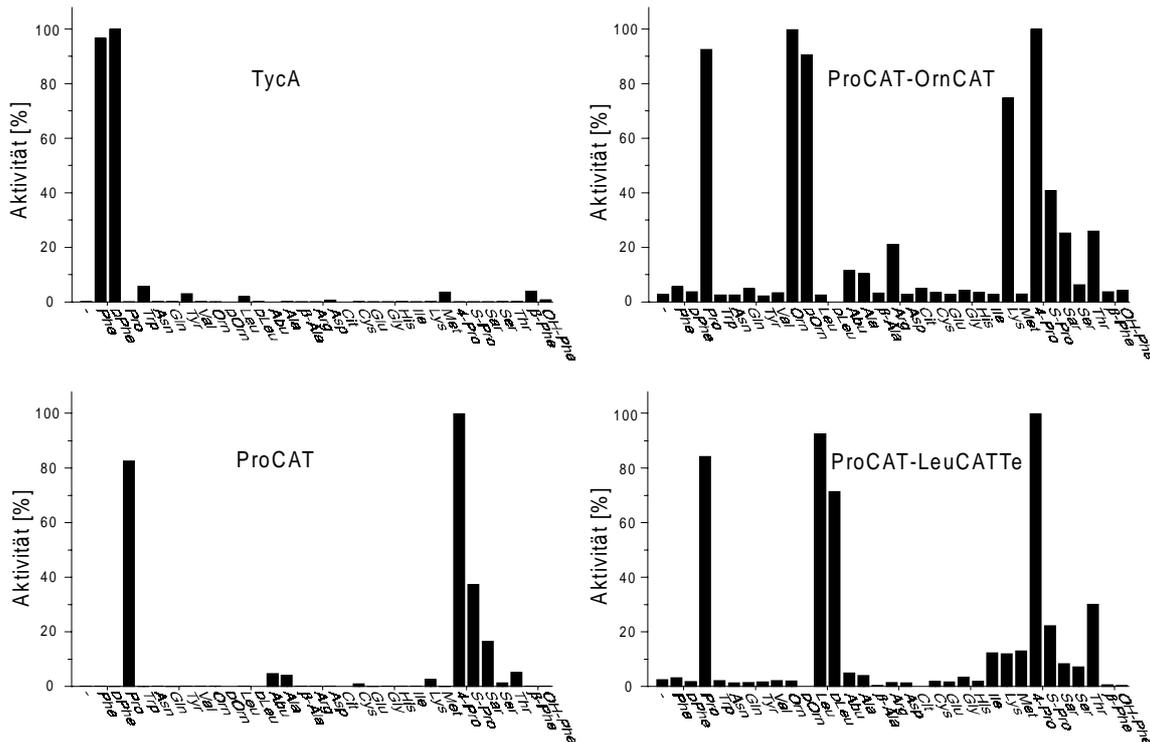


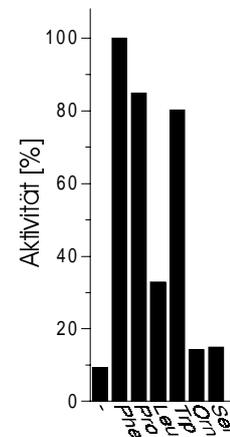
Abb. 5.4-4 Substratspezifität in der ATP/PP_i-Austauschreaktion: Gezeigt sind die Werte für TycA, ProCAT, ProCAT-OrnCAT und ProCAT-LeuCATTe. Die Enzymkonzentration in den Reaktionsansätzen betrug 20 nM. Der jeweils höchste Wert wurde gleich 100 % gesetzt. Cit = L-Citrullin, 4-Pro = (S)-Azetidin-2-carbonsäure, Sar = Sarkosin, S-Pro = (R)-1,3-Thiazolidin-4-carbonsäure, OH-Phe = α -Hydroxyphenylalanin.

Signifikante Aktivitäten wies das Pro-Modul auch für 4er-Pro ((S)-Azetidin-2-carbonsäure), Thio-Pro ((R)-1,3-Thiazolidin-4-carbonsäure) und Sarkosin auf (vergl. Abb. 5.3-8), das Orn-Modul auch für DOrn, Lys, Arg und Thr, sowie das Leu-Modul für DLeu, Ile, Lys, Met und Thr. TycA aktivierte gleichermaßen LPhe und DPhe und zeigte geringe Aktivität für Trp, Tyr, Leu, Met und β -Phe. Aus diesen Messungen war ersichtlich, daß sich die dimodularen Hydridenzyme tatsächlich wie die Summe aus den Einzelmodulen mit Pro- und Orn-, bzw. Pro- und Leu-Spezifität verhielten. Die Aktivitäten der A-Domänen waren durch die Modulfusionen nicht beeinträchtigt.

Unübliche Werte wurden für die Proteine ProCATPheCAT und ProCATPheCAT-Te gemessen. Unter den Standardbedingungen lagen die Negativwerten (nicht kognate aa wie z.B. Lys, Ser, His, Asn und auch ohne Aminosäure) bei 80-90 % der Positivwerte (Substrat-aminosäuren wie Pro, Phe, Trp). Durch deutliche Reduzierung der Enzymkonzentration in den Assays (von 200 nM auf 10 nM) konnte zwar eine Spezifitätserhöhung erreicht werden, die Messungen schienen aber immer noch deutlich mehr Hintergrundaktivität aufzuweisen als die oben beschriebenen (vergl. Abb. 5.4-4). Dabei ist anzumerken, daß für die Produktion von

ProCATPheCAT und ProCATPheCAT-Te dasselbe pQE60-ProCAT Ausgangskonstrukt wie für die Orn- und Leu-Module enthaltenen Proteine verwendet wurde. Werte mit gleichermaßen hoher Hintergrundaktivität wurden bei dem in dieser Arbeit ebenfalls bearbeiteten, hier jedoch nicht näher beschriebenen Protein ProATPheCAT (ohne ProC-Domäne) festgestellt. Daher ließ sich die unspezifische Reaktion auf das PheCAT-Modul einkreisen, welches in allen drei Fällen aus demselben Plasmid, pTZ18-PheCAT, hervorging. Ob dieses Modul eine Aminosäuresubstitution enthielt oder aus anderen Gründen unter den verwendeten Bedingungen große Unspezifität zeigte, wurde nicht geklärt. Die weiteren Arbeiten mit den Proteinen ProCATPheCAT und ProCATPheCAT-Te, Thioester- und Produktbildung, wurden aus diesen Gründen nur noch qualitativ durchgeführt.

Abb. 5.4-5 Substratspezifität von ProCATPheCAT in der ATP-PP_i Austauschreaktion: Die Enzymkonzentration in den Reaktionsansätzen betrug 10 nM. Der höchste Wert wurde gleich 100 % gesetzt.



5.4.4.2 Kinetische Konstanten der Adenylierungsreaktion

Exemplarisch wurden für einige der Hybridpeptidsynthetasen die K_m und k_{cat} -Werte für die Adenylierungsreaktion in Abhängigkeit verschiedener Substrate bestimmt. Dabei wurde nach einer anderen Methode verfahren als in Kapitel 5.2.3.2 beschrieben. Hierzu wurde eine Zeitabhängigkeit der Reaktion unter gesättigten Bedingungen durchgeführt (5 mM aa, 5 mM ATP). In dem Zeitfenster, in dem die Reaktion linear verlief, katalysierten die Enzyme mit maximaler Umsatzrate. Die Geschwindigkeit der Reaktion war dort also maximal und somit auch konstant. Unter diesen V_{max} -Bedingungen wurde dann die Konzentration der Substrataminosäure variiert. Der K_m -Wert für dieses Substrat entsprach dann dem Ordinatenwert von $V_{max}/2$. In Abbildung 5.4-6 sind die Ergebnisse dieser Messungen mit dem Enzym ProCAT-OrnCAT für die Substrate LPro, LOrn und Llys dargestellt. Tabelle 5.4-2 faßt die ermittelten Werte zusammen.

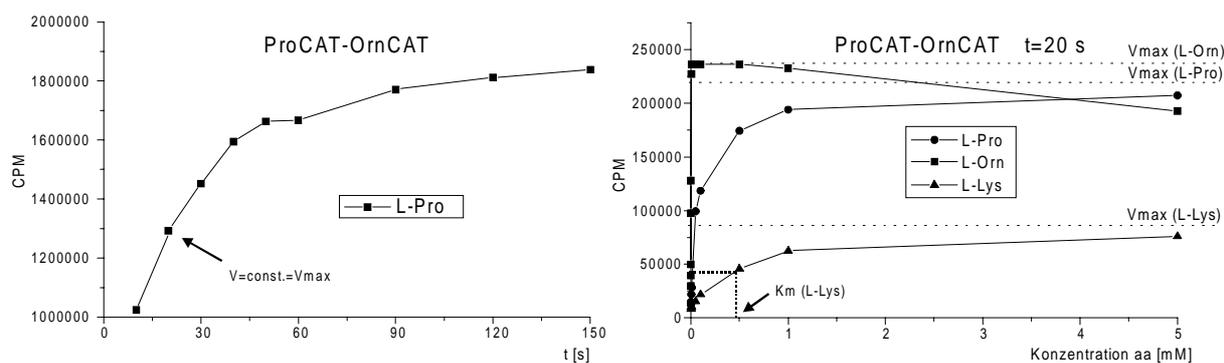


Abb. 5.4-6 Bestimmung der kinetischen Konstanten der ATP/PP_i-Austauschreaktion: Gezeigt sind am Beispiel von ProCAT-OrnCAT: links, die Zeitabhängigkeit der Adenylierungsreaktion unter gesättigten Substratkonzentrationen (5 mM aa, 5 mM ATP); rechts, die Abhängigkeit der Adenylierungsreaktion von der Substratkonzentration unter V_{max}-Bedingungen (20 s Inkubation). Die graphisch dargestellten Werte für die verschiedenen Substrate sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da unterschiedliche Zählraten an [³²P]-PP_i eingesetzt wurden. So ergibt sich, daß V_{max}(LLys) ähnlich zu V_{max}(LOrn) ist (siehe Tab. 5.4-2).

Tabelle 5.4-2 Kinetische Konstanten der ATP/PP_i-Austauschreaktion

Enzym	Substrat (aa)	K _m (μM)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} /K _m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
ProCAT-OrnCAT	LPro	800	0,68	0,85
	LOrn	0,8	0,29	363
	LLys	450	0,25	0,56
ProCAT-LeuCATTe	LLeu	20	0,43	22

5.4.4.3 Thioesterbildung

Schließlich wurden die Fähigkeiten der Proteine, ihre Substrataminosäuren als Thioester zu binden, untersucht (s. 4.2.4.1). Alle Proteine zeigten dabei die spezifische(n) Bindung(en) der jeweiligen radioaktiv markierten Aminosäuren, die jedoch in Abhängigkeit der Enzympräparation schwanken konnte. In Abbildung 5.4-7 sind einige der Werte dargestellt, die einer Beladung von etwa 20-30 % entsprachen. Deutlich niedriger war der Wert für die Ornithin-Thioesterbindung von ProCAT-OrnCAT. Dies kann jedoch mit der bekannten Instabilität von Ornithin-Thioestern erklärt werden und ist von Bedeutung für die nachfolgend untersuchte Produktbildungsreaktionen dieses Enzyms (s. 5.4.5.2 und 6.4.2).

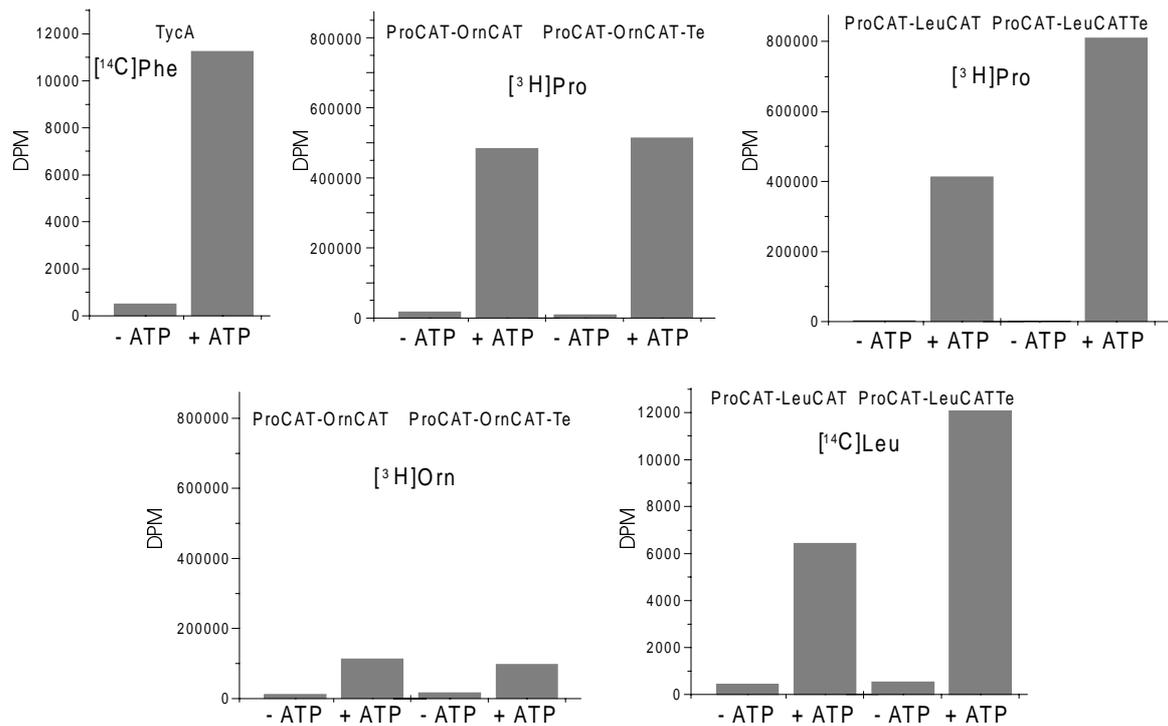


Abb. 5.4-7 Kovalente Bindung der Substrataminosäure als Thioester: Graphische Darstellung der Bindung der radioaktiv markierten Aminosäuren in Abhängigkeit von ATP. In einem 100 μ L Reaktionsansatz wurden jeweils 50 pmol Enzym für 30 min mit den Substraten bei 37°C inkubiert. Eingesetzte Stoffmengen der radioaktiv markierten Aminosäuren: 330 pmol (Phe*), 230 pmol (Pro*), 150 pmol (Orn*), 1020 pmol (Leu*).

Die Bildung des Leu-Thioesters durch das Protein ProCAT-LeuCATTe wurde auch in Zeitabhängigkeit untersucht. Diese Reaktion ist in Abb. 5.4-8 dargestellt und kann mit den Ergebnissen aus 5.3.4 für GrsA und ProCAT[‡] verglichen werden.

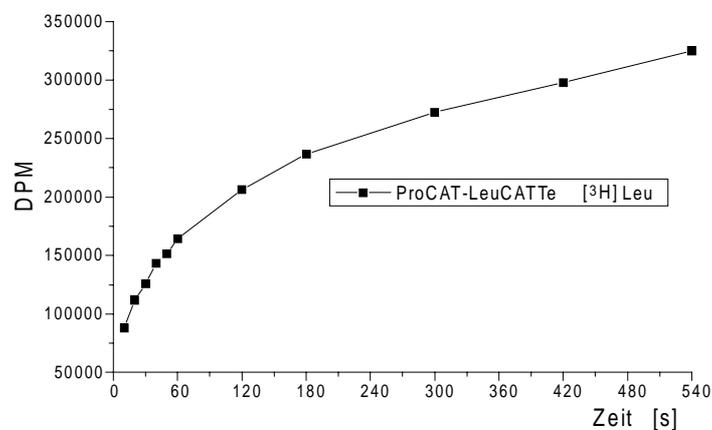


Abb. 5.4-8 Zeitabhängigkeit der Leu-Thioesterbildung durch ProCAT-LeuCATTe: Ein Reaktionsansatz mit 50 μ M ProCAT-LeuCATTe und 200 μ M [³H]-markiertem lLeu wurde bei 37°C inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden 100 μ L Aliquots entnommen und nach TCA-Fällung die Menge an präzipitierbaren Radioaktivität bestimmt.

5.4.5 Tripeptidsynthese durch Hybridproteinmatrizen *in vitro*

Nach der Analyse der Einzelaktivitäten konnten die bimodularen Hybridpeptid-synthetasen zusammen mit TycA zur Produktbildung eingesetzt werden. Der erste Schritt der Untersuchungen wurde dabei mit radioaktiv markierten Aminosäuren durchgeführt. Eine sich anschließende Dünnschichtchromatographie der Produkte und Visualisierung der aufgetrennten Komponenten durch Autoradiographie sollte im Vergleich mit chemischen Standards Aufschluß über die Reaktionsabläufe und -produkte geben. Waren geeignete Bedingungen gefunden, so wurden die Reaktionen im präparativen Ansatz mit nicht radioaktiv markierten Aminosäuren durchgeführt, und die Produkte mittels HPLC oder ESI-Massenspektrometrie analysiert.

Die typischen Reaktionsbedingungen für diese beiden Wege sind im Kapitel 4.2.4.3 beschrieben. Nach der Durchführung einer Tripeptidsynthese wurde der Reaktionsansatz mit n-Butanol/Chloroform (4:1 (v/v)) ausgeschüttelt, um die Produkte gegebenenfalls mit der organischen Phase abzutrennen. Es ist wichtig zu berücksichtigen, daß die jeweils radioaktiv markierte Aminosäure stets in nur sehr geringen Mengen im Reaktionsansatz zugegen war (ein- bis siebenfacher stöchiometrischer Überschuß gegenüber den Enzymen), während die anderen Substrate in sättigenden Konzentrationen vorlagen. Neben- bzw. Hauptprodukt bei allen diesen Ansätzen war das schon charakterisierte DPhe-Pro-DKP, welches sich durch frühzeitige Abspaltung des enzymgebundenen Dipeptidintermediates DPhe-Pro bildet. Dieses Produkt war unter den verwendeten Bedingungen hauptsächlich in der organischen Phase wiederzufinden.

5.4.5.1 Die Systeme TycA/ProCATPheCAT und TycA/ProCATPheCAT-Te

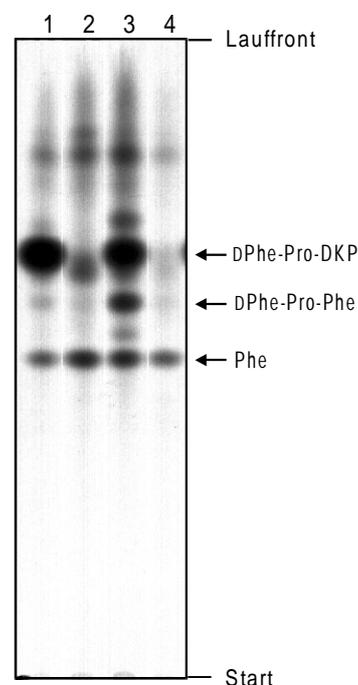
Diese Systeme können als die natürliche Verlängerung des TycA/ProCAT Systems um das dritte Modul der Tyrocidin Synthetasen verstanden werden. Daher wurde hier die Synthese des (enzymgebundenen) Tripeptids DPhe-Pro-Phe nicht als der kritische Punkt erwartet. Vielmehr stellte die künstlich fusionierte Te-Domäne im System TycA/ProCATPheCAT-Te die Anforderung an das Zusammenspiel der katalytischen Einheiten dar. Bei diesen Systemen ist daran zu erinnern, daß die rekombinanten Proteine ProCATPheCAT und ProCATPheCAT-Te eine signifikante Unspezifität in der ATP-PP_i Austauschreaktion aufwiesen (s. 5.4.4.1). Die folgenden Untersuchungen wurden daher nur qualitativ durchgeführt..

Die Systeme TycA/ProCATPheCAT und TycA/ProCATPheCAT-Te (je 50 pmol Enzym im 100 μ L Ansatz) wurden mit [14 C]-Phe (330 pmol) und Pro inkubiert. Die nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-Butanol/Chloroform (4:1 (v/v)) erhaltene Autoradiographie der DC-Analyse der eingeeengten organischen Phase ist in Abbildung 5.4-9 dargestellt.

Abb. 5.4-9 Produkte der Systeme TycA/ProCATPheCAT-(Te):

Autoradiographie der DC-Analyse der nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-BuOH/CHCl₃ (4:1 (v/v)) in der organischen Phase erhaltenen Produkte ([14 C]-L-Phe als radioaktiv markierte Aminosäure). Laufmittel n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1). Pfeile am rechten Rand der Darstellungen markieren das Laufverhalten der Standardverbindungen.

TycA/ProCATPheCAT:	Spur 1: F* , P
	Spur 2: F* , -
TycA/ProCATPheCAT-Te:	Spur 3: F* , P
	Spur 4: F* , -



Beide Systeme produzierten demnach erwartungsgemäß DPhe-Pro-DKP (Spuren 1 und 3). Dieses Produkt wurde nicht in den Kontrollansätzen ohne Pro gefunden (Spuren 2 und 4). Eine weitere Bande konnte bei beiden Systemen ebenfalls nur in den Ansätzen mit Pro beobachtet werden. Die Intensität dieser Bande war stark abhängig von der Präsenz der Te-Domäne. Im System TycA/ProCATPheCAT war sie nur äußerst schwach zu erkennen, während ihre Intensität im System TycA/ProCATPheCAT-Te etwa 20-30 % der DPhe-Pro-DKP-Bande ausmachte. Ihr Laufverhalten war identisch mit dem des DPhe-Pro-Phe-Standards. Von beiden Enzymsystemen wurde also das Tripeptid DPhe-Pro-Phe synthetisiert, das im System ohne Te-Domäne wahrscheinlich als Thioester an das dritte Modul gebunden blieb und nur sehr langsam unkatalysiert, im System mit Te-Domäne dagegen katalytisch durch Hydrolyse freigesetzt wurde. Somit konnte durch eine Versetzung der Te-Domäne vom zehnten Modul der Tyrocidin Synthetase TycC zum dritten Modul von TycB eine vorzeitige Abspaltung des Tripeptidintermediates bewirkt werden. Als Hauptprodukt entstand das Abspaltungsprodukt des Dipeptidintermediates, DPhe-Pro-DKP.

Die in der organischen Phase gesammelten Produkte eines präparativen Ansatzes wurden mittels Massenspektrometrie analysiert (s. Anhang Abb. 7.1a). Es konnte eindeutig

ein Signal bei der dem Tripeptid DPhe-Pro-Phe entsprechenden Masse ($M = 409,5$) nachgewiesen werden ($M^+ = 410$). Abbildung 5.4-10 faßt die Produktbildungsreaktionen der Systeme TycA/ProCATPheCAT und TycA/ProCATPheCAT-Te zusammen.

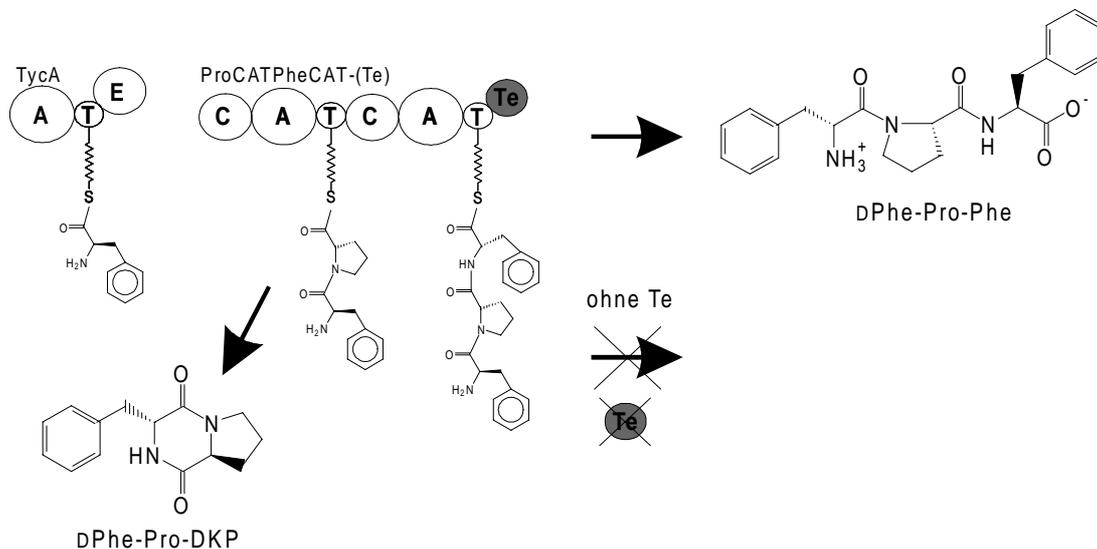


Abb. 5.4-10 Die Systeme TycA/ProCATPheCAT-(Te): Das künstliche Hybridenzymssystem TycA/ProCATPheCAT-Te katalysiert in Abhängigkeit der Te-Domäne die Abspaltung des Peptides DPhe-Pro-Phe. Ebenfalls entsteht durch Abspaltung des enzymgebundenen Dipeptids das zyklische DPhe-Pro-Diketopiperazin.

5.4.5.2 Die Systeme TycA/ProCAT-OrnCAT und TycA/ProCAT-OrnCAT-Te

In diesen Systemen wurde nicht nur die terminale Te-Domäne repositioniert, sondern das vollständige Orn-Modul an ProCAT fusioniert. Hier stellte sich also die Frage des funktionellen Zusammenspiels der in künstlicher Reihenfolge fusionierten Module. Im System TycA/ProCAT-OrnCAT-Te wurden mit der Orn-Modul- und Te-Domänen-Repositionierung sogar zwei künstliche Eingriffe vorgenommen.

Im Falle der Tripeptidbildung durch die künstliche Proteinmatrize wurde, bedingt durch die Instabilität von Ornithin-Thioestern [Gadow *et al.*, 1983; Vater *et al.*, 1987], auch eine signifikante Produktabspaltung *ohne* Te-Domäne erwartet. Das Produkt DPhe-Pro-cycloOrn sollte dabei deutlich hydrophober sein als DPhe-Pro-Orn, welches sich aufgrund der geladenen Seitenkette von Orn, ebenso wie die freie Aminosäure Orn selbst, nicht in die organische Phase extrahieren ließ. So war bei dem System TycA/ProCAT-OrnCAT unter Verwendung von [^3H]-markiertem Ornithin tatsächlich eine Anreicherung der Radioaktivität in die organische Phase zu beobachten. Diese Anreicherung war abhängig von der Präsenz aller Komponenten, ATP, LPhe, LPro und TycA, und ließ daher bereits die Bildung eines

DPhe-Pro-cycloOrn vermuten (s. Abb. 5.4-11). Aus der aufgenommenen Zeitabhängigkeit (s. Abb. 5.4-11) ließ sich eine Geschwindigkeitskonstante $k(\text{dFPcycO})$ von ca. $0,025 \text{ min}^{-1}$ errechnen. Dieser Wert könnte allerdings versuchsbedingt um einen Faktor 2-5 zu klein bestimmt worden sein, da auch in den zweiten Waschfraktionen der organischen Phasen noch erhebliche Zählraten gefunden wurden (ca. 50 % der jeweiligen organischen Phase). Dieser Befund sprach für ein amphiphiles Verhalten des Produktes, ein Verhalten, das für DPhe-Pro-cycloOrn zutreffen könnte.

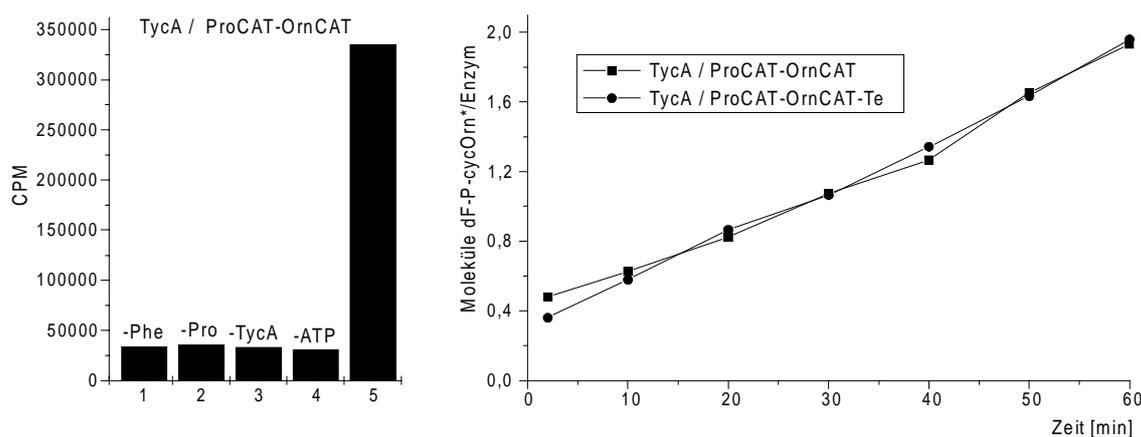


Abb. 5.4-11 Produktbildung der Systeme TycA/ProCAT-OrnCAT-(Te): Graphische Darstellung der Zählraten in der organischen Phase nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-Butanol/Chloroform (4:1 (v/v)). Als radioaktiv markierte Aminosäure wurde $[^3\text{H}]$ -L-Orn eingesetzt. Links, Abhängigkeit von den verschiedenen Komponenten der Reaktion. Rechts, Zeitabhängigkeit der Reaktion (Zählrate umgerechnet in molare Menge eines DPhe-Pro-cycOrn Tripeptides, für das sich eine Bildungsrate von ca. $0,025 \text{ min}^{-1}$ ergibt).

Eine Analyse der organischen Phase mittels DC zeigte eine Hauptbande, die mit allen drei Aminosäuren, $[^{14}\text{C}]$ -Phe, $[^3\text{H}]$ -Pro und $[^3\text{H}]$ -Orn, markiert werden konnte (s. Abb. 5.4-12). Wenn radioaktives Phe oder Pro eingesetzt wurden, war zusätzlich das markierte DPhe-Pro-DKP zu sehen. Eine Bande mit dem gleichen Laufverhalten fand sich auch in der wässrigen Phase, wodurch die Vermutung erhärtet wurde, daß DPhe-Pro-cycloOrn nicht vollständig mit der organischen Phase extrahiert wurde. Bemerkenswert war, daß diese Bande mit $[^{14}\text{C}]$ -Phe Markierung deutlich schwächer auch in Kontrollen auftrat, in denen Pro oder Orn nicht im Reaktionsansatz zugegeben waren. Dies ließ sich jedoch unterdrücken, wenn $[^{14}\text{C}]$ -Phe erst nach 10 Minuten Inkubationszeit zu einem Reaktionsansatz gegeben wurde, der auch sehr geringe Mengen an nicht markiertem Phe enthielt. Demzufolge schienen die Enzympräparationen noch geringe Mengen der freien Aminosäuren zu enthalten, die durch einen Vorlauf ohne radioaktiv markierte Aminosäuren durch Produktbildung verbraucht werden konnten. Diese Erklärung würde insbesondere für die Kontrolle ohne Orn Sinn

machen, da hier der Effekt am deutlichsten auftrat und die Affinität des Enzyms für Ornithin sehr groß ist (vergl. Tab.5.4-2).

Für DPhe-Pro-cycloOrn lag kein chemischer Standard zum Vergleich vor. Die ESI-MS Analyse der Produkte der organischen Phase eines präparativen Ansatzes (s. Anhang Abb. 7.1b) zeigte das Hauptsignal bei $M^+ = 359$, und stimmte damit mit der Masse für DPhe-Pro-cycloOrn überein ($M = 358,4$).

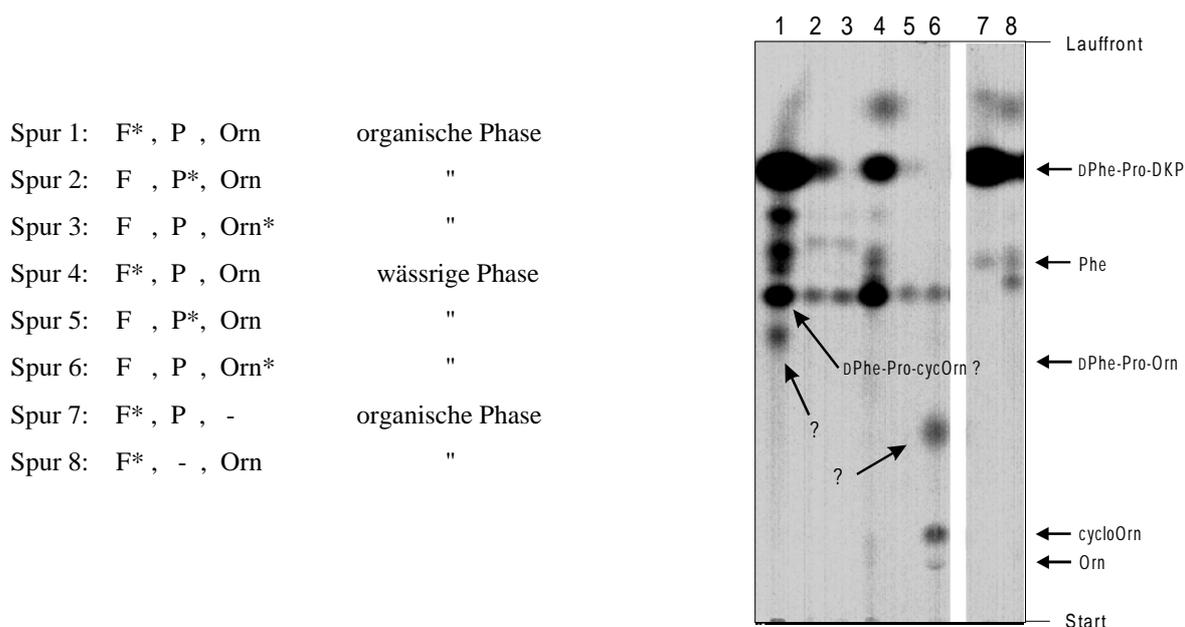


Abb. 5.4-12 Produkte des Systems TycA/ProCAT-OrnCAT:

Autoradiographie einer DC-Analyse der nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-BuOH/CHCl₃ in der organischen und wässrigen Phase erhaltenen Produkte. Laufmittel n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1). Pfeile am rechten Rand der Darstellung markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen. LPro und LOrn wurden [³H]-markiert, LPhe [¹⁴C]-markiert eingesetzt. Dadurch sind die unterschiedlichen Intensitäten zu erklären.

Im System TycA + ProCAT-OrnCAT-Te befindet sich durch eine zweite Fusion zusätzlich die Te-Domäne am C-Terminus des Orn-Moduls. Der Vorhersage nach war dieses System nicht mehr von der Abspaltung durch intramolekulare Laktamisierung des Ornithin-Restes abhängig, sondern sollte idealerweise das lineare Produkt DPhe-Pro-Orn abspalten. Für dieses Produkt lag ein chemischer Standard vor, der nach Extraktion vollständig in der wässrigen Phase verblieb. Somit schien ein Vergleich der Produkte in der wässrigen Phase mit denen des oben beschriebenen Systems ohne Te-Domäne angebracht. Nach Autoradiographie einer DC-Analyse der Produkte konnte tatsächlich eine neue Bande identifiziert werden, die nur im System mit Te-Domäne auftrat (Abbildung 5.4-13). Diese Bande ließ sich mit allen drei Aminosäuren, [¹⁴C]-Phe, [³H]-Pro und [³H]-Orn, erhalten und zeigte das gleiche Laufverhalten wie der Standard DPhe-Pro-Orn. In Kontrollansätzen, in denen eine der nicht

markierten Aminosäuren fehlte, tauchte diese Bande nicht auf. Diese Ergebnisse ließen sich nur durch die Produktion von DPhe-Pro-Orn erklären. Eine massenspektroskopische Analyse des Produktes konnte aufgrund des hohen Salzgehaltes der wässrigen Phase allerdings noch nicht durchgeführt werden und steht noch aus.

Neben DPhe-Pro-DKP wurde vom TycA + ProCAT-OrnCAT-Te System mit DPhe-Pro-cycloOrn noch ein weiteres Produkt synthetisiert (s. Abb. 5.4-13). Das vom System produzierte Tripeptid wird also offensichtlich nicht vollständig durch die Te-Domäne hydrolysiert, sondern kann ebenfalls durch intramolekulare Laktamisierung abgespalten werden. Die Bildung erfolgte mit gleicher Geschwindigkeit wie vom System ohne Te-Domäne (s. Abb. 5.4-11; $k(\text{dFPcycO}^*) = \text{ca. } 0,025 \text{ min}^{-1}$).

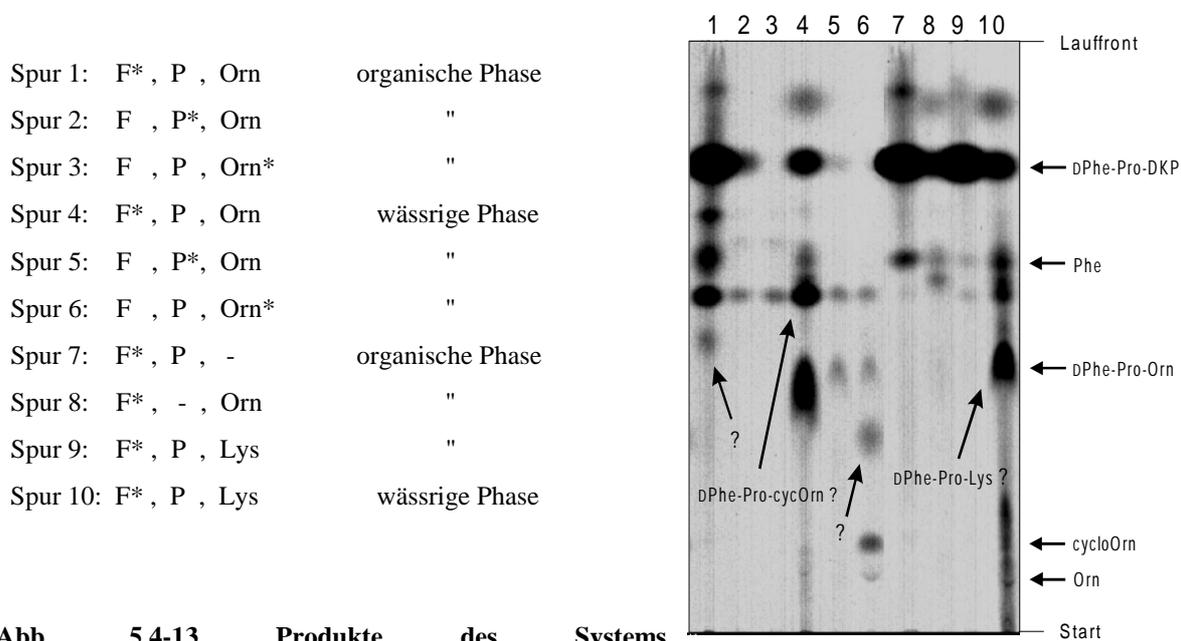


Abb. 5.4-13 Produkte des Systems

TycA/ProCAT-OrnCAT-Te: Autoradiographie einer DC-Analyse der nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-BuOH/CHCl₃ in der organischen und wässrigen Phase erhaltenen Produkte. Laufmittel n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1). Pfeile am rechten Rand der Darstellung markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen. LPro und LOrn wurden [³H]-markiert, LPhe [¹⁴C]-markiert eingesetzt. Dadurch sind die unterschiedlichen Intensitäten zu erklären.

Beide Systeme, mit und ohne Te-Domäne, produzierten wie erwartet auch cycloOrn. Eine mit [³H]-Orn markierte Bande, die gleiches Laufverhalten wie der chemische Standard aufwies, konnte jeweils nach Analyse der wässrigen Phasen identifiziert werden (s. Abb. 5.4-12 und 5.4-13). Da die Orn-A-Domäne auch DOrn aktivierte (vergl. Abb. 5.4-4), wurden mit beiden Systemen auch Elongationsreaktionen mit [¹⁴C]-Phe, Pro und DOrn durchgeführt. Es konnten aber keine Indizien für die Synthese der Produkte [¹⁴C]-DPhe-Pro-DOrn bzw.

[^{14}C]-DPhe-Pro-cyclo-DOrn gesammelt werden. Vielmehr schien DOrn eine Elongation zum Tripeptid zu blockieren. Die den LOrn-Produkten zugeordneten Banden wurden nicht beobachtet und keine Banden mit ähnlichen Laufverhalten tauchten auf.

Die beiden Systeme und die von ihnen synthetisierten Peptide sind in Abbildung 5.4-14 zusammengefasst.

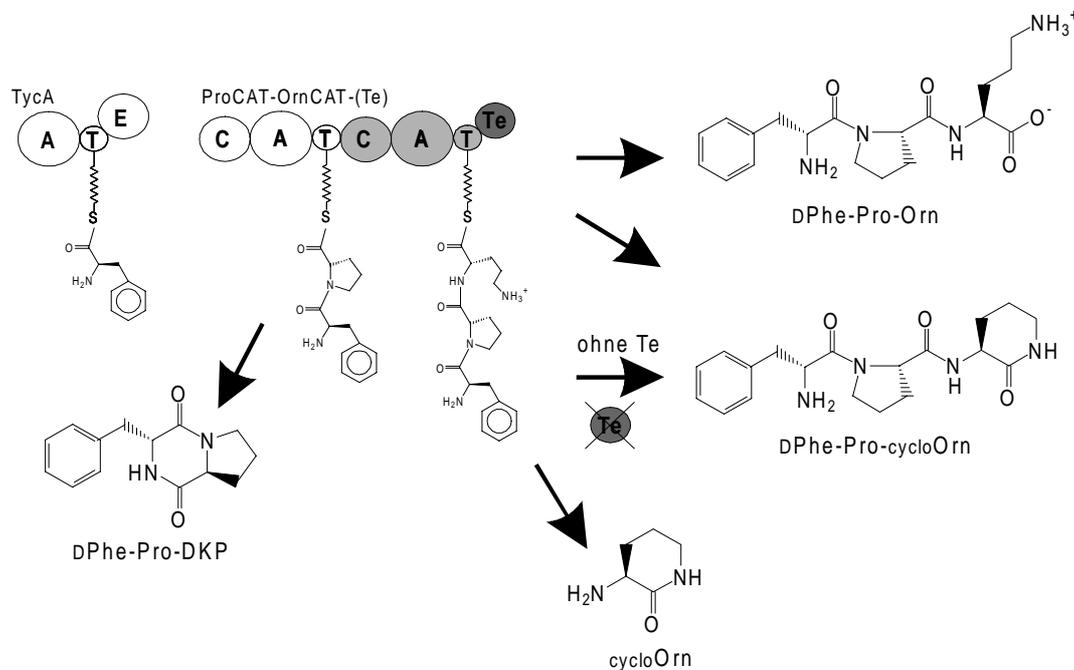


Abb. 5.4-14 Die Systeme TycA/ProCAT-OrnCAT-(Te): Durch die Katalyse der Te-Domäne wurde das Tripeptid dPhe-Pro-Orn vom Hybridenzymkomplex hydrolytisch abgespalten. Die Instabilität des Ornithinthioesters bewirkte die Entstehung des Produktes dPhe-Pro-cycloOrn, das ebenfalls durch das Enzymsystem ohne Te-Domäne gebildet werden konnte. Nach dem gleichen Abspaltungsmechanismus wurde mit cycloOrn noch ein weiteres Nebenprodukt synthetisiert. dPhe-Pro-DKP entstand durch intramolekulare Zyklisierung des enzymgebundenen Dipeptids.

5.4.5.3 Die Systeme TycA/ProCAT-LeuCAT und TycA/ProCAT-LeuCATTe

Die Besonderheit des Systems TycA/ProCAT-LeuCATTe macht die natürliche Lokalisation der Te-Domäne am Leu-Modul aus, dem letzten der Tyrocidin Synthetasen. Dieses System könnte man daher auch als eine Deletion der internen Module B2-C5 verstehen. Der chemische Standard für das erwartete Syntheseprodukt dPhe-Pro-Leu war unter den verwendeten Bedingungen nach Extraktion des Reaktionsansatzes größtenteils in der organischen Phase zu finden, während radioaktiv markiertes Leucin als freie Aminosäure hauptsächlich in der wässrigen Phase blieb.

Die Analyse des Systems TycA + ProCAT-LeuCATTe mit [^{14}C]-L-Leu zeigte eine Anreicherung der Radioaktivität in der organischen Phase in Abhängigkeit der Präsenz aller Komponenten, TycA, ATP, Phe und Pro (s. Abb. 5.4-15). Für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde eine Zeitabhängigkeit aufgenommen. Dabei wurde deutlich, daß die Umsatzrate durch Zugabe von LLeu, zusätzlich zu dem im Reaktionsansatz vorhandenen [^{14}C]-L-Leu, gesteigert werden konnte. LLeu wurde in 10- und 100fachem Verhältnis zu [^{14}C]-L-Leu zugegeben. Die Geschwindigkeitskonstante mit 10fachem LLeu Überschuß (Verhältnis Substrat:Enzym 75:1) betrug mit 0,10-0,15 min^{-1} nur etwa die Hälfte von der für 100fachen Überschuß (687:1) ermittelten Konstante von 0,20-0,25 min^{-1} (s. Abb. 5.4-15). Die Reaktion mit ausschließlich radioaktiv markiertem Leu (6,8:1) zeigte dagegen schon nach wenigen Minuten keine lineare Zunahme der Radioaktivität in der organischen Phase. Dieses Verhalten zeigte, daß durch die Limitierung des Substrates LLeu eine Zwischenreaktion, wahrscheinlich die Leu-Adenylierung oder -Thioesteraktivierung, offensichtlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt werden konnte.

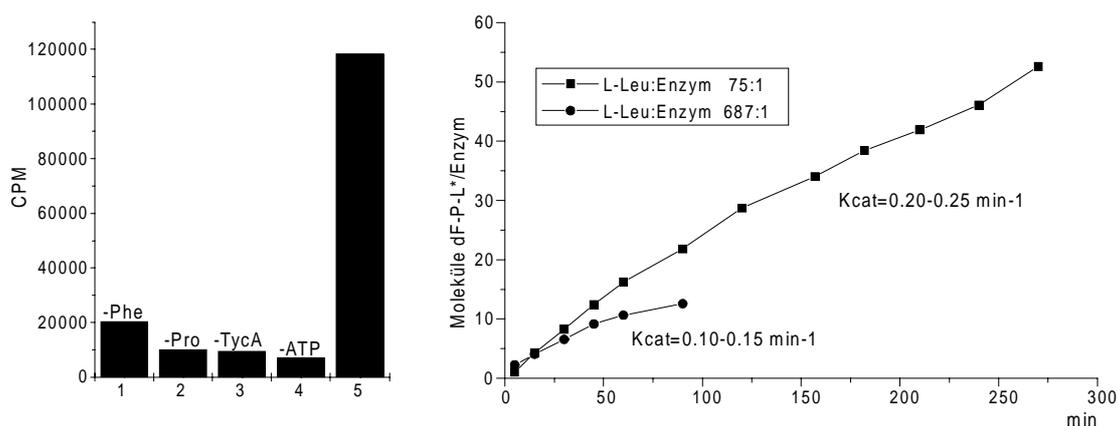


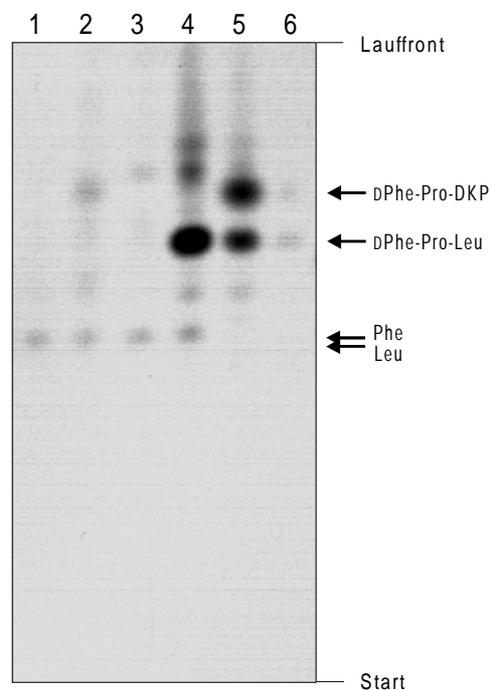
Abb. 5.4-15 Produktbildung TycA/ProCAT-LeuCATTe: Graphische Darstellung der Zählraten in der organischen Phase nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-Butanol/Chloroform (4:1 (v/v)). Als radioaktiv markierte Aminosäure wurde [^{14}C]-L-Leu eingesetzt. Links, Abhängigkeit von den verschiedenen Komponenten der Reaktion. Rechts, Zeitabhängigkeit der Reaktion für zwei verschiedene Konzentrationen an LLeu (Zählrate umgerechnet in molare Menge eines DPhe-Pro-Leu Tripeptides).

Die DC-Analyse der Reaktionsprodukte des Ansatzes mit [^{14}C]-L-Leu, die durch organische Extraktion isoliert wurden, zeigte nach Autoradiographie eine klare Hauptbande, die gleiches Laufverhalten wie der chemische DPhe-Pro-Leu Standard aufwies (s. Abb 5.4-16). Diese Bande trat nicht in den Kontrollansätzen auf, in denen TycA, ATP, Phe oder Pro fehlten. Ein Produkt mit gleichem Laufverhalten wurde durch die Verwendung von [^{14}C]-L-Phe oder [^3H]-L-Pro erhalten. Bei letzteren Ansätzen wurde auch eine zweite, mit DPhe-Pro-DKP identisch laufende Hauptbande erhalten. Die ESI-MS Analyse der Produkte eines

präparativen Ansatzes lieferte schließlich ein Hauptsignal bei $M^+ = 376$, das mit der für DPhe-Pro-Leu errechneten Masse ($M = 375,5$) übereinstimmte (s. Anhang Abb. 7.1). Dieses Produkt konnte zusätzlich mittels HPLC-Analyse durch seine Retentionszeit nachgewiesen werden, die identisch mit der des chemischen Standards war.

Abb. 5.4-16 Produkte TycA/ProCAT-LeuCATTe: Autoradiographie einer DC-Analyse der nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-BuOH/CHCl₃ in der organischen Phase erhaltenen Produkte. Laufmittel n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1). Pfeile am rechten Rand der Darstellung markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen. LPhe und LLeu wurden [¹⁴C]-markiert, LPro [³H]-markiert eingesetzt. Dadurch erklärt sich die geringe Intensität der Banden in Spur 6.

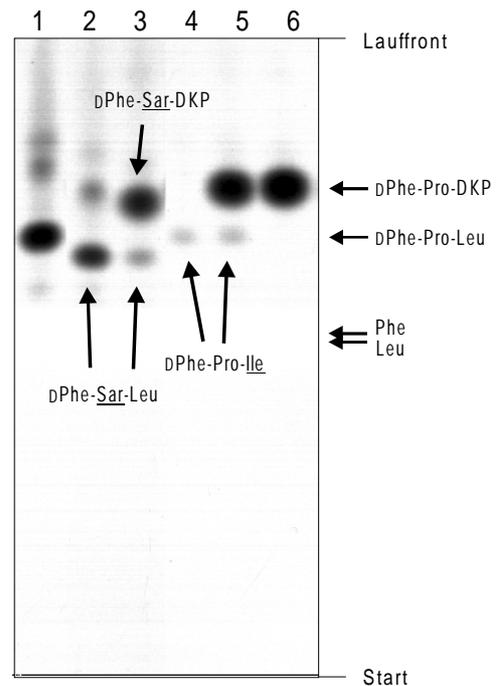
- Spur 1: F , P , L* - TycA (Kontrolle)
- Spur 2: F , P , L* - LPhe (Kontrolle)
- Spur 3: F , P , L* - LPro (Kontrolle)
- Spur 4: F , P , L*
- Spur 5: F*, P , L
- Spur 6: F , P*, L



Anschließend wurde das System TycA + ProCAT-LeuCATTe auf Toleranz gegenüber anderen Substraten getestet. Durch die Untersuchungen der von ProCAT-LeuCATTe katalysierten Adenylierungsreaktionen (s. 5.4.4.1) war bereits bekannt, daß unter anderem Sarkosin von der ProA-Domäne und Llle sowie dLeu von der LeuA-Domäne akzeptiert wurden. Diese Substrate wurden anstelle von LPro, bzw. LLeu für die Tripeptidbildung eingesetzt. Die Produkte wurden nur nach der gleichen Methode mittels DC analysiert. Dabei gelang es offensichtlich, Substitutionen an der zweiten Position zu bewirken und die Tripeptide DPhe-Sar-[¹⁴C]-Leu bzw. [¹⁴C]-DPhe-Sar-Leu zu produzieren (s. Abb. 5.4-17). An der dritten Position konnte offensichtlich Leu gegen Ile substituiert werden und die Produkte DPhe-Pro-[¹⁴C]-Ile bzw. [¹⁴C]-DPhe-Pro-Ile erzeugt werden. Im Gegensatz dazu schien das System nicht in der Lage, nach Aktivierung von dLeu dieses in ein putatives Produkt [¹⁴C]-DPhe-Pro-dLeu einzubauen, es sei denn, dieses Produkt hätte zufällig das gleiche Laufverhalten wie DPhe-Pro-DKP, und wäre aus diesem Grund von dessen Bande nicht zu unterscheiden gewesen (s. Abb. 5.4-17).

Abb. 5.4-17 Substrattoleranz TycA/ProCAT-LeuCATTe: Autoradiographie einer DC-Analyse der nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-BuOH/CHCl₃ in der organischen Phase erhaltenen Produkte. Laufmittel n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1). Pfeile am rechten Rand der Darstellung markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen. Pfeile innerhalb der Abbildung markieren die durch Substratsubstitution erhaltenen neuen Produkte (vergl. Abb. 5.4-16). Sar = Sarkosin.

Spur 1: F , P , L*
 Spur 2: F , Sar, L*
 Spur 3: F*, Sar, L
 Spur 4: F , P , Ile*
 Spur 5: F*, P , Ile
 Spur 6: F*, P , dLeu

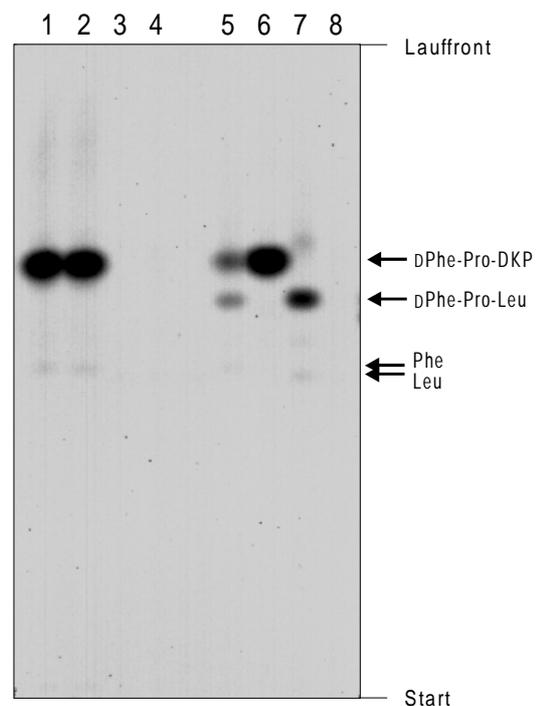


Mit dem System TycA/ProCAT-LeuCAT sollte untersucht werden, ob die beobachtete Tripeptidbildung durch eine katalytische Funktion der Te-Domäne bei der Abspaltung des Tripeptidbildung durch eine katalytische Funktion der Te-Domäne bei der Abspaltung des Produktes unterstützt wurde, oder ob das Produkt auch ohne Te-Domäne vom Enzym abgespalten werden konnte. In Abbildung 5.4-18 ist die Autoradiographie der DC-Analyse der Reaktionsprodukte gezeigt.

**Abb. 5.4-18 Bedeutung der Te-Domäne für die Produkt-
 abspaltung:** Autoradiographie einer DC-Analyse der nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-BuOH/CHCl₃ (4:1 (v/v)) in der organischen Phase erhaltenen Produkte. Pfeile am rechten Rand der Darstellung markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen. Laufmittel n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1).

Spur 1 - 4: TycA/ProCAT-LeuCAT
 Spur 5 - 8: TycA/ProCAT-LeuCATTe

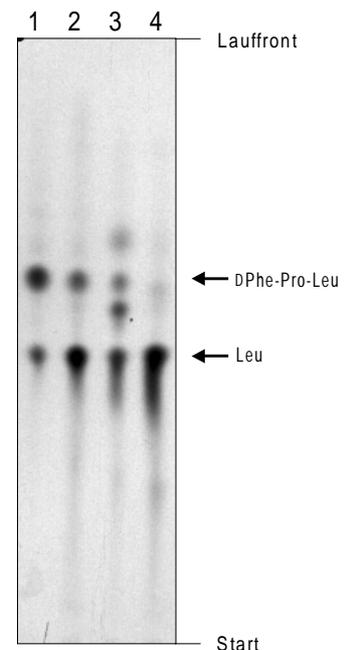
Spur 1 + 5: F*, P , L
 Spur 2 + 6: F*, P , -
 Spur 3 + 7: F , P , L*
 Spur 4 + 8: - , P , L*



Das System ohne Te-Domäne bildete [^{14}C]-DPhe-Pro-DKP, konnte jedoch weder [^{14}C]-DPhe-Pro-Leu noch DPhe-Pro- ^{14}C -Leu abspalten. Durch eine Thioesterspaltung konnte aber nachgewiesen werden, daß das Tripeptid DPhe-Pro- ^{14}C -Leu enzymgebunden gebildet wurde und somit offensichtlich alle enzymatischen Aktivitäten intakt waren (s. Abb. 5.4-19). Dieses Ergebnis unterstützte nochmals die Modellvorstellung, daß die Te-Domäne die Produktabspaltung katalysierte.

Abb. 5.4-19 Thioesterspaltung TycA/ProCAT-LeuCAT und TycA/ProCAT-LeuCATTe: Autoradiographie einer DC-Analyse der durch Thioesterspaltung gewonnenen enzymgebundenen Zwischenprodukte. Laufmittel n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1). Pfeile am rechten Rand der Darstellung markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen. Die Präsenz einer schwachen Bande in Spur 3 mit dem Laufverhalten von DPhe-Pro-Leu wird mit geringen Resten von LPhe in den Enzympräparationen erklärt.

TycA/ProCAT-LeuCAT:	Spur 1: F, P, L*
	Spur 3: -, P, L*
TycA/ProCAT-LeuCATTe:	Spur 2: F, P, L*
	Spur 4: -, P, L*



5.4.6 Untersuchungen zum Mechanismus der Te-Domäne

5.4.6.1 Die Te-Domäne „in trans“ als eigenständiges Enzym

Mit dem System TycA/ProCAT-LeuCAT konnte die Bildung des enzymgebundenen Tripeptides DPhe-Pro-Leu gezeigt werden. Nachfolgend wurde untersucht, ob die Te-Domäne auch „in trans“, als eigenständiges Enzym, katalytisch aktiv sein konnte. Wie in Kapitel 5.4.3 beschrieben, konnte die Te-Domäne als lösliches Proteinfragment in *E. coli* produziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dieses Protein wurde nun in verschiedenen molaren Verhältnissen (1:1, 2:1, 5:1 und 10:1) mit dem System TycA/ProCAT-LeuCAT unter den Standardbedingungen mit [^{14}C]-Leu inkubiert. Die Autoradiographie der DC-Analyse der organischen Phasen dieser Reaktionen sind in Abbildung 5.4-20 dargestellt. In Abhängigkeit der Konzentration der Te-Domäne entstand ein Produkt, dessen Laufverhalten mit dem des DPhe-Pro-Leu-Standards übereinstimmte. Die

Te-Domäne war also als eigenständiges Enzym in der Lage, das Leu-Modul des Enzyms ProCAT-LeuCAT mit dem darauf gebundenen Tripeptid als Substrat zu erkennen und hydrolytisch zu spalten. Diese Reaktion war jedoch deutlich ineffizienter als im „in cis“-System TycA/ProCAT-LeuCAT_{Te}, in dem die Te-Domäne einen integrierten Bestandteil des Leu-Moduls darstellte.

Abb. 5.4-20 TycA/ProCAT-LeuCAT mit Te-Domäne in trans:

Autoradiographie einer DC-Analyse der nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-BuOH/CHCl₃ (4:1 (v/v)) in der organischen Phase erhaltenen Produkte. Pfeile am rechten Rand der Darstellung markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen. In Abhängigkeit der Konzentration der als eigenständiges Protein zugegebenen Te-Domäne wird das enzymgebundene Tripeptid DPhe-Pro-Leu abgespalten. Zur Visualisierung der geringen Produktmengen wurde der Film lange aufliegen gelassen. Dadurch erklärt sich die hohe Intensität der LLeu Bande und der obersten Bande, die ein nicht identifiziertes Nebenprodukt darstellt. Laufmittel n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1). [¹⁴C]-L-Leu als radioaktiv markierte Aminosäure.

Spur 1: ohne Te

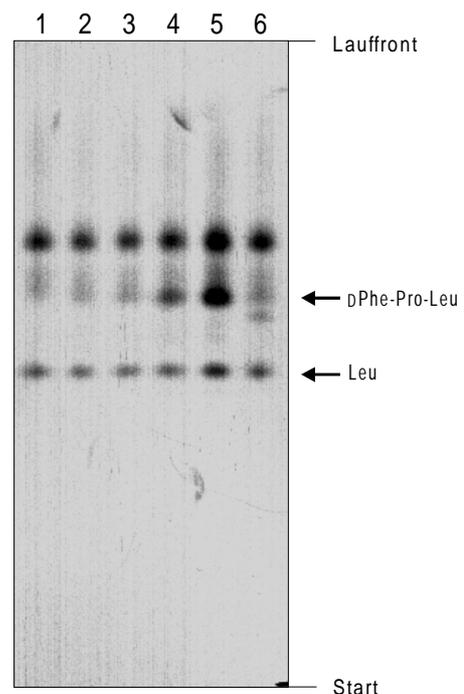
Spur 2: + Te (1:1 molares Verhältnis)

Spur 3: + Te (2:1)

Spur 4: + Te (5:1)

Spur 5: + Te (10:1)

Spur 6: + Te (2:1) + 67 mM Glycerin



5.4.6.2 Nukleophil-Studien an der Te-Domäne

Die in den vorherigen Kapiteln (5.4.5.3 und 5.4.6.1) beschriebenen Ergebnisse zur enzymatischen Produktion von DPhe-Pro-Leu waren zu Beginn der Untersuchungen von großen Komplikationen begleitet. Zwar wurde in den DC-Analysen stets die mit dem erwarteten Produkt korrespondierende Bande identifiziert, jedoch repräsentierte eine weitere Bande mit leicht unterschiedlichem Laufverhalten das Hauptprodukt der Reaktion. Außerdem war ein deutlich höherer Hintergrund festzustellen, der sich in den Autoradiographien der DC-Analysen als „Schmier“ äußerte. Als Ursache für diese Befunde wurde das in allen Ansätzen gegenwärtige Glycerin festgestellt (alle Proteine wurden routinemäßig nach ihrer Aufreinigung mit 10 % Glycerin (v/v) versetzt und so bei -80°C zur Lagerung eingefroren). In diesem Kapitel sind die Untersuchungen beschrieben, die den Effekt des Glycerins aufklären sollten.

Mit dem System TycA/ProCAT-LeuCAT_{Te} wurde wie beschrieben die Produktion des Tripeptides DPhe-Pro-[¹⁴C]-Leu unternommen. Zusätzlich wurden Reaktionsansätze durchgeführt, in denen eine steigende Konzentration von Glycerin zugegen war. Die Autoradiographie der DC-Analyse der in der organischen Phase befindlichen Produkte ist in Abbildung 5.4-21 dargestellt.

Abb. 5.4-21 Effekt von Glycerin im System

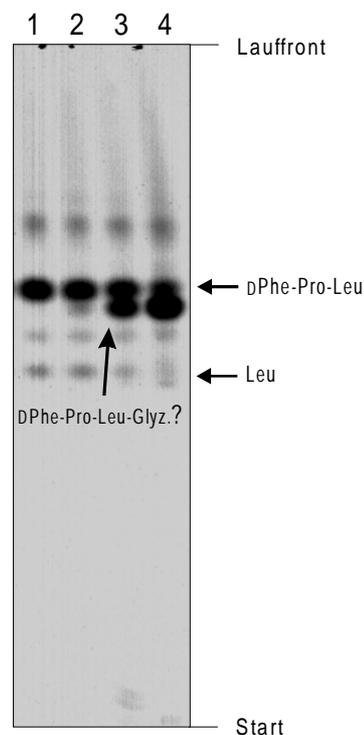
TycA/ProCAT-LeuCAT_{Te}: Autoradiographie einer DC-Analyse der nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-BuOH/CHCl₃ (4:1 (v/v)) in der organischen Phase erhaltenen Produkte. Pfeile am rechten Rand der Darstellung markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen. [¹⁴C]-L-Leu als radioaktiv markierte Aminosäure. Laufmittel: n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1).

Spur 1: + 0,13 mM Glycerin

Spur 2: + 1,30 mM Glycerin

Spur 3: +13,4 mM Glycerin

Spur 4: + 67,0 mM Glycerin



Bereits bei einer Konzentration von 1,3 mM Glycerin konnte eine zusätzliche Bande ausgemacht werden, die in ihrer Intensität, relativ zu der DPhe-Pro-[¹⁴C]-Leu repräsentierenden Bande, mit steigender Glycerin-Konzentration zunahm. Bei einer Konzentration von 67 mM Glycerin repräsentierte sie das Hauptprodukt der Reaktion. Die MS-Analyse eines so im präparativen Maßstab erhaltenen Produktgemisches zeigte das Hauptsignal bei $M^+ = 450$ (ein schwaches Signal von $M^+ = 376$ war dem Tripeptid DPhe-Pro-Leu ($M = 375,5$) zuzuordnen, s. Anhang Abb. 7.1). Dies entsprach der errechneten Masse eines DPhe-Pro-Leu-Glycerin Adduktes ($M = 449,5$). Ein ähnlicher Effekt konnte nicht mit dem System TycA/ProCAT-LeuCAT beobachtet werden. Hier war auch mit Glycerin-Zugabe nicht die Bildung eines [¹⁴C]-Leu markierten Produktes feststellbar. Wurde jedoch die Te-Domäne „in trans“ und Glycerin zugegeben, so glich das durch DC-Analyse erhaltene Produktmuster dem des Systems mit Te-Domäne „in cis“ (s. Abb. 5.4-20). Der Glycerin-Effekt wurde also offensichtlich durch die Te-Domäne vermittelt.

Die Berücksichtigung der postulierten Rolle der Te-Domäne im natürlichen, intakten Tyrocidin Synthetasekomplex führte zu folgender Interpretation der Daten: Die Te-Domäne

fungiert als Zyklase, das heißt sie bindet in ihrem katalytischen Zentrum das letzte Intermediat der Tyrocidin Biosynthese, das lineare Dekapeptid, und zyklisiert es in einem Mechanismus der dem der Serin-Proteasen ähnelt. Dabei wird die Peptidkette als Ester im katalytischen Zentrum der Te-Domäne gebunden. Durch Katalyse des nukleophilen Angriffs der Aminogruppe des N-terminalen D-Phenylalanins auf die aktivierte Carboxygruppe des C-terminalen Leucins wird die letzte Peptidbindung gebildet, die zum zyklischen Produkt führt. Bei Richtigkeit dieser Hypothese wäre eine funktionelle Optimierung der Te-Domäne im Laufe der Evolution verständlich, die zur Unterdrückung des nukleophilen Angriffs eines Wassermoleküls führt, da durch eine Hydrolyse das mit viel energetischem Aufwand synthetisierte lineare Dekapeptid als Vorstufe für das zyklische Endprodukt verloren wäre. Es wäre somit zu erwarten, daß die Te-Domäne, auch in einem nun künstlich veränderten System, den Eintritt von Wasser als Nukleophil zugunsten des Eintritts des gewünschten oder besseren Nukleophils zu unterbinden versucht. Dagegen können andere geeignete Nukleophile, wie Glycerin, relativ ungehindert ins katalytische Zentrum vordringen.

Zur Prüfung dieser Theorie wurde folgendes Experiment durchgeführt: Als Mimikri des N-Terminus des linearen Dekapeptidintermediates wurde dem Reaktionsansatz (TycA/ProCAT-LeuCATTe, [^{14}C]-Leu) in steigenden Konzentrationen das Dipeptid DPhe-Pro zugegeben. In Kontrollversuchen wurden die Reaktionen mit denselben Konzentrationen an LPhe-Pro, DPhe und LPhe versetzt. Die Autoradiographien der DC-Analysen der Produkte in der organischen Phase (s. Abb. 5.4-22) zeigten, daß nur in Reaktionen mit DPhe-Pro, und in Abhängigkeit von dessen Konzentration, ein neue Bande auftrat. Diese Bande entsprach in ihrem Laufverhalten einem Produkt, das hydrophober als das Tripeptid DPhe-Pro-Leu ist. Die MS-Analyse des Produktgemisches in der organischen Phase eines präparativen Ansatzes zeigte unter anderem ein deutliches Signal von $M^+ = 621$, das der errechneten Masse des Pentapeptides DPhe-Pro-Leu-DPhe-Pro ($M = 619,8$) entsprechen würde (s. Anhang Abb. 7.1). Das Hauptsignal in dieser Analyse war dem Tripeptid DPhe-Pro-Leu zuzuordnen ($M^+ = 376$).

- Spur 1: normaler Reaktionsansatz (1 mM LPhe)
 Spur 2: + 10 mM DPhe
 Spur 3: + 10 mM LPhe
 Spur 4: + 10 mM DPhe-Pro
 Spur 5: + 20 mM DPhe-Pro
 Spur 6: + 30 mM DPhe-Pro
 Spur 7: + 40 mM DPhe-Pro
 Spur 8: + 50 mM DPhe-Pro
 Spur 9: + 10 mM LPhe-Pro
 Spur 10: + 20 mM LPhe-Pro
 Spur 11: + 40 mM LPhe-Pro
 Spur 12: + 10 mM DPhe-Ala

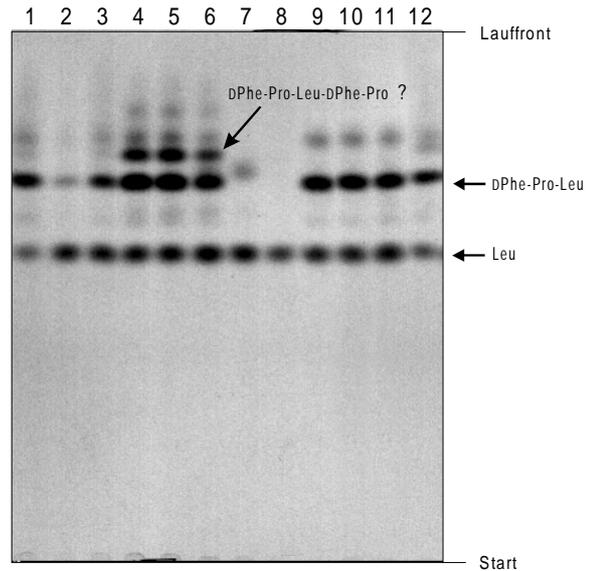


Abb. 5.4-22 Spezifität der Te-Domäne: Der Effekt verschiedener Nukleophile im Reaktionsansatz TycA/ProCAT-LeuCATTe wurde untersucht. Autoradiographie einer DC-Analyse der nach Extraktion der Reaktionsansätze mit n-BuOH/CHCl₃ (4:1 (v/v)) in der organischen Phase erhaltenen Produkte. Pfeile am rechten Rand der Darstellung markieren das Laufverhalten der chemischen Standardverbindungen. [¹⁴C]-L-Leu als radioaktiv markierte Aminosäure. Laufmittel: n-BuOH-H₂O-AcOH-EEE (1:1:1:1).

Abbildung 5.4-23 faßt alle Produktbildungsreaktionen des Systems TycA/ProCAT-LeuCATTe zusammen.

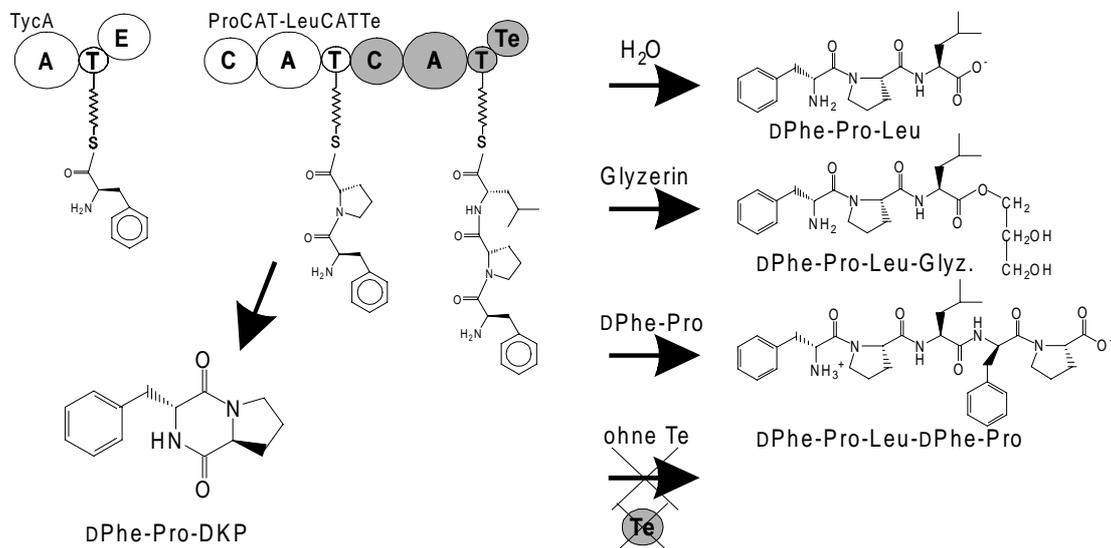


Abb. 5.4-22 Die Systeme TycA/ProCAT-LeuCAT(Te): Die Produktpalette dieses Hybridenzymkomplexes konnte durch Zugabe verschiedener Nukleophile gesteuert werden. Mit Glyzerin wurde bevorzugt das DPhe-Pro-Leu-Glyzerin Addukt synthetisiert, während DPhe-Pro, ein Mimikri des natürlichen Substrates in der Tyrocidin Biosynthese, zur Bildung des Pentapeptides DPhe-Pro-Leu-DPhe-Pro-Leu führte. Ohne Te-Domäne konnte kein Leucin-haltiges Produkt abgespalten werden. DPhe-Pro entstand durch intramolekulare Zyklisierung des enzymgebundenen Dipeptids.

5.5 4'-Phosphopantetheintransferasen des primären und sekundären Metabolismus

5.5.1 Strategie

Peptidsynthetasen binden in Analogie zu Fettsäure- und Polyketidsynthetasen ihre Syntheseintermediate als Thioester über den enzymgebundenen Kofaktor 4'-Phosphopantethein. Dabei weisen die T-Domänen, oder Peptidyl-carrier Proteine (PCPs), Homologien zu den Acyl-carrier Proteinen (ACPs) der Fettsäure- und Polyketidsynthetasen auf. Insbesondere ist ein Sequenzmotiv, das den als Ppant-Bindungsstelle fungierenden invarianten Serinrest enthält, unter allen drei Proteinen sehr gut konserviert.

Spezifitätsstudien an verschiedenen Ppant-Transferasen von Lambalot *et al.* [Lambalot *et al.*, 1996] (s. Einleitung 2.2.4) waren der Ausgangspunkt für die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten. Es sollte untersucht werden, ob die mit der nichtribosomalen Peptidbiosynthese assoziierten Ppant-Transferasen die Funktion von ACPs *in vivo* übernehmen können. Dazu sollte das Gen *acps* in *E. coli* unterbrochen werden, und die Möglichkeit der Komplementation mit den Genen wie *sfp* und *gsp* getestet werden.

5.5.2 Konstruktion einer *acps*-Unterbrechung in *E. coli*

Zur Unterbrechung eines Gens im Chromosom von *E. coli* wurde nach der Methode von Gutterson und Koshland [Gutterson & Koshland, 1983] verfahren. Ein *E. coli* Stamm, der eine *polA* Mutation besitzt, ist nicht mehr in der Lage Plasmide zu replizieren, die einen ColE1 Replikationsursprung besitzen. In ein solches Plasmid (das die Resistenz gegen Antibiotikum xy vermittelt) konstruiert man das mit einer Antibiotikaresistenzkassette (Antibiotikum yz) unterbrochene Gen mitsamt 5'- und 3'-flankierenden Bereichen. Nach Transformation der Zellen mit dem Plasmid wird auf yz-resistente Kolonien selektiert. Unter diesen kann zwischen single-crossover (yz^f , xy^f) und double-crossover Integrationen (yz^f , xy^s) unterschieden werden.

Da es sich bei *acps* aus *E. coli* um ein essentielles Gen handelt [Polacco & Cronan, 1981; Takiff *et al.*, 1992], sollte die Unterbrechung mit Hilfe des Plasmides pTrc99a-5'-*acps*::Km^R-3' (Konstruktion s. Tab 5.5-2) nur gelingen, wenn gleichzeitig ein komplementierendes Gen in der Zelle exprimiert wird. Tatsächlich führte die Transformation des *polA*-Stammes HSK42 mit pTrc99a-5'-*acps*::Km^R-3' nur zu single-crossover Integrationen (300 getestete Kolonien). Deshalb wurde zunächst das Gen *sfp* unter Kontrolle

des *lac*-Promotors in das Chromosom von HSK42 integriert (nachfolgend beschrieben, Konstruktion des notwendigen Plasmides siehe Tabelle 5.5-2). Die Expression von *sfp* in diesem Stamm, HM0072, wurde durch Western-Blotting mit anti-Sfp Antikörpern verifiziert. Jedoch auch nach Transformation von HM0072 mit pTrc99a-5'-*acps*::Km^R-3' wurden keine double-crossover Integrationen erhalten, die zur Unterbrechung von *acps* geführt hätten (ca. 500 Kolonien getestet). Die Strategie, die schließlich zum Erfolg führte, war die Integration einer zweiten Kopie von *acps* in das Chromosom von HSK42. Anschließend wurde mit pTrc99a-5'-*acps*::Km^R-3' die Originalkopie von *acps* mit einem double-crossover unterbrochen. Diese chromosomale Konstruktion konnte dann mittels P1-Phagen Transduktion in andere *E. coli* Stämme transduziert werden. Diese Strategie ist nachfolgend beschrieben.

Zur Integration von *sfp* und *acps* in das *E. coli* Chromosom wurde der *nrdD*-Lokus ausgewählt. *nrdD* kodiert für die anaerobe Ribonukleotid Reduktase, die unter normalen, aeroben Wachstumsbedingungen nicht essentiell ist [Sun *et al.*, 1993]. Außerdem lag bereits das Plasmid pUC18-*nrdD* vor [Bouzon & Marlière, 1994] (Konstruktion aller Plasmide in Tabelle 5.5-2 beschrieben).

Der *E. coli* Stamm HSK42 wurde per Elektroporation mit dem ColE1-Plasmid pUC18-*nrdD*::*acps*-Sp^R transformiert. Nach Selektion auf Sp-Resistenz erhaltene Kolonien wurden durch Umstreichen auf neue Platten in zwei Phänotypen, Amp^RSp^R und Amp^SSp^R, unterteilt. Aus den Amp^SSp^R-Kolonien wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden HM98-20 und HM98-21 (s. Tab. 7.1) die im *nrdD*-Lokus erfolgte Insertion bestätigt und die double-crossover Intergration verifiziert. In dem so erhaltenen Stamm HSK42 (*nrdD*::*acps*-Sp^R), HM0139, lagen nun zwei Kopien von *acps* vor, so daß die Unterbrechung der Originalkopie angegangen werden konnte. Dazu wurde HM0139 per Elektroporation mit dem ColE1-Plasmid pTrc99a-5'-*acps*::Km^R-3' transformiert. Die Km^R-Kolonien wurden wiederum auf Amp^S getestet, um Kandidaten für double-crossover Integrationen zu identifizieren. Von 59 erhaltenen Kolonien war 1 Kolonie sensitiv gegenüber Ampicillin. Eine PCR-Analyse belegte, daß hier am *acps*-Lokus tatsächlich eine double-crossover Intergration stattgefunden hatte. Gleichmaßen wurde durch PCR die Präsenz der Ersatzkopie von *acps* im *nrdD*-Lokus bestätigt. Dieser Stamm, HSK42 (*nrdD*::*acps*-Sp^R, *acps*::Km^R), Stammbezeichnung HM0145, war das erforderliche Werkzeug für die weiterführenden Arbeiten.

Nun sollte getestet werden, ob die chromosomale Region, die im Stamm HM0145 das mit einer Kanamycin-Resistenzkassette unterbrochene *acps*-Gen enthielt, mittels P1-Phagen in andere Stämme transduzierbar war. Von HM0145 wurde ein P1-Phagenlysatsat präpariert und zur Infektion der folgenden Stämme verwendet: Als Negativkontrollen *E. coli* K-Wildtyp (MG1655) und das Wildtypderivat β 2033 mit dem (leeren) Vektor pTZ18, sowie als Positivkontrolle β 2033 mit dem Plasmid pET22b-*acps*. Nur bei letzterem Stamm, der das Gen *acps* auf einem Plasmid trug, konnten nach Transduktion Kanamycin resistente Kolonien erhalten werden. Ihr chromosomaler *acps*::Km^R Genotyp wurde per PCR-Analyse verifiziert. Somit konnte gezeigt werden, daß der *acps*::Km^R Genotyp transduzierbar war. In den Kontrollansätzen konnten keine Km^R-Kolonien erhalten werden. Dies war ein weiterer Hinweis auf die essentielle Natur von *acps*.

5.5.3 Komplementation der *acps*-Mutante mit PPTasen des Sekundärmetabolismus

Mit Hilfe des per P1-Phagen transduzierbaren Genotyp *acps*::Km^R konnte getestet werden, ob andere für Ppant-Transferasen kodierende Gene in der Lage waren, *acps in vivo* zu komplementieren. Dazu wurden *E. coli* K-12 Stämme verwendet, die Plasmide mit den zu testenden Genen unter der Kontrolle induzierbarer Promotoren trugen. Diese Stämme wurden mit dem P1-Phagenlysatsat von Stamm HM0145 infiziert und auf Kanamycin-resistente Transduktanten selektiert. Auf diese Weise erhaltene Transduktanten, in denen durch PCR-Analyse tatsächlich der Genotyp *acps*::Km^R nachgewiesen werden konnte, wiesen auf die Fähigkeit des auf dem Plasmid befindlichen Gens zur Komplementation von *acps* hin.

Dieses Experiment wurde mit folgenden für Ppant-Transferasen kodierenden Genen durchgeführt: (1) *sfp* aus dem Surfactin-Biosynthesecluster von *Bacillus subtilis* (unter Verwendung des Plasmides pUC8-*sfp*, [Nakano *et al.*, 1992]). (2) *gsp* aus dem Gramicidin S-Biosynthesecluster von *Bacillus brevis* ATCC 9999 (pTZ19-*gsp*, [Borchert *et al.*, 1994]). (3) *entD* aus *E. coli*, das die Enterobactin Synthetasen modifiziert (pTZ18-*entD*, [Lambalot *et al.*, 1996]). (4) *yhhU*, ein Gen unbekannter Funktion aus *E. coli*, dessen Genprodukt Homologien zu Ppant-Transferasen hat (pQE60-*yhhU*, [Lambalot *et al.*, 1996]). Außerdem wurde mit zwei weiteren Konstruktionen getestet, wie sich die zur Verfügung gestellte Kopienzahl von *sfp* in diesen Experimenten auswirkte. Während pUC8-*sfp* ein high-copy Plasmid mit ca. 600 Kopien pro Zelle ist, wird das Plasmid pSU18-*sfp* nur mit etwa 10-12 Kopien pro Zelle repliziert [Miller, 1992]. Schließlich wurde die chromosomale Konstruktion getestet, bei der

sfp in nur einer einzigen Kopie im *nrdD*-Lokus integriert war. In allen diesen drei Fällen befand sich *sfp* in identischer Organisation unter der Kontrolle des *lac*-Promotors.

Wie in Tabelle 5.5-1 dargestellt, konnten in allen Fällen nach P1-Phageninfektion mit einem Lysat von HM0145 Kanamycin-resistente Transduktanten isoliert werden. Lediglich *entD* konnte offensichtlich *acps* nicht *in vivo* komplementieren, da hier, ebenso wie in den Kontrollansätzen mit pTZ18 bzw. ohne Plasmid, keine Km^R-Transduktanten erhalten werden konnten. Der *acps*::Km^R Genotyp der mit Hilfe von *sfp*, *gsp*, *yhhU* erhaltenen Km^R-Transduktanten wurde anschließend durch PCR verifiziert. Die Anzahl der erhaltenen Km^R-Transduktanten war stets von der Menge des zur Infektion eingesetzten P1-Phagenlysats abhängig. Um die unwahrscheinliche Ko-transduktion des *nrdD*::*acps*-Sp^R Genotyps von HM0145 auszuschließen, wurden die erhaltenen Transduktanten stets auf Sensitivität gegenüber Spectinomycin getestet. Zusätzlich wurde mittels PCR und den Oligonukleotiden HM98-20 und HM98-21 verifiziert, daß der *nrdD*-Lokus intakt geblieben war.

Tabelle 5.5-1 Komplementation von *acps* durch Ppant-Transferasen des Sekundärmetabolismus

Plasmid bzw. chromosomale Insertion	in <i>E. coli</i> Stamm	Stammbezeichnung	Transduktion des <i>acps</i> ::Km ^R Genotyps möglich*
-	K-12 MG1655	HM0045	-
pTZ18	K-12 MG1655	HM0169	-
pUC8- <i>sfp</i>	K-12 MG1655	HM0170	+
pSU18- <i>sfp</i>	K-12 MG1655	HM0195	+
<i>nrdD</i> :: <i>sfp</i> -Sp ^R	K-12 β2033	HM0079	+
pTZ19- <i>gsp</i>	K-12 MG1655	HM0171	(+)
pTZ18- <i>entD</i>	K-12 MG1655	HM0201	-
pQE60- <i>yhhU</i>	K-12 MG1655	HM0218	+

* „+“ = normales Wachstum, „(+“ = schlechteres Wachstum

Die Komplementation von *acps* durch *gsp* schien ineffizienter als beispielsweise durch *sfp*. Dies äußerte sich durch schlechteres Wachstum der entsprechenden Km^R-Transduktanten auf festem Medium. Neben einer möglichen unterschiedlichen Spezifität der Genprodukte könnte die Ursache auch in der schlechten Löslichkeit von *Gsp* liegen [Borchert *et al.*, 1994]. Bemerkenswert ist, daß die Expression von *sfp* selbst von einer einzigen chromosomalen Kopie für eine *acps*-Komplementation ausreichend war. Das *E. coli* eigene Gen *yhhU* kann

dagegen nicht von seiner chromosomalen Kopie, sondern nur auf einem Multikopien-Vektor komplementierend wirken. Es wurde nicht geklärt, ob dieser Befund durch zu geringe Aktivität des Enzyms oder durch nicht ausreichende Expression des chromosomalen Allels zu erklären ist. In allen in Kapitel 5.5 beschriebenen Transduktionsexperimenten des *acps::Km^R* Genotyps, auch in den Kontrollen mit leeren Vektor in den Rezipientenzellen, konnten nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37°C kleine *Km^R*-Transduktanden isoliert werden, die sich nach Umstreichen auf *Km⁶⁰*-Platten offensichtlich wie Wildtyp verhielten. Ihr *acps::Km^R* Genotyp wurde durch PCR-Kontrolle bestätigt. Siehe die Diskussion (Kapitel 6.5-1) zur eventuellen Erklärung dieses Effektes durch eine Suppressormutation im Gen *yhhU*.

Tabelle 5.5-2 führt alle in diesem Abschnitt verwendeten Plasmide und gegebenenfalls deren Konstruktion auf.

Tabelle 5.5-2 Konstrukte mit P_{ant}-Transferasen kodierenden Genen*

Plasmid	Resistenz(en)	Replikon	ggf. Literaturstelle
pET22b-acps	Amp	ColE1	[Lambalot & Walsh, 1995]
pET22b-acps-Sp ^R	Amp Sp	ColE1	diese Arbeit
pTZ18-acps-Sp ^R	Amp Sp	ColE1	diese Arbeit
pUC18-nrdD	Amp	pMB1	[Bouzon & Marlière, 1994]
pUC18-nrdD::acps-Sp ^R	Amp Sp	pMB1	diese Arbeit
pUC8-sfp	Amp	pMB1	[Nakano <i>et al.</i> , 1992]
pUC8-sfp-Sp ^R	Amp Sp	pMB1	diese Arbeit
pUC18-nrdD::sfp-Sp ^R	Amp Sp	pMB1	diese Arbeit
pSU18-sfp	Cm	P15A	diese Arbeit
pTrc99a-5'-acps-3'	Amp	ColE1	diese Arbeit
pTrc99a-5'-acps::Km ^R -3'	Amp Km	ColE1	diese Arbeit
pGsp+	Amp	ColE1	[Borchert <i>et al.</i> , 1994]
pTZ19-gsp	Amp	ColE1	diese Arbeit
pTZ19-gsp-Km ^R	Amp Km	ColE1	diese Arbeit
pUC18-nrdD::gsp-Km ^R	Amp Km	pMB1	diese Arbeit
pQE60-yhhU	Amp	ColE1	diese Arbeit
pET28(b)-entD	Km	ColE1	[Lambalot <i>et al.</i> , 1996]
pTZ18-entD	Amp	ColE1	diese Arbeit
pTZ18-acps B.sub	Amp	ColE1	diese Arbeit
pSU18-acps B.sub	Cm	p15A	diese Arbeit

ColE1=15-20 Kopien pro Zelle; pMB1=500-700; P15A=10-12 nach [Miller, 1992]

*Konstruktion der Plasmide (für Oligonukleotide s. Anhang Tab. 7.1): **pUC18-nrdD::acps-Sp^R**: Das Plasmid **pET22b-acps** wurde mit *Hind*III linearisiert und mit der *Hind*III-geschnittenen Spectinomycin-Resistenzkassette (Sp^R) aus pDG1726 ligiert. Aus dem so erhaltenen Plasmid **pET22b-acps-Sp^R** wurde mit *Bgl* II/*Sph* I das *acps*

und Sp^R-Kassette enthaltene Fragment ausgeschnitten und mit dem Vektor pTZ18, der mit *Bam* HI/*Sph* I geschnitten worden war, ligiert. Das resultierende Plasmid **pTZ18-acps-Sp^R** wurde als Templat für eine PCR mit den Oligonukleotiden 5'-pTZlac und 3'-pTZlac eingesetzt. So konnte ein Fragment amplifiziert werden, das zusätzlich zu *acps* und Sp^R-Kassette den *lac*-Promotorbereich vor *acps* enthielt. Dieses wurde schließlich „blunt-end“ in *Eco* RV-geschnittenen Vektor **pUC18-nrdD** ligiert. **pUC18-nrdD::sfp-Sp^R**: Der Vektor pUC8-sfp wurde mit *Hinc* II linearisiert und mit der *Eco* RV/*Hinc* II-geschnittenen Sp^R-Kassette aus pDG1726 [Guérout-Fleury *et al.*, 1995] ligiert. Aus dem so erhaltenen Plasmid **pUC8-sfp-Sp^R** wurde mit *Pvu* II ein Fragment ausgeschnitten, das das gesamte Insert und den *lac*-Promotorbereich des Vektors enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem Vektorfragment von **pUC18-nrdD** ligiert, das durch *Eco* RV-Restriktion erhalten wurde. **pSU18-sfp**: Das durch Restriktion mit *Eco* RI und *Pst* I erhaltene Insert aus **pUC8-sfp** wurde in gleichermaßen geschnittenen pSU18 ligiert. **pTrc99a-5'-acps::Km^R-3'**: Aus chromosomaler DNA von *E. coli* K-12 MG1655 wurde mittels PCR und den Oligonukleotiden HM98-16 und HM98-17 ein Fragment amplifiziert (2080 bp), das *acps* (381 bp) mit flankierenden Bereichen enthielt. Dieses Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Nco* I und *Xba* I geschnitten, deren Erkennungssequenzen mit den verwendeten Oligonukleotide eingeführt wurden. Nach Ligation in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pTrc99a konnte das Plasmid **pTrc99a-5'-acps-3'** erhalten werden. Die *Sac* I Erkennungssequenz im Gen *acps* wurde für die Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette (Km^R) aus pTZ18-Km-Sac I verwendet. **pTZ19-gsp**: Das *gsp* enthaltene Fragment aus pGsp+ wurde mit *Hind*III und *Pst* I ausgeschnitten und in gleichermaßen präparierten pTZ19R ligiert. **pQE60-yhhU**: Aus chromosomaler DNA von *E. coli* K-12 MG1655 wurde per PCR mit den Oligonukleotiden HM99-43 und HM99-44 ein Fragment amplifiziert, das *yhhU* mit Stopkodon enthielt. Nach Restriktion der durch die Oligonukleotide eingeführten Erkennungssequenzen von *Nco* I und *Bam* HI wurde in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pQE60 ligiert. **pTZ18-entD**: Aus **pET28(b)-entD** wurde mit *Xba* I und *Hind*III ein Fragment ausgeschnitten, das *entD* mitsamt ribosomaler Bindungsstelle und Stopkodon enthält. Dieses wurde in gleichermaßen geschnittenen Vektor pTZ18R ligiert. **pTZ18-acps B.sub**: Aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* JH642 wurde per PCR mit den Oligonukleotide HM98-18 und HM98-19 ein Fragment amplifiziert, das *acps B.sub* mitsamt ribosomaler Bindungsstelle und Stopkodon enthielt. Dieses wurde „blunt-end“ in *Hinc* II geschnittenen pTZ18 ligiert. **pSU18-acps B.sub**: Das durch Restriktion mit *Eco* RI und *Pst* I erhaltene Insert aus **pTZ18-acps B.sub** wurde in gleichermaßen geschnittenen pSU18 ligiert.

5.5.4 Identifizierung und genetische Charakterisierung von *acps* aus *B. subtilis*

Das Genom von *Bacillus subtilis* [Kunst *et al.*, 1997] enthält ein nicht charakterisiertes offenes Leseraster, das 366 bp große *ydcB*, dessen theoretisches Genprodukt YdcB (121 aa) Homologien zu ACPS (126 aa) aus *E. coli* hat (33,1 % Identität). Unter Verwendung der oben beschriebenen Methode sollte getestet werden, ob *ydcB* in der Lage war, *acps* in *E. coli* zu komplementieren.

Das Gen *ydcB* wurde unter Kontrolle des *lac*-Promotors in die Plasmide pTZ18 und pSU18, die sich durch ihre Kopienzahl in der Zelle von ca. 15-20 bzw. 10-12 unterscheiden

[Miller, 1992], kloniert (Plasmidkonstruktion s. Tab. 5.5-2). Die erhaltenen Plasmide pTZ18-acps B.sub und pSU18-acps B.sub wurden in Wildtyp *E. coli* K-12 MG1655 transformiert und die so resultierenden Stämme HM0172 bzw. HM0196 mit dem P1-Phagenlysat von HM0145 (*acps::Km^R*) infiziert. Durch Selektion auf Km^{60} wurden Km^R -Transduktanten erhalten, deren *acps::Km^R*-Genotyp durch PCR-Analyse verifiziert wurde (siehe Tabelle 5.5-3). Das gleiche Experiment mit Kontrollstämmen, die die (leeren) Plasmide pTZ18 bzw. pSU18 trugen, lieferte keine Km^R -Transduktanten. Somit wurde gezeigt, daß *ydcB* tatsächlich *acps* aus *E. coli* komplementieren konnte. Wahrscheinlich kodiert es für die Acyl-carrier-protein-Synthase aus *B. subtilis*. Das Gen *ydcB* wird daher in dieser Arbeit *acps* (B. sub) genannt, wie bereits in den Namen der verwendeten Plasmide geschehen.

Tabelle 5.5-3 Komplementation von *acps* aus *E. coli* durch *acps* aus *B. subtilis*

Plasmid bzw. chromosomale Insertion	in <i>E. coli</i> Stamm	Stammbezeichnung	Transduktion des <i>acps::Km^R</i> Genotyps möglich
pTZ18-acps B.sub	K-12 MG1655	HM0172	+
pSU18-acps B.sub	K-12 MG1655	HM0196	+

6 Diskussion und Ausblick

Die Natur bedient sich zweier genereller Systeme für die Synthese von Polypeptiden. Das ribosomale System wird durch Aminoacyl-tRNA Synthetasen, tRNAs, mRNAs, Ribosomen und weitere Faktoren vermittelt. Die nichtribosomale Peptidsynthese erfolgt dagegen durch multifunktionelle Peptidsynthetasen, deren Molekulargewichte in der gleichen Größenordnung wie das der gesamten Translationsmaschinerie liegen können. Die beiden Systeme sind unterschiedlichen evolutiven Anforderungen ausgesetzt. Die Überlebens- und Reproduktionsfähigkeit der Zellen basiert nicht zuletzt auf einer möglichst fehlerfreien Translation der genetischen Information. Das ribosomale System ist daher auf eine geringe Fehlerrate optimiert worden. Anpassung und Evolution wird durch Mutationen der in der DNA gespeicherten genetischen Information erreicht. Dagegen beinhalten Peptidsynthetasen als Proteinmatrizen sowohl die Synthesevorschrift als auch das katalytische Instrumentarium, diese in Produkte umzusetzen. Die evolutive Anforderung an die Peptidsynthetasen scheint zudem die Produktion einer möglichst großen strukturellen Vielfalt zu sein, da unter den so hergestellten Stoffen nützliche Kampfstoffe gegen Konkurrenten gefunden werden können. Demnach ist das nichtribosomale System auf genetischer, enzymatischer und architektonischer Ebene auf eine Flexibilität optimiert worden, die eine schnelle Umprogrammierung der Proteinmatrize erlaubt, sei es durch Genduplikation oder Spezifitätsänderungen der Substraterkennung- oder Verknüpfung.

Unter diesem Leitgedanken - Peptidsynthetasen selektiert auf Produktion struktureller Vielfalt - lassen sich auch die Ergebnisse dieser Arbeit verstehen und diskutieren. Die Sequenzanalyse des Tyrocidin Biosyntheseoperons weist die für Peptidsynthetasen typischen repetitiven Einheiten auf, die als Module semiautonom ihre Substrate erkennen und aktivieren und im Peptidsynthetaseverband dies entsprechend ihrer Anordnung innerhalb der multimodularen Enzyme bewerkstelligen. Die Ähnlichkeit mit den Gramacidin S Synthetasen läßt einen gemeinsamen Vorgänger dieser beiden System wahrscheinlich erscheinen. Adenylierungsdomänen weisen eine relativ geringe Substratspezifität auf, die zudem durch wenige gezielte Mutationen geändert werden kann. Die katalytische Eigenständigkeit von Modulen und Domänen spiegelt deren Verwendbarkeit als Bausteine für multifunktionelle Enzyme wider. So konnten künstliche Peptidsynthetasesysteme durch Moduldeletion bzw. -fusion auf DNA-Ebene erhalten werden. Diese Vorgehensweise kann auch als Simulation von Gendeletionen oder -duplikationen im Laufe der Evolution betrachtet werden. Die

Zugänglichkeit des Systems für solche Operationen unterstreicht das Potential für im Labor konstruierbare Peptidsynthetasen.

6.1 Das Tyrocidinbiosynthesystem: ein klassisches Beispiel der nichtribosomalen Peptidbiosynthese

Die Biosynthese des zyklischen Dekapeptides Tyrocidin war eines der ersten untersuchten Beispiele der nichtribosomalen Peptidsynthese. Nach der Entdeckung des Tyrocidins und seines Produzenten *Bacillus brevis* durch Hotchkiss und Dubos [Hotchkiss & Dubos, 1941] erkannten Mach und Tatum, daß dessen Synthese nicht durch die Dekodierung einer RNA-Matrize erfolgte [Mach *et al.*, 1963]. Eine erste Charakterisierung der als Templat fungierenden Biosyntheseenzyme erfolgte in den Arbeitsgruppen von Kurahashi [Fujikawa *et al.*, 1966; Kurahashi, 1974] und später Lipmann [Roskoski *et al.*, 1970a]. Durch umfangreiche Studien in den folgenden Jahren avancierten die Tyrocidin Synthetasen nach den Gramacidin S Synthetasen zu einem der am besten charakterisierten Systeme dieser Klasse. Es wurde klar, daß drei Enzyme, TycA, TycB und TycC, die schrittweise Synthese des Dekapeptides vom N- zum C- Terminus bewerkstelligten, in der die Kopf-Schwanz-Zyklisierung den letzten Schritt darstellte. TycA aktivierte die erste Aminosäure, TycB die folgenden drei und TycC die restlichen sechs. Der Nachweis aller Intermediate, vom Dipeptid DPhe-Pro bis zum Dekapeptid DPhe-Pro-Phe-DPhe-Asn-Gln-Tyr-Val-Orn-Leu, als Thioester an die Enzyme gebunden [Roskoski *et al.*, 1970b], trug wesentlich zur Entwicklung des „Thiotemplat“-Modells bei [Lipmann *et al.*, 1971]. Arbeiten von Lee und Lipmann zeigten bereits frühzeitig, daß sich die multifunktionellen Peptidsynthetasen TycB und TycC durch partielle Proteolyse in kleinere Einheiten spalten ließen, die noch in der Lage waren, Teilreaktionen wie Substrataktivierung zu katalysieren [Lee *et al.*, 1973; Lee & Lipmann, 1977]. TycB bestand offensichtlich aus drei solchen Untereinheiten, und TycC aus sechs, in Übereinstimmung mit der Anzahl der von diesen Enzymen aktivierten Aminosäuren. TycA war schließlich die erste Peptidsynthetase, deren Gen kloniert [Marahiel *et al.*, 1985] und sequenziert wurde [Weckermann *et al.*, 1988].

6.1.1 Sequenzanalyse der Tyrocidin Synthetasen

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Klonierung und Sequenzierung der für TycB und TycC kodierenden Gene stehen in Einklang mit den oben beschriebenen

Arbeiten. TycB besteht demnach aus drei repetitiven Untereinheiten, den Modulen, die alle große Ähnlichkeiten zu dem einmodularen TycA aufweisen. TycC besteht aus sechs solchen Modulen. Die Module an den Positionen eins, vier und zehn weisen zudem besondere Domänen auf, die den Epimerisierungs- und Zyklisierungsfunktionen zugeschrieben werden können. Lediglich die Präsenz einer 4'-Phosphopantethein-bindenden Domäne in jedem der zehn Module, und nicht als einmaliges zentrales Protein, ist als entscheidendes Biosyntheseprinzip für alle nichtribosomal synthetisierten Produkte noch nicht in den frühen Arbeiten erkannt worden [Schlumbohm *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1996]. Ebenso sind die Molekulargewichte der Enzyme aufgrund fehlender Größenstandards stets deutlich unterschätzt worden: 100, 230 und 460 kDa [Lipmann *et al.*, 1971] stehen errechneten 123, 405 und 724 kDa für TycA, TycB und TycC gegenüber [Mootz & Marahiel, 1997b]. TycC ist demnach eines der größten bekannten Proteine.

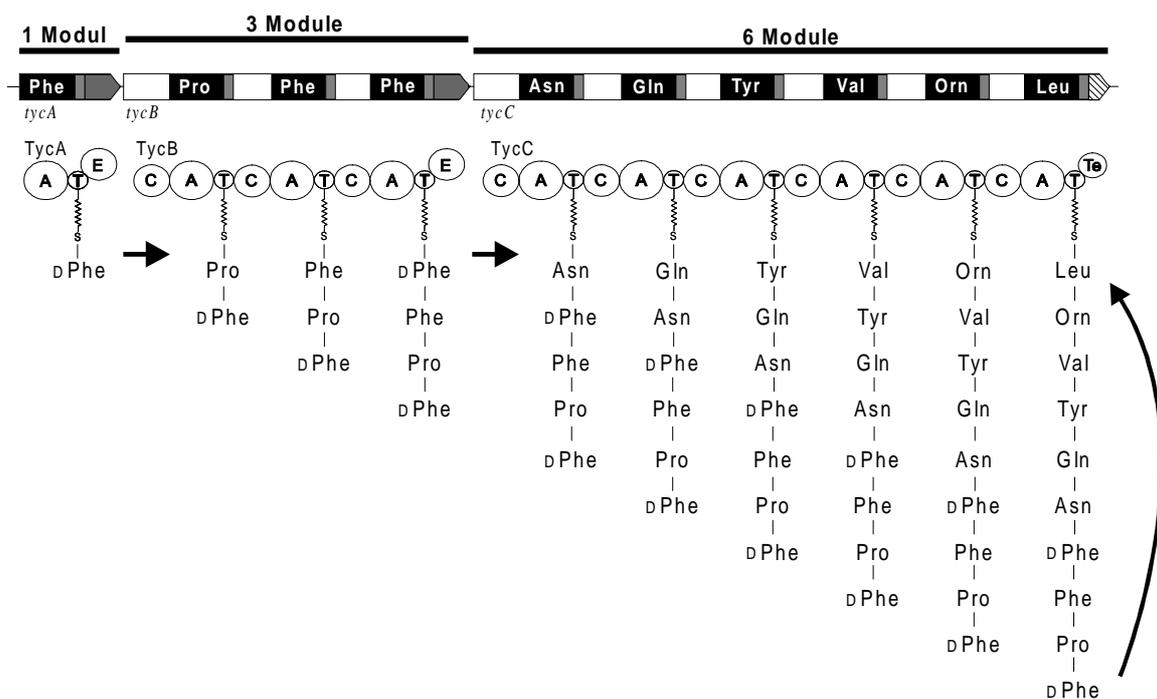


Abb. 6.1-1: Das Tyrocidin Biosynthesesystem: Das zyklische Dekapeptid Tyrocidin wird an einem Multienzymkomplex synthetisiert. Die drei Peptidsynthetasen TycA, TycB und TycC, kodiert durch die Gene *tycA*, *tycB* und *tycC*, bestehen aus zehn Modulen, die den schrittweisen Aufbau der Peptidkette katalysieren.

Die sich wiederholenden Module bestehen jeweils aus einer Abfolge von drei Domänen: Der Kondensations(C)-, der Adenylierungs(A)- und der Thiolierungs(T)-Domäne. Nur das erste Modul, TycA, trägt keine C-Domäne. Diese Abfolge erscheint den katalytischen Erfordernissen für den Aufbau eines linearen Dekapeptids zu entsprechen: Zehn

Aktivierungsfunktionen (A + T Domänen) sind durch neun Verknüpfungsfunktionen (C-Domänen) miteinander verbunden. Benachbarte Module bilden Peptidbindungen zwischen ihren Substraten aus, so daß ein Kettenwachstum vom N- zum C-Terminus resultiert. Die zehnte Peptidbindung, die zum Ringschluß führt, wird während der Abspaltung des Peptides gebildet, wahrscheinlich durch Katalyse der terminalen Terminations(Te)-Domäne. Es bleibt die Frage, warum die zehn Module auf drei Enzyme verteilt sind und warum die Verteilung in dieser Art vorliegt. Auffallend ist, daß diese Trennung zwischen Modulen in beiden Fällen nach den Modulen, die zusätzlich mit einer Epimerisierungs(E)-Domäne ausgestattet sind, zu finden ist. Eine analoge Organisation der Synthetasen in Multienzymkomplexe ist zum Beispiel bei den Gramicidin S-, Surfactin-, Lichenysin- und Fengycin-Synthetasen anzutreffen [Turgay *et al.*, 1992; Cosmina *et al.*, 1993; Konz *et al.*, 1999; Tosato *et al.*, 1997]. Dennoch scheint diesem Phänomen keine grundsätzliche Regel zu unterliegen, denn in einigen anderen Systemen, wie den Bacitracin-, Chloroeremomycin- und Exochelin-Synthetasen, sind auch Module mit E-Domänen in internen Positionen vorhanden [Konz *et al.*, 1997; van Wageningen *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998].

Durch den wohlgeordneten Aufbau der Tyrocidin Synthetasen, die umfangreichen enzymatischen Charakterisierungen der Wildtyp-Enzyme und die Kenntnis der DNA-Sequenz des gesamten Operons ist das Tyrocidin Biosynthesesystem in idealer Weise für grundlegende und allgemeine Studien der nichtribosomalen Peptidbiosynthese geeignet. Für derartige Studien bietet es zudem den Vorteil der relativen Einfachheit, wenn dieser Begriff für die Beschreibung eines aus 32 katalytischen Domänen bestehenden Enzymkomplexes passend ist. Die Tyrocidin Synthetasen weisen keine außergewöhnlichen enzymatischen Aktivitäten auf, wie die Verknüpfung des Peptidproduktes mit einer β -Hydroxyfettsäure (Surfactin [Cosmina *et al.*, 1993]), Bildung eines Thiazolinringes (Bacitracin [Konz *et al.*, 1997]), Di- oder Trimerisierung des linearen Intermediates (Gramicidin S [Turgay *et al.*, 1992], Enterobactin [Gehring *et al.*, 1998c]), welche meist auch zu den ungeklärten Aspekten der jeweiligen Synthesysteme zählen.

Zum Zeitpunkt seiner Publikation war der Tyrocidin Biosynthesecluster der achte Cluster dieser Art, der vollständig sequenziert wurde [Mootz & Marahiel, 1997b]. Inzwischen sind die Sequenzen von etwa 20 für die nichtribosomale Biosynthese von Peptiden verantwortlichen Cluster bekannt. Die Revolution im Bereich der DNA-Sequenzierungstechniken und die Sequenzierung gesamter bakterieller Genome haben dabei auch Gencluster zutage gefördert, deren Biosynthesenzyme erst anschließend (ansatzweise) charakterisiert

wurden [Konz *et al.*, 1999; Quadri *et al.*, 1998a; Gehring *et al.*, 1998a] oder deren chemische Produkte noch gar nicht identifiziert worden sind [Tosato *et al.*, 1997; Albertini *et al.*, 1995]. Bei der Analyse der so erhaltenen umfangreichen Sequenzdaten beginnt sich auch ein neues Bild von den möglichen Organisationen der zugehörigen Peptidsynthetasen abzuzeichnen. Neben der Identifizierung neuer Domänen mit speziellen katalytischen Fähigkeiten findet man auch die Anordnung und Anzahl der A-, T- und C-Domänen innerhalb der Enzyme und Module in immer neuen, zuvor unbekanntem Kombinationen. Die oben beschriebene, wohlgeordnete Reihenfolge der Domänen in den Modulen der Tyrocidin Synthetasen, AT-Domänen stets mit einer C-Domäne verbunden, wie sie auch für fast alle der anderen „älteren“ Peptidsynthetasen gefunden wurde, scheint in den meisten Systemen durch jeweils mindestens eine Ausnahme nicht eingehalten zu werden. So enthält der Syringomycin Synthetasekomplex offensichtlich zehn T-Domänen für die Synthese eines Nonapeptides [Guenzi *et al.*, 1998a]. Die Chloroeremomycin Synthetasen enthielten demnach eine C-Domäne im Überschuß [van Wageningen *et al.*, 1998] und die Exochelin Synthetasen sogar ein gesamtes Modul [Yu *et al.*, 1998]. In den meisten dieser Fälle wird jedoch eine biochemische Charakterisierung der Enzyme abzuwarten sein. Denn nur aus der Analyse der Sequenz kann nicht gefolgert werden, daß alle diese Komponenten auch für die Katalyse benötigt werden. Wenn multimodulare Enzymsysteme aus Genduplikationen hervorgegangen sind, dann ist es wahrscheinlich, daß manche Fragmente im Lauf der Evolution ebenso wieder zurückgebildet oder deletiert werden können. Insbesondere da diese Gencluster in der Regel nicht essentiell für das Wachstum der Produzenten sind, wäre es denkbar, daß die heute betrachteten Sequenzen Momentaufnahmen eines sich neu bzw. anders formierenden Systems darstellen.

6.1.2 Phylogenetische Verwandtschaft mit den Gramacidin S Synthetasen

Ein interessanter Aspekt der Sequenzanalyse der Tyrocidin Synthetasen ist der Vergleich mit den Gramacidin S Synthetasen aus dem *Bacillus brevis* Stamm ATCC 9999. Gramacidin S ist wie Tyrocidin ein zyklisches Dekapeptid. Es läßt sich als ein Kopf-zu-Schwanz verknüpftes Dimer des Pentapeptides DPhe-Pro-Val-Orn-Leu beschreiben, das als Teilsequenz auch im Tyrocidin enthalten ist (s. Abb. 6.1-2). Tatsächlich wird es auch von den Gramacidin S Synthetasen GrsA und GrsB durch eine Dimerisierung des Pentapeptides synthetisiert [Tomino *et al.*, 1967; Zimmer & Laland, 1975]. Damit übereinstimmend

enthalten die Synthetasen nur fünf Module, GrsA eins und GrsB vier. Diese fünf Module zeigen besonders ausgeprägte Sequenzhomologien mit den entsprechenden Modulen der Tyrocidin Synthetasen, TycA, TycB1 und TycC8-10. So findet man unter den Modulen der Peptidsynthetasensysteme für Tyrocidin, Gramacidin S [Turgay *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 1994], Bacitracin [Konz *et al.*, 1997], Lichenysin [Konz *et al.*, 1999] und Fengycin [Tosato *et al.*, 1997] in der Regel etwa 29-42 %, innerhalb der Tyrocidin und Gramacidin S Synthetasen bis zu 50 % Identität in der Primärstruktur. Die fünf erwähnten Module der Tyrocidin und Gramacidin S Synthetasen weisen jedoch 59.3-65.1 % Identität auf (s. Abb. 6.1-2). Im Licht dieser signifikant höheren Homologien und der verwandten Struktur der Produkte liegt die Vermutung nahe, daß das eine dieser beiden Systeme sich durch Deletion bzw. Integration oder Verdopplung von für fünf Module kodierenden DNA-Segmenten aus dem jeweils anderen entwickelt hat. Allerdings ist bemerkenswert, daß die DNA des *tyc*-Operons einen GC-Gehalt von etwa 54 %, die des *grs*-Operons dagegen von nur 36 % aufweist [Mootz & Marahiel, 1997b].

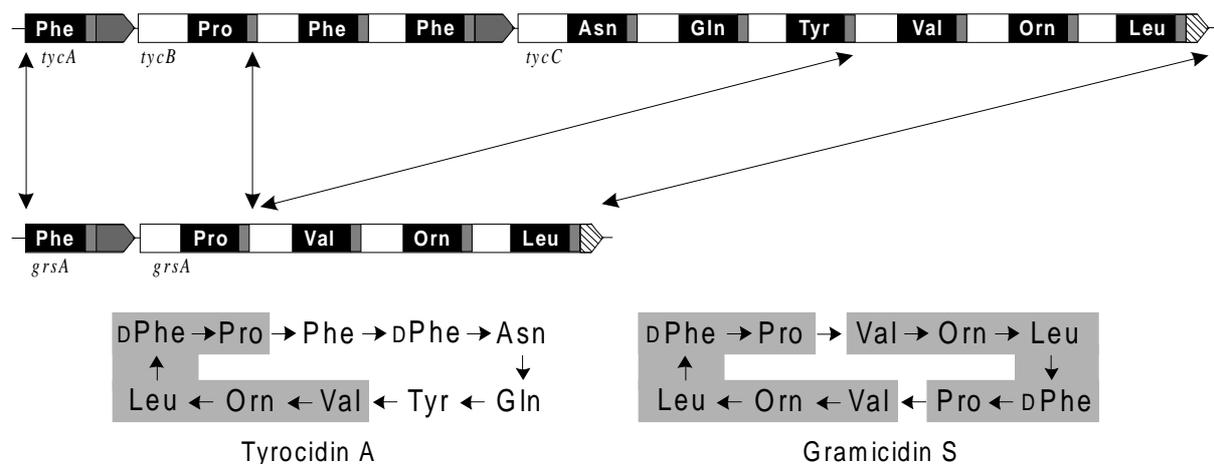


Abb. 6.1-2 Vergleich der Tyrocidin und Gramacidin S Synthetasen: Die Module TycA, TycB1 und TycC4-C6 der Tyrocidin Synthetasen weisen eine besonders hoch ausgeprägte Homologie zu den fünf Modulen der Gramacidin S Synthetasen auf. Die von diesen fünf Modulen synthetisierte Aminosäuresequenz Val-Orn-Leu-DPhe-Pro ist dementsprechend in beiden Peptidantibiotika zu finden, in Gramacidin S als Kopf-zu-Schwanz verknüpftes Dimer. Es kann über einen gemeinsamen phylogenetischen Vorläufer der beiden Biosynthesecluster spekuliert werden.

6.2 Die A-Domänen von Peptidsynthetasen: Unspezifitäten führen zur Produktvielfalt

In dieser Arbeit wurden die Substratspezifitäten von neun der zehn A-Domänen der Tyrocidin Synthetasen bestimmt. TycA wurde als vollständiges Protein, die A-Domänen von TycB1, TycB3, TycC1, TycC2 und TycC3 wurden als eigenständige Proteinfragmente, und schließlich die A-Domänen von TycB2, TycC5 und TycC6 als Module in den dimodularen Konstrukten ProCATPheCAT(Te), ProCAT-OrnCAT(Te) und ProCAT-LeuCAT(Te) untersucht. Lediglich die ValA-Domäne an achter Position, im Modul TycC4, wurde nicht als rekombinantes Protein hergestellt. Aus diesen Untersuchungen konnten drei Schlüsse gezogen werden: 1) Auf Modul- oder Domänenebene definierte Fragmente der multimodularen Tyrocidin Synthetasen sind in der Adenylierungsreaktion aktiv. 2) Die Substratspezifitäten dieser Proteine belegen, daß die Anordnung der zehn A-Domänen innerhalb der Tyrocidin Synthetasen TycA, TycB und TycC der Reihenfolge der schrittweisen Synthese des Dekapeptides Tyrocidin entspricht. 3) Die A-Domänen weisen teilweise beachtliche Nebenspezifitäten für strukturell ähnliche Substrate auf. Die Konsequenzen der ersten beiden Punkte werden im Abschnitt 6.4.1 diskutiert. Hier soll die Substraterkennung und -spezifität besprochen werden.

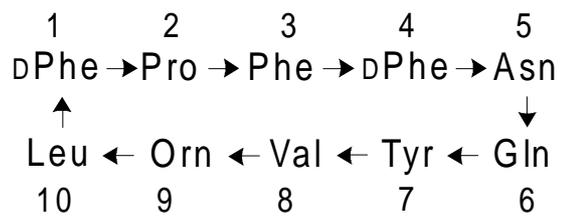
6.2.1 Die Tyrocidine A, B, C und D

Das von *B. brevis* produzierte Tyrocidin ist ein Gemisch aus mehreren Substanzen [Battersby & Craig, 1952]. Von mindestens vier Molekülen, den Tyrocidinen A, B, C und D, wurden eindeutige Strukturen beschrieben [Ruttenberg & Mach, 1966], in denen die Phenylalanin- und Tyrosinreste an den Positionen 3, 4 und 7 stufenweise gegen Tryptophan ersetzt sind (s. Tab. 6.2.1 und Abb. 6.2-1). Die relativen Mengenverhältnisse der Tyrocidine zueinander können durch Zugabe von Phenylalanin oder Tryptophan in das Wachstumsmedium von *B. brevis* verändert werden [Ruttenberg & Mach, 1966]. Der Phenylalaninrest an Position 1 konnte auf diese Weise jedoch nicht durch Tryptophan ersetzt werden. Weitere Substitutionen sind beschrieben worden. Durch Zugabe von Isoleucin oder Alloisoleucin konnten auch die Valin- und Leucinreste ersetzt werden. D-Alloisoleucin wurde jedoch nicht eingebaut [Ruttenberg & Mach, 1966].

Tab. 6.2-1: Die Tyrocidine A, B, C, und D

Tyrocidin	Aminosäure an Position			
	1	3	4	7
A	DPhe	Phe	DPhe	Tyr
B	DPhe	Trp	DPhe	Tyr
C	DPhe	Trp	DTrp	Tyr
D	DPhe	Trp	DTrp	Trp

Abb. 6.2-1: Tyrocidin A



Die Toleranzen mancher Positionen gegenüber Aminosäuresubstitutionen können mit den Ergebnissen dieser Arbeit erklärt werden. Die Spezifitätsuntersuchungen an einzelnen Domänen oder Modulen erlaubten eine selektive Untersuchung dieser Effekte für die verschiedenen Positionen. So zeigten die Untersuchungen der A-Domänen PheA4 und TyrA7, daß diese A-Domänen neben Phe und Tyr auch Trp aktivieren. Unter gleichen Bedingungen wiesen sie sogar eine Präferenz für Trp auf. Die A-Domäne der Position 3 wurde mit den Proteinen ProCATPheCAT und ProCATPheCAT-Te studiert. Wie bereits beschrieben (s. Kapitel 5.4.4.1) konnte hier aber aus ungeklärten Gründen nicht die übliche Aktivität und Spezifität erhalten werden. Dennoch war die Präferenz der A-Domäne für Phe und Trp erkennbar. Die nach Tabelle 6.2-1 zu erwartende stärkere Spezialisierung auf Trp-Aktivierung, verglichen mit PheA4 und TyrA7, konnte allerdings nicht beobachtet werden. Ein anderes Konstrukt, das die PheA2-Domäne beinhaltet, bestätigte aber inzwischen die klare Präferenz dieser Domäne für Trp [Dökel, 1999]. Durch die Untersuchungen des der Position 1 entsprechenden Proteins TycA läßt sich auch eine Substitution durch Trp an dieser Stelle postulieren, wenngleich die entsprechende Verbindung in Kulturüberständen von *B. brevis* bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu den A-Domänen der Positionen 3, 4 und 7 zeigt TycA zwar klare Präferenz für Phe, jedoch wird zu ca. 6 % auch Trp aktiviert. Darüberhinaus konnte mit dem System TycA/ProCAT *in vitro* gezeigt werden, daß Trp auch als Substrat für die Peptidbindungsbildung mit Pro fungieren kann. Eventuell ist es selbst durch Trp-Zugabe ins Kulturmedium nicht möglich, das intrazelluläre Konzentrationsverhältnis zwischen Trp und Phe ausreichend für das auf Phe spezialisierte TycA zu verschieben.

Die Spezifitätsuntersuchungen an den Proteinen ProCAT-LeuCAT und ProCAT-LeuCAT-Te sind ebenfalls in Übereinstimmung mit einer möglichen Substitution durch Ile an der 10. Position [Fujikawa *et al.*, 1968a]. Die Nebenspezifitäten der A-Domäne der 9. Position, gemessen an den Proteinen ProCAT-OrnCAT und ProCAT-OrnCAT-Te,

legen darüberhinaus die Substituierbarkeit des Ornithinrestes durch Lys oder Arg nahe [Fujikawa *et al.*, 1968a]. Gleiches gilt für die A-Domäne der zweiten Position, die eine Substitution von Pro durch Prolinanaloga wie Sarkosin oder (S)-Azetidin-2-carbonsäure oder (R)-1,3-Thiazolidin-4-carbonsäure (vergl. Abb. 5.3-6) erlauben sollte.

Andere A-Domänen zeichnen sich durch eine deutlich höhere Selektivität aus. Für die A-Domänen AsnA5 und GlnA6 wurden keine Nebenspezifitäten detektiert. Bemerkenswerterweise wurden insbesondere keine Kreuzspezifitäten zu den ähnlichen Substraten Gln, Asp und Glu, bzw. Asn, Asp und Glu festgestellt.

Es bleibt offen, ob die Unspezifität mancher A-Domänen und die hohe Spezifität von anderen biologische Erfordernisse widerspiegeln. Es wäre auch schlicht denkbar, daß A-Domänen von Peptidsynthetasen durch ihre strukturelle Architektur insbesondere bei den aromatischen und den großen aliphatischen Aminosäuren nur mäßig zwischen ihren Substraten diskriminieren können [Lawen & Traber, 1993]. Womöglich sind die Systeme in dieser Hinsicht keinem starken evolutiven Druck ausgesetzt (gewesen).

Die Kenntnis der jeweiligen Nebenspezifitäten war für die *in vitro* Untersuchungen der Tripeptidsysteme von großer Hilfe, da der Effekt eines Substratersatzes auf die Produktbildung Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Produkte erlaubte. Von besonderer Wichtigkeit ist die Kenntnis der Nebenspezifitäten auch für das Verständnis der molekularen Architektur der Substratbindungstaschen, die im nächsten Abschnitt diskutiert wird.

6.2.2 Molekularer Aufbau der Substratbindungstasche

Die kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur einer A-Domäne von Peptidsynthetasen im ternären Komplex mit ihrer Substrataminosäure und AMP erlaubt einen Einblick in die molekulare Architektur der spezifitätsbestimmenden Substratbindungstasche [Conti *et al.*, 1997]. Es handelt sich dabei um die A-Domäne PheA der Gramicidin S Synthetase GrsA [Stachelhaus & Marahiel, 1995b] mit ihrem Substrat L-Phenylalanin. In dieser Struktur konnten zehn Aminosäurereste von PheA identifiziert werden, die offensichtlich in direktem Kontakt mit LPhe stehen und somit die Substratbindungstasche formen. Der Vergleich der Kristallstruktur von PheA mit der eines weiteren Vertreters der Superfamilie der adenylyl-bildenden Enzyme, der Luciferase aus *Photinus pyralis* [Conti *et al.*, 1996], weist trotz relativ geringer Homologie der Primärstrukturen der beiden Enzyme über 90 % Homologie der Tertiärstrukturen auf. Berücksichtigt man die deutlich höheren Homologien unter den

A-Domänen verschiedener Peptidsynthetasen, so erscheint es zulässig, durch Vergleich der Primärstrukturen mit PheA Vorhersagen über die molekulare Zusammensetzung der Substratbindungstaschen zu treffen [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Auf diese Weise konnten für A-Domänen verschiedener Herkunft und Spezifität die jeweiligen zehn spezifitätsbestimmenden Aminosäurereste postuliert werden. Dabei zeigte sich, daß diese tatsächlich annähernd konserviert sind, wenn A-Domänen gleicher Spezifität verglichen wurden [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Weitere Unterstützung für die Glaubwürdigkeit der Vorhersage der Substratbindungstasche lieferte die erfolgreiche Spezifitätsumkehr von zwei A-Domänen, PheA aus GrsA und AspA5 aus der Surfactin Synthetase SrfB, mittels gerichteter Mutagenese auf der Basis der oben genannten Daten [Stachelhaus *et al.*, 1999].

Die Spezifitäten der A-Domänen der Tyrocidin Synthetasen ergeben im Licht der molekularen Analyse der wahrscheinlichen Substratbindungstasche ein interessantes Bild. In Tabelle 6.2.2 sind die zehn durch Sequenzvergleich mit PheA identifizierten Aminosäurereste der Tyrocidin und Gramicidin S Synthetasen aufgeführt. Dabei fällt zunächst auf, daß die fünf A-Domänen, die der in den Tyrocidinen und Gramicidin S identischen Pentapeptidhälfte Val-Orn-Leu-DPhe-Pro entsprechen, an allen zehn Positionen jeweils identische Aminosäurereste aufweisen (s. Tab. 6.2-2).

Tab. 6.2-2: Molekularer Aufbau der Substratbindungstaschen

A-Domäne	aus	Position Aminosäure*									
		235	236	239	278	299	301	322	330	331	517
PheA1	TycA	D	A	W	T	I	A	A	I	C	K
PheA1	GrsA	D	A	W	T	I	A	A	I	C	K
ProA2	TycB	D	V	Q	S	T	G	H	V	V	K
ProA2	GrsB	D	V	Q	S	T	G	H	V	V	K
PheA3	TycB	D	A	L	V	M	G	A	V	M	K
PheA4	TycB	D	A	W	T	I	A	G	V	C	K
AsnA5	TycC	D	L	T	K	I	G	E	V	G	K
GlnA6	TycC	D	A	W	Q	F	G	L	I	D	K
TyrA7	TycC	D	A	L	T	T	G	E	V	V	K
ValA8	TycC	D	A	F	W	I	G	G	T	F	K
ValA3	GrsB	D	A	F	W	I	G	G	T	F	K
OrnA9	TycC	D	V	G	E	I	G	S	I	D	K
OrnA4	GrsB	D	V	G	E	I	G	S	I	D	K
LeuA10	TycC	D	G	A	Y	T	G	E	V	V	K
LeuA5	GrsB	D	G	A	Y	T	G	E	V	V	K

* Numerierung nach PheA aus GrsA [Conti *et al.*, 1997]

Der Vergleich der Reste aus PheA1, PheA3, PheA4 und TyrA7 spiegelt die Spezifitätsabstufungen für die aromatischen Substrataminosäuren Phe, Tyr und Trp wider. PheA2 weist hier größere Unterschiede zur Referenz PheA1 auf als PheA3. Das ist in Übereinstimmung mit dem Befund, daß in Tyrocidin B zuerst an Position 3 die Phe/Trp-Substitution stattfindet. TyrA7 ist nur noch an den Positionen Asp235, Ala236, T278 und Lys517 identisch mit PheA1, hat dafür aber die Reste Leu239 und Gly301 mit PheA2 gemein.

Eine Mutationsanalyse dieser A-Domänen, sowie die genaue Kenntnis der Spezifitäten von weiteren A-Domänen, die aromatische Aminosäuren aktivieren, gepaart mit der molekularen Analyse der Substratbindungstaschen, wären für die Auflösung der entscheidenden Determinanten für Phe-, Trp- oder Tyr-Spezifität erforderlich. Ein solcher Ansatz wird besonders reizvoll, wenn man die unbegrenzte strukturelle Vielfalt der Substrate der Peptidsynthetasen bedenkt. In Peptidantibiotika wie Chloroeremomycin [van Wageningen *et al.*, 1998] oder Pristinamycin IA [de Crécy-Lagard *et al.*, 1997a; de Crécy-Lagard *et al.*, 1997b] finden sich als Vorstufen die aromatischen Aminosäuren Phenylglycin, 4-Hydroxy-Phenylglycin, 3,5-Dihydroxy-Phenylglycin und 4-Dimethylamino-Phenylalanin. Die zielgerichtete Manipulation der entsprechenden A-Domänen könnte zu interessanten, künstlichen Varianten der biotechnologisch so wichtigen Produkte führen.

6.2.3 Vergleich mit den Aminoacyl-tRNA Synthetasen

Für die ribosomale Peptidsynthese werden die proteinogenen Aminosäuren ebenfalls als Aminoacyladenylat aktiviert. Diese Reaktion wird von den Aminoacyl-tRNA Synthetasen durchgeführt, die in zwei Klassen unterteilt werden können [Arnez & Moras, 1997]. Dabei bestehen weder auf Primär- noch auf Tertiärstrukturebene Homologien zu den A-Domänen der Peptidsynthetasen. Es handelt sich vielmehr um drei grundsätzlich unterschiedliche Lösungen der Natur für die Katalyse der Adenylierung von Aminosäuren [Conti *et al.*, 1997; Carter, 1993].

Aminoacyl-tRNA Synthetasen liefern mit den beladenen tRNAs die Substrate für die Translationsmaschinerie. Dadurch stehen sie unter dem Druck der Evolution, die Fehlerrate der Translation möglichst gering zu halten [Edelmann & Gallant, 1977]. So sind die heutigen Aminoacyl-tRNA Synthetasen darauf optimiert, gegen nichtkognate Aminosäuren zu diskriminieren [Döring *et al.*, 1999]. Die einzigen relevanten Ungenauigkeiten ergeben sich bei der Unterscheidung der isosterischen Aminosäuren Thr und Val durch die Valyl-tRNA Synthetase (Fehlerrate 1/350) sowie der sehr ähnlichen Aminosäuren Val und Ile durch die

Isoleucyl-tRNA Synthetase (Fehlerrate 1/180) [Lin *et al.*, 1996]. Durch spezielle Korrekturfunktionen der Enzyme werden die fehladenylierten Aminosäuren jedoch wieder hydrolysiert, so daß die Gesamtfehlerrate der Translation bei $<1/2400$ liegt [Nureki *et al.*, 1998; Edelman & Gallant, 1977]. Die Fehlerraten von Aminoacyl-tRNA Synthetasen können dagegen erheblich höher sein, wenn Substrate angeboten werden, mit denen die Enzyme normalerweise *in vivo* nicht konfrontiert werden. Für diese Fälle haben sie keinen Diskriminierungsmechanismus entwickelt. Beispielsweise beruht die Wirkungsweise des Antibiotikums Azaleucin auf der Fehlaktivierung durch die Leucyl-tRNA Synthetase und den toxischen Effekten, die sich durch den Einbau in Proteine ergeben [Lemeignan *et al.*, 1993]. Selenomethionin und Norleucin können Methionin in Proteinen vollständig ersetzen [Gilles *et al.*, 1988]. Das Peptidsynthetasensystem TycA/ProCAT baut bereitwillig p-Chlorophenylalanin in sein Peptidprodukt ein (s. Kapitel 5.3.6), ein Substrat, das von der Phenylalanyl-tRNA Synthetase erst nach Mutation des aktiven Zentrums akzeptiert wird [Ibba & Hennecke, 1995]. Dagegen kann auch die Prolyl-tRNA Synthetase in Analogie zum System TycA/ProCAT nicht gegen exogene (R)-1,3-Thiazolidin-4-carbonsäure (Thioprolin, vergl. Abb. 5.3-6) selektieren [Budisa *et al.*, 1998].

Die hohe Selektivität der Aminoacyl-tRNA Synthetasen findet sich also hauptsächlich für Substrate, die in relevanten Mengen im natürlichen Metabolismus der Zelle vorkommen. Dies unterstützt die Hypothese, daß Peptidsynthetasen aufgrund des fehlenden evolutiven Drucks über eine vergleichsweise geringe Spezifität verfügen. Durch die Evolution wurden sie wahrscheinlich vielmehr in die entgegengesetzte Richtung gesteuert. Denn ein System, das strukturelle Vielfalt erzeugen soll, eventuell um geeignete Stoffe gegen Konkurrenten zu synthetisieren, muß in der Evolution flexibel bleiben. Das heißt, es sollte sich nicht zu stark auf ein bestimmtes Substrat perfektionieren, um in wenigen Mutationsschritten die Spezifität für ein beliebiges anderes Substrat annehmen zu können.

6.3 Ein minimiertes Peptidsynthetasensystem: TycA/ProCAT

Selbst die kleinsten natürlichen Peptidsynthetasensysteme sind so komplex, daß es mit großen Schwierigkeiten verbunden ist, die einzelnen Reaktionen und die Reaktionsabfolgen der multifunktionellen Enzymkomplexe zu untersuchen. Eines der einfachsten Systeme ist die ACV Synthetase, die den Vorläufer für Penicilline und Cephalosporine synthetisiert [Smith *et al.*, 1990; Schwecke *et al.*, 1992; Martin, 1998]. Sie besteht jedoch schon aus drei Modulen. Aus nur zwei Modulen sind die Enterobactin und Enniatin Synthetasen aufgebaut [Walsh *et al.*, 1990; Gehring *et al.*, 1998c; Haese *et al.*, 1993], erhöhen jedoch ihre biosynthetische Komplexität durch Trimerisierung ihrer Dipeptidintermediate (s. Abb. 6.3-1).

Das in dieser Arbeit entwickelte System TycA/ProCAT kann so betrachtet als das einfachste bekannte Peptidsynthetasensystem angesehen werden [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Der zehnmodulare Tyrocidin Synthetasenkomplex wurde auf die ersten beiden Module reduziert, die in der Lage sind, die Initiationsreaktion der Tyrocidin Biosynthese durchzuführen. Die Enzyme erkennen und aktivieren ihre Substrate LPhe und LPro und bilden das auf ProCAT gebundene Dipeptid DPhe-Pro. Durch eine intramolekulare Zyklisierung spaltet sich das Produkt als DPhe-Pro-Diketopiperazin ab. Diese Reaktion ermöglicht durch Freisetzung der Enzyme weitere Katalysezyklen und erleichtert so die Produktanalyse. Anhand dieses Systems war eine erstmalige nähere Charakterisierung der C-Domäne möglich [Stachelhaus *et al.*, 1998].

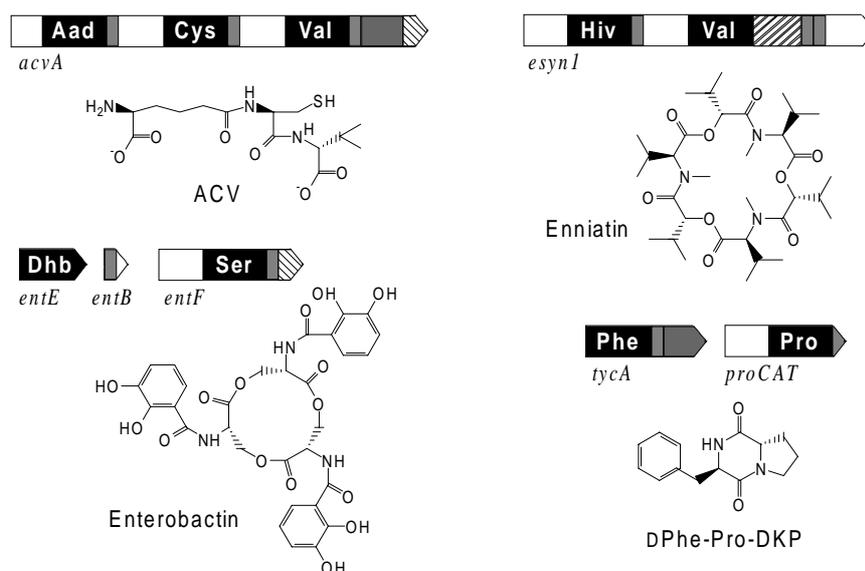


Abb. 6.3-1 Die kleinsten Peptidsynthetasensysteme: Das künstliche Minimalsystem TycA/ProCAT ist sowohl in seiner Zusammensetzung aus katalytischen Domänen als auch in der strukturellen Komplexität seines Produktes DPhe-Pro-DKP einfacher als die ACV, Enniatin und Enterobactin produzierenden Systeme.

Die Diketopiperazinabspaltung wird durch die Anwesenheit von Prolin als thioestergebundene Aminosäure begünstigt. Während Peptidbindungen normalerweise nahezu ausschließlich in der trans-Konformation vorliegen, wird durch *N*-alkylierte Aminosäuren wie Prolin die energetische Benachteiligung der cis-Konformation praktisch aufgehoben [Weiss *et al.*, 1998]. Dieser Effekt kann durch die 1,3-Allylspannung erklärt werden [Schwarzer, 1999]. Die cis-Konformation begünstigt im TycA/ProCAT System den Angriff der freien Aminogruppe von D_{Phe} auf die als Thioester aktivierte Carboxylgruppe des Prolins. So kommt es zur unkatalysierten Abspaltung des zyklischen Dipeptides. Die für Prolin eingesetzten Substratanaloga Sarkosin, (R)-1,3-Thiazolidin-4-carbonsäure (Thioprolin) und (S)-Azetidin-2-carbonsäure (4er-Prolin) bewirken den gleichen Effekt (s. Kapitel 5.3.6).

Viele bioaktive Substanzen sind auf einer Diketopiperazin-Grundgerüst aufgebaut (s. Abb. 6.3-2). Bicyclomycin aus *Streptomyces sapporonensis* wirkt antibiotisch gegen einige Gram-negative Bakterien [Miyoshi *et al.*, 1972]. Ebenfalls von Peptidsynthetasen synthetisierte Produkte sind die Ergotamine, alkalische Zyklopeptide. Das von dem Pilz *Claviceps purpurea* produzierte Ergotamin ist in Abbildung 6.3-2 dargestellt. Es besteht aus einem Tetrapeptid mit der Aminosäuresequenz D-Lysergsäure, Ala, Phe, Pro. Dabei bildet das C-terminale Pro mit Phe eine Diketopiperazinstruktur aus. Die Synthese des Ergotamins erfolgt über das lineare Tetrapeptid mit der Zyklisierung zum Diketopiperazin als letzten Schritt [Walzel *et al.*, 1997]. Die Peptidsynthetase LPS 2 aktiviert und bindet D-Lysergsäure [Riederer *et al.*, 1996]. Die restlichen Aminosäuren werden von LPS 1 aktiviert und gebunden [Walzel *et al.*, 1997]. Der Vergleich mit dem künstlichen TycA/ProCAT System kann leider nicht bis zur genetischen Ebene geführt werden, da die Sequenz des Ergotamin Biosyntheseclusters erst teilweise publiziert ist [Tudzynski *et al.*, 1999]. Eine effiziente DKP-Bildung ist hier nicht möglich, da die Aminogruppe von Phe bereits in die Peptidbindung mit Ala involviert ist und so nur noch eine stark verminderte Nukleophilie besitzt. Es ist daher zu erwarten, daß LPS 1 eine Te-Domäne zur Zyklisierung und Abspaltung des Produktes enthält.

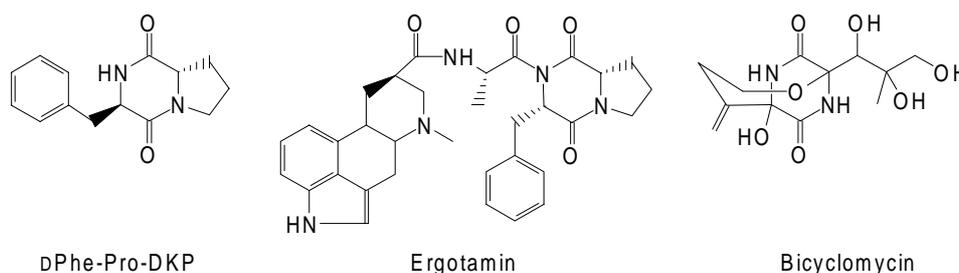


Abb. 6.3-2 Vergleich mit DKP-haltigen Naturstoffen: In vielen bioaktiven Verbindungen, wie Ergotaminen und Bicyclomycin, trifft man Diketopiperazinstrukturen an.

In dieser Arbeit wurden erste Schritte unternommen, um das Minimalsystem TycA/ProCAT in einen *E. coli* Stamm zu integrieren und Bedingungen für eine DPhe-Pro-DKP Synthese *in vivo* zu studieren. Dazu wurden die Gene für TycA und ProCAT von zwei kompatiblen Expressionsvektoren exprimiert. Die Ppant-Transferasen Gsp oder Sfp wurden durch die Expression einer chromosomalen Kopie von *gsp* bzw. *sfp* im *nrdD*-Lokus bereitgestellt (s. Kapitel 5.5.3). Ein aus einem solchen Stamm gereinigtes Proteingemisch aus TycA und ProCAT synthetisierte *in vitro* DPhe-Pro-DKP in üblichen Mengen, woraus geschlossen werden konnte, daß die Proteine in der Zelle intakt und in der aktiven holo-Form vorliegen mußten. Es gelang jedoch noch nicht zweifelsfrei nachzuweisen, daß dieses Produkt ebenfalls *in vivo* produziert wurde. Zwar konnten in Zellaufschlüssen große Mengen an DPhe-Pro-DKP mittels HPLC-Analyse nachgewiesen werden, die in Kontrollstämmen, in denen eine der Komponenten nicht exprimiert wurde, nicht nachweisbar waren. Es konnte aber noch nicht ausgeschlossen werden, daß diese Synthese in nachweisbaren Mengen nicht erst unmittelbar nach Zellaufschluß erfolgte. Eine eventuelle toxische Wirkung von exogenem DPhe-Pro-DKP konnte nicht festgestellt werden (s. Kapitel 5.3-7). Ebenso wurde von *E. coli* exogenes DPhe-Pro-DKP nicht metabolisiert, wie mit Hilfe von Prolin-auxotrophen Stämmen gezeigt werden konnte (s. Kapitel 5.3-7). Für die *in vivo* Synthese dieses Produktes bleibt ungeklärt, ob es von *E. coli* in das Kulturmedium ausgeschleust werden würde.

Eine funktionelle Interaktion von TycA und ProCAT in *E. coli* würde diesen genetisch vielseitig verwendbaren Organismus als geeigneten Wirtstamm für die Expression von heterologen und durch Modul- oder Domänenfusionen künstlich geschneiderten Peptid-synthetasenmatrizen etablieren. In Hinblick auf solche Unternehmungen werden die potentielle Toxizität des Produktes sowie geeignete Transportmechanismen, die es in den extrazellulären Raum schleusen, stets Limitationen darstellen. Wenn für das jeweilige Produkt kein spezifischer Transporter verfügbar ist, könnte auf Transportproteine zurückgegriffen werden, die strukturell ähnliche Substrate erkennen. So ist zum Beispiel ein Transporter für Bicyclomycin (s. Abb. 6.3-2) bekannt, der *E. coli* auch Resistenz gegenüber diesem Produkt verleiht [Bentley *et al.*, 1993], und für den Transport des strukturell ähnlichen DPhe-Pro-DKP getestet werden könnte.

6.4 Neue Peptidsynthetasenmatrizen durch Modul- und Domänenfusionen

In einer Weiterentwicklung des TycA/ProCAT Systems wurden durch Fusionen von ProCAT mit Modulen und Domänen Hybridenzyme hergestellt, mit denen das Potential der Konstruktion künstlicher Peptidsynthetasen *in vitro* untersucht werden sollte. Das Modul ProCAT wurde mit den Modulen PheCAT, OrnCAT und LeuCAT zu dimodularen Peptidsynthetasen verlängert, denen schließlich noch die Te-Domäne für die Produktabspeicherung angehängt wurde (s. Abb. 6.4-1).

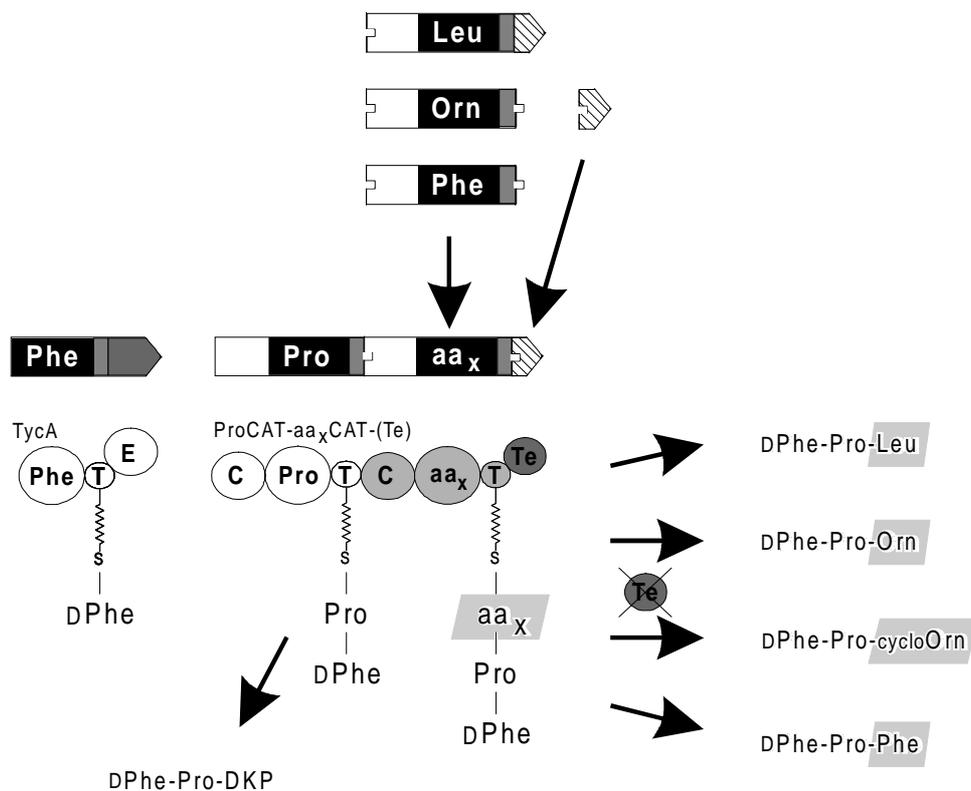


Abb. 6.4-1 Zusammenfassung der Hybridenzymssysteme: Verlängerung des Dipeptidsystems TycA/ProCAT um ein Modul mit Te-Domäne durch künstliche Fusion(en) führte zur Synthese der entsprechenden Tripeptide. Das Ornithin-haltige Tripeptid konnte sich durch intramolekulare Laktamisierung auch ohne Te-Domäne vom Proteintemplat abspalten. Als Nebenprodukt entstand in allen Fällen DPhe-Pro-DKP.

PheCAT ist das im Wildtypsystem auf ProCAT folgende Modul, so daß im Protein ProCATPheCAT-Te nur die Verbindung mit der Te-Domäne einer unnatürlichen Anordnung entspricht. Das Modul LeuCAT befindet sich in den Tyrocidin Synthetasen an letzter Position und trägt die Te-Domäne. Im Protein ProCAT-LeuCATTe ist also nur der Übergang zwischen den beiden Modulen künstlich. Dagegen sind im Protein ProCAT-OrnCAT-Te sowohl

zwischen den Modulen als auch zwischen dem OrnCAT-Modul und der Te-Domäne künstliche Fusionen vorgenommen worden. OrnCAT ist im Wildtypsystem an vorletzter Position lokalisiert. Aufgrund der Instabilität von Ornithinthioestern ist mit dem Modul OrnCAT auch ein alternativer Abspaltungsmechanismus realisiert worden, der im System TycA/ProCAT-OrnCAT zum Produkt δ Phe-Pro-cycloOrn führt. Die anderen Systeme, TycA/ProCATPheCAT-Te, TycA/ProCAT-OrnCAT-Te und TycA/ProCAT-LeuCATTe synthetisierten die entsprechenden linearen Tripeptide in Abhängigkeit der Te-Domäne (s. Abb. 6.4-1).

6.4.1 Funktionelle Interaktionen in multimodularen Hybridpeptidsynthetasen - Konsequenzen für das Design neuer Proteinmatrizen

Die chimären trimodularen Peptidsynthetasensysteme, die durch eine neue Zusammenstellung der katalytischen Komponenten der Tyrocidin Synthetasen gewonnen wurden, entsprechen in ihrer Domänenausstattung den Erwartungen an eine Proteinmatrize, die ein Tripeptid synthetisiert. Drei Aktivierungseinheiten, aus einer A- und einer T-Domäne bestehend, sind über zwei C-Domänen miteinander verbunden, und eine Te-Domäne befindet sich am letzten Modul. Dabei teilen sich die drei Module auf zwei Enzyme auf, und das erste Enzym, das einmodulare TycA, enthält zusätzlich eine E-Domäne. Tatsächlich finden sich natürliche Systeme mit einem sehr ähnlichen Aufbau: Die ACV-Synthetase, die das lineare Tripeptid δ -(α -Aminoadipyl)-Cysteinyl-D-Valin, die Vorstufe für die Penicilline und Cephalosporine, synthetisiert, weist genau die gleichen Domänenbestandteile auf. Jedoch befinden sich hier alle Module auf einer einzigen Polypeptidkette, und die E-Domäne ist am dritten Modul lokalisiert (s. Abb. 6.4-2). Ebenfalls ein Tripeptid wird von dem Phosphinotricin Synthetasekomplex produziert, der sich in drei Enzyme aufteilt und nicht über eine Epimerisierungsfunktion verfügt. Aufgrund fehlender Sequenzdaten ist auch die genaue Organisation des zweiten und dritten Moduls noch nicht gesichert [Schwartz *et al.*, 1996], kann aber von den proteinchemischen Daten extrapoliert werden [Grammel *et al.*, 1998] (s. Abb. 6.4-2).

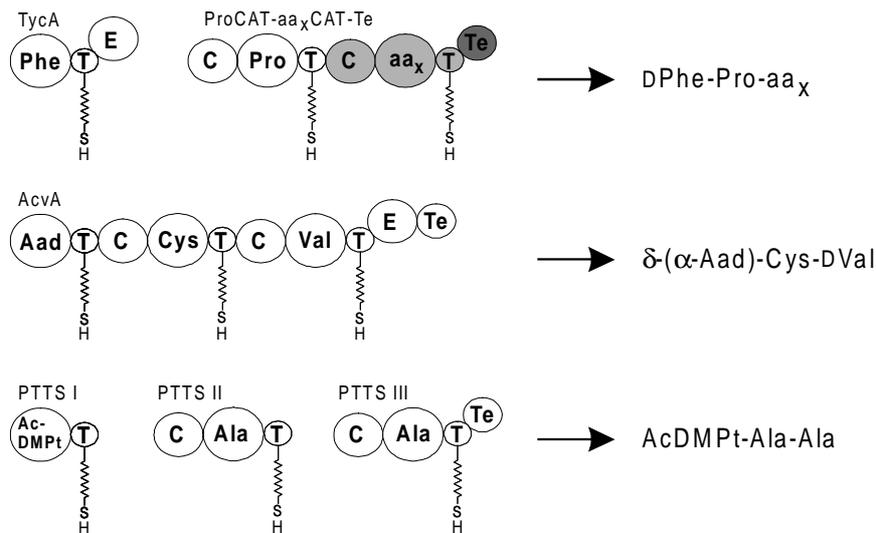


Abb. 6.4-2 Vergleich mit natürlichen trimodularen Peptidsynthetasen: Die ACV- und Phosphino-tricin Synthetasen weisen eine nahezu identische Domänenkomposition wie die in dieser Arbeit konstruierten trimodularen Proteinmatrizen auf. Allerdings sind die katalytischen Funktionen in anderer Art auf die Enzyme bzw. das Enzym verteilt. α-Aad = α-Amino adipat, AcDMPt = N-Acetyl-demethyl-phosphino-tricin.

Die Hybridenzymssysteme dieser Arbeit sind im direkten Vergleich mit den Domänen-austauschexperimenten im Surfactin Biosynthesesystem von Stachelhaus und Schneider zu sehen [Stachelhaus *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1998]. Diese stellen die einzigen bisher berichteten Ergebnisse dieser Art dar. Während die Manipulationen an den Surfactin Synthetasen jedoch *in vivo* durchgeführt wurden, liegen mit dieser Arbeit die ersten *in vitro* Untersuchungen über die Produktbildungsreaktionen künstlich fusionierter Peptidsynthetasen vor. Daraus ergibt sich die Möglichkeit zu einer detaillierteren Betrachtungsweise, wie etwa mit der Bestimmung der katalytischen Umsatzraten, der Nebenprodukte und der Untersuchung zur Akzeptanz von Substratanaloga geschehen.

Die wichtigste Erkenntnis aus den Untersuchungen an den chimären trimodularen Systemen sind die produktiven Interaktionen über die Fusionsstellen hinweg. Daraus lässt sich zunächst schließen, daß die Fusionsstellen günstig gewählt worden sein müssen (s. Kapitel 5.4-3). Die dritten Module der Systeme TycA/ProCAT-OrnCAT-Te und TycA/ProCAT-LeuCATTe akzeptieren und prozessieren normalerweise ein Okta- bzw. Nonapeptid mit carboxyterminalem Valyl- bzw. Ornithylrest. Ihre Fähigkeit, ein DPhe-Prolyl-Intermediat zu akzeptieren und zu prozessieren, deutet deshalb auch auf eine Toleranz der C-Domäne gegenüber dem vom vorangehenden Modul überreichten Peptid hin. Damit werden Hinweise auf die relative Unspezifität der sogenannten Donorposition der C-Domäne [de Crécy-Lagard *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 1996; Mootz & Marahiel, 1997a] bestätigt [Belshaw *et al.*, 1999]. Ebenso konnten Hinweise für eine Stereoselektivität der sogenannten Akzeptor-

position der C-Domäne gesammelt werden. So wurden von den Systemen TycA/ProCAT-OrnCAT-Te und TycA/ProCAT-LeuCATTe zwar dLeu bzw. dOrn an der dritten Position aktiviert, führten in Reaktionsansätzen mit [14 C]-Phe und Pro aber nicht zu nachweisbaren Mengen der entsprechenden Tripeptide. Ein analoges Ergebnis wurde nach künstlicher Fehlbeladung von ProCAT ‡ mit dPro (kein natürliches Substrat der ProA-Domäne) erhalten. Nach Zugabe von GrsA und [14 C]-Phe konnte keine Bildung eines dPhe-dPro Dipeptides beobachtet werden [Belshaw *et al.*, 1999]. Diese Selektivität der C-Domäne könnte auch die Erklärung für die Inhibierung der Surfactin *in vitro* Synthese durch dLeu sein [Ullrich *et al.*, 1991], da die C-Domänen der Leu-Module an zweiter und siebter Position der Synthetasen auf den Einbau von LLeu spezialisiert wurden. Die Donor- und Akzeptorpositionen der C-Domäne sind in Abbildung 6.4-3 am Beispiel des Hybridsystems TycA/ProCAT-LeuCATTe illustriert.

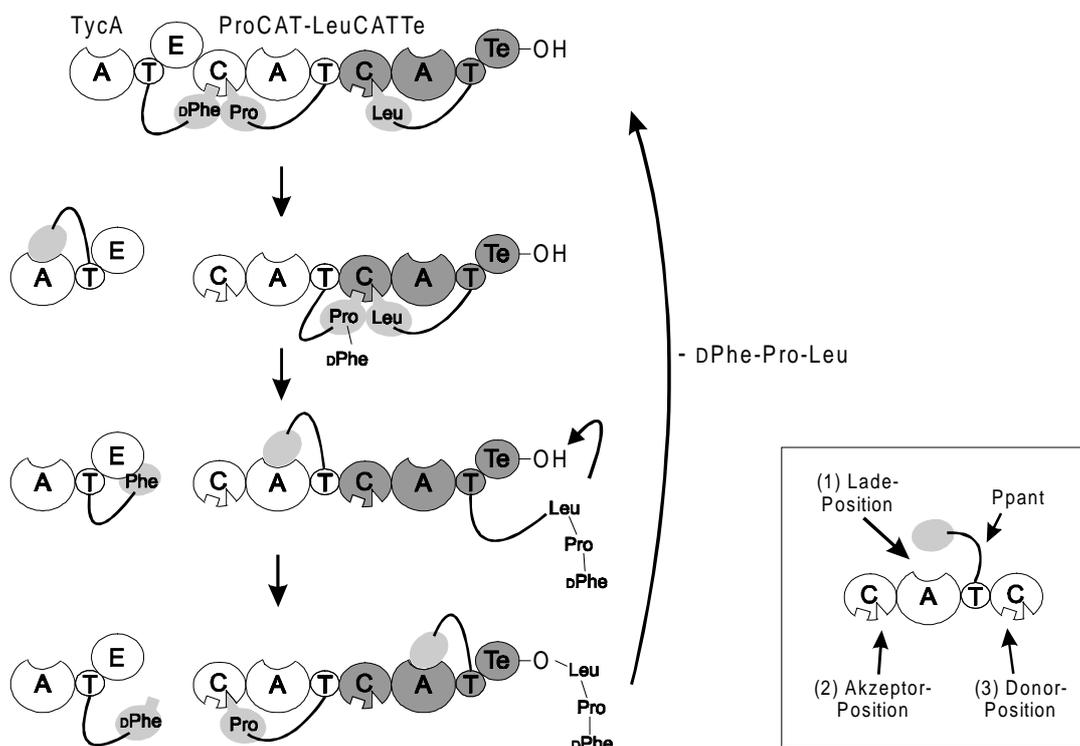


Abb. 6.4-3 Reaktionsabfolge im trimodularen System TycA/ProCAT-LeuCATTe: TycA aktiviert und bindet Phe und epimerisiert es zu dPhe, das von ProCAT-LeuCATTe auf das am Pro-Modul gebundene Pro übertragen wird. Das Intermediat dPhe-Pro wird dann am Leu-Modul zum enzymgebundenen Tripeptid dPhe-Pro-Leu verlängert. Nach einer Übertragung auf den Serinrest des katalytischen Zentrums der Te-Domäne erfolgt die Freisetzung des linearen Produktes dPhe-Pro-Leu durch Hydrolyse. Die gerichtete Reaktionsabfolge wird durch die Affinitäten der in verschiedenen Beladungszuständen vorliegenden Ppant-Kofaktoren zu den einzelnen Reaktionszentren kontrolliert. Dabei zeichnet sich die Akzeptorposition der C-Domäne gegenüber der Donorposition durch eine erhöhte Spezifität aus. Gebundene Aminosäuresubstrate der entgegengesetzten Konfiguration (z.B. dLeu am Leu-Modul) werden nicht erkannt und blockieren somit die Elongation.

Die geringere Selektivität der C-Domänen an der Donorposition gegenüber einer höheren an der Akzeptorposition legt nahe, daß die repetitiven Module der Peptidsynthetasen aus Domänen der Reihenfolge CAT oder TCA (und nicht etwa ATC) bestehen, und in dieser Form durch Genduplikationen vervielfältigt werden. Demnach sollte mit den in dieser Arbeit vorgenommenen Fusionen (CAT-CAT) eine richtige Wahl getroffen worden sein. Auf diese Weise ließen sich produktive Interaktionen zwischen dem zweiten und dem dritten Modul erzwingen. Daß so funktionelle Peptidsynthetasen entstanden sind, weist wiederum auf die enzymatische Flexibilität der Module hin. Entweder sind hier zur Kommunikation keine akkuraten Protein-Protein Wechselwirkungen erforderlich, beispielsweise weil nur der beladene Kofaktor des vorangehenden Moduls zur Erkennung durch die Donorposition der C-Domäne erkannt werden könnte. Oder die Aminosäurereste, die die Protein-Protein Wechselwirkung zwischen zwei Modulen kontrollieren, sind so hoch konserviert, daß sie in den hier vorgenommenen Konstruktionen erhalten blieben. Denn die Fusion scheint die Geschwindigkeit der Produktbildung nicht oder nur wenig zu beeinflussen. Die katalytische Umsatzrate des TycA/ProCAT-LeuCATTe Systems von $\geq 0,20-0,25 \text{ min}^{-1}$ je DPhe-Pro-Leu Tripeptid (s. Kapitel 5.4.5.3) liegt in der gleichen Größenordnung wie die Geschwindigkeitskonstante der Initiationsreaktion zur DPhe-Pro-Enzym Bildung ($1,4-1,8 \text{ min}^{-1}$) [Stachelhaus *et al.*, 1998; Belshaw *et al.*, 1999]. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Abspaltung des Tripeptides durch die Te-Domäne wahrscheinlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (s. Kapitel 5.4.6) [Roskoski *et al.*, 1970b]. In diesem Zusammenhang kann die katalytische Umsatzrate des natürlichen Tyrocidin Synthetasekomplexes als Vergleich herangezogen werden. Leider ist dieser Wert trotz der umfangreichen biochemischen Untersuchungen der Enzyme nie genau bestimmt worden. Eine Aktivitätsangabe von Kurahashi und Mitarbeitern, in Ermangelung der Kenntnis des Molekulargewichts der Tyrocidin Synthetasen auf die eingesetzte Masse an Protein bezogen [Fujikawa *et al.*, 1968a], läßt sich auf etwa $0,4 \text{ min}^{-1}$ umrechnen und stimmt damit sehr gut mit den oben diskutierten Werten überein.

Diese Ergebnisse unterstützen also das Modell, demnach Module und Domänen in multimodularen Peptidsynthetasen unter der Instruktion ihrer Reihenfolge innerhalb der Polypeptidkette interagieren. Dafür spricht auch der Befund, daß interne A-Domänen als eigenständige und aktive Proteinefragmente erhalten werden konnten. Damit ergeben sich beeindruckende Möglichkeiten für die Konstruktion neuer, beliebiger Peptidsynthetase-matrizen. Wahrscheinlich wird jedoch die Vielseitigkeit vor allem auf die internen Module

zutreffen, da für sie innerhalb des multimodularen Enzymverbandes keine besondere Spezialisierung zur Erkennung der benachbarten Module erforderlich war. Im Zusammenspiel der Peptidsynthetasen eines Enzymkomplexes muß es dagegen auch spezifische Protein-Protein Wechselwirkungen geben, um die korrekte Synthese des Produktes zu gewährleisten. Das gilt für die drei Enzyme des Phosphinotricin Synthetasekomplexes (s. Abb. 6.4-2) ebenso wie für die Tyrocidin Synthetasen TycA, TycB und TycC.

6.4.2 Ornithin als Terminator der Peptidsynthese

Im System TycA/ProCAT-OrnCAT wurde die Instabilität von Ornithin-Thioestern für die Produktabspaltung ausgenutzt. Ornithin-Thioester spalten sich durch intramolekularen Angriff der δ -Aminogruppe auf die aktivierte Carboxylgruppe ab, wobei es zur Bildung eines 6-Ring Laktams kommt. Diese Reaktion wurde für die Gramacidin S Synthetase beschrieben [Gadow *et al.*, 1983; Vater *et al.*, 1987], wo die Zyklisierung von thioesteraktiviertem Ornithin zu cycloOrn (3-Amino-2-piperidon), bzw. die Zyklisierung des enzymgebundenen DPhe-Pro-Val-Orn-Zwischenproduktes zur Abspaltung von DPhe-Pro-Val-cycloOrn führte. Tatsächlich konnten sowohl mit dem System TycA/ProCAT-OrnCAT als auch mit TycA/ProCAT-OrnCAT-Te die Produkte cycloOrn und DPhe-Pro-cycloOrn synthetisiert werden. Die Bildungsrate lag mit $\geq 0,025 \text{ min}^{-1}$ um etwa eine Größenordnung niedriger als die der DPhe-Pro-Leu Bildung mit dem System TycA/ProCAT-LeuCATTe.

Das Ornithin Modul OrnCAT stellt demzufolge bei der Konstruktion chimärer Peptidsynthetasen eine Alternative zu einer Te-Domäne dar, indem durch seine Verwendung auch eine Produktabspaltung herbeigeführt werden kann. Diese durch Ornithin induzierte Abbruchreaktion wird auch als Grund für die Abwesenheit des ubiquitären Metaboliten in der ribosomalen Peptidsynthese diskutiert [Weber & Miller, 1981]. Hier wurde von der Evolution Lysin als nächsthöheres Homologes des Ornithins selektiert. In der nichtribosomalen Peptidbiosynthese steht dagegen die strukturelle Vielfalt und nicht die Stabilität der (Zwischen-)produkte im Vordergrund. Mit Lysin als Substrat wurde auch von dem System TycA/ProCAT-OrnCAT-Te nur DPhe-Pro-Lys und kein DPhe-Pro-cycloLys produziert.

6.4.3 Rolle und Mechanismus der Te-Domäne

Die Rolle der Te-Domäne bakterieller Peptidsynthetasen als Terminations- und Abspaltungsfunktion wurde bereits in der Literatur diskutiert [Schneider & Marahiel, 1998; de Ferra *et al.*, 1997; Marahiel *et al.*, 1997; de Crécy-Lagard, 1999; Gehring *et al.*, 1998c]. Eine

Deletion der Te-Domäne des Surfactin Synthetasekomplexes führte zur einer Reduktion der Surfactinproduktion um 97 % [Schneider & Marahiel, 1998]. Ebenfalls am Beispiel der Surfactin Biosynthese konnte gezeigt werden, daß eine Verschiebung der Te-Domäne durch Fusion an interne Module zur *in vivo* Synthese entsprechend verkürzter Produkte führt [de Ferra *et al.*, 1997]. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stellen die ersten Translokationen einer Te-Domäne an *in vitro* studierbaren Hybridenzymen dar. Neben der erzwungenen Termination der Peptidsynthese konnten so auch Hinweise auf mechanistische Aspekte der Te-Domäne des Tyrocidin Biosynthesekomplexes gewonnen werden.

Anhand der drei Systeme TycA/ProCATPheCAT-Te, TycA/ProCAT-OrnCAT-Te und TycA/ProCAT-LeuCATTe konnte die essentielle Funktion der Te-Domäne zur Produktabspaltung nachgewiesen werden. Die Abspaltung der entsprechenden Tripeptide war in allen drei Fällen von der Te-Domäne abhängig, da in den Kontrollen ohne Te-Domäne keine freien Tripeptide nachgewiesen werden konnten. Nur das System TycA/ProCAT-OrnCAT spaltete auch ohne Te-Domäne ein Tripeptidprodukt ab. Diese Reaktion beruhte jedoch auf dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Eigenschaften des Ornithinthioesters. Im System TycA/ProCAT-LeuCAT konnte die Produktabspaltung auch durch Zugabe der Te-Domäne als diskretes Protein reaktiviert werden.

Eine Translokation der Te-Domäne an ein anderes Modul (ProCATPheCAT-Te und ProCAT-OrnCAT-Te) kann also ebenso wie die Translokation eines gesamten Moduls mit Te-Domäne (LeuCATTe) zur hydrolytischen Abspaltung der entsprechenden enzymgebundenen Peptide erwirkt werden. Im natürlichen Tyrocidin Synthetasenkomplex scheint die Te-Domäne jedoch nicht als Hydrolase zu arbeiten, da ein freies lineares Dekapeptid nicht als Intermediat zur Synthese des zyklischen Dekapeptides Tyrocidin nachgewiesen werden konnte [Roskoski *et al.*, 1970b]. Vielmehr scheint die Abspaltung und Zyklisierung des nachweisbar enzymgebundenen linearen Dekapeptides [Roskoski *et al.*, 1970b] in einem Schritt zu erfolgen. Wenn die Te-Domäne auch diese Reaktion vermittelt, sollte sie also als Zyklase fungieren. Eine hydrolytische Katalyseeigenschaft wäre dann sogar unerwünscht, da dadurch das Intermediat vor dem letzten Syntheseschritt verloren wäre. Eine als Zyklase arbeitende Te-Domäne sollte also den Eintritt des Nukleophils H₂O in ihr katalytisches Zentrum möglichst effizient unterdrücken.

Für diese Hypothese konnten anhand des Systems TycA/ProCAT-LeuCATTe, in dem die Te-Domäne sich noch an ihrem natürlichen Modul befindet, mit Nukleophil-Studien deutliche Hinweise gesammelt werden. Bereits geringe Mengen des alternativen Nukleophils

Glyzerin in den Reaktionsansätzen führten zur bevorzugten Synthese des DPhe-Pro-Leu-Glyzerin Adduktes (s. Kapitel 5.4.6.2). Mit diesem Nucleophil ist die Te-Domäne in ihrem natürlichen Organismus nicht konfrontiert und kann dessen Eintritt in das katalytische Zentrum im Vergleich mit H₂O entsprechend unzureichender unterdrücken. Ähnliche Reaktionen mit ungewöhnlichen Nucleophilen konnten bei chimären Polyketidsynthasen beobachtet werden. Die Te-Domäne des letzten Moduls des Erythromycin Synthasekomplexes (bestehend aus den Enzymen DEBS1, DEBS2 und DEBS3 [Cortes *et al.*, 1990]) wurde an verschiedene interne Module fusioniert, was in der *in vivo* Synthese der entsprechend verkürzten zyklischen Produkte resultierte [Cortes *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 1995]. *In vitro* wurde erst durch die Fusion an das erste Modul von DEBS1 auch die hydrolytische Abspaltung des entsprechenden Diketides beobachtet, da nun durch die Kettenlänge eine Zyklisierung nicht mehr möglich war [Böhm *et al.*, 1998]. Spezifitätsuntersuchungen an der Te-Domäne *in vitro* zeigten weiterhin, daß Ethanol als Nucleophil gegenüber H₂O bevorzugt ist [Weissman *et al.*, 1998].

Wenn die Te-Domäne des Tyrocidin Synthetasekomplexes die Zyklisierung des linearen Dekapeptidintermediates katalysiert, sollte sie nicht nur den nukleophilen Angriff von H₂O unterdrücken, sondern gleichermaßen den Angriff des N-Terminus des enzymgebundenen Dekapeptides ermöglichen. Daher wurden den Reaktionsansätzen des System TycA/ProCAT-LeuCATTe Mimikri des N-Terminus des linearen Intermediates zugesetzt. Durch die Zugabe von 10 mM DPhe-Pro konnte tatsächlich die Bildung eines neuen Produktes induziert werden. Eine ESI-MS Analyse des Produktgemisches dieses Ansatzes zeigte ein zusätzlich auftretendes Signal, das dem Pentapeptid DPhe-Pro-Leu-DPhe-Pro zugeordnet werden konnte, welches dem Produkt eines nukleophilen Angriffs von DPhe-Pro auf das enzymgebundene Tripeptid DPhe-Pro-Leu entspräche. Nach Zugabe von LPhe-Pro, DPhe-Ala, DPhe oder LPhe in Konzentrationen von 10 mM oder höher konnten dagegen keine Hinweise für neue Produkte erhalten werden. Die Te-Domäne schien also in der Lage, die richtige Konfiguration der ersten, und die Identität der ersten beiden Aminosäuren des Intermediates selektieren zu können. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die Te-Domäne des Tyrocidin Synthetasekomplexes die Bildung der zehnten Peptidbindung, und damit die zum Endprodukt führende Zyklisierung, katalysiert. In der genauen Reaktionsabfolge erscheint dabei zunächst der Transfer des linearen Dekapeptides von der Thioesterbindung am Kofaktor der letzten T-Domäne auf den Serinrest der katalytische Triade der Te-Domäne wahrscheinlich (s. Abb. 6.4-4). Die energiereiche Thioesterbindung würde somit gegen eine

Esterbindung im reaktiven Zentrum eingetauscht werden. Anschließend würde, katalysiert durch die katalytische Triade, der Angriff der Aminogruppe des N-terminalen D-Phenylalanins auf die Carbonylgruppe des C-terminalen Leucins zur Bildung der Peptidbindung und zur Abspaltung des Produktes vom Enzymkomplex führen (s. Abb. 6.4-3 und 6.4-4).

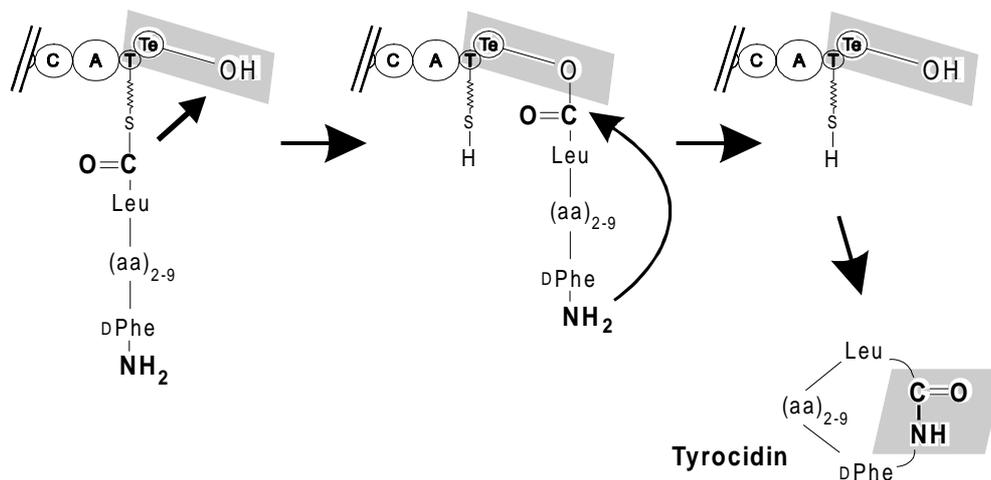


Abb. 6.4-4 Vorgeschlagener Reaktionsablauf der Produktabspaltung in der Tyrocidin Biosynthese: Das lineare Dekapetid ist das letzte Zwischenprodukt der Tyrocidin Biosynthese und liegt an der T-Domäne des letzten Moduls der Tyrocidin Synthetasen als Thioester gebunden vor. Nach Transfer auf den konservierten Serinrest der katalytischen Triade der Te-Domäne erfolgt ein durch die Te-Domäne katalysierter nukleophiler Angriff der Aminogruppe des N-Terminus, der zur Abspaltung des zyklischen Produktes führt.

Der vorgeschlagene Mechanismus der Te-Domäne beinhaltet wichtige Konsequenzen für die nichtribosomale Peptidbiosynthese: Die Art der Abspaltung des Produktes vom Peptid-synthetasekomplex stünde unter der Kontrolle der Te-Domäne. Eine Hydrolase würde ein lineares Produkt abspalten, während eine Zyklase Art (Amid- oder Esterbildung) und Regio-selektivität (zyklisch oder verzweigt zyklisch) bestimmen würde. Eine solche Interpretation findet weiter Unterstützung durch die Analyse der Primärstrukturen der Tyrocidin und Gramacidin S Synthetasen. Wie bereits erwähnt (s. Kapitel 6.1-2), unterscheiden sich diese beiden System in erster Linie durch den Einschub von fünf zusätzlichen Modulen im Tyrocidinsystem. Dennoch synthetisiert auch der Gramacidin S Synthetasekomplex eine zyklisches Dekapeptid, das aus einer Kopf-zu-Schwanz Dimerisierung zweier identischer Pentapeptide der Sequenz D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu resultiert. Die fünf Module für die Synthese des Pentapeptidintermediates sind den fünf Modulen gleicher Spezifität der Tyrocidin Synthetasen äußerst ähnlich (s. Kapitel 6.1-2). Insbesondere konnten hier keine signifikanten

Einschübe in der Primärstruktur identifiziert werden, die sich mit der Dimerisierungsaktivität der Gramicidin S Synthetasen in Verbindung bringen lassen könnten. Allerdings finden sich beim Vergleich der Te-Domänen beider Systeme relativ hohe Heterogenitäten, insbesondere in deren zweiten Hälfte, sowie der Einschub eines Sequenzmotivs von 24 aa Länge in der Te-Domäne der Gramicidin S Synthetase GrsB [Turgay *et al.*, 1992; Mootz & Marahiel, 1997b]. Es läßt sich somit spekulieren, daß auch in diesem Falle die Te-Domäne die Information für die besondere Art der Produktabspaltung durch Dimerisierung beinhaltet. Mittels gezielter Mutagenese des katalytischen Zentrums sowie MS-Nachweis aller enzymgebundenen Intermediate konnte kürzlich die Trimerisierung des Intermediates DHB-Ser durch die Te-Domäne des Enterobactin Synthetasekomplexes nachgewiesen werden (s. Abb. 6.3-1)[Gehring *et al.*, 1998c].

Die Spezifität der Te-Domäne wird daher bei allen Ansätzen zur Konstruktion neuer Peptidsynthetasenmatrizen in Betracht zu ziehen sein [Mootz & Marahiel, 1999a; Schwarzer, 1999].

6.5 4'-Phosphopantethein Transferasen: essentielle Enzyme im Primär- und Sekundärmetabolismus

Eines der grundlegenden Prinzipien der nichtribosomalen Peptidbiosynthese ist die kovalente Bindung der aktivierten Substrataminosäuren und Syntheseintermediate an den Modulen der Proteinmatrize. Dabei werden die Aminoacyl- bzw. Peptidylreste über ihre C-terminale Carboxylgruppe an die Sulfhydrylgruppe des Kofaktors 4'-Phosphopantethein als Thioester gebunden. Der Kofaktor ist wiederum über seine 3'-Phosphatgruppe mit der Seitenkette eines invarianten Serinrestes der T-Domänen als Phosphodiester verknüpft. Die Ppant-Transferasen, die die Übertragung des 4'-Phosphopantethein-Restes des Coenzym A auf die Peptidsynthetasen katalysieren, und diese damit von ihrer inaktiven apo- in die aktive holo-Form überführen, sind somit für die nichtribosomale Peptidbiosynthese essentielle Enzyme.

Die Fettsäure- und Polyketid-Synthasekomplexe verfolgen eine ähnliche Biosynthesestrategie [Cronan & Rock, 1996]. Hier werden die Intermediate in gleicher Art am Acyl-carrier-protein, ACP, gebunden. Die Acyl-carrier-protein Synthase, ACPS, die für die Modifikation von ACP der Fettsäurebiosynthese zuständig ist, ist daher für die Zelle ein essentielles Enzym. Dabei wurden offensichtlich für die Fettsäurebiosynthese des Primärstoffwechsels und die nichtribosomale Peptidbiosynthese des Sekundärstoffwechsels jeweils eigene Ppant-Transferasen entwickelt. So konnten Lambalot *et al.* durch *in vitro* Experimente zeigen, daß ACPS aus *E. coli* nur ACP, nicht aber T-Domänen oder Module aus den Gramicidin S und Surfactin Synthetasen als Substrat erkennt. Umgekehrt jedoch modifiziert die Ppant-Transferase Sfp des Surfactin Biosynthesekomplexes auch ACP aus *E. coli in vitro* [Lambalot *et al.*, 1996].

In dieser Arbeit wurde eine Unterbrechung des *acps*-Gens in *E. coli* konstruiert. Die mit diesem Stamm möglich gewordenen Komplementationsversuche zeigten, daß *sfp* auch *in vivo acps* komplementieren kann. Ebenso konnten *gsp* des Gramicidin S Biosynthesekomplexes, das *E. coli* Gen *yhhU* unbekannter Funktion und das *acps*-homologe *acps B. sub* aus *B. subtilis* die essentielle Funktion des *acps in vivo* übernehmen. Diese Ergebnisse erlauben Spekulationen über die Ursachen und Determinanten der Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen Ppant-Transferasen und ihren Substraten.

6.5.1 Funktionen von *acps*, *yhhU* und *entD* aus *E. coli*

Die Ppant-Transferase ACPS ist für *E. coli* von essentieller Bedeutung, da sie die posttranslationale Modifikation von apo-ACP zu holo-ACP katalysiert [Lambalot & Walsh, 1995; Lambalot & Walsh, 1997]. Nur holo-ACP kann als unverzichtbare Komponente der Fettsäuresynthase agieren. Die Produkte der Fettsäuresynthase sind Bausteine für die Phospholipide und Lipid A, sowie für die Kofaktoren Biotin und Liponsäure [Cronan & Rock, 1996]. In der Biosynthese der Phospholipide kann dabei der Acyl-Rest von Acyl-ACP oder Acyl-CoA auf die entsprechenden Zwischenprodukte, Glycerin-3-phosphat bzw. 1-Acylglycerin-3-phosphat, transferiert werden. Diese Reaktionen werden durch die Acyltransferasen PlsB bzw. PlsC katalysiert [Cronan & Rock, 1996]. In der Biosynthese des Lipid A [Raetz, 1996] akzeptieren die 3-Hydroxy-Myristoyl-, Myristoyl- und Lauroyl-ACP Acyltransferasen (LpxA, MsbB bzw. HtrB) jedoch nur das entsprechende Acyl-ACP als Substrat [Brozek & Raetz, 1990; Clementz *et al.*, 1997; Raetz, 1996] (s. Abb. 6.5-1). Das unmodifizierte apo-ACP mindert zudem stark das Zellwachstum, wahrscheinlich durch Inhibierung der Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase PlsB [Keating *et al.*, 1995; Jackowski & Rock, 1983].

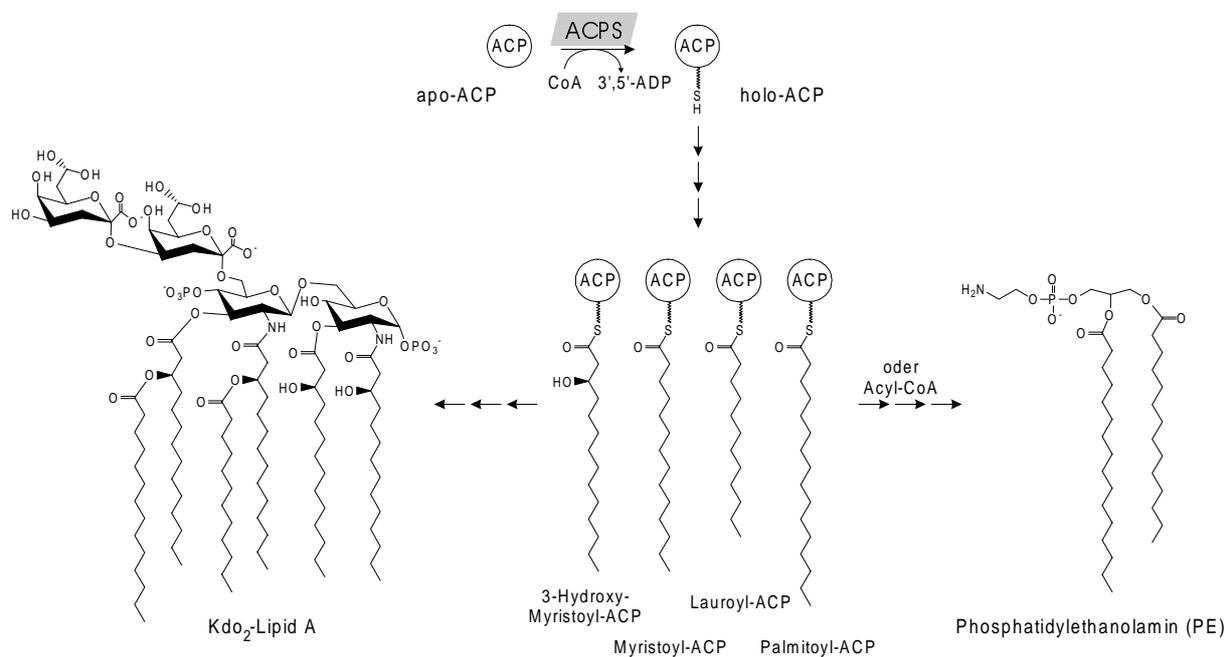


Abb. 6.5-1 Funktion von ACPS und holo-ACP aus *E. coli*: Die Ppant-Transferase ACPS wandelt apo-ACP in holo-ACP um, das essentieller Bestandteil für die *de novo* Fettsäurebiosynthese ist. Acyl-ACPs agieren in der Phospholipidsynthese und sind essentielle Substrate für den Lipid A-Bestandteil der Lipopolysaccharide.

ACPS wird durch das Gen *acps* (frühere Bezeichnung *dpj*) kodiert [Lambalot & Walsh, 1995]. Dieses Gen ist das zweite Gen des bicistronischen *pdxJ*-Operons [Matsunaga *et al.*, 1996; Takiff *et al.*, 1992]. Zu einem Zeitpunkt, als die Funktion des Gens *acps* noch nicht bekannt war, konnte durch genetische Analysen gezeigt werden, daß es sich um ein essentielles Gen handelt [Takiff *et al.*, 1992; Lam *et al.*, 1992]. Nach seiner konditionellen Unterbrechung wurden jedoch nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37°C sehr langsam wachsende Kolonien beobachtet, die nach mehrmaligem Umstreichen nahezu so schnell wie der Wildtyp wuchsen. Die so erhaltenen Suppressormutanten konnten in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden, von denen für die erste eine Mutation in der Nähe der Lon-Protease, wahrscheinlich im *lon*-Gen selbst, charakterisiert werden konnte [Lam *et al.*, 1992]. Die Autoren postulierten, daß ein unbekannter Faktor die Funktion des *acps*-Genproduktes komplementierte, dieser Faktor aber normalerweise von der Lon-Protease inaktiviert wird und erst in den beobachteten Suppressormutanten seine Wirkung voll entfalten konnte [Lam *et al.*, 1992]. Ein ähnlicher Effekt, der mit dem beschriebenen identisch sein könnte, wurde in dieser Arbeit beobachtet. Nach P1-Phagen Transduktion des *acps::Km^R*-Genotyps in *E. coli* Zellen, konnten nach Inkubation über Nacht bei 37°C nur in solchen Fällen Kanamycin resistente Transduktanten erhalten werden, in denen die Rezipientenzellen auf einem Plasmid das komplementierende Gen für eine geeignete Ppant-Transferase trugen. Diese Transduktanten wiesen ein offensichtlich normales Wachstum auf. Nach einer 2-3 tägigen Inkubation bei 37°C waren jedoch auch in den Ansätzen kleine Kolonien zu identifizieren, die als Kontrollen der Transduktion und der Komplementation gedacht waren, das heißt Ansätze, in denen Rezipientenzellen ohne bzw. mit leerem Plasmid verwendet wurden. Nach einmaligem Umstreichen auf *Km⁶⁰*-Platten zeichneten sich die so erhaltenen Kolonien durch offensichtlich normales Wachstum aus. Eine PCR-Analyse des *acps*-Lokus bestätigte den *acps::Km^R*-Genotyp. Es handelte sich also um echte Transduktanten und nicht um spontan Kanamycin resistente Zellen.

Diese Ergebnisse könnten sich durch die Präsenz von weiteren Ppant-Transferasen kodierenden Genen im *E. coli* Chromosom erklären lassen. Neben *acps* besitzt *E. coli* die Gene *entD* und *yhhU* (auch als o195 bezeichnet). In Abbildung 6.5-2 sind ihre Lokalisation im *E. coli* Genom graphisch dargestellt. *entD* kodiert für die Ppant-Transferase EntD des Enterobactin Biosynthesekomplexes [Lambalot *et al.*, 1996; Gehring *et al.*, 1998c]. *yhhU* ist ein Gen unbekannter Funktion, dessen Genprodukt O195 Homologien zu Ppant-Transferasen

aufweist. Beide Proteine modifizieren ACP *in vitro* nur marginal [Lambalot *et al.*, 1996]. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann allerdings *yhhU*, im Gegensatz zu *entD*, auf einem Multikopienplasmid unter der Kontrolle des *lac*-Promotors die *acps*-Unterbrechung *in vivo* komplementieren. Es wäre also denkbar, daß eine schwache Expression der chromosomalen Kopie von *yhhU* die Zellen ohne funktionelles *acps* am Leben erhalten kann, bis eine zweite spontane Mutation die Effizienz dieser Komplementation deutlich erhöht. Nach dieser Hypothese wäre das Genprodukt von *yhhU* der von Lam *et al.* postulierte Faktor [Lam *et al.*, 1992]. Die zweite Mutation erfolgt dann entweder in *lon* [Lam *et al.*, 1992], oder könnte im Regulationsbereich von *yhhU* oder in *yhhU* selbst liegen, und damit die zweite Gruppe der von Lam *et. al* erhaltenen Suppressormutanten darstellen, deren Lage im Chromosom nicht näher untersucht wurde [Lam *et al.*, 1992]. Die Gene *yhhU* und *lon* befinden sich in deutlichem Abstand voneinander (77,81 und 9,87 min; s. Abb. 6.5-2). Zur Prüfung dieser Hypothese müßte zusätzlich eine Unterbrechung von *yhhU* konstruiert werden. Außerdem sollte *yhhU* und sein Regulationsbereich (es liegt als letztes Gen in einem bicistronischen Operon unbekannter Funktion) in Kanamycin resistenten *acps*::Km^R-Transduktanten sequenziert und auf Mutationen untersucht werden.

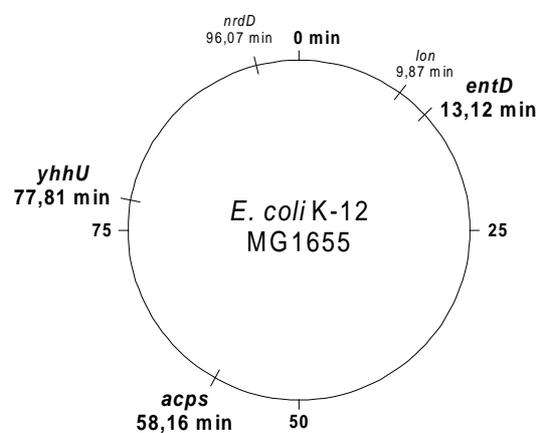


Abb. 6.5-2 Ppant-Transferasen kodierende Gene in *E. coli*: Auf einer physikalischen Karte von *E. coli* K-12 [Blattner *et al.*, 1997] sind die drei für Ppant-Transferasen kodierenden Gene *acps*, *entD* und *yhhU* dargestellt. Der Locus *nrdD* wurde zur Insertion von verschiedenen DNA-Fragmenten verwendet. Dargestellt ist auch die Position des Gens *lon* (s. Text).

6.5.2 Komplementation von *acps in vivo*: Determinanten der Protein-Protein Erkennung

Eine *in vivo* Komplementation von *acps* konnte für folgende Gene gezeigt werden: *sfp*, *gsp*, *yhhU* (s. vorheriger Abschnitt) und dem *acps*-Homologen *acps B.sub* aus *B. subtilis*. Die Gene *sfp* und *acps B. sub* wurden auch auf low-copy Plasmiden und *sfp* auch nur mit einer einzigen chromosomalen Kopie getestet. Beide Gene konnten auch trotz verringerter Kopienzahl *acps* komplementieren. Nicht komplementieren konnte dagegen *entD* des Enterobactin Synthetasekomplexes aus *E. coli*. Diese Befunde ergänzen das bisher durch *in vitro* Experimente gezeichnete Bild, daß Ppant-Transferasen spezifische Partner haben, *sfp* allerdings eine breitere Substratspezifität besitzt und auch ACPs modifizieren kann. Diese breitere Substratspezifität von *sfp*, und auch *gsp*, bestätigte sich also auch unter den stringenteren *in vivo*-Bedingungen. Dagegen steht das *in vivo*-Ergebnis mit *yhhU* im Widerspruch zu veröffentlichten *in vitro* Spezifitäten des Genproduktes O195 [Lambalot *et al.*, 1996]. Das bislang putative *acps B. sub* wurde durch die genetischen Nachweise in dieser Arbeit erstmals charakterisiert.

Über das Auftreten mehrerer Ppant-Transferasen (ACPS, EntD und O195 in *E. coli*, ACPS und Sfp in *B. subtilis*) im gleichen Organismus, und die Ursache ihrer Spezialisierung auf ihr jeweiliges Partner-Protein, mit Ausnahme von Sfp, kann nur spekuliert werden. Offensichtlich findet eine Trennung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus statt. Dies könnte beispielsweise in der Regulation des CoA-Metabolismus begründet sein. So findet man in *E. coli* eine starke Beteiligung des ACP-gebundenen Kofaktors am CoA-Metabolismus [Jackowski & Rock, 1984a]. Eine Phosphodiesterase spaltet holo-ACP wieder zu apo-ACP und 4'-Phosphopantethein [Fischl & Kennedy, 1990]. Mit einer Rate von 4 % pro Minute wird das ACP-gebundene 4'-Phosphopantethein ausgetauscht [Powell *et al.*, 1969; Jackowski & Rock, 1984b]. Die physiologische Funktion dieses Kreislaufes ist unbekannt. Es sind auch keine Untersuchungen veröffentlicht worden, die einen ähnlichen Kreislauf etwa für die holo-T-Domänen der Enterobactin Synthetasen behandeln. Eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Systeme könnte aber auf dieser Ebene unerwünscht sein. Ein anderer augenfälliger Unterschied zwischen den Substraten der Ppant-Transferasen liegt in der Organisation in Enzymkomplexe begründet. ACP ist in *E. coli* und *B. subtilis* ein diskretes Protein, während die T-Domänen der Peptidsynthetasen in multimodularen Strukturen eingebunden sind. Somit könnte die unterschiedliche räumliche Umgebung verschiedene Strategien zur Protein-Protein Erkennung erfordern. Ppant-Transferasen vom ACPS-Typ erkennen diskrete ACPs [Debabov *et al.*, 1996; Gehring *et al.*, 1997; Cox *et al.*, 1997], und Ppant-Transferasen vom Sfp-Typ

erkennen T-Domänen als Bestandteile multimodularer Peptidsynthetasen. Unter diesem Aspekt wäre ein Vergleich mit den für Polyketidsynthetasen vom Typ I spezifischen Ppant-Transferasen interessant, da diese Biosyntheseenzyme ihre multiplen ACPs ebenfalls im multimodularen Enzymverband eingebunden enthalten. Es ist aber noch keine Polyketidsynthetasen-(Typ I)-spezifische Ppant-Transferase beschrieben worden.

Eine mögliche Spezifitätsdeterminante zur Protein-Protein Erkennung ist die unterschiedliche Ladung von ACPs und T-Domänen. Die kinetischen Konstanten der ACPS-katalysierten Modifikationsreaktionen von ACP aus *E. coli* und den ACPs der PKS-Typ II Biosynthesesysteme für Frenelicin, Granaticin, Oxytetracyclin und Tetracenomycin aus *Streptomyces spp.* sind beschrieben worden [Gehring *et al.*, 1997]. Dabei konnte eine Abhängigkeit des K_m/k_{cat} -Wertes der 4'-Phosphopantetheinylierung von ACPS für verschiedene ACPs von der theoretisch errechneten elektrischen Ladung (bei pH 7) der letzteren festgestellt werden (s. Tab. 5.4-1). Je saurer das jeweilige ACP desto besser war es als Substrat für ACPS geeignet. Wenn man einen solchen Vergleich der theoretischen elektrischen Ladungen auch auf T-Domänen aus Peptidsynthetasen und ACPs aus Typ I-Polyketidsynthetasen ausdehnt, scheinen sich gewisse Gesetzmäßigkeiten zu ergeben. In Tabelle 6.5-1 sind die Werte dieser Berechnungen aufgeführt. Dazu wurden die T-Domäne der Peptidsynthetasen und ACPs der Typ I-Polyketidsynthetasen als ein Abschnitt von jeweils 40 aa vor und nach dem invarianten Serinrest definiert. Tatsächlich sind diese internen Carrier-Proteine deutlich weniger sauer als die diskreten ACPs. Die Hauptunterschiede begrenzen sich dabei auf die jeweils C-terminale Hälfte. Die ACPs der 6-Deoxyerythronolid B Synthetasen (kodiert durch die *ery*-Gene) [Cortes *et al.*, 1990] entsprechen in dieser Eigenschaft den T-Domänen der Peptidsynthetasen, in Übereinstimmung mit experimentellen Daten, nach denen diese Enzyme nicht als Substrate für ACPS fungieren [Roberts *et al.*, 1993]. Damit könnte eine Determinante für die Substraterkennung von ACPS aus *E. coli* gefunden sein. Interessant ist aber auch die Abstufung der Werte innerhalb der multimodularen Biosynthesekomplexe (die Werte in der Tabelle entsprechen den gemittelten Werte, z.B. der sieben T-Domänen der Surfactin Synthetasen). Die T-Domänen der Surfactin Synthetasen sind saurer als die der Gramacidin S Synthetasen, und diese sind wiederum saurer als die der Enterobactin Synthetasen. In gleicher Reihenfolge wurden die Komplementationsfähigkeiten der entsprechenden Ppant-Transferasen beobachtet: *sfp* kann *acps* sehr gut komplementieren, *gsp* kann komplementieren, aber schon merklich schlechter, und *entD* kann nicht komplementieren. Die

elektrische Ladung der ACPs bzw. der T-Domänen könnte also der oder ein Schlüssel für die Erkennung der kognaten Ppant-Transferase sein.

Tab. 6.5-1 Korrelation der elektr. Ladung von ACPs/PCPs mit der Erkennung durch Ppant-Transferasen

ACP bzw. T-Domäne (PCPs)	kognate Ppant- Transferase	Ppant- Transferase komplementiert <i>acps::Km^R</i>	theoretische Ladung			k_{cat}/K_m ACPS (<i>E. coli</i>) ($\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)*
			ACP bzw. T-Domäne bei pH 7,0			
			gesamt	N	C	
ACP <i>E. coli</i>	ACPS <i>E. c.</i>		- 14,89	-5,08	-10,90	50*
ACP <i>gra</i>	unbekannt		- 14,09	-8,11	-6,07	6*
ACP <i>fren</i>	unbekannt		- 12,07	-5,92	-4,91	1,6*
ACP <i>tcm</i>	unbekannt		- 11,76	-8,11	-3,74	0,25*
ACP <i>otc</i>	unbekannt		- 11,10	-10,11	-1,08	0,26*
ACP <i>B. sub</i>	ACPS <i>B. s.</i>	+	-17,06	-5,08	-12,07	n.b.**
PCPs <i>srf</i>	Sfp	+	- 5,51	-4,35	-1,27	-
PCPs <i>lic</i>	Bli		-5,10	-4,46	-0,73	n.b.
PCPs <i>grs</i>	Gsp	(+)	-3,69	-3,88	0,10	-
PCPs <i>tyc</i>	unbekannt		-2,78	-3,63	0,70	n.b.
ACPs <i>ery</i>	unbekannt		-2,30	-3,78	1,39	n.b.
PCPs <i>fen</i>	(Sfp ?)		-1,45	-3,28	1,74	n.b.
PCPs <i>ent</i>	EntD	-	-3,43	-6,02	2,50	n.b.
PCPs <i>bac</i>	(Bli ?)		-1,30	-4,65	3,25	n.b.

* nach [Gehring *et al.*, 1997]; **n.b.=nicht bestimmt

Ein weiterer Hinweis für das Verständnis der Protein-Protein Interaktion zwischen den Ppant-Transferasen mit ihren Substraten ACP bzw. T-Domänen läßt sich aus einem chimären ACP/NodF Konstrukt ableiten [Ritsema *et al.*, 1998]. NodF aus *Rhizobium leguminosarum* ist an der Synthese spezieller mehrfach ungesättigter Fettsäuren beteiligt, die Bestandteil der Nodulationsfaktoren sind. Es wird *in vitro* von ACPS aus *E. coli* 4'-phosphopantetheinyliert. Der K_m -Wert für diese Carrier-Protein liegt bei 61 μM , gegenüber 2 μM für das natürliche Substrat ACP [Ritsema *et al.*, 1998]. Ein Hybridkonstrukt aus der N-terminalen Hälfte von ACP und der C-terminalen Hälfte von NodF wird ebenfalls von ACPS als Substrat erkannt. Der K_m -Wert für dieses Substrat ist mit 70 μM vergleichbar mit dem des intakten NodF [Ritsema *et al.*, 1998] und spricht daher auch für eine Lokalisation der Determinanten der Substrat-Erkennung in der C-terminalen Hälfte der ACPs bzw. T-Domänen.

7 Anhang

Tab. 7-1 Synthetische Oligonukleotide*

Name	Sequenz 5'-...-3'	Verwendung
Universal	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierungsprimer pBluescript
Reverse	GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierungsprimer pBluescript
5'-TycTE-NcoI	TATCCATGGAGCTATTTTGCTTTCCGTA	pQE60-tycF; 5'-Primer
3'-TycTE-BamHI	ATAGGATCCGAAAGAGGAATGGATTGCCA	pQE60-tycF; 3'-Primer
5'-ProA-NcoI	TATCCATGGTTCCGTTGCTGACAGAAG	pQE60-ProA2, pQE60-ProAT; 5'-Primer
3'-ProCA-BamHI	ATAGGATCCCAAGATTTGCTCCCAAATCGC	pQE60-ProA2, pQE60-ProCA; 3'-Primer
5'-PheA3-NcoI	TTACCATGGTGACAGCAGCAGAAAAGC	pQE60-PheA4; 5'-Primer
3'-PheA3-BamHI	ATTGGATCCCAGCTCGGTTTGCGG	pQE60-PheA4; 3'-Primer
5'-AsnA-NcoI	ATACCATGGAGATCGGCATCATCACC	pQE60-AsnA5; 5'-Primer
3'-AsnA-BamHI	TATGGATCCCTCGATTTTCATTTTGCGG	pQE60-AsnA5; 3'-Primer
5'-GlnA-NcoI	TATCCATGGTGACGGAAGCGGAAAAAC	pQE60-GlnA6; 5'-Primer
3'-GlnA-BamHI	TATGGATCCCTTGGCTTCCCATTCGTTG	pQE60-GlnA6; 3'-Primer
5'-TyrA-NcoI	ATACCATGGCGTTGTCCGAGATCACCATG	pQE60-TyrA7; 5'-Primer
3'-TyrA-BamHI	TATGGATCCCACCGCATTTGTGCGGCG	pQE60-TyrA7; 3'-Primer
5'-ProC-NcoI	TATCCATGGGTGTATTTAGCAAAGAACAAG	pQE60-ProC, pQE60-ProCA, pQE60-ProCAT [‡] ; 5'-Primer
3'-ProC-II-BamHI	ATTGGATCCAGGATAGTCAGCCGCTGTTTC	pQE60-ProC; 3'-Primer
3'-ProCAT-BamHI	ATAGGATCCTTCGAGGATCATCGCGAC	pQE60-ProCAT [‡] , pQE60- ProAT; 3'-Primer
HM98-1	ATACCATGGGTGTATTTAGCAAAGAACAAGTTC	pQE60-ProCAT; 5'-Primer
HM98-2	TATGGATCCTTCCACATACGCTGCCAG	pQE60-ProCAT; 3'-Primer
HM98-3	ATAGGATCCTTCGATCAAGCGGGCCAAGTC	pTZ18-PheCAT; 3'-Primer
HM98-5	ATAGGATCCGCATTTCGAGCAGTTTCGAG	pTZ18-OrnCAT; 5'-Primer
HM98-6	ATAGGATCCTTCGATGAACGCCGCCAG	pTZ18-OrnCAT; 3'-Primer
HM98-7	ATAGGATCCGCCAAAGGGAATGTCTTCTCG	pTZ18-LeuCATTe; 5'-Primer
HM98-8	ATAGGATCCTTTCAGGATGAACAGTTCTTG	pTZ18-LeuCATTe, pQE60-Te; 3'-Primer
HM98-9	ATAAGATCTCATAAGCGCTTTGAGAGCAG	pQE60-Te, pQE60-ProCAT- LeuCAT durch inverse PCR aus pQE60-ProCAT-LeuCATTe; 5'- Primer
HM98-11	ATTGGATCCGAGGAAAGCGCGTATCTC	pTZ18-PheCAT; 5'-Primer
HM98-12	ATACCATGGTAGCAAATCAGGCCAATC	pQE60-TycA; 5'-Primer
HM98-13	TATGGATCCGCGCAGTCTATTTGCAAG	pQE60-TycA; 3'-Primer
HM98-16	ATATCTAGACCATGACGTATCGTTATC	pTrc99a-5'-acps-3'; 5'-Primer
HM98-17	ATACCATGGTTCTACTCTGGAAGTAGAG	pTrc99a-5'-acps-3'; 3'-Primer
HM98-18	ATATAAGCTTCATTTAAATAGTACGTACGC	pTZ18-acps B.sub.; 5'-Primer
HM98-19	TATAAGATCTCACTATCAAATATATGAGTGG	pTZ18-acps B.sub.; 3'-Primer
HM98-20	GATTATTGCGCCACTGTTGC	nrdD-Lokus: PCR- und Sequen- zierungskontrolle; Primer 1
HM98-21	TCATTTTCCCACACGCCGAG	nrdD-Lokus: PCR- und Sequen- zierungskontrolle; Primer 2

Tab. 7-1 (Fortsetzung)

Name	Sequenz 5'-...-3'	Verwendung
HM98-22	ATAG <u>AGCTCGACTCACTATAGGGAATTC</u>	MCS pTZ18/SacI: Amplifikation der Km ^R -Kassette aus pTZ18; Primer 1
HM98-23	ATAG <u>AGCTCTAAAACGACGGCCAGTG</u>	MCS pTZ18/SacI: Amplifikation der Km ^R -Kassette aus pTZ18; Primer 2
HM98-24	CGCGCGTTGGCCGATTCAT	lac-pUC8/PvuII: Amplifikation von sfp-Sp ^R aus pUC-sfp-Sp ^R ; 5'-Primer
HM98-25	GATCGGAGCGGGCCTCTTC	lac-pUC8/PvuII: Amplifikation von sfp-Sp ^R aus pUC-sfp-Sp ^R ; 3'-Primer
HM98-35	ATAGGATCCATTGTGCAGCTGTTACTG	pQE60-yhhU; 5'-Primer
HM98-36	ATAAAGCTTGCCAGTTTCAAACGCCAC	pQE60-yhhU; 3'-Primer
5'-pTZ-lac	ATAG <u>TTAACGCGCGTTGGCCGATTC</u>	lac-pTZ18/PvuII: Amplifikation von acps-Sp ^R aus pTZ18-acps-sp ^R ; 5'-Primer
3'-pTZ-lac	ATAG <u>TTAACGCCTCTTCGCTATTACGC</u>	lac-pTZ18/PvuII: Amplifikation von acps-Sp ^R aus pTZ18-acps-Sp ^R ; 5'-Primer
3'-LeuTeinv	ATAA <u>GATCTCGTGATGAAATCGGCCAC</u>	pQE60-ProCAT-LeuCAT durch inverse PCR aus pQE60-ProCAT-LeuCATTe; 3'-Primer

* Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen

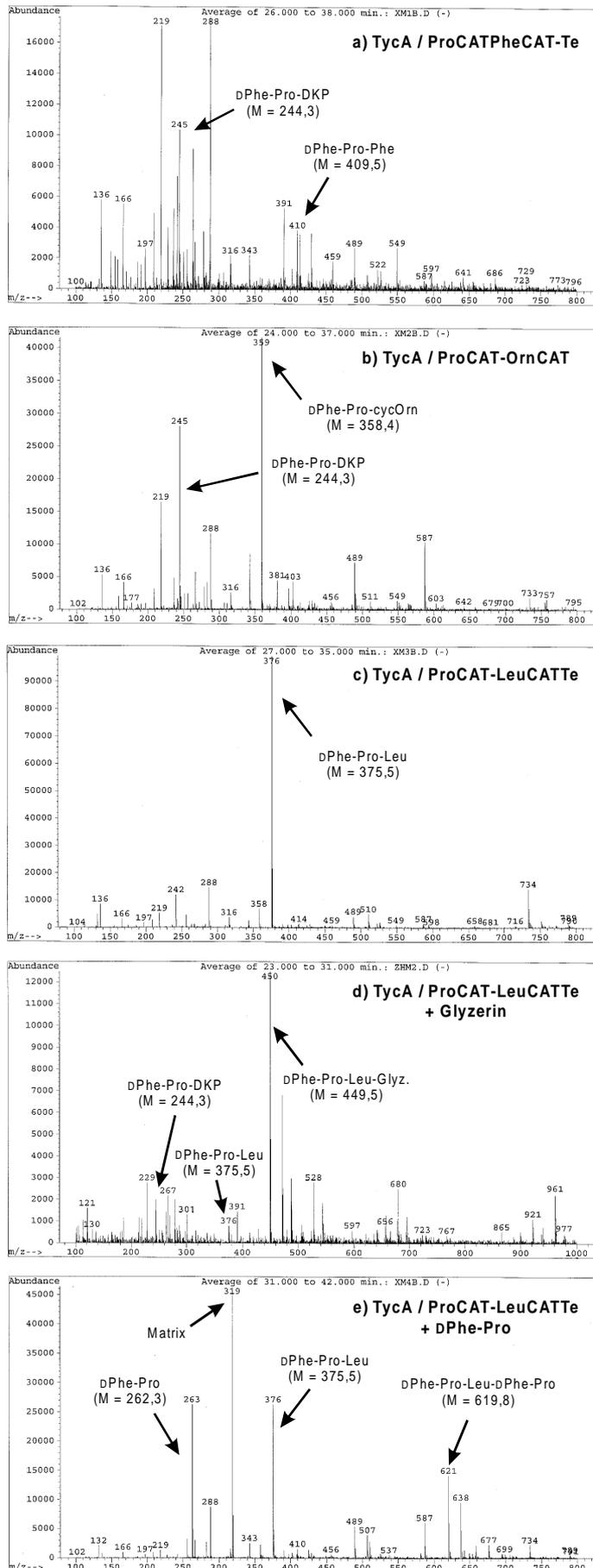


Abb. 7.1 ESI-MS Massenspektren: Gezeigt sind Spektren der in den Kapiteln 5.4.5.1 (a), 5.4.5.2 (b), 5.4.5.3 (c) und 5.4.6.2 (d+e) beschriebenen ESI-MS Experimente. In den Spektren (c) und (e) trat auch das Signal bei $M^+ = 245$ auf, das dem Produkt dPhe-Pro-DKP zuzuordnen ist. Es wurde jedoch mit der Subtraktion des Hintergrundes entfernt, der irrtümlicherweise noch signifikante Mengen dieses Produktes enthielt.

8 Literatur

- Akashi, K. & Kurahashi, K.** (1978). Enzyme-bound formylvaline and formylvalylglycine; an initiation complex for gramicidin A biosynthesis. *J Biochem (Tokyo)* **83**: 1219-1229.
- Albertini, A. M., Caramori, T., Scoffone, F., Scotti, C. & Galizzi, A.** (1995). Sequence around the 159 degree region of the *Bacillus subtilis* genome: the *pksX* locus spans 33.6 kb. *Microbiology* **141**: 299-309.
- Arnez, J. G. & Moras, D.** (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends in Biochem Sci* **22**: 211-216.
- Bartolomé, B., Jubete, Y., Martinez, E. & de la Cruz, F.** (1991). Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* **102**: 75-78.
- Battersby, A. R. & Craig, L. C.** (1952). The Chemistry of Tyrocidine. I. Isolation and Characterization of a single peptide. *J Am Chem Soc* **74**: 4019-4023.
- Becker-André, M., Schulze-Lefert, P. & Hahlbrock, K.** (1991). Structural comparison, modes of expression, and putative cis-acting elements of the two 4-coumarate:CoA-ligases in potato. *J Biol Chem* **266**: 8551-8559.
- 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.
- Bennett, J. & Scott, K. J.** (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* **43**: 173-182.
- Bentley, J., Hyatt, L. S., Ainley, K., Parish, J. H., Herbert, R. B. & White, G. R.** (1993). Cloning and sequence analysis of an *Escherichia coli* gene conferring bicyclomycin resistance. *Gene* **127**: 117-120.
- Birnboim, H. C. & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y.** (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Böhm, I., Holzbaier, I. E., Hanefeld, U., Cortes, J., Staunton, J. & Leadlay, P. F.** (1998). Engineering of a minimal modular polyketide synthase, and targeted alteration of the stereospecificity of polyketide chain extension. *Chem Biol* **5**: 407-412.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Green, P. J., Betlach, M. C., Heynecke, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. & Falkow, S.** (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.
- 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.
- Bouzon, M. & Marlière, P.** (1994). Konstruktion von pUC18-nrdD. Unveröffentlicht
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braun, V. & Killmann, H.** (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**: 104-109.
- Brozek, K. A. & Raetz, C. R. H.** (1990). Biosynthesis of Lipid A in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**: 15410-15417.
- Budisa, N., Minks, C., Medrano, F. J., Lutz, J., Huber, R. & Moroder, L.** (1998). Residue-specific bioincorporation of non-natural, biologically active amino acids into proteins as possible drug carriers: Structure and stability of the *per*-thiaproline mutant of annexin V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 455-459.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I. & Häuptle, M. T. D.** (1987). A T5 promoter based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Meth Enzymol* **155**: 416-433.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-379.
- 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.
- Carniel, E., Guilvout, I. & Prentice, M.** (1996). Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **178**: 6743-6751.

- Carter, C. W. J.** (1993). Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu Rev Biochem* **62**: 715-748.
- Casadaban, M. & Cohen, S. N.** (1979). Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4530-4533.
- 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.
- Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M. & Roninson, I. B.** (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**: 381-389.
- Clementz, T., Zhou, Z. & Raetz, C. R. H.** (1997). Function of the *Escherichia coli msbB* Gene, a multicopy suppressor of *htrB* knockouts, in the acylation of Lipid A. *J Biol Chem* **272**: 10353-10360.
- Connerton, I. F., Finchman, 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.
- 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.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. & Brick, P.** (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J* **16**: 4174-4183.
- Cortes, J., Haydock, S. F., Roberts, G. A., Bevitt, D. J. & Leadlay, P. F.** (1990). An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* **348**: 176-178.
- 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.
- 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.
- Cox, R. J., Hitchman, T. S., Byrom, K. J., Findlow, I. S. C., Tanner, J. A., Crosby, J. & Simpson, T. J.** (1997). Post-translational modification of heterologously expressed *Streptomyces* type II polyketide synthase acyl carrier protein. *FEBS Lett* **405**: 267-272.
- Cronan, J. E. J. & Rock, C. O.** (1996). Biosynthesis of Membrane Lipids. In *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, S. 612-636. Editor F. C. Neidhardt. ASM Press, Washington D.C.
- Crosa, J. H.** (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 517-530.
- Cummings, N. J. & Connerton, I. F.** (1997). The *Bacillus subtilis* 168 chromosome from *sspE* to *kata*. *Microbiology* **143**: 1855-1859.
- Dax, S. L.** (1997). Peptidic antibacterial agents. In *Antibacterial chemotherapeutic agents*, S. 351-356. Blackie Academic & Professional, London.
- de Crécy-Lagard, V., Blanc, V., Gil, P., Naudin, L., Lorenzon, S., Famechon, A., Bamas-Jacques, N., Crouzet, J. & Thibaut, D.** (1997a). Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes. *J Bacteriol* **179**: 705-713.
- de Crécy-Lagard, V., Marlière, P. & Saurin, W.** (1995). Multienzymatic non ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation. *C R Acad Sci III* **318**: 927-936.
- de Crécy-Lagard, V., Saurin, W., Thibaut, D., Gil, P., Naudin, L., Crouzet, J. & Blanc, V.** (1997b). Streptogramin B biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* and *Streptomyces virginiae*: molecular characterization of the last structural peptide synthetase gene. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1904-1909.
- 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.
- Debabov, D. V., Heaton, M. P., Zhang, Q., Stewart, K. D., Lambalot, R. H. & Neuhaus, F. C.** (1996b). The D-alanyl carrier protein in *Lactobacillus casei*: cloning, sequencing, and expression of *dltC*. *J Bacteriol* **178**: 3869-3876.
- Dieckmann, R., Lee, Y. O., van Liempt, H., von Döhren, H. & Kleinkauf, H.** (1995). Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett* **357**: 212-216.

- Dökel, S.** (1996). Untersuchungen zur Domänenstruktur von modularen Peptidsynthetasen und zur *in vivo* Aktivität der 4'-Phosphopantethein-Transferase Gsp. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Dökel, S.** (1999). Persönliche Mitteilung.
- Dökel, S. & Marahiel, M. A.** (1997). unveröffentlicht.
- Döring, V., Mootz, H. D., Gandbhir, M. & Marlière, P.** (1999). Enlarging the amino acid set of *Escherichia coli* by infiltration of the valine-coding pathway. Manuskript in Vorbereitung.
- Edelmann, P. & Gallant, J.** (1977). Mistranslation in *E. coli*. *Cell* **10**: 131-137.
- Ehmann, D. E., Gehring, A. M. & Walsh, C. T.** (1999). Lysine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Mechanism of alpha- Aminoacidate Reductase (Lys2) Involves Posttranslational Phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry* **38**: 6171-6177.
- 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* **347**: 203-206.
- Farabough, P. J.** (1978). Sequence of the *lacI* gene. *Nature* **274**: 765-769.
- Fischl, A. S. & Kennedy, E. P.** (1990). Isolation and Properties of acyl carrier protein phosphodiesterase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 5445-5449.
- Fujikawa, K., Sakamoto, Y. & Kurahashi, K.** (1971). Biosynthesis of tyrocidine by a cell-free enzyme system of *Bacillus brevis* ATCC 8185. 3. Further purification of components I and II and their functions in tyrocidine synthesis. *J Biochem (Tokyo)* **69**: 869-879.
- Fujikawa, K., Sakamoto, Y., Suzuki, T. & Kurahashi, K.** (1968a). 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.
- Fujikawa, K., Suzuki, T. & Kurahashi, K.** (1966). Incorporation of L-leucine-C14 into tyrocidine by a cell-free preparation of *Bacillus brevis* Dubos strai. *J Biochem* **60**: 216-216.
- Fujikawa, K., Suzuki, T. & Kurahashi, K.** (1968b). 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.
- Fürbass, R., Gocht, M., Zuber, P. & Marahiel, M. A.** (1991). Interaction of AbrB, a transcriptional regulator from *Bacillus subtilis* with the promoters of the transition state-activated genes *tycA* and *spoVG*. *Mol Gen Genet* **225**: 347-354.
- Fürbass, R. & Marahiel, M. A.** (1991). Mutant analysis of interaction of the *Bacillus subtilis* transcription regulator AbrB with the antibiotic biosynthesis gene *tycA*. *FEBS Lett* **287**: 153-156.
- Gadow, A., Vater, J., Schlumbohm, W., Palacz, Z., Salnikow, J. & Kleinkauf, H.** (1983). Gramicidin S synthetase. Stability of reactive thioester intermediates and formation of 3-amino-2-piperidone. *Eur J Biochem* **132**: 229-234.
- Gehring, A. M., DeMoll, E., Fetherston, J. D., Mori, I., Mayhew, G. F., Blattner, F. R., Walsh, C. T. & Perry, R. D.** (1998a). Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem Biol* **5**: 573-586.
- Gehring, A. M., Lambalot, R. H., Vogel, K. W., Drueckhammer, D. G. & Walsh, C. T.** (1997). Ability of *Streptomyces* spp. acyl carrier proteins and coenzyme A analogs to serve as substrates *in vitro* for *E. coli* holo-ACP synthase. *Chem Biol* **4**: 17-24.
- Gehring, A. M., Mori, I., Perry, R. D. & Walsh, C. T.** (1998b). The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry* **37**: 11637-11650.
- Gehring, A. M., Mori, I. & Walsh, C. T.** (1998c). Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* **37**: 2648-2659.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326.
- Gilles, A., Marlière, P., Rose, T., Sarfati, R., Longin, R., Meier, A., Femandjian, S., Monnot, M., Cohen, G. N. & Barzu, O.** (1988). Conservative replacement of methionine by norleucine in *Escherichia coli* adenylate kinase. *J Biol Chem* **263**: 8204-8209.
- 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.
- Grammel, N., Schwartz, D., Wohlleben, W. & Keller, U.** (1998). Phosphinothricin-tripeptide synthetases from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochemistry* **37**: 1596-1603.
- Grodberg, J. & Dunn, J. J.** (1988). *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* **170**: 1245-1253.
- Grossman, T. H., Tuckman, M., Ellestad, S. & Osburne, M. S.** (1993). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* genes involved in siderophore biosynthesis: relationship between *B. subtilis* *sfp0* and *Escherichia coli* *entD* genes. *J Bacteriol* **175**: 6203-6211.

- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C. & Grandi, G. (1998a). Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J Biol Chem* **273**: 32857-32863.
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Pace, E., Ferranti, P. & Grandi, G. (1998b). 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.
- Guérout-Fleury, A., Shazand, K., Frandsen, N. & Stragier, P. (1995). Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**: 335-336.
- Gutterson, N. I. & Koshland, D. E., Jr. (1983). Replacement and amplification of bacterial genes with sequences altered *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 4894-4898.
- 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.
- 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.
- Hamoen, L. W., Eshuis, H., Jongbloed, J., Venema, G. & van Sinderen, D. (1995). A small gene, designated *comS*, located within the coding region of the fourth amino acid-activation domain of *srfA*, is required for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **15**: 55-63.
- Hawkins, A. R. & Lamb, H. K. (1995). The molecular biology of multidomain proteins. Selected examples. *Eur J Biochem* **232**: 7-18.
- Haydock, S. F., Dowson, J. A., Dhillon, N., Roberts, G. A., Cortes, J. & Leadlay, P. F. (1991). Cloning and sequence analysis of genes involved in erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: sequence similarities between EryG and a family of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Mol Gen Genet* **230**: 120-128.
- Heath, R. J. & Rock, C. O. (1998). A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol* **180**: 1425-1430.
- Heaton, M. P. & Neuhaus, F. C. (1992). Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Lactobacillus casei* gene for the D- alanine-activating enzyme. *J Bacteriol* **174**: 4707-4717.
- Hoch, J. A. & Mathews, J. (1973). Chromosomal location of pleiotropic sporulation mutations in *Bacillus subtilis*. *Genetics* **73**: 193-228.
- Hori, K., Yamamoto, Y., Minetoki, T., Kurotsu, T., Kanda, M., Miura, S., Okamura, K., Furuyama, J. & Saito, Y. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of the gramicidin S synthetase 1 gene. *J Biochem (Tokyo)* **106**: 639-645.
- Hotchkiss, R. D. & Dubos, R. J. (1941). The isolation of bactericidal substances from cultures of *Bacillus brevis*. *J Biol Chem* **141**: 155-159.
- Hunter, F. E. J. & Schwartz, L. S. (1967). Tyrocidines and Gramicidin S (J1, J2). In *Antibiotics I (Mode of action)*, S. 142-152. Editoren D. Gottlieb & P. D. Shaw. Springer-Verlag, New York.
- Ibba, M. & Hennecke, H. (1995). Relaxing the substrate specificity of an aminoacyl-tRNA synthetase allows *in vitro* and *in vivo* synthesis of proteins containing unnatural amino acids. *FEBS Lett.* **364**: 272-275.
- Jackowski, S. & Rock, C. O. (1983). Ratio of active to inactive forms of acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **258**: 15186-15191.
- Jackowski, S. & Rock, C. O. (1984a). Metabolism of 4'-phosphopantetheine in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **158**: 115-120.
- Jackowski, S. & Rock, C. O. (1984b). Turnover of the 4'-phosphopantetheine prosthetic group of acyl carrier protein. *J Biol Chem* **259**: 1891-1895.
- Jerpseth, B., Greener, A., Short, J. M., Viola, J. & Kretz, P. L. (1993). *Stratagies* **5**: 2-3.
- Jung, G. (1991). Lantibiotika - ribosomale synthetisierte Polypeptidwirkstoffe mit Sulfidbrücken und alpha, beta-Didehydroaminosäuren. *Angew Chem* **103**: 1067-1084.
- Kambe, M., Sakamoto, Y. & Kurahashi, K. (1971). Biosynthesis of tyrocidine by a cell-free enzyme system of *Bacillus brevis* ATCC 8185. IV. Further separation of component II into two fractions. *J Biochem (Tokyo)* **69**: 1131-1133.
- Kao, C. M., Luo, G. L., Katz, L., Cane, D. E. & Koshla, C. (1995). Manipulation of macrolide ring size by directed mutagenesis of a modular polyketide synthase. *J Am Chem Soc* **117**: 9105-9106.
- Karow, M. & Georgopoulos, C. (1993). The essential *Escherichia coli msbA* gene, a multicopy suppressor of null mutations in the *htrB* gene, is related to the universally conserved family of ATP-dependent translocators. *Mol Microbiol* **7**: 69-79.
- Katz, E. & Demain, A. L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev* **41**: 449-474.

- Keating, D. H., Carey, M. R. & Cronan, J. E., Jr.** (1995). The unmodified (apo) form of *Escherichia coli* acyl carrier protein is a potent inhibitor of cell growth. *J Biol Chem* **270**: 22229-22235.
- Kittelberger, R., Altmann, M. & von Döhren, H.** (1982). Kinetics of Amino Acid Activation in Gramicidin S Synthesis. In *Peptide Antibiotics, Biosynthesis and Functions*. S.209-218. Editoren Kleinkauf, H. und von Döhren, H.
- Kleinkauf, H. & von Döhren, H.** (1990). Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem* **192**: 1-15.
- Kleinkauf, H. & von Döhren, H.** (1996). A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem* **236**: 335-351.
- Konz, D.** (1998). Identifizierung und Charakterisierung des Bacitracin Biosynthese-Operons aus *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. Dissertation, Philipps Universität Marburg.
- 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.
- 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.
- Konz, D. & Marahiel, M. A.** (1999). How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* **6**: 39-48.
- Krätzschmar, J., Krause, M. & Marahiel, M. A.** (1989). Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J Bacteriol* **171**: 5422-5429.
- Ku, J., Mirmira, R. G., Liu, L. & Santi, D. V.** (1997). Expression of a functional non-ribosomal peptide synthetase module in *Escherichia coli* by coexpression with a phosphopantetheinyl transferase. *Chem Biol* **4**: 203-207.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. & et al.** (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Kurahashi, K.** (1974). Biosynthesis of small peptides. *Annu Rev Biochem* **43**: 445-459.
- Kurotsu, T., Hori, K., Kanda, M. & Saito, Y.** (1991). Characterization and location of the L-proline activating fragment from the multifunctional gramicidin S synthetase 2. *J Biochem (Tokyo)* **109**: 763-769.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lam, H.-M., Tancula, E., Dempsey, W. B. & Winkler, M. E.** (1992). Suppression of insertions in the complex *pdxJ* operon of *Escherichia coli* K-12 by *lon* and other mutations. *J Bacteriol* **174**: 1554-1567.
- 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.
- Lambalot, R. H. & Walsh, C. T.** (1995). Cloning, overproduction, and characterization of the *Escherichia coli* holo-acyl carrier protein synthase. *J Biol Chem* **270**: 24658-24661.
- Lambalot, R. H. & Walsh, C. T.** (1997). Holo-[acyl-carrier-protein] synthase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **279**: 254-262.
- Lawen, A. & Traber, R.** (1993). Substrate specificities of cyclosporin synthetase and peptolide SDZ 214-103 synthetase. Comparison of the substrate specificities of the related multifunctional polypeptides. *J Biol Chem* **268**: 20452-20465.
- Lawen, A. & Zocher, R.** (1990). Cyclosporin synthetase. The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described. *J Biol Chem* **265**: 11355-11360.
- Lee, S. G. & Lipmann, F.** (1975). Tyrocidine synthetase system. *Methods Enzymol.* **43**: 585-602.
- Lee, S. G. & Lipmann, F.** (1977). Isolation of amino acid activating subunit-pantetheine protein complexes: their role in chain elongation in tyrocidine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 2343-2347.
- Lee, S. G., Roskoski, R., Jr., Bauer, K. & Lipmann, F.** (1973). Purification of the polyenzymes responsible for tyrocidine synthesis and their dissociation into subunits. *Biochemistry* **12**: 398-405.
- Lemeignan, B., Sonigo, P. & Marlière, P.** (1993). Phenotypic suppression by incorporation of an alien amino acid. *J Mol Biol* **231**: 161-166.
- 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.
- Lin, L., Hale, S. P. & Schimmel, P.** (1996). Aminoacylation error correction. *Nature* **384**: 33-34.

- Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H. & Roskoski, R., Jr. (1971). Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **35**: 1-34.
- Mach, B., Reich, E. & Tatum, E. L. (1963). Separation of the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine from protein synthesis. *Proc Nat Acad Sci U S A* **50**: 175-181.
- Marahiel, M. A. (1997). Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem Biol* **4**: 561-567.
- Marahiel, M. A., Krause, M. & Skarpeid, H. J. (1985). Cloning of the tyrocidine synthetase 1 gene from *Bacillus brevis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **201**: 231-236.
- Marahiel, M. A., Nakano, M. M. & Zuber, P. (1993). Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol Microbiol* **7**: 631-636.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997). Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* **97**: 2651-2673.
- Martin, J. F. (1998). New aspects of genes and enzymes for beta-lactam antibiotic biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 1-15.
- Matsunaga, J., Dyer, M., Simons, E. L. & Simons, R. W. (1996). Expression and regulation of the *mnc* and *pdxJ* operons of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **22**: 977-989.
- 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.
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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.
- Miyoshi, T., Miyairi, N., Aoki, H., Kohsaka, M., Sakai, H. I. & Imanaka, H. J. (1972). Bicyclomycin - a new antibiotic. Taxonomy, isolation and characterization. *J Antibiot* **25**: 569-575.
- Mootz, H. D. (1996). Untersuchungen zur Organisation des Tyrocidin-Biosyntheseoperon aus *Bacillus brevis* ATCC 8185. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1997a). Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Curr Opin Chem Biol* **1**: 543-551.
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1997b). The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **179**: 6843-6850.
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999a). Design and application of multimodular peptide synthetases. *Curr Opin Biotech* **10**: 341-348.
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999b). Tyrocidine. In *Encyclopedia of Molecular Biology*, S. 2706-2708. Editor T. E. Creighton. John Wiley & Sons, New York.
- 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.
- Nureki, O., Vassylyev, D. G., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T. L., Schimmel, P. & Yokoyama, S. (1998). Enzyme Structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* **280**: 578-581.
- Pavela-Vrancic, M., Pfeifer, E., Schröder, W., von Döhren, H. & Kleinkauf, H. (1994a). Identification of the ATP binding site in tyrocidine synthetase 1 by selective modification with fluorescein 5'-isothiocyanate. *J Biol Chem* **269**: 14962-14966.
- Pavela-Vrancic, M., Pfeifer, E., van Liempt, H., Schäfer, H. J., von Döhren, H. & Kleinkauf, H. (1994b). ATP binding in peptide synthetases: determination of contact sites of the adenine moiety by photoaffinity labeling of tyrocidine synthetase 1 with 2-azidoadenosine triphosphate. *Biochemistry* **33**: 6276-6283.
- 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.
- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M. A., Leopold, K. & Fischer, W. (1995). Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J Biol Chem* **270**: 15598-15606.
- Pfeifer, E., Pavela-Vrancic, M., von Döhren, H. & Kleinkauf, H. (1995). Characterization of tyrocidine synthetase 1 (TY1): requirement of posttranslational modification for peptide biosynthesis. *Biochemistry* **34**: 7450-7459.
- Polacco, M. L. & Cronan, J. E., Jr. (1981). A mutant of *Escherichia coli* conditionally defective in the synthesis of holo-[acyl carrier protein]. *J Biol Chem* **256**: 5750-5754.

- Porath, J., Carlson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975). Metal chelat affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.
- 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 antitumour agent saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus*. *Microbiology* **142**: 741-746.
- Powell, G. L., Elovson, J. & Vagelos, P. R. (1969). Acyl carrier protein. XII. Synthesis and turnover of the prosthetic group of acyl carrier protein *in vivo*. *J Biol Chem* **244**: 5616-5624.
- Quadri, L. E., Sello, J., Keating, T. A., Weinreb, P. H. & Walsh, C. T. (1998a). Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* **5**: 631-645.
- Quadri, L. E., Weinreb, P. H., Lei, M., Nakano, M. M., Zuber, P. & Walsh, C. T. (1998b). Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **37**: 1585-1595.
- Raetz, C. R. H. (1996). Bacterial Lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, S. 1035-1063. Editor F. C. Neidhardt. ASM Press, Washington D.C.
- Randhawa, Z. I. & Smith, S. (1987). Complete amino acid sequence of the medium-chain S-acyl fatty acid synthetase thio ester hydrolase from rat mammary gland. *Biochemistry* **26**: 1365-1373.
- Rangaswamy, V., Mitchell, R., Ullrich, M. & Bender, C. (1998). Analysis of genes involved in biosynthesis of coronafacic acid, the polyketide component of the phytotoxin coronatine. *J Bacteriol* **180**: 3330-3338.
- Reimmann, C., Serino, L., Beyeler, M. & Haas, D. (1998). Dihydroaeruginic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **144**: 3135-3148.
- Riederer, B., Han, M. & Keller, U. (1996). D-Lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *J Biol Chem* **271**: 27524-27530.
- Ristow, H., Pschorn, W., Hansen, J. & Winkel, U. (1979). Induction of sporulation in *Bacillus brevis* by peptide antibiotics. *Nature* **280**: 165-166.
- Ristow, H., Russo, J., Stochaj, E. & Paulus, H. (1982). Tyrocidine induced sporulation of *Bacillus brevis* in a medium lacking a nitrogen source. In *Peptide Antibiotics*, S. 381-388. Editoren H. Kleinkauf & H. von Döhren. W. de Gruyter, Berlin.
- Ristow, H., Schazschneider, B., Bauer, K. & Kleinkauf, H. (1975). Tyrocidine and the linear gramicidin. Do these peptide antibiotics play an antagonistic regulative role in sporulation? *Biochim Biophys Acta* **390**: 246-252.
- Ritsema, T., Gehring, A. M., Stuitje, A. R., van der Drift, K. M., Dandal, I., Lambalot, R. H., Walsh, C. T., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. & Spaik, H. P. (1998). Functional analysis of an interspecies chimera of acyl carrier proteins indicates a specialized domain for protein recognition. *Mol Gen Genet* **257**: 641-648.
- Roberts, G. A., Staunton, J. & Leadlay, P. F. (1993). Heterologous expression in *Escherichia coli* of an intact multienzyme component of the erythromycin-producing polyketide synthase. *Eur J Biochem* **214**: 305-311.
- Robertson, J. B., Gocht, M., Marahiel, M. A. & Zuber, P. (1989). AbrB, a regulator of gene expression in *Bacillus*, interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8457-8461.
- Roskoski, R., Jr., Gevers, W., Kleinkauf, H. & Lipmann, F. (1970a). Tyrocidine biosynthesis by three complementary fractions from *Bacillus brevis* (ATCC 8185). *Biochemistry* **9**: 4839-4845.
- Roskoski, R., Jr., Kleinkauf, H., Gevers, W. & Lipmann, F. (1970b). Isolation of enzyme-bound peptide intermediates in tyrocidine biosynthesis. *Biochemistry* **9**: 4846-4851.
- Ruttenberg, M. A. & Mach, B. (1966). Studies on amino acid substitution in the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine. *Biochemistry* **5**: 2864-2869.
- Safford, R., de Silva, J., Lucas, C., Windhust, J. H. C., Sheddon, J., James, C. M., Sidebottom, C. M., Sladbas, A. R., Tombs, M. P. & Hughes, S. G. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of complementary DNA encoding rat mammary gland medium-chain-S-acyl fatty acid synthetase thioester hydrolase. *Biochemistry* **26**: 1358-1364.
- Saito, F., Hori, K., Kanda, M., Kurotsu, T. & Saito, Y. (1994). Entire nucleotide sequence for *Bacillus brevis* Nagano Grs2 gene encoding gramicidin S synthetase 2: a multifunctional peptide synthetase. *J Biochem (Tokyo)* **116**: 357-367.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sanger, F., Miklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- 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.
- Schazschneider, B., Ristow, H. & Kleinkauf, H. (1974). Interaction between the antibiotic tyrocidine and DNA *in vitro*. *Nature* **249**: 757-759.
- 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.
- Schneider, A. (1993). Untersuchungen zur Subklonierung und Expression der Prolin-aktivierenden Domäne der Gramicidin S-Synthetase 2. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Schneider, A. & Marahiel, M. A. (1998). Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **169**: 404-410.
- 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.
- Schwartz, D., Alijah, R., Nussbaumer, B., Pelzer, S. & Wohlleben, W. (1996). The peptide synthetase gene *phsA* from *Streptomyces viridochromogenes* is not juxtaposed with other genes involved in nonribosomal biosynthesis of peptides. *Appl Environ Microbiol* **62**: 570-577.
- Schwarzer, D. (1999). Die Thioesterasedomäne der Tyrocidin-Synthetasen: Charakterisierung durch Konstruktion eines Hybridenzyms der nichtribosomalen Peptidsynthese. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- 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.
- 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.
- Scutcliffe, J. G. (1979). Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Meth Enzymol* **43**: 77-90.
- 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.
- 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.
- Southard, S. B. & Cihlar, R. L. (1995). Analysis and expression of the *Candida albicans* FAS2 gene. *Gene* **156**: 133-138.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Souza, D. C., Nakano, M. M., Corbell, N. & Zuber, P. (1993). Amino-acylation site mutations in amino acid-activating domains of surfactin synthetase: effects on surfactin production and competence development in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **175**: 3502-3510.
- Stachelhaus, T., Hüser, A. & Marahiel, M. A. (1996a). Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol* **3**: 913-921.
- Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. (1995a). Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol Lett* **125**: 3-14.
- Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. (1995b). Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J Biol Chem* **270**: 6163-6169.
- 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.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999). The specificity code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**: 493-505.
- 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.
- Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M. A. (1996b). Engineered biosynthesis of peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* **52**: 177-186.
- Stein, T., Kluge, B., Vater, J., Franke, P., Otto, A. & Wittmann-Liebold, B. (1995). Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4'-phosphopantetheine. *Biochemistry* **34**: 4633-4642.

- Stein, T., Vater, J., Krufft, 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.
- Stindl, A. & Keller, U. (1993). The initiation of peptide formation in the biosynthesis of actinomycin. *J Biol Chem* **268**: 10612-10620.
- Stindl, A. & Keller, U. (1994). Epimerization of the D-valine portion in the biosynthesis of actinomycin D. *Biochemistry* **33**: 9358-9364.
- Stüber, D., Matile, H. & Garotta, G. (1990). System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In *Immunological Methods*, S. 121-152. Editoren I. Levkovits & B. Pernis.
- 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.
- Sun, X., Harder, J., Krook, M., Jornvall, H., Sjöberg, B. M. & Reichard, P. (1993). A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the cloned *nrdD* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 577-581.
- Takiff, H. E., Baker, T., Copeland, T., Chen, S.-M. & Court, D. L. (1992). Locating essential *Escherichia coli* genes by using mini-Tn10 Transposons: the *pdxJ* operon. *J. Bacteriol.* **174**: 1544-1553.
- Thibaut, D., Bisch, D., Ratet, N., Maton, L., Couder, M., Debussche, L. & Blanche, F. (1997). Purification of peptide synthetases involved in pristamycin I biosynthesis. *J Bacteriol* **179**: 697-704.
- 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.
- Tomino, S., Yamada, M., Itoh, H. & Kurahashi, K. (1967). Cell-free synthesis of gramicidin S. *Biochemistry* **6**: 2552-2560.
- Tosato, V., Albertini, A. M., Zotti, M., Sonda, S. & Bruschi, C. V. (1997). Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* **143**: 3443-3450.
- 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.
- 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**: 529-546.
- 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.
- van Wageningen, A. M., Kirkpatrick, P. N., Williams, D. H., Harris, B. R., Kershaw, J. K., Lennard, N. J., Jones, M., Jones, S. J. & Solenberg, P. J. (1998). Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem Biol* **5**: 155-162.
- Vater, J., Schlumbohm, W., Palacz, Z., Salnikow, J., Gadow, A. & Kleinkauf, H. (1987). Formation of D-Phe-Pro-Val-cyclo-Orn by gramicidin S synthetase in the absence of L-leucine. *Eur J Biochem* **163**: 297-302.
- Vater, J., Stein, T., Vollenbroich, D., Krufft, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Liu, L. & Zuber, P. (1997). The modular organization of multifunctional peptide synthetases. *J Protein Chem* **16**: 557-564.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids: M13mp7-derived systems for insertion mutagenesis and sequencing with universal primers. *Gene* **19**: 159-268.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 615-619.
- Vollenbroich, D., Mehta, N., Zuber, P., Vater, J. & Kamp, R. M. (1994). Analysis of surfactin synthetase subunits in *srfA* mutants of *Bacillus subtilis* OKB105. *J Bacteriol* **176**: 395-400.
- Walsh, C. T., Gehring, A. M., Weinreb, P. H., Quadri, L. E. & Flugel, R. S. (1997). Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthetases. *Curr Opin Chem Biol* **1**: 309-315.
- Walsh, C. T., LiU, J. L., Rusnak, F. & Sakaitani, M. (1990). Molecular studies on enzymes in corismate metabolism and the enterobactin biosynthetic pathway. *Chem Rev* **90**: 1105-1129.
- Walzel, B., Riederer, B. & Keller, U. (1997). Mechanism of alkaloid cyclopeptide synthesis in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chem Biol* **4**: 223-230.
- Weber, A. L. & Miller, S. L. (1981). Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *J Mol Evol* **17**: 273-284.
- 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.
- Weckermann, R., Fürbass, 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.

- 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.
- Weiss, M. S., Jabs, A. & Hilgenfeld, R. (1998). Peptide bonds revisited. *Nat Struct Biol* **5**: 676.
- Weissman, K. J., Smith, C. J., Hanefeld, U., Aggarwal, R., Bycroft, M., Staunton, J. & Leadlay, P. F. (1998). Die Thioesterase der Polyketid-Synthase von Erythromycin: Einfluß der Acylkettenstruktur auf den Abkopplungsmechanismus der Substratanaloga von der Acyl-Enzym-Zwischenstufe. *Angew Chem* **110**: 1503-1506.
- Xue, Y., Zhao, H., Liu, W. & Sherman, D. H. (1998). A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1211-1216.
- Yarmolinsky, M. B. & Sternberg, N. (1988). Bacteriophage P1. In *The Bacteriophages*, S. 291-438. Editor R. Calendar. Plenum Press, New York.
- Yu, S., Fiss, E. & Jacobs, W. R., Jr. (1998). Analysis of the exochelin locus in *Mycobacterium smegmatis*: biosynthesis genes have homology with genes of the peptide synthetase family. *J Bacteriol* **180**: 4676-4685.
- Zamenhof, P. J. & Villarejo, M. (1972). Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of beta-galactosidase fragments *in vivo*. *J Bacteriol* **110**: 171-178.
- Zimmer, T. L. & Laland, S. G. (1975). Gramicidine S synthetase. *Methods Enzymol* **43**: 567-579.
- Zuber, P., Nakano, M. M. & Marahiel, M. A. (1993). Peptide antibiotics. In *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*, S. 897-916. Editoren A. L. Sonenshein, J.A. Hoch & R. Losick. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C..

Inhaltsverzeichnis

1 ABKÜRZUNGEN	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 PRODUKTE DER NICHTRIBSOMALEN PEPTIDBIOSYNTHESE	3
2.1.1 Produzenten, Strukturen und Anwendungen	3
2.1.2 Physiologische Rolle	5
2.2 MULTIMODULARE PEPTIDSYNTHEASEN	6
2.2.1 Das multiple carrier Thiotemplat Modell	6
2.2.2 Organisation der für Peptidsynthetasen kodierenden Gene	8
2.2.3 Funktionelle Domänen	11
2.2.3.1 Die Adenylierungs(A)-Domäne	12
2.2.3.2 Die Thiolierungs(T)-Domäne	13
2.2.3.3 Die Kondensations(C)-Domäne	14
2.2.3.4 Die Terminations(Te)-Domäne und Thioesterasen vom Typ II (TE II)	15
2.2.3.5 Die Heterozyklisierung(Z)-Domäne	16
2.2.3.6 Modifizierende Domänen: Epimerisierung, N-Methylierung und Reduktase	17
2.2.4 Posttranslationale Modifikation durch 4'-Phosphopantethein(Ppant)-Transferasen	18
2.3 DAS PEPTIDANTIBIOTIKUM TYROCIDIN	20
2.3.1 Struktur und Wirkungsmechanismus	20
2.3.2 Biosynthese	21
2.4 AUFGABENSTELLUNG	22
3 MATERIAL	23
3.1 GERÄTE	23
3.2 ENZYME UND CHEMIKALIEN	24
3.3 VEKTOREN	25
3.3.1 pBluescript II SK-	25
3.3.2 pQE60	25
3.3.3 pREP4 und pREP4-gsp	26
3.3.4 pTZ18R und pTZ19R	26
3.3.5 pSU18	27
3.4 MIKROORGANISMEN	27
3.5 MEDIEN	28
4 METHODEN	29
4.1 DNA-TECHNIKEN	29
4.1.1 DNA-Sequenzierung	29
4.1.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR	30
4.1.3 P1-Phagen Transduktion	31
4.2 PROTEIN-TECHNIKEN	32
4.2.1 Genexpression mit dem pQE-Vektorsystem	32

4.2.2 Präparation von <i>E. coli</i> Rohzelleextrakten.....	33
4.2.3 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie.....	33
4.2.4 Untersuchung enzymkatalysierter Reaktionen	34
4.2.4.1 ATP-PP _i Austauschreaktion.....	34
4.2.4.2 Beladung mit radioaktiv markierten Aminosäuren	35
4.2.4.3 Produktanalyse Di- und Tripeptid Assays radioaktiv	36
4.2.4.4 Produktanalyse Di- und Tripeptid Assays präparativ	37
4.2.4.5 Thioesterspaltung.....	38
4.2.4.6 HPLC-Produktanalyse.....	38
5 ERGEBNISSE	39
5.1 GENETISCHE CHARAKTERISIERUNG DES <i>TYC</i> -OPERONS.....	39
5.1.1 Strategie.....	39
5.1.2 Klonierung des <i>tyc</i> -Operons durch Isolierung von rekombinanten λ -Phagen und deren Subklonierung.....	40
5.1.2.1 Screening der Genbank	40
5.1.2.2 Subklonierung der λ -Phagen A.7 und A.13 in pBluescript SK (-)	40
5.1.2.3 Sequenzierung aller Subklone und Zusammenfügen der Sequenzen	41
5.1.3 Organisation des <i>tyc</i> -Operons	43
5.1.3.1 Transkriptionelle Einheiten.....	44
5.1.3.2 <i>tycD</i> und <i>tycE</i> kodieren für membranlokalisierte ABC-Transporter	45
5.1.3.3 Das Genprodukt von <i>tycF</i> hat Homologien zu Thioesterasen des Typs II.....	46
5.1.4 Modularer Aufbau der Tyrocidin Synthetasen	47
5.2 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG EIGENSTÄNDIGER ADENYLIERUNGSDOMÄNEN DER TYROCIDIN SYNTHETASEN.....	49
5.2.1 Strategie.....	49
5.2.2 Überproduktion rekombinanter interner Adenylierungsdomänen.....	50
5.2.3 Biochemische Charakterisierung interner A-Domänen.....	51
5.2.3.1 Substratspezifität.....	51
5.2.3.2 K _m -Wert-Bestimmung.....	53
5.2.4 Zusammenfassung der Charakterisierung des <i>tyc</i> -Operons.....	54
5.3 DIE INITIATION DER TYROCIDINBIOSYNTHESE - ENTWICKLUNG EINES SYSTEMS ZUR UNTERSUCHUNG DER ELONGATIONSREAKTION <i>IN VITRO</i>	55
5.3.1 Strategie.....	55
5.3.2 Das Minimalsystem TycA/ProCAT bzw. GrsA/ProCAT [‡]	56
5.3.3 Konstruktion der Expressionsvektoren und Reinigung der rekombinanten Proteine	58
5.3.4 Test der enzymatischen Einzelaktivitäten	59
5.3.5 Charakterisierung der Elongationsreaktion und Produktnachweis.....	59
5.3.6 Substratvariabilität des Minimalsystems TycA/ProCAT	62
5.3.7 Einfluß von DPhe-Pro-DKP auf <i>E. coli</i> Zellen	63
5.4 KONSTRUKTION VON HYBRIDPEPTIDSYNTHETASEN DURCH MODULFUSIONEN	64
5.4.1 Strategie.....	64
5.4.2 Ein Stecksystem für Hybridenzyme - Konstruktion der Expressionsvektoren	65

5.4.3	Reinigung der rekombinanten Enzyme	68
5.4.4	Test der enzymatischen Einzelaktivitäten	69
5.4.4.1	Substratspezifität der Adenylierungsreaktion	69
5.4.4.2	Kinetische Konstanten der Adenylierungsreaktion.....	71
5.4.4.3	Thioesterbildung	72
5.4.5	Tripeptidsynthese durch Hybridproteinmatrizen <i>in vitro</i>	74
5.4.5.1	Die Systeme TycA/ProCATPheCAT und TycA/ProCATPheCAT-Te.....	74
5.4.5.2	Die Systeme TycA/ProCAT-OrnCAT und TycA/ProCAT-OrnCAT-Te.....	76
5.4.5.3	Die Systeme TycA/ProCAT-LeuCAT und TycA/ProCAT-LeuCATTe	80
5.4.6	Untersuchungen zum Mechanismus der Te-Domäne.....	84
5.4.6.1	Die Te-Domäne „in trans“ als eigenständiges Enzym	84
5.4.6.2	Nukleophil-Studien an der Te-Domäne	85
5.5	4'-PHOSPHOPANTETHEINTRANSFERASEN DES PRIMÄREN UND SEKUNDÄREN METABOLISMUS.....	89
5.5.1	Strategie.....	89
5.5.2	Konstruktion einer <i>acps</i> -Unterbrechung in <i>E. coli</i>	89
5.5.3	Komplementation der <i>acps</i> -Mutante mit PPTasen des Sekundärmetabolismus	91
5.5.4	Identifizierung und genetische Charakterisierung von <i>acps</i> aus <i>B. subtilis</i>	94
6	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	96
6.1	DAS TYROCIDINBIOSYNTHESESYSTEM: EIN KLASSISCHES BEISPIEL DER NICHTRIBOSOMALEN PEPTIDBIOSYNTHESE.....	97
6.1.1	Sequenzanalyse der Tyrocidin Synthetasen.....	97
6.1.2	Phylogenetische Verwandtschaft mit den Gramacidin S Synthetasen	100
6.2	DIE A-DOMÄNEN VON PEPTIDSYNTHETASEN: UNSPEZIFITÄTEN FÜHREN ZUR PRODUKTVIELFALT	102
6.2.1	Die Tyrocidine A, B, C und D.....	102
6.2.2	Molekularer Aufbau der Substratbindungstasche	104
6.2.3	Vergleich mit den Aminoacyl-tRNA Synthetasen	106
6.3	EIN MINIMIERTES PEPTIDSYNTHETASENSYSTEM: TYCA/PROCAT.....	108
6.4	NEUE PEPTIDSYNTHETASENMATRIZEN DURCH MODUL- UND DOMÄNENFUSIONEN.....	111
6.4.1	Funktionelle Interaktionen in multimodularen Hybridpeptidsynthetasen - Konsequenzen für das Design neuer Proteinmatrizen.....	112
6.4.2	Ornithin als Terminator der Peptidsynthese	116
6.4.3	Rolle und Mechanismus der Te-Domäne	116
6.5	4'-PHOSPHOPANTETHEIN TRANSFERASEN: ESSENTIELLE ENZYME IM PRIMÄR- UND SEKUNDÄRMETABOLISMUS.....	121
6.5.1	Funktionen von <i>acps</i> , <i>yhhU</i> und <i>entD</i> aus <i>E. coli</i>	122
6.5.2	Komplementation von <i>acps in vivo</i> : Determinanten der Protein-Protein Erkennung...	125
7	ANHANG	128
8	LITERATUR.....	131
	Danksagungen	

Danksagungen

Herrn Prof. Mohamed A. Marahiel danke ich sehr herzlich für die Themenstellung, die intensive und begeisternde Betreuung der Arbeit und die Förderung meiner Beiträge und meiner Person. Besonders danke ich ihm für die Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes während der Doktorarbeit in Paris.

Herrn Prof. Helmut Kindl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Kollegen und Freunden, mit denen ich zusammengearbeitet habe, danke ich für diese gemeinsame Zeit.

Für hervorragende sowie besonders intensive und fruchtbare Zusammenarbeit möchte ich herzlichst, in zeitlicher Reihenfolge, Dr. Torsten Stachelhaus, Dr. Volker Döring und Dirk Schwarzer danken.

Ohne die lieben 4707-Laborkollegen wäre es nur halb so schön gewesen: Ganz persönlicher Dank gilt Thomas Wendrich, Dr. Petra Köhler, Dr. Torsten Stachelhaus und später Sascha Dökel und Jürgen May. Was für eine Atmosphäre !!!

Der ganzen Marburger Arbeitsgruppe danke ich für die Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft, insbesondere den PPS-Kollegen Sascha Dökel, Dr. Dirk Konz, Dr. Axel Schneider, Jürgen May, Veit Bergendahl, Thomas Weber, Andrea Klens, Katrin „Tini“ Eppelmann, Uwe Linne, Mohammad Mofid, Peter Weitz sowie Thomas Wendrich und Dr. Wolfgang Klein. Inge Schüler danke ich für die freundliche technische Hilfe. Meinen Vertiefungsstudenten Henner Knust (danke auch für das Stecksymbol !) und Stephan Zahn danke ich für ihren Einsatz.

Für eine sehr lehrreiche Zeit in seinem Labor am Institut Pasteur danke ich sehr herzlich Herrn Dr. Philippe Marlière. Großer Dank gilt auch den weiteren Pariser Kollegen Dr. Volker Döring, Dr. Valérie de Crécy-Lagard, Dr. Alexandre Kaminski, Dr. Madéleine Bouzon und Jacques Bellalou.

Für die kritische und schnelle Durchsicht dieser Arbeit danke ich Sascha Dökel, Dr. Torsten Stachelhaus und Dirk Schwarzer.

Der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie bin ich zu Dank für die Förderung durch ein Doktorandenstipendium verpflichtet.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern meinen größten Dank aussprechen für ihre stete und großzügige Unterstützung, ohne die mein Studium so nicht möglich gewesen wäre. Ihnen widme ich diese Arbeit.